

PROPUESTA PARA SELECCIONAR ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS DE COLOMBIA PARA INVESTIGACIÓN CON BASE EN SU CITOTOXICIDAD

PROPOSAL TO SELECT ESSENTIAL OILS FROM COLOMBIAN PLANTS FOR RESEARCH BASED ON ITS CYTOTOXICITY

Sindi Alejandra VELANDIA¹ BSc, María Camila FLECHAS¹ MSc., Elena E. STASHENKO² Ph.D.,
Raquel E OCAZONEZ^{1*} Ph.D.

Recibido: Enero 21 de 2016. Aceptado: Abril 08 de 2016.

RESUMEN

Antecedentes: Conocer la tendencia de productos de plantas a causar toxicidad en humanos es parte de la investigación orientada al descubrimiento de un medicamento natural. Las pruebas en animales son relativamente costosas, de bajo rendimiento, asociadas a sufrimiento del animal y diferencias relativas a la especie hacen difícil inferir efectos en humanos. Las pruebas en célula viva son recomendadas. **Objetivo:** Estudiar la tendencia a toxicidad de aceites esenciales (AE) de plantas de Colombia usando un ensayo basado en célula. **Método:** Los AE de 18 especies distintas de plantas fueron estudiados. Se usó el ensayo del MTT en seis líneas celulares de humano y animal derivadas de tejido normal y canceroso, las cuales se trataron antes y después de la proliferación. Los AE se organizaron en el orden de una agrupación jerárquica con base en los valores de CC_{50} y la sumatoria de la jerarquía ponderada en el panel de células ($\sum JPi$) se usó como indicador de similitud. Cuanto mayor fue el valor de $\sum JPi$ menor fue la tendencia a toxicidad. **Resultados:** Los AE con valores de $CC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ en al menos cinco condiciones experimentales presentaron valores de $\sum JPi > 6,0$ sugiriendo baja tendencia a toxicidad y fueron en orden descendente ($\sum JPi$ en paréntesis): *Calycolpus moritzianus* (O.Berg) Burret (9,7) < *Psidium sartinianum* (O. Berg) Nied. (8,9) < *Wedelia calycina* (6,5) < *Lippia micromera* Schauer (6,2) \approx *Piper haltonii* (6,2). AE con valores de $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ en cuatro o más condiciones experimentales presentaron valores $\sum JPi < 4,0$ sugiriendo alta tendencia a toxicidad y fueron en orden ascendente: *Tagetes caracasana* Kunth (2,7 – 2,8) > *Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob. (3,0) > *Ageratina aff. popayanensis* (Hieron.) R.M.King & H.Rob. (3,1) > *Lantana colombiana* López-Pal. (3,3) > *Turnera diffusa*. (3,4). AE de *Tagetes caracasana* presentó actividad antiproliferante (CI_{50} : 42,2 y 47,9 $\mu\text{g/mL}$) sobre células humanas de cáncer de cérvix. **Conclusión:** El abordaje metodológico permitió identificar AE con baja y alta tendencia a toxicidad. Los resultados podrían tener valor para predecir actividad *in vivo* y priorizar muestras para futuras investigaciones.

Palabras clave: Toxicidad, aceite esencial, MTT, planta, fitoterapia.

¹ Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM).
1Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), UIS, Parque Tecnológico Guatiguará, CINTROP, Av Los Bambues,
km 2 Autopista, Piedecuesta.

² Centro de investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: relocaz@uis.edu.co

ABSTRACT

Background: Part of the research process focused on discovering natural medicines is the study of products derived from plants, which may be toxic to humans. Animal-based test methods can be relatively expensive, low-throughput and associated with animal suffering, and differences in animal species may difficult to infer human health effects. Methods based on living cells are recommended. **Objectives:** To study the tendency to toxicity of essential oils (EOs) from plants of Colombia using a cell-based assay. **Methods:** EOs from different species ($n = 18$) of plants were included. The MTT assay was used on six human and animal cell lines derived from normal and cancerous organs, which were treated before and after proliferation. The EOs were arranged in the order of a hierarchical clustering based on their CC_{50} values, and the sum of weighted hierarchy across cell panel ($\sum_i WH$) was used as the similarity metric. The greater the value of $\sum_i WH$ lesser tendency to toxicity. **Results:** The EOs, which showed CC_{50} values $> 200 \mu\text{g/mL}$ in at least five experimental conditions presented $\sum_i WH$ values $> 5,0$ suggesting lower tendency to toxicity, and they were in descending order ($\sum_i WH$ in parentheses), as follows: *Calycolpus moritzianus* (O.Berg) Burret (9,7) $<$ *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied. 1893 (8,9) $<$ *Wedelia calcycina* (6,5) $<$ *Lippia micromera* Schauer (6,2) \approx *Piper haltonii* Jacq. (6,2) The EOs, which showed $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ in four or more experimental conditions presented $\sum_i WH$ values < 4.0 suggesting higher tendency to toxicity, and they were in ascending order, as follows: *Tagetes caracasana* Kunth (2,7 – 2,8) $>$ *Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob. (3,0) $>$ *Ageratina aff. popayanensis* (Hieron.) R.M.King & H.Rob. (3,1) $>$ *Lantana colombiana* López-Pal. (3,3) $>$ *Turnera diffusa* (3,4). EO from *Tagetes caracasana* Kunth presented relevant antiproliferative activity (CI_{50} : $< 50.0 \mu\text{g/mL}$) on cells from human cervical carcinoma. **Conclusions:** The methodological approach allows identifying EOs with lower and higher tendency to toxicity. Data generated may be valuable for predicting *in vivo* toxicity and for prioritizing samples for further studies.

Keywords: Toxicity, essential oils, MTT, plant, phytochemistry.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos como metabolitos secundarios de plantas. Al menos 3000 se han identificado y 300 están comercialmente disponibles para diversos usos como la fabricación de perfumes, cosméticos, productos de limpieza, insecticidas, conservantes y aditivos de alimentos (1-5). Los AE también están presentes en formulaciones de medicamentos homeopáticos, por ejemplo, la aplicación tópica se usa para tratar el acné, dermatomicosis y otras afectaciones de la piel, la aromaterapia para infecciones del tracto respiratorio y afecciones del sistema nervioso y el efecto anticancerígeno están bien documentado (6-9). Varios estudios sugieren que estas propiedades medicinales se deben en gran parte a fortalecimiento del sistema inmune (7, 10).

En términos generales, la práctica medicinal con AE se considera segura para la salud humana. No obstante, el uso inadecuado puede resultar en efectos adversos como irritación o cambios malignos en la piel por aplicación tópica excesiva y convulsiones,

hepato-toxicidad y daño renal cuando la absorción sistémica es alta (2, 7). Se ha demostrado que los AE generan especies reactivas de oxígeno resultando en fragmentación del ADN (10,11).

La evaluación inicial del potencial tóxico de productos de plantas se requiere para seleccionar muestras líderes para la fase de descubrimiento de un producto para uso humano. La experimentación animal se recomienda ya que permite inferir con cierta confiabilidad el grado de afectación sobre diversos órganos humanos en el humano, en especial hígado, riñón y cerebro (12), aunque tiene tres limitaciones mayores: i) alto costo en infraestructura para cumplir con parámetros de buenas prácticas; ii) bajo rendimiento debido a que un limitado número de muestras se puede analizar en corto tiempo; iii) el análisis está restringido a muestras que no causen dolor intenso o sufrimiento permanente al animal según normas éticas actuales (12,13). Por estas dificultades viene aumentado el uso de ensayos basados en célula (citotoxicidad *in vitro*) y el interés de la comunidad científica para que los resultados se tengan en cuenta en la regulación de productos recién descubiertos (14).

