

## Composición química y actividad biológica de aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus* recolectado en el Norte de Santander, Colombia

### Chemical composition and biological activity of essential oils *Calycolpus moritzianus* collected in the Norte de Santander, Colombia

Xiomara Yáñez-Rueda<sup>1</sup> Liliana Betancur-Galvis<sup>2</sup>, Lee Solbay Agudelo-Gómez<sup>2</sup>, Maria Bibiana Zapata<sup>2</sup>, Julieth Correa-Royero<sup>2</sup>, Ana Cecilia Mesa-Arango<sup>2</sup>, Elena Stashenko<sup>3</sup>

#### RESUMEN

**Introducción:** Actualmente, se están llevando a cabo estudios sobre la actividad biológica de AEs de plantas de la familia Myrtaceae. El objetivo de esta investigación fue la caracterización química y la evaluación de la actividad antimicótica, antitumoral y antiviral de 40 aceites extraídos de plantas de la especie *Calycolpus moritzianus*, comúnmente llamada “arrayán ó cínaró”, recolectadas en varias zonas del Norte de Santander, Colombia. **Materiales y métodos:** la actividad antimicótica se evaluó contra: *Candida krusei*, *C. parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus* y *A. flavus*, siguiendo las técnicas estándar EUCAST y CLSI M38-A, respectivamente, para levaduras y hongos filamentosos. La citotoxicidad se evaluó en las líneas celulares tumorales (HeLa, Jurkat) y no tumorales (Vero) mediante la técnica fotocolorimétrica del MTT. La actividad antiviral *in vitro*, contra el virus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), se realizó mediante la “técnica de titulación del punto final (EPTT)”. **Resultados y Discusión:** los aceites X38 y X39, de muestras recolectadas en los municipios de Chinácota y Salazar, mostraron actividad contra *C. krusei* con valores de concentraciones inhibitorias mínimas de 500 µg/mL. Ninguno de los aceites fue citotóxico en células no tumorales Vero. Los aceites X9 y X10, procedentes de los municipios de Salazar y Pamplonita, fueron los más citotóxicos sobre células HeLa, a concentraciones de 37,8 ± 2,4 y 40,6 ± 2,6 µg/mL, respectivamente. La reducción de la carga viral en los cultivos celulares sólo fue lograda por el aceite X11. La actividad antimicótica y antitumoral de los aceites fue correlacionada con la composición de los componentes mayoritarios, evidenciándose la actividad del Terpinen-4-ol, (-) Limoneno, α-Pineno y Linalol. *Salud UIS* 2009; 41: 259-267

**Palabras clave:** Myrtaceae, *Calycolpus Moritzianus*, citotoxicidad, actividad antimicótica, actividad antiviral, Herpes simplex virus, *Aspergillus* spp, *Candida* spp

1 Grupo Productos Verdes (GPV). Universidad de Pamplona, Campus Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia.

2 Grupo de Investigación Dermatológica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

3 Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

**Correspondencia:** Liliana Betancur-Galvis. Química, MSc, PhD. Grupo de Investigación Dermatológica- Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Carrera 51D # 62-29 Laboratorio 283 B. Teléfono: +4 219 60 64 Fax: +4 219 60 66.

**E-mail:** betancurli@hotmail.com.

**Recibido:** 12 de octubre de 2009 **Aceptado:** 23 de diciembre de 2009

## ABSTRACT

**Background:** Essential oils of plants of the family Myrtaceae have been evaluated for different biological activities. The aim of this research was the chemical characterization and evaluation of antifungal, antiviral and cytotoxic activity of 40 essential oils extracted from *Calycolpus moritzianus*, commonly called “arrayán” or “cínaro”, collected in several areas of Norte de Santander, Colombia. **Materials and Methods:** antifungal activity was determined following the protocols AFST-EUCAST for *Candida krusei* and *C. parasilopsis*, and CLSI-M38A for *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus*. Cytotoxicity was evaluated on tumoral (HeLa and Jurkat), and non tumoral (Vero) cell lines by the MTT photo-colorimetric technique. The *in vitro* antiviral activity against *Herpes simplex* virus HSV-1 was determined by the end-point titration technique (EPTT). **Results and Discussion:** X38 and X39 oils of plants collected in regions of Chinácota and Salazar regions showed activity against *C. krusei* with minimal inhibitory concentration values of 500 µg/mL. None of the oils was cytotoxic in no-tumor (Vero) cells. Oils X9 and X10 of plants from regions of Salazar and Pamplonita were the most cytotoxic on HeLa cells at concentrations of  $37.8 \pm 2.4$  and  $40.6 \pm 2.6$  µg/mL, respectively. The reduction of viral load in cell cultures only was showed by X11 oil. Antifungal and antitumor activity of these oils was correlated with the composition of the major components showing activity for Terpinen-4-ol, (-) Limonene, Linalool and  $\alpha$ -Pinene. *Salud UIS* 2009; 41: 259-267

**Keywords:** Myrtaceae, *Calycolpus Moritzianus*, antifungal, antiviral, cytotoxic, Herpes simplex virus, *Aspergillus* spp, *Candida* spp

## INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AEs) son fuente de una amplia variedad de moléculas bioactivas que podrían ser utilizadas como base para el diseño y la formulación de nuevos medicamentos<sup>1</sup>. La frecuencia de las infecciones fúngicas ha aumentado durante los últimos años y la mayoría son producidas por dermatofitos y especies de *Malassezia*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* y *Candida*. Especies de los dos últimos géneros son los responsables de aproximadamente el 90% de las infecciones, con una alta incidencia en la población inmunocomprometida, siendo una de las causas más importante de morbilidad y mortalidad<sup>2-3</sup>. *C. albicans* es la especie más patógena y frecuente, sin embargo, en los últimos años, otras especies han emergido: *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi* y *C. lusitaniae*<sup>3-4</sup>. Las infecciones causadas por especies del género *Aspergillus* causan morbilidad (superior al 50 %) y mortalidad en individuos inmunocomprometidos<sup>5</sup>. Las especies más implicadas son *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*<sup>5-6</sup>. La cantidad de antimicóticos útiles para el tratamiento aún son limitados y se registran constantemente aislamientos con resistencia a algunos de ellos<sup>3-5</sup>. El virus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), pertenece a la subfamilia alfa-Herpesvirinae y causa infecciones virales comunes en humanos, tales como infecciones herpéticas mucocutáneas, keratitis, encefalitis y herpes neonatal<sup>7</sup>. Como consecuencia de la epidemia del VIH-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<sup>8</sup>.

Los AEs de especies de la familia Myrtaceae se han evaluado para diferentes actividades biológicas, tales como *Eucalyptus globulus* cuyo aceite tiene actividad antibacterial y antimicótica<sup>1</sup>; y el “tea tree oil (TTO)”, proveniente de la especie *Melaleuca alternifolia*, y su componente mayoritario, el Terpinen-4-ol, se les ha demostrado actividad antimicrobiana y antitumoral<sup>9-11</sup>. El AE de *Psidium caudatum*, otra especie de la familia Myrtaceae, que contiene también Terpinen-4-ol<sup>12</sup>, puede llegar a tener el mismo potencial bioactivo que el TTO. En el presente estudio se evaluó *in vitro* la actividad antimicótica, antitumoral y antiviral, como también la caracterización química de cuarenta AEs foliares obtenidos de diferentes quimiotipos de la especie *Psidium caudatum*, syn. *Calycolpus moritzianus*, nombre común “arrayán o cínaro”, recolectadas en varias zonas del departamento del Norte de Santander–Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y extracción de los AEs

Se recolectaron las hojas de la especie *Calycolpus moritzianus*, en los municipios de Chinácota, Ocaña, Pamplonita, Toledo y Salazar, durante los períodos climáticos lluviosos. La clasificación taxonómica la realizó Luis Roberto Sánchez Montaña, MSc,

director del Herbario Regional Catatumbo-Sarare de la Universidad de Pamplona, en Pamplona, Norte de Santander, quien depositó ejemplares de la especie con los siguientes números de colección: 10484 Toledo Junio 18-2007), 10488 Salazar (Junio 21-2007), 11094 Pamplonita (Marzo 4-2008), 11149 Chinácota (Abril 11-2008) y 10328 Ocaña (Mayo 12-2007).

Para el secado de las hojas (HS), 5 Kg de hojas se colocaron por 15 días a la sombra en lugar aireado y seco. La extracción de los aceites se realizó por dos métodos: 1) destilación por arrastre con vapor de agua (AV), y 2) hidrodestilación asistida por radiación de microondas (HDMO) en aparato Clevenger modificado. Cada aceite se recogió en un equipo Dean Stark, se midió en bureta, se separó de la fase acuosa por decantación, se secó con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se almacenó en frasco ámbar a 4°C, hasta su análisis por Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR). Es de anotar que tanto las técnicas de hidrodestilación y arrastre con vapor, son métodos de extracción incapaces de remover del material vegetal moléculas con alto peso molecular como endotoxinas.

### Análisis cromatográfico de los AEs

Se disolvieron 30  $\mu\text{L}$  del AE en 1 mL de diclorometano y se añadieron a la muestra 5  $\mu\text{L}$  de *n*-tetradecano como patrón interno. Para obtener el perfil cromatográfico de cada AE y los índices de Kováts (IK) relativos a los patrones de alcanos  $\text{C}_8\text{-C}_{32}$ , el análisis se realizó en un CGAR HP 6890 Plus con detector FID a 250°C. El flujo de aire y de hidrógeno para el detector FID fue, respectivamente, de 400 y 40 mL/min. Se utilizó una columna capilar no polar HP-5 de 60 m x 250  $\mu\text{m}$ , y de espesor 0,25  $\mu\text{m}$ . Se inyectó 1,0  $\mu\text{L}$ , modo split (70:1, flujo 68,7 mL/min). La temperatura del inyector fue de 250°C. Se utilizó Helio (99,995%, Aga-Fano) como gas de arrastre; con presión de 150 pKa; flujo constante de 1 mL/min y velocidad lineal de 36 cm/seg. La temperatura inicial fue de 50°C por 4 min, luego se aumentó la temperatura 2°C/min hasta 90°C, permaneciendo 3 min. Se continuó la rampa aumentando 4°C/min hasta 166°C, 1°C/min hasta 170°C, luego 2°C/min hasta 186°C, y finalmente 4°C/min hasta 216. El tiempo de corrido fue 65,5 min. Se utilizó como gas auxiliar Nitrógeno, con un flujo de 30 mL/min. Los datos se procesaron con un HP ChemStation 3365-II.

Para los análisis por CGEM, se utilizó un equipo Serie HP 6890, en interfase con un detector selectivo de masas HP5973-Network, conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2005.

