

Composición química y evaluación de la actividad antiherpética *in vitro* de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown y sus componentes mayoritarios

Actividad antiherpética de aceites esenciales de *Lippia alba*

Chemical Composition and evaluation *in vitro* of anti-herpetic activity of essential oils from *Lippia alba* (Mill) NE Brown and the main components

Lee Solbay Agudelo-Gómez¹, Germán Augusto Gómez Ríos², Diego Camilo Durán García², Elena Stashenko², Liliana Betancur-Galvis¹

RESUMEN

Introducción: *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown es una planta aromática perteneciente a la familia Verbenaceae, ampliamente usada en Suramérica y Norteamérica como infusión contra la hipertensión, problemas digestivos, náuseas y resfriados. **Objetivo:** En el presente estudio, se evaluó la actividad antiviral *in vitro* frente al Herpesvirus Humano Tipo 1 (HSV-1), de veinte aceites esenciales de *L. alba* y, diez de sus componentes mayoritarios. **Metodología:** La actividad antiviral *in vitro* fue evaluada empleando la técnica modificada, de titulación del punto final (EPTT). Los aceites esenciales, de plantas de *L. alba* recolectadas de diferentes regiones del país, fueron obtenidos por hidrodestilación asistida con radiación de microondas (MWHD). Se determinó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), la composición química, de los veinte aceites esenciales de *L. alba*, identificándose dos quimiotipos: citral y carvona. **Resultados y conclusiones:** Los aceites quimiotipo carvona, BC₁ y CA₂, mostraron actividad antiherpética *in vitro*, moderada sobre monocapa de células HeLa infectadas, con valores de Rf de 1x10^{1.5}, en concentraciones, de 250 µg/mL y 125 µg/mL, respectivamente. Los controles positivos, sulfato de heparina y aciclovir, redujeron el título viral con valores de Rf, en orden, de 1x10² y 1x10⁴. Ninguno de los monoterpenos evaluados mostró actividad contra el HSV-1. *Salud UIS* 2010; 42: 230-239

Palabras clave: *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, herpesvirus humano 1, agentes antivirales, aceite esencial, verbenaceae

1. Grupo de Investigación Dermatológica (GRID), Universidad de Antioquia.

2. Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, Universidad Industrial de Santander.

Correspondencia: Liliana Betancur-Galvis, Spc, MSc, PhD. Química, Grupo de Investigación Dermatológica (GRID), Universidad de Antioquia, Carrera 51D # 62 -29 LAB 283, Teléfono (574) 2196064, A.A. 1226, Medellín, Antioquia, Email: betancurli@hotmail.com

Recibido: 14 de diciembre de 2010 - **Aceptado:** 22 de diciembre de 2010

ABSTRACT

Introduction: *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown is an aromatic shrub belonging to the Verbenaceae family, which is widely used all over South and Central America as an infusion against, hypertension, digestive troubles, nausea and cold. The antiviral activity *in vitro* against Herpesvirus 1, Human (HSV-1) of twenty essential oils of *L. alba* and ten of its components were evaluated. **Methodology:** The antiviral activity was determined using a modified end-point titration technique (EPPT). The essential oils from *L. alba* collected in different regions of Colombia were obtained by microwave-assisted hydrodistillation (MWHd). Their chemical compositions were determined by GC and GC/MS. Two chemotypes were distinguished, characterized by carvone and citral as main constituents. **Results and conclusions:** Carvone chemotype oils BC₁ and CA₂ were found to be moderate antiviral activity over infected confluent monolayers of HeLa cells with Rf value of 1x10^{1.5} at a concentration of 250 µg/mL and 125 µg/mL, respectively. Heparin sodium salt and acyclovir were used as positive controls and showed Rf values of 1x10² and 1x10⁴, respectively. None of monoterpenes tested showed antiviral activity against HSV-1. *Salud UIS* 2010; 42: 230-239

Keywords: *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, herpesvirus 1 human, essential oil, antiviral agents, verbenaceae

INTRODUCCIÓN

El Herpesvirus Humano Tipo 1 (HSV-1), pertenece a la subfamilia Alphaherpesvirinae y causa infecciones virales comunes en humanos, tales como infecciones herpéticas mucocutáneas, keratitis, encefalitis y herpes neonatal. La infección inicia en las células mucoepiteliales, donde se replican las partículas virales, para luego ser transportadas por el nervio sensorial hacia el ganglio, donde permanecen en estado de latencia hasta su reactivación¹. Como consecuencia de la epidemia del HIV-SIDA (*Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida*), los tratamientos inmunosupresores y, el incremento en las infecciones de transmisión sexual, las enfermedades producidas por este agente infeccioso persistente, tienden a ser más frecuentes y clínicamente más complejas. Adicionalmente, el herpes neonatal es una infección potencialmente devastadora, causada por el HSV-1 o HSV-2, donde el riesgo de transmisión al neonato, de una madre infectada, en el momento del parto es del 30-50%².

