

Especialización en Terapéuticas Alternativas y Farmacología Vegetal



FUNDACIÓN UNIVERSITARIA
JUAN N. CORPAS

Educación y Salud de Calidad
con Sentido Social

Trabajo de grado

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y CITOTÓXICA DE
EXTRACTOS, FRACCIONES Y ACEITE ESCENCIAL OBTENIDOS DE LAS
HOJAS DE *Origanum vulgare*

LINA MARIA GODOY PEREZ
YEIMI JOHANNA GOMEZ IRIARTE
ANDREA CAROLINA LABORDE VELAIDES
ALVARO ALFONSO MAYORGA ISAZA

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y FARMACOLOGÍA
VEGETAL
BOGOTÁ
2022

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y CITOTÓXICA DE
EXTRACTOS, FRACCIONES Y ACEITE ESCENCIAL OBTENIDOS DE LAS
HOJAS DE *Origanum vulgare*

LINA MARIA GODOY PEREZ
YEIMI JOHANNA GOMEZ IRIARTE
ANDREA CAROLINA LABORDE VELAIDES
ALVARO ALFONSO MAYORGA ISAZA

ESTUDIO EXPERIMENTAL PRIMARIO OBSERVACIONAL, PARA OPTAR AL
TÍTULO DE ESPECIALISTAS EN TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y
FARMACOLOGÍA VEGETAL

ASESOR TEMÁTICO: LUIS MIGUEL POMBO OSPINA
INGENIERO QUÍMICO, MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS PONTIFICIA
UNIVERSIDAD JAVERIANA

COTUTOR: PAOLA BORREGO MUÑOZ
LICENCIADA EN QUIMICA, MS(c,) PhD (c)

ASESOR METODOLÓGICO: VÍCTOR HUGO FORERO SUPELANO
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA CLÍNICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y FARMACOLOGÍA
VEGETAL
BOGOTÁ
2022

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos en primera instancia a Dios Padre por la fortaleza y sabiduría que nos proporciona día a día, y por su Guía amorosa en este camino hacia el cumplimiento de nuestros sueños y objetivos de vida.

A nuestras familias por su apoyo decidido y amor incondicional en estos dos años de arduo trabajo, esfuerzo y dedicación.

También al Grupo de asesores de la Fundación Universitaria Juan N Corpas, quienes nos ha apoyado y guiado durante el desarrollo de este trabajo, especialmente a los Doctores Luis Miguel Pombo, Oscar Rodríguez, María Claudia Barrera, Paola Borrego, y al Grupo de docentes que durante estos dos años nos han brindado su saber y calidad humana.

A todos mil y mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pag. |
|---|-------------|
| GLOSARIO | 1 |
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1. OBJETIVOS | 8 |
| 1.1 OBJETIVO GENERAL | 8 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 8 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 9 |
| 2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA | 9 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 11 |
| 4. MARCO TEÓRICO | 13 |
| 4.1 GENERALIDADES DEL ORÉGANO | 13 |
| 4.2 DISTRIBUCIÓN EN COLOMBIA | 15 |
| 4.3 USOS TRADICIONALES | 16 |
| 4.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA | 16 |
| 4.4.1 COMPUESTOS VOLÁTILES | 16 |
| 4.4.2 COMPUESTOS FENÓLICOS | 20 |
| 4.5 TOXICOLOGÍA | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6 MICROORGANISMOS DE INTERÉS | 20 |
| 4.6.1 <i>Fusarium oxysporum</i> | 21 |
| 4.6.2 <i>Botrytis cinerea</i> : | 23 |
| 4.7 CÁNCER | 24 |
| 4.7.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER A NIVEL MUNDIAL | 24 |
| 4.7.2 BIOLOGÍA DEL CÁNCER | 28 |
| 4.7.3 CÁNCER DE PRÓSTATA | 29 |
| 4.7.4 CÁNCER DE MAMA | 29 |
| 4.7.5 TRATAMIENTO DEL CÁNCER Y <i>Origanum vulgare</i> | 30 |
| | |
| 5. METODOLOGÍA | 32 |
| | |
| 5.1 MATERIALES | 32 |
| | |
| 5.2 METODOLOGÍA | 33 |
| | |
| 6. DESARROLLO DEL PROYECTO | 34 |
| | |
| 6.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL | 34 |
| | |
| 6.2 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO | 34 |
| 6.2.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTES POLARIDADES | 34 |
| 6.2.2 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (AE) | 35 |
| 6.2.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO (FS) | 36 |
| 6.2.4 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL DE <i>Fusarium oxysporum</i> | 37 |
| 6.2.5 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE <i>Botrytis cinérea</i> | 38 |
| | |
| 7. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS) | 38 |
| | |
| 8. ANÁLISIS DEL DESARROLLO DEL PROYECTO | 39 |
| | |
| 8.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA | 39 |
| | |
| 8.2 CULTIVO Y TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS | 39 |
| | |
| 8.3 METODOLOGÍA ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 40 |
| | |
| 8.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 8.4.1 ANÁLISIS DE GC-MS | 40 |
| 8.4.2 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Botrytis cinérea</i> | 49 |
| 8.4.3 ACTIVIDAD CITOTÓXICA | 54 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| 9. CRONOGRAMA | 64 |
| 10. CONCLUSIONES | 65 |
| 11. RECOMENDACIONES | 66 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 67 |
| 13. ANEXOS | 75 |