La Columna capilar fue HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor). La temperatura de la cámara de ionización y la línea de transferencia fue, respectivamente, de 180 y 280 °C. La energía de la fuente de electrones fue de 70 eV. Los espectros de masas (EM) se obtuvieron por ionización electrónica, barrido automático en el rango de masas *m/z* 50-550 u.m.a., a 2,4 scan/s. Cada EM es comparado con los estándares reportados en la base de datos y con datos reportados en la literatura<sup>12</sup>.

Para la identificación cualitativa y cuantitativa de los componentes se utilizó a) el criterio cromatográfico: IK experimentales comparados con los publicados en la literatura y bases de datos, así como, la comparación de los tiempos de retención de patrones puros de algunos monoterpenos y sesquiterpenos certificados y b) el criterio espectral: interpretación de EM. La composición porcentual de la CG-FID de cada componente se analizó por el método de normalización de áreas por cálculo del factor de respuesta y la cuantificación en ppm con relación al *n*-tetradecano como patrón interno.

### Monoterpenos y sesquiterpenos

Los monoterpenos (+) Limoneno, (-) Limoneno, Linalol,  $\alpha$ -Pino,  $\beta$ - Mirceno, Terpinen-4-ol, 1,8-Cineol (Eucaliptol) y el sesquiterpenos  $\beta$ -Cariofileno, fueron comprados a Sigma (Chemical Company St Louis, MO, USA). Se prepararon soluciones de los monoterpenos y sesquiterpenos en DMSO a 50mg/mL y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

### Actividad antimicótica

La actividad antimicótica fue evaluada mediante la técnica de susceptibilidad antimicótica, propuesta por el comité “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)<sup>13</sup>” para las levaduras y, el “*Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) M38-A*<sup>14</sup>” para hongos filamentosos. Se incluyeron las cepas: *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305. Los AEs se evaluaron a concentraciones comprendidas en el rango 500 a 31,25  $\mu\text{g/mL}$ . Los fármacos itraconazol y anfotericina B (Sigma-Adrich, Co, MO, USA) se emplearon como controles de las técnicas en un rango de concentraciones de 16 a 0,031  $\mu\text{g/mL}$ . Las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) de los AEs, monoterpenos y sesquiterpenos se determinaron por espectrofotometría y correspondieron a las mínimas concentraciones donde se observó inhibición del 50 % del crecimiento respecto al control (100 %). Las CMI de los hongos filamentosos se

determinaron por lectura visual y correspondió a la mínima concentración del aceite que mostró inhibición del 100% con respecto al control (100%).

### Actividad citotóxica

Las células utilizadas fueron: HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humano, HeLa cell line ATCC CRL-1958), Vero (células de riñón de mono verde africano, Vero cell line ATCC CCL-81) y Jurkat (Leucemia de células T ATCC TIB-152). La citotoxicidad se evaluó mediante la técnica fotocolorimétrica del MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro) descrita por Betancur-Galvis y col<sup>15</sup> con algunas modificaciones. Las células se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero bovino fetal (10 %), aminoácidos no esenciales (1 %), L-glutamina 1 %, vitaminas 1%, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL, neomicina 100 µg/mL, Hepes 1M y bicarbonato al 7 %.

Se cultivaron las células HeLa a una densidad de  $1,25 \times 10^5$ /mL y las células Vero a una densidad de  $1,4 \times 10^5$  células/mL, en placas de 96 pozos; y se incubaron durante 24h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en atmosfera húmeda. Luego de la incubación se agregó por cuadruplicado a cada pozo, las respectivas diluciones de los aceites. A las células Jurkat a densidad de  $3 \times 10^5$  células/mL, se les adicionó los aceites, monoterpenos o sesquiterpenos en RPMI-1640 suplementado, a concentraciones, respectivamente, de 200 y 31,6 µg/ml, inmediatamente después de sembradas, teniendo en cuenta que éstas células crecen en suspensión. Las placas cultivadas con las células HeLa, Jurkat y Vero, se incubaron por un periodo adicional de 48h a 37°C y finalmente se realizó lectura espectrofotométrica a 570 nm, para la determinación de la concentración que inhibió el crecimiento o mató el 50 % de las células (IC<sub>50</sub>). Finalmente los platos se incubaron durante 48h a 37°C en atmosfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>. La concentración final de DMSO en pozo fue de 0,05%. Los controles celulares con DMSO a concentración de 0,05 % fueron tenidos en cuenta para todos los bioensayos.

Se calculó el IS de los aceites, monoterpenos y sesquiterpenos (ejemplo,  $IS = IC_{50} \text{ células Vero} / IC_{50} \text{ células HeLa}$ ) y se consideró selectiva la muestra que mostró un  $IS \geq 3$  de acuerdo al criterio utilizado por Prayong y col<sup>16</sup>.

### Ensayo de Reducción del título viral

Se utilizó un aislado del virus *Herpes simplex* tipo 1 (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). El lote viral 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 (DICC<sub>50</sub>)”, correspondiente a la concentración del virus que afecta el 50 % de la monocapa celular, con formación del  $\geq 80$  % de la monocapa; según lo descrito por Betancur-Galvis y col<sup>15</sup>. Luego de cuantificar el virus, éste fue conservado en alícuotas a -196°C, en nitrógeno líquido.