Las enfermedades producidas por los virus de la subfamilia Alphaherpesvirinae, constituyen un creciente problema de salud pública, debido al aumento en la prevalencia (50-95% para HSV-1 y 6-50% para HSV-2)³. El tratamiento de elección para las infecciones causadas por los virus Alphaherpesvirinae es el Aciclovir (ACV) y sus derivados. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a este fármaco complica su manejo a nivel clínico; registrándose una prevalencia de resistencia al tratamiento con aciclovir en pacientes inmunocomprometidos, aproximadamente, del 4 al 7%⁴. En las dos últimas décadas, se ha incrementado los trabajos de investigación enfocados a evaluar actividad antiviral, de principios activos aislados, de productos

naturales, como alternativa para el descubrimiento de agentes antivirales. Producto de estos estudios es la Vidarabina, disponible en el mercado⁵.

Lippia alba (Mill) N.E. Brown, conocida, comúnmente, como “Cidrón”, “hierba luisa” (Venezuela), “erva-cidreira” (Brasil), “prontoalivio” (Colombia), es usada en Latinoamérica como anti-diarreico, antiespasmódico, diaforético, diurético, expectorante, laxante y sedante^{6,7}. Hasta el momento, no se tiene evidencia de la actividad anti-herpética de los aceites esenciales obtenidos de *L. alba*. Recientemente, se demostró la actividad antiviral, para las fracciones de *n*-butanol y acetato de etilo, obtenidas del extracto etanólico de las hojas de *L. alba*. La fracción butanólica mostró actividad antiherpética, contra la cepa 29R de HSV-1 resistentes al Aciclovir; mientras que, la fracción de acetato mostró actividad contra la cepa PV-2 de poliovirus⁸. El presente estudio, evaluó la actividad antiviral *in vitro* contra el HSV-1 de veinte aceites esenciales de *L. alba* y, diez de sus monoterpenos mayoritarios, sobre la línea celular HeLa, mediante la “Técnica de Titulación del Punto Final (EPTT)”⁹, con el fin de correlacionar la actividad biológica con la composición de los aceites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción del aceite esencial

El material vegetal utilizado, fue colectado por personal adscrito al Centro de Excelencia CENIVAM, en diferentes lugares de Colombia. La identificación taxonómica de las muestras botánicas se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá), por el

doctor José Luis Fernández. Los pliegos testigo de cada planta, quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano.

Los aceites esenciales se extrajeron de 300 g de planta completa, por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHF)¹⁰. La extracción se llevó a cabo empleando un equipo de destilación, tipo Clevenger, con reservorio de destilación, Dean Stara, y adaptación para calentamiento por radiación de microondas, a través, de un horno de microondas convencional, KENDO modelo MO-124, con una potencia de salida 800 vatios y frecuencia de radiación de 2,5 GHz. Al final del proceso de extracción, se agregó sulfato de sodio al aceite extraído, para secar el agua residual. Cada extracción tuvo una duración de 40 minutos. Adicionalmente, material vegetal de plantas cultivadas, proveniente de la zona experimental de cultivos de CENIVAM, fue utilizado para realizar un análisis comparativo de la composición química de los aceites esenciales, en función de la temperatura de secado y tiempo de extracción.

Análisis cromatográfico del aceite esencial

El análisis cromatográfico de los aceites, fue realizado en el Laboratorio de cromatografía, Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, del Centro de Investigación CENIVAM. Éste se describe, de manera breve, en Stashenko et al¹⁰. Una alícuota de cada aceite esencial puro (50 µL), junto con el patrón interno (*n*-tetradecano, 4 µL), se disolvieron en diclorometano hasta el volumen final de 1 mL. Luego, 1 µL de la solución se inyectó al equipo de GC-MS, para su análisis cromatográfico.

La identificación de los componentes presentes en los aceites esenciales de *L. alba* se llevó a cabo por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS), empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 6890 Plus (HP, Palo Alto, California, USA), acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5973, equipado con un puerto de inyección split/splitless (1:50), un inyector automático Agilent 7863, y un sistema de datos HP-MS ChemStation G17001DA (Versión D.00.01.27, 2002), incluyendo las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K, NIST 2002 y ADAMS 2004.

Se utilizó una columna capilar apolar de sílice fundida DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) de 60 m x 0,25 mm, D.I x 0,25 µm, d_f con fase estacionaria de 5% fenil – poli (metil siloxano) y, una columna polar de sílice fundida DB-WAX (J & W Scientific, Folsom,

CA, EE.UU) de 60 m x 0,25 mm, D.I x 0,25 µm, d_f con fase estacionaria de polietilenglicol. El aumento de la temperatura del horno se programó, en el rango inicial, desde 45°C hasta 150°C, a razón 4°C/min; luego se incrementó hasta 250°C a razón de 5°C/min. Finalmente, la temperatura aumentó a razón de 10°C/min hasta alcanzar 275°C (15 minutos). Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron, respectivamente, a 230 y 285 °C.

Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (full scan), a 6 scan s⁻¹, en el rango de masas m/z 40-350. Para la identificación de los compuestos se usaron los espectros de masas e índices de retención de Kováts (I_k).

La cuantificación de los componentes presentes en cada aceite esencial extraído e identificado, se llevó a cabo empleando la técnica de estandarización interna, utilizando el *n*-tetradecano como patrón interno. La concentración, a la cual se llevó el patrón interno fue de 3040 ppm.

Monoterpenos

Los monoterpenos: (±) linalol, R (-) carvona, S (+) carvona, eugenol, geraniol, nerol, citral (cis, trans), (-) trans-cariofileno, R (+) limoneno, S (-) limoneno, fueron comprados a Sigma (Chemical Company St Louis, MO, USA).

