

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE COMPONENTES  
MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia citriodora* Y *Lippia  
alba* SOBRE LA REPLICACIÓN *IN VITRO* DEL VIRUS DE LA FIEBRE  
AMARILLA**

**LUZ ÁNGELA GÓMEZ SUÁREZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA  
2011**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE COMPONENTES  
MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia citriodora* Y *Lippia  
alba* SOBRE LA REPLICACIÓN *IN VITRO* DEL VIRUS DE LA FIEBRE  
AMARILLA**

**LUZ ÁNGELA GÓMEZ SUÁREZ**

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

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA  
2011**

*Dedico este trabajo*

*A Dios todo poderoso por estar a mi lado en todo momento y darme la oportunidad y las fuerzas necesarias para cumplir esta meta tan importante en mi vida.*

*A mis padres Adán y Leyla por la confianza, el amor y apoyo incondicional que toda la vida me han brindado.*

*A Lácides por su amor y apoyo en los momentos difíciles que me alentaron a seguir el camino.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora Raquel Ocazonez, por su dedicación, compromiso y contribución en mi formación científica y personal que impulsó la culminación de este proyecto.

A Sergio Yebrail por su asesoría con el análisis estadístico, su amistad y apoyo incondicional a lo largo del proceso.

A Flor Ángela y Rocío por transmitirme su experiencia, por el acompañamiento, asesoría y sobre todo por su amistad.

A Yenny, Laura, Sandra, Nestor y Manuel compañeros y amigos de maestría, y a mis compañeros y amigos del CINTROP por brindarme su amistad y apoyo que fueron muy importantes para llevar a cabo esta meta.

## CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN.....	13
1. OBJETIVOS .....	18
2. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 Estructura del VFA .....	19
2.2 Ciclo replicativo viral.....	21
2.3 Ensayos para evaluar la actividad antiviral de compuestos .....	22
2.3.1 In vitro.....	23
2.3.2 In vivo.....	24
2.4 Desarrollo de antivirales contra el VFA .....	25
2.5 Efecto antiviral de componentes de aceites esenciales .....	26
3. METODOLOGÍA.....	30
3.1 Materiales.....	30
3.1.1 AE-L. citriodora y AE-L. alba .....	30
3.1.2 Componentes mayoritarios.....	30
3.1.3 Compuestos controles.....	31
3.1.4 Células .....	32
3.1.5 Virus.....	32
3.2 Procedimientos de laboratorio.....	32
3.2.1 Plaqueo .....	32
3.2.2 Ensayo de citotoxicidad.....	33
3.2.3 Inmunofluorescencia .....	34
3.3 Ensayos antivirales.....	34

3.4	Toxicidad <i>in silico</i> de componentes mayoritarios .....	36
3.5	Análisis de datos .....	36
4.	RESULTADOS .....	37
4.1	Citotoxicidad .....	37
4.2	Toxicidad <i>in silico</i> de componentes mayoritarios .....	39
4.3	Efecto inhibitorio sobre el VFA .....	40
4.4	Potencial antiviral de compuestos activos .....	43
5.	DISCUSIÓN .....	46
6.	CONCLUSIONES.....	52
	BIBLIOGRAFÍA.....	53

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Componentes mayoritarios de los aceites esenciales usados en el estudio .....	30
Tabla 2. Valores CC <sub>50</sub> del componente mayoritario con respecto al aceite esencial para célula humana (Hela) y de animal (Vero). .....	38
Tabla 3. Valores NOAEL de los componentes mayoritarios con respecto al aceite esencial para célula humana y de animal.....	39
Tabla 4. Riesgo de efectos tóxicos sobre organismos vivos del citral y limoneno y fragmento de la molécula asociado.....	40
Tabla 5. Potencial antiviral del citral contra el VFA de acuerdo al tratamiento y comparado con el del AE- <i>Lippia citriodora</i> . .....	45

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estructura química del componente mayoritario del AE- <i>L.citriodora</i> (Citral) y AE- <i>L.alba</i> (Limoneno) usados en el estudio.....	31
Figura 2. Viabilidad de monocapas de células Vero en relación con exposición a concentraciones de compuesto. citral (rojo) y AE- <i>L.citriodora</i> (negro). Limoneno (rojo) y AE- <i>L.alba</i> (negro).....	37
Figura 3. Efecto inhibitorio dosis-respuesta del dextrán sulfato y la ribavirina sobre la replicación in Vitro del VFA .....	41
Figura 4. Efecto inhibitorio de compuestos incluidos en el estudio dependiente de la concentración observado por inmunofluorescencia. ....	42
Figura 5. Ausencia de efecto inhibitorio sobre la replicación del VFA por tratamiento con limoneno antes (rojo) y después de la adsorción (negro).....	43
Figura 6. Ausencia de efecto inhibitorio sobre la replicación in Vitro del VFA debido a tratamiento previo de la célula con componente mayoritario o AE.....	44

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DE COMPONENTES MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia citriodora* Y *Lippia alba* SOBRE LA REPLICACIÓN *IN VITRO* DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA\*

**AUTORES:** GÓMEZ SUÁREZ, Luz A.; OCAZONEZ JIMÉNEZ, Raquel E.\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Citral, limoneno, aceite esencial, *Lippia citriodora*, *Lippia alba*, antiviral, virus de la fiebre amarilla.

## RESUMEN

El aceite esencial (AE) de plantas del género *Lippia* puede inhibir una variedad de virus envueltos, pero se desconoce si se debe a sus componentes mayoritarios. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de citral (neral y geranial) y limoneno compuestos mayoritarios del AE de *Lippia citriodora* y *Lippia alba* sobre la replicación *in vitro* del virus de la fiebre amarilla (VFA).

La citotoxicidad (CC<sub>50</sub>) de los compuestos sobre células HeLa y Vero fue evaluada por el método del MTT. El ensayo de reducción de placas y reducción del título viral se empleó para determinar el efecto inhibitorio viral de los compuestos antes y después de la adsorción a la célula, o el efecto del tratamiento de las células antes de la adsorción viral. El resultado se expresó como la concentración del compuesto que redujo en 50% la replicación del virus. Valores de CI<sub>50</sub> < 100 µg/mL e índice de selectividad (IS: CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>) ≥ 2 sugirieron potencial antiviral promisorio.

Limoneno y AE-*L. alba* resultaron menos tóxicos para células HeLa y Vero (CC<sub>50</sub>: 920.5-944.1 µg/mL y 375.5-164.9, respectivamente) que citral y AE-*L. citriodora* (CC<sub>50</sub>: 22.1-27.3 µg/mL y 35.3-51.2 µg/mL, respectivamente). Citral y los AEs mostraron efecto inhibitorio sobre el VFA antes y después de la adsorción, pero no por tratamiento previo de la célula. Dependiendo del tratamiento, los valores de CI<sub>50</sub> para citral estuvieron entre 17.6 µg/mL y 25 µg/mL con IS de 0.9 y 1.3. Los resultados sugieren que neral y geranial contribuyen con el efecto antiviral del AE-*L. citriodora*. No obstante, el potencial antiviral de los compuestos es muy limitado debido a la citotoxicidad para célula humana. El limoneno no tuvo efecto antiviral (CI<sub>50</sub> > 600 µg/mL) con ningún tratamiento, consecuentemente, no parece tener papel en la actividad del AE de las especies de *Lippia* analizadas.

---

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de salud. Maestría en ciencias básicas biomédicas. Directora Raquel E. Ocazonez Ph.D.

**TITLE:** EVALUATION OF ANTIVIRAL EFFECT OF MAJORITY COMPONENTS PRESENT IN *Lippia citriodora* AND *Lippia alba* ESSENTIAL OIL ON YELLOW FEVER VIRUS REPLICATION IN VITRO\*

**AUTHORS:** GÓMEZ SUÁREZ, Luz A.; OCAZIO NEZ JIMÉNEZ, Raquel E.\*\*

**KEY WORDS:** Citral, limonene, essential oil, *Lippia citriodora*, *Lippia alba*, antiviral, yellow fever virus.

### ABSTRACT

Essential oil (EO) from *Lippia* species can inhibit a varied of enveloped viruses, but it is unknown whether majority components are responsible for the effect. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of citral (geranial and neral) and limonene majority components present in *Lippia citriodora* and *Lippia alba* EO on yellow fever virus (YFV) replication in vitro.

The cytotoxicity (CC<sub>50</sub>) on HeLa and Vero cells was evaluated by the MTT method, and the viral inhibitory effect was investigated using plaque reduction or virus yield reduction assays. YFV was treated or not with compound before and after cell adsorption, or cells were treated with compound before virus adsorption. Inhibitory effect was expressed as the concentration of compounds that caused 50% reduction of virus replication (IC<sub>50</sub>). IC<sub>50</sub> values <100 µg/mL and selectivity index (SI: CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) ≥ 2 indicated promising antiviral potential.

Limonene and *L. alba* EO resulted in less toxicity for HeLa and Vero cells (CC<sub>50</sub>: 920.5 - 944.1 µg/mL and 375.5 - 164.9 µg/mL, respectively) than citral and *L. citriodora* EO (CC<sub>50</sub>: 22.1 - 27.3 µg/mL and 35.3 - 51.2 µg/mL, respectively). Citral and EOs showed inhibitory effect on YFV before and after adsorption, but not when the cell was exposed to compound before virus infection. Depending on treatment, IC<sub>50</sub> values for citral were between 17.6 µg/mL and 25 µg/mL with SI values between 0.9 – 1.3. The results suggest that neral and geranial could contribute to inhibitory effect of *L. citriodora* EO on YFV replication in vitro. Nonetheless, the antiviral potential of these compounds is very limited due to cytotoxicity for human cell. Limonene did not exhibit antiviral action on YFV (CI<sub>50</sub> > 600 µg/mL irrespective of treatment). Suggesting that the compound do not play role in the activity of the EO from *Lippia* species studied.

---

\*Master thesis

\*\* Faculty of Health. Medical basic sciences postgraduate programme. Director Raquel E. Ocazionez Ph.D.

## INTRODUCCIÓN

La fiebre amarilla (FA) es una enfermedad hemorrágica aguda causada por el virus del mismo nombre (VFA), el cual es transmitido a humanos por la picadura de mosquitos *Aedes* y *Haemagogus* involucrados en ciclos de transmisión urbano y selvático, respectivamente. La enfermedad se presenta especialmente en África y América del Sur, en regiones donde prima la transmisión selvática y donde el acceso a cuidados médicos es limitado (Monath, 2001). El resultado de la infección con el VFA varía en los individuos desde estado asintomático o con manifestaciones leves hasta la forma icterico-hemorrágica que lleva a muerte. En la mayoría de los sintomáticos se presenta un síndrome febril que se confunde con otras virosis, caracterizado por viremia, fiebre elevada, escalofríos, cefalea, náuseas y dolor muscular especialmente en la parte baja de la espalda. Aproximadamente 15-25% de los pacientes desarrollan la forma severa o periodo de intoxicación, con ictericia, dolor epigástrico, diversas manifestaciones hemorrágicas (epistaxis, hemorragia gingival, hematemesis, melena y oliguria) y falla renal. En esta fase al menos 50% de los pacientes mueren. (Monath 2008; OPS, 2005).

La FA se puede prevenir vacunando individuos residentes en las áreas donde existe transmisión del virus. La vacuna es un virus atenuado (cepa 17D) que induce la formación de anticuerpos neutralizantes y es considerada una de las de mayor eficacia ya que con una única dosis el individuo queda protegido de por vida (Monath, 2001; Wilson et al., 2004). La vacuna se considera segura pero en algunos individuos se puede presentar reacciones adversas, que van desde un síndrome febril leve hasta alteraciones clínicas severas. La enfermedad neurotrópica y viscerotrópica se presenta en 0.8 y 0.4 de cada 100.000 vacunados, respectivamente. Entre 2000 y 2006 se reportaron 660 eventos al Sistema de Reportes de Eventos Adversos a la Vacuna (EUA), de los cuales 11% fueron clasificados como severos incluyendo 12 con

enfermedad neurotrópica, 6 con enfermedad viscerotrópica y 4 muertes (Lindsey et al., 2008).

A pesar que desde 1936 se viene inmunizando a la población de forma masiva, continúan ocurriendo brotes de FA debido a que en regiones de alta transmisión la cobertura de vacunación no alcanza 50% (WHO, 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que anualmente se presentan 200.000 casos y 30.000 muertes alrededor del mundo, de los cuales 90% ocurren en África. En América Latina en 2007 se reportaron 42 casos, resultando 35 (83.3%) fatales (WHO, 2006 y 2008). En Colombia, el último brote ocurrió en 2003 - 2004 cuando se notificaron 134 casos con 57 muertes (Vera et al., 2004; Valendia, 2004); entre 2005 - 2007 se registraron 31 casos y 24 fueron fatales. Los datos históricos demuestran que la FA puede mantenerse ausente por años o décadas en una región y luego emerger. Generalmente los brotes se inician en la selva debido al traslado de individuos no-vacunados a áreas boscosas, quienes eventualmente se pueden infectar y llevan el virus a áreas cercanas más pobladas y a urbanas donde es fácilmente transmitido por el mosquito vector. Así, el brote inicialmente selvático se convierte en urbano (Barrett et al., 2003; Wilson et al., 2004; Monath, 2001).