Se determinó la actividad antiviral de los AEs frente a una Dosis Infecciosa de Cultivo Celular Cincuenta (1DICC<sub>50</sub>), de HSV-1, mediante la técnica de titulación del punto final (TTPF) 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<sub>2</sub> al 5%, fueron mantenidas hasta constituir el 80% de la monocapa celular. Luego, suspensiones virales de 1DICC<sub>50</sub> de HSV-1, con el aceite esencial en concentraciones de 500 hasta 12,5 µg/mL, y los monoterpenos en concentraciones desde 100 hasta 12,5 µg/mL, se incubaron, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La mezcla de aceite esencial/suspensión viral, fue adicionada a la monocapa confluyente de células HeLa. Se examinó el efecto citopático, después de 24 horas de incubación en 5 % de atmósfera húmeda a 37°C; 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, que desprende el 100 por ciento de las células en cada dilución (CC<sub>100</sub>), como la concentración mínima de aceite que reduce la carga viral. La actividad fue evaluada determinando el factor de reducción, el cual corresponde al valor obtenido de dividir el título viral en ausencia del aceite, sobre el título obtenido en presencia del aceite<sup>17</sup>. 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 por cuadruplicado. Se utilizó como controles positivos la heparina y el aciclovir. Según los parámetros establecidos por Vlietinck y col<sup>17</sup>, la actividad antiviral relevante o moderada de un producto natural purificado, es aquella cuyo factor de reducción (RF) del título viral es, respectivamente, de  $1 \times 10^3$  o de

1x10<sup>2</sup>. Se determinó, en este estudio, como criterio de actividad moderada y leve, un factor de reducción del título viral, respectivamente, de 1x10<sup>1.5</sup> y 1x10<sup>1</sup>.

### Análisis de datos

Los ensayos de la actividad antimicótica, se realizaron por duplicado en tres momentos diferentes para cada hongo. Los resultados de los valores de las CMI se expresaron como medias geométricas (MG-CMI). Los ensayos de citotoxicidad se realizaron por cuadruplicado y las IC<sub>50</sub> se expresaron como IC<sub>50</sub> ± desviación estándar. Las IC<sub>50</sub> se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal simple con el paquete estadístico R (Development Core Team, Vienna, Austria, 2008). Se aceptaron las regresiones con un coeficiente de correlación múltiple al cuadrado (R<sup>2</sup>) mayor de 0,7, y se realizó un análisis de residuales para asegurar un efecto dosis dependiente.

## RESULTADOS

En el presente estudio, se recolectaron hojas de *Calycolpus moritzianus* de cinco regiones del departamento del Norte de Santander correspondientes a Toledo, Salazar, Pamplonita, Chinácota y Ocaña. Se obtuvieron del material vegetal recolectado, en total cuarenta AEs. La caracterización química se realizó a

los 40 AEs, sin embargo, en la Tabla 1, se registra sólo la composición de los aceites relevantes para la discusión de la actividad biológica. Mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS) se identificaron 26 compuestos (datos no mostrados). En la Tabla 1, se registran los 12 componentes mayoritarios identificados por GC/MS. Los componentes están ordenados según el tiempo de elución en las columnas HP-5MS y DB-WAX, con sus índices de retención y cantidades relativas (%). La composición química de los AEs varió en la concentración relativa de los componentes presentes, pero cualitativamente fue muy constante. El Limoneno y el 1,8-Cineol o Eucaliptol fueron los constituyentes mayoritarios, mostrando rangos de porcentajes de concentración, respectivamente, de 20 – 47 % y 12 – 49,7 %; seguido del Guaiol (2-12 %), α-Pineno (3,9-11,8 %), β-Cariofileno (1,1-9,9 %), α-Selineno (0,5-7,3 %), Terpinen-4-ol (2-6 %). Los aceites con actividad citotóxica, sobre líneas celulares tumorales, presentaron alto contenido de Limoneno (23-29,4 %), Eucaliptol (12,9 – 39,8 %), Guaiol (4,7-12 %), α-Selineno (7 %), β-Cariofileno (5 %), Terpinen-4-ol (5 %) y α-Pineno (4 %). Por otra parte, el aceite con actividad antiviral presentó alto contenido de Eucaliptol (49 %), Limoneno (20 %) y Terpinen-4-ol (5 %); y finalmente, los aceites con actividad antimicótica mostraron un contenido elevado de Limoneno (45-47 %), seguido de Eucaliptol (12-20 %), α-Pineno (7-11 %) y β-Cariofileno (7-9 %).

