



## ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS CULTIVADAS EN COLOMBIA

## Antiproliferative Activity of Essential Oils from Colombian Plants

Sindi Alejandra VELANDIA<sup>1</sup>, Elizabeth QUINTERO<sup>1</sup>, Elena E STASHENKO<sup>2</sup>, Raquel E OCAZIONEZ<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), Facultad de Salud, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander. Autopista Bogotá Km 2 vía Refugio. Piedecuesta, Colombia.

<sup>2</sup> Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM. Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander. Cra. 27 Calle 9 Ciudad Universitaria, Bucaramanga, Colombia.

**For correspondence.** [sindi.Avelandia@outlook.com](mailto:sindi.Avelandia@outlook.com)

**Received:** 31<sup>st</sup> August 2017, **Returned for revision:** 30<sup>th</sup> October 2017, **Accepted:** 11<sup>th</sup> December 2017.

**Associate Editor:** Xavier Marquínez Casas.

**Citation/Citar este artículo como:** Velandia SA, Quintero E, Stashenko EE, Ocazionez RE. Actividad antiproliferativa de aceites esenciales de plantas cultivadas en Colombia. Acta biol. Colomb. 2018;23(2):189-198. DOI:<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v23n2.67394>

## RESUMEN

Colombia posee gran diversidad de plantas medicinales, pero pocas han sido objeto de investigación. En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación asistida por microondas. Se analizaron 15 muestras de 11 especies en ensayos del MTT en células cancerosas MCF-7, HeLa y HepG-2 y se incluyeron células normales humanas (HEK293) y de animales (Vero y BF16F10) para evaluar selectividad. La composición química de muestras activas se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Aceites esenciales de cuatro especies mostraron actividad antiproliferativa (IC<sub>50</sub>: 50 µg/mL) en células HeLa y/o MCF-7, en el siguiente rango (índice de selectividad en paréntesis): *Piper cumanense* H.B.K. (4,7) > *Piper subflavum* var. *espejuelanum* C.DC (3,9) > *Salvia officinalis* L. (3,6) > *Piper eriopodom* (Miq.) C. DC. (3,1). Ninguna muestra fue activa en células HepG-2. El análisis por CG-MS identificó β-cariofileno, α-copaeno, β-pineno, α-pineno y linalol como componentes mayoritarios. Los aceites esenciales activos pueden ser puntos de partida para desarrollo de medicamentos herbales para cuidado paliativo del cáncer.

**Palabras clave:** aceite esencial, apoptosis, cáncer, fitoterapia, MTT.

## ABSTRACT

Colombia has a great diversity of medicinal plants, but few have been investigated. In this work, the antiproliferative activity of essential oils obtained by microwave-assisted hydrodistillation was evaluated. Fifteen samples from 11 species were analyzed in MTT assays in cancer cells MCF-7, HeLa and HepG-2, and normal human cells (HEK293) and animal cells (Vero and B16F10) were included to evaluate selectivity. The chemical composition of the active oils was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Essential oils from four species showed antiproliferative activity (IC<sub>50</sub>: <50 µg / mL) in HeLa and / or MCF-7 cells, in the following range (selectivity index in parenthesis): *Piper cumanense* H.B.K. (4.7) > *Piper subflavum* var. *espejuelanum* C. DC (3.9) > *Salvia officinalis* Linneo. (3.6) > *Piper eriopodom* (Miq.) C.DC. (3.1). The CG-MS analysis identified β-caryophyllene, α-copaene, β-pinene, α-pinene and linalool as major components. Active essential oils could serve as starting points to develop herbal medicines for cancer palliative care.

**Keywords:** essential oil, apoptosis, cancer, MTT, phytotherapy.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer y sus condiciones asociadas impactan la salud pública mundial: causan muertes prematuras, incrementan el gasto por alto costo de las terapias y requieren tratamientos prolongados que aminoran la calidad de vida del paciente y sus familias (Miller *et al.*, 2016)". Hoy día no hay cura para la mayoría de cánceres a pesar de intensa investigación en fármacos sintéticos de acción selectiva (Dunn y Kramer, 2016). El uso de medicamentos herbales sigue siendo alternativa para aliviar síntomas del cáncer, pueden actuar como coadyuvantes en tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Harvey *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016; Shareef *et al.*, 2016).

Los aceites esenciales (AEs) son líquidos hidrofóbicos de compuestos aromáticos que están presentes en varias partes de la planta, un sinnúmero de ellos se usan como saborizantes o potenciadores de aromas en cosméticos, perfumes y jabones (Pandey *et al.*, 2017). Resultados de estudios indican que los AEs y componentes aislados poseen actividad *in vitro* anticancerígena y en ratones de laboratorio pueden reducir el tamaño de tumores inducidos (Bhalla *et al.*, 2013; Lesgards *et al.*, 2014; Sobral *et al.*, 2014; Manion y Widder, 2017). Existe suficiente evidencia para concluir que los AEs pueden servir como puntos de partida para desarrollo de medicamentos herbales y descubrimiento de nuevos fármacos.

En Colombia, el número de plantas medicinales depositadas en colecciones botánicas es cerca de 2800 (Bernal *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2016). Solo 144 especies tienen uso médico autorizado por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, aunque ninguna como coadyuvante en tratamiento del cáncer (INVIMA, 2017). Este escaso aprovechamiento de las plantas se debe en buena parte a carencia de suficiente evidencia científica sobre sus propiedades anticancerígenas. Algunos trabajos se han realizado. De *Croton lechleri* Müll. Arg, conocida como sangre de drago, está documentado el uso popular para aliviar síntomas del cáncer y estudios *in vitro* e *in vivo* indican que el extracto posee potencial farmacológico para tratar cáncer de colon (Gupta, 2008; Bernal *et al.*, 2011). Del AE de *Ocotea caparrapi* (Sandino Groot ex Nates) Dugand, palo de Caparrí, se registra su potencial como coadyuvante del tratamiento convencional de tumores cutáneos (Palomino *et al.* 1996; Bernal *et al.*, 2011). Los extractos de *Vismia baccifera* Reichart, *Passiflora edulis* Sims y especies del género *Piper* presentaron actividad antiproliferativa en células de cáncer hepático (Osma *et al.*, 2013; Lizcano *et al.*, 2015).

