

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES



**ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES Y
SELECCIÓN DE MUESTRAS BIOACTIVAS CON POTENCIAL USO EN
INVESTIGACIÓN ORIENTADA AL DESCUBRIMIENTO DE UN MEDICAMENTO
PARA EL DENGUE**

SINDI ALEJANDRA VELANDIA CRUZ

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

Enero, 2017

**ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES
ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES Y
SELECCIÓN DE MUESTRAS BIOACTIVAS CON POTENCIAL USO EN
INVESTIGACIÓN ORIENTADA AL DESCUBRIMIENTO DE UN MEDICAMENTO
PARA EL DENGUE**

SINDI ALEJANDRA VELANDIA CRUZ

**Trabajo de grado como requisito para optar el título de
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas**

Orientadora: Raquel E Ocazonez J. PhD.

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

2017

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES**TABLA DE CONTENIDO**

Introducción	13
1. Objetivos.....	16
1.1 General	16
1.2 Específicos	16
2. Marco teórico	17
2.1 El dengue.....	17
2.2 Investigación en medicamentos	21
2.3 Productos naturales	23
3. Metodología.....	26
3.1 Materiales	27
3.2 Evaluación de actividades biológicas.....	30
3.2.1 Actividad citotóxica.....	30
3.2.2 Actividad antiviral	31
3.2.3 Efecto sobre la secreción de citoquinas	34
3.2.4 Efecto sensibilizante	34
3.3 Análisis de los datos	35
3.4 Consideraciones éticas	37

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

4. Resultados.....	39
4.1 Citotoxicidad.....	39
4.2 Actividad antiviral.....	45
4.4 Efecto sensibilizante:.....	50
5. Discusión.....	54
6. Conclusiones.....	60
Bibliografía.....	62
Apéndices.....	75

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES**LISTA DE TABLAS**

	Página
Tabla 1. Plantas incluidas en el estudio	29
Tabla 2. Perfil de citotoxicidad de AEs según valores de CC ₅₀ en dos ensayos	46
Tabla 3. Actividad antiviral de AEs sobre serotipos del VDEN evaluada en ensayos de reducción de NS1.	48
Tabla 4. Actividad antiviral del AE de <i>Cordia curassavica</i> sobre serotipos del VDEN en ensayos del ELISA <i>in situ</i> .	50
Tabla 5. Valores de concentración citotóxica 30 (CC ₃₀) de AEs sobre monocitos humanos (línea celular THP-1).	52
Tabla 6. Efecto sensibilizante de los AEs activos sobre VDEN evaluado en ensayos THP-1 / IL-8.	54

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Abordaje experimental seguido en el estudio.....	26
Figura 2. Curvas dosis-respuesta representativas obtenidas de ensayos de MTT. .	39
Figura 3. Susceptibilidad de las líneas celulares al tratamiento con AEs según curva dosis– respuesta.....	41
Figura 4. Susceptibilidad de las líneas celulares al tratamiento con los AEs según rango de CC ₅₀	41
Figura 5a. Perfiles de los AEs de baja y media citotoxicidad.	43
Figura 6. Actividad antiviral de AEs sobre VDEN-1 evaluada en ensayos de protección.....	46
Figura 7. Efecto inhibitorio de los AEs de <i>Cordia curassavica</i> y <i>Psidium sartorianum</i> sobre serotipos del VDEN en ensayos de reducción de NS1.	48
Figura 8 Actividad antiviral del AE de <i>Cordia curassavica</i> sobre serotipos del VDEN en el ensayo ELISA <i>in situ</i>	49
Figura 9. Efecto inhibitorio de AEs sobre la secreción de TNF- α e IL-8 por mononucleares de sangre periférica.	50
Figura 10. Inducción de IL-8 por compuestos sensibilizantes en monocitos humanos (THP-1).	52

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

TÍTULO: ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES Y SELECCIÓN DE MUESTRAS BIOACTIVAS CON POTENCIAL USO EN INVESTIGACIÓN ORIENTADA AL DESCUBRIMIENTO DE UN MEDICAMENTO PARA EL DENGUE¹

AUTORES: VELANDIA CRUZ, Sindi A.; OCAZIONEZ JIMÉNEZ, Raquel E²

PALABRAS CLAVE: dengue, aceites esenciales, antiviral, citoquinas, sensibilizante.

RESUMEN

Un medicamento eficaz para el dengue no se ha descubierto y se requieren nuevas fuentes de compuestos. El objetivo de este trabajo fue identificar aceites esenciales (AEs) de plantas de Colombia que sirvan como fuente primaria para descubrimiento de un antiviral y/o medicamento natural para el dengue. Se analizaron 50 muestras de AEs de 40 especies. Se siguió un protocolo guiado para seleccionar los menos citotóxicos, con mayor efecto antiviral e inhibitorio de citoquinas TNF- α e IL-8 y sin efecto sensibilizante a dermatitis de contacto. Se usaron ensayos en líneas celulares (MTT, Protección, Reducción-NS1, ELISA-*in-situ*, THP-1-IL-8) y un ensayo en cultivo primario de mononucleares de sangre periférica (MNSP). Se crearon perfiles de citotoxicidad usando una estrategia de jerarquización en base a valores de CC₅₀ (MTT) de ocho condiciones experimentales. Se generó un indicador de citotoxicidad (IC: ΣJ_{pi}) y los AEs se ordenaron de acuerdo a la citotoxicidad. Los 24 AEs menos tóxicos (IC > 4.0) se analizaron para actividad antiviral sobre un serotipo (Protección - VDEN-1): *Cordia curassavica*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum* y *Turnera difusa* presentaron la mayor actividad (protección > 50% a 100 $\mu\text{g/mL}$). De estos, *Cordia curassavica* y *Psidium sartorianum* presentaron actividad relevante (CI₅₀ < 44 $\mu\text{g/mL}$; IS: 1.5 – 14.3) sobre tres serotipos en el ensayo de Reducción-NS1, pero solo *Cordia curassavica* sobre los cuatro (CI₅₀: 18 - 26 $\mu\text{g/mL}$; IS: 6 -9) en el ensayo ELISA-*in-situ*. Los dos AEs más activos redujeron TNF- α (MNSP: 85.0 y 97.3%) e IL-8 (96.2 y 99.1%). Ningún AE activo presentó efecto sensibilizante, excepto *Piper marginatum* (TPH-1: IL-8 420 pg/mL vs. 142 pg/mL, control). El estudio demostró el potencial de plantas de Colombia para descubrimiento de medicamentos para el dengue. El AE de *Cordia curassavica* mostró el mayor potencial como fuente primaria seguido por *Psidium sartorianum*. Estos AEs pueden ser seleccionados para futuros estudios pre-clínicos.

1 Trabajo de grado

2 Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director Tesis RAQUEL E. OCAZIONEZ PhD.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

TITLE: STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS AND SELECTION OF BIOACTIVE SAMPLES WITH POTENTIAL USE IN RESEARCH FOR DISCOVERING A MEDICINE FOR DENGUE³

AUTHORS: VELANDIA CRUZ, Sindi A.; OCAZIONEZ JIMÉNEZ, Raquel E⁴

KEYWORDS: dengue, essential oils, antiviral, cytokines, sensitizing.

SUMMARY

An effective drug for dengue has not been discovered. New sources of compounds are required. The aim of this work was identify essential oils (EOs) from Colombian plants that could be used as primary sources for discovery of an antiviral or natural medicine for dengue. Fifty EOs from 40 plants species were analyzed. A guided protocol was followed to select EOs less cytotoxic, with the highest antiviral activity and inhibitory effect on cytokines TNF- α and IL-8, and without sensitizing effect to allergic contact dermatitis. Cell-line based assays (MTT, Protection, NS1-Reduction, *in-situ* ELISA, THP-1-IL-8) and a peripheral blood mononuclear cells (PBMC) based assay were used. Cytotoxicity profiles were created using a hierarchical strategy based on CC₅₀ values (MTT) of eight experimental conditions. A cytotoxicity indicator (CI: ΣJ_{pi}) was generated and the EOs were ordered according cytotoxicity. The 24 EOs less cytotoxic (CI > 4.0) were selected for evaluation of antiviral activities on one serotype (Protection - DENV-1): *Cordia curassavica*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum* and *Turnera difussa* showed the highest activities (protection > 50% at 100 μ g/mL). *Cordia curassavica* and *Psidium sartorianum* presented relevant activities (IC₅₀ < 44 μ g / mL; SI: 1.5 - 14.3) on three serotypes in the NS1-Reduction assay, but only *Cordia curassavica* was active on all four serotypes (IC₅₀: 18-26 μ g/mL; SI: 6-9) in the *in-situ*-ELISA assay. Both more active EOs reduced TNF- α (PBMC: 85.0 and 97.3%) and IL-8 (96.2 and 99.1%). None active EOs presented sensitizing effect, except *Pipier marginatum* (TPH-1: IL-8: 420 pg/mL vs. 142 pg/mL, control). This study demonstrated the potential of plants grown in Colombia for discovering of dengue drugs. *Cordia curassavica* EO showed the highest potential as a primary source followed by *Psidium sartorianum*. The active EOs could be selected for future pre-clinical trials.

³ Degree work

⁴ Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director Tesis RAQUEL E. OCAZIONEZ PhD

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

INTRODUCCIÓN

El dengue es causado por el virus del mismo nombre (VDEN) del cual existen cuatro serotipos que se transmiten a humanos por picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*. Afecta cerca de 100 países y se estima que 3.6 billones de personas en áreas endémicas están en riesgo (Guzman *et al.*, 2016). En las Américas, la enfermedad ha incrementado 30 veces en los últimos 15 años con epidemias más frecuentes en la última década. En 2013 se reportaron 2.3 millones de casos de los cuales 37,989 fueron severos y 1,319 fatales (Beesetti *et al.*, 2016; Guzman *et al.*, 2015). El impacto económico del dengue es notorio: el costo anual para las Américas (2000 – 2007) se estimó en 2.2 billones de dólares, para Asia (2001 – 2010) 1.2 billones y a nivel mundial 8.9 billones (Guzman *et al.*, 2016). El impacto económico podría ser mayor teniendo en cuenta el subregistro de casos y el costo por ausencia laboral.

El dengue es endémico en Colombia con una incidencia de 366.2 casos por 100.000 habitantes. Se estima que 23 millones de personas viven en áreas de riesgo. En 2016 se reportaron 103.822 casos de los cuales 40% (41.555 casos) presentaron signos de alarma y 1% fueron severos. En el mismo año se confirmaron 60 muertes y otras 229 se consideran probables (Sivigila, 2016). Colombia ocupó el primer lugar entre países de Latinoamérica con mayor número de muertes entre 2001 – 2007 (Castrillón *et al.*, 2015; Villar *et al.*, 2015). El impacto económico ha sido difícil de estimar: para 2012, Castro *et al.* (2015) estimaron en 202.3 y 497.9 dólares el costo en atención médica por caso ambulatorio y hospitalizaciones.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Las manifestaciones clínicas del dengue derivan de la presencia del virus en sangre y otros tejidos y del exacerbado nivel de citoquinas de respuesta inflamatoria, entre estas, el factor de necrosis tumoral alfa - TNF- α y la interleuquina 8 -IL-8 (Guzman et al., 2015). El tratamiento actual se limita a cuidados paliativos y fluidoterapia, y puede ser insuficiente en algunos casos llevando a mortalidad por choque hipovolémico (Guzman et al., 2016). Un medicamento eficaz no ha sido aún descubierto, la búsqueda se ha enfocado en un fármaco con al menos uno de estos modos de acción: i) que interrumpa la replicación del virus (antiviral); ii) que altere un proceso en la célula huésped clave para la sobrevivencia del virus (ej. estatinas); o iii) que aminore la acción de citoquinas y quimioquinas de respuesta inflamatoria (ej. corticosteroides). Numerosos compuestos químicos con distinto modo de acción se han descubierto y algunos mostraron eficacia terapéutica en algún modelo animal. Unos pocos se evaluaron en ensayos clínicos sin resultado prometedor para ser licenciados y otros se encuentran en proceso de evaluación (Beesetti *et al.*, 2016; Beesetti *et al.*, 2014; Canard, 2011).

La dificultad para descubrir un fármaco ha mostrado la necesidad de nuevas fuentes primarias de compuestos y los productos de plantas medicinales son una. Son bien conocidos los fármacos licenciados para varias enfermedades que fueron derivados de plantas (Atanasov *et al.*, 2015) y también numerosos medicamentos herbales que mejoran sustancialmente la salud y calidad de vida de quienes los usan (Dutra *et al.*, 2016; Pigili & Runja, 2013). Los AEs son productos de plantas que contienen al menos 20 compuestos distintos y esta propiedad los hace fuente de nuevos compuestos con actividad farmacológica. El Ministerio de Ambiente y Desarrollo

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Sostenible de Colombia reconoce la existencia de al menos 2404 especies de plantas usadas en la medicina tradicional. De estas, 1656 son nativas y sólo 12.5% han sido objeto de investigación (Bernal *et al.*, 2011). En el *Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales* (Ministerio de la Protección Social de Colombia, 2008) no se reporta uso medicinal para el dengue

La investigación del potencial farmacológico para el dengue de AEs ha sido muy escasa. Se encontraron solo cinco publicaciones de las cuales tres son de plantas de Colombia (Meneses *et al.*, 2009(a); Meneses *et al.*, 2009(b); Ocazonez *et al.*, 2010) y dos de Argentina (García *et al.*, 2003; García *et al.*, 2010). El conocimiento generado de estos estudios es de limitado alcance. En el presente estudio se usó un protocolo de ensayos en célula (*in vitro*) guiado hacia identificar AEs de plantas de Colombia con potencial farmacológico. Se incluyeron 50 muestras de 40 especies, de las cuales se estudiaron varias actividades biológicas: citotoxicidad, efecto antiviral (sobre todos los serotipos del VDENV), efecto inhibitorio de TNF- α e IL-8 (con papel en la patogénesis del dengue) y efecto sensibilizante a dermatitis de contacto (posible efecto adverso).

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

1. OBJETIVOS

General

Evaluar actividades biológicas de AEs de plantas de Colombia para identificar fuentes primarias para descubrimiento de medicamentos para el dengue.

Específicos

- Seleccionar AEs con baja citotoxicidad para células eucarióticas
- Seleccionar AEs con actividad antiviral *in vitro* sobre los cuatro serotipos del VDENV
- Determinar el efecto inhibitorio de AEs con actividad anti-DENV sobre la producción *in vitro* de TNF- α e IL-8
- Determinar el efecto sensibilizante a dermatitis alérgica de contacto de AEs activos

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El dengue

Curso clínico:

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por cualquiera de los cuatro serotipos del VDEN. El virus ingresa en el huésped a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes* y una vez en circulación logra infectar diferentes tejidos (Simmons *et al.*, 2012; Whitehorn & Simmons, 2011). Después de un periodo de incubación que puede durar de 3 a 7 días, los síntomas aparecen y se pueden identificar tres fases clínicas. Una fase inicial febril o virémica que generalmente está caracterizada por altas temperaturas ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), dolor de cabeza, vómito, mialgias, dolor muscular y en algunas ocasiones exantema maculopapular. En esta fase se alcanza el mayor pico de viremia que disminuye rápidamente hacia el quinto día de síntomas cuando inicia la fase crítica. En esta fase, se puede presentar incremento de la permeabilidad capilar con extravasación plasmática, hemoconcentración, coagulopatía y reducción en el número de plaquetas que pueden desencadenar en complicaciones más severas como choque hipovolémico. Los pacientes que no entran en fase crítica se recuperan entre 48 y 72 horas y entran en fase de convalecencia cuando progresivamente se estabilizan. Al inicio de la infección en el torrente sanguíneo se detectan linfocitos T activados y anticuerpos IgM e IgG dirigidos contra el virus.

El conocimiento del VDEN (estructura y replicación) y de la respuesta de defensa del huésped infectado, son bases que soportan la investigación para el descubrimiento de medicamentos. Esta información se detalla a continuación.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

El Virus:

El VDENV pertenece a la familia *Flaviviridae*, al género *Flavivirus*. Existe como cuatro serotipos (VDENV1 – 4) genéticamente diversos y con homología entre 60 – 75% de aminoácidos (Guzman & Harris, 2015). Su genoma es un ARN monocatenario de polaridad positiva con aproximadamente 11000 nucleótidos de longitud que codifica para diez proteínas. Tres proteínas estructurales (C: cápside, E: envoltura y M: membrana) que conforman el virión y siete proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) que son necesarias para la replicación, ensamblaje del virión y evasión de la respuesta inmune del infectado. El virión tiene cápside icosaédrica rodeada por una membrana externa derivada de la célula que se conoce como envoltura viral.

