

Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. y componentes mayoritarios

Cytotoxic activity of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K and its major constituents

Bibiana Zapata¹, Camilo Durán², Elena Stashenko², Julieth Correa-Royero¹,
Liliana Betancur-Galvis¹

RESUMEN

Introducción: *Lippia organoides* H.B.K. (Verbenacea), es una planta aromática conocida comúnmente como “orégano”. Los aceites esenciales de 8 muestras de *L. organoides* y algunos de sus componentes mayoritarios fueron evaluados *in vitro* sobre la línea tumoral HeLa y la línea no tumoral Vero para identificar su potencial citotóxico. **Materiales y métodos:** la concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀) se determinó mediante la técnica fotocolorimétrica del MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio) y los valores de IC₅₀ se obtuvieron por análisis estadístico mediante regresión lineal simple. El índice de selectividad (IS), definido como la IC₅₀ en células Vero sobre IC₅₀ en células HeLa, fue calculado con el fin de encontrar aceites o componentes con potencial citotóxico selectivo hacia líneas celulares tumorales. **Resultados y conclusiones:** se determinó por cromatografía de gases y espectrometría de masas GC/MS la composición química de los aceites más citotóxicos. El aceite de *L. organoides* que presentó la mayor actividad citotóxica sobre células HeLa con un valor de IC₅₀ de 9,1 ± 1 µg/mL e índice de selectividad de 7,1, fue identificado como quimiotipo trans-β-cariofileno/*p*-cimeno. Los componentes mayoritarios del aceite quimiotipo trans-β-cariofileno/*p*-cimeno fueron: trans-β-cariofileno (11,3%), *p*-cimeno (11,2%), α-felandreno (9,9%), limoneno (7,2%), 1,8-cineol (6,5%) y α-humuleno (6,0%). Los componentes mayoritarios evaluados no mostraron actividad citotóxica relevante sobre células HeLa, sólo el limoneno y β-mirceno presentaron valores de IS, respectivamente, de 6,97 y 3,01. Sin embargo, los valores de IC₅₀ fueron más altos que el del aceite activo. Estos resultados sugieren que la actividad citotóxica de los aceites no se debe sólo a sus componentes mayoritarios, sino a un sinergismo entre sus componentes. *Salud UIS* 2009; 41: 215-222

Palabras clave: Citotoxicidad, Vero, HeLa, *Lippia organoides*, aceites esenciales, quimiotipos

1. Grupo de Investigación Dermatológica- Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia.

2. 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, Colombia. Carrera 51D # 62-29 Laboratorio 283 B. Teléfono: +4 219 60 64 Fax: +4 219 60 66. E-mail: betancurli@hotmail.com.

Recibido: 1 de octubre de 2009 - **Aceptado:** 20 de diciembre de 2009

ABSTRACT

Introduction: *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae) is an aromatic plant commonly called as “oregano”. Eight essential oils of *L. origanoides* and some of their main components were evaluated *in vitro* on tumor cell line HeLa and non-tumor cell line Vero to identify tumoural cytotoxic potential. **Materials and methods:** Inhibition 50% of cell population (IC₅₀) was determined using the photo-colorimeter technique MTT (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolium bromide). IC₅₀ values were obtained by linear regression analysis. The selectivity index (SI), defined as Vero IC₅₀ on HeLa IC₅₀, it was calculated in order to find oil or major components with selective tumor cytotoxic potential. **Results and conclusions:** the chemical composition of the oil most cytotoxic was determined by gas chromatography and mass spectrometry GC/MS. The *L. origanoides* oil identified as chemotype *trans*- β -caryophyllene/*p*-cymene showed the highest cytotoxic activity on HeLa cells with IC₅₀ value of $9.1 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ and selectivity index of 7.1. The main components were: *trans*- β -caryophyllene (11.3%), *p*-cymene (11.2%), α -phellandrene (9.9%), limonene (7.2%), 1,8-cineol (6.5%) and α -humulene (6.0%). The most of the major components did not show cytotoxic activity on HeLa cells, only limonene and β -myrcene showed IS values of 6.97 and 3.01, respectively. However, the IC₅₀ values were higher than active oil. These results suggest that cytotoxic activities of the oils are not only due to their main components, but to a synergism among its components. *Salud UIS* 2009; 41: 215-222