La investigación en medicamentos herbales y fármacos de base natural para tratamiento del cáncer comienza con la selección de la planta apropiada. Esto ahorra tiempo y dinero y la probabilidad de encontrar un producto activo es mayor (Mazzio y Soliman, 2009; Harvey *et al.*, 2015). El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antiproliferativa de

AEs de 11 especies cultivadas en Colombia en células de tres cánceres humanos. Se analizaron 15 muestras siguiendo un protocolo guiado para identificar los AEs más apropiados para investigación y desarrollo de medicamentos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Plantas

Se incluyeron 15 ejemplares de 11 especies. Las plantas se colectaron en áreas rurales y semiurbanas de los departamentos de Santander, Arauca y Bolívar. El Prof. Dr. José Luis Fernández, Universidad Nacional (Bogotá) y Real Jardín Botánico de Madrid (España), realizó la identificación taxonómica. Una muestra del espécimen se depositó en el Herbario Nacional Colombiano con el respectivo código de identificación como se presenta en la Tabla 1.

### Aceites esenciales (AEs)

Las muestras se obtuvieron por hidrodestilación asistida por radiación de microondas, en un equipo de destilación tipo Clevenger adaptado a un sistema de calentamiento (Stashenko *et al.*, 2013). Brevemente, el material vegetal (210 g), sumergido en agua (300 mL), se colocó en un balón conectado al equipo con un reservorio de destilación *Dean-Stark* y la mezcla se calentó 15 min x 3 veces en el microondas. El AE se secó usando sulfato de sodio anhidro y se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C. Cada extracción se llevó a cabo por triplicado. De cada muestra se hizo una preparación concentrada (100 mg/mL) en dimetilsulfóxido y alícuotas se almacenaron a -20 °C. Para cada experimento se usó una alícuota de la misma preparación diluida en medio de cultivo.

### Análisis químico de aceites esenciales

Las muestras que presentaron actividad antiproliferativa se analizaron por cromatografía de gases/ espectrometría de masas como se ha descrito (Stashenko *et al.*, 2013). Se usó un equipo *Agilent Technologies 6890N Series Network System* (Palo Alto, California, EE.UU) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Inert XL*. Se utilizaron dos columnas capilares de 60 m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 µm (df): DB-5MS con fase estacionaria apolar de 5 % fenil-poli (dimetilsiloxano) y DB-WAX, con fase estacionaria polar de poli (etilenglicol). Helio (1 ml/min) se usó como gas de arrastre. La temperatura del horno se programó de 45 °C (5 min) hasta 150 °C (3 min) a 3 °C/ min; luego, hasta 220 °C (5 min) a 4°C/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C; se usó la relación split 1:30. Los índices de retención lineales (IRL) se calcularon con base en la serie homóloga de *n*-alcanos C9-C25 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.). Los componentes se identificaron comparando sus espectros de masas e IRL con espectros de bases de datos (NIST14 y Wiley) y reportados por otros (Davies, 1990; Babushok *et al.*, 2011). Se emplearon además compuestos de referencia (Sigma-Aldrich).

**Tabla 1.** Plantas usadas para obtención de los aceites esenciales.

| Nombre   | Familia     | Voucher   | Órgano utilizado      | Fecha de colecta | Lugar de colecta       |
|--|-------------|-----------|-----------------------|------------------|------------------------|
| <i>Ageratina</i> aff. <i>popayanensis</i> (Hieron.) R.M. King and H. Rob | Asteraceae  | COL582600 | Hojas, tallos, flores | 07-02-2015       | Zapatoca, Santander    |
| <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand                             | Burseraceae | COL582595 | Hojas, tallos, flores | 19-07-2014       | Tame, Arauca           |
| <i>Salvia officinalis</i> L  | Lamiaceae   | COL555844 | Hojas, tallos, flores | 28-07-2014       | Bucaramanga, Santander |
| <i>Piper cumanense</i> H.B.K.  | Piperaceae  | COL578977 | Hojas, tallos, flores | 15-07-2014       | Zapatoca, Santander    |
| <i>Piper eriopodon</i> (Miq.) C. DC                                      | Piperaceae  | COL578364 | Hojas, tallos, flores | 15-07-2014       | Zapatoca, Santander    |
| <i>Piper subflavum</i> var. <i>espejuelanum</i>                          | Piperaceae  | COL578976 | Hojas, tallos, flores | 16-07-2014       | Zapatoca, Santander    |
| <i>Swinglea glutinosa</i> Merr.  | Rutaceae    | COL521530 | Hojas, tallos, flores | 28-07-2014       | Bucaramanga, Santander |
| <i>Lippia alba</i> (Citrul) Mill.  | Verbenaceae | COL512272 | Hojas, tallos, flores | 18-05-2005       | Colorado, Bolívar      |
| <i>Lippia graveolens</i> Kunth   | Verbenaceae | COL555839 | Hojas, tallos, flores | 28-07-2014       | Bucaramanga, Santander |
| <i>Lippia organoides</i> H.B.K.  | Verbenaceae | COL587104 | Hojas, tallos, flores | 17-07-2014       | Bucaramanga, Santander |
| <i>Lippia organoides</i> H.B.K.  | Verbenaceae | COL587105 | Hojas, tallos, flores | 07-02-2015       | Girón, Santander       |
| <i>Lippia organoides</i> H.B.K.  | Verbenaceae | COL587106 | Hojas, tallos, flores | 17-07-2014       | Bucaramanga, Santander |
| <i>Lippia organoides</i> H.B.K.  | Verbenaceae | COL587107 | Hojas, tallos, flores | 17-07-2014       | Bucaramanga, Santander |
| <i>Tagetes caracasana</i> Humboldt ex Willdenow                          | Asteraceae  | COL587125 | Hojas, tallos, flores | 31-07-2015       | Suratá, Santander      |
| <i>Tagetes caracasana</i> Humboldt ex Willdenow                          | Asteraceae  | COL559441 | Hojas, tallos, flores | 15-07-2014       | Zapatoca, Santander    |

## Células

La actividad antiproliferativa de los AEs se evaluó en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, ATCC® HTB-22™), cáncer cervical (HeLa, ATCC® CCL-2™) y cáncer de hígado (HepG-2, ATCC® CRL-11997™). Para evaluar si los AEs presentaban más acción selectiva por las células cancerosas que otras, se incluyeron líneas celulares de riñón humano embrionario (HEK293-ATCC® CRL-1573™), riñón de mono (Vero, ATCC® CCL-81™) y piel de ratón (B16F10, ATCC® CRL-6475™). Cada línea celular se cultivó en cajas de 25 cm<sup>2</sup> en el medio de cultivo recomendado (MEM, DMEM-F12 o RPMI-1640, Gibco Co.) suplementado (8-10 %) con suero bovino fetal (Gibco Co.). Las cajas se incubaron por 3-4 días a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Se hicieron curvas de crecimiento para determinar el número de células apropiado para obtener monocapas confluentes viables por 72 h.