La glicoproteína E se encuentra expuesta sobre la superficie del virión, anclada en la envoltura viral y por esta localización posee dos funciones clave para la sobrevivencia del virus: puede unirse a varios receptores celulares para la internalización del virus al citoplasma por endocitosis y es un potente inmunógeno que estimula la producción de anticuerpos neutralizantes y activa la inmunidad celular. Por estas funciones biológicas, la proteína E es seleccionada como blanco en estudios para descubrimiento de fármacos y vacunas. Diferentes sitios de interés se han identificado y el bloqueo de estos puede interferir con el proceso de endocitosis del virus (De La Guardia & Leonart, 2014; Guzman et al., 2016; Whitehorn & Simmons, 2011; Yacoub, *et al.*, 2013).

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Las proteínas NS están localizadas en el citoplasma de la célula y conforman el complejo de replicación del ciclo viral. La proteína NS1 se sintetiza como un monómero que posteriormente se se dimeriza (Byron *et al.*, 2009; Simmons *et al.*, 2012; Whitehorn & Simmons, 2011). Se encuentra en tres formas: soluble en el torrente sanguíneo, anclada en la membrana citoplasmática y anclada en la membrana del retículo endoplasmático. Altos niveles de NS1 se encuentran en suero de pacientes en fase aguda y diversos estudios han mostrado su relación con los niveles de viremia y severidad. Por lo anterior, el nivel sanguíneo de la proteína NS1 se ha sugerido como parámetro para definir el grado de severidad del dengue. Por otro lado, se cree que altos niveles de NS1 potencian la respuesta inmune y favorecen la producción de citoquinas pro-inflamatorias durante el progreso de la enfermedad.

Resultados de varios estudios sugieren que el VDENV puede infectar monocitos, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, hepatocitos, entre otras células; así, puede unirse a distintos receptores celulares como ICAM-3, DC-SIGN, L-SIGN, heparan sulfato y receptor de manosa (Guzman *et al.*, 2016; Urcuqui *et al.*, 2010). Una vez el virus se ha unido al receptor celular la internalización al citoplasma se lleva a cabo por endocitosis. Dentro del endosoma, cambia la conformación de la proteína E debido al pH ácido y esto promueve la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma liberándose la cápside en el citoplasma. El ARN viral es traducido en una poliproteína que posteriormente es fragmentada por proteasas celulares y virales en las 10 proteínas mencionadas. Se sintetiza ARN genómico que se ensambla con proteínas estructurales para dar origen a nuevas partículas

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

virales (viriones). Este ensamblaje se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso donde el virión obtiene la envoltura con heterodímeros de proteína M-E anclados. El proceso de maduración del virión se da en el aparato de Golgi donde la proteína M experimenta fragmentación de una porción y esto promueve el cambio conformacional de la proteína E que le permitirá unirse al receptor celular. Los viriones infecciosos son liberados por exocitosis al torrente sanguíneo.

Respuesta de defensa del individuo infectado:

Las causas por las cuales una minoría de casos progresa a dengue severo no son bien conocidas. A la respuesta de defensa del infectado se le ha reconocido un papel preponderante (Simons *et al.* 2015; Yacoub *et al.*, 2013). Por ejemplo, ciertos anticuerpos que se unen al virus no lo neutralizan, más bien le sirven de puente para penetrar al interior de la célula debido a que se unen a receptores sobre la superficie. La activación de células del sistema inmune resulta en incremento notorio del nivel sanguíneo de citoquinas como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IL-18, RANTES, CCL2, CCL4, CXCL10, Cuando este incremento es exacerbado se conoce como tornado de citoquinas. El incremento de IL-6 e IL-8 se ha asociado con incremento de la permeabilidad vascular que lleva a derrame pleural y ascitis, daño hepático y trombocitopenia. Por otro lado, la carga viral también se considera factor determinante del incremento de citoquinas. Quimioquinas como IL-8 y RANTES incrementan incluso con carga viral baja, mientras niveles elevados de TNF- α e IL-1 β son más frecuentes cuando la carga viral es mayor (Simons *et al.* 2015; John *et al.*, 2015).

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

2.2 Investigación en medicamentos

Aún no se ha descubierto un fármaco eficaz para tratamiento farmacológico del dengue. Así, el tratamiento es de soporte enfocado a disminuir el riesgo de complicaciones clínicas y muerte. El manejo de la severidad se hace mediante monitoreo exhaustivo de signos de choque hipovolémico y reposición de líquidos intravenosos. El descubrimiento del fármaco se viene intentando desde hace al menos 50 años y son múltiples los estudios realizados. Un medicamento ideal sería aquel que sea seguro y fácilmente suministrado a la población general: de administración oral, que contribuya a disminuir la carga de la enfermedad (menos casos) sobre el sistema de salud y que el uso permanente reduzca la transmisión del virus en áreas endémicas (menos infectados).

A continuación se resume el conocimiento sobre el descubrimiento de medicamentos reportado en las revisiones más recientes de expertos con reconocimiento mundial (Alen & Schols, 2012; Beesetti *et al.*, 2016; Limet *et al.*, 2015; Whitehorn *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2015).

Se han descubierto docenas de moléculas sintéticas que inhiben *in vitro* la actividad de varias proteínas del virus (NS3, E, NS5, NS4), pero la mayoría se han evaluado sobre un solo serotipo del virus. Además solo unas pocas se evaluaron en ratón AG129, el único disponible para investigación en antivirales, que presenta varias limitaciones, entre estas, la patología que el virus causa en el ratón es distinta a la del humano. De las pocas moléculas activas evaluadas en ratón, la mayoría se abandonaron debido a que no presentaron características de pro-fármaco en base a propiedades fisicoquímicas, permeabilidad celular, biodisponibilidad, toxicidad y eficacia. En este escenario de fracasos, surgieron los ensayos clínicos con fármacos licenciados

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

para tratamiento de la hepatitis C (causada por otro *flavivirus*) como balapavir y ribavirina (inhibidores de la replicación del ARN viral). Los dos fármacos presentaron baja eficacia: el tratamiento de pacientes no disminuyó la viremia ni los síntomas del dengue.

La necesidad de reducir el tornado de citoquinas de respuesta inflamatoria ha soportado también el descubrimiento de medicamentos para el dengue. La eficacia clínica de corticosteroides y esteroides, licenciados para tratamiento de varias enfermedades, se ha evaluado en múltiples estudios por cerca de 25 años. Hasta la fecha los resultados son desalentadores. Numerosos estudios con prednisolona reportan baja eficacia clínica dado que el tratamiento no resultó en reducción del nivel de citoquinas a las dosis suministradas. Se presume que parte del fracaso se deba a que el tratamiento se instauró tardíamente. Así, se espera el reporte de nuevos estudios con otros inmuno-moduladores administrados en estadios más tempranos de la enfermedad.

La afectación de vías celulares necesarias para la replicación del virus se ha considerado otra estrategia para descubrimiento de medicamentos. La producción de viriones en el retículo endoplásmico depende del contenido de colesterol y la actividad de enzimas celulares α -glucosidasas. Ambos son indispensables para el ensamblaje de la envoltura viral y para la glicosilación de la proteína E. La lovastatina es un medicamento usado para controlar el nivel sanguíneo de colesterol y tiene además actividad antiinflamatoria y estabilizadora del endotelio vascular. Varios inhibidores de α -glucosidasas se han descubierto, uno de los más activos *in*

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

vitro es celgosivir. En ensayos clínicos no se evidenció eficacia de tratamiento con lovastatina ni con colgosivir: la viremia no se redujo ni las manifestaciones clínicas se aminoraron.

2.3 Productos naturales

Los productos naturales se consideran fuente de nuevos compuestos con potencial farmacológico. También son fuente de recursos para la económica de un país porque la producción de fármacos se sustenta en los cultivos de plantas. No obstante, han sido desestimados debido a que de ellos se presume alta toxicidad y por lo mismo no se seleccionan para estudiar las actividades biológicas en detalle. Este preconceito ha reducido la variedad de fuentes primarias para descubrir medicamentos para el dengue.

Se estima que alrededor del 80% de la población en regiones de Asia y África dependen de la medicina tradicional como fuente primaria para el cuidado de la salud (WHO, 2008). De otra parte, cerca de 50% de los medicamentos disponibles actualmente derivan o están basados en productos naturales (Atanasov et al., 2015). Diferentes reportes han descrito el potencial activo de plantas medicinales como antioxidantes, anti-inflamatorias e inmunomoduladoras y por lo tanto se ha descrito que ayudan a reducir el dolor, la inflamación y el estrés oxidativo. Al menos 31 especies de plantas con potencial medicinal para tratar el dengue se encuentran reportadas pero no todas se han incluido en estudios científicos (revisado en Abd Kadir *et al.*, 2013). Entre estas plantas se incluyen *Carica papaya*, *Lippia alba* y *Lippia citriodora* que son de uso

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

medicinal en Colombia (*Vademecum de Plantas Medicinales*, Ministerio de la Protección Social de Colombia, 2008).

La búsqueda de un antiviral para el dengue se ha intentado analizando extractos de plantas (revisado en Beesetti *et al.*, 2014). La piperina, un compuesto derivado de *Piper nigrum*, se descubrió como potente inhibidor de la proteasa NS3 del VDEN. Otro fitoquímico de *Scutellaria baicalensis*, conocido como baicalein (5,6,7-trihidroxi-flavona) inhibió la replicación de VDEN-2 en células de riñón de mono. Al parecer el compuesto puede inactivar directamente al virus e interrumpir la replicación intracelular. Sood y colaboradores (2015) reportaron actividad del extracto alcohólico de *Cissampelos pereira* sobre los cuatro serotipos en modelos *in vitro* y animal. El extracto también mostró efecto inhibidor sobre citoquinas pro-inflamatorias. El tratamiento con una mezcla de atermisina, de *Artemisia annua*, y berberina, de plantas *Berberis*, fue usada para tratar pacientes con dengue con resultados prometedores: mitigó los síntomas previniendo desarrollo de la forma clínica severa.

Además de los extractos, otro de los derivados de plantas medicinales de interés en la investigación de antivirales son los AEs. Son metabolitos secundarios sintetizados en cualquier parte de planta (hojas, semillas, raíces, corteza, etc), altamente volátiles, que le proporcionan el olor aromático a la planta. Se estima que un AE puede contener entre 20 – 60 componentes y esta cantidad y composición química puede variar dependiendo del suelo, época del año, temperatura, edad y etapa del ciclo vegetativo de la planta (Bakkali *et al.*, 2008). Los AE son usados para la fabricación de cosméticos, perfumes, remedios, productos de aseo y como

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

aditivos en alimentos (Perricone *et al.*, 2015). Las propiedades medicinales son ampliamente conocidas: actividad antiséptica, antimicrobiana, anti-inflamatoria, sedante, anestésica, espasmolítica, entre otras. La actividad está estrechamente relacionada con la composición química.

El uso medicinal de AE como formulaciones de mezcla ha sido reconocido con varias patentes (Sienkiewicz *et al.*, 2012). Las patentes US6824795 y US6319958 son productos para tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos; la patente US7150888 es un producto a base de AE de eucalipto y árbol de té para prevenir enfermedades respiratorias. La patente US7807202 es AE del árbol de té con algunos aditivos mineralizados para tratar lesiones de piel causadas por el Virus del Papiloma Humano y el Virus Herpes Simplex. El medicamento licenciado conocido como Acheflan (Aché laboratorios, Brasil) es una crema anti-inflamatoria a base de AE de *Cordia verbenácea*.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

3. METODOLOGÍA

En el presente estudio se utilizaron distintos ensayos basados en célula (*in vitro*) para identificar AEs con potencial uso como fuente primaria para descubrimiento de medicamentos para el dengue. Se siguió un abordaje experimental en cuatro etapas (Figura 1). Etapa I, se evaluó la actividad citotóxica de 50 muestras y se seleccionaron las 24 menos activas. Etapa II (Antiviral I), las 24 muestras se evaluaron para efecto inhibitorio sobre un serotipo del virus y se seleccionaron las 4 más activas. Etapa III, las 4 muestras se analizaron para: efecto inhibitorio sobre otros dos serotipos del virus en otro ensayo; efecto sobre la producción de TNF- α e IL-8; efecto sensibilizante a dermatitis alérgica. Etapa IV, los 2 AEs con mayor actividad antiviral se analizaron para efecto inhibitorio sobre los cuatro serotipos en un ensayo distinto a los usados en las etapas anteriores.

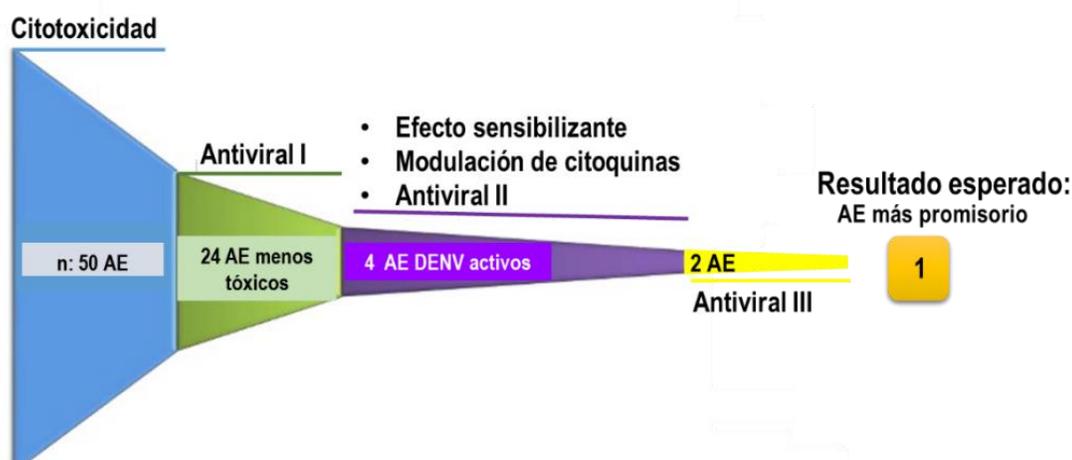


Figura 1. Abordaje experimental seguido en el estudio

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

3.1 Materiales

Plantas:

Se incluyeron 40 especies distintas (Tabla 1), algunas con más de un ejemplar (*Lippia origanoides*: 5; *Turnera diffusa*: 3; *Ageratina popayanensis*: 2; *Tagetes caracasana*: 2; *Calycolpus moritzianus*: 2; *Wedelia calycina*) distinto con respecto a fecha y/o sitio de colecta.

Tabla 1. Plantas incluidas en el estudio.

Familia	Nombre	Voucher: COL-
Asteraceae	<i>Ageratina aff. popayanensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.	579422
	<i>Ageratina popayanensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.	582607
	<i>Austroepatorium inulaefolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.	587130
	<i>Baccharis decussata</i> (Klatt) Hieron	582606
	<i>Baccharis trinervis</i> Pers.	587092
	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.	583919
	<i>Elaphandra quinquenervis</i> (S.F Blake) H. Rob.	587094
	<i>Senecio sp*</i>	587133
	<i>Tagetes caracasana</i> Kunth	587125
	<i>Wedelia calycina</i> Rich.	578353
Boraginaceae	<i>Wedelia cf. stuebelii</i>	587093
	<i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	559446
Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	582595
Fabaceae	<i>Dalea sp*</i>	Estéril
	<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel.	582604
Lamiaceae	<i>Eriope crassipes</i> Benth.	578966
	<i>Hyptis brachiata</i> Briq.	582531
	<i>Salvia aratocensis</i> (J.R.I. Wood & Harley) Fern. Alonso	517740
	<i>Salvia officinalis</i> L	555844
	<i>Satureja viminea</i>	566449

*: En proceso la identificación de especie.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Tabla 1. Continuación.