Hasta la fecha no existe en el mercado un medicamento antiviral para el tratamiento de la FA o para el manejo de las complicaciones de la vacuna; y sumado a esto, la mayoría de los casos ocurren en áreas remotas donde los servicios de salud son limitados (Barrett et al., 2003). Consecuentemente, el manejo médico del paciente es sintomático y está encaminado a prevenir las complicaciones. Este incluye, mantenimiento nutricional y prevención de la hipoglicemia, succión nasogástrica para evitar la distensión gástrica, tratamiento de la hipotensión con reemplazo de líquidos y si fuese necesario drogas vasoactivas, administración de oxígeno, corrección de la acidosis metabólica, tratamiento de la hemorragia, diálisis si está indicada por falla

renal, y tratamiento de infecciones secundarias con antibióticos. El tratamiento resulta costoso y en la mayoría de casos graves no asegura la recuperación del estado de salud del infectado (Monath, 2001; OPS, 2005). Así, la disponibilidad de un medicamento antiviral que elimine el virus es una prioridad en el control de la FA.

La investigación de un medicamento contra la FA ha estado orientada a la búsqueda de compuestos que puedan interrumpir etapas del ciclo de replicación del virus y sin afectar la célula hospedera. Durante décadas se vienen evaluando compuestos producidos por síntesis química y aunque con varios los resultados han sido promisorios hasta la fecha ninguno ha sido aprobado para uso humano (Monath 2008, Julander et al., 2007a). La ribavirina, un antiviral de amplio uso para tratamiento de enfermedades causadas por virus ARN, puede interrumpir in vitro la replicación del genoma del VFA. No obstante, la concentración efectiva en cultivos celulares y en modelos animales es muy alta haciendo esta droga ineficaz para el tratamiento de enfermos. Otros medicamentos como el tiazofurin, análogo sintético de ribavirina; la carboxamida, análogo de compuestos con actividad contra el virus de la influenza; y derivados de la pirazolina, activos contra otros flavivirus, tampoco han resultados eficaces (Puig-Basaqoiti et al., 2006; Julander et al., 2007b; Monath, 2008). En los últimos años ha crecido el interés por compuestos que puedan bloquear la actividad de proteínas del virus claves para su replicación como la polimerasa y proteasas. Hasta la fecha el avance ha sido poco (Keller et al, 2006).

Ante los intentos fallidos por encontrar una droga sintética contra la FA, se hace urgente la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos que puedan interrumpir el ciclo de replicación del virus. Es ampliamente conocido el uso popular de plantas aromáticas con fines terapéuticos. La propiedad medicinal de estas ha sido atribuida a sus múltiples constituyes en particular al aceite

esencial (AE). En la última década un sinnúmero de publicaciones reportan la actividad antiviral del AE contra virus que causan enfermedades humanas; y que ha sido obtenido de una variedad de especies de plantas, la mayoría conocidas por sus propiedades medicinales y oriundas de diversos países. El modo de acción del AE parece ser la interrupción de la entrada del virus a la célula y se ha dicho que esta actividad puede ser atribuida a sus componentes mayoritarios (Bakkali et al., 2008; Mukhtar et al., 2008; Cowan, 1999)

El AE obtenido de plantas medicinales es una mezcla compleja que contiene entre 20 a 60 componentes, dos o tres son mayoritarios considerando que se encuentran en altas concentraciones comparados con otros en trazas. La mayoría de los componentes son terpenos y terpenoides, y otros son compuestos aromáticos y alifáticos (Cowan, 1999). El potencial antiviral de componentes aislados presentes en el AE ha sido poco investigado y el conocimiento hasta la fecha publicado está referido a resultados de ensayos in vitro con el Virus Herpes Simplex (VHS). Con algunos monoterpenos, fenilpropanoides y sesquiterpenos se ha reportado efecto inhibitorio viral y sin efectos tóxicos sobre células humanas o de animales (Astani et al., 2009 a y b; Sivropoulou et al., 1997; Hayashi et al., 1996).

En Colombia existen más de 40.000 especies de plantas y aproximadamente en 10% se han identificado propiedades fitoterapéuticas y antivirales (López et al., 2001; Betancur et al., 2002; Bakkali et al., 2008). La actividad antiviral contra el VFA del AE de plantas colombianas ha sido investigada por el grupo de Arbovirus del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), de la Universidad Industrial de Santander (UIS). El AE de por lo menos 15 especies contiene componentes que pueden inhibir la replicación in vitro del virus, en particular el obtenido de *L. citriodora* y *L. alba* (Meneses et al., 2009 a y c; Ocazonez et al., 2010). La composición química de varios de estos AEs fue determinada en estudios realizados por investigadores del

Centro de Investigación de Biomoléculas (CIBIMOL), UIS (Ocazonez et al., 2010; Stashenko et al., 2003; Castañeda et al., 2007; Duarte et al., 2007). Los componentes en la mayoría fueron monoterpenos e hidrocarburos sesquiterpénicos. Citral y limoneno fueron identificados en *L. citriodora* y *L. alba*. Luego de una búsqueda exhaustiva en varias bases de datos, no se encontraron publicaciones del efecto antiviral de componentes aislados de AEs contra el VFA.

En el contexto arriba descrito, el propósito del presente estudio fue determinar el potencial antiviral de componentes mayoritarios del AE de *L. citriodora* y *L. alba*. Esto con el fin de contribuir a la búsqueda de fuentes de compuestos base para la fabricación de una droga contra la FA. El trabajo también aporta conocimiento nuevo sobre el rol de los componentes en la actividad antiviral de los AEs obtenidos de plantas de uso popular para aliviar dolencias.

## 1. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial antiviral de componentes mayoritarios constituyentes del AE de *L. citriodora* y *L. alba* sobre la replicación in vitro del VFA.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto citotóxico de los componentes mayoritarios con respecto al AE para célula humana y de animal.
- Comparar el efecto inhibitorio del componente con respecto al AE antes y después de la adsorción del virus a la célula.
- Comparar el efecto inhibitorio del componente y el AE sobre la replicación del VFA debido a tratamiento de la célula antes de la infección con el virus.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Estructura del VFA

El virus existe como un solo serotipo dentro del género flavivirus, por lo que posee genoma de ARN y cápside icosaédrica rodeada por una membrana lipoprotéica o envoltura derivada de la célula. El ARN contiene una única región de lectura abierta para una poliproteína, de donde se originan por proteólisis 10 proteínas individuales en el siguiente orden: NH<sub>2</sub>-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH. Las proteínas E y M están presentes en la envoltura, la C conforma la cápside y las siete restantes se detectan solo en la célula infectada por lo que se conocen como no-estructurales o NS- (Lindenbach & Rice 2003). Todas las proteínas del virus pueden ser blancos potenciales de un medicamento, por lo que el conocimiento estructural y funcional de cada una es determinante para una intervención quimioterapéutica. Detalles de interés de cada una de las proteínas se describen a continuación (Sampath et al., 2009; Ghosh & Basu 2008; Rice 1996; Leung et al., 2008).

Proteína C - por su alto contenido de aminoácidos básicos interacciona con el ARN para formar la nucleocápside. Posee una secuencia hidrofóbica que media la asociación con la membrana y también una porción C-terminal que señala la traslocación de la prM al retículo endoplásmico rugoso (Rice, 1996). Proteína E - juega un papel esencial en el ensamblaje viral, morfogénesis e infección de células hospederas. Funciona como ligando de unión al receptor y lleva a cabo la fusión de membranas viral y celular, la interferencia de este proceso es una alternativa de inhibición viral. La proteína adquiere diferentes conformaciones en su estado inmaduro, maduro y activado durante la fusión. (Ghosh & Basu 2008; Stiasny et al., 2006). Proteína prM /M – la prM forma complejos con la prE previniendo en ésta un cambio conformacional irreversible que resulte en fusión anticipada durante el ensamblaje de la partícula. Antes de la liberación del virus, ocurre proteólisis de un segmento de la prM

convirtiéndose en M, la forma que se encuentra en el virus infeccioso (Perera et al., 2008).

Proteína NS1 - es inicialmente sintetizada como una glicoproteína monomérica, hidrofílica y soluble en agua, puede presentarse como dímeros y multidímeros en las formas intracelular, anclada a la membrana externa y extracelular secretada. Su dimerización es requerida para el transporte al aparato de Golgi donde sufre modificaciones, seguido del transporte a la membrana plasmática para su liberación. La forma soluble es endocitada por células no-infectadas acumulándose en endosomas e interrumpiendo el tráfico de moléculas (Sampath et al., 2009). NS2: es una proteína pequeña hidrofóbica, multifuncional, asociada a membrana e involucrada en la replicación del ARN viral. Se considera vital para el procesamiento adecuado de la NS1; y la NS2b lo mismo con relación a la NS3 (Leung et al., 2008). NS3: es una de las de mayor interés como blanco de un antiviral. El dominio N-terminal se fusiona con la región hidrofílica de NS2b actuando como serín proteasa siendo responsable del procesamiento proteolítico de la poliproteína. El dominio C-terminal funciona como una ARN-helicasa, ARN-trifosfatasa y NTPasa (Löhr et al., 2007). NS4: se ha sugerido que NS4a es indispensable para la translocación de la NS4b al lumen del retículo. Se cree que la NS4a induce rearrreglos en membranas para formar el complejo de replicación viral, y que la NS4b funciona como modulador del ciclo replicativo del virus, a través de interacción con la NS3 disociándola del RNA (Sampath et al., 2009). NS5 – proteína que tiene dos actividades enzimáticas diferentes, ARN polimerasa dependiente de ARN y S-adenosil metiltransferasa, su papel es crítico en la replicación del ARN viral (Ghosh & Basu 2008).

## 2.2 Ciclo replicativo viral

El VFA se puede replicar en diferentes tipos de células. In vivo, en macrófagos, linfocitos, células dendríticas, hepatocitos, microglia y endotelio (Xiao et al., 2001; Monath 2001); in vitro, células de mosquito *Aedes albopictus* son las más susceptibles, seguido por líneas celulares de órganos de animales (BHK-21, Vero, LLCMK-2) y de tejido humano (HepG2, Hela, U-937, K-562, entre otras) (Chambres et al., 1990; Marianneau et al., 1998; Schlesinger et al., 1981). La entrada del virus a la célula se realiza mediante eventos consecutivos que comienzan con la adsorción a receptores sobre la membrana celular, siendo el heparan sulfato y el DC-SIGN (molécula específica de adhesión de células dendríticas) los mejores descritos para los flavivirus (Germi et al. 2002; Tassaneeritthep et al. 2003). La unión o adsorción del virus al receptor celular es un proceso mediado por la prE y la penetración del citoplasma ocurre por endocitosis dentro de vesículas. El pH ácido dentro de la vesícula induce cambios conformacionales de la gpE, e incluye la exposición del péptido de fusión que es insertado en la membrana celular para dar inicio al proceso de fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal. La fusión forma un poro por el cual la cápside es liberada al citoplasma donde la traslación y replicación del ARN ocurren (Stiasny et al., 2006; Perera et al., 2008; Bressanelli et al., 2004; Borowski, 2006).

La replicación del ARN se inicia con la síntesis de una cadena negativa complementaria resultando una molécula de doble cadena (forma replicativa – RF) y ocurre en íntima unión con compartimentos membranosos intracelulares. Varias proteínas del virus y la célula participan en la replicación. La NS5, NS3 y NS2A se ensamblan con proteínas celulares formando el complejo de replicación. Para que se dé inicio a la replicación del genoma las regiones 5'CS y 3'CS deben formar interacciones entre sí con el fin de permitir la ciclización del ARN; y la formación del complejo inicia la traducción y síntesis de proteínas, con reclutamiento de la fracción 43S y 48S ribosomales en interacción con la proteína celular eIF4F que inicia la lectura del ARN viral. La

detección del primer codón es facilitada por la presencia de una región en forma de horquilla (cHP) ubicada 12 a 16 nucleótidos aguas abajo (Harris et al., 2006).

La formación de la nucleocápside es el evento más temprano en la formación de nuevos viriones, está conformada por una copia de genoma y abundantes de la proteína C y su ensamble es llevado a cabo en el citoplasma en asociación con la membrana del retículo endoplásmico. En el lumen del retículo, las proteínas prM y E forman un heterodímero que sigue la vía secretora celular hasta el aparato de Golgi. En las cisternas *trans* la proteína prM es fragmentada resultando la prM y este proceso deja expuesto el dominio de fusión resultando un virus maduro capaz de infectar la célula. Los nuevos viriones son transportados a la membrana celular por el sistema de vesículas, y el virus es liberado al medio extracelular por fusión de la membrana externa de la célula con la membrana vesicular exocítica o por rupturas específicas en la membrana celular (Clyde et al. 2006; Mukhopadhyay et al. 2005).

### **2.3 Ensayos para evaluar la actividad antiviral de compuestos**

Existen diversos abordajes para investigar la actividad antiviral de un compuesto químico o un producto natural. Independiente de la estrategia, siempre se deberá evaluar la toxicidad del compuesto para la célula blanco del virus (Cos et al. 2006). La magnitud de la citotoxicidad es un criterio indispensable para determinar la selectividad de la actividad inhibitoria del compuesto y por lo general se evalúa *in vitro* usando el ensayo del MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-tetrazolium diphenylbromide]. Este ensayo mide la disminución de la proliferación y/o viabilidad de las células cuando se expone al compuesto (Mosmann 1983).