Keywords: Cytotoxicity, Vero, HeLa, *Lippia origanoides*, essential oil, chemotype

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales constituyen una fuente de sustancias con gran actividad biológica, a partir de los cuales se ha obtenido aproximadamente el 60% de los medicamentos antineoplásicos¹. Entre estos se encuentran el taxol aislado de la planta *Taxus brevifolia*, empleado en el tratamiento de cáncer de seno, de ovario y de pulmón; el etopósido derivado semisintético de la epidofilotoxina utilizado en el tratamiento de linfomas, cáncer bronquial y testicular; y la camptotecina proveniente del árbol *Camptotheca acuminata* que es usada en el tratamiento de tumores sólidos². En los últimos años, algunos aceites esenciales y sus componentes mayoritarios han sido reportados con actividad citotóxica en células tumorales³⁻⁵. El aceite esencial de *Cymbopogon flexuosus* y su principal componente, el isointermedeol, inhiben la proliferación de células de leucemia promielocítica (HL-60), después de 48h de tratamiento, a una concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀), respectivamente, de 30 y 20 $\mu\text{g/mL}$ ³. El eugenol, un componente del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*, es citotóxico sobre células de leucemia promielocítica humana (HL-60) a una concentración de 23,7 μM ⁴. El citral, uno de los componentes principales del “pasto de limón”, mostró actividad citotóxica sobre células de linfoma de monocitos (U937), células de leucemia promielocítica humana (HL-60), células de hepatoma de ratón (RL-12) y células de leucemia de ratón (BS-24-1)⁵.

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae), es una planta aromática conocida comúnmente como “oregano”. Las variaciones en las cantidades de los componentes mayoritarios de aceites esenciales de diferentes muestras de *L. origanoides*, tales como, carvacrol, timol, *trans*- β -cariofileno, *p*-cimeno, β -mirreno, α -humuleno y γ -terpineno⁶⁻⁷, ha conducido a clasificar los según su composición química en quimiotipos⁶. En cuanto a la actividad biológica, las hojas y flores de esta planta se usan en infusión para tratar afecciones respiratorias e intestinales^{6,8}. En Colombia, el uso medicinal de infusiones de hojas y flores de otra especie de “oregano”, *Origanum vulgare*, está aprobado por el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) como antiinflamatorio⁹. Los aceites esenciales de *L. origanoides* son hasta ahora sólo reportados en la literatura con propiedades antimicóticas y antibacterianas⁶⁻⁷. Además, estudios de actividad citotóxica *in vitro*, con el fin de identificarlos como posibles agentes antitumorales, no han sido publicados.

En el presente estudio se evaluó el efecto citotóxico de aceites esenciales de ocho muestras de *L. origanoides* y algunos de sus componentes mayoritarios, sobre la línea tumoral HeLa (células de adenocarcinoma de cérvix humano). Además, se evaluó la citotoxicidad en células no-tumorales, Vero (células de riñón de mono verde africano), con el fin de determinar el índice de selectividad (IS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de aceites esenciales (AEs)

El material vegetal empleado 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 (MWH) ¹⁰. La extracción se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean Stark* 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 30 minutos.

Análisis cromatográfico del aceite esencial

El análisis cromatográfico de los aceites, fue realizado en el Laboratorio de cromatografía, Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, Centro de Investigación CENIVAM. Éste se describe de manera breve en Stashenko y col (2004) ¹⁰. 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, 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. La temperatura del horno se programó desde 45°C, (5 min) hasta 150°C (2 min) a razón 4°C/min luego se incrementó hasta 250°C (5 min) a razón de 5°C/min. Finalmente, la temperatura aumentó a razón de 10°C/min hasta alcanzar 275°C (15 min). Cada extracción tuvo una duración de (30 min). Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285 °C, respectivamente.