Familia	Nombre	Voucher: COL-
Myrtaceae	<i>Calycolpus moritzianus</i> (O.Berg) Burret	578360
	<i>Psidium sartorianum</i> (O. Berg) Nied.	578359
Piperaceae	<i>Piper aduncum</i> L.	587136
	<i>Piper cumanense</i> Kunth.	578977
	<i>Piper dilatatifolium</i> Trel. & Yunck	578975
	<i>Piper eriopodon</i> (Miq.) C. DC	578364
	<i>Piper holtonii</i> C.DC.	582357
	<i>Piper marginatum</i> Jacq.	578365
	<i>Piper medium</i> Jacq.	583968
	<i>Piper subflavum</i> var. <i>Espejuelanum</i>	578976
Poaceae	<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) W.Watson	587116
	<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle	578357
Rutaceae	<i>Swinglea glutinosa</i> Merr.	521530
Turneraceae	<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	578361
Verbenaceae	<i>Lantana cf. canescens</i> Kunth	587108
	<i>Lantana colombiana</i> López-Pal.	582328
	<i>Lippia alba</i> (citrál) Mill.	512272
	<i>Lippia graveolens</i> Kunth	555839
	<i>Lippia micromera</i> Schauer	578971
	<i>Lippia origanoides</i> H.B.K	582599

Estéril: Identificación incompleta por ausencia de parte reproductiva.

La colecta de las plantas estuvo a cargo de investigadores del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) y se realizó en áreas rurales y semiurbanas de los departamentos de Santander, Valle del Cauca y Arauca. La identificación taxonómica de la planta fue realizada por el Dr. José Luis Fernández de la Universidad Nacional (UNAL; Bogotá) y una muestra con un número de *voucher* se depositó para referencia en el Herbario de la UNAL.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

AEs:

Se incluyeron 50 muestras de las 40 especies. Las muestras fueron suministradas por la profesora Elena Stashenko, Directora del Centro de Investigaciones en Biomoléculas (CIBIMOL) de la UIS. Para la extracción del AE se utilizó arrastre por vapor e hidrodestilación asistida por radiación de microondas como está publicado (Stashenko *et al.*, 2004). De cada muestra se hizo una preparación concentrada (1×10^5 $\mu\text{g/mL}$) en dimetilsulfóxido (DMSO) y alícuotas de esta preparación se almacenaron a -20°C . Para cada experimento se usó una alícuota de la misma preparación.

Líneas celulares:

Se usaron cinco líneas celulares obtenidas de la colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP. De origen humano: HEK293 (ATCC ® CRL-1573™, riñón embrionario); HEPG-2 (ATCC® CRL-11997™, hígado); THP-1 (ATCC ® TIB.202™, monocitos). Las dos primeras se cultivaron en medio DMEM-F12 [GIBCO Co.] suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF [GIBCO, Co.]) y antibiótico (P/E: Penicilina/Estreptomicina [Invitrogen Carlsbad, CA.]). Las células THP-1 se cultivaron en medio RPMI [GIBCO Co.] con 10% de SFB. De origen animal:

VERO (ATCC ® CCL-81™; riñón de mono) que se cultivó medio MEM (GIBCO) suplementado con 8% de SBF y P/E. Las células B16F10 (ATCC ® CRL-6475™, melanoma de ratón) se cultivaron en medio RPMI-1640 [GIBCO Co.] con 10% de SBF y P/E.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Cultivo primario de mononucleares de sangre periférica humana (MNSP):

Las células MNSP se obtuvieron de sangre periférica de donantes sanos. Sangre heparinizada se diluyó en igual proporción con medio RPMI 1640 (Gibco Co.) y solución Ficoll-Hipaque (Histopaque® Sigma Aldrich). La mezcla se centrifugó a 2800 rpm durante 30 minutos y la fase superior se descartó. La fase intermedia que contenía las células se colectó, lavó dos veces con PBS y el precipitado celular se resuspendió en medio RPMI. Las células se contaron en cámara de Neubauer y luego se sembraron, en cada pozo de una placa de cultivo de 24, a concentración de 1×10^6 células/ mL para ser tratadas con AE

V DEN:

Se usaron cepas de referencia de cada serotipo de la colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP: VDEN-1 (Hawaii), VDEN-2 (Nueva Guinea), VDEN-3 (H-87) y VDEN-4 (H-241). De cada uno se hizo una preparación de trabajo producida en células *Aedes albopictus* (clon C6/36). El título viral (ufp/mL) de la preparación se estimó en el ensayo convencional de plaqueo (Meneses *et al.*, 2009). La preparación se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -80°C .

3.2 Evaluación de actividades biológicas

3.2.1 Actividad citotóxica

El efecto del AE sobre la viabilidad celular se evaluó sobre cuatro líneas celulares (HEK293, HEPG2, VERO y B16F10) en el ensayo del MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

difeniltetrazolio) y siguiendo el protocolo del laboratorio (Ocazionez *et al.*, 2010). Se hicieron dos tratamientos: antes de la proliferación (a), el AE se adicionó en el momento de sembrar las células en el soporte; después de la proliferación (d), el AE se adicionó 24 h después de la siembra cuando la monocapa celular tenía confluencia de 70 – 80%. Brevemente, las células se crecieron en placas de 96 pozos por 72 h a 37°C, en medio de cultivo que contenía distintas concentraciones de AE (50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL). Luego el medio se descartó, se adicionaron 20 µL (5 mg/mL) de MTT en cada pozo y las placas se incubaron 4 h a 37°C cuando el medio se descartó nuevamente y 100 µL de DMSO se adicionaron para solubilizar los cristales de formazán. La intensidad del color de la reacción se midió por espectofotometría (Multiskan Go [Thermo Scientific]) a DO de 580 nm. Células tratadas con DMSO a diferentes concentraciones y células no-tratadas se incluyeron como controles. Cada AE se evaluó por duplicado en tres ensayos independientes. El valor de DO se consideró proporcional a la viabilidad celular la cual se estimó para cada muestra referente al 100% de las células no tratadas (control). Los datos se analizaron como se describe adelante.

3.2.2 Actividad antiviral

Ensayo de protección de la infección viral:

En este ensayo la actividad antiviral del AE se interpreta como protección de muerte celular causada por la replicación del virus. Se optimizó un protocolo usando como referencia el descrito por Busschots *et al.*, 2015. Brevemente, VDEN-1 diluido (MOI: 0.5) en medio de cultivo que contenía AE (30 y 100 µg/mL) se adsorbió a monocapas de células VERO crecidas

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

24 h en placas de 48 pozos. Luego de 1 h de incubación a 37°C, se retiró el AE y se adicionó medio de cultivo fresco. La replicación del virus se permitió 5 días a 37°C en atmósfera de CO₂ 5% y después las células se tiñeron con colorante vital (200 µL x pozo de cristal violeta al 1%). Cada muestra se evaluó por triplicado en dos ensayos independientes cada uno con controles: células infectadas / no-tratadas, células tratadas / no-infectadas y células no-infectadas / no-tratadas. Las monocapas celulares teñidas se observaron al microscopio de luz corriente y se tomaron 6 fotografías al azar. El análisis de las fotografías se describe adelante.

Ensayo de reducción de proteína viral NS1:

Se usaron células HEPG-2 (hepatocitos humanos) las cuales producen virus y secretan NS1 (Alen & Schols, 2012). El hepatocito se considera célula blanco durante la infección natural por VDEN (Guzman *et al.*, 2016). Se siguió el protocolo del laboratorio como fue publicado (Pájaro *et al.*, 2015). Brevemente, VDEN (MOI: 0.5) se adsorbió 1 h sobre células crecidas en placas de 96 pozos por 24 h, luego se adicionó medio de cultivo que contenía AE (10 – 50 µg/mL) y la replicación del virus se permitió 72 h. La concentración (unidades PanBio) de NS1 en el medio se determinó con un estuche comercial (Pan-E Dengue EARLY ELISA™, PanBio) del ELISA. Ribavirina (100 µM) se incluyó como antiviral de referencia. En cada ensayo se corrieron controles (células no-infectadas / no-tratadas y células infectadas /no-tratadas). Los datos de densidad óptica (DO) se analizaron como se detalla adelante.

Inmunoensayo in situ ligado a enzima (ELISA):

Se usaron células VERO (riñón de mono) las cuales son altamente susceptibles a la infección por VDEN. Se optimizó un protocolo usando como referencia el ensayo de microneutralización

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

descrito por Vorndam & Beltran (2002). Para la optimización se tuvieron en cuenta parámetros como tiempo de incubación, densidad celular por pozo, proporción virus: célula (MOI), tiempo de fijación de las células a la placa, concentración de anti-suero y anticuerpo secundario. Se adoptó el protocolo experimental con el cual se obtuvieron con el control (virus sin tratamiento) valores de densidad óptica (405 nm) entre 1.0 - 1.7, luego de 5 días de incubación a 37°C. Brevemente el ensayo consistió en: VDEN se adsorbió 1 h sobre células (5×10^4 x pozo) cultivadas en placas de 96 pozos y la replicación se permitió 5 días a 37°C en medio que contenía concentraciones de AE (1, 10, 15, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$). Al término, el medio se retiró y las células se fijaron con solución metanol:acetona (1:1) durante 30 minutos a -20°C. Luego se realizaron 5 lavados con PBS. La presencia de antígeno viral se analizó por ELISA usando anticuerpo contra VDEN obtenido en ratón (líquido ascítico hiperinmune) y anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en cabra que se ligó a enzima peroxidasa (Kirkegaard and Perry, Gaithersberg, USA). Después de varios lavados para retirar los anticuerpos, se adicionó substrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) dejando incubar 1h a temperatura ambiente hasta aparición de color. La intensidad del color se leyó en un espectrofotómetro (Thermo Fischer Scientific, USA) a 405 nm. En cada ensayo se corrieron controles (células no-infectadas / no-tratadas y células infectadas /no-tratadas. Ribavirina (100 μM) se incluyó como antiviral de referencia. Los datos de DO se analizaron como se detalla adelante.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

3.2.3 Efecto sobre la secreción de citoquinas

TNF- α e IL-8 son blanco de terapia para dengue debido a que incrementan notoriamente durante la fase febril contribuyendo al choque hipovolémico (Guzman *et al.*, 2016; Pawitan, 2011). Células MNSP secretan estas citoquinas cuando se exponen a lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Hui *et al.*, 2014). Para evaluar si los AEs podrían inhibir la secreción de TNF- α e IL-8, se optimizó un ensayo en MNSP expuestos a LPS. Brevemente, las células (5×10^5 /mL) se sembraron en placa de 24 pozos en medio de cultivo que contenía LPS de *Escherichia coli* (O55:B5) y AE (30 μ g/mL) y la placa se incubó 24 h a 37°C en atmósfera de CO₂. La concentración de citoquina se determinó por ELISA usando estuches comerciales (Invitrogen, KHC3011 y KHC0081). Células no-tratadas (sin LPS ni AE) y células tratadas con LPS pero no con AE se corrieron como controles. Efecto inhibitorio se consideró cuando la concentración (pg/mL) de citoquina en células expuestas a LPS y tratadas con AE fue menor ($p < 0.05$) comparada con el control (células expuestas no-tratadas). Los datos se analizaron como se detalla adelante.

3.2.4 Efecto sensibilizante

La tendencia a causar dermatitis alérgica de contacto (DAC) es uno de los parámetros a evaluar para identificar efectos adversos por uso de AEs y otros preparados herbales (Edris, 2007). Compuestos sensibilizantes incrementan la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la expresión de marcadores de activación inmune en células presentadoras de antígeno (Parise *et al.*, 2015). El incremento de IL-8, como indicador temprano de respuesta inmune innata, se

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

reconoce como indicador de sensibilización a DAC (Kaplan *et al.*, 2012; Nukada *et al.*, 2012; Miyazawa *et al.*, 2007). Monocitos de origen humano, estimulados *in vitro* con LPS producen IL-8 a concentración fácilmente detectable y por esta propiedad se usan en ensayos que evalúan el efecto sensibilizante de compuestos de interés (Mitjans *et al.*, 2010; Nukada *et al.*, 2008; Parise *et al.*, 2015) .

Para conocer el efecto sensibilizante a DAC de los AE se optimizó un protocolo en células THP-1 (monocitos humanos) usando como referencia el descrito por Nukada *et al.*, 2008. Para la optimización se emplearon compuestos con y sin efecto sensibilizante (detalles en resultados). El ensayo consistió brevemente en: células sembradas en placas de 48 pozos se expusieron o no al compuesto sensibilizante o AE durante 24 h y luego la concentración de IL-8 en el medio de cultivo se determinó por ELISA usando un estuche comercial (Invitrogen KHC0081). Cada AE se evaluó por duplicado en dos ensayos independientes y en cada uno se incluyeron controles (células tratadas con sensibilizante y LPS como inductor de IL-8 y células sin tratamiento). Efecto sensibilizante se consideró cuando la concentración de IL-8 en células expuestas al AE fue mayor ($p < 0.05$) comparada con la del control (células no-expuestas). Los datos se analizaron como se detalla adelante.

3.3 Análisis de los datos

Citotoxicidad: los datos de DO generados en los ensayos del MTT se usaron para estimar la concentración de AE que redujo 50% la viabilidad celular o CC_{50} usando el programa R (R

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Development Core Team, 2013; libre acceso usando el portal <https://www.rstudio.com/>). Con los valores de CC_{50} de las ocho condiciones experimentales (cuatro líneas celulares y dos tratamientos) se construyó una matriz de datos con el programa Excel. Para identificar los AE con menor tendencia a toxicidad se usó una estrategia de jerarquización de la actividad que fue publicada (Velandia., *et al* 2016) y se detalla en resultados.

Antiviral – ensayo de protección: las fotografías de las monocapas celulares se procesaron con el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, USA, libre acceso usando el portal: <https://imagej.nih.gov/ij/>) y se obtuvo la fracción de área oscura (FA) o de células viables (teñidas) sin infección viral productiva. La actividad antiviral se expresó como porcentaje de protección (PP) de muerte celular (daño causado por el virus) que se calculó con la siguiente fórmula: $PP = [FA \text{ células infectadas-tratadas} - FA \text{ células infectadas-no tratadas}] / [FA \text{ células no infectadas} - FA \text{ células infectadas-no tratadas}] \times 100$. Valores de PP igual o mayores a 30% se adoptaron como parámetro de actividad.

Antiviral – ELISA (NS1 e in situ): los valores de DO se usaron para estimar la concentración de proteína viral NS1 la cual se expresó en Unidades Panbio de acuerdo al fabricante del estuche. Se estimó el porcentaje de NS1 del tratamiento *versus* 100% del no-tratado. Para el ELISA *in situ*, los valores de DO se consideraron proporcional a la concentración de antígeno (replicación del virus) y se usaron para estimar el porcentaje de reducción en el tratado con respecto al 100% del no-tratado. Los porcentajes se usaron para construir curvas dosis-respuesta y generar los

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

valores de la concentración que inhibió 50% la replicación viral o CI_{50} . Se estimó el índice de selectividad (IS) que correspondió a CC_{50}/CI_{50} . Valores de $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ e $IS \geq 4.0$ se adoptaron como parámetros de actividad relevante.

Efecto inhibitorio sobre citoquinas: los valores (pg/mL) de TNF- α e IL-8 en cultivos tratados con AE se compararon con los valores en cultivos no-tratados y la significancia de la diferencia se estimó por ANOVA usando el software R.

Definición de fuente primaria: un AE se consideró fuente primaria para descubrimiento de medicamentos para el dengue cuando presentó actividad antiviral relevante ($CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ e $IS \geq 4.0$) en dos ensayos distintos y redujo significativamente la secreción de TNF- α e IL.8.

3.4 Consideraciones éticas

Este estudio está anidado al proyecto # 4 del programa “*Estudio Integral de Especies Aromáticas y Medicinales Tropicales Promisorias para el Desarrollo Competitivo y Sostenible de la Agroindustria de Esencias, extractos y derivados naturales en Colombia*” de la Unión Temporal BioRed / Colciencias / CENIVAM (UT-BioRed-Co-CENIVAM). El proyecto es liderado por la profesora Raquel Ocazonez y el programa por la profesora Elena Stashenko. El programa es financiado por Colciencias y está registrado bajo el código 550754331904-31893 El material vegetal utilizado para ejecutar el programa es proveído por el Estado Colombiano

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

mediante contrato suscrito entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM (Contrato # 01, Junio 03, 2014).

El presente estudio se considera sin riesgo para la salud humana debido a que no se realizó sobre humanos. Para obtener células MNSP se obtuvo sangre de voluntarios sanos usando el procedimiento rutinario en Laboratorios Clínicos y cada donante firmó el consentimiento como lo solicita el Comité de Ética de la UIS.