## Ensayo del MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]

El ensayo se usó para evaluar actividad antiproliferativa y selectividad de los AEs. Actividad antiproliferativa: las células cancerosas (10,000 por pozo) de interés (MCF-7, HeLa y HepG-2) se sembraron en placas de 96 pozos en medio de cultivo (200 µL/pozo) que contenía concentración distinta (50, 100, 200, 300, 400 o 500 µg/mL) de AE y se incubaron 72 h a 37 °C. Células HEK293, Vero y B16F10 se trataron antes de proliferación como las cancerosas y en otros ensayos después de la proliferación en consideración a que el efecto sobre la viabilidad celular varía dependiendo del estado de la monocapa. Las células se dejaron proliferar

sin tratamiento 24 h, posteriormente el medio se reemplazó por medio fresco con AE a las concentraciones mencionadas y la placa se incubó hasta 72 h a 37°C. Este segundo tratamiento se denominó después de proliferar. En cada placa se incluyeron células tratadas con dimetilsulfóxido y no-tratadas con AE como controles. Para determinar la viabilidad se eliminó el medio de cultivo, se adicionaron 20 µl de MTT (5 mg/mL) en cada pozo y la placa se incubó 4 h a 37°C. La intensidad del color de la reacción se determinó por espectrofotometría (Multiskan Go., Thermo Scientific) a longitud de onda de 580 nm. El valor de densidad óptica se consideró proporcional a la viabilidad celular y se estimó referente a 100 % de las células no tratadas.

## Ensayo de condensación de cromatina

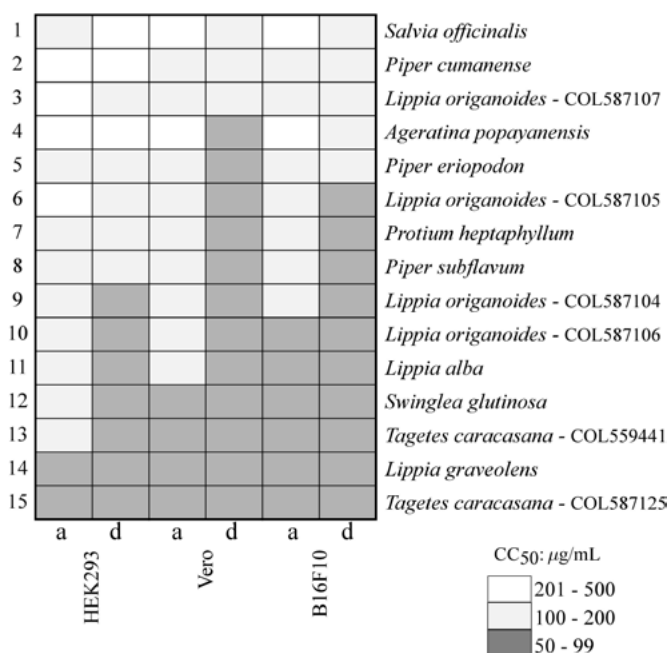
La condensación de cromatina se usó como indicador de actividad antiproliferativa. Brevemente, 8000 células en medio de cultivo que contenía AE (50 µg/mL) se depositaron en micropocillos de placas de vidrio. Las placas se incubaron 24 h a 37°C en atmósfera CO<sub>2</sub> 5%; al término, las células se fijaron con *p*-formaldehído por 10 min y después de varios lavados con tampón fosfato salino se adicionó colorante Hoechst-33342 (Sigma-Aldrich, 5 µg/mL). Las placas se incubaron 15 min a 37 °C en oscuridad y enseguida se examinaron en un microscopio de inmunofluorescencia (Ex 450 - 490; cámara Nikon P6000). Células con cromatina condensada se contaron como porcentaje del número total de células teñidas con Hoechst-33342. En cada experimento se incluyeron células no tratadas y tratadas con ectoposide (Sigma-Aldrich: 250 µM)] como controles. Cada AE se analizó por duplicado en tres experimentos independientes.

### Análisis de datos

Los datos de ensayos del MTT obtenidos en células cancerosas de interés (HeLa, MCF-7 y HepG-2) se expresaron como concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>). Los datos con las otras células como concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>). El índice de selectividad (IS) fue la proporción entre CC<sub>50</sub> en la célula normal (HEK293) y CI<sub>50</sub> en la cancerosa. Los valores de CI<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> se calcularon por regresión lineal simple usando el programa R (R Development Core Team, 2013). La significancia de la diferencia entre datos del ensayo de condensación de cromatina se determinó por ANOVA y prueba de Tukey.

### RESULTADOS

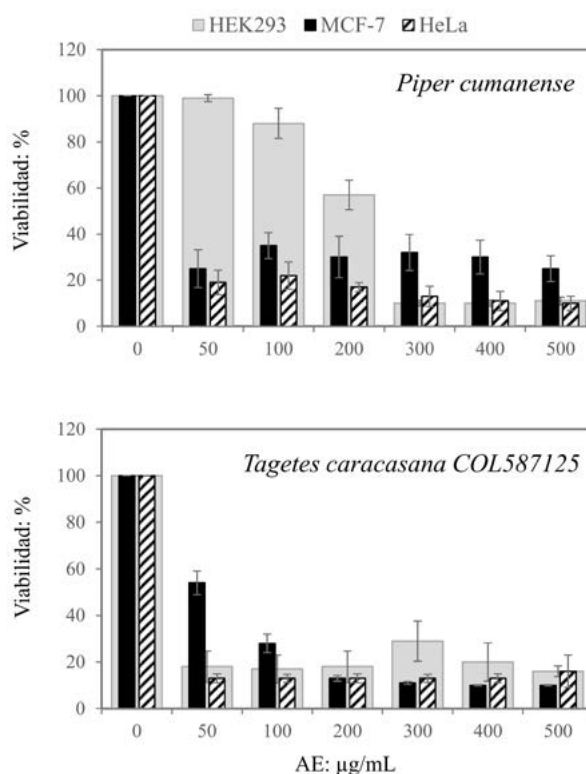
Los AEs variaron en su habilidad para afectar la viabilidad de células distintas a las cancerosas de interés, rangos de CC<sub>50</sub> de 500-201 µg/mL, 200-100 µg/mL y 99-50 µg/mL indicaron citotoxicidad baja, media y alta, respectivamente, según lo sugerido por otros (Cos *et al.*, 2006; Mazzió y Soliman, 2009). Como se presenta en Fig. 1, los cinco AEs menos citotóxicos fueron en el siguiente rango: *S. officinalis* < *P. cumanense* < *L. origanoides* (especimen COL587107) < *A. popayanensis* < *P. eriopodon*. Los cinco más citotóxicos fueron: *T. caracasana* (especimen COL587125) > *L. graveolens* > *T. caracasana* COL559441 > *S. glutinosa* > *L. alba*.



