

Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla

Essential oils from Colombian plants inactive dengue virus and yellow fever virus

Rocío Meneses¹, Flor Ángela Torres¹, Elena Stashenko², Raquel E. Ocazionez¹

RESUMEN

Introducción: Un antiviral contra el virus del dengue (VDEN) y el virus de la fiebre amarilla (VFA) para tratamiento de los enfermos, no está disponible en el mercado a pesar de numerosas investigaciones con compuestos sintéticos. **Objetivo:** Evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* sobre el VDEN y el VFA del aceite esencial obtenido de plantas cultivadas en Colombia. **Materiales y Métodos:** Los virus se incubaron con el aceite esencial (100 µg/mL) 2 h a 37°C antes de la adsorción a la célula y el efecto inhibitorio fue determinado por el método de reducción de placa. **Resultados:** El aceite esencial obtenido de 10 y 8 plantas redujo desde 74 hasta 100% placas del VDEN y del VFA, respectivamente. Los aceites de *Lippia citriodora* (verbena) y *Pimenta racemosa* (laurel) fueron más activos contra ambos virus reduciendo 100% las placas. La magnitud del efecto inhibitorio se relacionó con el método de extracción del aceite y la parte de la planta seleccionada. **Conclusión:** El aceite esencial de plantas colombianas puede inhibir la replicación *in vitro* del VDEN y VFA. Se requieren más estudios para determinar la concentración mínima inhibitoria y el índice de selectividad para considerar estas plantas como fuente de compuestos antivirales. *Salud UIS* 2009; 41: 236-243

Palabras clave: Aceite esencial, antiviral, plantas colombianas, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla

ABSTRACT

Introduction: Products obtained from plants can inhibit *in vitro* viruses that cause human diseases. An antiviral drug against dengue virus (DENV) and yellow fever virus (YFV) does not exist despite extensive research exploring synthetic compounds. **Objective:** To evaluate the inhibitory effect on DENV and YFV of essential oils obtained from Colombian plants. **Materials and Methods:** Viruses were incubated with essential oil (100 µg/mL) 2 h at 37°C before cell adsorption and the inhibitory effect was determined by plaque reduction assay. **Results:** The essential oil obtained from 10 and 8 plants reduced from 74 to 100%

1. Laboratorio de Arbovirus, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP. Universidad Industrial de Santander.

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

Correspondencia: Rocío Meneses, Bact. MSc, CINTROP, Universidad Industrial de Santander, sede UIS-Guatigura, Piedecuesta, Sntander, Colombia, Tel: 6344000 extensión 3555

E-mail: rocio.meneses@gmail.com.

Recibido: 11 de julio de 2009 - **Aceptado:** 11 de diciembre de 2009

DENV and YFV plaques, respectively. Essential oils from *Lippia citriodora* and *Pimenta racemosa* were the most active against both viruses causing 100% reduction of plaques. The magnitude of the inhibitory effect was related to the method of oil extraction and part of plant used. **Conclusion:** Essential oils from Colombian plants can inhibit the replication *in vitro* of DENV and YFV. Further studies determining the minimal inhibitory concentrations and selectivity index are needed in order to consider these plants as a source of antiviral compounds. *Salud UIS* 2009; 41: 236-243

Keywords: Essential oils, antiviral, Colombian plants, dengue virus, yellow fever virus

INTRODUCCIÓN

El dengue y la fiebre amarilla son las enfermedades virales transmitidas por mosquitos más frecuentes en países tropicales. En Latinoamérica, 35.593 casos de dengue y cerca de 38 muertes fueron reportados en el año 2008¹ y 12 casos de fiebre amarilla con 8 fatalidades en el 2009². La fiebre amarilla es prevenible por inmunización con un virus vivo atenuado (YFV 17 D) y a pesar de considerarse una práctica altamente segura, 169 casos de enfermedad postvacunal con 3 muertes se registraron entre 1990-2001³. La ocurrencia de complicaciones severas y de fatalidades por dengue y fiebre amarilla, se debe en gran parte a la carencia de una droga antiviral para el tratamiento oportuno de los enfermos.