En la ejecución de los experimentos se cumplieron normas de bioseguridad para investigación científica: Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia: resolución 008430 de 1993, decreto 2164 de 1992 y la Ley 10 de 1990. OMS: Capítulo I. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

4. RESULTADOS

4.1 Citotoxicidad

Las curvas dosis-respuesta de los ensayos del MTT se agruparon en clases dependiendo del ajuste a un modelo de regresión logístico simple (Figura 2): clase 1, con ajuste ($P_{[Wald]} < 0.05$); clase 2, sin ajuste ($P_{[Wald]} > 0.05$) las cuales se dividieron en clase 2a cuando se observó reducción de la viabilidad en 90 – 100% a las menores concentraciones del AE y clase 2b cuando la reducción fue menor que 50% a cualquier concentración. Se observó mayor proporción de AEs con curvas clase 1 (buen ajuste) cuando el tratamiento se hizo antes que después de la proliferación: 71 vs. 58%. De las curvas dosis – respuesta se generaron los valores de CC_{50} . Cuando no fue posible se asignó la mínima (50 $\mu\text{g/mL}$) o máxima (500 $\mu\text{g/mL}$) concentración evaluada (Tabla 1 y 2, suplementarias).

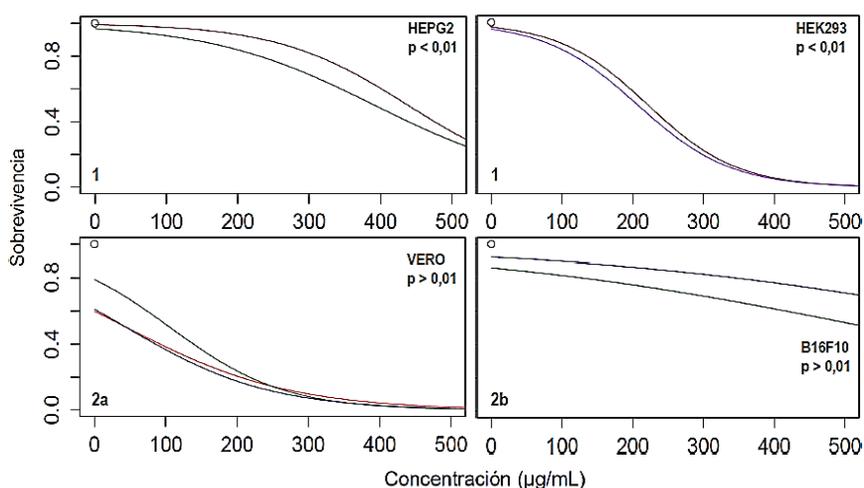


Figura 2. Curvas dosis-respuesta representativas obtenidas de ensayos de MTT. Las células se trataron con AE a las concentraciones indicadas y se determinó la viabilidad con respecto al control (no tratado) 72 h después. HEK293, HEPG2, VERO, B16F10: líneas celulares como se detalla en Metodología. El valor p se calculó con la prueba de Wald y refleja el ajuste a un modelo de regresión logístico simple. 1, 2a y 2b se refiere a la clase de curva (texto) y cada color de la línea corresponde a un aceite esencial.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Existe evidencia que la citotoxicidad de una muestra varía considerablemente dependiendo del tipo de célula y la forma como se hace el tratamiento (Weyermann, Lochmann, & Zimmer, 2005; Xia et al., 2008). Para identificar cuáles líneas celulares fueron las más y menos susceptibles en cada tratamiento con los AEs se usaron dos parámetros:

1) Porcentaje de AEs que presentaron curva dosis-respuesta clase 2b (no hubo reducción de la viabilidad celular > 50% a ninguna concentración del AE): cuanto menor el porcentaje mayor la susceptibilidad de la línea celular. El orden de mayor a menor fue el siguiente (Figura 3): tratamiento a, VERO (2%) > HEK293 (6%) \approx B16F10 (6%) > HEPG2 (10%); tratamiento d, HEK293 (0%) > VERO (2%) > B16F10 (4%) > HEPG2 (6%). Los resultados indican que las células de riñón humano (HEK293) y de mono (VERO) fueron las más susceptibles y las de hígado humano (HEPG2) las menos.

2) Valores de CC₅₀ indicando grado de citotoxicidad (criterios de Cos *et al*, 2006; Ferraz *et al*, 2013): baja, 351 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; media, 201 – 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$; alta, 100 – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; muy alta, < 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cuanto mayor el porcentaje de AEs con valores CC₅₀ < 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mayor la susceptibilidad de la línea celular. El orden de mayor a menor fue el siguiente (Figura 4): tratamiento a, B16F10 (16%) > VERO (14%) > HEK293 (2%) \approx HEPG2 (2%); tratamiento d, VERO (32%) > B16F10 (30%) > HEK293 (22%) > HEPG2 (18%). Los resultados indican que las células de riñón de mono (VERO) fueron las más susceptibles y las de hígado humano (HEPG2) las menos.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

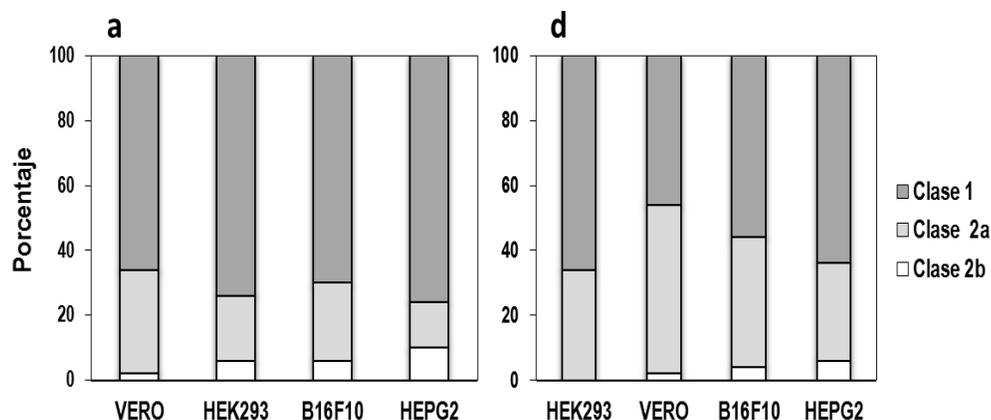


Figura 3. Susceptibilidad de las líneas celulares al tratamiento con AEs según curva dosis-respuesta. Cuanto menor el porcentaje de curvas 2b mayor la susceptibilidad de la línea celular. Tratamiento (a) antes y (d) después de la proliferación celular. HEK293, HEPG2, células humanas de riñón e hígado, respectivamente. VERO, B1610: células de riñón de mono y piel de ratón, respectivamente.

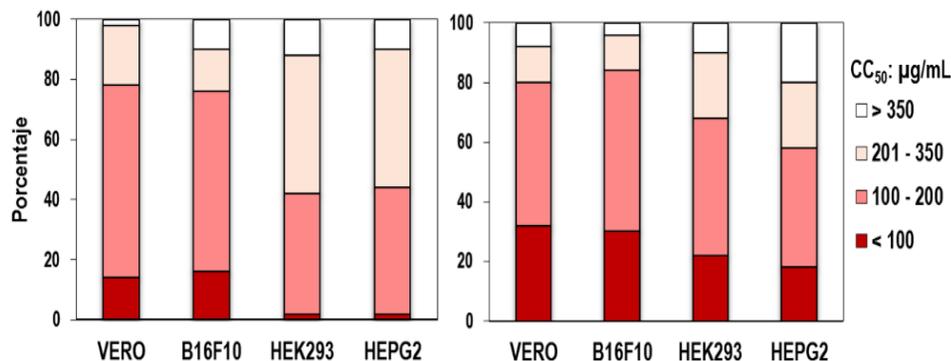


Figura 4. Susceptibilidad de las líneas celulares al tratamiento con los AEs según rango de CC_{50} . Cuanto mayor porcentaje de AEs con valores $< 100 \mu\text{g/mL}$ mayor la susceptibilidad. Tratamiento (a) antes y (d) después de la proliferación celular. HEK293, HEPG2, células humanas de riñón e hígado, respectivamente. VERO, B1610: células de riñón de mono y piel de ratón, respectivamente.

Jerarquización de la actividad citotóxica:

Actualmente no se cuenta con un valor numérico que refleje el grado de citotoxicidad de una muestra de planta acorde con resultados del ensayo del MTT. En consecuencia, se usó una

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

estrategia de jerarquización para generar ese valor el cual se denominó indicador de citotoxicidad (IC). Para esto se usó el siguiente algoritmo:

- Ponderación por puntos de las líneas celulares. Más puntos para células de origen humano por ser de mayor interés toxicológico y más para las de hígado por resultar las más resistentes. De las animales, más puntos para las de ratón por resultar las más resistentes. La ponderación (P) fue de la siguiente manera: HEPG2, 40; HEK293, 20; B16F10, 30; VERO, 10.
- Jerarquización por condición experimental (una línea celular y un tratamiento): con cada AE se aplicó la fórmula: $J_{Pi} = (CC_{50} \times r / CM) \times P$, donde $r = 5$ como referente común, CM es la concentración máxima del AE y P es el valor de ponderación de la línea celular.
- Cálculo del IC: sumatoria de valores de J_{Pi} (8 condiciones experimentales: 4 líneas x 2 tratamientos).

Perfiles de citotoxicidad:

Los valores IC se ordenaron de mayor a menor y se obtuvieron los perfiles de citotoxicidad de las muestras en el panel de células (Figura 5a y b). $IC > 5$, entre 4.9 - 3.5 y < 3.5 se consideraron, respectivamente, baja, media y alta citotoxicidad. Valores IC correspondieron con valores de CC_{50} de $> 250 \mu\text{g/mL}$, 150 - 250 $\mu\text{g/mL}$ y $< 150 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, en la mayoría de las condiciones experimentales. De las 50 muestras analizadas, 12 (24%) presentaron perfil de citotoxicidad baja, 17 (34%) media y 21 (42%) alta. Con muestras de la misma planta, la citotoxicidad fue distinta o similar: *Lippia origanoides*, baja (n = 3 muestras) y alta (n = 2

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

muestras); *Ageratina popayanensis*, *Turnera diffusa* y *Wedelia calycina* una baja y otra alta; con *Calycolpus moritzianus* y *Tagetes caracasana* fue similar.

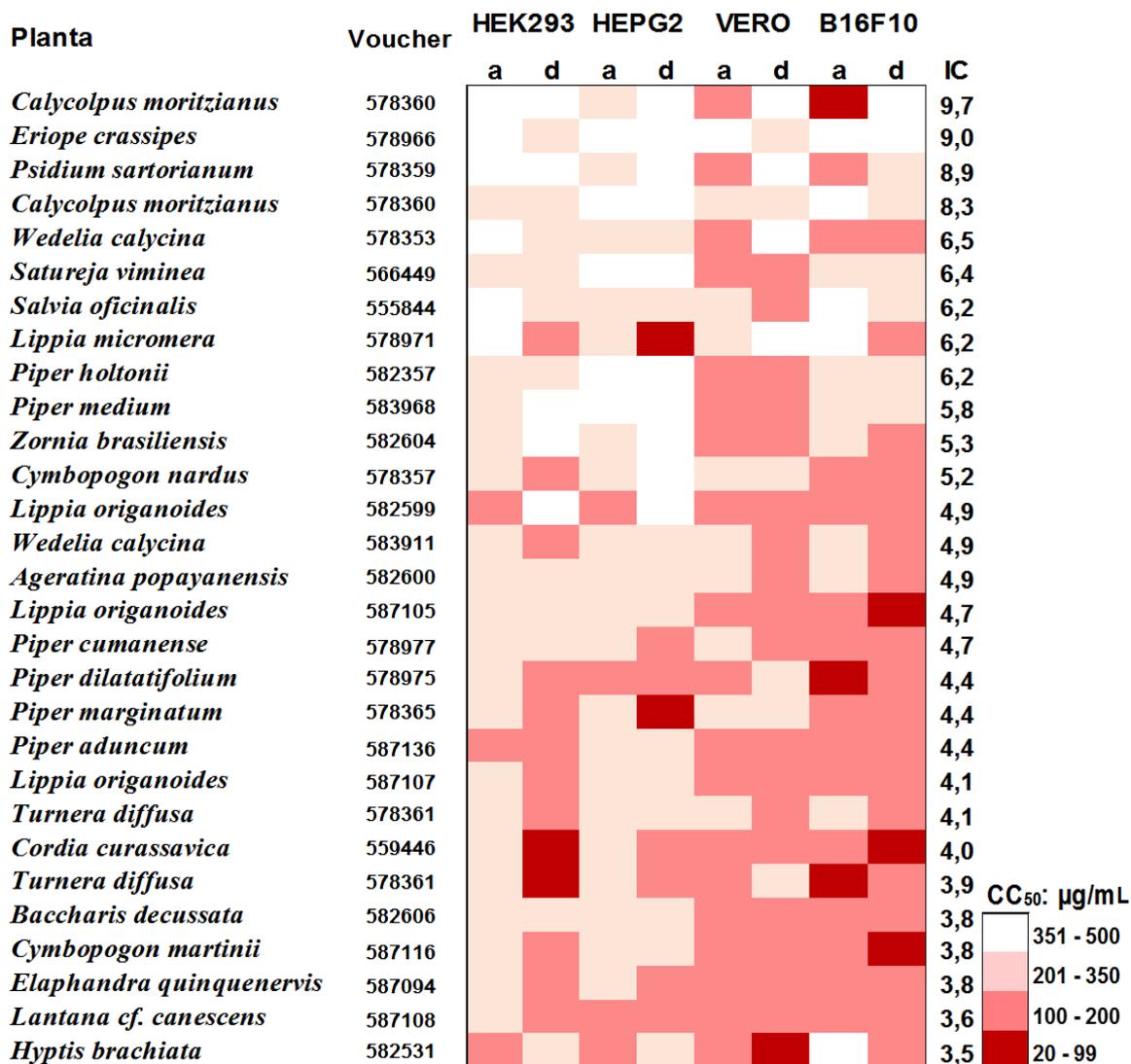


Figura 5a. Perfiles de los AEs de baja y media citotoxicidad. Las muestras se organizaron de menor a mayor citotoxicidad con base en los valores del índice citotoxicidad (IC) derivados de valores de CC₅₀. Cuanto mayor la intensidad del color mayor citotoxicidad. Líneas celulares de riñón (HEK293 y VERO), hígado (HEPG2) y piel (B16F10) tratadas (a) antes y (d) después de la proliferación.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

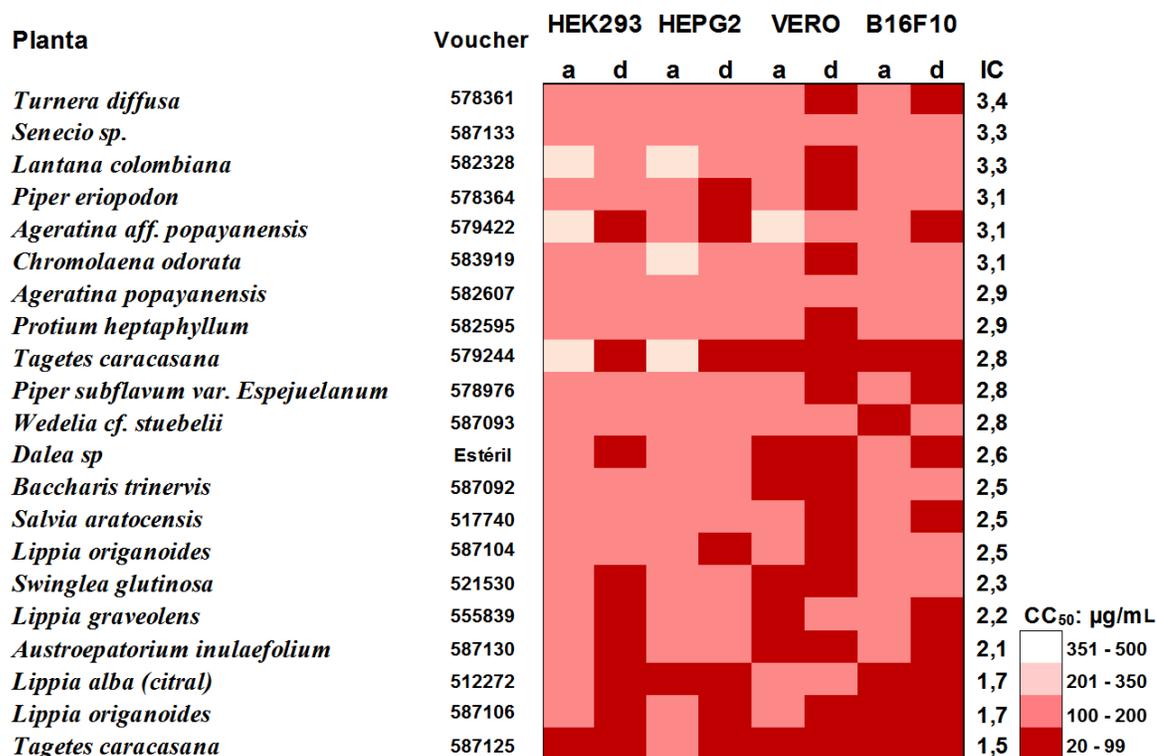


Figura 5b. Perfiles de los AEs de alta citotoxicidad. Las muestras se organizaron de mayor a menor citotoxicidad con base en los valores del índice citotoxicidad (IC) derivados de valores de CC₅₀. Cuanto mayor la intensidad del color mayor citotoxicidad. Líneas celulares de riñón (HEK293 y VERO), hígado (HEPG2) y piel (B16F10) tratadas (a) antes y (d) después de la proliferación.