**Figura 1. Perfiles de citotoxicidad de los AEs analizados.** Células de riñón humano (HEK293), riñón de mono (Vero) y melanoma de ratón (B16F10) se trataron antes (a) y después (d) de proliferación. Los AEs aparecen organizados de menor a mayor citotoxicidad con base en valores de CC<sub>50</sub> (Tabla 1 suplementaria). Citotoxicidad es menor cuanto menor intensidad de color.

No hay acuerdo sobre los valores de CI<sub>50</sub> e IS indicando actividad antiproliferativa *in vitro* relevante. Se ha sugerido (Mazzió y Soliman, 2009; Ferraz *et al.* 2013) que valores de CI<sub>50</sub> menores que 100 µg/mL e IS mayores que 3.0 se podrían usar para seleccionar muestras vegetales activas. Con base en este criterio, la actividad antiproliferativa en este estudio se categorizó como relevante (CI<sub>50</sub>=50 µg/mL; IS ≥4.0), moderada (CI<sub>50</sub>=50 µg/mL; IS=3.9-3.1) o irrelevante (CI<sub>50</sub>=50 µg/mL; IS <3.1). Valores CI<sub>50</sub> >50 µg/mL indicaron inactividad. La Fig. 2 muestra resultados representativos del ensayo del MTT y la Tabla 2 presenta los valores de CI<sub>50</sub>.

Los AEs variaron con respecto al grado de actividad en las células cancerosas (Fig. 3). AE de *P. cumanense* presentó actividad antiproliferativa relevante (CI<sub>50</sub>=50 µg/mL; IS=4.7) en células MCF-7 y HeLa; AEs de *P. subflavum*, *S. officinalis* y *P. eriopodon* actividad moderada (IS=3.9 y 3.6) en células MCF-7; y AEs de *P. heptaphyllum* y *T. caracasana* (especimen COL587125) actividad irrelevante (CI<sub>50</sub>=50 µg/mL; IS=2.9 y 1.0). El AE de *L. alba* fue el más activo en células HepG-2 con



**Figura 2. Efecto sobre la viabilidad celular de AEs analizados.** Reducción de la viabilidad celular en ensayos del MTT dependiendo de la concentración de AE. *P. cumanense* presentó actividad antiproliferativa relevante: a concentración de 50 µg/mL redujo >50 % la viabilidad de las células cancerosas (MCF-7, HeLa) pero no la célula normal (HEK293). *T. caracasana* presentó actividad antiproliferativa irrelevante: a concentración de 50 µg/mL redujo >50 % la viabilidad de las células cancerosas y la normal.

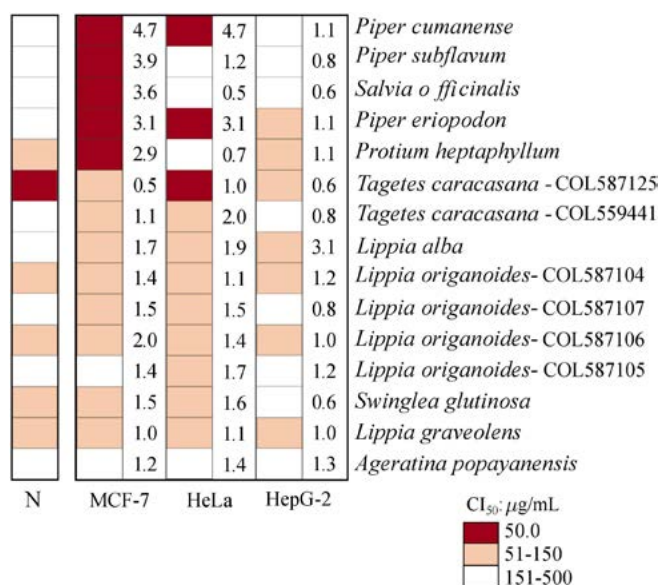
**Tabla 2.** Valores de  $CI_{50}$  de los aceites esenciales analizados.

| Aceite esencial                           | Normal: HEK293 | Cancerosas |            |             |
|---|----------------|------------|------------|-------------|
|   |                | HepG-2     | MCF-7      | HeLa        |
| <i>Piper cumanense</i>                    | 233 ± 3,4      | 210 ± 20,0 | 50,0       | 50,0        |
| <i>Piper eriopodon</i>                    | 153 ± 9,9      | 140 ± 24,2 | 50,0       | 50,0        |
| <i>Piper subflavum</i>                    | 193 ± 16,3     | 249 ± 1,1  | 50,0       | 162 ± 13,8  |
| <i>Salvia officinalis</i>                 | 181 ± 34,7     | 320 ± 72,7 | 50,0       | 370 ± 109,1 |
| <i>Protium heptaphyllum</i>               | 144 ± 19,6     | 140 ± 11,8 | 50,0       | 196 ± 6,8   |
| <i>Tagetes caracasana</i> COL587125       | 50,0           | 88 ± 7,8   | 100 ± 17,9 | 50,0        |
| <i>Tagetes caracasana</i> COL559441       | 162 ± 14,1     | 220 ± 26,4 | 140 ± 62,2 | 80 ± 29,3   |
| <i>Swinglea glutinosa</i>                 | 119 ± 34,1     | 200 ± 16,9 | 81 ± 5,6   | 73 ± 7,7    |
| <i>Lippia alba</i> (citral)               | 167 ± 14,6     | 54 ± 7,3   | 100 ± 37,6 | 86 ± 4,7    |
| <i>Lippia graveolens</i>                  | 90 ± 18,1      | 86 ± 3,9   | 88 ± 2,1   | 80 ± 12,7   |
| <i>Lippia origanoides</i> COL587104       | 106 ± 8,0      | 87 ± 2,2   | 80 ± 11,9  | 99 ± 3,8    |
| <i>Lippia origanoides</i> COL587105       | 242 ± 33,7     | 200 ± 27,6 | 170 ± 19,2 | 150 ± 6,1   |
| <i>Lippia origanoides</i> COL587106       | 137 ± 3,4      | 140 ± 7,9  | 68 ± 4,9   | 100 ± 19,2  |
| <i>Lippia origanoides</i> COL587107       | 204 ± 12,9     | 260 ± 32,3 | 130 ± 22,5 | 138 ± 3,1   |
| <i>Ageratina</i> aff. <i>popayanensis</i> | 237 ± 27,0     | 190 ± 30,0 | 196 ± 7,2  | 174 ± 3,2   |