El virus del dengue (VDEN) y el virus de la fiebre amarilla (VFA) pertenecen al mismo género (Flavivirus). Ambos poseen una membrana externa lipoproteica o envoltura derivada de la célula y en donde están presentes las glicoproteínas E y M de origen viral. Los Flavivirus entran a la célula por endocitosis mediada por un receptor, un proceso que se inicia con la adsorción del virus a la célula a través de unión de la proteína E a una molécula receptora en la membrana celular. La adsorción es seguida por la fusión entre la envoltura viral y celular mediada por cambios conformacionales de las proteínas E y M, y el virus penetra al citoplasma dentro del endosoma⁴. Compuestos que se ligan a componentes de la envoltura pueden inhibir la adsorción y penetración del virus⁵.

Centenares de compuestos sintéticos que pueden interrumpir etapas del ciclo de replicación del VDEN y VFA han sido evaluados *in vitro* y algunos en modelos animales⁵⁻⁶. Aunque *in vitro* se han obtenido resultados promisorios con varios compuestos, cuando se evalúan *in vivo* son ineficaces debido a que son activos a dosis tóxicas y tienen poco efecto en la fase aguda de la enfermedad. Hasta la fecha, ninguno de los compuestos evaluados ha sido licenciado para uso en humanos.

El uso de preparados de plantas para aliviar y curar dolencias es una práctica milenaria. La infusión de hojas de *Artemisia arborescens* (ajenjo moruno) es de frecuente uso popular para aliviar los síntomas de la malaria y lo mismo ocurre con *Prunella vulgaris* (consuelda) para el SIDA^{7,8}. Varios estudios *in vitro* demuestran que al aceite esencial obtenido de plantas posee actividad antiviral. La incubación por algunas horas de virus que poseen envoltura con aceite esencial inhibe la adsorción-penetración y consecuentemente disminuye la progenie originada durante la replicación⁹⁻¹³. En Colombia existen más de 51 220 especies de plantas que han sido usadas por siglos para calmar dolencias causadas por diversos microorganismos¹⁴. El potencial antiviral de centenares de ellas se desconoce.

Los datos presentados en este reporte corresponden a resultados preliminares sobre actividad antiviral de productos naturales, en el marco del proyecto “Estudio integral de especies aromáticas y medicinales tropicales promisorias para el desarrollo competitivo y sostenible de la agroindustria de esencias, extractos y derivados naturales” del CENIVAM. Específicamente en este estudio se investigó si la exposición previa del VDEN y el VFA al aceite esencial de plantas colombianas usadas en la medicina popular inhibe su posterior replicación *in vitro*. En todos los experimentos se usó una única concentración del aceite esencial correspondiente a 100 µg/mL. Esto debido a que el efecto inhibitorio de un compuesto a esa concentración refleja potencial antiviral *in vitro*¹⁵.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas

Se incluyeron 13 especies aromáticas cultivadas en los Departamentos de Santander, Nariño y Antioquia, que son usadas por los pobladores para preparar infusión o ungüento, a partir de hojas, flores o la raíz. Algunas de las plantas se colectaron directamente en el municipio

y otras en el jardín experimental del CENIVAM ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga. El código de identificación de cada planta fue registrado

en el Herbario Nacional de Colombia y la identificación taxonómica se realizó por el Dr. José Luis Fernández de la misma institución. Detalles de las plantas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Plantas cultivadas en Colombia examinadas en este estudio para actividad antiviral contra el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla.

Nº Voucher (COL)	Nombre		Uso médico ¹⁷
	Científico	Común	
531012	<i>Cananga odorata</i>	Cadmio, ylang-ylang	Fiebre e infecciones
512478	<i>Cordia cylindrostachya</i>	Guasca negra	Síntomas estomacales
173416	<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronela,	Antiséptico, gripe
CENIVAM-450	<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamomo	Inhibe la agregación plaquetaria
516304	<i>Hyptis suaveolens</i>	Cuchilla perdomo	Antiséptico, cicatrizar
512074	<i>Tagetes lucida</i>	Anís estrellado	Espasmos digestivos
^a	<i>Lippia alba</i>	Pronto alivio	Expectorante, diarrea
480749	<i>Lippia citriodora</i>	Verbena olorosa, cidrón	Antiinflamatorio, analgésico
512270	<i>Lippia origanoides</i>	Orégano de monte	Dolor de estómago, infección urinaria
512266 ^b	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	Albahaca	Antiflatulento, antibacterial
512227	<i>Pimenta racemosa</i>	Laurel	Dolores reumáticos
512209	<i>Piper auritum</i> Kunth	Cordoncillo	Antifúngico
CENIVAM-451	<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	Resfriados, gastrointestinal