### 2.3.1 In vitro

La primera etapa en el estudio de la actividad antiviral de un compuesto son los ensayos in vitro, usando monocapas celulares crecidas en diversos soportes. No existe un ensayo de referencia debido a que no hay una única célula hospedera para todos los virus de interés y en una misma la alteración causada por cada especie de virus puede variar. Independiente del ensayo, el efecto antiviral es confiable siempre y cuando se determine el índice de selectividad (IS), el cual corresponde a la razón entre la concentración que disminuye en 50% la viabilidad celular ( $CC_{50}$ ) y la que inhibe en 50% la replicación viral ( $CI_{50}$ ). Valor mínimo de 2 del IS se considera aceptable y el compuesto puede ser seleccionado para estudios en más detalle (Cos et al. 2006). Los procedimientos in vitro más usados por la confiabilidad, sensibilidad y reproducibilidad se describen a continuación.

*Reducción del número y tamaño de placa* – El virus se incuba unas horas con concentraciones del compuesto y la mezcla se adiciona al cultivo celular; o, el virus es primero adsorbido a la célula y la replicación se lleva a cabo en presencia del compuesto. En ambos casos, las células se mantienen en medio de cultivo viscoso que delimita la dispersión del virus resultando focos o placas. Las placas se pueden visualizar por coloración o por inmunohistoquímica y la actividad antiviral se evidencia cuando se confirma reducción en al menos 50% en relación con el control. Estos procedimientos son recomendados para evaluar la habilidad del compuesto para inactivar directamente el virus o inhibir la diseminación célula-célula. La limitante es que el procedimiento es laborioso, el resultado demora varios días, y está sujeto a variaciones notorias debido a pérdida de la estabilidad del virus (Meneses et al. 2009a; Cos et al. 2006).

*Reducción de la progenie viral*– El virus se trata como se describió en la reducción de placa pero el medio de cultivo es líquido impidiendo la formación de placa. El efecto antiviral se evidencia por reducción  $\geq 50\%$  del título viral o el nivel de una proteína viral secretada, ambos en una muestra del sobrenadante del cultivo. El título viral puede ser determinado por el método de plaqueo o de

la PCR en tiempo real (Meneses et al. 2009a; Stránská et al. 2002) y la proteína por el ELISA (Luder et al. 2008). El ensayo es indicado para evaluar la capacidad del compuesto para interrumpir la adsorción, penetración o etapas intracelulares de la replicación viral. Cuando el plaqueo es el método de cuantificación, el ensayo es laborioso y los resultados demoran varios días. En contraste, la PCR acorta ese tiempo e incrementa varias veces el número de compuestos que se pueden procesar simultáneamente (Meneses et al., 2009b; Parida et al., 2002; Kuo et al., 2002)

*Inhibición del efecto citopático (ECP)*- La replicación del virus se lleva a cabo en presencia del compuesto en el sobrenadante del cultivo, y el efecto inhibitorio se evidencia por ausencia o disminución  $\geq 50\%$  de alteración morfológica de la monocapa celular o ECP. El ensayo evalúa el efecto sobre la adsorción, penetración o replicación intracelular (Crance et al., 2003); y es apropiado para virus que inducen ECP y los que no forman placas en cultivos celulares; igualmente, útil en ensayos de tamizaje primario cuando no existe disponibilidad técnica más desarrollada (Sidwel & Smees, 2000; Morrey et al., 2002). Un compuesto considerado activo por este método, deberá ser evaluado usando el ensayo de reducción de la progenie viral como se describió arriba.

### 2.3.2 In vivo

La actividad antiviral in vitro del compuesto debe ser luego evaluada in vivo usando el modelo animal que más semeje la enfermedad en el humano. Para el estudio de drogas antivirales contra la FA los modelos más usados son los primates no humanos, principalmente monos Rhesus y macacos *cynomolgus* que desarrollan una enfermedad prácticamente indistinguible de la humana (Monath et al., 2003); y hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) que desarrolla disfunción hepática y necrosis parecida a la observada en el enfermo de FA (Tesh et al., 2001; Monath, 2008). No obstante, el uso de los animales está actualmente restringido a ciertos laboratorios convirtiéndolo en una alternativa de bajo alcance. Los indicadores de actividad de mayor referencia es el tiempo de

sobrevida del animal al desafío con el virus, la disminución de la carga viral en fluidos y tejidos, y/o la ausencia de síntomas (Monath et al., 1981).

La evaluación en modelo animal deberá continuar en ensayos clínicos con pacientes, los cuales se llevan a cabo en varias fases: I, con pocos individuos para determinar seguridad y efecto antiviral; II, con número mayor de participantes para confirmar seguridad y evaluar dosis en relación a la edad; III, grupos de individuos que reciben o no tratamiento con el compuesto (estudios controlados) para determinar la eficacia; y IV, estudio en poblaciones para confirmar eficacia e identificar efectos secundarios (Linde et al. 2001).

#### **2.4 Desarrollo de antivirales contra el VFA**

El uso de técnicas virtuales (*in silico*) ha permitido diseñar miles de compuestos con capacidad para interrumpir etapas del ciclo replicativo del virus actuando sobre blancos específicos. Entre estas: la adsorción y entrada; y la inhibición de proteínas que participan en la morfogénesis del virus.

*Inhibición de la entrada del virus* - Se ha focalizado hacia compuestos que se ligan a la prE impidiendo la adecuada interacción con el receptor celular. Se ha encontrado que compuestos tiazol, seleccionados por herramientas computacionales por su afinidad a la prE, inhibieron la replicación *in vitro* del VFA con  $CI_{50}$  entre 0.9 y 51  $\mu M$  (Li et al., 2008); lo mismo se encontró con galactomananos extraídos de *Mimosa scabrella* y *Leucaena leucocephala*, y esa inhibición también se observó *in vivo* (Ono et al. 2003). En estudios *in silico* se ha identificado un compuesto derivado de una estructura base de thiophene-phenyl-chlorine con valor predictivo de  $CI_{50}$  de 0.4  $\mu M$  pero aún no hay resultados en ensayos biológicos (Wang Q.-Y et al. 2009).

*Inhibición de la RNA polimerase (NS5)* – Existe en el mercado el antiviral ribavirina de amplio espectro contra virus RNA, pero desafortunadamente tiene baja actividad contra El VFA (Crance et al., 2003; Leyssen et al., 2005 y 2006).

Se han fabricado varios análogos de la droga conservando la actividad antiviral que resultaron 100 veces más potentes. El trifosfato de ribavirina inhibe la actividad metil-transferasa de la NS5 (Benarroch et al. 2004). Otro compuesto multifuncional heterocíclico mostró fuerte actividad contra el VFA, probablemente por inhibición de la inosin monofosfato deshidrogenasa y en consecuencia la polimerización del ARN viral (Nair et al., 2009).

*Inhibición de la NS3* – Es una estrategia de reciente interés para el desarrollo de una droga debido a que la estructura tridimensional de la proteína fue definida. Se evaluaron una serie de pequeños inhibidores peptídicos basados en la estructura de un sustrato tetrapéptido fluorogénico que la enzima es capaz degradar, y se obtuvo inhibición de la actividad proteasa del VFA con resultados promisorios. Iguales resultados se obtuvieron con otros flavivirus (Löhr et al., 2007).

*Inhibición de  $\alpha$ -Glucosidasa I* – Se ha reportado que inhibidores de esta enzima interfieren etapas del ciclo de replicación de virus con envoltura como el de la VFA. El mecanismo es la inhibición de la fusión entre envoltura y membrana celular durante la salida; y el bloqueo de la interacción entre receptores del virus con el de la célula debido a doblamiento defectuoso de las proteínas E y M (Mehta et al. 1998). La castanospermina, un alcaloide derivado del árbol de Moreton Bay (*Castanospermum australe*) que inhibe una variedad de disacaridasas murinas, fue evaluada contra el VFA pero se observó resistencia parcial al efecto inhibitorio (Whitby et al. 2005).

## **2.5 Efecto antiviral de componentes de aceites esenciales**

Los AEs son compuestos complejos sintetizados por plantas aromáticas como metabolitos secundarios, volátiles y caracterizados por un fuerte olor. Se usan en la medicina popular como antiséptica, sedante, analgésicos, anestésicos y antiespasmódicos; en la industria para preparar perfumes y fragancias; y en la gastronomía para preservar alimentos. Por estas propiedades, el AE de un

sinnúmero de plantas ha sido analizado y en docenas se ha detectado actividad contra virus con o sin envoltura, bacterias, parásitos, y hongos, todos ellos patógenos para humanos (Schnitzler et al. 2008; Saddi et al., 2007; Lai & Roy 2004; Koch et al., 2008; Duschatzky et al., 2005; Schuhmacher et al., 2003).

Los AEs están constituidos por alrededor de 20 a 60 componentes en distinta concentración siendo dos o tres mayoritarios (20-70%), todos ellos por lo general determinando sus propiedades biológicas. Los componentes son terpenos, terpenoides y compuestos aromáticos y alifáticos, caracterizados por bajo peso molecular (Bakkali et al., 2008; Betts 2001). Existen diferentes clases estructurales y funcionales de terpenos que se forman por la combinación de unidades de isopreno ( $C_5$ ), siendo los principales monoterpenos ( $C_{10}$ ), y sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), pero también se producen hemiterpenos ( $C_5$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) y tetraterpenos ( $C_{40}$ ). Se llaman terpenoides a los terpenos que contienen oxígeno. Los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropano, incluyen aldehídos, alcoholes, fenoles, y compuestos dioximetileno, estos son menos frecuentes que los terpenos (Pichersky et al. 2006; Betts, 2001; Croteau et al, 2000).

En los últimos años ha crecido el interés por evaluar la actividad antiviral de componentes aislados de AEs, y varios trabajos se han realizado principalmente con el VHS y hasta ahora en ensayos in vitro. El isoborneol, componente mayoritario del AE- *Salvia fruticosa*, inhibió en 86% la replicación del virus por tratamiento con una preparación de 0.1% antes de ser adsorbido a la célula. Más aún, la replicación fue suprimida completamente en la presencia del compuesto en el medio de cultivo a concentración de 0.06%. Se demostró que el efecto inhibitorio del compuesto se debió a interferencia de la glicosilación de las proteínas del virus impidiendo la formación de partículas infectivas (Armaka et al., 1999).

La actividad de fenilpropanoides y sesquiterpenos obtenidos del anís estrellado, entre estos los que se encuentran en una amplia variedad de AE tales como trans-anethol,  $\beta$ -cariofileno, eugenol,  $\beta$ -eudesmol, oxido de  $\beta$ -cariofileno y farnesol, fue evaluada contra el VHS-1. Los compuestos redujeron la formación de placas virales entre 40 – 98%, siendo mayor con el  $\beta$ -cariofileno a  $CI_{50}$  de 0.25  $\mu$ g/mL e IS de 140. Los compuestos tuvieron efecto antes pero no después de la adsorción del virus a la célula. De la misma manera, los monoterpenos  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno, *p*-cimeno, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, timol, citral y 1,8-cineol componentes mayoritarios del AE de eucalipto, árbol del té y timo, redujeron la infectividad del virus en más de 80%. El rango de  $CI_{50}$  resultó desde 3.5  $\mu$ g/mL para citral hasta 1200  $\mu$ g/mL para 1,8-cineol, e IS entre 1.7 para 1,8-cineol y 18.2 para  $\alpha$ -terpineol. El modo en el que actúan los monoterpenos estudiados parece ser interferencia en la entrada la célula debida a inactivación directa del virus (Astani et al. 2009a y b). Triptofordin C-2 un sesquiterpeno aislado de *Tripterygium wilfordii*, inhibió la replicación in vitro de virus envueltos como VHS, citomegalovirus, influenza A y mixovirus, pero no la de poliovirus y coxakievirus que no poseen envoltura. La infectividad residual a 50 mg/L del compuesto fue de 30-50%, dependiendo del virus. Además se sugirió que el compuesto interfiere con etapas tempranas de la replicación del VHS específicamente con la traslación (Hayashi et al., 1996).

Con respecto al efecto antiviral contra el VFA de componentes de AEs no se encontró ninguna publicación, luego de una búsqueda en varias bases de datos y tampoco en resúmenes de trabajos presentados en eventos científicos como congresos, simposios o seminarios. Más aún, no hay datos con otros flavivirus de interés como el virus del dengue (VDEN), virus del oeste del Nilo, virus de la encefalitis de San Luis, y otros.