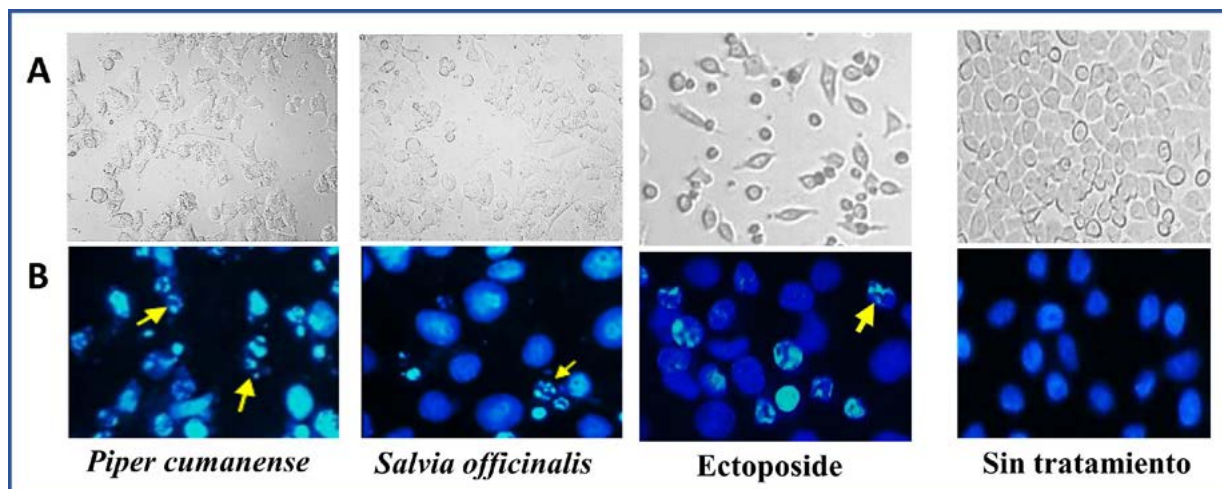
Datos ( $\mu\text{g/mL}$ ) se presentan como promedio  $\pm$  DS de tres ensayos independientes por duplicado. 50.0: concentración mínima que redujo más de 50% la viabilidad celular con respecto al control (no-tratado).

$CI_{50}$  ( $54 \pm 7.3 \mu\text{g/mL}$ ) e IS (3.1) cercanos al punto de corte. En un intento de corroborar actividad relevante y moderada, las células tratadas con los AEs de *P. cumanense* y *S. officinalis* se tiñeron con Hoechst para evidenciar condensación de cromatina (Fig. 4): con *P. cumanense* se observó mayor frecuencia de células con cromatina condensada respecto a las no-tratadas:  $55 \pm 3.7\%$  vs.  $15 \pm 3.7\%$  ( $p < 0.01$ ) y con *S. officinalis* la diferencia no fue significativa ( $19 \pm 2.4\%$  vs.  $15 \pm 3.7\%$ ;  $p > 0.05$ ).

De acuerdo a los perfiles de actividad antiproliferativa presentados en la Fig. 3, los AEs de cinco especies resultaron inactivos ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ). Con muestras diferentes de AEs pero de la misma especie se observaron diferencias: *T. caracasana*, un AE afectó en alto grado ( $CI_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$ ) la célula cancerosa y normal sugiriendo alta toxicidad pero el otro ejemplar mostró menor afectación tanto de células tumorales como de la normal ( $CI_{50} = 220-80 \mu\text{g/mL}$ ); *L. origanoides*, el AE del espécimen COL587104 (planta de Bucaramanga) fue el que más afectó la viabilidad de células cancerosas y normal ( $CI_{50} = 106-80 \mu\text{g/mL}$ ) y al contrario el AE del espécimen COL587105 (planta de Girón) ( $CI_{50} = 150-242 \mu\text{g/mL}$ ). Los AEs de *S. glutinosa* ( $CI_{50} = 73-200 \mu\text{g/mL}$ ) y *L. graveolens* ( $CI_{50} = 80-90 \mu\text{g/mL}$ ) afectaron en igual grado células cancerosas y normal. El AE de *Ageratina popayanensis* fue el único que afectó en bajo grado ( $CI_{50} = 190-237 \mu\text{g/mL}$ ) células cancerosas y las no cancerosas.



**Figura 3.** Perfiles de actividad antiproliferativa de los AEs analizados. Células cancerosas (MCF-7, HeLa, HepG-2) y células normales de riñón humano embrionario (N: HEK293). Números en los recuadros son índices de selectividad ( $IS = CC_{50} \text{ HEK293} / CI_{50} \text{ célula cancerosa}$ ; Tabla 2). Valores de  $CI_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$  indicaron actividad relevante ( $IS > 4.0$ ), moderada ( $IS = 3.1-4.0$ ) o irrelevante ( $IS < 3.1$ ). Valores de  $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$  indicaron inactividad.



**Figura 4. Condensación de cromatina en células MCF-7 tratadas con AE (50 µg/mL).** Arriba: fotografías de cultivos celulares en fresco. Abajo: fotografías de células teñidas con Hoechst 33342 presentando condensación de cromatina (flecha).

### Composición química de los AEs

La Tabla 3 presenta la composición química de los AEs con actividad antiproliferativa relevante y moderada. La mayoría de compuestos fueron monoterpenos y sesquiterpenos. El 62 % del contenido del AE de *P. cumanense* está constituido de seis compuestos, linalol (37,2 %) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (8,8 %) son los mayoritarios; el 60 % de *P. subflavum* de cinco compuestos,  $\alpha$ -pineno (18,9%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (15,9 %) y  $\beta$ -pineno (13,2 %) son los mayoritarios; el 63 % del AE de *P. eripopodon* corresponde a cinco compuestos,  $\alpha$ -pineno (18,6 %),  $\beta$ -pineno (16,1 %) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (11,6 %) son los mayoritarios; y el 71.4 % del contenido del AE de *S. officinalis* corresponde a seis compuestos, 1,8-cineol (26.6 %) y  $\alpha$ -tujona (18.1 %) son los mayoritarios.

### DISCUSIÓN

La selectividad es una propiedad tenida en cuenta al momento de seleccionar muestras vegetales para investigación en medicamentos para el cáncer (Ferraz *et al.* 2013; Harvey *et al.*, 2015). Dado que el uso de ratones de laboratorio tiene limitaciones, los ensayos en células surgen como una alternativa para predecir selectividad (Xia *et al.*, 2008). En este estudio se generaron perfiles de citotoxicidad en células cancerosas de interés, células humanas normales y células de órganos blanco (riñón y piel) de animales seleccionados para evaluación toxicológica. Con las primeras se pretendió evaluar actividad antiproliferativa y con las segundas selectividad. La estrategia sirvió para identificar los AEs de especies de *Piper* y *Salvia officinalis* como los más citotóxicos para células cancerosas y los menos para las no cancerosas. La estrategia podría robustecerse evaluando simultáneamente otros indicadores de viabilidad celular e incluyendo otras líneas celulares de órganos normales y blanco de análisis toxicológico como cerebro, hígado y piel.