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.

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 en el extracto fue de 3040 ppm.

Monoterpenos

Los monoterpenos: timol, (+) limoneno, (-) limoneno, 1,8-cineol, α-pineno, trans-β-cariofileno, p-cimeno, carvacrol, timol, β- mirceno, α-terpineno, γ-terpineno, terpinen-4- ol fueron comprados a Sigma (Chemical Company St Louis, MO, USA). Se prepararon soluciones de los monoterpenos en DMSO a 50 mg/mL y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Actividad citotóxica

La citotoxicidad se evaluó en células de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa ATCC CCL-2) y células de riñón de mono verde africano (Vero ATCC CCL-81) mediante la técnica fotocolorimétrica del MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio) (Sigma, New Jersey, USA) descrita por Betancur-Galvis y col (2002) ¹¹ con algunas modificaciones. Se cultivaron las células HeLa y Vero a una densidad, respectivamente, de 1,25 x 10⁵ y 1,4x10⁵ células/mL en placas de 96 pozos; y

se incubaron durante 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron 100 µL de cuatro concentraciones entre 25 y 200 µg/mL, por cuadruplicado. Las placas se incubaron por un periodo adicional de 48 horas a 37°C y finalmente se realizó lectura espectrofotométrica a 570 nm, para la determinación de la concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀). Los valores de IC₅₀ para cada aceite y extracto se obtuvieron por análisis de regresión lineal simple

de curvas dosis-respuesta generada con los datos de absorbancia y empleando el paquete estadístico R (Development Core Team, Vienna, Austria, 2008). Los valores de IC₅₀ se expresaron como la media ± desviación estándar (M ± DS). Se calculó el IS de los aceites y monoterpenos (IS = IC₅₀ células Vero/IC₅₀ células HeLa) y se consideró selectiva la muestra que mostró un IS ≥ 3 de acuerdo al criterio utilizado por Prayong y col (2008)¹².

Tabla 1. Código de la planta, número de voucher, lugar de recolección y quimiotipo de las plantas de *Lippia origanoides*.

Planta	Código	Número de Voucher	Lugar de recolección	Quimiotipo
<i>L. origanoides</i>	1A	512271	Santander, Jordán Sube	Carvacrol
<i>L. origanoides</i>	3C	520285	Nariño, Pedregal	Timol
<i>L. origanoides</i>	4D	516294	Santander, Los Santos	trans-β-Cariofileno/p-cimeno
<i>L. origanoides</i>	5E	516290	Santander, Piedecuesta	Carvacrol
<i>L. origanoides</i>	6F ^a	517741	Boyacá, Soatá	Timol
<i>L. origanoides</i>	7G	517741	Boyacá, Soatá	Timol
<i>L. origanoides</i>	8H	512087	Cauca, Mercaderes	Timol
<i>L. origanoides</i>	9I	512075	Santander, Bucaramanga	Carvacrol

^a La extracción del aceite se realizó por un periodo de 15 min

RESULTADOS

El análisis cromatográfico de los aceites identificó tres quimiotipos: trans-β-cariofileno/p-cimeno, timol y carvacrol. La composición química de los quimiotipos evaluados en este estudio ha sido reportada por Stashenko y col (2008)¹³. En la Tabla 1 se presenta los códigos de los aceites, número de voucher, lugar de recolección y quimiotipo de las plantas de *Lippia origanoides*.