Sobre la actividad antiviral de AEs de plantas medicinales cultivadas en Colombia es muy poco lo que ha sido publicado y como se anotó arriba, hasta

la fecha no se ha reportado la actividad inhibitoria de componentes de AEs sobre virus del género flavivirus. Los únicos trabajos que se encontraron fueron los que han venido realizando investigadores del Grupo de Arbovirus del CINTROP entre 2007-2010. En un estudio inicial con VFA se evaluaron 12 AEs distintos y de estos 8 redujeron entre 74 – 100% el número de placas formadas por el virus previamente expuesto al compuesto (antes de la adsorción). Los más activos fueron los obtenidos de especies de *Lippia* y el de *Pimenta racemosa* (Meneses et al., 2009a). El modo de acción antiviral de algunos AEs activos contra el VFA, como el de *L. alba*, *L. organoides*, *Artemisia vulgaris* y *Origanum vulgare* fue investigado. Se encontró que inhibieron la replicación in vitro antes y después de la adsorción a concentración < 100 µg/mL con potencial antiviral promisorio (Concentración mínima inhibitoria entre 3.7 µg/mL y 11.1 µg/mL; selectividad entre 8.8 y 26.5). Al contrario, ningún efecto se observó cuando la célula se expuso al AE antes de ser infectada con el virus. Los resultados sugirieron que el AE puede bloquear la infección celular impidiendo la entrada del virus debido a inactivación (Meneses et al., 2009c).

Resultados similares a los descritos con AEs contra el VFA reportó el mismo grupo con virus del dengue (VDEN). De un total de 13 AEs distintos 10 resultaron activos, entre ellos varias especies de *Lippia* (Meneses et al 2009a). En un estudio posterior con el AE de *L.alba* y *L. citriodora* se identificó que, al igual que con el VFA, el modo de acción fue la interrupción de la entrada del virus por inactivación directa. Estos AE mostraron potencial antiviral promisorio con  $CI_{50}$  entre 0.4 µg/mL y 33.7 µg/mL e IS entre 2 y 349 dependiendo del tratamiento (Ocazonez et al., 2010).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 AE-L. citriodora y AE-L. alba

Las muestras de cada AE que se usaron en el estudio fueron suministradas por la Dra. Elena Stashenko del Centro de Investigación de Biomoléculas (CIBIMOL) de la UIS. El AE fue obtenido de hojas (*L. citriodora*) o de la planta entera (*L. alba*) usando hidrodestilación asistida por radiación de microondas como fue descrito (Stashenko et al, 2003) y los componentes mayoritarios de cada AE han sido reportados (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes mayoritarios de los aceites esenciales usados en el estudio

Aceite esencial	No. de voucher	Rendimiento (%)	Componente*	
			Nombre	%
<i>Lippia alba</i> <sup>1</sup>	484334	0.63	Carvona	39.7
			Limoneno	30.6
			Biciclosesquifelandreno	8.9
			Piperitenona	4.5
			Piperitona	2.8
			β-bourboneno	1.7
<i>Lippia citriodora</i> <sup>2</sup>	484350	0.51	Geranial	18.9
			Neral	15.6
			Limoneno	10.7
			1,8-Cineol	5
			Espatulenol	4.7
			Geraniol	2.7
			<i>trans</i> - β-cariofileno	2.3
			Nerol	2
			Geranil acetato	1.3

\*: Ocazonez et al, 2010. <sup>1</sup>: nombre común: orégano de cerro, pronto alivio o curatodo.

<sup>2</sup>: nombre común: yerba Luisa, verbena o cidrón.

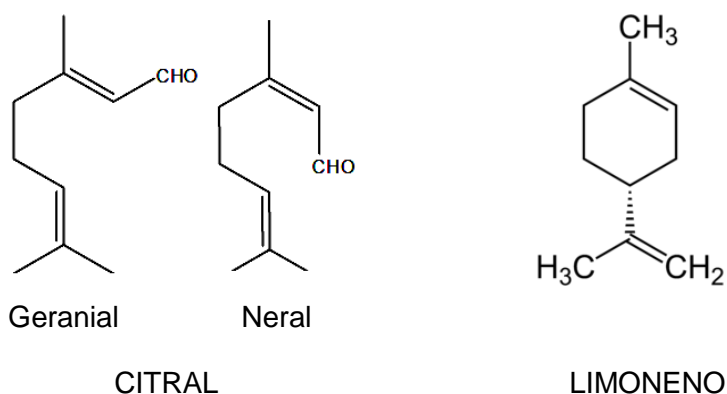
##### 3.1.2 Componentes mayoritarios

Se obtuvieron de la casa comercial Sigma Aldrich Co. (USA) y de pureza entre 95 y 97%. Para los ensayos se usaron preparaciones en dimetil-sulfóxido

(DMSO), el mismo solvente del AE. La estructura química de los componentes se muestra en la Figura 1 y estos fueron:

- Citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal o lemonal) – contiene geranial (cis-isómero) y neral (trans-isómero), dos terpenoides que se encuentran en el AE-*L.citriodora*.
- Limoneno - se usó el isómero (R)-(+)-limoneno, el cual es uno de los componentes mayoritarios de los dos AEs seleccionados.

Figura 1. Estructura química del componente mayoritario del AE-*L.citriodora* (Citral) y AE-*L.alba* (Limoneno) usados en el estudio.



3.1.3 Compuestos controles - Se obtuvieron de la casa comercial Sigma Aldrich Co. (USA).

- Dextran sulfato – es un carbohidrato polisulfatado con capacidad para inhibir la entrada a la célula de virus con envoltura (Herold et al., 1997; Gong et al., 2002). Debido a esa propiedad se utilizó como control positivo en los ensayos para evaluar la inhibición de la replicación del virus por tratamiento antes de ser adsorbido a la célula. Se hicieron preparaciones del compuesto usando como solvente medio de cultivo M-199 sin suero bovino fetal (SBF).

- Ribavirina – es un análogo de nucleósido que interfiere en la replicación del genoma de una variedad de virus ARN incluido el VFA (Crance, et al., 2003). Se utilizó como control positivo en los ensayos para evaluar la inhibición de la replicación del virus después de ser adsorbido a la célula. Se hicieron preparaciones del compuesto usando como solvente DMSO.

#### 3.1.4 Células

Se usó la línea epitelial Vero (riñón de mono verde africano) y la línea epitelial HeLa (carcinoma cervical humano); ambas fueron obtenidas de la colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP (UIS). Las células fueron mantenidas en cajas de 75 cm<sup>2</sup> en medio M-199 o RPMI, respectivamente, suplementado con 10% de SBF y a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.1.5 Virus

Se usó la cepa vacunal 17DD del VFA la cual fue seleccionada de la Colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP. El virus se replicó en células Vero. Brevemente, monocapas celulares crecidas en cajas de 25 cm<sup>2</sup>, se infectaron con el virus y se incubaron por 3 días a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, medio M-199 SBF 2%. Al término, el medio se colectó y usó para infectar nuevas monocapas de forma consecutiva. El sobrenadante del cuarto cultivo se recolectó y distribuyó en tubos que se almacenaron a -70°C hasta ser usado.

### **3.2 Procedimientos de laboratorio**

#### 3.2.1 Plaqueo

Este método limita el movimiento y dispersión de partículas virales nacientes de células inicialmente infectadas a células vecinas mediante la adición de un medio semisólido que localiza el efecto citopático y logra la formación de la placa. El procedimiento se utilizó para determinar la concentración de

partículas virales en el sobrenadante colectado de cultivos celulares, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Meneses et al., 2009c). Brevemente, monocapas de células Vero crecidas en cajas de 24 pozos se infectaron con 200  $\mu$ L de diluciones seriadas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ) de la preparación de virus durante 1 hora a 37°C. El virus no adsorbido se retiró mediante lavado con tampón fosfato 1X (PBS), las monocapas celulares se cubrieron con medio de plaqueo (medio M-199 62.5%; SBF 6%; carboxi-metil-celulosa 31.5%) y las cajas se incubaron durante 6 días a 37°C; CO<sub>2</sub> 5%. Al término, las células se fijaron con una solución de formaldehído al 10% y se colorearon con cristal violeta para visualizar las placas. El título viral se expresó como unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL) y se calculó de la siguiente manera: promedio de placas en el pozo, por la dilución mayor a la que se contaron, por 10 (conversión a mL).

### 3.2.2 Ensayo de citotoxicidad

El efecto tóxico de cada compuesto sobre las células seleccionadas se evaluó antes de los ensayos de efecto antiviral y utilizando el método del MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-tetrazolium diphenylbromide] como previamente se describió (Meneses et al, 2009c). Brevemente, monocapas de células Vero o HeLa crecidas en cajas de 96 pozos por 24 h a 37°C se expusieron 72 h a 37°C a variadas concentraciones del compuesto o solvente. Luego se adicionaron 20  $\mu$ L de MTT (5mg/mL) a cada pozo, las cajas se incubaron 4 h a 37°C y al término se adicionó 100  $\mu$ L de DMSO para solubilizar los cristales de formazán. Las cajas se agitaron vigorosamente y seguido se cuantificó la extensión de la reducción del MTT a formazán midiendo la absorbancia a 580 nm (DO<sub>580</sub>) en un espectrofotómetro (Merck). Cada compuesto se evaluó por triplicado en 2 ensayos independientes.

La citotoxicidad se expresó como la concentración del compuesto que disminuyó en 50% (CC<sub>50</sub>) la viabilidad celular con respecto al control (células tratadas con solvente). El cálculo se realizó por regresión lineal usando el

programa xl-fit para Windows, versión 4.0. Para cada compuesto se determinó el valor NOAEL (no observed adverse effect level) o concentración mayor sin efecto sobre la viabilidad celular usando la prueba de Scheffé.

### 3.2.3 Inmunofluorescencia

La técnica fue utilizada para confirmar inhibición de la replicación viral por el compuesto evidenciada por disminución de células con antígeno. Se siguió el protocolo previamente descrito por Ocazonez y colb. (2006). Brevemente, células provenientes del ensayo de tratamiento del virus después de la adsorción (descrito abajo) fueron fijadas en láminas de inmunofluorescencia con acetona fría. Las células fueron cubiertas con una dilución 1:200 de anticuerpo contra el VFA (Donación del Dr. Pedro Vasconcelos del Instituto Evrando Chagas, Brasil) y se incubaron por 30 min a 37°C en cámara húmeda. Al término se lavaron las placas con PBS por 10 min y luego fueron expuestas a una dilución 1:80 de anti-IgG de ratón marcado con el fluorocromo por 30 min a 37°C en cámara húmeda. El anticuerpo no ligado fue retirado por varios lavados por 10 min con PBS, las placas se secaron a temperatura ambiente y luego fueron cubiertas con glicerina tamponada para observación al microscopio de fluorescencia. Células infectadas fueron aquellas que se observaron de color verde fluorescente y las que no las que captaron el colorante de contraste (rojo).

## 3.3 Ensayos antivirales

### *Tratamiento del virus antes de la adsorción a la célula*

Se usó el ensayo de reducción de placa siguiendo el protocolo del Laboratorio previamente descrito (Meneses et al, 2009c). Brevemente, 50 UFP del virus se incubaron con solvente o variadas concentraciones (desde 0.062 hasta 800 µg/mL) de compuesto (AE, componente o dextran-sulfato) por 2 h a 37°C y la mezcla se usó para infectar por duplicado monocapas de células Vero crecidas en cajas de 24 pozos. Luego de 1 h a 37°C las células se lavaron con PBS y se

incubaron 6 días a 37°C en medio para la formación de placa. Al término, las placas virales se visualizaron adicionando a cada pozo cristal violeta (solución 1%). Cada compuesto se evaluó por triplicado en 2 ensayos independientes. El efecto inhibitorio del compuesto se expresó como la concentración que redujo en 50% el número de placas del virus tratado con respecto al no-tratado. Esto es:  $CI_{50}$  o concentración inhibitoria 50, que se calculó por regresión lineal usando el programa XL-fit para Windows, versión 4.0.

#### *Tratamiento del virus después de la adsorción a la célula*

Se usó el ensayo de reducción del título de la progenie viral siguiendo el protocolo del Laboratorio previamente descrito (Meneses et al. 2009b) con algunas modificaciones. Brevemente, monocapas de células Vero crecidas en cajas de 24 pozos a densidad de 100.000 células/pozo fueron infectadas con virus a multiplicidad de infección de 1 ( $MOI = 1$ ) y luego incubadas a 37°C por 1 h. Previamente se había demostrado que a éste  $MOI$  se consigue el mayor título viral 48 h después de la infección (Meneses, 2007). Las monocapas celulares fueron lavadas con PBS 1X, luego se adicionó medio de cultivo (M-199; SBF 2%) conteniendo o no compuesto (AE, componente o ribavirina) a las concentraciones antes señaladas y finalmente las cajas se incubaron en medio a 37°C;  $CO_2$  5%, durante 48 h para replicación del virus. Al término, se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C; y luego se procesó para determinar el título viral por el método de plaqueo como se describió arriba. Cada compuesto se evaluó por triplicado en 2 ensayos independientes. El efecto inhibitorio del compuesto se expresó como la  $CI_{50}$ .

#### *Tratamiento de la célula antes de la infección con el virus*

Se usó el ensayo de reducción de placa descrito arriba. Brevemente, monocapas de células Vero fueron crecidas en cajas de 24 pozos y expuestas a variadas concentraciones de compuesto (AE o componente) durante 24 y 72 h a 37°C;  $CO_2$  5%. Al término, las células fueron lavadas con PBS 1X para remover residuos del compuesto y luego el virus (50 UFP) fue adsorbido 1 h a

37°C; CO<sub>2</sub> 5%. Finalmente, las células se incubaron en medio para la formación de placas por 6 días bajo las mismas condiciones. Cada compuesto se evaluó por triplicado en 2 ensayos independientes. El efecto inhibitorio del compuesto se expresó como la CI<sub>50</sub>.