^a 8 muestras (códigos: VEmcW02E, VEmcT02E, LAA454005, LAA454009, LAA750000, LAA455005, BEtoW02B, VEsaW06H). ^b dos muestras

Aceite esencial

Los aceites esenciales fueron obtenidos en el Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, UIS. Para su extracción se usó el método de hidrodestilación asistida con radiación por microondas como fue descrito previamente¹⁶. Cada aceite esencial fue remitido al Laboratorio de Quimioterapia del CINTROP, donde se procesó para determinar su citotoxicidad usando el método del MTT siguiendo un protocolo descrito¹³. Ninguno de los aceites esenciales incluidos en este estudio resultó tóxico para células de mamífero, esto es, el valor de CC_{50} fue $<100 \mu\text{g/mL}$ (Laboratorio de Quimioterapia, CINTROP. Sandra Leal). Para los ensayos, el aceite esencial se disolvió en dimetil sulfóxido al 1% y a cada uno se le asignó un código. El nombre de la planta se conoció después del análisis de los datos.

Célula y virus

Células de riñón de mono verde africano (Vero) fueron mantenidas en medio esencial mínimo (M-199) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 0,07% de NaHCO_3 a 37°C en atmósfera de 5%- CO_2 . Los virus fueron seleccionados de la colección del Laboratorio de Arbovirus del CINTROP (UIS). El VFA fue la cepa vacunal (YF 17 DD) y el VDEN una cepa del serotipo 2

(G-025) que había sido aislada de un paciente con dengue del municipio de Girón, Santander. Cada virus se replicó en células Vero y el título viral (unidades formadoras de placa por mL: UFP/mL) se determinó por plaqueo como se describió previamente¹³. La preparación de virus con la concentración conocida se almacenó a -70°C en alícuotas.

Ensayo de inhibición viral

El virus se incubó con $100 \mu\text{g/mL}$ de aceite esencial o en medio M-199 durante 2 h a 37°C . y la mezcla se usó para infectar monocapas de células Vero crecidas en cajas de 24 pozos a multiplicidad de infección de 1. Después de incubación durante 1 h a 37°C se hicieron dos lavados con tampón fosfato (PBS) y luego las células se incubaron 6 días a 37°C , CO_2 -5% en medio para la formación de placa (M-199 62,5%; SBF 6%; carboxi-metil-celulosa 31,5%). Al término, se adicionó a cada pozo una solución de cristal violeta (1%) y las placas virales fueron contadas visualmente. En algunos casos, las células fueron crecidas en medio sin carboxi-metil-celulosa y se procesaron para detectar antígeno viral con anticuerpo marcado con fluoresceína usando la técnica de inmunofluorescencia como fue descrita¹⁷. Cada aceite se evaluó por duplicado en dos ensayos independientes y el efecto inhibitorio viral se expresó

como el porcentaje promedio de reducción del número de placas del virus tratado versus el control. Valores $\geq 50\%$ se consideraron efecto inhibitorio sobre el virus.

Análisis de datos

Se compararon entre sí los porcentajes de reducción de placas causados por preparaciones del aceite esencial obtenido de una misma planta y la significancia de la diferencia de la significancia se determinó aplicando la prueba del Chi cuadrado.

RESULTADOS

Se evaluaron 21 muestras de aceites esenciales obtenidos de 13 plantas (Tabla 1). Del total de muestras, 8 fueron de *Lippia alba* quimiotipo Carvona de las cuales 4 se diferenciaron en el proceso de extracción del aceite en términos de condiciones de secado (temperatura y tiempo) y tiempo de extracción (Tabla 2); 2 muestras fueron de *Ocimum tenuiflorum* L diferentes con respecto a la parte de la planta utilizada para la extracción del aceite; y las 11 restantes de otras especies.