LISTA DE TABLAS

| | Pag. |
|--|---------|
| Tabla 1. Actividad del aceite de orégano frente a principales patologías y microorganismos causantes | 19 |
| Tabla 2. Componentes extracto de petrol de <i>O. vulgare</i> obtenidos por GC-MS | 41, 42 |
| Tabla 3. Componentes extracto diclorometano de <i>O. vulgare</i> obtenidos por GC-MS | 43, 44 |
| Tabla 4. Componentes del aceite esencial de <i>O. vulgare</i> obtenidos por GC-MS | 44 - 47 |
| Tabla 5. Componentes del extracto por fluido super crítico de <i>O. vulgare</i> obtenidos por GC-MS | 47 - 49 |
| Tabla 6. Valores de IC ₅₀ (µg/mL) de fungicidas sobre <i>F. oxysporum</i> | 52 |
| Tabla 7. IC ₅₀ de extractos de <i>O. vulgare</i> sobre líneas celulares tumorales PC3, MDA-MB-231 y MCF7 | 55 |
| Tabla 8. Cronograma | 64 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Clasificación taxonómica <i>Origanum vulgare</i> | 14 |
| Figura 2. Partes aéreas de <i>O. vulgare</i> | 15 |
| Figura 3. Distribución del <i>O. vulgare</i> en Colombia | 15 |
| Figura 4. Exportación de <i>O. vulgare</i> en Colombia | 16 |
| Figura 5. Principales componentes de aceite esencial de <i>O. vulgare</i> | 17 |
| Figura 6. Efectos del aceite esencial de <i>O. vulgare</i> | 18 |
| Figura 7. Fusariosis humana | 22 |
| Figura 8. Número estimado de casos nuevos de cáncer para el 2020 ambos sexos a nivel mundial | 25 |
| Figura 9. Distribución mundial de casos nuevos de cáncer en ambos sexos para el 2020 según órgano afectado | 26 |
| Figura 10. Número de casos nuevos de cáncer en hombres y mujeres de todas las edades para el 2020 en Colombia | 26 |
| Figura 11. Número de casos nuevos de cáncer en mujeres de todas las edades para el 2020 en Colombia | 27 |
| Figura 12. Número de casos nuevos de cáncer en hombres de todas las edades para el 2020 en Colombia | 27 |
| Figura 13. Material vegetal de <i>O. vulgare</i> | 34 |
| Figura 14. Obtención de extractos en equipo tipo Soxhlet. a. EP y ET; b. DM; c. EM. | 35 |
| Figura 15. Obtención de extractos en rotaevaporador. a. Concentración en rotaevaporador. b. Extractos EP, ED, EM y EET | 35 |
| Figura 16. Obtención del AE por hidrodestilación. a. Material vegetal. b. Equipo de Hidrodestilación c. AE | 36 |