### 3.4 Toxicidad *in silico* de componentes mayoritarios

Se utilizó el programa OSIRIS Property Explorer, en línea (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). Tras dibujar la estructura del compuesto de interés, el programa permite localizar fragmentos dentro de la molécula que indiquen un potencial riesgo de toxicidad. Las alertas se generan para mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos irritantes y efecto sobre la reproducción; y son clasificados por el grado del riesgo (alto, medio y bajo).

### 3.5 Análisis de datos

Para determinar el potencial antiviral de cada compuesto (AE o componente) se calculó el IS (CC<sub>50</sub> / CI<sub>50</sub>). Valores de CI<sub>50</sub> ≤ 100 µg/mL con IS ≥ 2 se consideró potencial antiviral promisorio.

Se hicieron los siguientes análisis estadísticos usando el software SPSS 13.0; valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significantes:

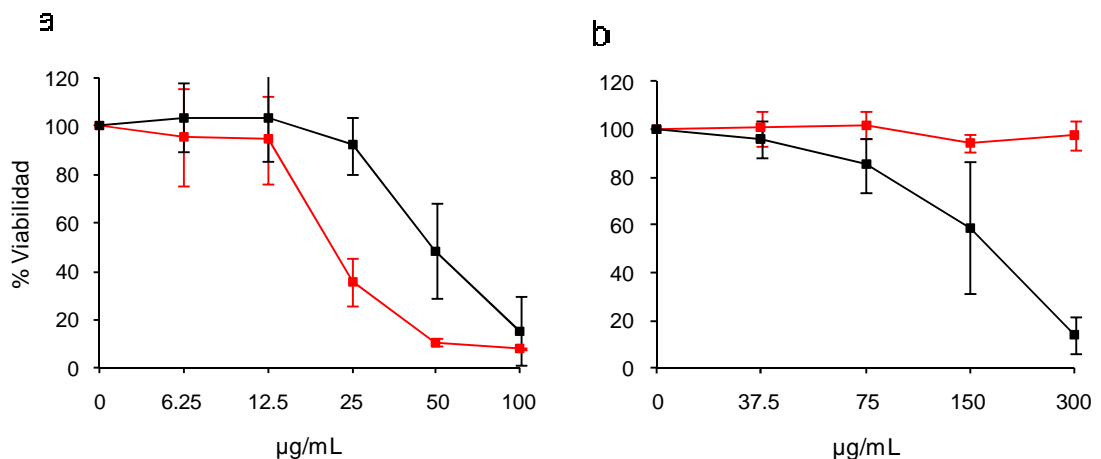
- Se estimó la tendencia dosis-respuesta en el ensayo antiviral usando regresión logística.
- Para determinar la variación de citotoxicidad del compuesto con respecto a la línea celular y variación entre componente y AE, se compararon los valores de CC<sub>50</sub> usando la prueba de Student.
- Para determinar diferencias del efecto inhibitorio del componente con respecto al AE se compararon los valores de CI<sub>50</sub> usando la prueba de Student.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Citotoxicidad

La toxicidad de los componentes y AEs se evaluó sobre célula animal (Vero) y humana (HeLa). Excepto con limoneno, la exposición a los otros compuestos disminuyó la viabilidad de cultivos de células Vero en proporción con la concentración usada (Figura 2); y lo mismo se observó con células HeLa (datos no mostrados).

Figura 2. Viabilidad de monocapas de células Vero en relación con exposición a concentraciones de compuesto. a: citral (rojo) y AE-*L.citriodora* (negro). b: limoneno (rojo) y AE-*L.alba* (negro).



Monocapas celulares fueron incubadas 72 h con el compuesto a las concentraciones señaladas y luego se determinó la viabilidad con respecto al control (no-tratadas) por el método de MTT. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  2DS de dos experimentos independientes por triplicado. Valores de la  $CC_{50}$  descritos en el texto.

La  $CC_{50}$  de los componentes y AEs se presenta en la Tabla 2. El citral y AE-*L.citriodora* resultaron tóxicos para ambos tipos de célula en consideración a que los valores de  $CC_{50}$  resultaron menores que 52 µg/mL. Al contrario se encontró con limoneno y AE-*L.alba*, esto es, los valores estuvieron por encima de 100 µg/mL sugiriendo bajo potencial para causar muerte celular. La citotoxicidad del componente mayoritario se comparó con la del AE. El citral resultó con mayor ( $p = 0.001$ , Student) potencial citotóxico que el AE-

*L.citriodora* en células Vero aunque en células HeLa no hubo diferencia ( $p = 0.6$ ). Por su lado, el limoneno presentó menor ( $p < 0.001$ , Student) potencial citotóxico que el AE-*L. alba* en ambas líneas celulares.

Tabla 2. Valores  $CC_{50}$  del componente mayoritario con respecto al aceite esencial para célula humana (Hela) y de animal (Vero).

Compuesto	Célula HeLa		Célula Vero	
	$CC_{50}(\mu\text{g/mL})$	$p^*$	$CC_{50}(\mu\text{g/mL})$	$p^*$
Citral	$22.1 \pm 1.1$	0.6	$27.3 \pm 1.3$	0.001
AE- <i>Lippia citriodora</i>	$35.3 \pm 4.1$		$51.2 \pm 18.6$	
Limoneno	$920.5 \pm 185.7$	0.0002	$944.1 \pm 90.3$	$< 0.001$
AE- <i>Lippia alba</i>	$375.5 \pm 40.1$		$164.9 \pm 60.7$	

$CC_{50}$  : concentración citotóxica 50, los valores fueron obtenidos de la curva dosis-respuesta para cada compuesto usando el programa XL-fit. AE: aceite esencial. \*: comparado con el AE-*L.citriodora* y AE-*L.alba*, respectivamente.

Con el propósito de evaluar si la  $CC_{50}$  de los compuestos varía dependiendo de la célula, se compararon entre sí los valores obtenidos en célula HeLa *versus* Vero. Con limoneno no hubo diferencias ( $920.5 \pm 185.7$  *versus*  $944.1 \pm 90.3$ ,  $p = 0.8$ , Student); mientras que el citral y el AE-*L.citriodora* resultaron más tóxicos ( $p < 0.01$ ) para célula HeLa ( $22.1 \pm 1.1$  *versus*  $27.3 \pm 1.3$  y  $35.3 \pm 4.1$  *versus*  $51.2 \pm 18.6$ , respectivamente). El AE-*L.alba* fue más tóxico para células Vero ( $164.9 \pm 60.7$  *versus*  $375.5 \pm 40.1$ ;  $p < 0.01$ ). Aunque valores de  $CC_{50}$  de esos compuestos variaron en relación con la célula, el potencial citotóxico continuó siendo el mismo. Esto es, alto ( $CC_{50} < 60 \mu\text{g/mL}$ ) para citral y AE-*L.citriodora*, y bajo ( $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) para limoneno y AE-*L.alba*.

El potencial citotóxico de cada compuesto se estimó también según el valor NOAEL, esto es, la mayor concentración a la cual no se observó disminución de la viabilidad celular con respecto al control (Hayes et al., 2002). El valor NOAEL del citral resultó igual que el del AE-*L.citriodora* en célula Hela, pero menor en Vero confirmando la mayor citotoxicidad para estas células encontrada con la  $CC_{50}$ . Como se esperaba, el valor NOAEL del limoneno

resultó superior comparado con el del AE, e indicó baja citotoxicidad de los compuestos (Tabla 3).

Tabla 3. Valores NOAEL de los componentes mayoritarios con respecto al aceite esencial para célula humana y de animal.

Compuesto	Célula HeLa	Célula Vero
	µg/mL	µg/mL
Citral	12.5	12.5
AE- <i>L. citriodora</i>	12.5	25
Limoneno	600	600
AE- <i>L. alba</i>	150	75

NOAEL (No Adverse Effect Level): concentración mayor del compuesto a la cual no se observó disminución de la viabilidad celular. Los valores fueron calculados por la prueba de Scheffé, con  $\alpha = 0.05$ . AE: aceite esencial. Valores  $\geq 100$  µg/mL indican baja citotoxicidad

Teniendo en cuenta los valores de  $CC_{50}$  y NOAEL se puede concluir que el citral y el AE-*L. citriodora* son compuestos con alto potencial citotóxico in vitro para las células de origen humano y de animal incluidas en este estudio; mientras que el limoneno y el AE-*L. alba* podrían ser considerados compuestos de bajo o nulo potencial.

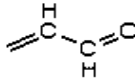

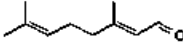
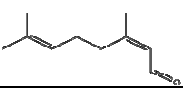

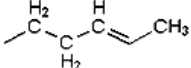
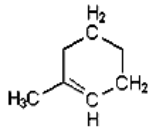
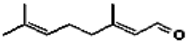
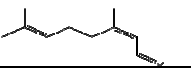

#### 4.2 Toxicidad *in silico* de componentes mayoritarios

Usando el programa OSIRIS Property Explorer se hizo una aproximación sobre el riesgo de efectos adversos en seres vivos por exposición al citral y limoneno (Tabla 4).

La molécula completa del citral resultó de alto riesgo tumorigénico y puede causar efectos sobre la reproducción; además, de alto riesgo mutagénico proveído por la porción de la molécula que contiene un grupo aldehído y una insaturación en el carbono  $\beta$ ; y efecto irritante por la porción de la cadena carbonada que presenta una insaturación en el carbono 2. Con respecto al limoneno, la porción de la cadena carbonada que presenta una insaturación en el carbono  $\alpha$  puede causar a riesgo medio efectos mutagénicos, tumorigénicos

y sobre la reproducción; asimismo el anillo insaturado de 6 carbonos está asociado con un alto riesgo para producir irritación.

Tabla 4. Riesgo de efectos tóxicos sobre organismos vivos del citral y limoneno y fragmento de la molécula asociado.

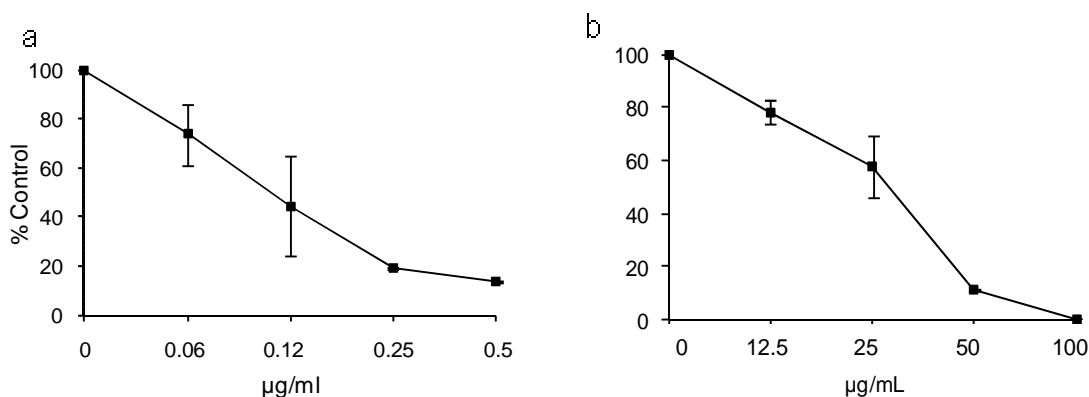
Efecto	Citral		Limoneno	
	Riesgo	Fragmento	Riesgo	Fragmento
Mutagénico	Alto		Medio	
Tumorigénico	Alto	 	Medio	
Irritante	Alto		Alto	
Sobre la reproducción	Alto	 	Medio	

La estimación se realizó usando el software OSIRIS Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

### 4.3 Efecto inhibitorio sobre el VFA

Antes de evaluar el efecto inhibitorio de componentes y AEs, se hicieron experimentos con los compuestos controles con el propósito de estandarizar el procedimiento para obtener curvas dosis-respuesta. Como se muestra en la Figura 3, con el dextrán sulfato y la ribavirina se observó un efecto antiviral. Con el primero hubo reducción del número de placas de infección formadas por el virus sobre la monocapa celular; y con el segundo lo mismo con el número de UFP por mL en el sobrenadante del cultivo. El análisis con la prueba de regresión logística indicó que el comportamiento del ensayo fue tipo dosis-respuesta para dextrán-sulfato ( $r = 0.88$ ) y ribavirina ( $r = 0.95$ ).