Citotoxicidad se define como el efecto acumulativo sobre el número de células debido a apoptosis, necrosis o reducción de la tasa de replicación celular. Existen ensayos *in vitro* para evaluar cada alteración celular y se recomienda realizarlos en varios tipos de células (15-20). Rezk *et al.* (21) compararon y jerarquizaron la actividad citotóxica de extractos de plantas usando diversos ensayos, el abordaje permitió identificar las muestras líderes para investigación en antimicrobianos de origen natural. El perfil de citotoxicidad en un panel de células y la jerarquización de la actividad también se usaron para identificar compuestos sintéticos líderes (22).

En Colombia el uso medicinal de AE es muy limitado debido en gran parte a falta de información sobre efectos adversos. En este trabajo se presenta un abordaje metodológico para evaluar y comparar

la citotoxicidad de muestras de AE usando el ensayo del MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio], el cual permitió identificar muestras líderes para investigaciones futuras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las plantas se colectaron en áreas rurales y semiurbanas de los departamentos de Santander, Valle del Cauca y Arauca (Tabla 1). La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. José Luis Fernández de la Universidad Nacional (Bogotá), una muestra codificada de cada planta se depositó para referencia en el Herbario Nacional de esta Universidad con su respectivo número de *voucher*.

Tabla 1. Plantas usadas en el estudio.

| Familia | Nombre científico | Voucher |
|--------------|--|------------|
| Asteraceae | <i>Ageratina aff. popayanensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob. | COL 579422 |
| Asteraceae | <i>Baccharis decussata</i> (Klatt) Hieron | COL 582606 |
| Myrtaceae | <i>Calycolpus moritzianus</i> (O.Berg) Burret | COL 578360 |
| Asteraceae | <i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M.King & H.Rob. | COL 583919 |
| Boraginaceae | <i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult. | COL 559446 |
| Lamiaceae | <i>Hyptis brachiata</i> Briq. | COL 582531 |
| Verbenaceae | <i>Lantana colombiana</i> López-Pal. | COL 582328 |
| Verbenaceae | <i>Lippia micromera</i> Schauer | COL 578971 |
| Verbenaceae | <i>Lippia organoides</i> H.B.K | COL 582599 |
| Piperaceae | <i>Piper dilatatifolium</i> Trel. & Yunck, | COL 578975 |
| Piperaceae | <i>Piper holtonii</i> C.DC. | COL 582357 |
| Piperaceae | <i>Piper marginatum</i> Jacq. | COL 578365 |
| Piperaceae | <i>Piper médium</i> Jacq. | COL 583968 |
| Myrtaceae | <i>Psidium sartorianum</i> (O. Berg) Nied. | COL 578359 |
| Asteraceae | <i>Tagetes caracasana</i> Kunth | COL 579244 |
| Asteraceae | <i>Tagetes caracasana</i> Kunth | COL 559441 |
| Turneraceae | <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult. | COL 578361 |
| Asteraceae | <i>Wedelia calycina</i> Rich. | COL 583911 |
| Asteraceae | <i>Wedelia calycina</i> Rich. | COL 578353 |
| Fabiaceae | <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel | COL 582604 |

Muestras

Se analizaron 20 muestras de AE de 18 especies distintas de plantas. La extracción del AE se hizo mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas o mediante extracción por arrastre con

vapor. Detalles de los procedimientos han sido publicados (23,24). De cada AE se hizo una preparación concentrada en dimetilsulfóxido (DMSO: 1%) como solvente y se almacenaron alícuotas a -20 °C. La misma muestra se usó para todos los experimentos.

Células

Se usaron seis líneas celulares de las cuales dos son de tejido normal y las otras de canceroso. De origen humano: HEK293 (ATCC® CRL-1573™) de riñón embrionario; HEPG2 (ATCC® CRL-11997™) de carcinoma de hígado; MCF-7 (ATCC® HTB-22™) de carcinoma de glándula mamaria y HELA (ATCC® CCL-2™) de carcinoma cervical. Las tres primeras se cultivaron en medio DMEM-F12 [GIBCO Co.] suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF [GIBCO, Co.]) y antibiótico (P/E: Penicilina/Estreptomicina [Invitrogen Carlsbad, CA.]) y la otra, en medio MEM (GIBCO) suplementado con 8% de SBF y P/E. Las líneas celulares de origen animal fueron: VERO (ATCC® CCL-81™), riñón de mono, que fueron cultivadas en medio MEM suplementado como se mencionó; y B16F10 (ATCC® CRL-6475™) de melanoma de ratón cultivadas en medio RPMI-1640 [GIBCO Co.] suplementado con 10% de SBF y P/E. Para cada línea celular se estableció previamente el tiempo de duplicación en 24 h como tiempo mínimo para formación de monocapa viable y confluyente 50 – 80%.

Ensayo de citotoxicidad

Se usó el ensayo colorimétrico basado en la reducción del MTT a formazán por enzimas oxidoreductasas en células vivas. Se siguió el protocolo previamente descrito (16,17). Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pozos en medio que contenía o no AE a variada concentración (50, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las placas se incubaron durante 72 h a 37 °C. El medio se removió y luego se adicionaron 20 μL de MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a concentración de 5 mg/mL. Las placas se incubaron nuevamente 4 h a 37°C, se retiró el MTT y enseguida se adicionaron 100 μL de DMSO para solubilizar los cristales de formazán. La intensidad del color (absorbancia) en cada pozo se cuantificó en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a 580 nm y se consideró proporcional a la viabilidad celular. Las células se expusieron al AE en el momento de la siembra que aquí se denomina tratamiento **a** (antes de la proliferación) y 24 h después o tratamiento **d** (después de la proliferación). Con cada línea celular y cada tratamiento se realizaron tres ensayos independientes por duplicado y células no-tratadas o tratadas con DMSO se incluyeron como controles. El número

de células sembradas en cada pozo se determinó en ensayos previos y se seleccionó aquel con el cual la absorbancia de las no-tratadas a las 72 h fue $> 0,9$.

Análisis de datos

Los valores promedio de absorbancia de experimentos con células tratadas con AE se corrigieron usando el valor promedio de células tratadas con DMSO. Las curvas dosis-respuesta se construyeron, ajustaron y validaron usando el paquete estadístico R (R Development Core Team [2013]. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). El porcentaje de viabilidad de las células AE-tratadas se calculó referente a 100% de las no-tratadas y la actividad se expresó en $\mu\text{g}/\text{mL}$ como concentración citotóxica 50 (CC_{50}) o que causó reducción de la viabilidad en 50%. Se construyó una matriz con los valores de la CC_{50} de ocho condiciones experimentales (cuatro líneas celulares con dos tratamientos) que se usó para jerarquizar la actividad. Para cada AE, se calculó la jerarquía ponderada individual (JP_i) en cada condición experimental así: $\text{JP}_i = (\text{CC}_{50} \times r / \text{C}_{\text{mc}}) \times \text{P}$, donde: $r = 5$ o valor referente común; C_{mc} = concentración máxima usada en el ensayo; P = valor ponderado de la línea celular como se detalla adelante. La sumatoria de las jerarquías individuales ($\sum \text{JP}_i$) se usó como indicador de similitud y las muestras se organizaron en orden descendente con base en este valor.