Se almacenaron en refrigeración a 4°C, hasta su uso, soluciones en DMSO de 50 mg/mL y 10 mg/mL, respectivamente, para los aceites esenciales y monoterpenos. Se garantizó una concentración final de DMSO en las evaluaciones ≤ 0,05%.

Actividad antiviral *In vitro*

Células

Las células utilizadas fueron: HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humano, línea ATCC CCL-2) y Vero (Células de riñón de mono verde africano, línea ATCC CCL-81), conservadas en fase logarítmica de crecimiento en Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado, respectivamente, con 5% y 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), 1 µg/mL de estreptomina, 1 µg/mL de neomicina, vitaminas, aminoácidos no esenciales y glutamina al 1%. El pH de 7,2 requerido para los cultivos celulares fue logrado con hidróxido de sodio 1N; y estabilizado con 0,5% de una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 7% y con 1% HEPES 1M.

Virus

Se utilizó un aislado de HSV-1 sensible al Aciclovir, donado por el grupo de Virología de la Universidad de Antioquia (Cepa Viral comprada al “The Center for Disease Control -Atlanta, GA, USA”), éste fue propagado en cultivo de células Vero (Células de riñón de mono verde africano, línea ATCC CCL-81). Una concentración de partículas virales se preparó mediante etapas a repetición de congelación y descongelación, a partir del sobrenadante, obtenido del cultivo celular infectado de células Vero. Posteriormente se realizó la titulación viral según el método de “Dosis Infecciosa de Cultivo Celular 50 (DICC₅₀)”, correspondiente a la concentración del virus que afecta el 50% de la monocapa celular, sobre monocapa de células Vero con formación $\geq 80\%$; según lo descrito en los protocolos⁹. Luego de cuantificar el virus, éste fue conservado en alícuotas a -196°C , en nitrógeno líquido.

Ensayo de reducción del título viral

Se determinó la actividad antiviral de los aceites esenciales de *Lippia alba*, frente a una Dosis Infecciosa de Cultivo Celular Cincuenta (1DICC₅₀), de HSV-1, mediante la técnica de titulación del punto final (EPTT) ó ensayo de reducción del título viral. Las células HeLa, cultivadas en platos de 96 pozos a una densidad de $1,6 \times 10^4$ células/pozo, incubada a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%, fueron mantenidas hasta constituir el 80% de la monocapa celular. Luego, en suspensiones virales de 1DICC₅₀ de HSV-1, con el aceite esencial en concentraciones de 500 hasta $12,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ se incubaron, durante 30 minutos, a temperatura ambiente; y los monoterpenos, en concentraciones desde 100 hasta $12,5 \mu\text{g}/\text{mL}$. La mezcla de aceite esencial/ suspensión viral o monoterpeno / suspensión viral, fueron adicionadas, independientemente, a la monocapa confluyente de células HeLa. Después de 24 horas de incubación en 5% de atmósfera húmeda a 37°C , se examinó el efecto citopático, y, posteriormente, los microplatos fueron fijados con formaldehído al 3,5% y teñidos con cristal violeta al 0,2%. El control celular, del aceite, del monoterpeno y, el control de la suspensión viral, fueron incluidos en la prueba, para determinar, tanto, la concentración de aceite o monoterpeno, que desprende el 100 por ciento de las células en cada dilución (CC_{100}), como la concentración mínima, de sustancia, que reduce la carga viral. La actividad fue evaluada determinando el factor de reducción (Rf), el cual corresponde al valor obtenido de dividir el título viral en ausencia del aceite o monoterpeno, sobre el título obtenido en presencia del aceite o monoterpeno¹¹. En otras palabras, el factor de reducción muestra cuantas veces el aceite redujo la

carga viral al cual fue retado. Se realizaron dos réplicas de cada experimento, y por cuadruplicado, cada concentración; se utilizó como controles positivos la Heparina y el Aciclovir.

Criterios para definir actividad

Según los parámetros establecido por Vlietinck et al.¹¹, la actividad antiviral relevante o moderada de un producto natural purificado, es aquella cuyo factor de reducción (Rf) del título viral es, respectivamente, de $\geq 1 \times 10^3$ o de 1×10^2 . Se determina, en este estudio, como criterio de actividad moderada y leve para aceites esenciales, un factor de reducción del título viral, respectivamente, de $1 \times 10^{1.5}$ y 1×10^1 .