Figura 3. Efecto inhibitorio dosis-respuesta del dextrán sulfato (a) y la ribavirina (b) sobre la replicación in Vitro del VFA

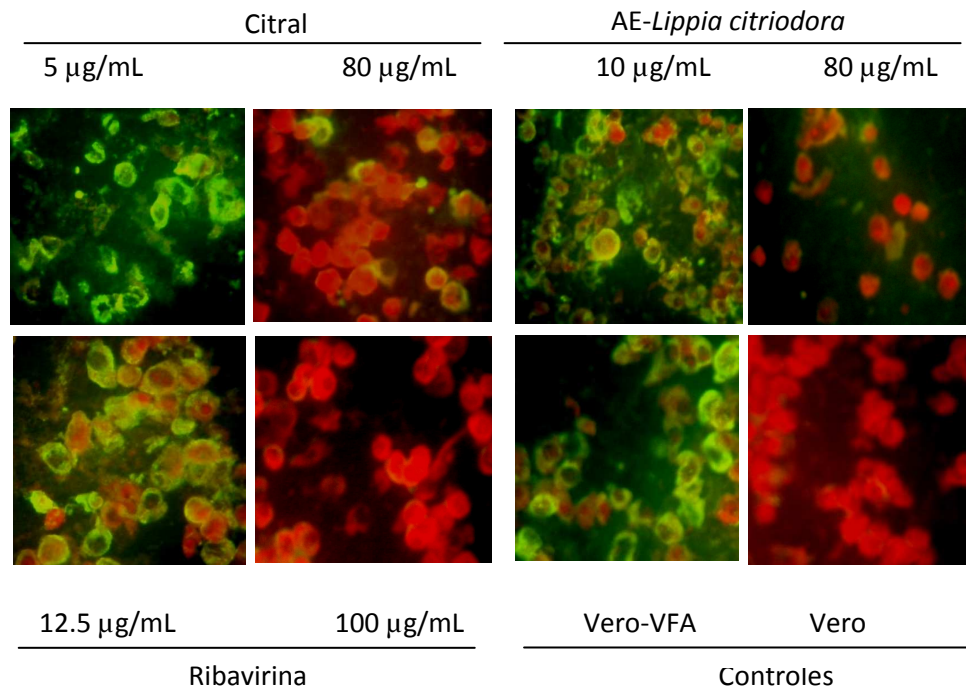


a: células Vero fueron infectadas con VFA previamente tratado con dextran-sulfato a las concentraciones señaladas por 2 h a 37°C y 6 días después se determinó la reducción (%) de placas virales con respecto al control. b: células Vero se infectaron con VFA (MOI = 1) y la replicación se llevó a cabo en medio que contenía ribavirina y a las 48 h post-infección se determinó la reducción (%) del título viral (UFP/mL) en el sobrenadante. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  2DS de dos experimentos independientes por duplicado.

El efecto antiviral en ensayos iniciales con los componentes, AEs y compuestos controles, se evidenció también por reducción del porcentaje de células infectadas detectadas en el ensayo de inmunofluorescencia. La Figura 4 muestra reducción de la infección celular dependiente de la concentración de compuesto adicionado al medio de cultivo.

Para identificar la etapa del ciclo de replicación del virus sobre la cual el compuesto podría causar inhibición se hicieron tres tipos de tratamiento: (i), antes de la adsorción - las monocapas celulares fueron infectadas con virus previamente expuesto al compuesto 2 h a 37°C; (ii), después de la adsorción - el compuesto se adicionó al medio de cultivo después de la infección de la célula con virus no-expuesto; y (iii), tratamiento de la célula - las monocapas fueron expuestas a los compuestos por 24 y 72 h a 37°C antes de ser infectadas con virus no-expuesto. Células o virus no-expuesto según el caso y dextran-sulfato o ribavirina, se usaron como controles. El porcentaje de reducción de placa o del título viral fue calculado con respecto a la cantidad de virus producido en ausencia del compuesto.

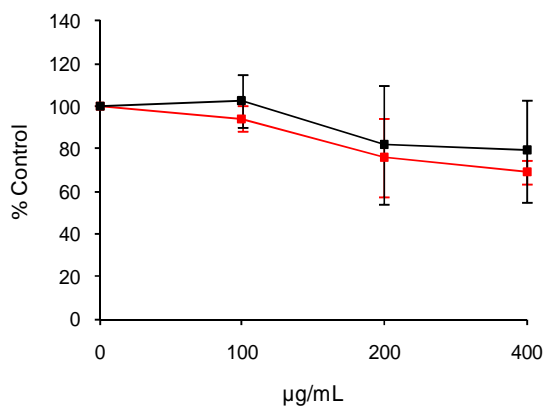
Figura 4. Efecto inhibitorio de compuestos incluidos en el estudio dependiente de la concentración observado por inmunofluorescencia.



Células Vero fueron infectadas con VFA (MOI = 1) y la replicación se llevó a cabo en medio de cultivo que contenía los compuestos a las concentraciones indicadas. A las 48 h post-infección las células se analizaron por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-VFA como se describe en el texto. Verde: células con presencia de virus. Rojo: células sin virus.

El potencial antiviral in vitro de un compuesto se considera promisorio, cuando se observa inhibición de la replicación del virus igual o mayor que 50% a concentración máxima de 100 µg/mL (Cos et al., 2006). El citral a concentración de 80 µg/mL redujo en 97.4% y 72.7% el número de placas y UFP/mL del VFA, antes y después de la adsorción. El AE-*L.citriodora* lo hizo en 81.8% y 98.6% a concentración de 62.5 µg/mL y 80 µg/mL, respectivamente. En contraste, el limoneno no causó inhibición significativa con ninguno de los dos tratamientos; aún utilizando 400 µg/mL la reducción fue solo de 1.3% y 7.7% antes y después de la adsorción, respectivamente (Figura 5). Como se esperaba, el AE-*L.alba* inhibió en 42.4% y 99.6% el número de placas y de UFP/mL a concentración de 62.5 µg/mL y 80 µg/mL, respectivamente.

Figura 5. Ausencia de efecto inhibitorio sobre la replicación del VFA por tratamiento con limoneno antes (rojo) y después de la adsorción (negro).



Antes de la adsorción: células Vero fueron infectadas con VFA previamente tratado con compuesto las concentraciones señaladas por 2 h a 37°C y 6 días después se determinó la reducción (%) de placas virales con respecto al control. Después de la adsorción: células Vero se infectaron con VFA (MOI = 1) y la replicación se llevó a cabo en medio que contenía compuesto y a las 48 h post-infección se determinó la reducción (%) del título viral (UFP/mL) en el sobrenadante. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  2DS de dos experimentos independientes por duplicado.

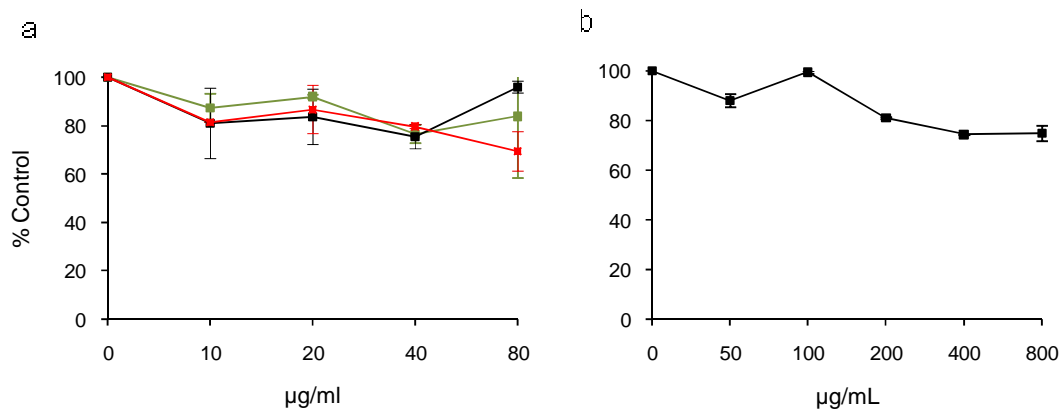
El efecto sobre la replicación del virus debido a tratamiento previo de la célula por 24 h con el componente o el AE se muestra en la Figura 6. Con el citral, AE-*L.citriodora* y AE-*L.alba* a concentración mayor o igual que 100 µg/mL no hubo reducción  $\geq$  50% del número de placas virales; y lo mismo se observó con el limoneno incluso usando concentración de 800 µg/mL. La ausencia de efecto inhibitorio también se observó cuando el tratamiento se hizo por 72 h (datos no mostrados).

#### 4.4 Potencial antiviral de compuestos activos

En este estudio el potencial antiviral promisorio mínimo del compuesto se consideró como  $CI_{50} \leq 100\mu\text{g/mL}$  e  $IS \geq 2$  adoptando los parámetros recomendados por Cos et al (2006). En este contexto, el limoneno resultó un compuesto sin potencial antiviral in vitro contra el VFA en cada uno de los tratamientos evaluados y lo mismo para los otros tres compuestos por tratamiento previo de la célula.

Como se describió arriba, el efecto inhibitorio sobre la replicación del virus se observó con citral y los AEs. Los valores de  $CI_{50}$  e IS para citral con respecto al AE-*L.citriodora* por tratamiento antes y después de la adsorción se muestran en la Tabla 5. Con ambos tratamientos, el citral resultó con igual potencial antiviral que el AE en términos de  $CI_{50}$  pero con un valor de IS menor que 2. Al comparar el potencial de cada compuesto con respecto al tratamiento no se observaron diferencias. Esto es, los valores de  $CI_{50}$  del citral fueron  $17.6 \pm 5.4$  versus  $25 \pm 6.5$  ( $p = 0.4$ ) y los del AE-*L.citriodora*  $19.4 \pm 7.5$  versus  $21.2 \pm 1.7$  ( $p = 0.8$ ).

Figura 6. Ausencia de efecto inhibitorio sobre la replicación in Vitro del VFA debido a tratamiento previo de la célula con componente mayoritario o AE.



Monocapas de células Vero fueron tratadas por 24 h con las concentraciones señaladas de compuesto antes de ser infectadas con VFA no-tratado y el porcentaje de reducción de placas virales fue determinado a los 6 días post-infección. a: citral (rojo), AE-*L. citriodora* (verde), AE-*L. alba* (negro). b: limoneno. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  2DS de dos experimentos independientes hechos por triplicado.

Como se esperaba el AE- *L.alba* mostró potencial antiviral por los dos tratamientos con  $CI_{50}$  de  $64.7 \pm 20.2$   $\mu\text{g/mL}$  e IS de 2.5; y de  $15.2 \pm 1.2$   $\mu\text{g/mL}$  e IS de 10.8 para tratamiento antes y después de la adsorción, respectivamente. El resultado confirma el potencial promisorio antiviral del AE encontrado en estudios previos (Meneses et al., 2009 a y c).

Tabla 5. Potencial antiviral del citral contra el VFA de acuerdo al tratamiento y comparado con el del AE-*Lippia citriodora*.

Compuesto	Antes de la adsorción			Después de la adsorción		
	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	p*	IS	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	p*	IS
Citral	17.6 ± 5.4	0.7	1.3	25 ± 6.5	0.5	0.9
AE- <i>L.citriodora</i>	19.4 ± 7.5		2.6	21.2 ± 1.7		2.4

\*: Student. CI<sub>50</sub>: concentración que causo reducción del número de placas de infección (antes de la adsorción) o del título viral (después de la adsorción) en células Vero. IS: índice de selectividad = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>; los valores de CC<sub>50</sub> son mostrados en la Tabla 2.

## 5. DISCUSIÓN

En los últimos años ha crecido el interés de la industria farmacéutica por productos obtenidos de plantas medicinales que sean de fácil cultivo y de conocimiento popular. *L. alba* y *L. citriodora* son conocidas popularmente como “pronto alivio” y “verbena olorosa”, respectivamente. En la medicina alternativa se usan para preparar infusiones o brebajes a los que se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, sedantes, diaforéticas, emenagogas, tranquilizantes y expectorantes, y también son usados para aliviar dolores estomacales. Las plantas son bien conocidas en regiones tropicales y subtropicales donde ocurren brotes de FA (Oliveira et al., 2006; Pascual et al., 2001; Manenzhe et al., 2004). En el contexto antes mencionado, el desarrollo de investigaciones referentes a buscar posibles candidatos de agentes con actividad sobre la FA es de gran interés así como de alta relevancia.

Numerosos estudios, mayoritariamente contra el VHS, han sido publicados sobre la actividad antiviral de AEs, y esto mismo se ha hecho con componentes presentes en una docena de ellos (Sivropoulou et al., 1997; Allahverdiyev et al., 2004; Saddi et al., 2007; Astani et al., 2009). Al contrario, la información sobre la actividad antiviral del AE contra el VFA es muy escasa, solo los estudios realizados en Colombia por el CINTROP (Meneses et al., 2009 a y c). Más aún, luego de consultar varias bases de datos no se encontró información documentada sobre la actividad antiviral de componentes de los AEs. Así, este trabajo constituye aporte de nuevo conocimiento sobre fuente de compuestos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FA.

En este estudio se investigó si componentes del AE de *L.citriodora* y *L.alba* podían inhibir la replicación in vitro del VFA. Para esto se usaron dos tipos de ensayos, los cuales son ampliamente recomendados para screening de la actividad antiviral de compuestos (Cos et al., 2006; Safrin et al., 1995). El ensayo de reducción de placa se usa para evaluar inactivación directa de virus extracelular; y el de reducción de progenie para explorar la propiedad del

compuesto para interrumpir etapas intracelulares del ciclo de replicación. Los dos ensayos fueron reproducibles como se muestra en la Figura 3, al obtenerse curvas dosis-respuesta con compuestos de acción inhibitoria conocida. Uno que altera la envoltura impidiendo la adsorción del virus a la célula (dextrán-sulfato) y otro que interrumpe la replicación del ARN viral (ribavirina).