RESULTADOS

Las curvas dosis-respuesta generadas en los ensayos se agruparon en cuatro categorías dependiendo del ajuste a un modelo de regresión logística simple (Figura 1): curvas con buen ajuste ($P_{[\text{Wald}]}$: < 0.01) se denominaron clase 1a, con ajuste aceptable ($P_{[\text{Wald}]}$: 0.02 – 0.04) clase 1b y sin ajuste clase 2 ($P_{[\text{Wald}]}$: > 0.05). Las clase 2 se denominaron 2a cuando se observó reducción de la viabilidad en 90 - 100% a las menores concentraciones de AE y clase 2b cuando la reducción fue $< 50\%$ con cualquier concentración. La curva clase 2b se usó como indicador de susceptibilidad de la línea celular al tratamiento con el AE ya que cuanto mayor la proporción de muestras con este tipo de respuesta, menor fue la susceptibilidad.

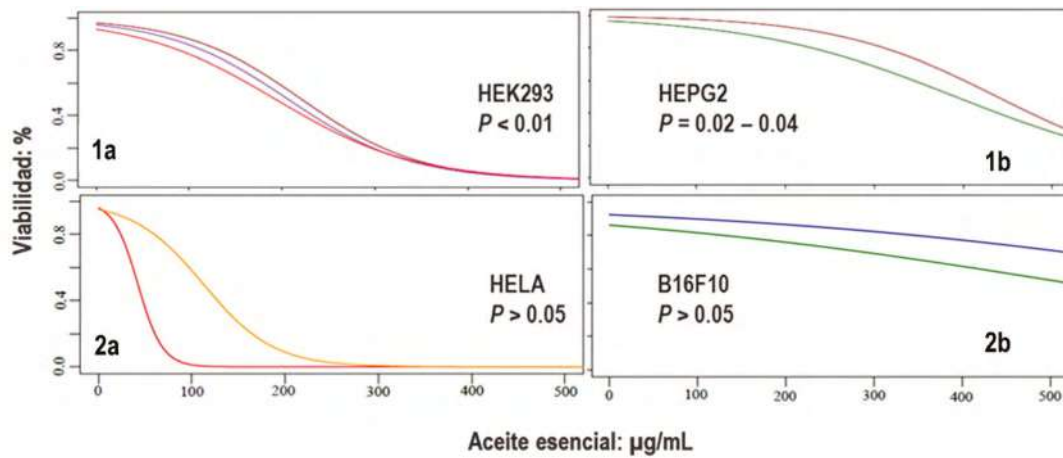


Figura 1. Curvas dosis-respuesta representativas. Las células se trataron con variadas concentraciones de aceite esencial y a las 72 h se determinó la viabilidad con respecto al control (no-tratado). HEK293: riñón humano embrionario. HEPG2: hígado humano. HELA: cérvix humano. B16F10: piel (melanocitos) de ratón. El valor P se calculó con la prueba de Wald y refleja el ajuste a un modelo de regresión logística simple. 1a, 1b, 2a y 2b se refiere a la clase de curva y cada color de la línea corresponde a un aceite esencial.

La proporción de AE según curva dosis-respuesta en cada línea celular, se presenta en la Figura 2. Se observó que curvas clase 1a y 1b (buen ajuste) fueron más frecuentes cuando las células se trataron antes (tratamiento **a**) que después (tratamiento **d**) de la proliferación (65,3% vs. 53,3%). Con respecto a la susceptibilidad, el rango por línea celular fue en el siguiente orden (frecuencia de curvas 2b en paréntesis): tratamiento a, VERO (0%) > HELA (5%) ≈

MCF7 (5%) > B16F10 (10%) > ≈ HEK293 (10%) > HEPG2 (15%); tratamiento d, HEK293 (0%) > VERO (5%) ≈ B16F10 (5%) ≈ HEPG2 (50). Los resultados muestran que células de riñón de mono (VERO) expuestas a los dos tratamientos fueron las más susceptibles y al contrario las de hígado humano (HEPG2). Se observó que las células de riñón humano (HEK293) fueron notoriamente más susceptibles después de la proliferación que antes de esta.

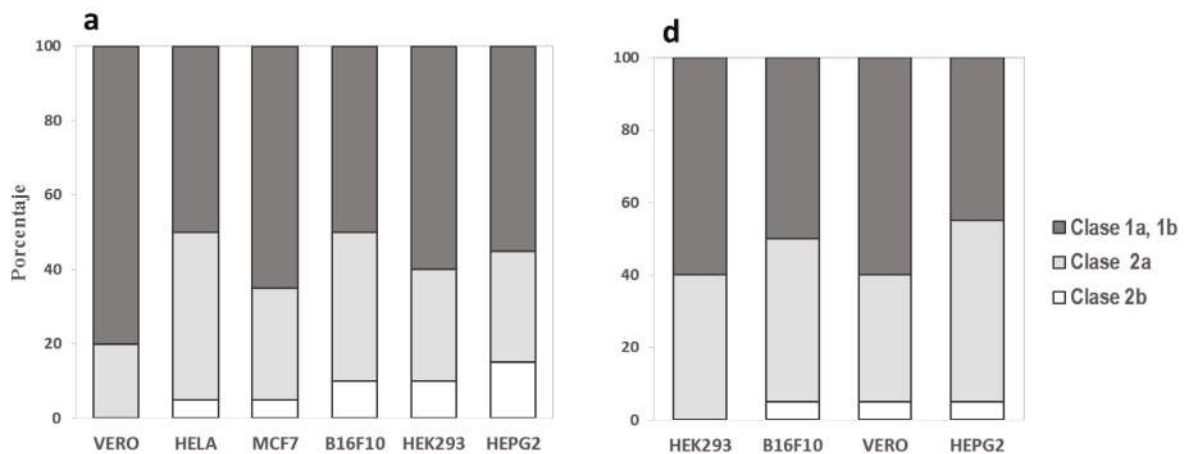


Figura 2. Proporción de aceites esenciales según curva dosis-respuesta en cada línea celular. Cuanto mayor la clase 2b menor la susceptibilidad de la célula. Tratamiento (a) antes y (d) después de la proliferación celular. Células humanas: HEPG2-hígado, HEK293-riñón, MCF7-glándula mamaria, HELA-cuello uterino. Células de animal: B16F10-piel de ratón, VERO-riñón de mono.

De las curvas dosis – respuesta se derivaron los valores de la CC_{50} en cada línea celular. Cuando esto no fue posible (curvas clase 2) se asignó la mínima ($50 \mu\text{g/mL}$) o máxima ($500 \mu\text{g/mL}$) concentración usada en el ensayo que redujo en $> 50\%$ la viabilidad (Tablas 1 y 2, Suplementarias). Los valores CC_{50} se agruparon en rangos que sirvieron para valorar la citotoxicidad (Figura 3), así: 351 – 500, 201 – 350, 100 – 200 y 20 – 99 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, como baja, media, alta y muy alta citotoxicidad adoptando criterios de Cos *et al.* (23) y Ferraz *et al.* (24), y la proporción de muestras con valores CC_{50} entre 20 – 99 $\mu\text{g/mL}$ se consideró grado de susceptibilidad. Con tratamiento **a**, el rango

de mayor a menor susceptibilidad (porcentaje de AE con CC_{50} de 20 – 99 $\mu\text{g/mL}$ en paréntesis) fue como sigue: HELA (25,0%) \approx B16F10 (25,0%) $>$ VERO (10,0%) $>$ MCF7 (0%) \approx HEK293 (0%) \approx HEPG2 (0%); con tratamiento **d**, fue: VERO (30,0%) $>$ B16F10 (25,0%) \approx HEPG2 (25,0%) $>$ HEK293 (20,0%). Los resultados sugieren que las células de riñón de mono (VERO) fueron más sensibles a los dos tratamientos con AE comparadas con las de riñón (HEK293) e hígado humano (HEPG2). De las células cancerosas, las de cérvix (HELA) y piel (B16F10) fueron más susceptibles que las de glándula mamaria (MCF7) y hepatoma (HEPG2).