| | |
|--|--------|
| Figura 17. Obtención del extracto por FS. a. Equipo fluido supercrítico. b. Extracto FS | 36 |
| Figura 18. Distribución de los tratamientos para <i>Fusarium oxysporum</i> | 37 |
| Figura 19. Equipo de GC-MS a. Extractos b. Equipo Shimadzu® Nexis GC 2020 c. Cromatograma | 39 |
| Figura 20. Resultado análisis GC-MS de <i>O. vulgare</i> | 41 |
| Figura 21. Cajas excavadas con <i>F. oxysporum</i> y EET | 49 |
| Figura 22. Cajas excavadas con <i>F. oxysporum</i> y EP | 50 |
| Figura 23. Cajas excavadas con <i>F. oxysporum</i> y extracto por FS | 51 |
| Figura 24. Cajas excavadas con <i>F. oxysporum</i> y ED | 51 |
| Figura 25. Cajas excavadas con <i>F. oxysporum</i> y AE | 52 |
| Figura 26. Cajas excavadas con <i>F. oxysporum</i> y control | 52 |
| Figura 27. Cajas de Petri con <i>Botrytis cinerea</i> a. Control negativo b. EET. c. EP | 53 |
| Figura 28. Cajas de Petri con <i>B. cinerea</i> a. ED. b. Extracto por FS. c. AE | 53 |
| Figura 29. Resultados MTT en las diferentes líneas celulares tumorales. a. MCF-7 b. MDA-MB-231 c. PC3 d. DMSO | 54, 55 |
| Figura 30. Evaluación citotóxica de los extractos AE y FS de <i>O. vulgare</i> frente a la línea celular MDA-MB-231. a. Porcentaje de viabilidad celular. b. IC ₅₀ | 56, 57 |
| Figura 31. Evaluación citotóxica de los extractos EP, DM, ET, AE y FS de <i>O. vulgare</i> frente a la línea celular PC3. a. Porcentaje de viabilidad celular b. IC ₅₀ | 59, 60 |
| Figura 32. Evaluación citotóxica de los extractos AE y FS de <i>O. vulgare</i> frente a la línea celular MCF-7. a. Porcentaje de viabilidad celular b. IC ₅₀ | 62 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|--------|
| Anexo A. Tabla 8. IC ₅₀ de AE y FS de <i>O. vulgare</i> sobre línea celular tumoral MDA-MB-231 | 75 |
| Anexo B. Análisis estadístico de AE y FS de <i>O. vulgare</i> sobre línea celular tumoral MDA-MB-231 | 76 |
| Anexo C. IC ₅₀ de EP, DM, AE y FS de <i>O. vulgare</i> sobre línea celular tumoral PC3. | 77 |
| Anexo D. Análisis estadístico de EP, DM, AE y FS de <i>O. vulgare</i> sobre línea celular tumoral PC3 | 78, 79 |
| Anexo E. IC ₅₀ de AE y FS de <i>O. vulgare</i> sobre línea celular tumoral MCF-7 | 79, 80 |
| Anexo F. Análisis estadístico de AE y FS de <i>O. vulgare</i> sobre línea celular tumoral MCF-7 | 80, 81 |

GLOSARIO

ACEITE ESENCIAL (AE): Son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, provenientes de una misma familia química, terpenoides. Tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano. En condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos.

ANTIMICÓTICO: sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o provocar su muerte.

ANTIMICROBIANO: Sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos o parásitos. Basado en ello, los siguientes pueden referirse a agentes microbianos.

CÁNCER (CA): neoplasia caracterizada por el crecimiento incontrolado de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido circundante y metastatizar a puntos distantes del organismo.

CITOTÓXICO: sustancia que tiene un efecto tóxico sobre determinadas células.

CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM): técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad.

ENSAYO MTT PARA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR: técnica utilizada para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal amarilla de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán púrpura por células metabólicamente activas. Las células viables contienen enzimas oxidorreductasa dependientes de NAD(P)H que reducen el MTT a formazán.

EXTRACCIÓN MEDIANTE CO₂ SUPERCRÍTICO (FSC): Los fluidos supercríticos son particularmente buenos disolventes debido a su capacidad para disolver sustancias de forma similar a los disolventes orgánicos, y debido a que su viscosidad y coeficiente de difusión son próximos a los de los gases, facilitando así las propiedades de transporte de estos fluidos. Además, puesto que la tensión superficial de los FSCs es igual a cero, estos fluidos son particularmente adecuados

para la extracción de sustancias contenidas en matrices sólidas. Otra ventaja en el uso de los FSCs es la posibilidad de cambiar su poder de solvatación por variaciones de la presión y / o temperatura del fluido, permitiendo así la extracción fraccionada de los solutos, y la recuperación completa del disolvente mediante simples ajustes de la presión.

EXTRACTO: Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.

FLAVONOIDES: metabolito secundario de las plantas de naturaleza fenólica que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6, los cuales pueden formar o no un tercer anillo. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los poliketidos y el B y la unidad C3 proceden de la ruta del ácido shikímico. Actúan protegiendo al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.

FLUIDO SUPERCRÍTICO (FS): sustancia que se encuentra en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico. El punto crítico representa la temperatura y la presión más elevadas a las que una sustancia puede existir como gas y como líquido en equilibrio.