Para evaluar si la citotoxicidad por MTT varía en otro ensayo, 7 AEs con perfiles bajo, medio y alto se analizaron en el ensayo de rojo neutro sobre la línea celular más susceptible (VERO). Este ensayo evalúa la integridad de la membrana celular mientras que el del MTT la actividad de una enzima (Weyermann *et al.*, 2005). Se compararon entre si los valores de CC₅₀ y se consideraron similares cuando indicaron el mismo perfil de citotoxicidad (Tabla 2). Los AEs de *Ageratina popayanensis* y *Tagetes caracasana* presentaron el mismo perfil pero fue discordante con los otros: medio vs. alto para *Calycolpus moritzianus*, *Piper subflavum var.*

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Esp y *Cordia curassavica*; y bajo vs. alto para *Calycolpus moritzianus* y *Psidium sartorianum*.

Estos resultados sugieren que el AE puede afectar un parámetro específico de la viabilidad celular o varios de ellos.

Tabla 2. Perfil de citotoxicidad de AEs según valores de CC₅₀ en dos ensayos.

AE: planta	Voucher: COL_	Rojo neutro	MTT	Perfil
<i>Tagetes caracasana</i>	579244	< 50.0	56 ± 19.4	Alto
<i>Ageratina popayanensis</i>	582607	84 ± 47.8	112 ± 48.1	Alto
<i>Calycolpus moritzianus</i>	578360	109 ± 51.9	216 ± 43.8	Discordante
<i>P. subflavum</i> var. <i>Esp.</i>	57896	157 ± 152.0	86 ± 59.4	Discordante
<i>Cordia curassavica</i>	559446	52 ± 71.9	155 ± 55.6	Discordante
<i>Calycolpus moritzianus</i>	578360	< 50.0	> 500.0	Discordante
<i>Psidium sartorianum</i>	578359	< 50.0	488 ± 97.1	Discordante

Células VERO se trataron después de la proliferación con AE (500, 400, 300, 200, 100 y 50 µg/mL) durante 72 h. La viabilidad se determinó por los dos métodos. Datos de CC₅₀ en µg/mL y son el promedio dos experimentos independientes por duplicado. Perfil según el ensayo del MTT como se describe en el texto. Discordante: medio vs. bajo o bajo vs. alto.

4.2 Actividad antiviral

Se evaluaron 24 AEs con perfiles de citotoxicidad baja y media (Figura 5a) siguiendo el protocolo guiado que se detalló en metodología (Figura 1). Las muestras se analizaron para actividad sobre VDEN-1 a concentración de 30 y 100 µg/mL en el ensayo de protección y valores de PP ≥ 30% se consideraron relevantes (Figura 6). El 62.5% (n = 15) de las muestras presentaron actividad relevante (PP: 30 - 49%) a 100 µg/mL y de estas, *Cordia curassavica*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum* y *Turnera diffusa* también a 30 µg/mL. AEs de *Piper holtonii*, otra muestra de *Turnera diffusa*, *Baccharis decusata*, *Calycolpus moritzianus*, *Wedelia calycina*, *Ageratina*

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

popayanensis, *Ageratina aff popanayensis*, *Piper dilatatifolium*, *Piper medium* e *Hyptis brachiata* resultaron activos solo a 100 $\mu\text{g/mL}$. Los restantes 9 AEs se consideraron inactivos (PP < 30% a 100 $\mu\text{g/mL}$)

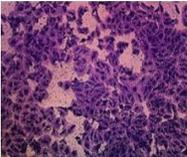
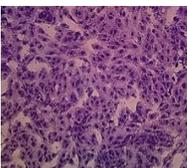
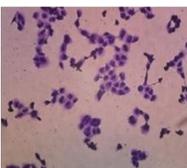
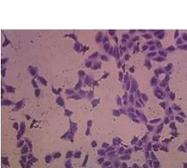
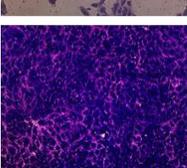
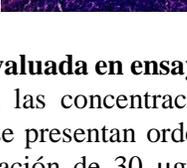
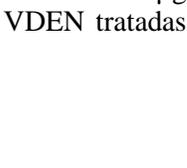
Protección: %	Planta	Voucher COL:	$\mu\text{g/mL}$:			
			30	100		
≥ 50	<i>Cordia curassavica</i>	559446	■	■		<i>Cordia curassavica</i>
30-49	<i>Piper marginatum</i>	578365	■	■		
<30	<i>Psidium sartorianum</i>	578359	■	■		<i>Piper marginatum</i>
	<i>Turnera diffusa</i>	578361	■	■		
	<i>Turnera diffusa</i>	578361	■	■		<i>Hyptis brachiata</i>
	<i>Ageratina popayanensis</i>	582600	■	■		
	<i>Tagetes caracasana</i>	559441	■	■		<i>Lippia origanoides</i>
	<i>Hyptis brachiata</i>	582531	■	■		
	<i>Piper holtonii</i>	582357	■	■		<i>Baccharis decussata</i>
	<i>Lippia origanoides</i>	587105	■	■		
	<i>Lippia origanoides</i>	587107	■	■		<i>Wedelia calycina</i>
	<i>Baccharis decussata</i>	582606	■	■		
	<i>Calycolpus moritzianus</i>	578360	■	■		<i>Piper dilatatifolium</i>
	<i>Wedelia calycina</i>	583911	■	■		
	<i>Ageratina aff. popayanensis</i>	579422	■	■		<i>Piper medium</i>
	<i>Piper dilatatifolium</i>	578975	■	■		
	<i>Piper medium</i>	583968	■	■		<i>Lippia micromera</i>
	<i>Lippia origanoides</i>	582599	■	■		
	<i>Wedelia calycina</i>	578353	■	■		<i>Zornia brasiliensis</i>
	<i>Lippia micromera</i>	578971	■	■		
	<i>Piper aduncum</i>	587136	■	■		<i>Piper cumanense</i>
	<i>Zornia brasiliensis</i>	582604	■	■		
	<i>Piper cumanense</i>	578977	■	■		<i>Calycolpus moritzianus</i>
	<i>Calycolpus moritzianus</i>	578360	■	■		

Figura 6. Actividad antiviral de AEs sobre VDEN-1 evaluada en ensayos de protección. Virus (MOI de 0.3) se adsorbió la célula en presencia de AE a las concentraciones mostradas. Detalles del procedimiento se describen en Metodología. Los AEs se presentan ordenados desde el más al menos activo en base al porcentaje de protección a concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$. Se presentan fotografías representativas de monocapas celulares infectadas con VDEN tratadas y no tratadas con AE que se usaron para análisis con el software ImageJ.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

En el descubrimiento de medicamentos para el dengue se espera que la fuente primaria presente actividad relevante sobre los cuatro serotipos del VDEN. Los AEs de *Cordia curassavica*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum* y *Turnera diffusa* se analizaron en el ensayo de reducción de NS1 usando cepas virales serotipos 1, 2 y 4. Los AEs de *Cordia curassavica* y *Psidium sartorianum* presentaron valores de $CI_{50} < 44 \mu\text{g/mL}$ para dos de los tres serotipos, mientras que los otros AEs inhibieron solo VDEN-4 y a concentración $< 50 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 3, Figura 7). En todos los casos, los valores de CI_{50} fueron menores a la CC_{50} resultando en IS de 1.4 y 14.3.

El AE de *Cordia curassavica* se seleccionó para confirmar actividad antiviral en el ensayo ELISA *in situ* (Figura 8). Se observó efecto inhibitorio sobre los cuatro serotipos a CI_{50} entre 18 y 25 $\mu\text{g/mL}$ e IS entre 6 y 9 (Tabla 4). El AE de *Psidium sartorianum* se evaluó a concentraciones no-citotóxicas (1.5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) y no se observó reducción de la replicación viral a la máxima concentración (DO: 1.798 vs 1.729 del control).

Tabla 3. Actividad antiviral de AEs sobre serotipos del VDEN evaluada en ensayos de reducción de NS1.

AE: planta	CC_{50} : $\mu\text{g/mL}$	VDEN-1: CI_{50} (IS)	VDEN-2: CI_{50} (IS)	VDEN-4: CI_{50} (IS)
<i>Cordia curassavica</i>	106.2	70 ± 14.4 (1.5)	38 ± 16.8 (2.8)	10 ± 1.5 (10.6)
<i>Psidium sartorianum</i>	500.0	44 ± 0.8 (11.3)	98 ± 13.9 (5.1)	35 ± 13.6 (14.3)
<i>Turnera diffusa</i>	100.9	60 ± 17.0 (1.7)	*	37 ± 11.6 (2.7)
<i>Piper marginatum</i>	66.1	$> 50^*$	*	36 ± 10.8 (1.8)

Datos de CI_{50} derivados de curvas dosis – respuesta expresada en $\mu\text{g/mL}$. IS: índice de selectividad = CC_{50} / CI_{50} . Valores de $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ e $IS \geq 4.0$ indican actividad relevante. Los resultados son promedio de tres experimentos realizados por duplicado \pm DS. *: no calculada: no se observó reducción de NS1 a la mayor concentración usada en el ensayo (100 $\mu\text{g/mL}$).

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

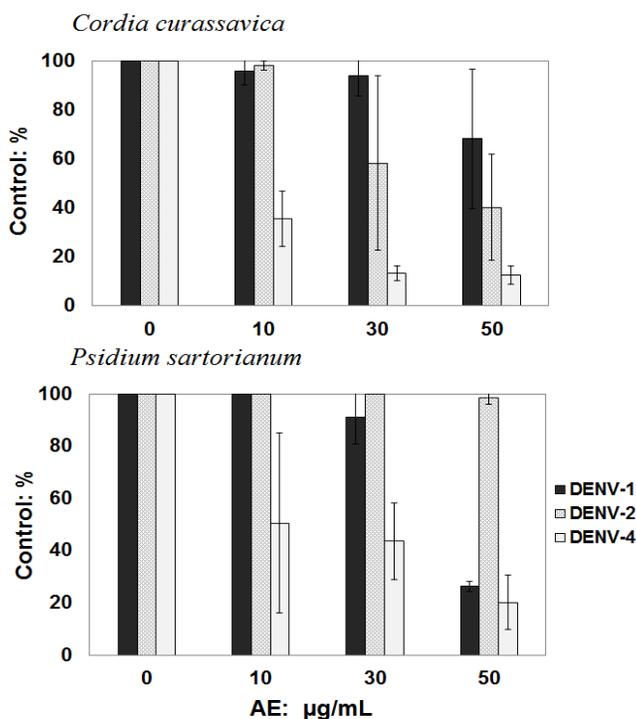


Figura 7. Efecto inhibitorio de los AEs de *Cordia curassavica* y *Psidium sartorianum* sobre serotipos del VDENV en ensayos de reducción de NS1. Se representan actividad dependiente de la concentración para estimar los valores CI_{50} de la Tabla 3. Control (no-tratado): 56.4 ± 15.8 unidades de NS1

Tabla 4. Actividad antiviral del AE de *Cordia curassavica* sobre serotipos del VDENV en ensayos del ELISA *in situ*.

Serotipo	CI_{50} : $\mu\text{g/mL}$	$\acute{I}S$: CC_{50} / CI_{50}
VDENV-1	26 ± 6.1	6.0
VDENV-2	24 ± 4.3	6.4
VDENV-3	18 ± 3.4	8.6
VDENV-4	26 ± 8.3	6.0

CC_{50} : $155.1 \mu\text{g/mL}$. Datos de CI_{50} derivados de curvas dosis-respuesta de dos ensayos independientes por triplicado. Valores de $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ e $IS \geq 4.0$ indican actividad relevante.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

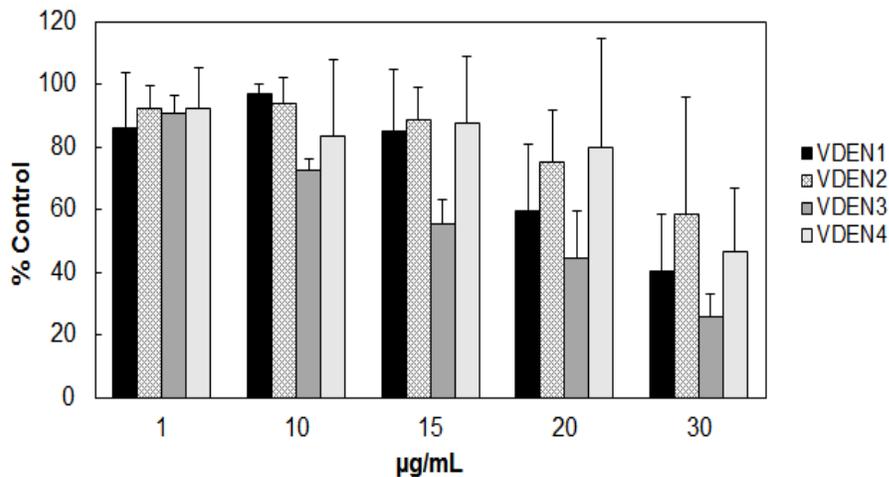


Figura 8 Actividad antiviral del AE de *Cordia curassavica* sobre serotipos del VDEN en el ensayo ELISA *in situ*. Se presenta el porcentaje de reducción de la replicación viral con respecto al control (100%: DO \geq 1.0) a las concentraciones mostradas del AE. Los resultados son promedio \pm DS de tres experimentos realizados por duplicado.

4.3 Actividad sobre TNF- α e IL-8:

Con el fin de conocer el potencial de los AEs de *Cordia curassavica*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum* y *Turnera diffusa* para aminorar la producción de TNF- α e IL-8, se usó un ensayo con células humanas de sangre periférica estimuladas con LPS (Figura 9). *Cordia curassavica* y *Piper marginatum* inhibieron, respectivamente, 85.5% (1640 vs 213; $p = 0.006$) y 96.2% (1640 vs 681; $p = 0.003$) la concentración de TNF- α en el sobrenadante del cultivo. Con los dos AEs la inhibición fue mayor comparada con el medicamento de referencia dexametazona (71.8%, $p = 0.019$). Con respecto a IL-8, se observó inhibición cercana a 100% en contraste con dexametazona que fue 51.2% (Figura 9); no obstante, la diferencia con respecto al control no fue significativa

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

(14284 vs 281= 0.114 para *Cordia curassavica*) posiblemente debido a la baja reproducibilidad de los ensayos (reflejada en amplia desviación estándar).