Tabla 1 – Suplementaria. Valores de la concentración citotóxica 50 (CC_{50}) de aceites esenciales en células tratadas antes de la proliferación celular

| Voucher: COL_ | Línea celular | | | | | |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | HEK293 | HEPG2 | HELA | MCF7 | B16F10 | VERO |
| 579422 | 217,9 \pm 70.4 | 199.3 \pm 57.5 | 112.4 \pm 53,6 | 207.0 \pm 73.3 | 112.7 \pm 62.0 | 238.7 \pm 54.9 |
| 582606 | 216.8 \pm 47.6 | 267.9 \pm 51.5 | 121.2 \pm 63.7 | 192.6 \pm 54.2 | 161.6 \pm 49.0 | 183.4 \pm 48.9 |
| 578360 | >500.0 | >300.0 | >300.0 | >300.0 | 40.2 \pm 34.9 | 117.1 \pm 49.4 |
| 583919 | 147.1 \pm 48.3 | 209.8 \pm 40.6 | 82.2 \pm 47.1 | 188.3 \pm 49.8 | 154.6 \pm 39.9 | <50.0 |
| 559446 | 280.8 \pm 89.3 | >300.0 | 193.2 \pm 77.4 | 153.2 \pm 78.1 | 184.1 \pm 81.1 | 132.0 \pm 553.4 |
| 582531 | 156.2 \pm 43.8 | 175.9 \pm 43.7 | 98.8 \pm 46.3 | 153.8 \pm 49.9 | >500.0 | 107.4 \pm 45.9 |
| 582328 | 221.2 \pm 44.5 | 250.5 \pm 50.5 | 136.3 \pm 65.2 | 175.9 \pm 48.7 | 159.3 \pm 46.7 | 157.2 \pm 56.9 |
| 578971 | 409.0 \pm 77.4 | >300 | 237.4 \pm 66.5 | 300.0 | 459.7 \pm 400 | 233.8 \pm 51.4 |
| 582599 | 186.0 \pm 46.7 | 192.6 \pm 45.4 | 156.6 \pm 44.7 | 164.7 \pm 40.5 | 162.2 \pm 50.9 | 173.2 \pm 42.3 |
| 578975 | 294.1 \pm 75.0 | 167.7 \pm 59.6 | 89.1 \pm 24 | 112.1 \pm 51.2 | 88.3 \pm 37.5 | 180.4 \pm 50.3 |
| 582357 | 212.7 \pm 58.6 | 478.3 \pm 73.3 | 187.1 \pm 55.5 | 204.4 \pm 53.2 | 256.8 \pm 59.2 | 159.8 \pm 67.5 |
| 578353 | >500 | >300.0 | 283.2 \pm 85.0 | >300.0 | 173.8 \pm 61.4 | 168.2 \pm 47.9 |
| 578359 | >500 | >300.0 | 342.4 \pm 218 | >300.0 | 151.7 \pm 100 | 187.5 \pm 47.5 |
| 583911 | 194.3 \pm 40.2 | 271.6 \pm 47.6 | 174.9 \pm 37.6 | 233.0 \pm 52.6 | 234.8 \pm 41.7 | 139.4 \pm 40.2 |
| 578365 | 277.8 \pm 84.1 | 298.1 \pm 78.4 | 163.8 \pm 72.2 | 169.5 \pm 73.0 | 125.0 \pm 384 | 209.1 \pm 48.4 |
| 583968 | 221.4 \pm 52.5 | 376.7 \pm 62.6 | 205.5 \pm 46.8 | 284.7 \pm 61.3 | 251.5 \pm 70.7 | 199.5 \pm 49.6 |
| 579244 | 212.8 \pm 78.6 | >300.0 | 42.2 \pm 22.3 | 233.1 \pm 59.3 | 26.9 \pm 13.3 | <50.0 |
| 559441 | 198.1 \pm 76.2 | 300.0 | <50.0 | 226.7 \pm 74.7 | <50.0 | <50.0 |
| 578361 | 143.2 \pm 60.9 | 199.3 \pm 42.6 | 109.5 \pm 44.4 | 139.9 \pm 47.9 | 161.3 \pm 41.2 | 135.0 \pm 54.6 |
| 582604 | 222.3 \pm 45.6 | 208.2 \pm 51.5 | 125.8 \pm 45.5 | 179.2 \pm 49.1 | 234.2 \pm 61.6 | 125.3 \pm 4 |

Células humanas de riñón embrionario (HEK293), carcinoma hepático (HEPG2), cáncer cervical (HELA) y cáncer de mama (MCF7). Células de piel de ratón (B16F10) y células de riñón de mono (VERO).

Tabla 2 – Suplementaria. Valores de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de aceites esenciales en células tratadas después de la proliferación celular

| Voucher: COL | Línea celular | | | |
|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| | HEK293 | HEPG2 | VERO | B16F10 |
| 579422 | 98.7 ± 38.2 | 88.2 ± 45.7 | 151.8 ± 54.3 | 811 ± 34.6 |
| 582606 | 212.8 ± 44.5 | 220.8 ± 45.6 | 114.3 ± 50.8 | 151.3 ± 62.6 |
| 578360 | 485.2 ± 122.8 | 491.9 ± 112.6 | >500.0 | >300.0 |
| 583919 | 135.2 ± 56.8 | 166.2 ± 48.8 | 125.6 ± 56.1 | 102.8 ± 60.9 |
| 559446 | 99.1 ± 47.3 | 106.2 ± 46.0 | 155.1 ± 55.6 | 78.9 ± 46.6 |
| 582531 | 213.1 ± 55.9 | 224.4 ± 55.2 | 40.6 ± 99.3 | 127.5 ± 45.5 |
| 582328 | 169.3 ± 46.9 | 170.8 ± 50.1 | 68.3 ± 63.7 | 146.2 ± 64.6 |
| 578971 | 185.4 ± 56.8 | 98.2 ± 57.1 | 481.1 ± 77.2 | 160.7 ± 70.2 |
| 582599 | 363.7 ± 96.5 | 383.3 ± 56.4 | 127.8 ± 65.5 | 144.9 ± 45.0 |
| 578975 | 157.7 ± 55.3 | 102.9 ± 60.5 | 349.3 ± 60.9 | 172.9 ± 71.5 |
| 582357 | 345.7 ± 68.1 | >500.0 | 116.6 ± 67.5 | 207.8 ± 62.9 |
| 578353 | 229.1 ± 57.4 | 224.6 ± 75.9 | 432.9 ± 94.8 | 195.5 ± 70.7 |
| 578359 | 380.9 ± 103.4 | >500.0 | 488.6 ± 97.1 | 286.7 ± 147.7 |
| 583911 | 253.9 ± 224.5 | 284.3 ± 49.0 | 224.5 ± 51.1 | 173.8 ± 47.6 |
| 578365 | 136.6 ± 52.2 | 66.1 ± 56.0 | 282.4 ± 67.4 | 153.6 ± 69.4 |
| 583968 | 364.9 ± 82.7 | 365.4 ± 63.2 | 122.0 ± 55.0 | 284.6 ± 59.4 |
| 579244 | 98.9 ± 38.2 | 98.3 ± 38.2 | 55.6 ± 19.4 | 73.6 ± 27.8 |
| 559441 | 122.3 ± 57.0 | 88.1 ± 35.9 | 63.2 ± 30.8 | 45.5 ± 26.0 |
| 578361 | 152.5 ± 46.2 | 186.5 ± 58.4 | 90.5 ± 56.7 | 83.9 ± 55.3 |
| 582604 | 378.2 ± 81.3 | 422.9 ± 110.8 | 104.7 ± 66.9 | 188.0 ± 51.9 |

Células humanas de riñón embrionario (HEK293) y carcinoma hepático (HEPG2). Células de riñón de mono (VERO) y células de piel de ratón (B16F10). NC: no calculado, sin reducción de viabilidad $\geq 50\%$ a las concentraciones usadas en el ensayo.