El género *Piper* L. incluye cerca de 2000 especies y al menos 36 son nativas de América (Giovannini y Howes, 2017). En Colombia estas plantas se conocen con los nombres de cordoncillos o anises y 38 tienen reporte de uso medicinal (Bernal *et al.*, 2011; Fonnegra y Villa, 2011). No se encontraron estudios evidenciando actividad antiproliferativa de muestras preparadas a partir de las plantas colombianas, pero sí de al menos 16 especies cultivadas en otros países (Kumar *et al.*, 2015). Los AEs de especies de *Piper* incluidos en este estudio presentaron actividad antiproliferativa en células MCF-7 y HeLa sugiriendo potencial anticancerígeno. Es conocido que las diversas actividades biológicas de los AEs se explican por la acción de los compuestos que contienen (Pandey *et al.*, 2017). El análisis por cromatografía identificó  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno y pineno ( $\alpha$  y  $\beta$ ) como constituyentes mayoritarios de los AEs de *Piper*. Se ha demostrado que el  $\beta$ -cariofileno y óxido de cariofileno tienen potente actividad anticancerígena (Fidy *et al.*, 2016); y el  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pinene y otros monoterpenos inhiben la proliferación de una amplia variedad de células cancerígenas (Zhao *et al.*, 2017; Scotti *et al.*, 2017). El linalol se identificó como el componente mayoritario (37 %) del AE de *P. cumanense* y esto podría explicar su baja citotoxicidad observada en células humanas renales (HEK293) y hepáticas (HepG-2). En un estudio se demostró que el linalol no causó hepatotoxicidad en ratones de laboratorio (Jana *et al.* 2014). El potencial farmacológico de especies de *Piper* es bien reconocido, del extracto de *P. nigrum* Carlos L. se aisló piperina un alcaloide con potente actividad antitumoral (Wang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016).

Del género *Salvia* al menos 66 especies tienen uso medicinal en Colombia, *S. officinalis* se conoce con el nombre de salvia (Bernal *et al.*, 2011). No se encontraron estudios

Tabla 3. Composición química de los AEs con actividad antiproliferativa.

| Compuesto                            | LIR  | <i>Piper cumanense</i> |      | <i>Piper subflavum</i> |      | <i>Piper eriopodon</i> |      | <i>Salvia officinalis</i> |      |
|--------------------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|------------------------|------|---------------------------|------|
|                                      |      | IR                     | %    | IR                     | %    | IR                     | %    | IR                        | %    |
| Linalol                              | 1096 | 1101                   | 37,2 | 1100                   | 0,8  | 1100                   | 0,8  | -                         | -    |
| <i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno  | 1436 | 1436                   | 8,8  | 1435                   | 15,9 | 1435                   | 11,6 | 1444                      | 7,3  |
| <i>trans</i> -Nerolidol              | 1563 | 1566                   | 5,8  | -                      | -    | 1566                   | 0,2  | -                         | -    |
| $\alpha$ -Copaeno                    | 1387 | 1388                   | 5,4  | 1386                   | 9,2  | 1387                   | 5,5  | -                         | -    |
| Piperitona                           | 1254 | 1262                   | 4,6  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| Dilapiol                             | 1620 | 1628                   | 3,9  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| Óxido de cariofileno                 | 1600 | 1601                   | 3,6  | 1599                   | 10,5 | 1600                   | 10,8 | -                         | -    |
| $\alpha$ -Pinoeno                    | 939  | 939                    | 0,9  | 937                    | 18,9 | 936                    | 18,6 | 942                       | 2,1  |
| $\beta$ -Pinoeno                     | 979  | 979                    | 0,5  | 982                    | 13,2 | 982                    | 16,1 | 985                       | 3,9  |
| 1,8-Cineol                           | 1032 | -                      | -    | -                      | -    | -                      | -    | 1041                      | 26,6 |
| $\alpha$ -Tujona                     | 1117 | -                      | -    | -                      | -    | -                      | -    | 1116                      | 18,8 |
| Viridiflorol                         | 1612 | -                      | -    | -                      | -    | 1603                   | 1,7  | 1622                      | 8,0  |
| Alcanfor                             | 1146 | 1146                   | 1,7  | -                      | -    | -                      | -    | 1157                      | 6,0  |
| $\alpha$ -Humuleno                   | 1472 | 1472                   | 1,0  | -                      | -    | 1472                   | 1,1  | 1478                      | 5,4  |
| Limoneno                             | 1030 | 1029                   | 0,6  | 1032                   | 0,5  | 1033                   | 1,0  | -                         | -    |
| Terpinoleno                          | 1087 | 1089                   | 0,7  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| Germacreno D                         | 1495 | 1500                   | 1,0  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| Canfeno                              | 954  | 954                    | 0,3  | -                      | -    | 954                    | 0,3  | 957                       | 1,4  |
| $\alpha$ -Terpineno                  | 1017 | 1020                   | 0,6  | -                      | -    | -                      | -    | 1065                      | 0,8  |
| <i>p</i> -Cimeno                     | 1024 | 1028                   | 1,9  | 1027                   | 0,7  | -                      | -    | -                         | -    |
| $\gamma$ -Terpineno                  | 1059 | 1089                   | 0,7  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| $\alpha$ -Terpineol                  | 1190 | 1201                   | 0,7  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| $\gamma$ -Muroleno                   | 1479 | 1487                   | 0,5  | -                      | -    | 1487                   | 0,2  | -                         | -    |
| Pentadecano                          | 1500 | 1501                   | 1,1  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| <i>epi</i> -Zoraneno                 | 1501 | 1507                   | 0,6  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| $\alpha$ -Muroleno                   | 1504 | 1510                   | 1,0  | -                      | -    | 1509                   | 1,3  | -                         | -    |
| $\gamma$ -Cadineno                   | 1517 | 1527                   | 1,7  | -                      | -    | 1529                   | 0,7  | -                         | -    |
| $\delta$ -Cadineno                   | 1523 | 1530                   | 2,6  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| <i>cis</i> -Calameneno               | 1529 | 1535                   | 0,3  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| <i>epi</i> -1-Cubenol                | 1647 | 1644                   | 0,7  | -                      | -    | -                      | -    | -                         | -    |
| Sabineno                             | 973  | -                      | -    | -                      | -    | -                      | -    | 980                       | 0,5  |
| <i>p</i> -Cimeno                     | 1088 | -                      | -    | -                      | -    | 1028                   | 1,1  | -                         | -    |
| $\beta$ -Mirceno                     | 989  | -                      | -    | -                      | -    | 990                    | 0,2  | 993                       | 2,4  |
| Espatuleno                           | 1576 | -                      | -    | 1593                   | 1,7  | -                      | -    | -                         | -    |
| Heptanal                             | 901  | -                      | -    | 901                    | 0,5  | 901                    | 0,3  | -                         | -    |
| $\Delta^3$ -Careno                   | 1011 | -                      | -    | 1011                   | 0,8  | 1012                   | 1,0  | -                         | -    |
| Pinocarveol                          | 1139 | -                      | -    | -                      | -    | 1149                   | 0,7  | -                         | -    |
| Pinocarvona                          | 1164 | -                      | -    | -                      | -    | 1170                   | 0,5  | -                         | -    |
| Mirtenal                             | 1195 | -                      | -    | 1202                   | 0,5  | 1204                   | 0,8  | -                         | -    |
| Acetato de bornilo                   | 1288 | -                      | -    | 1289                   | 0,5  | 1291                   | 0,8  | -                         | -    |
| Acetato de mirtenilo                 | 1326 | -                      | -    | 1327                   | 0,8  | 1329                   | 1,1  | -                         | -    |
| <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno | 1434 | -                      | -    | -                      | -    | 1442                   | 0,5  | -                         | -    |
| Aromadendreno                        | 1464 | -                      | -    | -                      | -    | 1454                   | 0,9  | -                         | -    |
| allo-Aromadendreno                   | 1478 | -                      | -    | -                      | -    | 1476                   | 1,4  | -                         | -    |
| $\beta$ -Selineno                    | 1509 | -                      | -    | -                      | -    | 1505                   | 1,5  | -                         | -    |
| $\alpha$ -Selineno                   | 1517 | -                      | -    | -                      | -    | 1510                   | 0,2  | -                         | -    |
| $\alpha$ -Calacoreno                 | 1548 | -                      | -    | -                      | -    | 1556                   | 0,2  | -                         | -    |
| Sesquiterpenol                       | NR   | -                      | -    | -                      | -    | 1962                   | 11,4 | -                         | -    |
| Manol                                | NR   | -                      | -    | -                      | -    | -                      | -    | 2094                      | 1,3  |