RESULTADOS

Composición del aceite esencial

En el presente estudio, se recolectaron plantas de *Lippia alba* de cinco departamentos del país; algunas de ellas se cultivaron en la Unidad Experimental, del Complejo Piloto Agroindustrial del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, en la ciudad de Bucaramanga. En la (Tabla 1) se presenta el código del aceite, el número de voucher, y el lugar de recolección del material vegetal. La caracterización química fue realizada a los veinte aceites esenciales, sin embargo, en las tablas 2 y 3 se registra sólo la composición química de los aceites, relevantes, para la discusión de la actividad antiviral. El análisis cromatográfico reveló la presencia de 125 compuestos (datos no mostrados). Mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS) se identificó 80 de estos compuestos, lo cual representó el 93% de la composición total de los aceites (datos no mostrados). La composición de los aceites TS, TF₂, BC₁, BC₂, CC₁, CA₁ y CA₂, ha sido reportada, anteriormente, por nosotros¹². En las (Tabla 2 y 3), sólo se registran 27 de los 80 componentes identificados por GC/MS. Los componentes están ordenados según el tiempo de elución en las columnas DB-5MS y DB-WAX, con sus índices de retención y cantidades relativas (%). Los aceites esenciales fueron clasificados a partir de sus componentes mayoritarios como quimiotipo “cital” y “carvona”. En general, la composición química de los aceites de *Lippia alba* quimiotipo “cital” extraídos por MWHD (Tabla 2), varió, levemente, en el porcentaje de los componentes presentes, pero, cualitativamente fue muy constante la composición. El cital (mezcla de los isómeros, neral y geranial) fue el constituyente mayoritario (42-56%), seguido del geraniol (7-16%), el *trans*- β -cariofileno (4-

8%), el 6-metil-5-hepten-2-ona (1-3%), el nerol (0-5%), el limoneno (2-3%), el biciclosesquifelandreno (1-2%) y el α -humuleno (1-2%).

Tabla 1. Aceites esenciales de *Lippia alba* y monoterpenos: citotoxicidad (100%), reducción del título viral y, actividad antiviral.

Nombre Aceite Esencial	Código	Quimiotipo	Voucher	Lugar de recolección	Modelo HeLa ^c (1DICC ₅₀ ^d) (24h)		
					Citotoxicidad 100% ^e (µg/mL)	Reducción Título Viral (Rf) ^f	Actividad Antiviral ^g (µg/mL)
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Brown.	SB ₁	Citral	516929	Bucaramanga, Santander	25	-	-
<i>Lippia alba</i> Cubará	BC ₁	Carvona	512083	Cubará, Boyacá	>500	10 ^{1.5}	250
<i>Lippia alba</i> San Jerónimo	TS	Carvona	484650	San Jerónimo, Tolima	500	10 ¹	125
<i>Lippia alba</i> Flandes	TF ₂	Carvona	484650	Flandes, Tolima	500	10 ¹	250
<i>Lippia alba</i> Colorado	BC ₂	Citral	512272	Colorado, Bolívar	25	-	-
<i>Lippia alba</i> Cachipai	CC ₁	Carvona	484650	Cachipai, Cundinamarca	250	10 ¹	125
<i>Lippia alba</i> Anolaima	CA ₁	Carvona	484650	Anolaima, Cundinamarca	500	10 ¹	250
<i>Lippia alba</i> Anolaima	CA ₂	Carvona	484650	Anolaima, Cundinamarca	500	10 ^{1.5}	125
<i>Lippia alba</i> Bucaramanga	SB _{2,3,5-10}	Citral	512077 ^a	Bucaramanga, Santander	50	-	-
<i>Lippia alba</i> Bucaramanga	SB _{4,11-13}	Carvona	512078 ^b	Bucaramanga, Santander	>250	-	-
(±) Linalol ^h	E6	-	-	-	>100	-	-
R (-) Carvona ^h	E14	-	-	-	>100	-	-
S (+) Carvona ^h	E15	-	-	-	>100	-	-
Eugenol ^h	E16	-	-	-	>100	-	-
Geraniol ^h	E17	-	-	-	>100	-	-
Nerol ^h	E18	-	-	-	>100	-	-
Citral, (Cis, trans) ^h	E19	-	-	-	25	-	-
(-) trans-Cariofileno ^h	E21	-	-	-	12,5	-	-
R (+) Limoneno ^h	E23	-	-	-	>100	-	-
S (-) Limoneno ^h	E24	-	-	-	>100	-	-
Heparina	H	-	-	-	>10U.I/mL	10²	10U.I
Aciclovir	A	-	-	-	>600	10⁴	6.0

^{a, b} Los aceites fueron extraídos de la misma planta (SB₂) y (SB₄), para a y b, respectivamente, en experimentos donde se variaron los tiempos de secado y extracción. ^a Los aceites esenciales SB₂, SB₃ y SB₅ hasta SB₁₀ con una citotoxicidad del 100% entre 50 y 25 µg/mL, no presentaron actividad antiviral en ninguna de las concentraciones evaluadas. ^b Los aceites esenciales SB₄ y SB₁₁ hasta SB₁₃ con una citotoxicidad del 100% entre 500 y 200 µg/mL, no presentaron actividad antiviral en ninguna de las concentraciones evaluadas. ^c HeLa, carcinoma epitelial de cérvix humano, línea ATCC CCL-2. ^d 1DICC₅₀: 1 Dosis Infecciosa Cultivo Celular Cincuenta. ^e Dosis mínima tóxica del aceite o monoterpeno que desprendió el 100% de la monocapa celular. ^f Rf: Valor obtenido de dividir el título viral en ausencia del aceite o monoterpeno, sobre el título obtenido en presencia del aceite o monoterpeno. ^g Dosis máxima no tóxica del aceite o monoterpeno que presentó el mayor factor de reducción del Título viral. ^h Monoterpenos.

Tabla 2. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”.