**Tabla 1.** Composición Química de los aceites esenciales foliares de *Calycolpus moritzianus*

IK <sup>a</sup>	Componente	Concentración relativa %						
		X9	X10	X11	X22	X27	X38	X39
934	α-Pineno	<b>4,13</b>	<b>3,87</b>	3,00	6,16	10,94	<b>11,79</b>	<b>7,27</b>
991	β-Mirceno	0,91	1,04	1,00	1,00	1,03	1,45	1,50
1031	<b>Limoneno</b>	<b>29,35</b>	<b>23,09</b>	<b>20,00</b>	<b>24,28</b>	<b>21,79</b>	<b>45,82</b>	<b>47,09</b>
1033	<b>Eucaliptol</b>	<b>12,93</b>	<b>39,86</b>	<b>49,78</b>	<b>20,22</b>	<b>30,32</b>	<b>20,75</b>	<b>12,86</b>
1091	Linalol	0,43	0,69	0,79	0,20	2,02	0,62	0,40
1194	<b>Terpinen-4-ol</b>	2,30	<b>5,25</b>	<b>5,74</b>	2,20	4,50	1,54	1,10
1386	α-Copaeno	0,25	0,92	0,90	1,07	1,09	1,19	1,92
1432	<b>β-Cariofileno</b>	1,10	<b>5,17</b>	<b>3,51</b>	8,95	4,00	<b>7,16</b>	<b>9,87</b>
1498	<b>α-Selineno</b>	<b>7,24</b>	0,63	0,50	0,90	1,17	0,90	1,63
1568	Oxido de cariofileno	1,48	0,50	1,00	3,43	1,70	0,93	1,00
1610	<b>Guaiol</b>	<b>12,30</b>	<b>4,70</b>	<b>3,50</b>	5,00	2,64	<b>2,00</b>	<b>4,07</b>
1626	γ-Eudesmol	3,00	0,51	2,00	1,00	1,00	1,00	1,30
<b>Tipo de actividad</b>		Citotóxica	Citotóxica	Antiviral	-	-	Antimicótica	Antimicótica
<b>Sitio de recolección</b>		Salazar	Pamplonita	Pamplonita	Pamplonita	Toledo	Chinácota	Salazar

<sup>a</sup>Índice de Kóvats calculado experimentalmente en columna HP-5

El efecto citotóxico de los AEs de *C. moritzianus* y sus componentes mayoritarios se evaluó sobre las líneas tumorales HeLa y Jurkat, y la línea no tumoral inmortalizada Vero, según los criterios del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, el cual considera citotóxico un extracto vegetal con valor de  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ <sup>18</sup>. En la Tabla 2, se presentan los valores de  $IC_{50}$ , desviación estándar, R cuadrado ajustado ( $R^2$ ) e índice de selectividad (IS) de los AEs y componentes mayoritarios sobre células HeLa, Jurkat y Vero, obtenidas por la técnica del MTT y por análisis de regresión lineal, de los aceites que presentaron mayor actividad citotóxica sobre células tumorales. Las concentraciones evaluadas en células Vero fueron más altas que las evaluadas en células tumorales, con el fin de encontrar un producto citotóxico a concentraciones bajas en células tumorales y poco citotóxico a concentraciones altas en células no tumorales. Según Prayong y col<sup>16</sup>, consideran citotoxicidad selectiva, el principio activo o componente que muestra un  $IS \geq 3$ . Los aceites X9 y X10, provenientes de los municipios de Salazar y Pamplonita, fueron los más citotóxicos sobre células HeLa, a concentraciones, respectivamente, de  $37,8 \pm$

$2,4$  y  $40,6 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ . Ambos aceites, mostraron un efecto de dosis dependiente, con valores de coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) de 0,96. Sin embargo, el aceite con mayor índice de selectividad, IS de 3,1, fue el aceite X10. En células Jurkat ninguno de los aceites evaluados mostraron actividad ( $IS \geq 3$ ). La mayoría de los aceites no presentó citotoxicidad sobre las células Vero. El aceite X11, inactivo, fue obtenido del mismo material vegetal que el aceite X10 pero el método de extracción fue diferente. En el aceite X11, la extracción por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (HDMO) aumentó la concentración de Eucaliptol y disminuyó la concentración de Limoneno y Guaiol. Con el fin de correlacionar la actividad de los aceites, con la presencia y porcentaje de los componentes mayoritarios, se evaluó la actividad citotóxica de ocho componentes mayoritarios (Tabla 2). Los componentes que mostraron mayor actividad fue el (-) Limoneno sobre células HeLa, y el Linalol sobre células Jurkat, mostrando valores de  $IC_{50}$  e IS, respectivamente de,  $22,1 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$  ( $IS = 6,97$ ) y  $19,8 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$  ( $IS \geq 10,1$ ). Ambos monoterpenos, mostraron un efecto de dosis dependiente, con valores de coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) de 0,9.

**Tabla 2.**  $IC_{50}$ , desviación estándar, índice de selectividad y R cuadrado ajustado ( $R^2$ ) de aceites esenciales con células Vero, Jurkat y HeLa.