Como previamente fue publicado, el AE de *L.citriodora* cultivada en Colombia contiene geranial (18.9%), neral (15.6%) y limoneno (10.7%), los tres compuestos correspondiendo a 45.2% de los componentes. El limoneno además corresponde al 30.6% de los componentes del AE de *L.alba* (Ocazonez et al 2010). Debido a que el neral y geranial no se encuentran disponibles comercialmente se analizó el citral. Esto limita las conclusiones sobre el potencial antiviral de los componentes, debido a que no se puede identificar con precisión la actividad de cada uno y se podría presentar enmascaramiento o fortalecimiento de la actividad del uno sobre la del otro. Con respecto al limoneno, es conocido que el AE de varias plantas contiene los dos isómeros [R-(+) y S-(-)] y diferencias entre ellos de la actividad antimicrobiana ha sido reportada (Aggarwal et al., 2002; Asztemborska et al., 2002). En este trabajo se analizó solamente el R-(+)-limoneno y por lo tanto el análisis de los resultados está restringido a este isómero.

#### *Toxicidad de los compuestos*

El efecto citotóxico del citral fue evaluado sobre célula humana (carcinoma de cérvix) y de animal (riñón de mono). El valor de la  $CC_{50}$  ( $< 50 \mu\text{g/mL}$ ) e IS ( $< 2$ ) confirman el potencial citotóxico del compuesto para las mismas células y HaCat (epidérmicas humanas) reportado en otros estudios (Mesa et al., 2009; Koba et al., 2009; Astani et al., 2009b). Las alteraciones del citral sobre la célula fueron también predichas haciendo análisis *in silico*. Se identificó potencial mutagénico, tumorigénico, alteraciones sobre la reproducción. Se ha sugerido que la presencia de la función aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en los componentes del citral podría darle propiedades carcinogénicas y mutagénicas (Lewis et al., 1996). Duerksen y colb. (1999) encontraron que el citral induce altos niveles de la

proteína p53 promoviendo la muerte celular por apoptosis debida a daño del ADN. Nogueira y colb. (1995) reportaron efectos tóxicos del compuesto en ratones hembra en gestación. No obstante, se ha reportado que el compuesto carece de mutagenicidad y no incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en fibroblastos de hámster (Gomes et al., 1998).

Al contrario de lo observado con el citral, el R-(+)-limoneno no fue tóxico para células humanas y de animal con  $CC_{50}$  entre 920 y 944  $\mu\text{g/mL}$ , Lo mismo reportaron Mesa y colb. (2009) y Arruda y colb. (2009), encontrando valores de  $CC_{50} > 154 \mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, el análisis *in silico* sugiere que el limoneno tiene características estructurales que le confieren propiedades como mutagénico, tumorigénico y puede afectar la reproducción aunque a riesgo medio. Esta suposición podría ser descartada en consideración a dos hallazgos bien documentados con el mismo isómero del compuesto: (i) ausencia de mutagenicidad usando el ensayo salmonella/microsoma y de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en células de ovario de hámster chino; leve efecto sobre la reproducción cuando se administró una concentración alta (2.363 mg/kg) a ratones entre el día 7 y 12 de gestación (Turner et al., 2001; Jameson 1990) y (ii) el compuesto es ampliamente utilizado en la elaboración de jugo de frutas, refrescos, productos horneados, helados y tortas, y está incluido en la lista de compuestos seguros (Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de América. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>).

#### *Actividad antiviral*

Uno de los parámetros más determinantes del potencial antiviral de un compuesto es el IS ( $CC_{50}/CI_{50}$ ). Es decir, cuanto mayor la  $CC_{50}$  y menor la  $CI_{50}$  mayor el potencial promisorio del compuesto. Se considera que cuando se evalúa por primera vez la actividad antiviral de cualquier compuesto, la  $CC_{50}$  deberá ser mayor que 100  $\mu\text{g/mL}$ , la  $CI_{50}$  cercana a 25  $\mu\text{g/mL}$  e IS deberá resultar entre 2 y 4. Compuestos con  $IS < 2$  se consideran tóxicos para la célula

y por lo mismo de poco interés para ser incluidos en estudios más detallados (Cos et al., 2001; Amoros et al., 1992).

Los resultados obtenidos demuestran que la exposición del VFA al citral antes de ser adsorbido a la célula inhibió su posterior replicación. El efecto fue observado a  $CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$  e  $IS < 2$ . La acción antiviral del citral fue reportada por Astani y colb. (2009b) a  $CI_{50}$  de  $3.5 \mu\text{g/mL}$  e IS de 12.9 cuando el VHS se incubó 1 h con el compuesto. Los resultados de este estudio y el de Astani sugieren que el efecto inhibitorio viral del citral puede ser debido a inactivación directa del virus (acción virucida), y en consecuencia a interrupción en la entrada a la célula bloqueando la adsorción y/o penetración evitando la subsecuente replicación intracelular. Este modo de acción antiviral fue también reportado con el AE-*L. citiodora*, *L. alba* y *L. origanoides* (Meneses et al. 2009 a y b; Ocazonez et al., 2010), y numerosos trabajos han demostrado lo mismo con AE de un amplia variedad de plantas contra VHS (Schnitzler et al., 2008; Schuhmacher et al., 2003; Saddi et al., 2007). Otros estudios han demostrado potencial virucida contra el VHS de otros componentes mayoritarios como monoterpenos de *Salvia fruticosa* (Sivropoulou et al. 1997); fenilpropanoides y sesquiterpenos del AE del anís estrellado, eucalipto, árbol del té y timo (Astani et al. 2009a y b).

Hasta la fecha se conoce poco sobre el mecanismo de acción virucida de AEs o componentes aislados. Se ha sugerido que los compuestos podrían causar alteraciones estructurales en la envoltura del virus debido a su característica lipofílica (Cowan, 1999); o por unión a dominios de proteínas virales que interactúan con receptores proteicos en la membrana celular durante el proceso de adsorción y penetración al interior de la célula. (Astani et al., 2009). Este supuesto se respalda en el hecho de que virus no envueltos como Virus del Mosaico del Tabaco (Bishop, 1995) y Adenovirus (Cermelli et al., 2008) no fueron afectados por el AE de *Melaleuca alternifolia* y eucalipto, respectivamente. Al parecer, la conformación estructural del componente viral es determinante de la acción virucida del compuesto. Se ha encontrado que AEs presentan actividad diferente contra VHS y el VDEN, ambos con envoltura (Duschatzky et al., 2005).

En este estudio se hicieron experimentos con el isoborneol un componente del AE de *Salvia fruticosa* que resultó activo contra el VHS (Armaka et al., 1999), y no se encontró inhibición sobre el VFA con ningún tratamiento (datos no mostrados).

Algunas evidencias sugieren que componentes de AEs pueden inhibir etapas intracelulares del ciclo replicativo del virus además del efecto virucida. Triptofordin C-2 un sesquiterpeno aislado de *Tripterygium wilfordii* inhibió la síntesis de proteínas del VHS (Hayashi et al., 1996) y el isoborneol la glicosilación de proteínas del mismo virus (Armaka et al., 1999). La capacidad del citral para interrumpir etapas intracelulares del ciclo replicativo del VFA fue también evaluada en este estudio. El compuesto adicionado al medio de cultivo después de la adsorción del virus causó reducción significativa de la progenie viral a  $CI_{50}$  de 25  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 6). No obstante, no es posible concluir inequívocamente que el compuesto inhibió etapas del ciclo viral seguidas a la adsorción, debido a que no se hicieron experimentos para evaluar los diferentes procesos intracelulares del ciclo. Sin embargo, al no haber inhibición cuando la célula fue expuesta hasta por 3 días a concentraciones no-citotóxicas del compuesto antes de la adsorción del virus, se podría suponer que el citral no llegó al interior de la célula o si lo hizo no interrumpió etapas de la replicación viral. En consecuencia, la acción inhibitoria del compuesto sería debida a inactivación del virus presente en el sobrenadante del cultivo impidiendo nuevos ciclos de replicación.

El efecto inhibitorio sobre el VFA del citral fue comparado con el AE-*L.citriodora* (Tabla 6). Como se esperaba, e independiente del tratamiento, el AE mostró mayor potencial reflejado en IS de 2.6 vs 1.3 ( $p = 0,018$ ) y 2.4 vs 0.9 ( $p = 0.017$ ) antes y después de la adsorción, respectivamente. Lo mismo encontraron Astani y colb. (2009b), el potencial antiviral sobre el VHS de componentes terpénicos y fenilpropanoides del AE de eucalipto, árbol del té y timo fue menor que el de la mezcla completa. Con esto se podría pensar que en el AE se presenta

sinergismo entre componentes lo que potenciaría su efecto antiviral y explicando así el menor potencial antiviral de compuestos aislados.

La ausencia de efecto antiviral de limoneno fue observada con concentraciones de hasta 800 µg/mL con cualquiera de los tres tratamientos (Figura 5 y 6). Se descarta que este resultado haya sido debido a error metodológico, considerando la reproducibilidad de los ensayos con respuesta dependiente de la dosis. Como se ha observado en otros estudios (Aggarwal et al., 2002; Asztemborska et al., 2002), es posible que el resultado sea diferente usando el otro isómero del compuesto.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el citral y limoneno, componentes mayoritarios del AE-*L. citriodora* y AE-*L. alba*, carecen de potencial antiviral promisorio contra el VFA. Esto debido a la  $CI_{50}$  y IS del limoneno y citral, respectivamente, están fuera del rango de indicadores de potencial en términos de fuentes para la fabricación de un fármaco. Otros trabajos han demostrado que las propiedades antivirales del AE pueden reflejarse mejor en componentes presentes en menor proporción. Por ejemplo, isoborneol (Armaka et al., 1999), tujona (Sivropoulou et al., 1997) y terpineno (Astani et al., 2009b) presentaron mejor potencial contra el VHS en comparación con el componente mayoritario. Basados en nuestros resultados y en los de otros, se plantea la necesidad de evaluar el potencial antiviral de mayor número de componentes mayoritarios o de menor proporción presentes en AEs activos contra el VFA. Aquellos que resulten con potencial inhibitorio pueden ser seleccionados para estudios más detallados sobre la base molecular del efecto inhibitorio.

## 6. CONCLUSIONES

El citral y el AE-*L. citriodora* resultaron igualmente tóxicos para célula humana (HeLa) y de animal (Vero), sugiriendo que el componente tiene papel preponderante en la citotoxicidad del AE.

El citral igual que el AE-*L. citriodora* inhibió la replicación del VFA antes y después de la adsorción a la célula, sin embargo el potencial antiviral de ambos compuestos se puede considerar no prometedor debido a la citotoxicidad para célula humana.

El R-(+)-limoneno no fue tóxico para las células seleccionadas sugiriendo que la baja citotoxicidad del AE-*L. alba* podría ser debida en parte a la presencia del componente.

El R-(+)-limoneno no inhibió la replicación in vitro del VFA pero al contrario el AE-*L. alba*, sugiriendo que el componente no juega papel en el efecto inhibitorio del AE.

El modo de acción antiviral del citral y los AEs parece ser el bloqueo de la etapa de adsorción a la célula, debido a alteración estructural del receptor o receptores del virus.

Se requieren más estudios para descartar o demostrar que el citral y AEs inhiben etapas intracelulares del ciclo de replicación del virus

## BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, K., Khanuja, S., Ahmad, A., Santha, T., Gupta, V., Kumar, S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal* 2002, 17(1): 59–63.

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

Amoros, M., Simoes, M., Girre, L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 1992 55(12): 1732-1740.

Armaka, M., Papanikolaou, E., Sivropoulou, A. y Arsenakis, M. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research* 1999, 43: 79–92.

Arruda, D., Miguel, D., Yokoyama-Yasunaka, J., Katzin, A., Uliana, S. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2009, 63: 643-649.

Astani, A., Reichling, J., Schnitzler P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* on December 15, 2009a, DOI 10.1093/ecam/nep187.

Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytother. Res.* 2009b, 24(5): 673-679.

Asztemborska, M., Ochocka, J. Chiral monoterpenoids in plants- enantioselective chromatographic analysis, and their bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry* 2002, 27: 361-391

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. Biological effects of essential oils – a review. *Food and chemical toxicology* 2008, 46: 446–475.

Barrett A., Monath, T. Epidemiology and ecology of Yellow Fever Virus. In *The Flaviviruses: Detection, Diagnosis, and Vaccine Development*. Elsevier Academic Press (USA), 2003. p. 291-313.

Benarroch, D., Egloff, M., Mulard, L., Guerreiro, K., Romette, J., Canard, B. Structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2' O-methyltransferase domain by ribavirin 5' -triphosphate. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 35638-35643.

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

Betts, T.J. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr.* 2001, 936:33–46.

Bishop C. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (Tea Tree) against Tobacco Mosaic Virus. *J Essent Oil Res* 1995, 7: 641–644.

Borowski, P. Characterization of targets for antiviral therapy of *Flaviviridae* infections. *New Concepts of Antiviral Therapy*. Bogner and A. Holzenburg, Eds. 2006, p. 21–46.

Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S., Stura, E., Duquerroy, E., Lescar, J., Heinz, F., y Rey, F. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *The EMBO Journal* 2004, 23: 728–738.