Tabla 2. Rendimientos (%) de aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* de acuerdo con las condiciones de su extracción

Código	Secado		Extracción, min	Rendimiento, % p/p
	Tiempo, h	Temperatura, °C		
LAA454005	5	40	45	1,4 ± 0,2
LAA454009	9	40	45	2,12 ± 0,04
LAA750000	0	0	75	0,70 ± 0,09
LAA455005	5	50	45	2,2 ± 0,1

El secado del material vegetal fue realizado en una estufa *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia) y el aceite esencial fue extraído de las partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencias) empleando el método de la hidrodestilación asistida con radiación microondas¹⁵. Los datos de rendimiento corresponden al promedio de dos valoraciones independientes.

La incubación previa del VDEN con el aceite esencial de 10 plantas de las 13 examinadas inhibió su posterior replicación *in vitro*. Esto es, hubo reducción de placas de infección entre 74 y 100%, dependiendo del aceite, comparado con el control. Lo mismo se observó sobre el VFA con el aceite esencial de 8 de las 10 plantas. El obtenido de hojas de *Pimenta racemosa* y de *Lippia*

citriodora redujo 100% las placas de infección de ambos virus. El de *Cymbopogon nardus* redujo 100% el VDEN pero 82,7% el VFA. De los otros, 7 redujeron el VDEN entre 96,5 y 74,4% y 5 el VFA en porcentajes similares. Los aceites de *Thymus vulgaris*, *Cananga odorata* y *Piper auritum* Kunth no fueron activos contra ninguno de los virus (Tabla 3).

Tabla 3. Reducción de placas virales en cultivos celulares infectados con virus tratado con el aceite esencial de plantas de Colombia.

Planta	Parte usada	Placas: # (% de reducción ^d)	
		VDEN ^a	VFA ^b
Ninguna (control)	-	53-71(0)	29 (0)
<i>Pimenta racemosa</i>	Hoja	0 (100)	0 (100)
<i>Lippia citriodora</i>	Hoja	0 (100)	0 (100)
<i>Cymbopogon nardus</i>	Planta entera	0 (100)	5 (83 ± 2,8)
<i>Lippia alba</i>	Planta entera	3 (97 ± 2,0)	7 (78 ± 2,1)
<i>Hyptis suaveolens</i>	Hoja, tallo	6 (92 ± 0,1)	2 (95 ± 0,7)
<i>Tagetes lucida</i>	Fruto	6 (92 ± 2,0)	8 (74 ± 0,7)
<i>Cordia cylindrostachya</i>	Hoja, fruto	5 (91 ± 1,2)	4 (88 ± 2,1)
<i>Elettaria cardamomum</i>	Fruto	9 (88 ± 1,0)	^c
<i>Ocimum tenuiflorum</i> L	Planta entera	10 (82 ± 0,0)	31 (0)
<i>Lippia origanoides</i>	Hoja, flor	13 (74 ± 4,9)	5 (83 ± 0,4)
<i>Thymus vulgaris</i>	Planta entera	35 (34 ± 0,9)	19 (36 ± 0,7)
<i>Cananga odorata</i>	Flor	50 (6 ± 2,4)	55 (0)
<i>Piper auritum</i> Kunth	Fruto	90 (0)	43 (0)

^a Virus del dengue, ^b Virus de la fiebre amarilla, ^c No se hizo. El virus se incubó con el aceite esencial (100 µg/mL) 2 h a 37°C antes de la adsorción a la célula, Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes hechos por duplicado valores ≥ 50 se considera efecto inhibitorio o potencial antiviral.

El efecto inhibitorio sobre los virus seleccionados de los 4 aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, se muestra en la Figura 1. Con el VDEN, los aceites obtenidos por hidrodestilación sin o con secado (5 ó 9 h a 40°C) del material y duración de la extracción durante 45 o 75 min, redujeron más placas de infección que el obtenido con secado a 50°C y extracción por 45 min: 92,9; 89,4 y 86,6% versus 63,8% ($p = 0,002$, χ_2). Con el VFA, el aceite esencial que menos redujo placas de infección fue el obtenido sin secado y de 75 min de extracción: 62,1% versus 91,4; 84,4, 91,4% de las otras ($p = 0,018$, χ_2).