Cod. IYC	Código	Actividad citotóxica								Actividad antimicótica
		Vero $IC_{50}^a \pm DS^b$	$R^{2c}$	Jurkat $IC_{50} \pm DS$	$R^2$	IS <sup>d</sup> Jurkat	HeLa $IC_{50} \pm DS$	$R^2$	IS HeLa	<i>C. krusei</i> MG-CMI <sup>f</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
X9	A09 Salazar AV-HF	$72,3 \pm 16,9$	0,73	$71 \pm 10,1$	0,9	1,0	<b><math>37,8 \pm 2,4</math></b>	0,96	1,9	>500
X10	A10 Pamplonita AV-HS	$126 \pm 12,7$	0,91	$62,7 \pm 8,2$	0,92	2,0	<b><math>40,6 \pm 2,6</math></b>	0,96	<b>3,1</b>	>500
X11	A11 Pamplonita HDMO-HF	$129,3 \pm 17,7$	0,88	$\geq 200$	-	-	$198,8 \pm 39,2$	0,74	-	>500
X22	A22 Pamplonita AV-HF	$\geq 200$	- <sup>e</sup>	$\geq 200$	-	-	$154,1 \pm 23,5$	0,81	-	>500
X27	A27 Toledo AV-HF	$\geq 200$	-	$\geq 200$	-	-	$134,4 \pm 13,7$	0,91	-	>500
X38	A 03 Chinácota AV-HS	$\geq 200$	-	$\geq 200$	-	-	$\geq 200$	-	-	<b>500</b>
X39	A 04 Salazar AV-HS	$\geq 200$	-	$\geq 200$	-	-	$\geq 200$	-	-	<b>500</b>
	$\alpha$ -Pino	$86,8 \pm 19,7$	0,76	$\geq 31,6$	-	-	$\geq 31,6$	-	-	<b>500</b>
	1,8-Cineol	$\geq 200$	-	$\geq 31,6$	-	-	$\geq 31,6$	-	-	>500
	Linalol	$\geq 200$	-	$19,8 \pm 2,8$	0,9	$\geq 10,1$	$\geq 31,6$	-	-	>500
	Terpineol -4-ol	$\geq 200$	-	$\geq 31,6$	-	-	$\geq 31,6$	-	-	<b>500</b>
	$\beta$ -cariofileno	$\geq 200$	-	$\geq 31,6$	-	-	$\geq 31,6$	-	-	>500
	(-) Limoneno	$154,1 \pm 14,4$	0,93	$\geq 31,6$	-	-	$22,1 \pm 1,2$	0,98	6,97	>500
	(+) Limoneno	$\geq 200$	-	$\geq 31,6$	-	-	$\geq 31,6$	-	-	>500
ITZ	$\beta$ -Mirreno	$\geq 200$	-	$\geq 31,6$	-	-	$\geq 31,6$	-	-	>500
	Itraconazol									0,125

<sup>a</sup> Concentración que inhibe el crecimiento o elimina el 50% de las células, <sup>b</sup> Desviación estándar, <sup>c</sup> Coeficiente de correlación múltiple al cuadrado, <sup>d</sup> Índice de selectividad, <sup>e</sup> No determinado, <sup>f</sup> Medida geométrica de la concentración mínima inhibitoria, Los aceites evaluados no mostraron actividad antifúngica contra *Aspergillus* spp.

La evaluación de la actividad antimicótica de los aceites más activos, en la cepa que fue más susceptible a la acción antimicótica del aceite, es mostrada en la Tabla 2. Los aceites evaluados no mostraron actividad antifúngica contra *Aspergillus* spp. ni contra *C. parapsilosis* (datos no mostrados). Los aceites X38 y X39 inhibieron el crecimiento de la cepa *C. krusei* con valores de CMI de 500 µg/mL (Tabla 2). Los dos aceites mostraron altas concentraciones de Limoneno. Con el fin de correlacionar la actividad de los aceites con la presencia y porcentaje de los componentes mayoritarios, se evaluó la actividad anti- *C. krusei* de ocho componentes mayoritarios (Tabla 2). El  $\alpha$ -Pino y el Terpinen-4-ol inhibieron el crecimiento de la cepa *C. krusei* con valores de CMI de 500 µg/mL.

En la evaluación de la actividad antiviral, los aceites se retaron con IDCC<sub>50</sub> del virus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), sobre células HeLa durante 24 h a partir de 500 µg/mL. Los aceites evaluados, no mostraron actividad antiviral a las concentraciones evaluadas, según los parámetros de actividad establecidos por Vlietinck y col<sup>17</sup>. Sin embargo, el aceite X11 presentó una muy leve actividad antiherpética a partir de 250 µg/mL. Los monoterpenos y sesquiterpenos tampoco mostraron actividad anti-herpética.

## DISCUSIÓN

Los AEs de importancia comercial como el eucalipto y el “*Tea Tree Oil* (TTO) son obtenidos de plantas de la familia Myrtaceae. De la destilación de las hojas de la mirtácea australiana *M. alternifolia* (TTO) se obtiene un fitofármaco, con alto contenido de Terpinen-4-ol y 1,8-cineol o Eucaliptol, para el tratamiento de infecciones en la piel causadas por especies del género *Candida* y *Malassezia*, y en las onicomicosis causadas por dermatofitos<sup>19-22</sup>. En Colombia se ha identificado la mirtácea *Psidium caudatum*, sinónimo *Calycolpus moritzianus*, (“arrayán” ó “cínaro”), la cual posee un aceite foliar con alto contenido de Terpinen-4-ol (47,72 %) <sup>12</sup>, principio activo reconocido por su variada actividad biológica<sup>9-11</sup>. Recientes estudios de Castañeda y col<sup>23</sup> en diferentes zonas de Colombia y, de Díaz y col<sup>24</sup> en Mérida (Venezuela) muestran la existencia de otros quimiotipos de *C. moritzianus*. En el primer caso, se concluye que el AE contiene principalmente 1,8-Cineol o Eucaliptol (20%),  $\beta$ -cariofileno (8%),  $\gamma$ -Eudesmol (7%),  $\alpha$ -Terpineol (6%) y Guaiol+Viridiflorol (5%), y en el segundo caso, se encontró que el componente mayoritario es  $\beta$ -cariofileno (21%). La presente investigación, realizó la caracterización química de AEs obtenidos de plantas de *Calycolpus moritzianus* provenientes de cinco regiones

del Departamento del Norte de Santander, seleccionadas con base en la Cartografía de la Corporación Autónoma Regional de Norte de Santander (CORPONOR). Según el análisis cromatográfico GC/MS de los aceites obtenidos, los componentes mayoritarios, con los rangos de porcentaje de composición, fueron: Limoneno (21-37 %), Eucaliptol (12-47 %), Guaiol (2,5-12 %),  $\beta$ -Cariofileno (4-9 %),  $\alpha$ -Selineno (0,6-7,3 %) y Terpinen-4-ol (2-6 %). Dado que la química de los AEs puede cambiar debido a la existencia de quimiotipos, individuos de una misma especie morfológicamente idénticos pero diferentes en la composición química de sus aceites, en este estudio, se correlacionó la composición química del aceite con la actividad biológica, con el fin de darle un valor agregado a la especie *Calycolpus moritzianus* del Norte de Santander.