HIDRODESTILACIÓN: método de extracción de aceites esenciales en el cual el material está sumergido en agua en ebullición, la característica principal de este proceso es el contacto directo del agua y el material del cual se extraerá el aceite esencial.

MCF-7: Línea celular de carcinoma ductal de mama, no invasiva, tiene receptores funcionales de estrógeno y EGF.

MDA-MB-231: Línea celular de cáncer de mama triple negativo (TNBC) altamente agresiva, invasiva y pobremente diferenciada, carece de la expresión del receptor de estrógeno (ER) y del receptor de progesterona (PR), así como de HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano).

MÉTODO SOXHLET: técnica de separación sólido-líquido comúnmente usada en la industria alimentaria y no alimentaria para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza. De igual modo, puede ser usada como técnica preparativa de muestra como paso previo al análisis mediante otra técnica instrumental.

Origanum vulgare (*O. vulgare*): más conocido como orégano, es una planta cuyo nombre deriva del griego oros y ganos que significan “adorno” o “alegría de la montaña”, haciendo referencia a su bonito aspecto y agradable aroma. Por su parte,

vulgare se refiere a la facilidad con la que puede ser encontrada. Esta planta pertenece al género *Origanum*, familia Lamiaceae.

PC3: Línea celular de cáncer de próstata

RESUMEN

Origanum vulgare, es una planta procedente de la región mediterránea predominantemente de Turquía, la cual es cultivada en nuestro país en la Región Andina. Es rica en metabolitos secundarios en especial terpenoides, predominando carvacrol y timol como los principales responsables de su potencial efecto citotóxico y antimicrobiano; lo anterior referenciado de estudios realizados en los últimos años en especial a partir de los aceites esenciales obtenidos principalmente de sus hojas, tallos y flores.

Entre los desafíos a los que nos enfrentamos en la actualidad y que se constituyen en un problema de salud pública, encontramos la resistencia a los antimicrobianos, la proliferación de patógenos emergentes para los cuales no se cuenta con protocolos de manejo definidos, la resistencia y fallo terapéutico a los tratamientos antitumorales convencionales.

Se puede observar que un amplio número de agentes antitumorales (74%), derivan de productos naturales; por otra parte, aproximadamente el 80% de la población mundial ha llegado a utilizar plantas para el tratamiento de diversas patologías. Por esto, se hace necesario explorar nuevas alternativas que permitan dar respuesta efectiva a estas necesidades en salud, para lo cual la farmacología vegetal se constituye en una herramienta terapéutica de gran interés y valor científico, dado las grandes potencialidades existentes en los metabolitos secundarios de las plantas.

En este contexto, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antifúngica y citotóxica de los extractos de diferentes polaridades, aceite esencial y extracto por fluido supercrítico obtenidos de las hojas de *Origanum vulgare*. Se realizó un estudio experimental en el que luego de adquirir el material vegetal, se obtienen los extractos etanólico total (EET), éter de petróleo (EP), de diclorometano (ED), y metanólico (EM), además del aceite esencial (AE) y el extracto por fluido supercrítico (FS). Se evaluó la acción antifúngica de los anteriores extractos a concentraciones de 500, 250, 100, 50 y 10 $\mu\text{g/mL}$ mediante el método de Kirby-Bauer de difusión en PDA con posterior medición del halo de crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*; y para *Fusarium oxysporum* se utilizó el ensayo de medio modificado a microescala. Se tuvo como control positivo el itraconazol y como blanco PDA con Tween 20 al 5%.

En paralelo se realizó la prueba de citotoxicidad en tres líneas celulares de cáncer: MDA-MB-231: Cáncer de mama, PC3: Cáncer de próstata y MCF-7: Cáncer de mama, a través del método del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT).

Como resultados se encontró que los extractos de diferentes polaridades, el aceite esencial y el extracto por fluido supercrítico no presentan actividad antifúngica a las concentraciones evaluadas.

En cuanto al ensayo de citotoxicidad, solamente se pueden realizar comparaciones del AE y FS dado que estos extractos fueron realizados en las tres líneas celulares tumorales; los análisis para las líneas de cáncer de mama con relación a EP, DM y ET no se realizaron en este estudio. Se evidenció que el AE y FS presentan mayor especificidad para la línea celular PC3 al comparar con las líneas MDA-MB-231 y MCF-7. Este efecto citotóxico puede asociarse a la presencia de metabolitos secundarios encontrados en el análisis por CG-EM los cuales mostraron que el compuesto mayoritario presente en AE, FS, EP y DM corresponde a carvacrol, y en menor proporción otros compuestos como timol, eucaliptol y cariofileno.