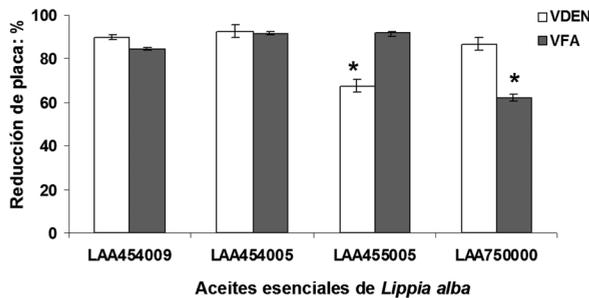


Figura 1, Efecto inhibitorio sobre el virus del dengue (VDEN) y el virus de la fiebre amarilla (VFA) del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo carvona, obtenido por hidrodestilación asistida con microondas bajo diferentes condiciones. LAA454005: secado 5 h a 40°C y extracción por 45 min. LAA454009: igual que 1 con secado de 9 h. LAA455005: igual que 1 con secado a 50°C. LAA750000: sin secado y extracción por 75 min. El virus se incubó con el aceite esencial (100 µg/mL) antes de la adsorción a la célula y a los 6 días postinfección se determinó el porcentaje de reducción de placas virales con respecto al control. Los datos muestran el resultado de dos experimentos independientes realizados por duplicado, *: $p = 0,002$ (χ_2) con respecto a las otras muestras del aceite esencial con el virus correspondiente

La variación del efecto inhibitorio viral del aceite esencial obtenido de la planta entera con respecto al obtenido de hoja-flor fue evaluada (Figura 2). El de *Lippia alba* de la planta entera tuvo mayor efecto inhibitorio sobre el VDEN que el otro (reducción 96,5% versus 55,7%; $p = 0,0001$, χ_2) y esta diferencia fue mayor con el VFA (89,6% versus 1,7%). Sin embargo, lo mismo no se observó con el aceite esencial de *Ocimum tenuiflorum*: los dos aceites causaron reducción de placas del VDEN en proporción similar (82 y 76,5%; $p > 0,05$, χ_2) y ninguno resultó activo contra el VFA (reducción de placa < 50%).

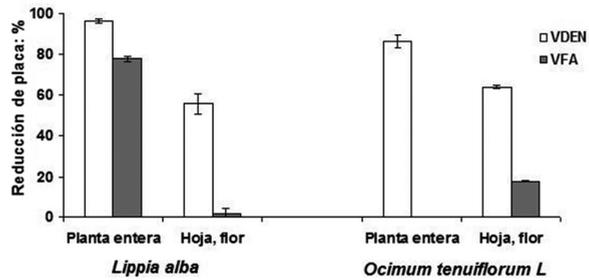


Figura 2, Efecto inhibitorio sobre el virus del dengue (VDEN) y el virus de la fiebre amarilla (VFA) de aceite esencial en relación con la parte de la planta usada. El virus se incubó con aceite esencial (100 µg/mL) antes de la adsorción a la célula y a los 6 días de postinfección se determinó el porcentaje de reducción de placas virales con respecto al control. Los datos muestran el resultado de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Diferencias ($p < 0,0001$, χ_2) con los dos virus y ambos aceites esenciales comparando el extraído de la planta entera versus el de hoja, flor.

DISCUSIÓN

La evaluación de la actividad antiviral *in vitro* de un compuesto requiere ensayos de dosis-respuesta para determinar la concentración que inhibe en 50% (CI_{50}) la replicación del virus y el índice de selectividad (IS) que corresponde a la proporción CC_{50} / CI_{50} . Es aceptado que en ensayos *in vitro* los compuestos con valor de $CI_{50} = 100$ µg/mL e $IS > 2,0$ poseen actividad antiviral^{15,18}.

En este estudio no se determinaron el CI_{50} y el IS de los aceites esenciales examinados y esto limita la conclusión sobre el potencial antiviral de los mismos. No obstante, los resultados demuestran que la exposición previa del VDEN y el VFA a 100 µg/mL del aceite obtenido de varias plantas colombianas puede inhibir entre 70 y 100% la progenie viral de la posterior replicación *in vitro*. Este hallazgo presume que la CI_{50} de los aceites esenciales evaluados podría ser menor que 100 µg/mL. Así se confirmó en un estudio previo con el VFA: el aceite esencial de *Lippia origanoides* y *Lippia alba* mostraron CI_{50} entre 3,3 y 11,1 µg/mL¹³. Por otro lado, en un estudio en progreso el de *Lippia alba* fue activo contra el VDEN-1, VDEN-2 y VDEN-4 a $CI_{50} < 0,1$ µg/mL (Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2010, aceptado para publicación).