Entre los AEs de especies de la familia mirtácea con actividad citotóxica se encuentra el aceite de *Melaleuca alternifolia*, el cual inhibe el crecimiento de células de melanoma (M14 WT) a una concentración de 0,03 % V/V<sup>11</sup>. El efecto citotóxico del aceite fue mucho más evidente en células de melanoma resistentes a adriamicina (M14 ADR), donde la inhibición del 50 % del crecimiento se dio a las 48h, a la concentración de 0,03 % v/v<sup>11</sup>. La composición porcentual de los componentes mayoritarios del aceite correspondió a: Terpinen-4-ol (42,35%),  $\gamma$ -Terpineno (20,65%),  $\alpha$ -Terpineno (9,76%), Terpinoleno (3,71%), 1,8 Cineol (3,57%) y  $\alpha$ -Terpineol (3,09%). El Terpinen-4-ol, componente principal, al igual que el aceite, produjo inhibición del crecimiento celular, cambios morfológicos, fragmentación del DNA y apoptosis en células M14 ADR a una concentración de 0,01 % V/V<sup>11</sup>.

En este estudio el AE de la especie *Calycolpus moritzianus* de composición: Limoneno (23,09%), Eucaliptol (39,86%), Guaiol (4,7%),  $\beta$ -Cariofileno (5,17%), Terpinen-4-ol (5,25%) y  $\alpha$ -Pino (3,87%), inhibió el crecimiento de células HeLa, mostrando un IS de 3,1. Al evaluar la contribución que tenían los componentes mayoritarios en la actividad citotóxica mostrada por el aceite, se pudo comprobar la actividad del monoterpeno (-) Limoneno, el cual mostró valores de IC<sub>50</sub> de 22,1 ± 1,2 y IS de 6,9 sobre células HeLa. En células Jurkat, el monoterpeno que mostró la más alta citotoxicidad fue el Linalol, con valores de IC<sub>50</sub> de 19,8 ± 2,8 µg/mL (IS ≥10). La actividad citotóxica del limoneno ha sido reportada por varios autores<sup>25-27</sup>. Vigushin y col, -evaluaron la actividad citotóxica, por 48h, utilizando la técnica del MTT, del (-) Limoneno sobre células de cáncer de próstata (DU-

145) y células no tumorales epiteliales de próstata (PZ-HPV-7), mostrando, respectivamente, valores de  $IC_{50}$  de 2,8 mM y 9,4 mM<sup>25</sup>. Estudios clínicos en fase II/I, se están llevando a cabo para demostrar el potencial antitumoral que tiene el (-) Limoneno<sup>26,28</sup>. Igualmente, para el Linalol la actividad citotóxica hacia líneas tumorales ha sido comprobada por otros investigadores. Loizzo y col, evaluaron la actividad citotóxica del Linalol sobre las líneas tumorales de adenocarcinoma de colon y melanoma, ACHN y C32, encontrando valores de  $IC_{50}$ , respectivamente, de 23,16 y 23,77  $\mu\text{g/mL}$ <sup>27</sup>. En el presente estudio se evidenció la actividad citotóxica de los aceites *C. moritzianus*, sin embargo la actividad fue menor que la encontrada por sus componentes mayoritarios.

Actualmente, no existe un consenso sobre los métodos de elección para la evaluación de la actividad antimicótica *in vitro* en productos naturales, ni sobre los valores de CMI para definir actividad en un producto natural. Aligiannis y col, sugirieron una clasificación para material vegetal basado en los resultados de la CMI, mencionando como: fuerte inhibidor (aquellos con CMI hasta 500  $\mu\text{g/mL}$ ), moderado inhibidor (CMI entre 0,6 y 1,5  $\text{mg/mL}$ ) y débil inhibidor (CMI por encima de 1,6  $\text{mg/mL}$ )<sup>29</sup>. Partiendo de lo anterior, tenemos que los AEs X38 y X39, mostraron actividad contra *C. krusei* (500  $\mu\text{g/mL}$ ). Con el fin de identificar cual de los componentes mayoritarios del aceite estaba contribuyendo a la actividad antimicótica, se evaluaron ocho componentes mayoritarios. Los monoterpenos  $\alpha$ -Pino y Terpinen-4-ol, fueron los únicos componentes que mostraron actividad contra *C. krusei*. La actividad antimicótica contra *Candida* spp. de AEs de especies de la familia Myrtaceae ha sido reportada por varios investigadores. Mondello y col, evaluaron la actividad anti-*Candida* del aceite de *Melaleuca alternifolia*; la composición porcentual de los componentes mayoritarios del aceite correspondió a: Terpinen-4-ol (42,35%),  $\gamma$ -Terpineno (20,65%),  $\alpha$ -Terpineno (9,76%), Terpinoleno (3,71%), 1,8 Cineol (3,57%) y  $\alpha$ -Terpineol (3,09%). Mondello y col, utilizando la técnica de susceptibilidad antimicótica del “Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) M27-A” y la misma cepa de *C. krusei* ATCC 6258, encontraron que tanto el aceite de *M. alternifolia* como su componente mayoritario el Terpinen-4-ol, presentaron actividad contra *C. krusei* con valores de CMI, respectivamente, de 0,25 y 0,03% v/v<sup>10</sup>. En el presente estudio encontramos los mismos valores de CMI contra *C. krusei* para el aceite de *C. moritzianus* y para el Terpinen-4-ol, además, se evidenció la actividad anti- *C. krusei* del  $\alpha$ -Pino. Según