El presente estudio evaluó el efecto citotóxico de ocho aceites esenciales de *L. origanoides* y sus componentes mayoritarios, sobre la línea tumoral HeLa y la línea no-tumoral Vero, según los criterios del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, el cual considera citotóxico un extracto vegetal con valor de IC₅₀ < 30 µg/mL¹⁴. En la Tabla 2 se muestra los valores de IC₅₀ obtenidos para los aceites de *L. origanoides* y, trece mono-terpenos que hacen parte de los componentes mayoritarios y minoritarios

de los diferentes quimiotipos. Los aceites de *L. origanoides* 1A, 3C, 8H y 9H no fueron citotóxicos, en ambas líneas celulares, mostrando valores de IC₅₀ mayores de 50 µg/mL. Estos aceites correspondieron a los quimiotipos timol y carvacrol. Los aceites 6F y 7G son aceites obtenidos de la misma planta, con la diferencia en su tiempo de extracción. Como se puede observar en la Tabla 2, los valores de IC₅₀ de los aceites 6F y 7G son muy similares, siendo más citotóxicos sobre la línea celular HeLa que en la línea no-tumoral Vero. Ambos aceites, quimiotipo timol, mostraron un efecto de dosis dependiente, con valores de coeficiente de regresión lineal (R²) de 0,7. El aceite 5E fue mas citotóxico en la línea no-tumoral que en las células HeLa. Finalmente, el aceite que mostró mayor actividad citotóxica fue el aceite 4D, con un valor de IC₅₀ de 9,1 ± 1 µg/mL y un índice de selectividad de 7,1. Además, el valor de R², tanto para la citotoxicidad en células HeLa como en Vero, fueron lo más altos entre los aceites evaluados.

Tabla 2. Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀)^a en µg/mL de aceites esenciales de *L. origanoides* y algunos componentes, determinado por la técnica de MTT.

Nombre Aceite Esencial / Terpeno	Actividad Citotóxica				IS ^c
	Células HeLa ATCC CCL-2		Células Vero		
	IC ₅₀ ^a ± DS	R ₂ ^b	IC ₅₀ ± DS ^a	R ₂ ^b	
<i>L. origanoides</i> (1A)	106,7 ± 9	0,95	52,3 ± 11,5	0,8	0,49
<i>L. origanoides</i> (8H)	≥ 200	NE ^d	116,6 ± 6,1	0,98	°---
<i>L. origanoides</i> (9I)	≥ 200	NE	74,6 ± 16,9	0,75	---
<i>L. origanoides</i> Kunth (5E)	68,4 ± 10,2	0,8	29,3 ± 4,8	0,79	0,42
<i>L. origanoides</i> Kunth (4D)	9,1 ± 1	0,95	64,4 ± 7,8	0,93	7,07
<i>L. origanoides</i> Kunth (3C)	≥ 200	NE	130,1 ± 16,5	0,86	---
<i>L. origanoides</i> (6F)	17,2 ± 5,3	0,99	34,3 ± 6,5	0,71	1,9
<i>L. origanoides</i> (7G)	15,3 ± 1,5	0,92	31,4 ± 5,6	0,75	2,05
α -Pino	138,2 ± 6,8	0,98	86,8 ± 19,7	0,76	0,63
Linalol	≥200	NE	≥200	NE	---
1,8 Cineol	≥200	NE	≥200	NE	---
α -Terpineno	114,5 ± 8,5	0,96	47 ± 2,6	0,98	0,41
γ-Terpineno	166,5 ± 22,1	0,86	57,3 ± 2,4	0,99	0,34
Terpinen-4- ol	≥ 200	NE	≥ 200	NE	---
trans-β-Cariofileno	≥ 200	NE	39,7 ± 6,9	0,75	---
(+) Limoneno	≥ 200	NE	106,9 ± 9,4	0,94	---
(-) Limoneno	22,1 ± 1,2	0,98	154,1 ± 14,4	0,93	6,97
Carvacrol	121,2 ± 7,2	0,97	115,7 ± 8	0,96	0,95
ρ-Cimeno	≥ 200	NE	≥ 200	NE	---
Timol	121,8 ± 7,1	0,97	126,6 ± 16,5	0,86	1
β- Mirceno	66,4 ± 13,2	0,8	≥200	NE	3,01

^a La mínima dilución del compuesto que es capaz de inducir la muerte o inhibir la proliferación del 50% de las células;

^b Coeficiente de correlación lineal; ^c Índice de Selectividad definido como IC₅₀ en Vero sobre IC₅₀ en HeLa; ^d No evaluado.