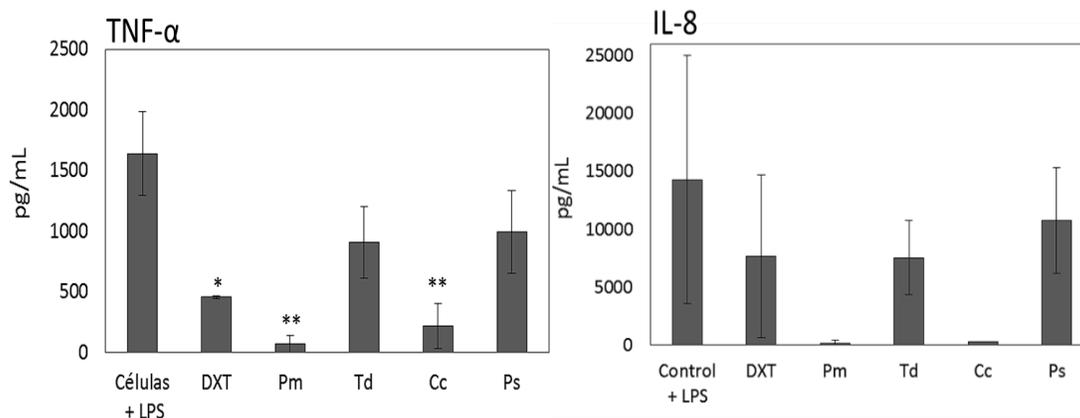


Figura 9. Efecto inhibitorio de AEs sobre la secreción de TNF- α e IL-8 por mononucleares de sangre periférica. Células estimuladas con LPS se trataron 24 h con AE (30 $\mu\text{g/mL}$) y la concentración de citoquina se cuantificó por ELISA. Células tratadas con el fármaco de referencia (dexametazona: DTX) se incluyeron como controles. AEs: Pm, *Piper marginatum*; Td, *Turnera difusa*; Cc, *Cordia curassavica*; Ps, *Psidium sartorianum*. ***: $p < 0,0001$, **: $p 0,01 - 0,001$, *: $p 0,01 - 0,05$ (ANOVA, Tukey).

4.4 Efecto sensibilizante:

Para conocer si los AEs poseen actividad sensibilizante para dermatitis por contacto, las cuatro muestras activas sobre VDEN se analizaron en el ensayo de THP-1 / IL-8. Inicialmente se determinó la concentración de cada AE que reduce la viabilidad del cultivo celular en 30% (CC_{30}). Esta concentración se considera no-toxica pero estimula la célula a producir IL-8 si el compuesto tiene efecto sensibilizante (Nukada *et al.*, 2008; Mitjans *et al.*, 2010). La Tabla 5 presenta los valores de CC_{30} para cada AE.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Tabla 5. Valores de concentración citotóxica 30 (CC₃₀) de AEs sobre monocitos humanos (línea celular THP-1).

AE: planta	Voucher	CC ₃₀ µg/mL
<i>Cordia curassavica</i>	COL559446	77 ± 80.7
<i>Psidium sartorianum</i>	COL578359	124 ± 58.7
<i>Piper marginatum</i>	COL578365	< 50.0
<i>Turnera diffusa</i>	COL578361	< 50.0

Valores derivados de curvas dosis-respuesta en ensayos del MTT. Células en placa de 96-pozos se cultivaron en medio que contenía AE (500, 400, 300, 200, 100, 50 µg/mL) por 24 h. Los datos son el promedio ± DS de tres experimentos independientes hechos por duplicado.

Optimización del ensayo TPH-1 / IL-8:

Se usaron compuestos de referencia con efecto sensibilizante de distinto grado (Nukada et al., 2008; Parise et al., 2015): fuerte, 2-aminofenol - AM y Glutaraldehído - GLU; moderado, isoeugenol – ISO; débil, eugenol - EU. Como control negativo (sin actividad) se incluyó glicerina (GLI) y como control positivo LPS (inductor de IL-8). Se hicieron experimentos para establecer el tiempo de exposición tratando las células 8, 12 y 24 h (Figura10): se detectó incremento de IL-8 en todos los tiempos en las células tratadas con LPS siendo notoriamente mayor a las 24 h; no se detectó incremento con GLI incluso a concentración tan alta como 2000 µg/mL. El tratamiento con AM causó incremento significativo de IL-8 en todos los tiempos pero fue mayor a las 24 h ($p = 0.022, 0.014$ y 0.0003 para 8, 12 y 24 h, respectivamente). Los tratamientos con GLU, ISO y EU no causaron el incremento esperado de IL-8. Con base en estos resultados, se adoptó 24 h como tiempo de tratamiento y se seleccionó el AM como control positivo.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

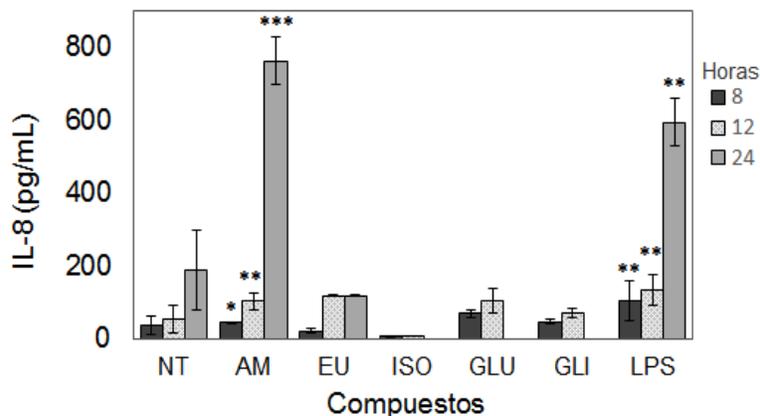


Figura 10. Inducción de IL-8 por compuestos sensibilizantes en monocitos humanos (THP-1). Las células ($5 \times 10^5/\text{mL}$) se sembraron en placas de 24 pozos en medio que contenía compuesto (CC_{30}) y a los tiempos mostrados se determinó la concentración de IL-8 en el medio de cultivo usando un estuche del ELISA. AM, 2-aminofenol; EU, eugenol; ISO, isoegenol; GLU, glutaraldehído. Glicerina (GLI) y lipopolisacárido bacteriano (LPS) se usaron como control negativo y positivo respectivamente. NT, células no-tratadas. Los resultados son promedio de dos experimentos independientes por duplicado. (***) $p < 0.0001$, (**) $p: 0.01 - 0.001$, (*) $p: 0.01 - 0.05$ (ANOVA, Turkey).

Actividad sensibilizante de los AEs:

Los cuatro AEs que presentaron actividad sobre el VDEN fueron evaluados a CC_{30} (Tabla 6). Sólo el AE de *Piper marginatum* incrementó ($p: 0.03$) tres veces la secreción de IL-8 respecto al control (células no tratadas), sugiriendo posible efecto sensibilizante a DAC por aplicación tópica. El AE de *Cordia Curasavica* incrementó 2 veces IL-8 pero la diferencia no fue significativa ($p = 0.36$). Con los AEs de *Psidium sartorianum* y *Turnera diffusa* no se observó incremento.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Tabla 6. Efecto sensibilizante de los AEs activos sobre VDEN evaluado en ensayos THP-1 / IL-8.

AEs:	IL-8: pg/mL	P
<i>Cordia curassavica</i>	276 ± 105	0.36*
<i>Piper marginatum</i>	420 ± 10.0	0.03*
<i>Psidium sartorianum</i>	401 ± 325.1	0.89**
<i>Turnera diffusa</i>	551 ± 322.3	0.99**
Controles: ensayo 1 / ensayo 2		
Sin tratamiento	142 ± 4.2 / 692 ± 171	
2-aminofenol	510 ± 71.0 / 1158 ± 208.7	0.007 / 0.58
LPS bacteriano	549 ± 76.7 / 1044 ± 227,1	0.004 / 0.97

Controles: se presentan valores promedios los dos ensayos independientes. Valor de significancia (P) por ANOVA - *post hoc* Turkey: *: comparado con el control (sin tratamiento) del ensayo 1. **: Comparado con el control del ensayo 2.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

5. DISCUSIÓN

El dengue afecta cerca de 390 millones de personas alrededor del mundo y a la fecha no se cuenta con un antiviral para tratamiento farmacológico eficaz. Aunque en las últimas décadas se descubrieron decenas de inhibidores sintéticos del virus, ninguno presentó la eficacia protectora esperada cuando se evaluó en animales o humanos (Beesetti *et al.*, 2014 y 2016). Así, se requiere encontrar nuevas fuentes de compuestos y los derivados de plantas son una de ellas (Abd Kadir *et al.*, 2013; Ngo *et al.*, 2014). Al menos 50% de los medicamentos licenciados para tratamiento de otras enfermedades están basados en compuestos encontrados en una planta medicinal (Atanasov *et al.*, 2015). El contexto descrito constituyó la base racional del presente estudio. Se siguió un protocolo guiado hacia identificar plantas de Colombia cuyo AE presente actividades biológicas para ser considerado fuente primaria para descubrimiento de medicamentos para el dengue.

La citotoxicidad es un parámetro usado para seleccionar fuentes primarias para descubrimiento de fármacos; se considera que refleja, en medida aceptable, la tendencia de una muestra a producir efectos tóxicos en el humano (Xia *et al.*, 2008). Aún no hay acuerdo sobre el indicador para categorizar la citotoxicidad observada con el ensayo del MTT y esto en parte se debe a variaciones del procedimiento técnico como célula empleada y forma de tratamiento (Tonder *et al.*, 2015; Velandia *et al.*, 2016). Con material vegetal se ha propuesto que valores de $CC_{50} < 100$ ug/mL, sugieren alta citotoxicidad (Cos *et al.*, 2006). En este estudio se generaron perfiles de citotoxicidad en base a valores de CC_{50} en un panel de ensayos del MTT y la estrategia sirvió

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

para seleccionar las muestras menos citotóxicas. Esta estrategia podría considerarse confiable dado que: los perfiles no variaron notoriamente al cambiar valores de ponderación de la línea celular o tratamiento (datos no mostrados) y el resultado con algunos AEs fue similar al reportado en estudios por otros. Por ejemplo, el AE de *Calycolpus moritzianus* resultó de baja citotoxicidad y así reportaron Yañez *et al* (2009) con 40 muestras de esta misma planta; el de *Tagetes caracasana* resultó de alta citotoxicidad concordante con su reconocida actividad como anti-proliferante de células cancerosas (Ayyadurai *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2016).

Es conocido que la citotoxicidad del AE depende de su composición química y que ésta varía entre muestras de la misma planta (Sarrazin *et al.*, 2015). Terpenos como p-cimeno, timol, geraniol, carvacrol y β -felandreno son componentes mayoritarios del AE de *Lippia origanoides* de Colombia (Stashenko *et al.*, 2013). En este estudio, los AEs de esta planta presentaron distinto perfil de citotoxicidad (bajo, medio o alto) y esto podría explicarse por concentración distinta de componentes como timol y carvacrol. Garcia *et al* (2006) y Maisanaba *et al* (2015) reportaron baja citotoxicidad del AE con alto contenido de timol; y estos mismos autores y Cabello *et al* (2014) reportaron alta citotoxicidad del AE con alto contenido de carvacrol. El ocimeno y tagenona son componentes mayoritarios del AE de *Tagetes caracasana* que fue el más citotóxico en este estudio (Armas *et al.*, 2012).

En el descubrimiento de un medicamento para el dengue se espera que una fuente primaria (química o natural) posea efecto inhibitorio sobre los cuatro serotipos con la misma potencia.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

De otra parte, se considera que un inhibidor sintético tiene potencial antiviral si disminuye al menos 50% la concentración de virus en sangre (Beesetti et al., 2016). De los 24 AEs analizados, los de *Cordia curassavica*, *Turnera diffusa*, *Psidium sartorianun* y *Piper marginatum* presentaron actividad anti-VDEN relevante ($CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ e $IS > 4$); sin embargo, *Cordia curassavica* fue el único con actividad sobre los cuatro serotipos. En México y Brasil, infusiones de estas plantas se usan para tratar distintas dolencias y en varios estudios se ha demostrado que extractos o AEs de estas plantas poseen actividad antibacteriana, antimicótica antiinflamatoria y analgésica (Andrade et al., 2008; Bezerra et al., 2016; D'Angelo et al., 1997; De Carvalho et al., 2004; Delgado-Vargas et al., 2006; Passos et al., 2007; Szewczyk & Zidorn, 2014). Estas plantas no están listadas en el *Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales* (Ministerio de salud y Protección Social de Colombia, 2008). No obstante, de *Cordia curassavica* y *Turnera diffusa* se reporta uso medicinal; de *Psidium sartorianum* y *Piper marginatum* no se encontró información documentada pero sí de otras especies de los mismos géneros (Bernal et al., 2011). Luego de revisar varias bases de datos no se encontraron publicaciones reportando efecto anti-VDEN del AE o el extracto de estas especies crecidas en Colombia.

La producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias se considera un factor de riesgo para dengue severo (Byron et al., 2009; Guzman et al., 2016) y un medicamento que aminore esta producción es una alternativa de tratamiento. El AE de *Cordia curassavica* inhibió al menos 80% la secreción de TNF- α e IL-8 en células MNSP y no indujo la secreción de IL-8 en el

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

ensayo con células THP-1. Estos hallazgos sugieren que el AE tiene efecto modulador de citoquinas pero no efecto sensibilizante para dermatitis alérgica de contacto. Varios estudios reportan el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto de *Cordia* sobre TNF- α y otras citoquinas pro-inflamatorias (Fernandes *et al.*, 2007; Medeiros *et al.*, 2007; Pimentel *et al.*, 2012); el AE de la planta es el componente mayoritario de la crema Acheflan producida en Brasil y que se usa para tratamiento de inflamaciones localizadas (Dutra *et al.*, 2016; Passos *et al.*, 2007). Los resultados de este y los otros estudios animan a realizar estudios sobre eficacia clínica del AE de *Cordia curassavica* para tratamiento el exantema y prurito que sufren los pacientes con dengue, estos síntomas resultan de la respuesta inmune exacerbada (Guzman *et al.*, 2016; Malavige *et al.*, 2012).

El modo de acción del AE de *Cordia curassavica* podría inferirse de los tipos de ensayos usados en este estudio para evaluar actividad antiviral. En el de protección, la presencia del AE al momento de adsorber el virus a la célula redujo la muerte celular y esto refleja afectación de la infectividad del virus. La afectación podría deberse a que el AE ocupa los receptores celulares a los cuales el virus se liga y/o enmascara la envoltura viral impidiendo que se fusione con la membrana de la célula para internalización en el citoplasma. Varios estudios respaldan este supuesto (Bakkali *et al.*, 2008; Edris, 2007; García *et al.*, 2010) y este modo de acción se pudo concluir en un estudio previo del grupo con AE de *Lippia alba* (Ocazonez *et al.*, 2010). Los resultados de los ensayos de reducción de NS1 y ELISA *in situ* sugieren que el AE podría además interrumpir eventos tempranos del ciclo viral. Esto se deduce porque cuando el

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

tratamiento se realizó después de la adsorción del virus se disminuyó notoriamente la secreción de antígeno viral y la proporción de células infectadas. No se realizaron experimentos de adición del AE en tiempos distintos después de la adsorción del virus; así, no se puede inferir cuál o cuáles etapas del ciclo viral podrían ser bloqueadas en presencia del AE.

La actividad biológica de los AEs podría depender de la presencia de terpenos que generalmente son sus mayores constituyentes. La caracterización química del AE de *Cordia curassavica* usado en el estudio fue realizada por investigadores del grupo CIBIMOL de la UIS. El β -cariofileno, α - y β - pineno, α - copaeno, germacreno D, entre otros, se encontraron entre los componentes mayoritarios (manuscrito sometido para publicación). En un trabajo reciente de nuestro grupo se encontró que el β -cariofileno inhibe los cuatro serotipos del VDEN y la producción de IL-8 en hepatocitos humanos infectados (Pajaro *et al.* 2015; Flechas & Ocazionez, 2015). Se ha demostrado que este terpeno puede interrumpir la vía de señalización celular de la proteína NF-Kb, esta vía conduce a la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Kim *et al.*, 2014). Se requieren estudios para evaluar el papel de otros componentes del AE en la actividad antiviral y en la respuesta de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por la infección con el VDEN.

Los AEs de *Piper marginatum*, *Turnera difussa*, *Psidium sartorianum* presentaron efecto inhibitorio sobre VDEN; y probablemente se deba a que contienen β -cariofileno (Alcaraz *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2008; Biegelmeier *et al.*, 2011; D'Angelo *et al.*, 1997). La menor actividad de estos AE comparada con *Cordia curassavica* puede deberse a la composición

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

química distinta con presencia de compuestos con menor actividad antiviral y/o antagonismo. Además, las diferencias estructurales y biológicas de los serotipos del VDEN podrían determinar que los AEs inhibieron el serotipo 1 pero no los otros. Sólo el AE de *Piper marginatum* inhibió TNF- α e IL-8 y con la misma potencia como *Cordia curassavica* sugiriendo que posee actividad anti-inflamatoria, como ha sido previamente reportado (D'Angelo et al., 1997).