LIR: índice de retención reportado en la literatura. IR: índice de retención experimental. -: no detectado.

evidenciando actividad antiproliferativa de muestras de estas especies. En países alrededor del mundo varias especies se usan en la medicina tradicional (Baricevic y Bartol, 2000). Se ha reportado que el AE inhibe células leucémicas y de cánceres de colon, mama y pulmón (García *et al.*, 2016) y el desarrollo de tumor en ratones de laboratorio (Bonesia *et al.*, 2017). El AE de *S. officinalis* incluido en este estudio presentó actividad antiproliferativa en células MCF-7 sugiriendo potencial anticancerígeno. El 46 % de su contenido está constituido de 1,8-cineol,  $\alpha$ -tujona y  $\beta$ -cariofileno. En una muestra extraída de una planta del Valle del Cauca se encontraron  $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -copaeno como los constituyentes mayoritarios (Saldarriaga *et al.*, 2009) y los mismos terpenos se identificaron en AEs de plantas de otros países (Cvetkovikj *et al.*, 2015). La actividad antiproliferativa del AE puede deberse a la presencia de estos terpenos, el 1-8-cineol mostró eficacia para inhibir el desarrollo de cáncer colorectal en ratones (Murata *et al.*, 2013) y de los otros terpenos existe evidencia de la actividad anticancerígena como se mencionó.

## CONCLUSIONES

En este estudio se pretendió identificar especies de plantas de la medicina popular colombiana apropiadas para investigar en medicamentos para cáncer de mama, cervical y hepatocelular. Se estudió la actividad antiproliferativa de sus AEs y se identificaron los componentes químicos de las muestras activas usando GC-MS. El estudio tiene limitaciones, la actividad observada en el ensayo del MTT no se confirmó con otro ensayo y no se investigaron los mecanismos moleculares de inhibición de la proliferación celular. No obstante, los resultados aportan conocimiento nuevo sobre el potencial farmacológico de la flora colombiana, específicamente, de AEs de *P. cumanense*, *P. subflavum* var. *espejuelanum*, *P. eriopodom* y *S. officinalis*. Las muestras de estas especies pueden servir como puntos de partida para desarrollo de medicamentos herbales y descubrimiento de fármacos para tratamiento paliativo y curativo del cáncer de mama y cáncer cervical.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Patrimonio Autónomo del Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas (Colciencias, Contrato RC-0572-2012). El material vegetal utilizado fue proveído por el Estado Colombiano. Permiso de colecta: contrato N° 101 del 3 de junio de 2014 (Resolución N° 081 del 4 de junio de 2014) suscrito entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

- Aguillón Osma J, Maldonado ME, Loango C Nelsy, Arango V Sandra Sulay, Landázuri P. Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice *Passiflora edulis*. *Perspect Nut Hum*. 2013;15(1):13-25.
- Babushok V, Linstrom P, Zenkevich I. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *J Phy Chem Ref Data*. 2011;40,43101 Doi:10.1063/1.3653552.
- Baricevic D, Bartol T. The biological pharmacological activity of the *Salvia* genus. *Phytomedicine*. 2000;12(1-2):143-184. Doi:10.1016/j.phymed.2004.06.005.
- Bernal H Y, Garc H, Quevedo F, editors. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. Bogotá: Instituto Alexander Von Humboldt, Colombia. 2011, 232 p.
- Bonesi M, Loizzo M, Acquaviva R, Malfa GA, Aiello F, Tundis R. Anti-inflammatory and antioxidant agents from *Salvia* genus (Lamiaceae): An assessment of the current state of knowledge. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2017; 16(2):70-86. Doi:10.2174/1871523016666170502121419.
- Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils: A review. *J Sci Food Agr*. 2013;93(15):3643-3653. Doi:10.1002/jsfa.6267.
- Brehehy D, Oke O, Faux S. The use of in vitro systems to assess cancer mechanisms and the carcinogenic potential of chemicals. *Altern Lab Anim*. 2011;39(3):233-255.
- Cvetkovikj I, Stefkov G, Karapandzova M, Kulevanova S, Satović Z. Essential oils and chemical diversity of southeast European populations of *Salvia officinalis* L. *Chem Biodivers*. 2015;12(7):1025-1039. Doi:10.1002/cbdv.201400273.
- Cos P, Vlietinck A, Berghe D, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept." *J Ethnopharmacol*. 2006;106(3):290-302. Doi:10.1016/j.jep.2006.04.003.
- Davies NW. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *J Chromatogr*. 1990;503:1-24. Doi:10.1016/S0021-9673(01)81487-4
- Dunn BK, Kramer BS. Cancer prevention: lessons learned and future directions. *Trends in Cancer*. 2016;2(12):713-722. Doi:10.1016/j.trecan.2016.11.003.
- Fidyk K, Fiedorowicz A, Strządala L, Szumny A.  $\beta$ -Caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med*. 2016;5(10): 3007-3017. Doi:10.1002/cam4.816.
- Fonnegra-Gómez R, Villa-Londoño J. Plantas medicinales usadas en algunas veredas de municipios del altiplano del Oriente Antioqueño, Colombia. *Actual Biol*. 2011; 33(95):219-250.