^e No es necesaria el cálculo dado que a las concentraciones evaluadas no presentó actividad citotóxica para las células HeLa

Con el fin de correlacionar la actividad de los aceites con los componentes mayoritarios, se caracterizó la composición química de los aceites 4D y 5E, correspondiente al aceite más activo y el menos activo. El análisis de GC/MS identificó 40 componentes (datos no mostrados). En la Tabla 3 sólo se registran 17 componentes con concentración relativa porcentual mayor de uno por ciento. 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 (%). El aceite quimiotipo trans-β-cariofileno/ρ-

cimeno (4D) mostró la siguiente composición, en sus componentes mayoritarios: trans-β-cariofileno (11,3%), ρ-cimeno (11,2%), α-felandreno (9,9%), limoneno (7,2%), 1, 8-cineol (6,5%) y α-humuleno (6,0%). El aceite quimiotipo carvacrol (5E) mostró la siguiente composición, en sus componentes mayoritarios: carvacrol (46,2%), ρ-cimeno (12,0%), timol (9,5%), γ-terpineno (9,5%), β- mirceno (2,5%), α-terpineno (2,7%) y trans-β-cariofileno (2%). En la Tabla 2, se muestra la actividad citotóxica de estos componentes. Los monoterpenos, componentes mayoritarios, no mostraron actividad

citotóxica en ninguna de las dos líneas evaluadas, solo el (-) limoneno mostró actividad citotóxica en las células HeLa, con un valor de IC_{50} de $22,1 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ e índice

de selectividad de 6,97. El respectivo isómero óptico (+) limoneno no fue citotóxico. El β - mirceno tubo un IS de 3,1, pero el valor IC_{50} fue de $66.4 \pm 13 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 3. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, quimiotipo “*p*-cymene/*trans*-beta-caryophyllene (4D)” y Carvacrol (5E), aislados por MWHHD

Componente	Ik ^a		Composición porcentual	
	DB-5 ^b	DB-WAX ^c	4D	5E
α -Thujene	924	1023	-	1,5
Camfene ^a	952	1060	2,6	-
β -Mircene ^a	990	1164	-	2,5
α -Terpinene ^a	1021	1178	-	2,7
ρ -Cimene ^a	1031	1270	11,2	12,0
1,8-Cineol ^a	1035	1205	6,5	-
γ -Terpinene ^a	1066	1224	-	9,5
Timol ^a	1297	2181	-	9,9
Carvacrol ^a	1316	2212	-	46,2
α -Pinene ^a	934	1036	2,3	-
α -Felandrene ^a	1011	1146	9,9	-
Limonene ^a	1034	1197	7,2	-
<i>trans</i> - β -Cariofilene ^a	1436	1610	11,3	2,0
α -Humulene	1471	1683	6,0	1,2
Oxido de cariofilene ^a	1602	2010	2,2	-
Borneol ^a	1181	1710	3,1	-
Terpinen-4-ol ^a	1191	1606	-	1,1

^a Índice de Kováts determinados experimentalmente.