I_k^a		Identificación	AE, Cantidad Relativa %							
DB-5MS	DB-WAX		SB ₃	SB ₄	SB ₆	SB ₇	SB ₈	SB ₉	SB ₁₀	
986	1338	6-Metil-5-hepten-2-ona	2,00	1,92	1,70	1,51	1,91	1,68	1,62	
1016	994	Isobutanoato de isopentilo	0,05	-	-	-	-	-	0,05	
1034	1197	Limoneno	1,94	2,15	2,61	2,09	2,59	2,09	2,22	
1048	1251	<i>trans</i> -β-Ocimeno	0,24	0,32	0,30	0,31	0,34	0,33	0,41	
1102	1548	Linalool	1,42	1,48	1,45	1,41	1,48	1,50	1,43	
1146	1521	<i>epi</i> -Fotocitral A + C ₁₀ H ₁₆ O (N.I.)	0,38	0,46	0,47	0,49	0,48	0,50	0,54	
1155	1483	Citronellal	0,92	0,98	0,81	0,79	0,96	0,90	0,76	
1164	1577	<i>trans</i> -Verbenol	1,02	1,43	1,79	1,74	1,81	1,86	2,02	
1183	1577	<i>cis</i> -Verbenol	1,54	1,91	0,22	2,20	2,25	2029	2,52	
1235	1808	Nerol	2,11	2,44	1,23	1,68	1,22	1,46	1,33	
1252	1692	Neral	20,00	20,96	23,05	22,72	23,09	23,10	22,19	
1264	1852	Geraniol	9,42	10,31	8,42	6,96	6,69	8,04	8,71	
1270	1747	Geranial	24,54	26,00	30,14	29,00	29,80	29,30	27,32	
1359	1732-2177	Acetato de nerilo + Eugenol	0,40	0,43	0,28	0,40	0,39	0,43	0,52	
1380	1761	Acetato de geraniol	2,94	2,75	3,15	3,18	3,23	3,38	3,27	
1391	1598	β-Elemento	1,36	1,59	1,33	1,35	1,52	1,49	1,67	
1419	1611	<i>trans</i> -β-Cariofileno	5,30	5,67	5,44	5,45	6,25	5,99	6,30	
1440	1601	α-Guaieno	1,33	1,27	1,18	1,18	1,41	1,27	1,38	
1455	1580	α-Humuleno	1,67	1,73	1,41	1,5	1,65	1,67	1,82	
1495	1726	Biciclosesquifelandreno	1,24	1,99	1,19	1,66	1,61	1,83	2,24	
1508	1817	Isobutanoato de geraniol	0,65	0,56	0,39	0,47	0,43	0,40	0,46	
1513	1731	α-Bulneseno	0,58	0,62	0,49	0,53	0,57	0,57	0,57	
1543	1783	<i>Trans</i> -γ-Bisaboleno	1,21	1,03	0,56	0,71	0,61	0,57	0,82	
1596	2001	Óxido de cariofileno	2,88	1,64	1,29	1,28	1,23	1,03	0,79	
1613	1970	N.I. ^b	0,12	0,08	-	-	0,13	-	-	
1628	1964	Epóxido de humuleno	0,86	0,23	0,23	0,16	-	0,10	0,08	
2114	-	C ₁₉ H ₂₆ O	0,65	0,50	0,18	0,22	-	0,17	0,21	

^a I_k : Índice de Kováts determinados experimentalmente; ^bN.I: No identificado

De igual modo, los aceites quimiotipo “carvona” (Tabla 3), presentaron variaciones cuantitativas. La carvona fue el compuesto mayoritario (34-39%), seguido del

limoneno (22-31%), el biciclosesquifelandreno (5-13%), la piperitenona (5-6%), la piperitona (2-4%), y los sesquiterpenos, β-bourboneno y β-elemento (2-3%).

Tabla 3. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”.

I_k^a		Identificación	AE, Cantidad Relativa %			
DB-5MS	DB-WAX		SB ₁₂	SB ₁₃	BC ₁ ^b	CA ₂ ^b
855	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-hexenal	0,18	0,1	0,1	-
954	965	Canfeno	0,24	0,30	0,2	0,5
991	1064	β-Mirceno	0,71	0,91	0,9	0,9
1041	1197	Limoneno	23,17	29,71	32	37,1

1049	1153	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0,73	0,80	-	-
1102	1453	Linalol	0,54	0,49	0,6	0,7
1126	1580	<i>trans-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0,23	0,26	0,5	0,1
1137	1350	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0,18	0,18	0,4	0,1
1141	1948	<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0,15	0,17	0,5	0,2
1180	1613	Borneol	0,90	-	-	-
1202	1517	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0,38	-	0,4	0,3
1210	1537	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0,38	-	0,3	0,1
1221	1745	<i>trans</i> -Carveol	0,67	0,24	-	-
1259	1654	Carvona	36,70	35,00	49,4	27,9
1265	1641	Piperitona	2,78	3,45	2,8	0,1
1269	1798	<i>cis</i> -Óxido de carvona	0,30	0,38	0,4	-
1348	1948	Piperitenona	5,07	5,67	5,1	1,6
1388	1428	Isómero de β -Elemeno	0,08	0,07	-	0,1
1394	1428/1496	β -Bourboneno + β -Elemeno	2,73	2,63	2,0	5,3
1453	1570	<i>trans</i> - β -Farneseno	1,21	0,56	0,3	1,8
1461	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,06	0,46	-	0,1
1481	1692	γ -Muuroleno	0,48	0,09	-	0,3
1483	1552	Germacreno D	0,15	0,09	-	0,2
1493	1624	Biciclosesquifelandreno	1,08	8,65	1,2	12,3
1506	1608	Biciclogermacreno	0,87	0,63	-	-
1512	1671	γ -Cadineno	0,25	0,19	-	0,5
1525	1855	Cubebol	-	-	-	0,4

^aI_K: Índice de Kováts determinados experimentalmente; ^bMesa et al. (Mesa 2008) reportan la composición de los aceites BC₁ y CA₂.