Palabras clave: *Origanum vulgare*, actividad antifúngica, actividad citotóxica, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*.

INTRODUCCIÓN

La farmacología vegetal a través de la historia de la humanidad, se ha constituido en una herramienta terapéutica que le ha permitido al hombre afrontar los problemas de salud, a partir de un conocimiento que, en la mayoría de las veces, se ha transmitido de generación en generación a través de la tradición oral; fenómeno particularmente observado en los pueblos indígenas de Latinoamérica, donde se conjugan la cosmovisión del mundo con los saberes médicos propios, la herbolaria, las condiciones climáticas y pisos térmicos que determinan procesos de atención a la morbilidad sentida por las comunidades en su interior. Conocimiento que ha trascendido desde los pueblos indígenas, a comunidades campesinas, comunidades urbanas y hoy en día a las grandes multinacionales farmacéuticas, que cada vez exploran más en estos saberes ancestrales, nuevas formas y moléculas farmacológicas con diferentes fines.

Es así como la comunidad académica y científica desde el área de la medicina, se interesa por entender las acciones terapéuticas de diferentes productos obtenidos de plantas medicinales, realizando experimentación pura y clínica, con el objetivo de dar respuesta a las condiciones de enfermedad de la sociedad moderna que se ve afectada por diferentes factores de riesgo como el estrés, el sedentarismo, obesidad, exposición a diferentes fuentes de radiaciones, sustancias químicas, los propios alimentos, la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos, y el incremento progresivo de enfermedades como el cáncer en la población en general, hacen necesario que se estudien nuevas formas de abordar esta problemática.

Origanum vulgare a pesar de corresponder a una especie vegetal procedente de Turquía, está siendo cultivada en Colombia en especial en la región Andina, siendo empleada como condimento, pero también es una de las principales hierbas aromáticas de exportación. Se encuentran en el mercado productos carminativos para el manejo de afecciones gastrointestinales; su aceite esencial es comercializado en el país por su efecto antioxidante.

Dado que esta especie vegetal ha sido ampliamente estudiada entre otros por su potencial antimicrobiano y citotóxico, se constituye en una posibilidad fitoterapéutica considerando los efectos derivados de sus metabolitos secundarios.

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente mencionados, éste estudio busca evaluar la actividad antifúngica y citotóxica de extractos, aceite esencial y fluido supercrítico obtenidos a partir de las hojas de *Origanum vulgare*.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la **actividad antifúngica** y **citotóxica** de extractos, fracciones y el aceite esencial obtenidos a partir de las hojas de *Origanum vulgare*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1 Obtener **extractos de diferentes polaridades**, aceite esencial y fluido supercrítico de las hojas de la especie *Origanum vulgare*.

1.2.2 Evaluar la **actividad antifúngica** de extractos, aceite esencial y fluido supercrítico sobre los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinérea*.

1.2.3 Evaluar la **actividad citotóxica** de extractos, fracciones y el aceite esencial sobre diferentes líneas celulares tumorales.

1.2.4 Determinar la **composición química** por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) a los extractos que presentaron mayor actividad biológica.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Uno de los componentes que determinan la salud está dado por la seguridad alimentaria y la nutrición, la cual puede verse afectada en cuanto a la disponibilidad de alimentos, en lo referente a la producción agrícola, que a su vez puede perjudicarse de diversos patógenos entre los cuales encontramos a los hongos que ocasionan patologías que afectan la salud humana, haciendo necesario explorar y descubrir nuevos antimicóticos que controlen su reproducción y crecimiento. (1)

Estos hongos además de causar pérdidas económicas en la producción agrícola, afectan de forma directa la salud humana ocasionando enfermedades con compromiso local y sistémico, desde onicomiosis e infecciones de la piel hasta enfermedades invasivas multisistémicas. El incremento progresivo de la resistencia a los antifúngicos por parte de los hongos, se constituye en un riesgo para la salud humana, considerándose uno de los grandes desafíos para la atención en salud.(2)

En la actualidad las investigaciones se han enfocado en el desarrollo y descubrimiento de antifúngicos, contribuyendo significativamente a la reducción de la morbilidad y mortalidad asociadas a infecciones multirresistentes en la población mundial (3). Se estima que para el año 2050 como consecuencia de la resistencia antimicrobiana, se causarán alrededor de 300 millones de muertes prematuras y una pérdida de \$100 billones para la economía mundial.(4)