Buckley, A., Gaidamovich, S., Turchinskaya, A., Gould, E. Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever virus non-structural protein in the nuclei of infected cells *Journal of General Virology* 1992, 73:1125-1130.

Castañeda, M., Muñoz, A., Martínez, J., Stanshenko, E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica* 2007, 33: 0122-1701.

Cermelli C, Fabio A, Fabio G, Quaglio P. 2008. Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Curr Microbiol* 56: 89–92

Chambers, T., Hahn, C., Galler, R., Rice, C. Flavivirus genome organization, expression, and replicación. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990, 44: 649-688.

Clyde. K., Harris, E. RNA Secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol* 2006, 80: 2170–2182.

Cos, P., Vlietinck, A., Berghe, D. y Maes, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* 2006, 106: 290–302b.

Cowan, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews* 1999 12: 564–582.

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

Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Grisse, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2000. American Society of Plant Physiologists.

Duarte, S., Cárdenas, C., Martínez J., Stashenko, E. Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por destilación – extracción con solvente simultánea, de hojas de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae). *Scientia et Technica* 2007, 33:0122-1701.

Duerksen, P., Yang, J., Ozcan, O. P53 induction as a genotoxic test for twenty-five chemicals undergoing in vivo carcinogenicity testing. *Environmental Health Perspectives* 1999, 107(10): 805-812.

Duschatzky, C., Possetto, M., Talarico, L., García, C., Michis, F., Almeida, N., de Lampasona, P., Schuff, C. and Damonte, E. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2005, 16:247–251.

FDA-Administración de alimentos y drogas. Código de regulaciones federales de los Estados Unidos. Título 21, Parte 182. 60.<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm>.

Ghosh, G., Basu, A. Present perspectives on flaviviral Chemotherapy. *Drug Discovery Today* 2008, 13:619-624.

Germi, R., Crance, J., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, J., Ruigrok, R., Zarski, J., Drouet, E. Heparan Sulfate-Mediated Binding of Infectious Dengue Virus Type 2 and Yellow Fever Virus. *Virology* 2002, 292: 162-168.

Gomes, M., Felzenszwalb, I., Paumgarten, F. Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella* /microsome assay. *Mutation Research* 1998, 416:129–136.

Gong, Y., Matthews, B., Cheung, D., Tam T., Gadawski, I., Leung D., Holan, G., Raff, J., y Sacks, S. Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Research* 2002, 55: 319–329.

Harris, E., Holden, K., Edgil, D., Polacek, C., Clyde, K. Molecular biology of flaviviruses: en *New Treatment strategies for dengue and other flaviviral diseases*. 2006, p 23-40.

Hayashi K, Hayashi T, Ujita K, Takaishi Y. Characterization of antiviral activity of a sesquiterpene, triptofordin C-2. *J Antimicrob Chemother* 1996, 37: 759–68.

Hayashi, K., M. Kamiya, and T. Hayashi. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus and HIV. *Planta Med.* 1995, 61:237–241.

Hayes, A., Markovic, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 2002 40: 535–543.

Herold, B.C., Siston, A., Bremer, J., Kirkpatrick, R., Wilbanks, G., Fugedi, P., Peto, C., Cooper, M. Sulfated carbohydrate compounds prevent microbial adherence by sexually transmitted disease pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41:2776–2780.

Julander, J.G., Morrey, J.D., Blatt, L.M., et al. Comparison of the inhibitory effects of interferon alfacon-1 and ribavirin on yellow fever virus infection in a hamster model. *Antivir. Res.* 2007a, 73: 140–146.

Julander, J., Furuta, Y., Schafer, K., Sidwell, R. Activity of T-1106 in a hamster model of yellow fever virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007b, 51:1962–1966.

Keller, T., Chen, Y, Knox, J. Finding new medicines for flaviviral targets. *Novartis Found Symp.* 2006, 277:102–114.

Koba, K., Sanda, K., Guyon, C., Raynaud, C., Chaumont, J., Nicod, L. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol* 2009; 4:29-34.

Koch, C., Reichling, J., Schneele, J. y Schnitzler, P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine* 2008, 15: 71–78.

Kuo, Y., Lin, L., Tsai, W., Chou, C., Kung, S., y Ho, Y. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2002, 46: 2854–2864.

Lai, P., Roy, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Curr Med Chem* 2004, 11:1451-1460.

Leung, J., Pijlman, G., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J., Khromykh, A. role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of Virology* 2008, 82(10): 4731–4741.

Lewis, D., Ionnides, C., Parke, D. COMPACT and molecular structure in toxicity assessment: a prospective evaluation of 30 chemicals currently being tested for carcinogenicity by the NCI/NTP, *Environ. Health Perspect.* 1996, 104(5): 1011–1016.

Leyssen P, Balzarini J, De Clercq E, and Neyts J. The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J Virol* 2005, 79:1943–1947.

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

Li, Z., Khaliq, M., Zhou, Z., Beth-Post, C., Kuhn, R., Cushman, M. Design, synthesis, and biological evaluation of antiviral agents targeting flavivirus envelope proteins. *J. Med. Chem.* 2008, 51:4660–4671.

Lindenbach, B., and Rice, C.M. Flaviviridae: The virus and their replication. In *Fields Virology*, D.M Knipe and P. M. Howley, eds. (Philadelphia Lippincott-Raven Publishers), 2003 pp.991-1041.

Linde K, Jonas, J., Melchart, D., Willich, E. The methodological quality of randomized controlled trials of homeopathy, herbal medicines and acupuncture. *Int J Epidemiol.* 2001, 30: 526-531.

Lindsey, N., Schroeder, B., Miller, E., Braun, M., Hinckley, A., Marano, N., Slade, B., Barnett, E., Brunette, G., Horan, K., Staples, J., Kozarsky, P., Hayes, E. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine* 2008, 26: 6077–6082.

Lopez A., Hudson J., Towers G. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2001, 77:189–196.

Löhr, K., Knox, J., Phong, W., Ma, N., Yin, Z., Sampath, A., Patel, S., Wang, W., Chan, W., Ranga-Rao, K., Wang, G., Vasudevan, S., Keller, K., Lim, S. Yellow fever virus NS3 protease: peptide-inhibition studies. *Journal of General Virology* 2007, 88: 2223–2227.

Luder, J., Mosso, C., Ceballos, I., del Angel, R. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virol J* 2008, 5: 51 (on line).

Manenzhe, N., Potgieter, N., Ree, T. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. *Phytochemistry* 2004, 65: 2333–2336.

Marianneau, P., A. M. Steffan, C. Royer, M. T. Drouet, A. Kirn, and V. Deubel. Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. *J. Infect. Dis.* 1998, 178:1270–1278.

Meneses, R., Torres, F., Stashenko, E., Ocazonez, R. Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla *Salud UIS* 2009a, 41: 236-243.

Meneses, R., Ocazonez, R., Torres, F., Stashenko E. Essentials 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* 2009b, 3.

Meneses, R., Ocazonez, R., Martínez, J., y Stashenko, E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2009c, 8:8.

Meneses, R. Actividad de extractos naturales sobre la replicación in vitro del virus de la fiebre amarilla (tesis de maestría). Bucaramanga, Univesidad Industrial de Santander. Facultad de Medicina. 2007, 37 p.

Mehta, A., Zitzmanna, N., Rudda, P., Blockb, T., Dwek, R.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents. *FEBS Letters* 1998, 430:17-22.

Mesa, A., Montiel, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur, L., Stashenko, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104(6): 878-884.

Monath, T. Treatment of yellow fever. *Antiviral Research* 2008, 78: 116–124.

Monath, T. Yellow fever: an update. *Lancet Infectious Diseases* 2001, 1: 11–20.

Monath, T.P., Barrett, A. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv. Virus Dis.* 2003, 60: 343–397.

Monath, T.P., Brinker, K.R., Chandler, F.W., Kemp, G., Cropp, B. Pathophysiologic correlations in a rhesus monkey model of yellow fever with special observations on the acute necrosis of B cell areas of lymphoid tissues. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1981, 30:431-443.

Morrey, J., Smee, D., Sidwell, R., Tseng, C. Identification of active antiviral compounds against a New York isolate of West Nile virus. *Antiviral Research* 2002, 55:107–116.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65; 55-63.

Mukhopadhyay S, et al. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005, 3:13-22.

Nair, V., Chi, G., Shu, Q., Julander, J., Smee, D. A heterocyclic molecule with significant activity against dengue virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009, 19: 1425–1427.

Jameson, C. NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene (CAS NO. 5989-27-5) in F344/N rats and B6C3Fi mice. National toxicology program. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. NIH Publicación No. 90-2802, 1990.

Nogueira, A., Carvalho, R., Souza, C. Chahoud, I., Paumgarten, F. Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat. *Toxicology* 1995, 96:105-113.

Ocazonez, R., Meneses, R., Torres, F., Stashenko, E. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010, 105(3): 000-000.

Ocazonez, R., Cortés F., Villar, L., Gómez, S. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, 101(7): 725-731.

Oliveira, D., Leitão, G., Santos, S., Bizzo, H., Lopes, D., Alviano, C., Alviano, D., Leitão, S. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 2006, 108: 103–108.

Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I., Coimbra, T., Gorin, P., Sierakowski, M. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Res.* 2003, 60; 201–208.

OPS. Control de la Fiebre Amarilla: guía práctica. 2005. 67p.

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

Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez, D., Villar, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 2001, 76: 201–214.

Perera, R., Khaliq, M. y Kuhn, R. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research* 2008, 80: 11–22.

Puig-Basagoiti, F., Tilgner, M., Forshey, B., Philpott, S., Espina, N., Wentworth, D., Goebel, S., Masters, P., Falgout, B., Ren, P., Ferguson, D., Shi, P. Triaryl pyrazoline compound inhibits flavivirus RNA replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50: 1320–1329.

Rice CM. *Flaviviridae*: The viruses and their replication. In: Fields BM, editor. Virology. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven 1996, p. 931-960.

Saddi, M., Sanna, A., Cottiglia, F., Chisu, L., Casu, L., Bonsignore, L. y De Logu, A. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2007, 6:10.

Safrin, S., Phan, L., Elbeik, T. A comparative evaluation of three methods of antiviral. *Clinical and Diagnostic Virology* 1995, 4:81-91.

Sampath, A., Padmanabhan, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Research* 2009, 81:6–15.

Schlesinger, J., Brandriss, M. Growth of 17D yellow fever virus in a macrophage-like cell line, U937: role of Fc and viral receptors in antibody-mediated infection. *The Journal of Immunology* 1981, 127(2): 659-665.

Schnitzler, P., Schuhmacher, A., Astani, A. y Reichling, J. Melissa officinalis oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine* 2008, 15 734–740.

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

Sidwell, R., Smee, D. In vitro and in vivo assay systems for study of influenza virus inhibitors. *Antiviral Research* 2000, 48:1–16.

Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., y Arsenakis, M. Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45: 3197–3201.

Stashenko E, et al. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* HBK grown in Colombia. *Nat Product Commun* 2008; 3: 563-566.

Stashenko,E., Jaramillo, B., Martínez, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 2003, 27(105): 579-597.

Stiasny, K. y Heinz, F. Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology* 2006, 87: 2755–2766.

Stránská, R., van Loon, A., Polman, M., Schuurman, R. Application of PCR real time for determination of antiviral drugs susceptibility of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemoth* 2002, 46: 2943-2947.

Tassaneeritthep, B., Burgess, T., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D., Steinman, R., Schlesinger, S., Marovich M. DC-SIGN (CDR.,209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; 197:823–829.

Tesh, R.B., Guzman, H., da Rosa, A.P., Vasconcelos, P., Días, L., Bunnell, J., Zhang, H., Xiao, S. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. *J. Infect. Dis.* 2001, 183: 1431–1436.

Turner, S., Tinwell, H., Piegorsch, W., Schmezer, P., Ashby, J. The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male big blue rats. *Mutagenesis* 2001, 16:329-332.

WHO. Yellow fever situation in Africa and South America 2006. *Weekly epidemiological record* 2008, 83: 69-76.

Valencia, M. Vigilancia epidemiológica: Fiebre amarilla y su control en Colombia 2002-2003. *Infectio* 2004, 8-3.

Vera, M., Velandia, M., García, I. y Bernal, P. Brote de fiebre amarilla selvática en Colombia 2004. *Iatreia* 2004, 17: 3.

Wang, Q., Patel, S., Vangrevelinghe, E., Xu, H., Rao, R., Jaber, D., Schul, W., Gu, F., Heudi, O., Ma, N., Poh, M., Phong, W., Keller, T., Jacoby, E., Vasudevan, S. A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:1823.

Whitby K, Pierson, T., Geiss, B., Lane, K., Engle, M., Zhou, Y., Doms, R., Diamond, M. Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo. *J. Virol.*2005, 79: 8698–8706.

WHO. Yellow fever situation in Africa and South America 2005. *Weekly epidemiological record* 2006, 81: 317–324.

Wilson, M., Chen, L., Barnett, E. Yellow Fever Immunizations: Indications and Risks. *Current Infectious Disease Reports* 2004, 6:34–42.

Xiao, S., Zhang, H., Guzman, H., Tesh, R. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *The Journal of Infectious Diseases* 2001, 183:1437–44.