DISCUSIÓN

L. origanoides H.B.K. es una planta aromática perteneciente a la familia *Verbenaceae*, reconocida, tradicionalmente, por sus propiedades farmacológicas¹⁴⁻¹⁵. *L. origanoides* es un arbusto de hasta 3 m de altura, que crece en forma silvestre en América Central, el norte de América del Sur y de las Antillas¹⁴⁻¹⁵. Las investigaciones sobre la actividad biológica de esta especie, cobran importancia, debido a sus múltiples usos: como condimento, por su contenido alto en timol y carvacrol; y en infusiones de flores y hojas para aplicaciones etnofarmacológicas^{6,8}. En México, es conocido popularmente como orégano silvestre y es

utilizado en la cocina como un sustituto del orégano común, *L. graveolens* Kunth⁶. En Colombia, se encuentra en altitudes entre 500 y 800 m, en varios departamentos de la región Andina y en el norte de la península de la Guajira¹³. Stashenko y col (2008)¹³ han identificado en Colombia la presencia de tres quimiotipos: *trans*- β -cariofileno/ ρ -cimeno, timol y carvacrol.

En el presente estudio se evaluó el efecto citotóxico *in vitro* en la línea tumoral HeLa (células de adenocarcinoma de cérvix humano) y la línea no-tumoral Vero, de ocho aceites esenciales obtenidos de plantas de *L. origanoides*, con el fin de identificar un posible uso antitumoral.

Entre los aceites esenciales reportados con actividad citotóxica, están los aceites aislados de las plantas *Zanthoxylum schinifolium*¹⁶, *Melaleuca alternifolia*¹⁷ y *Eugenia caryophyllata*⁴; así como algunos componentes mayoritarios de sus aceites esenciales como el eugenol⁴, 1,8-cineol¹⁸, terpinen 4-ol¹⁷, limoneno¹⁹ y el citral⁵, los cuales han mostrado actividad citotóxica sobre líneas celulares de leucemias mieloides, linfoides, cáncer de hígado, melanoma y cáncer de cérvix.

Moteki y col (2002)¹⁸ reportaron efecto citotóxico del monoterpeneo 1,8-cineol, en el cual se indujo fragmentación del DNA en las líneas celulares de leucemia humana Molt 4B y HL-60, a concentraciones de 0,7 µg/mL; por el contrario no induce fragmentación del DNA en linfocitos provenientes de voluntarios sanos, mostrando así un efecto selectivo sobre las líneas tumorales Molt 4B y HL-60. En nuestro estudio, sin embargo, no se encontró actividad citotóxica del 1,8-cineol en células de adenocarcinoma de cérvix humano.

El aceite de *Melaleuca alternifolia*, es reportado como citotóxico e inductor de apoptosis en células de melanoma (M14 WT) y células de melanoma resistentes a adriamicina (M14 ADR), después de 48 horas de tratamiento, a una concentración de 0,02% V/V¹⁷. El componente principal, el terpinen 4-ol, al igual que el aceite, provoca daño morfológico, fragmentación del DNA y apoptosis en células M14 ADR a una concentración de 0,01% V/V¹⁷. En nuestro estudio, la actividad citotóxica del terpinen 4-ol no pudo ser evidenciada. Estos resultados obtenidos, de no actividad, para 1,8-cineol y terpinen 4-ol, comparado con la citotoxicidad reportada por Moteki y col (2002)¹⁸ y Calcabrini y col (2004)¹⁷, puede ser debido a un efecto citotóxico específico, respectivamente, hacia las células tumorales, Molt 4B, HL-60, M14 WT y M14 ADR.