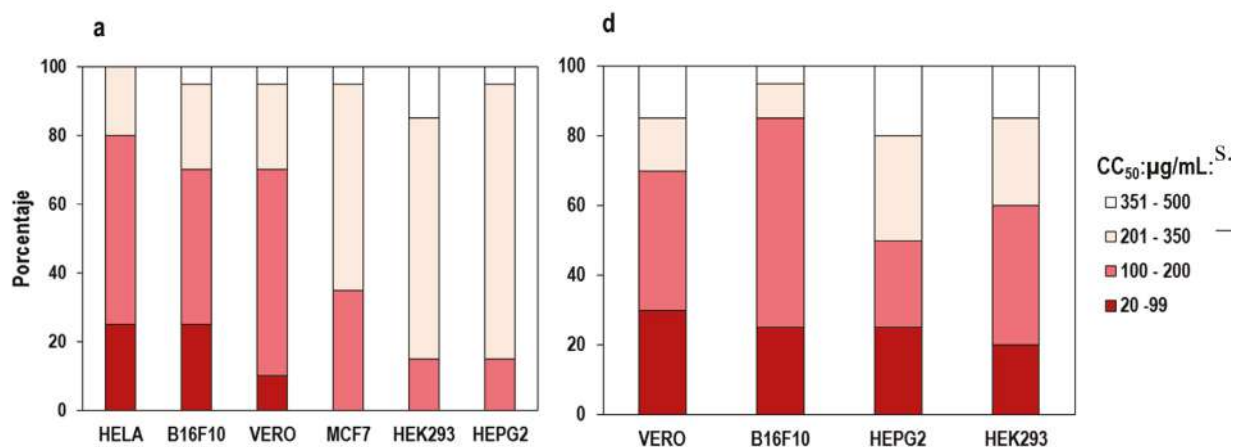


Figura 3. Proporción de aceites esenciales en cada línea celular, según rango de la concentración citotóxica 50 (CC_{50}), cuanto menor el rango mayor la susceptibilidad de la célula. Tratamiento (a) antes y (d) después de la proliferación celular. Células humanas: HEPG2-hígado, HEK293-riñón, MCF7-glándula mamaria, HELA-cuello uterino. Células de animal: B16F10-piel de ratón, VERO-riñón de mono.

Los valores de la CC_{50} en las líneas celulares de hígado (HEPG2), riñón (HEK293 y VERO) y piel (B16F10) con cada tratamiento se usaron para jerarquizar la actividad de los AE. El total de datos se derivó de ocho condiciones experimentales, esto es, cuatro líneas celulares cada una con dos tratamientos. En consideración a que células de origen

humano son de mayor interés y que el tratamiento **d** causó mayor afectación se asignó la siguiente ponderación (% por tratamiento d / % por tratamiento a) de 40/20 para HEPG2/HEK293 y 30/10 para B16F10/VERO. Se estableció la jerarquía en cada condición experimental calculando el valor JPi y $\sum JPi$ (Tabla 3 Suplementaria).

Tabla 3 – Suplementaria. Calculos de la jerarquización de citotoxicidad de los aceites esenciales. Valores de CC_{50} y jerarquía en cada condición experimental (JPi) y en el panel (\sum JPi).

| Voucher COL_ | HEK293 | JPi | HEPG2 | JPi | B16F10 | JPi | VERO | JPi | HEK293 | JPi | HEPG2 | JPi | B16F10 | JPi | VERO | JPi | \sum JPi |
|--------------|--------|-----|-------|-----|--------|-----|-------|-----|--------|-----|-------|-----|--------|-----|-------|-----|------------|
| 578360 | 500,0 | 1,0 | 300,0 | 1,0 | 40,2 | 0,1 | 117,1 | 0,1 | 485,2 | 1,9 | 491,9 | 2,0 | 412,7 | 2,1 | 500,0 | 1,5 | 9,7 |
| 578359 | 500,0 | 1,0 | 300,0 | 1,0 | 151,7 | 0,3 | 187,5 | 0,2 | 380,9 | 1,5 | 500,0 | 2,0 | 286,6 | 1,4 | 488,6 | 1,5 | 8,9 |
| 578353 | 500,0 | 1,0 | 300,0 | 1,0 | 173,8 | 0,3 | 168,1 | 0,2 | 229,1 | 0,9 | 224,6 | 0,9 | 195,5 | 1,0 | 432,9 | 1,3 | 6,5 |
| 578971 | 409,0 | 0,8 | 300,0 | 1,0 | 459,6 | 0,8 | 233,8 | 0,2 | 185,3 | 0,7 | 98,2 | 0,4 | 160,7 | 0,8 | 481,1 | 1,4 | 6,2 |
| 582357 | 212,7 | 0,4 | 478,3 | 1,0 | 256,8 | 0,3 | 159,8 | 0,2 | 345,7 | 1,4 | 500,0 | 2,0 | 207,8 | 0,6 | 116,6 | 0,3 | 6,2 |
| 583968 | 221,4 | 0,4 | 376,7 | 0,8 | 251,5 | 0,3 | 199,5 | 0,2 | 364,8 | 1,5 | 365,4 | 1,5 | 284,7 | 0,9 | 122,0 | 0,4 | 5,8 |
| 582604 | 222,3 | 0,4 | 208,2 | 0,4 | 234,2 | 0,2 | 125,4 | 0,1 | 378,3 | 1,5 | 422,9 | 1,7 | 188,0 | 0,6 | 104,7 | 0,3 | 5,3 |
| 582599 | 186,1 | 0,4 | 192,6 | 0,4 | 162,2 | 0,2 | 173,2 | 0,2 | 363,7 | 1,5 | 383,3 | 1,5 | 144,9 | 0,4 | 127,8 | 0,4 | 4,9 |
| 583911 | 253,9 | 0,5 | 271,6 | 0,9 | 234,8 | 0,4 | 224,5 | 0,2 | 194,3 | 0,8 | 284,3 | 1,1 | 173,8 | 0,5 | 139,4 | 0,4 | 4,9 |
| 578975 | 294,1 | 0,6 | 167,7 | 0,6 | 88,3 | 0,1 | 180,4 | 0,2 | 157,8 | 0,6 | 102,9 | 0,4 | 172,9 | 0,9 | 349,3 | 1,0 | 4,4 |
| 578365 | 277,8 | 0,6 | 298,1 | 1,0 | 125,0 | 0,2 | 209,1 | 0,2 | 136,7 | 0,5 | 66,1 | 0,3 | 153,6 | 0,8 | 282,5 | 0,8 | 4,4 |
| 559446 | 280,8 | 0,6 | 300,0 | 1,0 | 184,1 | 0,3 | 132,0 | 0,1 | 99,1 | 0,4 | 106,2 | 0,7 | 78,9 | 0,4 | 155,1 | 0,5 | 4,0 |
| 582606 | 216,9 | 0,4 | 267,9 | 0,5 | 161,6 | 0,2 | 183,4 | 0,2 | 212,9 | 0,9 | 220,9 | 0,9 | 151,4 | 0,5 | 114,3 | 0,3 | 3,8 |
| 582531 | 156,2 | 0,3 | 175,9 | 0,4 | 500,0 | 0,5 | 107,4 | 0,1 | 213,1 | 0,9 | 224,5 | 0,9 | 127,5 | 0,4 | 40,6 | 0,1 | 3,5 |
| 578361 | 143,2 | 0,3 | 199,3 | 0,4 | 161,3 | 0,2 | 135,0 | 0,1 | 152,5 | 0,6 | 186,5 | 1,2 | 83,9 | 0,3 | 90,5 | 0,3 | 3,4 |
| 582328 | 221,2 | 0,4 | 250,5 | 0,5 | 159,3 | 0,2 | 157,2 | 0,2 | 169,3 | 0,7 | 170,8 | 0,7 | 146,3 | 0,4 | 68,3 | 0,2 | 3,3 |
| 579422 | 217,9 | 0,4 | 199,3 | 0,7 | 112,7 | 0,2 | 238,7 | 0,2 | 98,7 | 0,4 | 88,2 | 0,4 | 81,1 | 0,4 | 151,8 | 0,5 | 3,1 |
| 583919 | 135,2 | 0,3 | 209,8 | 0,4 | 154,6 | 0,2 | 125,6 | 0,1 | 147,1 | 0,6 | 166,2 | 1,1 | 102,8 | 0,3 | 23,4 | 0,1 | 3,0 |
| 579244 | 212,8 | 0,4 | 300,0 | 1,0 | 26,9 | 0,0 | 50,0 | 0,1 | 98,9 | 0,4 | 98,4 | 0,4 | 73,6 | 0,4 | 55,6 | 0,2 | 2,8 |
| 559441 | 198,1 | 0,4 | 300,0 | 1,0 | 22,9 | 0,0 | 50,0 | 0,1 | 122,3 | 0,5 | 88,0 | 0,4 | 45,5 | 0,2 | 63,2 | 0,2 | 2,7 |