Los resultados de este estudio confirman el potencial de AEs de plantas de Colombia como fuentes primarias para el descubrimiento de medicamentos. Por primera vez se identifica *Cordia curassavica* como una planta que podría seleccionarse para investigaciones futuras enfocadas al descubrimiento de productos naturales para aliviar síntomas del dengue y como fuente de compuestos base para el descubrimiento del antiviral. Se requiere más estudio del potencial farmacológico del AE de esta planta y de otras que frecuentemente usan los Colombianos para tratar los síntomas del dengue.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

6. CONCLUSIONES

Se identificaron cuatro plantas cuyo AE puede servir como fuente primaria para el descubrimiento de un fármaco o una medicina natural para tratamiento del dengue. El AE de *Cordia curassavica* presentó la mayor actividad relevante *in vitro*: i) antiviral, sobre todos los serotipos del VDEN ($CI_{50} < 30\mu\text{g/mL}$ e $IS > 4.0$) con reducción de proteína NS1 en célula hepática humana y de replicación del virus en células de riñón de mono; ii) anti-inflamatoria, sobre monocitos humanos con reducción ($> 75\%$) en la producción de citoquinas (TNF- α e IL-8) con papel en la patogénesis del dengue. Los AEs de *Psidium sartorianum*, *Piper marginatum* y *Turnera diffusa* presentaron actividad relevante sobre al menos un serotipo del VDEN y redujeron las citoquinas pro-inflamatorias.

Los resultados sugieren que AEs con actividad relevante sobre la infección celular por VDEN (*Cordia curassavica* y *Psidium sartorianum*) podrían ser inocuos para la salud humana. *In vitro*, no afectaron notoriamente la viabilidad de células humanas y animales ($CC_{50} > 100\mu\text{g/mL}$ para la mayoría de células) ni estimularon la producción de IL-8 por monocitos humanos (indicador de sensibilización a dermatitis de contacto).

Los AEs se diferenciaron con respecto a citotoxicidad. Los de *Calycolpus moritzuanus*, *Eriope crassipes* y *Psidium sartorianum* no afectaron la viabilidad de células humanas a concentración alta ($> 100\mu\text{g/mL}$) y por esto podrían ser seleccionados para investigaciones futuras enfocadas

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

al descubrimiento de medicamentos para enfermedades infecciosas. Al contrario, los AE de *Tagetes Caracasana*, *Lippia origanoides* y *Lippa alba* quimiotipo citral, afectaron notoriamente la viabilidad de células cancerosas convirtiéndolos en candidatos para investigación de medicamentos para el cáncer.

Los hallazgos de este estudio demuestran que las plantas medicinales y aromáticas de Colombia analizadas, merecen ser tenidas en cuenta para la producción de medicamentos naturales y la investigación de fármacos sintéticos. Se requieren ensayos pre-clínicos para confirmar los resultados de los AEs que inhibieron la infección por VDEN.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES**BIBLIOGRFÍA**

- Abd Kadir, S. L., Yaakob, H., & Mohamed Zulkifli, R. (2013). Potential anti-dengue medicinal plants: A review. *Journal of Natural Medicines*, 67, 677–689.
<http://doi.org/10.1007/s11418-013-0767-y>
- Alcaraz-Meléndez, L., Delgado-Rodríguez, J., & Real-Cosío, S. (2004). Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, 75(7–8), 696–701. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.09.001>
- Alen, M. M. F., & Schols, D. (2012). Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 628475. <http://doi.org/10.1155/2012/628475>
- Andrade, E. H. A., Carreira, L. M. M., da Silva, M. H. L., da Silva, J. D., Bastos, C. N., Sousa, P. J. C., ... Maia, J. G. S. (2008). Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry and Biodiversity*, 5(1), 197–208.
<http://doi.org/10.1002/cbdv.200890011>
- Armas, K., Rojas, J., Rojas, L., & Morales, A. (2012). Comparative study of the chemical composition of essential oils of five *Tagetes* species collected in Venezuela. *Nat.Prod.Comm.*, 7(9), 1225–1226. Retrieved from %5C%5CRobsrv-05%5Creference manager%5CArticles%5C15629.pdf
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., & Pferschy-wenzig, E. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant- derived natural products : A review, 33(8), 1582–1614.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>.Discovery

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

- Ayyadurai, N., Valarmathy, N., Kannan, S., & Jansirani, D. (2013). Evaluation of cytotoxic properties of *Curcuma longa* and *Tagetes erecta* on cancer cell line (Hep2), 7(14), 736–739. <http://doi.org/10.5897/AJPP12.031>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Beesetti, H., Khanna, N., & Swaminathan, S. (2014). Drugs for dengue : a patent review. *Expert Opin. Ther. Patents*, 24(11), 1171–1184.
- Beesetti, H., Khanna, N., & Swaminathan, S. (2016). Investigational Drugs in Early Development for Treating Dengue Infection. *Expert Opin Investig Drugs*, 3784(June). <http://doi.org/10.1080/13543784.2016.1201063>
- Bernal, H. Y., Garc, H., & Quevedo, F. (2011). *Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en colombia*. Bogotá, Colombia. <http://doi.org/978-958-8343-55-6>
- Bezerra, A. G., Negri, G., Duarte-Almeida, J. M., Smaili, S. S., & Carlini, E. A. (2016). Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of *Turnera diffusa* Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death. *Einstein (São Paulo)*, 14(1), 56–63. <http://doi.org/10.1590/S1679-45082016AO3386>
- Biegelmeyer, R., Andrade, J. M. M., Aboy, A. L., Apel, M. A., Dresch, R. R., Marin, R., ... Henriques, A. T. (2011). Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. *Journal of Food Science*, 76(7), C991–C996.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

<http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02319.x>

Busschots, S., O'Toole, S., O'Leary, J. J., & Stordal, B. (2015). Non-invasive and non-destructive measurements of confluence in cultured adherent cell lines. *MethodsX*, 2(1), 8–13. <http://doi.org/10.1016/j.mex.2014.11.002>

Byron, M., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564–81. <http://doi.org/10.1128/CMR.00035-09>

Canard, B. (2011). Antiviral Research and Development Against Dengue Virus. *WHO Report*, 1–101.

Castrillón, J. C., Carlos, J., & Urcuqui, S. (2015). Dengue en Colombia, diez años de evolución.

Castro Rodriguez, R., Galera-Gelvez, K., Lopez Yescas, J. G., & Rueda-Gallardo, J. a. (2015). Costs of Dengue to the Health System and Individuals in Colombia from 2010 to 2012. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(4), 709–714.

Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden, & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept.” *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290–302.

D'Angelo, L. C. a., Xavier, H. S., Torres, L. M. B., Lapa, a. J., & Souccar, C. (1997). Pharmacology of Piper marginatum Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, antiinflammatory and hemostatic. *Phytomedicine*, 4(1), 33–40.

[http://doi.org/10.1016/S0944-7113\(97\)80025-6](http://doi.org/10.1016/S0944-7113(97)80025-6)

De Carvalho, P. M., Rodrigues, R. F. O., Sawaya, A. C. H. F., Marques, M. O. M., & Shimizu,

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

- M. T. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2–3), 297–301.
<http://doi.org/10.1016/j.jep.2004.07.028>
- De La Guardia, C., & Lleonart, R. (2014). Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. *BioMed Research International*, 2014(C), 1–13.
<http://doi.org/10.1155/2014/825039>
- Delgado-Vargas, F., Diaz-Camacho, S. P., Salazar-Zamora, G., Uribe-Beltran, M. J., & Vega-Avina, R. (2006). *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied., an indigenous plant to Mexico, from biology to biological activity. *Section Title: Pharmaceutical Analysis*, 13, 81–114.
- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 1–25. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytother. Res*, 21, 308–323.
- Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Campos, M. M., ... Calixto, J. B. (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, 569(3), 228–236. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.059>
- Flechas, M. C., & Ocazonez, R. E. (2015). *POTENCIAL ANTIVIRAL E INMUNOMODULADOR DE ANTIBIÓTICOS Y COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES SOBRE EL VIRUS DEL DENGUE*. Universidad Industrial de Santander.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

García, C. C., Acosta, E. G., Carro, A. C., Fernández Belmonte, M. C., Bomben, R., Duschatzky,

C. B., ... Damonte, E. B. (2010). Virucidal activity and chemical composition of essential oils from aromatic plants of central west Argentina. *Natural Product Communications*, 5(8), 1307–10.

García, C. C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., & Damonte, E. B.

(2003). Virucidal Activity of Essential Oils from Aromatic Plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research*, 17, 1073–1075.

Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue

infection. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2, 16055. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>

Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Nathan, M. B., ... Yoksan, S.

(2015). Europe PMC Funders Group Dengue : a continuing global threat Europe PMC Funders Author Manuscripts, 8(12 0), 1–26. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2460>.Dengue

Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). Dengue. *The Lancet*, 385, 453–465.

Hui, B., Yao, X., Zhou, Q., Wu, Z., Sheng, P., & Zhang, L. (2014). Pristimerin, a natural anti-

tumor triterpenoid, inhibits LPS-induced TNF- α and IL-8 production through down-regulation of ROS-related classical NF- κ B pathway in THP-1 cells. *International Immunopharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.010>

John, D. V., Lin, Y.-S., & Perng, G. C. (2015). Biomarkers of severe dengue disease - a review.

Journal of Biomedical Science U6 - ctx_ver=Z39.88-

2004&ctx_enc=info%3Aofi%2Fenc%3AUTF-

8&rfr_id=info:sid/summon.serialssolutions.com&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

&rft.genre=article&rft.atitle=Biomarkers+of+severe+dengue+disease+-+a+review&rft.jt, 22(1), 83. <http://doi.org/10.1186/s12929-015-0191-6>

Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., & Gaspari, A. a. (2012). Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 114–124. <http://doi.org/10.1038/nri3150>

Kim, C., Cho, S. K., Kim, K. D., Nam, D., Chung, W. S., Jang, H. J., ... Ahn, K. S. (2014). β -Caryophyllene oxide potentiates TNF α -induced apoptosis and inhibits invasion through down-modulation of NF- κ B-regulated gene products. *Apoptosis*, 19(4), 708–718. <http://doi.org/10.1007/s10495-013-0957-9>

Lim, S. P., Noble, C. G., & Shi, P.-Y. (2015). The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Research*, 67222924(April). <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.010>

Lim, S. P., Noble, C. G., Shi, P.-Y., Luo, D., Vasudevan, S. G., Lescar, J., ... Ferreira, L. C. de S. (2015). The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Research*, 118(April), 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.010>

Llana-Ruiz-Cabello, M., Gutiérrez-Praena, D., Pichardo, S., Moreno, F. J., Bermúdez, J. M., Aucejo, S., & Cameán, A. M. (2014). Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 281–290. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.005>

Maisanaba, S., Prieto, A. I., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, D., Demir, E., Marcos, R., & Cameán, A. M. (2015). In vitro genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

- micronucleus and mouse lymphoma assays. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 785, 37–44. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.05.005>
- Malavige, G. N., Huang, L. C., Salimi, M., Gomes, L., Jayaratne, S. D., & Ogg, G. S. (2012). Cellular and Cytokine Correlates of Severe Dengue Infection. *PLoS ONE*, 7(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0050387>
- Medeiros, R., Passos, G. F., Vitor, C. E., Koepp, J., Mazzuco, T. L., Pianowski, L. F., ... Calixto, J. B. (2007). Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*, 151(5), 618–27. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707270>
- Meneses, R., Torres, F., Stashenko, E & Ocazonez, R. (2009). Aceites esenciales de plantas Colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Salud UIS*, 41, 236–243.
- Meneses, R., Ocazonez, R. E., Torres, F., & Stashenko, E. (2009). Essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia: Chemical composition, cytotoxicity and in vitro virucidal effect on the dengue virus. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 3, 3–9.
- Ministerio de la Protección Social de Colombia. (2008). *Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales*. Universidad Nacional. Retrieved from <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/library/documents/DocNewsNo17421DocumentN VADEMECUM COLOMBIANO DE PLANTAS MEDICINALES> Ministerio de la Protección Social

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Mitjans, M., Galbiati, V., Lucchi, L., Viviani, B., Marinovich, M., Galli, C. L., & Corsini, E.

(2010). Use of IL-8 release and p38 MAPK activation in THP-1 cells to identify allergens and to assess their potency in vitro. *Toxicology in Vitro*, *24*(6), 1803–1809.

<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.001>

Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., Sakaguchi, H., & Suzuki, H. (2007). Phenotypic alterations

and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicology in Vitro*, *21*,

428–437. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.10.005>

Ngo, L. T., Okogun, J. I., & Folk, W. R. (2014). 21St Century Natural Product Research and

Drug Development and Traditional Medicines. *Natural Product Reports*, *30*(4), 584–592.

Nukada, Y., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Sakaguchi, H., & Nishiyama, N. (2008).

Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-

activated protein kinase activation or tumor necrosis factor-alpha production. *The Journal of*

Toxicological Sciences, *33*, 175–185. <http://doi.org/10.2131/jts.33.175>

Ocazonez, R. E., Meneses, R., Torres, F. Á., & Stashenko, E. (2010a). Virucidal activity of

Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro. *Memorias Do Instituto*

Oswaldo Cruz, *105*(May), 304–309.

Ocazonez, R. E., Meneses, R., Torres, F. Á., & Stashenko, E. (2010b). Virucidal activity of

Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro. *Memorias Do Instituto*

Oswaldo Cruz, *105*(May), 304–309. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762010000300010>

Pájaro, N., Flechas, M. C., Ocazonez, R., Stashenko, E., & Olivero, J. (2015). Potential

interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. *Boletín*

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas, 14(3), 141–155.

Retrieved from http://blacpma.usach.cl/images/docs/014-003/002_articulo_1.pdf

Parise, C. B., Sá-Rocha, V. M., & Moraes, J. Z. (2015). Skin sensitizer identification by IL-8 secretion and CD86 expression on THP-1 cells. *Toxicology in Vitro*, 30(1), 318–324.

<http://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.10.004>

Passos, G. F., Fernandes, E. S., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Pianowski, L. F., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 323–333. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032>

Pawitan, J. a. (2011). Dengue virus infection: predictors for severe dengue. *Acta Medica Indonesiana*, 43(2), 129–135.

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*, 6(February), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00076>

Pigili, R. K., & Runja, C. (2013). Medicinal plants used in dengue treatment: An overview. *Natural Science*, 2(1), 70–76.

Pimentel, S. P., Barrella, G. E., Casarin, R. C. V., Cirano, F. R., Casati, M. Z., Foglio, M. A., ... Ribeiro, F. V. (2012). Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 224. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-12-224>

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

- Sarrazin, S. L. F., da Silva, L. A., de Assunção, A. P. F., Oliveira, R. B., Calao, V. Y. P., da Silva, R., ... Mourão, R. H. V. (2015). Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(2), 1860–71. <http://doi.org/10.3390/molecules20021860>
- Sienkiewicz, M., Kowalczyk, E., & Wasiela, M. (2012). Recent Patents Regarding Essential Oils and the Significance of their Constituents in Human Health and Treatment. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(2), 133–140. <http://doi.org/10.2174/157489112801619665>
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., Van, V. C. N., & Wills, B. (2012). Dengue. *N Engl J Med*, 366, 1423–1432.
- Simmons, C. P., Wolbers, M., Nguyen, M. N., Whitehorn, J., Shi, P. Y., Young, P., ... Wills, B. (2012). Therapeutics for Dengue: Recommendations for Design and Conduct of Early-Phase Clinical Trials. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9), 1–4. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001752>
- Singh, P., Krishna, A., Kumar, V., Krishna, S., Singh, K., Gupta, M., & Singh, S. (2016). Chemistry and biology of industrial crop *Tagetes Species* : a review. *Journal of Essential Oil Research*, 28(1), 1–14. <http://doi.org/10.1080/10412905.2015.1076740>
- Sivigila. (2016). *Boletín epidemiológico semanal*. Colombia.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of*

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Chromatography A, 1025(1), 93–103. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.058>

Stashenko, E., Martínez, J., Cala, M. P., Durán, D. C., & Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*, 36(1), 192–202.