El análisis, comparativo, de la composición química de los aceites, en función de la temperatura de secado y tiempo de extracción, mostró, en forma general, estar relacionado con el incremento en el rendimiento de los aceites, en ambos quimiotipos. Es decir, a mayor tiempo de extracción para hojas frescas del quimiotipo "cital", incrementó el rendimiento de los aceites. En ambos quimiotipos, disminuyó el contenido de sus componentes principales, a medida que aumentaba el tiempo de extracción. En el quimiotipo cital, conforme aumentó el tiempo y la temperatura de secado, se observó un aumento en el contenido de neral y geranial, y la disminución de nerol y geraniol. En contraste, no hubo efecto significativo de la temperatura y duración del secado sobre la composición química de los aceites del quimiotipo "carvona".

Actividad antiviral *In vitro*

En la tabla 1, se muestra los resultados de la evaluación de la actividad antiherpética de los veinte aceites y los monoterpenos. En general, los aceites quimiotipo "carvona" fueron activos. Ninguno de los aceites

quimiotipo cital, ni los monoterpenos, mostraron actividad. La mayor actividad anti-herpética, fue evidenciada para los aceites quimiotipo "carvona", BC₁ y CA₂, respectivamente, a una concentración de 250 μ g/mL y 125 μ g/mL, los cuales redujeron en 10^{1.5} unidades logarítmicas la carga viral, cuando fueron retados a 1DICC₅₀ (Tabla 1). Los aceites TS, CC₁, CA₁, y TF₂, mostraron una leve actividad, en concentraciones de 125 μ g/mL, para los dos primeros aceites y, 250 μ g/mL para los dos últimos; disminuyendo diez veces la carga viral. El control de Heparina redujo la carga viral cien veces, es decir 10² unidades logarítmicas a una concentración de 10U/mL, mientras el Aciclovir disminuyó la carga viral cien mil veces, a una concentración de 6 μ g/mL.

Igualmente, en los resultados obtenidos para la evaluación de la actividad citotóxica, los dos quimiotipos tuvieron actividades contrastantes (Tabla 1). La concentración citotóxica que desprendió el 100% de la monocapa de células HeLa para el quimiotipo "carvona", estuvo en un rango 200-500 μ g/mL, mientras, para el quimiotipo "cital" fue de 50-25 μ g/mL. Según el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (INC-USA), los extractos

vegetales que muestren valores de concentraciones citotóxicas cincuenta (CC_{50}) menores de 30 $\mu\text{g/mL}$, son considerados citotóxicos¹³; lo que caracteriza a los aceites quimiotipo “citral” como citotóxicos, respecto al quimiotipo “carvona”, para las células tumorales HeLa.

DISCUSIÓN

La especie *Lippia alba*, de la familia Verbenaceae, resulta de gran interés por la diversidad química de los metabolitos secundarios volátiles, presentes en sus aceites esenciales, y la variedad de usos botánicos y etnofarmacológicos¹³. La composición química de los aceites esenciales obtenidos de *L. alba* dependen de factores geobotánicos, de las condiciones de cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción y, del proceso de extracción^{14,15,16}. A la fecha se han descrito los quimiotipos: citral/ β -cariofileno¹⁷, 1,8-cineol/alcanfor¹⁸, γ -terpineno¹⁹, citral, carvona²⁰, citral/mirceno, citral/limoneno, carvona/limoneno²¹, limoneno²², linalol²³, citral/germacreno-D, 1,8-cineol/limoneno¹⁵ y, limoneno-piperitona¹⁴. Por otro lado, basándose en la composición y las vía de biosíntesis de los diferentes aceites esenciales, Hennebelle et al.¹³ proponen, 7 quimiotipos: I (citral, linalol, β -cariofileno), II (tagetona), III (limoneno-carvona ó limoneno-monoterpenos/cetónicos), IV (mirceno), V (γ - terpineno), VI (alcanfor 1,8-cineol) y VII (estragol).

En el presente estudio, se evaluó la actividad antiviral *in vitro* contra el virus HSV-1, de veinte aceites esenciales de *L. alba* y diez de sus monoterpenos mayoritarios, sobre la línea celular HeLa. Los aceites esenciales, fueron obtenidos de plantas silvestres, recolectadas de varios departamentos del país, y plantas cultivadas. La actividad anti-herpética fue evaluada para los diferentes aceites obtenidos, incluyendo aceites que se diferenciaron en el proceso de extracción.