La Figura 4 compara los perfiles de citotoxicidad y presenta la ubicación de cada AE en la agrupación jerárquica. En los primeros lugares se ubicaron los AE con CC_{50} entre 201 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el mayor número de condiciones experimentales y valores de \sum JPi > 6.0, los primeros se consideraron los menos citotóxicos y en orden descendente fueron en el siguiente rango (\sum JPi en paréntesis): *Calycolpus moritzianus* (9,7) < *Psidium sartorianum* (8,9) < *Wedelia calycina* (6,5) < *Lippia micromera* (6,2) \approx *Piper haltonii* (6,2). En últimos lugares se ubicaron las muestras con CC_{50} de 20 - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en al menos cuatro de las condiciones experimentales y por lo mismo con valores de \sum JPi < 4.0. Los cinco AE más citotóxicos en orden ascendente fueron en el siguiente rango: *Tagetes caracasana* (2,7 - 2,8) > *Chromolaena odorata* (3,0) > *Ageratina popayanensis* (3,1) > *Lantana colombiana* (3,3) > *Turnera diffusa* (3,4).

Existe suficiente evidencia para concluir que el AE de variadas especies de plantas inhibe la proliferación *in vitro* de células cancerosas (6,26). La tendencia de los AE de este estudio a inhibir

células de cánceres humanos, se infirió con base en la concentración que redujo la viabilidad en 50% (CI_{50}) con el tratamiento a (las células se sembraron en medio de cultivo que contenía AE). Los valores de la CI_{50} se agruparon en rangos adoptando criterios de otros estudios (25, 27) y la actividad antiproliferante se categorizó como sigue (valores de CI_{50} en paréntesis): relevante (< 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), probable (51 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incierta (101 - 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ausente (> 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 5). Sobre células humanas de cáncer cervical (HELA), se observó actividad antiproliferante relevante con AE de *Tagetes caracasana* (CI_{50} de 42,2 y 47,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y actividad probable con tres AE en el siguiente rango (CI_{50} : $\mu\text{g}/\text{mL}$, en paréntesis): *Chromolaena odorata* (82,2) > *Piper dilatatifolium* (89,1) > *Hyptis brachiata* (98,8). Sobre células de cáncer de mama (MCF7) y hepatoma (HEPG2), los 20 AE fueron inactivos ya que presentaron valores de CI_{50} entre 101 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sobre células de melanoma murino, se observó actividad relevante también con AE de *Tagetes caracasana*, y además, de *Calycolpus moritzianus*.

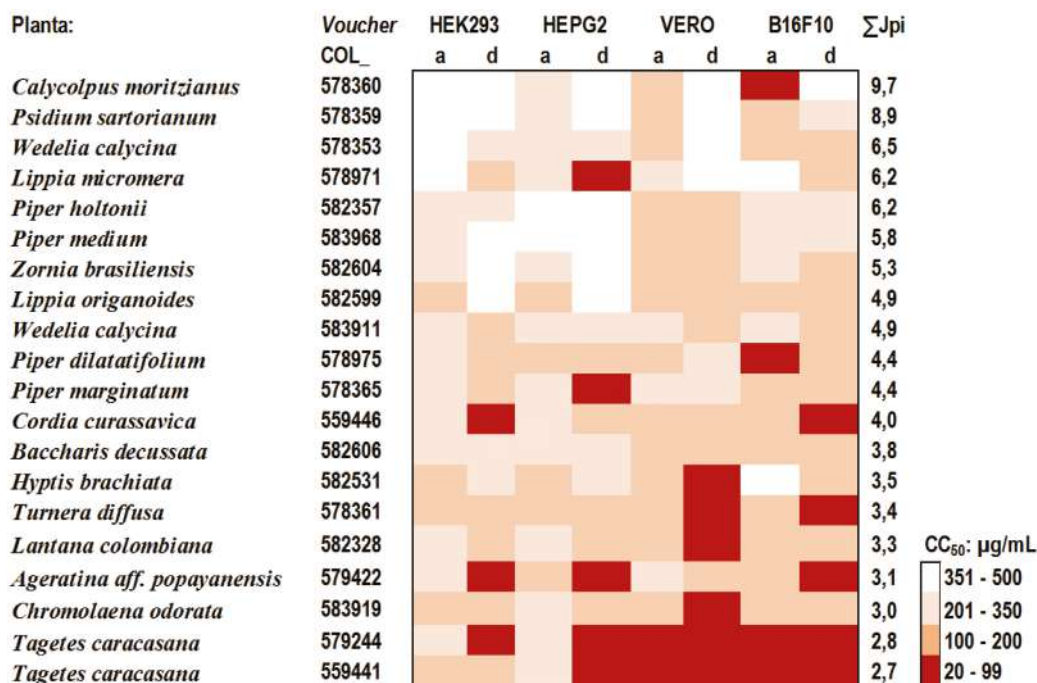


Figura 4. Agrupación jerárquica con base en perfiles de citotoxicidad. Los aceites esenciales se organizaron en orden descendente con respecto al valor de ΣJ_{Pi} . La tendencia a toxicidad es menor cuanto menor la intensidad del color y en consecuencia mayor el valor de ΣJ_{Pi} . Líneas celulares de riñón (HEK293 y VERO), hígado (HEPG2) y piel (B16F10) tratadas (a) antes y (d) después de la proliferación.