los resultados obtenidos, se podría pensar en un sinergismo, que está potenciando la actividad anti- *C. krusei*, entre los monoterpenos 1,8-Cineol o Eucaliptol, Limoneno,  $\alpha$ -Pino, Terpinen-4-ol y  $\alpha$ -Terpineol con los sesquiterpenos Guaiol, trans- $\beta$ -Cariofileno, y el  $\gamma$ -Eudesmol, puesto que el Terpinen-4-ol, que no se encontró en alta concentración (5,25 %), tuvo un valor de CMI similar al del aceite. Los próximos estudios estarán encaminados a evaluar el sinergismo entre los componentes mayoritarios. Encontrar actividad contra *C. krusei* es importante porque a pesar que no es la especie más prevalente, en los últimos años, se ha registrado un incremento notable en esta especie resistente a Fluconazol e Itraconazol, medicamento de elección para el tratamiento de infecciones por *Candida* spp, donde los valores de CMI determinados por Mondello y col, fueron, respectivamente, de 32  $\text{mg/L}$  y 0,25  $\text{mg/L}$ <sup>10</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este artículo se derivan de los proyectos RC 226-2006 y RC 432-2004 financiados por el Instituto colombiano para el desarrollo de la ciencia y la tecnología-COLCIENCIAS, Bogotá, Colombia.

## CONFLICTOS DE INTERES

Los autores no tienen conflictos de intereses que declarar.

## REFERENCIAS

1. Mesa-Arango AC, Bueno-Sánchez JG, Betancur-Galvis LA. Productos naturales con actividad antimicótica. Rev Esp Quimioterap 2004; 17: 325-31.
2. García-Ruiz JC, Amutio E, Pontón J. Invasive fungal infection in immunocompromised patients. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 55-62.
3. Groll AH, Tragiannidis A. Recent advances in antifungal prevention and treatment. Semin Hematol 2009; 46: 212-229.
4. Lai CC, Tan CK, Huang YT, Shao PL, Hsueh PR. Current challenges in the management of invasive fungal infections. J Infect Chemother 2008; 14: 77-85.
5. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 44-69.
6. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310-350.
7. Whitley RJ, Roizman B. Herpes Simplex virus infections. Lancet 2001; 357:1513-1518.

8. Stranska R, Schuurman R, Nienhuis E, Goedegebuure IW, Polman M, Weel JF, Wertheim-Van Dillen PM, Berkhout RJM, Van Loon AM. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol* 2005; 32: 7–18.
9. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. Determining de antimicrobial actions of Tea Tree Oil. *Molecules* 2001; 6: 87-91.
10. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 158.
11. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 349-360.
12. Yáñez X, Pinzón ML, Solano F, Sánchez LR. Chemical composition of the Essential Oil of *Psidium caudatum* Mc Vaugh. *Molecules* 2002; 7: 712-716.
13. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH, Richardson MD, Sancak B, Verweij PE, Rodríguez-Tudela JL. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 467-474.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. Document M38-A. Wayne, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
15. Betancur-Galvis LA, Morales GE, Forero JE, Roldan J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 541-546.
16. Prayong P, Barusrux S, Weerapreeyakul N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia* 2008; 79: 598–601
17. Vlietinck AJ, Van Hoof L, Totté J, Lasure A, Vanden Berghe D, Rwangabo PC, Mvukiyumwami J. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *J Ethnopharm.*1995; 46: 31-47.
18. Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 211-222.
19. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida sp.* *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 591-595.
20. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and *M. alternifolia* (tea tree) oil against *Malassezia* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 467-469.
21. Syed TA, Qureshi ZA, Ali SM, Ahmad S, Ahmad SA. Treatment of toenail onychomycosis with 2% butenafine and 5% *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in cream. *Trop Med Int Health* 1999; 4: 284-287.
22. Vásquez J, Arganoza M, Boikov D, Vaishampayan J, Akins R. In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* oil. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 60-63.
23. Castañeda ML, Muñoz A, Martínez JR, Stashenko EE. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Sci Téc* 2007; 33: 165-166.
24. Díaz T, Mora FD, Velasco J, Díaz T, Rojas LB, Usubillaga A, Carmona J. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Calycolpus moritzianus* from Mérida, Venezuela. *Nat Prod Com* 2008; 3: 937-940.
25. Vigushin DM, Poon GK, Boddy A, English J, Halbert GW, Pagonis C, Jarman M, Coombes RC. Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 42: 111-117.
26. McNamee D. *d*-Limonene trial in cancer. *Lancet* 1993; 342: 801-805.
27. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Prolif* 2008; 41: 1002-1012.
28. Rabi T, Bishayee A. *d* -Limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *J Carcinog* 2009; 8: 9.
29. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4168-4170.