- Ferraz RP, Bomfim DS, Carvalho NC, Soares MB, da Silva TB, Machado WJ, *et al.* Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine*. 2013;20(7):615-621. Doi:10.1016/j.phymed.2013.01.015
- García C, Menti C, Lambert A, Barcellos T, Moura S, Calloni C, *et al.* Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): Antioxidant, and antitumor in mammalian cells. *An Acad Bras Cienc*. 2016;88(1):281-292. Doi:10.1590/0001-3765201520150344.
- Giovannini P, Howes M. Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *J Ethnopharmacology*. 2017;199:240-256. Doi:10.1016/j.jep.2017.02.011.
- Gómez M, Moreno L, Andrade G, Rueda C. Biodiversidad 2015: Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos. Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 2016. Doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Gupta, M. 2008. Plantas medicinales iberoamericanas. Primera edición. Editorial Quebecor World. Bogotá, D. C., Colombia. 1003 p.
- Harvey A, Edrada-Ebel R, Quinn R. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(2):111-129. Doi:10.1038/nrd4510.
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Available in: <http://www.humboldt.org.co/es/>. Consulted: 12 de Junio de 2017.
- INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Available in: <https://www.invima.gov.co/index.php>. Cited: 12 de Junio de 2017.
- Jana S, Patra K, Sarkar S, Jana J, Mukherjee G, Bhattacharjee S, *et al.* Antitumorogenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: an *in vivo* study in sarcoma-180 solid tumor model. *Nutr Cancer*. 2014;66(5):835-48. Doi: 10.1080/01635581.2014.904906
- Kumar S, Malhotra S, Prasad AK, Van der Eycken EV, Bracke ME, Stetler-Stevenson WG, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Piper* species: a perspective from screening to molecular mechanisms. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(9):886-93. Doi:10.2174/156802661566150220120651
- Lizcano L, Siles M, Trepiana J, Hernández ML, Navarro R, Ruiz-Larrea MB, *et al.* *Piper* and *Vismia* species from Colombian Amazonia differentially affect cell proliferation of hepatocarcinoma cells. *Nutrients*. 2015;7:179-195. Doi:10.3390/nu7010179
- Lesgards J, Baldovini N, Vidal N, Pietri S. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: A review. *Phytother Res*. 2014;28(10):1423-1446. Doi:10.1002/ptr.5165.
- Manion C, Widder R. Essential of essential oils. *Am J Health-Syst Pharm*. 2017;74 (9):e153-e162. Doi:10.2146/ajhp151043.
- Mass Spectral Libraries (NIST17 and Wiley Libraries). <http://www.sisweb.com/software/ms/wiley.htm>. Consultado en febrero 2017
- Mazzio E, Soliman K. *In vitro* Screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. *Phytother Res*. 2009;23(3):385-398. Doi:10.1002/ptr.2636.In.
- Miller K, Siegel R, Lin C, Mariotto A, Kramer J, Rowland J, *et al.* Cancer treatment and survivorship Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(4):271-289. Doi:10.3322/caac.21349.
- Murata S, Shiragami R, Kosugi C, Tezuka T, Yamazaki M, Hirano A, *et al.* Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. *Oncol Rep*. 2013;30(6):2647-52. Doi:10.3892/or.2013.2763.
- Palomino E, Maldonado C, Kempff, MB, Ksebati, MB. Caparratriene, an active sesquiterpene hydrocarbon from *Ocotea caparrapi*. *J Nat Prod*. 1996;59(1):77-79. Doi: 10.1021/np960012r
- Pandey AK, Kumar P, Singh P, Tripathi NN, Bajpai VK. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Front Microbiol*. 2017;16;7:2161. Doi:10.3389/fmicb.2016.02161
- R Studio Team. *R Studio: Integrated Development for R*. R Studio, Inc., Boston, MA. 2015. Available in: <http://www.rstudio.com/>.
- Saldarriaga L, Sánchez G, Bonilla C, Sánchez M, Torres H. Evaluación agroindustrial de los aceites esenciales de *Artemisia dracunculoides* L, *Franseria artemisioides* Willd, *Salvia officinalis* L, *Lippia dulcis* Frev, y *Occimum americanum* L en condiciones del Valle del Cauca. *Acta Agronómica*. 2010;59(3):293-302.
- Scotti L, Mendonca F, Ribeiro F, Tavares J, Da Silva M, Barbosa Filho J, *et al.* Natural product inhibitors of topoisomerases: review and docking study. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(12). Doi:10.2174/138920371866617011114442.
- Shareef M, Ashraf M, Sarfraz M. Natural cures for breast cancer treatment. *Saudi Pharm J*. 2016;24(3):233-240. Doi:10.1016/j.jsps.2016.04.018.
- Stashenko E, Martínez J, Cala M, Durán D, Caballero D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *J Sep Sci*. 2013;36(1):192-202. Doi:10.1002/jssc.201200877.
- Sobral M, Xavier A, Lima T, de Sousa D. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *Sci World J*. 2014;2014:953451. Doi:10.1155/2014/953451.
- Velandia S, Flechas M, Stashenko E, Ocazonez R. Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Vitae*. 2016;23(1):18-29. Doi:10.17533/udea.vitae.v23n1a03.

Wang Y, Morris-Natschke S, Yang J, Niu H, Long C, Lee K. Anticancer principles from medicinal *piper* (胡椒 Hú Jiāo) Plants. *J Tradit Complement Med.* 2014;4(1):8-16. Doi:10.4103/2225-4110.124811.

Zhao Y, Chen R, Wang Y, Yang Y.  $\alpha$ -Pinene inhibits human prostate cancer growth in a mouse xenograft model. *Chemotherapy.* 2017;63(1):1-7. Doi:10.1159/000479863.

Zheng J, Zhou Y, Li H-B. Spices for prevention and treatment of cancers. *Nutrients.* 2016; 8(8):495. Doi:10.3390/nu8080495.

Xia M, Huang R, Witt K, Southall N, Fostel J, Cho M, *et al.* Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ Health Perspect.* 2014;16:284-291. Doi:10.1289/ehp.10727.