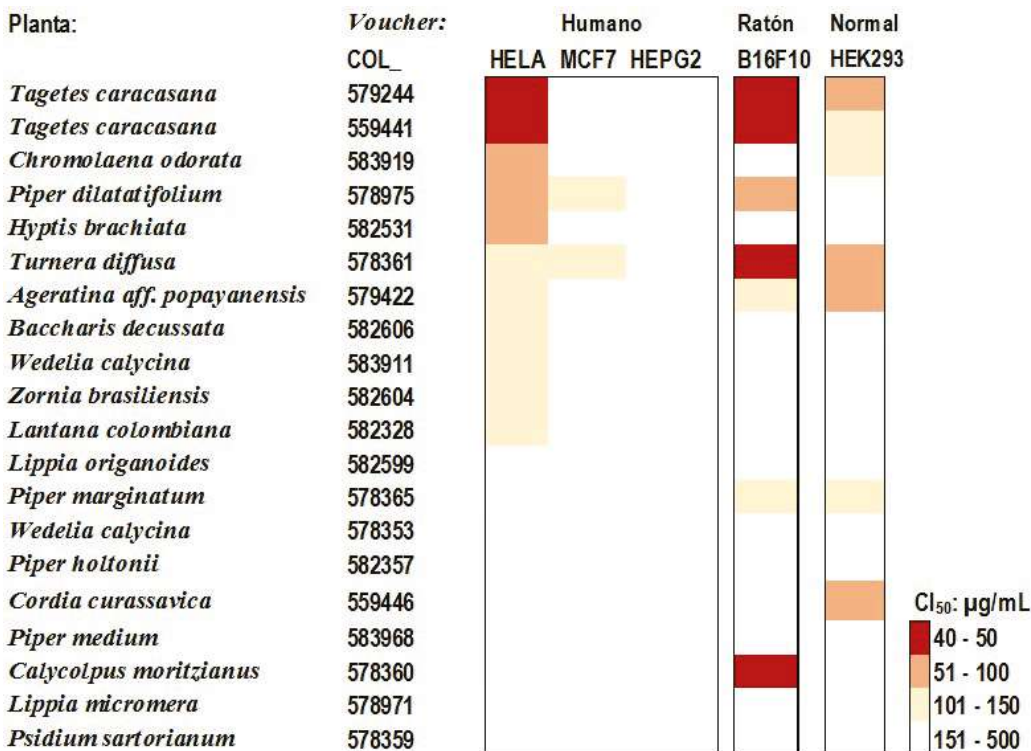


Figura 5. Tendencia a actividad antiproliferante de los aceites esenciales. Las muestras se organizaron en orden descendente con respecto al rango de la CI_{50} en células HELA. La tendencia a actividad antiproliferante es mayor cuanto mayor la intensidad del color. Células de origen humano: HELA, cáncer de cérvix; MCF7, glándula mamaria; HEPG2, hepatoma. (B16F10, melanoma de ratón. HEK293, células humanas de riñón embrionario tratadas después de la proliferación (tratamiento **b**) como referente de actividad citotóxica de cada aceite esencial.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran la variación de la citotoxicidad entre AE de especies de plantas de Colombia y con respecto a la célula y tratamiento usados en el ensayo. La jerarquización de la actividad permitió identificar muestras con perfiles de baja y alta tendencia a toxicidad con base en valores de CC_{50} mayores y menores que $100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, en la mayoría de líneas celulares. No se encontraron trabajos similares sobre citotoxicidad de AE luego de una revisión exhaustiva de sistema de búsqueda de artículos científicos. Rezk *et al.* (21) compararon la citotoxicidad del extracto de especies del género *Rhododendron*, analizando cada muestra simultáneamente en dos líneas celulares mediante ensayos que miden distinto parámetro de muerte celular. Usando un abordaje distinto de jerarquización, los autores lograron identificar la especie más promisoría para incluir en futuros estudios sobre antimicrobianos.

El ensayo del MTT es ampliamente utilizado para evaluar citotoxicidad de muestras de plantas y moléculas sintéticas (29,30) y en consideración a la facilidad técnica y bajo costo se seleccionó para este estudio. En un intento de robustecer el ensayo minimizando la variación con respecto al tipo y estado fisiológico de la célula, se incluyeron seis líneas celulares derivadas de órganos recomendados para análisis toxicológicos, como riñón, hígado y piel (28), las cuales se trataron en el momento de la siembra y 24 h después dado que el MTT puede evaluar estado quiescente de la célula (30). No se incluyó AE de referencia debido a que el propósito del estudio fue comparar entre sí los AE para identificar los de menor tendencia a citotoxicidad y no comparar la actividad con respecto a un referente. No existe un parámetro único de toxicidad *in vitro* debido, en buena parte a la diversidad de ensayos, por lo que algunos autores han propuesto valores de $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ como indicador de actividad de muestras vegetales y estudios demuestran relación directa con toxicidad *in vivo* (6, 23, 24).

La agrupación de los AE analizados, según la curva dosis-respuesta y rango de la CC_{50} , permitió identificar la variación de la citotoxicidad con respecto a la línea celular, la de riñón de mono (VERO) resultó más susceptible que las de riñón (HEK293) e hígado (HEPG2) humano (Figuras 2 y 3). La variación de citotoxicidad dependiendo del tipo de línea celular ha sido demostrada en otros

trabajos (13,21,28). La actividad varió también con respecto al tratamiento, siendo mayor después de la proliferación, que es resultado de esperar, ya que a las 24 h la división celular disminuye porque la monocapa celular ha alcanzado 75 – 80%. Además con este tratamiento, la concentración de suero bovino fetal en el medio de cultivo disminuyó de 10% a 2%) y con esto la señalización para progreso del ciclo celular (27,28).

La variación con respecto a la célula y tratamiento se tuvo en cuenta para jerarquizar los AE con respecto a citotoxicidad y de esta manera se identificaron los menos y más activos (Figura 4). El abordaje metodológico usado permite seleccionar AE para investigaciones futuras en medicamentos naturales o fármacos para patologías humanas. Los AE con baja tendencia a toxicidad pueden contener inhibidores de patógenos y metabolitos que modulen la respuesta inmune hacia un perfil más de protección contra la infección que inflamatorio. El AE de *Lippia organoides*, de mediana toxicidad en este estudio, presentó actividad antiviral *in vitro* promisoría ($CC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ e $IS > 4.0$) sobre el virus dengue y virus de la fiebre amarilla (17,18). AE de *Piper medium* y *Zornia brasiliensis*, con baja tendencia a toxicidad en este estudio (seis y siete en la jerarquización), presentaron actividad antidengue promisoría ($CC_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$ e $IS > 10$) en un estudio en progreso.

La estrategia de jerarquización también permitió identificar AE para estudios de actividad anticancerígena, por ejemplo, el de *Hyptis brachiata* podría ser seleccionado para estudios futuros sobre medicamentos naturales para cáncer cervical debido a que presentó $CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ en células HELA y $CC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ en células HEK293 (riñón) y HEPG2 (hígado), resultados que sugieren actividad promisoría. Aunque el AE de *Tagetes caracasana* presentó actividad antiproliferante relevante sobre células HELA ($CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$), no se recomienda para futuros estudios debido a su notada toxicidad ($\sum J_{pi} < 3,0$, último lugar en la jerarquización).

Es conocido que la actividad biológica de los AE depende de su composición química (5,10), aunque en este estudio no se pretendió establecer la relación entre el perfil citotóxico y químico. En estudios previos (23,24,31) y en progreso, se identificaron carvacrol, limoneno, timol, β -felandreno y α -humuleno, dependiendo de la planta, como componentes mayoritarios del AE de *Lippia organoides*, *Lippia micromera*, *Pipiper medium* y *Zornia brasiliensis*

los cuales resultaron de baja toxicidad en este estudio; y *cis*- y *trans*-tagenonas, *cis*- y *trans*-ocimenonas, óxido de cadineno, carvacrol y germacreno del AE de *Tagetes caracasana*, *Ageratina aff. popayanensis*, *Lantana colombiana* y *Hyptis brachiata* que fueron los más citotóxicos. De algunos terpenos constituyentes de los AE hemos evaluado la citotoxicidad en ensayos del MTT, el tratamiento de células de riñón humano (HEK293), riñón de mono (VERO) y célula humana (HELA) con limoneno a concentración tan alta como 1600 µg/mL no afectó la viabilidad (16) y recientemente encontramos valores de $CC_{50} > 200 \mu M$ sobre las mismas células con carvacrol, timol y β-felandreno.