Es de resaltar, en nuestro estudio, la actividad citotóxica del aceite quimiotipo trans-β-cariofileno/ρ-cimeno (4D), de composición: trans-β-cariofileno (11,3%), ρ-cimeno (11,2%), α-felandreno (9,9%) y limoneno (7,2%), con valores de IC₅₀ de 9.1 ± 1 µg/mL, evaluado por la técnica del MTT, e índice de selectividad de 7.1. El (-) limoneno, uno de los componentes mayoritarios del aceite mostró valores de IC₅₀ de 22,1 ± 1,2 y IS de 6,9, similares a los obtenidos en el aceite 4D. La actividad citotóxica del limoneno ha sido reportada por varios autores¹⁹⁻²¹. Rabi y Bishayee (2009)²⁰, 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 IC₅₀ de 2,8 mM y 9,4 mM. El efecto del (-) limoneno fue dosis dependiente, y éste potenció la actividad citotóxica inducida por el medicamento docetaxel sobre la células DU-145. Estudios clínicos en fase II/I, están siendo llevados a cabo para demostrar su potencial actividad antitumoral²²⁻²³. Este es el primer estudio en el cual se evalúa la actividad citotóxica en células HeLa de aceites esenciales provenientes de la planta *L. origanoides*. El índice de selectividad alto del aceite, y el valor de IC₅₀ bajo, sugiere que la actividad citotóxica hacia las células de adenocarcinoma de cérvix humano, no se debe sólo a sus componentes mayoritarios, como el limoneno, ya que la presencia de sus isómeros estructurales determinan actividades contrapuestas, sino a un sinergismo entre componentes mayoritarios y minoritarios. Próximos estudios, estarán encaminados a evaluar la actividad de este aceite con medicamentos que se encuentran actualmente en uso para tratamiento de cáncer de cérvix, con el fin de evaluar su potencial para inducir sinergismo en la citotoxicidad selectiva a células tumorales.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este artículo se derivan del proyecto RC 432-2004 financiado por el Instituto colombiano para el desarrollo de la ciencia y la tecnología-COLCIENCIAS, Bogotá, Colombia.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores no tienen conflictos de intereses que declarar.

REFERENCIAS

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 564-582.
2. Cragg G and Newman D. Plants as a source of anticancer agents. Journal of Ethnopharmacology 2005; 100: 72-79.
3. Kumar A, Malik F, Bhushan S, Sethi VK, Shahi AK, Kaur J, Taneja SC, Qazi GN, Singh J. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. Chem Biol Interact 2008; 171: 32-347.
4. Yoo CB, HanK T, Cho KS, Ha J, Park HJ, Nam JH, Kil UH, Lee KT. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Cancer Lett 2005; 225: 41-52.

5. Dudai N, Weinstein Y, Krup M, Rabinski T, Ofir R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med* 2005; 71: 484-488.
6. Oliveira DR, Leitao GC, Bizzo HR, Alviano DS, Alviano CS, Leitão SG. Chemical and antimicrobial analysis of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry* 2007; 101:236-240.
7. Dos Santos FJ, Lopes JA, Cito GL, Oliveira EH, de Lima SG de Reis F. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research* 2004; 16: 504-506.
8. Garcia-Barriga HG. *Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica*. 2da edición. Bogota: Tercer Mundo, 1992 p. 508.
9. Fonnegra R, Jimenez S. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. 2da edición. Medellín: editorial Universidad de Antioquia, 2006 p. 368.
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: 93-103.
11. 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.
12. Prayong P, Barusrux S, Weerapreeyakul N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia* 2008; 79: 598-601.
13. Stashenko E, Ruiz C, Muñoz A, Castañeda M, Martínez J. Composition and Antioxidant activity of Essential Oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. *Natural products communications* 2008; 3: 563-566.
14. Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 211-222.
15. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76: 73-99.
16. Paik SY, Koh KH, Beak SM, Paek SH, Kim JA. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 802-807.
17. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaciel 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.
18. Moteki H, Hibasami H, Yamada Y, Katsuzaki H, Imai K, Komiya T. Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. *Oncol Rep* 2002; 9: 757-760.
19. Ji J, Zhang L, Wu YY, Zhu XY, Lv SQ, Sun XZ. Induction of apoptosis by d-limonene is mediated by a caspase-dependent mitochondrial death pathway in human leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 2617-2624.
20. 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.
21. Kawamori T, Tanaka T, Hirose Y, Ohnishi M, Mori H. *Carcinogenesis* 1996; 17(2): 369-72.
22. 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(2): 111-7.
23. McNamee D. *d*-Limonene trial in cancer. *Lancet* 1993; 342: 801-5.