Según el análisis cromatográfico GC/MS, los aceites fueron clasificados como quimiotipo “citral” y “carvona”. Los compuestos mayoritarios, identificados en los aceites del quimiotipo “citral” fueron: geranial, neral, geraniol, *trans*- β -cariofileno, acetato de geranilo y nerol; y para el quimiotipo “carvona” son: carvona, limoneno, biciclosquifelandreno, piperitenona, piperitona, β -bourboneno y β -elemeno. El análisis cromatográfico estableció diferencias en el porcentaje de los componentes mayoritarios según el proceso de extracción. En ambos quimiotipos, varió el contenido de sus componentes principales a medida que aumentaba el tiempo de extracción. En el quimiotipo “citral” se

observó un aumento en el contenido de neral y geranial, y la disminución de nerol y geraniol. En contraste, no hubo efecto significativo de la temperatura y duración del secado sobre la composición química de los aceites del quimiotipo “carvona”.

Al analizar la actividad frente al herpes simplex tipo 1 de los aceites esenciales de *L. alba*, se encontró que los aceites del quimiotipo “citral” y sus componentes mayoritarios: (\pm) linalol, R (-) carvona, S (+) carvona, eugenol, geraniol, nerol, citral (cis, trans), (-) trans-cariofileno, R (+) limoneno, y S (-) limoneno; no presentaron actividad en las concentraciones evaluadas, las cuales incluyeron concentraciones citotóxicas y no citotóxicas. Aunque, no se ha publicado por el momento, la actividad antiherpética de aceites esenciales de *L. alba*; aceites esenciales, con componentes mayoritarios, similares a la composición del quimiotipo “citral”, han mostrado actividad antiherpética²⁴. El aceite esencial Lemon Balm obtenido de *Melissa officinalis* en el cual se destaca por poseer como componentes principales: geranial (20,13%), neral (13,58%), cariofileno (17,31%) citronelal (3,86%), β -cubebeno (3,78%) metilheptenona (2,31%) cariofileno (1,13%) y ocimeno (0,73%), presentó a una concentración de 0.002% v/v reducción de la formación de placas en un 98,8% y 97,2%, respectivamente, frente a HSV-1 y HSV-2. Lo que sugiere que componentes diferentes a: (\pm) Linalol, R (-) carvona, S (+) carvona, eugenol, geraniol, nerol, citral (cis, trans), (-) trans-cariofileno, R (+) limoneno, y S (-) limoneno, posiblemente, son los responsables de la actividad del aceite de Lemon Balm.

La actividad anti-herpética de los aceites esenciales de *L. alba*, se encontró en los aceites quimiotipo “carvona”. Los aceites con mayor actividad fueron BC₁ y CA₂. El análisis cromatográfico, mostró la siguiente composición, en los componentes mayoritarios: para el aceite BC₁, carvona (49,4%), limoneno (32%), piperitenona (5,1%), piperitona (2,8%), β -bourboneno (2%), biciclosquifelandreno (1,2%); y para el aceite CA₂, carvona (27,9%), limoneno (37,1%), biciclosquifelandreno (12,3%), β -bourboneno (5,3%), (E)- β -farneseno (1,8%), *trans*-piperitona óxido (1,7%), piperitenona (1,6%) β -cariofileno (1,4%) y α - muuroloeno (1,2%)¹². No identificó actividad anti-herpética para los monoterpenos carvona y limoneno, componentes principales de estos dos aceites. Lo que sugiere que componentes dentro de estos aceites, diferentes a carvona y limoneno, son los responsables de la actividad.

La no actividad antiviral de muchos de los monoterpenos evaluados en este estudio ha sido demostrada por otros autores²⁵. Carvona, β -cariofileno y geraniol no presentaron actividad frente a adenovirus (ADV-II) en estudios realizados por Chiang et al.²⁵; sin embargo, el linalol presentó actividad frente a ADV-II. En este estudio, la actividad anti-herpética del linalol no se pudo evidenciar en células HeLa infectadas con 1DICC₅₀ de HSV-1. La evaluación de la actividad anti-HSV-1 sobre monocapa de células HeLa ha sido demostrada en ensayos de actividad antiviral de polisacáridos²⁶.

Asegurar la evaluación de la citotoxicidad, es, claramente, una parte importante en la evaluación de un potencial agente antiviral, porque debe ser selectivo para un proceso específico del virus y no debe afectar el metabolismo celular. El aceite CA₂ mostró un índice de selectividad de cuatro, el cual se define como: el valor de la concentración del aceite que desprende el 100% de la monocapa celular, dividido, la concentración mínima del aceite que reduce la carga viral de 1 DICC₅₀. Los índices de selectividad para la actividad antiherpética han sido calculados para los extractos de *L. alba* en los estudios realizados por Andrighetti-Frohner et al.⁸ La fracción butanólica mostró actividad contra HSV-1 en cepas 29R resistentes a aciclovir, con índice de selectividad de ocho⁸.