El presente estudio tiene limitaciones relacionadas con el abordaje metodológico y la naturaleza de la muestra que dificultan concluir inequívocamente la tendencia a toxicidad de los AE. El MTT es una prueba colorimétrica que evalúa reducción de la actividad de enzimas como único parámetro de citotoxicidad (29,30); así, un AE con baja tendencia a toxicidad, según el MTT, puede resultar tóxico en un ensayo que evalúe otro parámetro. El MTT puede además generar falsos-positivos con muestras no-tóxicas pero que contienen inhibidores de las enzimas y falsos-negativos con muestras tóxicas que contienen componentes que señalizan la célula para apoptosis sin alterar la actividad enzimática (28-30). Con respecto a la naturaleza de la muestra, el resultado entre ensayos puede haber variado teniendo en cuenta que los AE son mezclas volátiles y, por lo mismo, la composición química se puede alterar durante el almacenamiento y la manipulación.

En futuros trabajos deberán ser considerados varios aspectos para lograr un abordaje metodológico que permita inferir con cierto grado de confiabilidad la toxicidad *in vivo* de muestras de AE. Entre estos: i) caracterizar la muestra para explicar su ubicación en la agrupación jerárquica dado que la toxicidad depende de su composición química; ii) evaluar la citotoxicidad simultáneamente en varias líneas celulares de origen humano de órganos relevantes en toxicología; iii) usar en cada ensayo AE de baja y alta toxicidad demostrada en ensayos *in vivo* como muestras de referencia; iv) evaluar simultáneamente varios parámetros de citotoxicidad.

CONCLUSIÓN

El abordaje metodológico usado en el estudio puede ser útil para seleccionar muestras de AE

para futuros trabajos orientados al descubrimiento de productos para uso humano. Se demostró la variabilidad de resultados del MTT dependiendo del tipo de célula y en consecuencia la necesidad de usar un panel para evaluar la actividad citotóxica. Dadas las limitaciones de los ensayos basados en célula, se recomienda usar protocolos robustos y reproducibles que permitan inferir con cierto grado de confiabilidad la tendencia de muestras vegetales que pueden ser tóxicas en humanos.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al Dr. Marcos López de la Fundación Cardiovascular, Bucaramanga, Colombia, Dra. Patricia Escobar y a Henry Bautista por la contribución con las líneas celulares MCF-7, B16F10, HEK293 y HEPG2. Este trabajo está anidado al Programa Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana de la UT-BioRed-CO-CENIVAM. El programa es financiado con recursos del Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contrato RC-0572-2012. El material que se utilizó para este trabajo fue proveído por el Estado Colombiano a través del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Fue colectado bajo el *Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados No. 101 del 3 de junio de 2014*, suscrito entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras manifiestan que no existe ningún conflicto de interés con los resultados publicados

REFERENCIAS

1. Baser K.H.C, Buchbauer G (Ed.). Handbook of essential oils: science, technology, and application. USA: Taylor & Francis Group, Boca Raton. 2010.
2. Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid Based Complement Alternat Med* 651593. 2014.
3. Dweck AC. Formulating Natural Cosmetics: An Encyclopedia of Ingredients: Natural preservatives - An update. Allured Pub Corp. ISBN-13: 978-1932633757. 2010;107-130 p.
4. Antonioti S. Tuning of essential oil properties by enzymatic treatment: towards sustainable processes for the generation of new fragrance ingredients. *Molecules*. 2014; 19(7):9203-9214.

5. Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr.* 2010; 25: 407-426.
6. Bayala B, Bassole IH, Scifo R, Gnoula C, Morel L, Lobaccaro J, *et al.* Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *Am J Cancer Res.* 2014; 4(6): 591-607.
7. Sienkiewicz M, Kowalczyk E, Wasiela M. Recent patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2012;7(2):133-140.
8. Lang G. and Buchbauer G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* 2010; 27:13-39.
9. Ben-Arye E, Dudai N, Eini A, Torem M, Schiff E, Rakover Y. Treatment of upper respiratory tract infections in primary care: a randomized study using aromatic herbs. *Evid Based Complement Alternat Med* 690346. 2011.
10. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(2):446-475.
11. Sperotto AR1, Moura DJ, Péres VF, Damasceno FC, Caramão EB, Henriques JA, Saffi J. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food Chem Toxicol.* 2013;57: 57-68.
12. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C. Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Program: an overview. *Int J Hyg Environ Health.* 2003; 206 (4-5):437-445.
13. Tweats DJ, Scott AD, Westmoreland C, Carmichael PL. Determination of genetic toxicity and potential carcinogenicity *in vitro*—challenges post the Seventh Amendment to the European Cosmetics Directive. *Mutagenesis.* 2006; 22(1):5-13.
14. Ahuja V, Sharma S. Drug safety testing paradigm, current progress and future challenges: an overview. *J. Appl. Toxicol.* 2014; 34:576-594.
15. Bueno J, Escobar P, Martínez JR, Leal SM, Stashenko EE. Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity against drug resistant-tuberculosis and nontuberculous mycobacteria strains. *Nat Prod Commun.* 2011; 6(11):1743-1748.
16. Gómez LA, Stashenko E, Ocazonez RE. Comparative study on *in vitro* activities of citral, limonene and essential oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on yellow fever virus. *Nat Prod Commun.* 2013; 8(2):249-252.
17. Meneses R, Ocazonez RE, Martínez JR, Stashenko EE. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 6:8:8.
18. Ocazonez RE, Meneses R, Torres FA, Stashenko E. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(3):304-309.
19. Sarrazin SL, da Silva LA, de Assunção AP, Oliveira RB, Calao VY, da Silva R, *et al.* Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Molecules.* 2015; 20(2):1860-1871.
20. Vera SS, Zambrano DF, Méndez-Sánchez SC, Rodríguez-Sanabria F, Stashenko E, Duque Luna JE. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2014; 113(7):2647-2654.
21. Rezk A, Al-Hashimi A, John W, Schepker H, Ullrich M-S, Brix K. Assessment of cytotoxicity exerted by leaf extracts from plants of the genus *Rhododendron* towards epidermal keratinocytes and intestine epithelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* DOI 10.1186/s12906-015-0860-8. 2015; 15:364
22. Xia M, Huang R, Witt K, Southall N, Fostel J, Cho M-H, *et al.* Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ Health Perspect.* 2008; 116(3): 284-291.
23. Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J Chromatogr A.* 2004; 1025(1):93-103.
24. Stashenko E, Martínez JR, Cala MP, Durán DC, Caballero D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *J Sep Sci.* 2013; 36(1):192-202.
25. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 106(3):290-302.
26. Ferraz R, Bomfim D, Carvalho N, Soares M, da Silva T, Machado W, *et al.* Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomed.* 2013; 20:615-621.
27. Suffness M, Pezzuto JM. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity.* Academic Press, London, pp. 71 -133.
28. Yoon M, Campbell JL, Andersen ME, Clewell H. Quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation of cell-based toxicity assay results. *Crit Rev Toxicol.* 2012; 42(8):633-652.
29. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 2005; 288(2):369-376.
30. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1):55-63.
31. Leal SM, Pino N, Stashenko EE, Martínez JR, Patricia E. Escobar. Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper spp.* grown in Colombia. *J Essential Oil Res.*