Los aceites esenciales de *Lippia citriodora* (verbena olorosa, cidrón) y el de *Pimenta racemosa* (laurel) fueron evaluados en este estudio. La infusión de hojas de la primera planta es de uso popular para aliviar

síntomas del asma, resfriado común, diarrea; y como digestivo, antipirético y sedante¹⁹. La infusión de hojas de *Pimenta racemosa* (laurel) es utilizada para aliviar dolores musculares y articulares y disminuir la inflamación; y del extracto se han reportado actividades bacteriostática, bactericida y antiinflamatoria²⁰⁻²². Los aceites esenciales de esas dos plantas redujeron 100% la replicación del VDEN y el VFA. Esto es, ninguna placa de infección se visualizó en cultivos infectados con el virus previamente incubado con el aceite (Tabla 2). En ensayos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio, ambos aceites esenciales fueron activos contra los dos virus a $CI_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ (datos no mostrados), lo que sugiere un alto potencial antiviral. Hasta donde los autores conocen, éste es el primer reporte sobre la actividad antiviral de los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Pimenta racemosa* sobre Flavivirus.

Resultados de otros estudios sobre la actividad antiviral de aceites esenciales contra virus que poseen envoltura respaldan los reportados en este. El aceite obtenido de *Lippia alba* inactivó directamente el virus del herpes simplex tipo 1²²; los de *Lippia junelliana* y de *Lippia turbinata* fueron activos contra el virus Junin²³; especies de la familia Zingiberaceae, a la cual pertenece *Elettaria cardamomum*, fueron activas contra el virus del herpes simplex, el virus de la inmunodeficiencia humana, el citomegalovirus y el virus de la hepatitis C^{24,25}.

En este estudio, se encontró que la actividad antiviral del aceite esencial puede variar dependiendo de las condiciones (tiempo y temperatura) de secado y tiempo de hidrodestilación en el proceso de extracción. Adicionalmente, se observó variación dependiendo de la parte de la planta de donde el aceite fue extraído (Figuras 1 y 2). No obstante, para confirmar más precisamente la influencia de esas variables sobre el potencial antiviral del aceite deberán realizarse ensayos *in vitro* comparando el CI_{50} e IS. Variaciones del efecto inhibitorio del extracto con respecto a la parte de la planta ha sido ampliamente estudiado para la especie *Hypericum perforatum* y diferencias en la actividad biológica de extractos obtenidos por diferentes métodos han sido reportadas²⁶⁻²⁸.

El mecanismo de acción antiviral de aceites esenciales ha sido muy poco investigado. Los resultados de dos estudios con Herpesvirus sugieren que componentes de la mezcla pueden unirse a la membrana viral y esto genera cambios conformacionales de las proteínas virales que afectan negativamente la adsorción y penetración del virus²⁹⁻³¹. Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales examinados aquí han sido determinados en estudios previos^{16,32} o en progreso. El componente

mayoritario de *Lippia citriodora* y *Pimenta racemosa*, los más activos contra el VDEN y VFA, es el geranial (18,9%) y el eugenol (56,1%), respectivamente. El mecanismo de acción de algunos componentes mayoritarios de los aceites esenciales incluidos en este estudio está siendo investigado en nuestro laboratorio.

En resumen, este estudio demuestra que los aceites esenciales de plantas colombianas usadas en la medicina alternativa, pueden inhibir la progenie *in vitro* del VDEN y VFA cuando son expuestos por algunas horas antes de ser adicionados a la célula. Los resultados sugieren que la acción inhibitoria de los aceites esenciales podría deberse a inactivación directa del virus o efecto virucida, probablemente por inhibición de la adsorción y penetración del virus. Los estudios para determinar la concentración mínima inhibitoria y el índice de selectividad de los aceites esenciales examinados están en progreso. Esta información es necesaria para considerar este producto natural como fuente de compuestos antivirales.

AGRADECIMIENTOS

A Patricia Escobar, Directora del Laboratorio de Quimioterapia del CINTROP por la información sobre la citotoxicidad de los aceites esenciales. A Sergio Yebraíl Gómez, Laboratorio de Arbovirus del CINTROP por su colaboración con el análisis de datos. A Camilo Durán, CENIVAM, Universidad Industrial de Santander por su colaboración. Este proyecto fue financiado por el Instituto Colombiano de Ciencia y Tecnología, COLCIENCIAS (Proyecto RC-432-2004).