La actividad antiviral de los aceites esenciales sobre el ciclo de replicación viral *in vitro* del virus HSV-1, se ha explorado, entre otros, en los aceites, obtenidos de *Santolina insularis*², *Artemisia arborescens*²⁸, *Mentha piperita*²⁹, *Melaleuca alternifolia*³⁰; sugiriendo que el efecto antiviral es el resultado de la inactivación directa del virus (efecto virucida), más que interferencia con etapas intracelulares del ciclo viral (antiviral); debido a la alteración de la membrana o envoltura viral por interacción con componentes de composición lipofílica de los aceites. Los futuros estudios serán dirigidos a la evaluación de la actividad virucida del aceite CA₂, el cual mostro la máxima actividad antiherpética.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este artículo se derivan del proyecto RC 245-2011 financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología-COLCIENCIAS, Bogotá, Colombia. Gracias al apoyo financiero de la Universidad de Antioquia CODI-UdeA (subvención Mediana Cuantía 2010).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

La conformidad ética no aplica para el presente estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no tienen conflictos de intereses que declarar. Liliana Amparo Betancur Galvis certifica que: El manuscrito representa un trabajo válido, y que ni este manuscrito, ni otro, con un contenido sustancial similar, ha sido publicado bajo mi autoría o está siendo considerado para su publicación en otro lugar. No tiene intereses financieros en relación con este manuscrito. Todo el apoyo material y de financiación para este trabajo está claramente expresado en el manuscrito.

REFERENCIAS

1. Whitley RJ, Roizman B. Herpes Simplex virus infections. *Lancet* 2001; 357: 1513-1518.
2. Brown ZA, Wald A, Morrow RA, Selke S, Zeh J, Corey L. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *JAMA* 2003; 289: 203-209.
3. Gudmundsson KS, Johns BA. Imidazo[1,2-a]pyridines with potent activity against herpesviruses. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 2735-2739.
4. Stranska R, Schuurman R, Nienhuis E, Goedegebuure IW, Polman M, Weel JF et al. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol.* 2005; 32: 7-18.
5. Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ, Van Hoof L. Plant products as potential antiviral agents. *Bull Inst Pasteur* 1986; 84:101-147.
6. Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz-Junior M, Tien OS, Kakinami SH, et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 2002; 73 (1): 69-91.
7. Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA, DeFilipps RA. Medicinal plants of Brazil. 6ta edición. ISBN 0-917256-42-5. USA: Algonac, 2000: p. 501.
8. Andrighetti-Frohner CR, Sincero TCM, Da Silva AC, Savi LA, Gaido CM., Bettiga JMR, et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia* 2005; 76 (3-4): 374-378.
9. Betancur-Galvis LA, Forero JE, Morales G, Roldan FJ. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian

- medicinal plant extracts of the genus *Euphorbia*. Men Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(4): 541-546.
10. Stashenko EE, Jaramillo BE, Martinez 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.
 11. Vlietinck AJ, Van Hoof L, Totté J, Lasure A, Vanden Berghe D, Rwangabo PC, et al. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. J Ethnopharm 1995; 46: 31-47.
 12. Mesa-Arango AC, Montiel J, Betancur-Galvis L, Bueno JG, Baena A, Duran DC, et al. Antifungal activity and chemical composition of the essential oils of *Lippia alba* (Miller) N.E Brown Grown in Different Regions of Colombia. JEOR 2010; 22(6): 568-574.
 13. Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. J Ethnopharmacol 2008; 116(2): 211-222.
 14. Senatore F, Rigano D. Essential oil of two *Lippia* spp (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. Flavour Fragr J 2001; 16: 169-171.
 15. Zoghbi MGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MHL, Maia JGS. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown growing wild in Brazilian Amazon. Flavour Fragr J 1998; 14: 411-414.
 16. Castro DM, Ming LC, Marques MOM. Composicao fitoquimica dos oleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. em diferentes épocas de colheita e partes de ramo. RBPM 2002; 4: 75-79.
 17. Craveiro AA, Alencar JW, Matos FJA, Andrade CHS, Machado MIL. Essential oils from Brazilian Verbenaceae Genus *Lippia*. J Nat Prod 1981; 44: 598-601.
 18. Dellacassa E, Soler E, Menendez P, Moyna P. Essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (Verbenaceae) from Uruguay. Flavour Fragr J 1990; 5: 107-108.
 19. Gomes EC, Ming LC, Moreira EA, Miguel OG, Miguel MD, Kerber VA, et al. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br (Verbenaceae). Rev Bras Farm 1993; 74: 29-32.
 20. Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA, Alencar JW. The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. JEOR 1996a; 8: 695-698.
 21. Matos FJA. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de from Northeast of Brazil—chemical analysis of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae). Parte II—Farmacoquímica. Rev Bras Farm 1996b; 77: 137-41.
 22. Pino JA, Luiz AGO, Peres AR, Jorge MR, Baluja R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. Rev Cubana Farm 1997; 30: 29-35.
 23. Frighetto N, Oliveira JG, Siani AC, Chagas KC. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br (Verbenaceae) as a source of linalool. JEOR 1998; 10: 578-580.
 24. Schnitzler P, Schuhmacher A, Astani A, Reichling J. *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. Phytomedicine 2008; 15: 734-740.
 25. Chiang LC, Ng LT, Cheng PW, Chiang W, Lin CC. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. Clin Exp Pharmacol 2005; 32(10): 811-816.
 26. González ME, Alarcón B, Carrasco L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31(9): 1388-1393.
 27. De Logu A, Loy G, Pellerano ML, Bonsignore L, Schivo ML. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. Antiviral Res 2000; 48: 177-185.
 28. Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, Chisu L, Casu L, Bonsignore L, et al. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in vero cells. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007; 6: 10.
 29. Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. Phytomedicine 2003; 10: 504-510.
 30. Schnitzler P, Schön K, Reichling J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. Pharmazie 2001; 56(4): 343-347.