Szewczyk, K., & Zidorn, C. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana - *Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(3), 424–443. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.019>

Urcuqui-Inchima, S., Patiño, C., Torres, S., Haenni, A.-L., & Díaz, F. J. (2010). Recent developments in understanding dengue virus replication. In *Advances in virus research* (Vol. 77, pp. 1–39). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-385034-8.00001-6>

van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, 8, 47. <http://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>

Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *VITAE*, 23(1), 18–29.

Villar, L. A., Rojas, D. P., Besada-Iombana, S., & Sarti, E. (2015). Epidemiological Trends of Dengue Disease in Colombia (2000-2011): A Systematic Review, 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003499>

Vorndam, V., & Beltran, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay-format

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

- microneutralization test for dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(2), 208–212.
- Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2), 369–376.
<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.018>
- Whitehorn, J., Nguyen, C. V. V., Khanh, L. P., Kien, D. T. H., Quyen, N. T. H., Tran, N. T. T., ... Wills, B. (2015). Lovastatin for the Treatment of Adult Patients with Dengue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), 468–476. <http://doi.org/10.1093/cid/civ949>
- Whitehorn, J., & Simmons, C. P. (2011). The pathogenesis of dengue. *Vaccine*, 29(42), 7221–7228. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.022>
- Xia, M., Huang, R., Witt, K. L., Southall, N., Fostel, J., Cho, M. H., ... Austin, C. P. (2008). Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 284–291. <http://doi.org/10.1289/ehp.10727>
- Xie, X., Zou, J., Wang, Q.-Y., & Shi, P.-Y. (2015). Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Research*, 118(March), 39–45.
<http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.007>
- Yacoub, S., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. (2013). The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis*, 26(3), 284–289.
- Yañez, X. Betancur, L. Agudelo, L. Zapata, M. Correa, J. Mesa, A. Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad biológica de aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus*

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

recolectado en el Norte de Santander, Colombia. *Salud UIS*, 41, 259–267.

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

APÉNDICES

Tabla 1 Suplementaria: Valores de CC50 de aceites esenciales sobre células humanas en ensayos del MTT.

Planta	Voucher	HEK293: a/d	HEPG2: a/d
<i>Ageratina aff. Popayanensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.	579422	218 ± 70,3 / 99 ± 38,1	199 ± 57,5 / 88 ± 45,7
<i>Ageratina popayanensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.	582607	144 ± 49,7 / 158 ± 48,4	117 ± 51,3 / 119 ± 49,9
<i>Ageratina popayanensis</i> (Hieron.) R.M. King & H. Rob	582600	261 ± 68,1 / 347 ± 50,1	302 ± 46,7 / 285 ± 68,3
<i>Austroepatorium inulaefolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.	587130	184 ± 61,7 / 50	139 ± 54,9 / 120 ± 48,4
<i>Baccharis decussata</i> (Klatt) Hieron	582606	217 ± 47,6 / 213 ± 44,5	268 ± 51,5 / 221 ± 45,6
<i>Baccharis trinervis</i> Pers.	587092	189 ± 62,9 / 101 ± 88,5	161 ± 50,0 / 122 ± 50,0
<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.	583919	135 ± 56,8 / 147 ± 48,3	210 ± 40,6 / 166 ± 48,8
<i>Elaphandra quinquenervis</i> (S.F Blake) H. Rob.	587094	246 ± 56,1 / 139 ± 68,1	232 ± 58,2 / 179 ± 47,6
<i>Senecio sp.</i>	587133	192 ± 58,3 / 159 ± 61,6	140 ± 52,0 / 178 ± 45,1
<i>Tagetes caracasana</i> Kunth	587125	50 / 50	120 ± 63,3 / 95 ± 60,3
<i>Tagetes caracasana</i> Kunth	579244	213 ± 78,6 / 99 ± 38,2	300 / 98 ± 38,2
<i>Wedelia calycina</i> Rich.	578353	500 / 229 ± 57,4	300 / 225 ± 75,0
<i>Wedelia calycina</i> Rich.	583911	254 ± 54,9 / 194 ± 40,2	272 ± 47,6 / 284 ± 49,9
<i>Wedelia cf. stuebelii</i>	587093	132 ± 75,6 / 106 ± 84,5	140 ± 51,9 / 151 ± 47,4
<i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	559446	281 ± 89,3 / 99 ± 47,3	300 / 106 ± 46,0
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	582595	188 ± 52,2 / 154 ± 54,6	149 ± 52,5 / 132 ± 45,9
<i>Dalea sp</i>	Estéril	171 ± 47,3 / 100 ± 56,1	171 ± 46,6 / 144 ± 45,1
<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel.	582604	222 ± 45,6 / 378 ± 81,3	208 ± 51,6 / 423 ± 110,9

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Tabla 1 Suplementaria: continuación

Planta	Voucher	HEK293: a/d	HEPG2: a/d
<i>Eriope crassipes</i> Benth.	578966	474 ± 110,4 / 280 ± 59,4	494 ± 236,0 / 500
<i>Hyptis brachiata</i> Briq.	582531	156 ± 43,8 / 213 ± 55,9	176 ± 43,7 / 224 ± 55,2
<i>Salvia aratocensis</i> (J.R.I. Wood & Harley) Fern. Alonso	517740	150 ± 58,4 / 124 ± 49,4	117 ± 49,2 / 142 ± 43,9
<i>Salvia officinalis</i> L	555844	371 ± 91,9 / 225 ± 47,2	331 ± 73,3 / 332 ± 54,5
<i>Satureja viminea</i>	566449	344 ± 99,2 / 217 ± 71,9	387 ± 106 / 500
<i>Calycolpus moritzianus</i> (O.Berg) Burret	578360	500 / 485 ± 122,8	300 / 4912 ± 112,6
<i>Calycolpus moritzianus</i> (O.Berg) Burret	578360	296 ± 65,1 / 297 ± 46,9	415 ± 55 / 411 ± 58,9
<i>Psidium sartorianum</i> (O. Berg) Nied.	578359	500 / 381 ± 103,4	300 / 500
<i>Piper aduncum</i> L.	587136	179 ± 69,9 / 120 ± 65,5	261 ± 58,9 / 282 ± 67,1
<i>Piper cumanense</i> Kunth.	578977	225 ± 48,7 / 337 ± 66,9	287 ± 52,0 / 149 ± 73,2
<i>Piper dilatatifolium</i> Trel. & Yunck	578975	294 ± 75,0 / 158 ± 55,3	168 ± 59,6 / 103 ± 60,5
<i>Piper eriopodon</i> (Miq.) C. DC	578364	176 ± 48,9 / 200 ± 50,1	166 ± 55,2 ± 74 ± 64,1
<i>Piper holtonii</i> C.DC.	582357	213 ± 58,6 / 346 ± 68,1	478 ± 73,3 / 500
<i>Piper marginatum</i> Jacq.	578365	278 ± 84,2 / 137 ± 52,3	298 ± 78,4 / 66 ± 56,0
<i>Piper medium</i> Jacq.	583968	221 ± 52,6 / 364,8 ± 82,2	377 ± 62,2 / 365 ± 63,2
<i>Piper subflavum</i> var. Espejuelanum	578976	125 ± 62,1 / 159 ± 56,5	192 ± 56,5 / 119 ± 55,7
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) W.Watson	587116	214 ± 57,4 / 108 ± 67,7	248 ± 58,5 / 238 ± 55,0
<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle	578357	307 ± 68,1 / 179 ± 59,5	256 ± 49,8 / 361 ± 57,8
<i>Swinglea glutinosa</i> Merr.	521530	123 ± 86,2 / 60 ± 69,7	154 ± 60,4 / 124 ± 50,6
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	578361	216 ± 58,1 / 184 ± 41,7	235 ± 44,0 / 262 ± 47,3
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	578361	243 ± 93,2 / 92 ± 27,2	261 ± 63,5 / 101 ± 36,0
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	578361	143 ± 60,9 / 152 ± 46,2	199 ± 42,6 / 186 ± 58,4
<i>Lantana cf. canescens</i> Kunth	587108	214 ± 59,9 / 188 ± 58,7	134 ± 54,3 / 199 ± 47,0
<i>Lantana colombiana</i> López-Pal.	582328	221 ± 44,5 / 169 ± 46,9	250 ± 50,5 / 171 ± 50,1
<i>Lippia alba</i> (citrinal) Mill.	512272	180 ± 76,2 / 50	59 ± 72,0 / 57 ± 62,9
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	555839	120 ± 67,2 / 82 ± 55,7	114 ± 49,6 / 116 ± 44,7

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Tabla 1 Suplementaria: continuación

Planta	Voucher	HEK293: a/d	HEPG2: a/d
<i>Lippia micromera</i> Schauert	578971	409 ± 77,4 / 185 ± 56,8	300 / 98 ± 57,1
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	582599	186 ± 46,7 / 364 ± 96,5	193 ± 45,4 / 383 ± 56,4
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	587105	233 ± 54,9 / 213 ± 41,2	254 ± 46,3 / 229 ± 57,4
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	587107	231 ± 49,9 / 152 ± 56,2	257 ± 50,4 / 254 ± 43,8
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	587104	111 ± 54,5 / 154 ± 51,9	111 ± 52,7 / 58,9 ± 64,9
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	587106	120 ± 55,6 / 50	143 ± 48,8 / 56 ± 69,0

Tabla 2 Suplementaria: Valores de CC50 de aceites esenciales sobre células de origen animal en ensayos del MTT.

Planta	Voucher	B16F10: a/d	VERO: a/d
<i>Ageratina aff. Popayanensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.	579422	113 ± 62,0 / 80 ± 37,0	239 ± 55,0 / 152 ± 54,3
<i>Ageratina popayanensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.	582607	153 ± 42,2 / 123 ± 48,5	135 ± 49,7 / 112 ± 48,1
<i>Ageratina popayanensis</i> (Hieron.) R.M. King & H. Rob	582600	245 ± 38,6 / 114 ± 49,6	225 ± 57,6 / 131 ± 44,9
<i>Austroepatorium inulaefolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.	587130	123 ± 52,8 / 50	50 / 50
<i>Baccharis decussata</i> (Klatt) Hieron	582606	162 ± 49,0 / 151 ± 62,6	183 ± 48,9 / 114 ± 50,8
<i>Baccharis trinervis</i> Pers.	587092	109 ± 59,4 / 107 ± 55,9	50 / 50
<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.	583919	155 ± 40,0 / 103 ± 60,9	126 ± 56,1 / 50
<i>Elaphandra quinquenervis</i> (S.F Blake) H. Rob.	587094	165 ± 47,3 / 152 ± 47,4	157 ± 63,3 / 117 ± 64,0
<i>Senecio sp.</i>	587133	159 ± 47,8 / 112 ± 51,1	114 ± 60,3 / 134 ± 62,8
<i>Tagetes caracasana</i> Kunth	587125	50 / 50	50 / 50
<i>Tagetes caracasana</i> Kunth	579244	27 ± 13,3 / 74 ± 27,8	50,0 / 56 ± 19,4
<i>Wedelia calycina</i> Rich.	578353	174 ± 61,4 / 196 ± 70,0	168 ± 47,9 / 433 ± 94,8
<i>Wedelia calycina</i> Rich.	583911	235 ± 41,7 / 174 ± 47,6	225 ± 51,1 / 139 ± 40,2
<i>Wedelia cf. stuebelii</i>	587093	65 ± 60,6 / 140 ± 49,5	126 ± 66,5 / 118 ± 57,4
<i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	559446	184 ± 81,1 / 79 ± 46,7	132 ± 53,4 / 155 ± 55,6
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	582595	152 ± 55,9 / 112 ± 65,8	117 ± 58,4 / 50

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Tabla 2 Suplementaria: continuación

Planta	Voucher	B16F10: a/d	VERO: a/d
<i>Dalea sp</i>	Estéril	120 ± 48,6 / 96 ± 55,6	83,7 ± 55,3 / 50
<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel.	582604	234 ± 61,6 / 188 ± 51,9	125 ± 47,5 / 105 ± 66,9
<i>Eriope crassipes</i> Benth.	578966	405 ± 129,7 / 500	352 ± 116,4 / 241 ± 73,4
<i>Hyptis brachiata</i> Briq.	582531	500 / 128 ± 45,5	107 ± 45,9 / 41 ± 99,3
<i>Salvia aratocensis</i> (J.R.I. Wood & Harley) Fern. Alonso	517740	164 ± 51,4 / 50	129 ± 51,4 / 65 ± 67,2
<i>Salvia officinalis</i> L	555844	381 ± 59,1 / 324 ± 80,8	213 ± 101,7 / 113 ± 74,6
<i>Satureja viminea</i>	566449	287 ± 76,3 / 206 ± 96,3	135 ± 70,8 / 113 ± 71,6
<i>Calycolpus moritzianus</i> (O.Berg) Burret	578360	40,2 ± 34,9 / 413 ± 268,8	117 ± 49,4 / 500
<i>Calycolpus moritzianus</i> (O.Berg) Burret	578360	406 ± 56,6 / 284 ± 51,2	258 ± 59,2 / 216 ± 43,8
<i>Psidium sartorianum</i> (O. Berg) Nied.	578359	152 ± 105,2 / 287 ± 147,7	188 ± 47,4 / 489 ± 97,1
<i>Piper aduncum</i> L.	587136	191 ± 49,9 / 156 ± 53,2	166 ± 58,2 / 192 ± 60,3
<i>Piper cumanense</i> Kunth.	578977	153 ± 53,9 / 156 ± 61,7	212 ± 53,9 / 130 ± 53,9
<i>Piper dilatatifolium</i> Trel. & Yunck	578975	88 ± 37,5 / 173 ± 71,5	180 ± 50,4 / 349 ± 60,9
<i>Piper eriopodon</i> (Miq.) C. DC	578364	157 ± 51,0 / 177 ± 53,1	189 ± 48,1 / 50
<i>Piper holtonii</i> C.DC.	582357	257 ± 59,2 / 208 ± 62,9	160 ± 67,5 / 117 ± 67,5
<i>Piper marginatum</i> Jacq.	578365	125 ± 384,3 / 154 / 69,4	209 ± 48,5 / 283 ± 67,4
<i>Piper medium</i> Jacq.	583968	252 ± 70,7 / 285 ± 59,4	199 ± 49,6 / 122 ± 55,0
<i>Piper subflavum</i> var. <i>Espejuelanum</i>	578976	131 ± 55,2 / 50	161 ± 55,7 / 86 ± 59,4
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) W.Watson	587116	162 ± 79,1 / 50	186 ± 60,9 / 188 ± 52,5
<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle	578357	200 ± 63,3 / 144 ± 63,4	238 ± 105,8 / 203 ± 65,5
<i>Swinglea glutinosa</i> Merr.	521530	120 ± 67,4 / 109 ± 134,1	63 ± 61,8 / 62 ± 70,3
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	578361	214 ± 40,4 / 155 ± 48,3	224 ± 49,4 / 161 ± 41,3
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	578361	43 ± 18,5 / 114 ± 58,3	190 ± 46,0 / 327 ± 77,8
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	578361	161 ± 41,2 / 84 ± 55,3	135 ± 54,6 / 91 ± 56,7

ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES

Tabla 2 Suplementaria: continuación

Planta	Voucher	B16F10: a/d	VERO: a/d
<i>Lantana cf. canescens</i> Kunth	587108	186 ± 45,6 / 121 ± 49,5	130 ± 62,0 / 137 ± 62,3
<i>Lantana colombiana</i> López-Pal.	582328	159 ± 46,7 / 146 ± 64,6	157 ± 56,9 / 68 ± 68
<i>Lippia alba (citrinal)</i> Mill.	512272	68 ± 88,1 / 50	112 ± 70,1 / 107 ± 56,4
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	555839	139 ± 51,8 / 66 ± 79,1	65 ± 62,3 / 103 ± 53,0
<i>Lippia micromera</i> Schauer	578971	460 ± 400,7 / 161 ± 70,2	234 ± 51,5 / 481 ± 77,1
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	582599	162 ± 50,9 / 145 ± 45,0	173 ± 42,3 / 128 ± 65,5
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	587105	190 ± 42,6 / 75 ± 50,6	183 ± 53,5 / 110 ± 48,5
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	587107	150 ± 48,6 / 106 ± 65,4	150 ± 53,3 / 157 ± 47,9
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	587104	153 ± 43,0 / 140 ± 58,3	137 ± 48,7 / 76 ± 60,6
<i>Lippia organoides</i> H.B.K	587106	59 ± 70,3 / 50	135 ± 54,2 / 50