REFERENCIAS

1. Pan American Health Organization. Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion) last update: 18 April 2008.
2. Pan American Health Organization. Update: Yellow Fever Situation in the Américas last update: 10 February 2009.
3. Lindsey NP, Schoroeder BA, Miller ER, Braun MM, Hinckley AF, Marano N, et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine* 2008; 48: 6077-6082.
4. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 59: 23-61.
5. Keller TH, Chen YL, Knox JE, Lim SP, Ma NL, Patel SJ, et al. Finding new medicines for flaviviral targets. *Novartis Found Symp.* 2006; 277: 102-114.

6. Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res* 2008; 78: 116-124.
7. Taylor S, Berridge V. Medicinal plants and Malaria: an historical case study of research at the London School of Hygiene and Tropical Medicine in the twentieth century. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 707-714.
8. Chang RS, Yeung HW. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus in vitro by crude extracts of Chinese medicinal herbs. *Antiviral Res* 1988; 9: 163-175.
9. Duschatzky C, Possetto ML, Talarico LB, Garcia CC, Michis F, Almeida NV, et al.. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antiviral Chem Chemother* 2005; 16: 247-251.
10. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 681-684.
11. Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H, Otake T, Ueba N, et al. Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiates. *Biol Pharm Bulletin* 1998; 21: 829-833.
12. Zhang B, Chen J, Li H, Xu X: Study on the *Rheum palmatum* volatile oil against HBV in cell culture *in vitro*. *Zhong Yao Cai* 1998; 21: 524.
13. Meneses R, Ocazonez RE, Martínez JR, Stashenko EE. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8:8.
14. Bernal H, Correa J. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello. Tomo VII, Secretaria Ejecutiva del Convenio Andrés Bello, Talleres de Editora Guadalupe Ltda, Bogotá, 440 p.
15. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* 2006; 106: 290-302.
16. Stashenko E, Jaramillo E, Martínez R: 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* 2004; 1025: 93-103.
17. Ocazonez RE, Cortés F, Villar LA. Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. *Colombia Médica* 2005; 36: 65-72.
18. Martin K, Ernst E. Antiviral agents from plants and herbs: a systematic review. *Antivir Ther* 2003; 8: 77-790.
19. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Branquinho Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Studies on the Antioxidant Activity of *Lippia citriodora* Infusion: Scavenging Effect on Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1324-1327.
20. Saenz MT, Tornos MP, Alvarez A, Fernandez MA, García MD. Antibacterial activity of essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terebinthina* and *Pimenta racemosa* var. *grisea*. *Fitoterapia* 2004; 75: 599-602.
21. Fernández MA, Tornos MP, García MD, de las Heras B, Villar AM, Sáenz MT. Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*. *J Pharm Pharmacol* 200; 53: 867-872.
22. Andrighetti-Fröhner CR, Sincero TC, da Silva AC, Savi LA, Gaido CM, Bettega JM, et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia* 2005; 76: 374-378.
23. Garcia C, Talarico L, Almeida N, Colombres S, Duschatzky C, Damonte. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Res* 2003; 17:1073-1075.
24. Sookkongwaree K, Geitmann M, Roengsumran S, Petsom A, Danielson UH. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. *Pharmazie* 2006; 61:717-721.
25. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca aternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000; 88: 170-177.
26. Kirakosyan A, Sirvent TM, Gibson DM, Kaufman PB. The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biotechnol Appl Biochem* 2004; 39: 71-81.
27. Apers S, Cimanga K, Vanden Berghe D, Van Meenen E, Longanga AO, Foriers A, et al. Antiviral activity of simalikalactone D, a quassinoid from *Quassia africana*. *Planta Med* 2002; 68: 20-24
28. Woo ER, Kim HJ, Kwak JH, Lim YK, Park SK, Kim HS, et al. Anti-herpetic activity of various medicinal plant extracts. *Arch Pharm Res* 1997; 20:58-67.

29. Schnitzler P, Schuhmacher A, Astani A, Reichling J. *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine* 2008; 15: 734-740.
30. 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.
31. 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: 343-347.
32. Stashenko E, Ruiz C, Muñoz A, Castañeda M, Martínez J: Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K. grown in Colombia. *Nat Product Commun* 2008;3: 563-566.