Otro de los problemas actuales de salud pública es el cáncer. Se considera que una de cada cinco personas en el mundo se enfrentará al diagnóstico de alguna neoplasia maligna a lo largo de su vida, y se prevé que el número de personas con cáncer se duplique para el año 2040 (Organización Mundial de la Salud, 2020). Siendo el cáncer una de las primeras cuatro causas principales de muerte prematura antes de los 70 años de edad en la mayoría de los países, se investiga en nuevas moléculas antitumorales más efectivas, con menos efectos secundarios que los tratamientos actuales.

Es aquí donde las plantas medicinales juegan un papel importante como alternativa para el manejo de enfermedades infecciosas causadas por diferentes agentes patógenos por su potencial efecto antimicrobiano, así como también se exploran sus propiedades antitumorales para el manejo de diferentes tipos de cáncer dado el aumento de casos de resistencia frente a los tratamientos actuales. Dentro de las plantas medicinales objeto de investigación se encuentra *Origanum vulgare* dado su potencial efecto antineoplásico, dado la presencia de metabolitos secundarios como carvacrol y timol. (2)

El *O.vulgare* ha demostrado tener efecto antifúngico, por lo que se podría constituir en una alternativa tanto para el control de hongos que afectan los cultivos como para el manejo de patologías ocasionados por estos en el ser humano. (1)

A partir de lo anteriormente mencionado, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

*¿Los extractos, aceite esencial y fluido supercrítico obtenidos a partir de las hojas de *Origanum vulgare* tienen efecto antifúngico y citotóxico?*

3. JUSTIFICACIÓN

El incremento progresivo de resistencia por parte de hongos, bacterias y virus a los tratamientos actuales, como producto del manejo indiscriminado de antifúngicos y antibióticos por la población en general, así como por los profesionales de la salud, hace que de manera continua se exploren nuevas moléculas que permitan realizar tratamientos efectivos, superando las barreras establecidas por los diferentes gérmenes patógenos.

De otro lado, los alimentos cada vez más se encuentran expuestos a sufrir contaminación desde que son cultivados, procesados, manufacturados y elaborados para el consumo humano por parte de diferentes microorganismos. Igualmente, el uso indiscriminado de herbicidas, fungicidas, plaguicidas hace que se presenten mecanismos de resistencia a los mismos dificultando el control de las plagas y permitiendo que microorganismos como los hongos, además de causar enormes pérdidas económicas en los cultivos, estén generando enfermedades emergentes en el ser humano de difícil manejo dado la ausencia de protocolos y la resistencia a los antifúngicos convencionales. Tal es el caso de la fusariosis enfermedad con compromiso local y multisistémico, y de las enfermedades causadas por *Botrytis cinérea*, las cuales estaban siendo generadoras de patologías de tipo alérgico, pero ya encontramos reporte de casos de otro tipo de afecciones a nivel pulmonar, constituyéndose en un desafío para el tratamiento médico.

Por otra parte, en los últimos años se ha hecho presente el incremento progresivo en los casos de cáncer a nivel mundial, evidenciando que a pesar del manejo realizado con herramientas como quimioterapia, radioterapia, cirugía, los casos en cuanto a fallas terapéuticas vienen en incremento, constituyéndose en una las primeras causas de muerte a nivel mundial. Para el año 2020, se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones, es decir, casi una de cada seis de las defunciones que se registran de acuerdo a lo informado por la Organización Mundial de la salud en su informe del 22 de febrero de 2022, es como consecuencia de una lesión neoplásica, siendo los tipos de cáncer más comunes los de mama, pulmón, colon y recto, y próstata. Según el informe de la base de datos en línea de GLOBOCAN de 2020, se prevé que el número anual de casos de cáncer en el mundo aumente de 19,3 millones en 2020 a 28,4 millones en 2025 (un aumento del 47% en comparación con 2020), de acuerdo a su distribución mundial en ambos sexos. Los primeros lugares de mortalidad a nivel mundial obedecen a cáncer de seno, de pulmón, colorrectal y de próstata.

Esta situación se ve reflejada en Colombia, donde para el año 2020 los primeros lugares de casos nuevos de cáncer están ocupados por el cáncer de mama, próstata, colorrectal y gástrico.

Es así como el *Origanum vulgare*, dado sus beneficios evidenciados en estudios realizados en diversos países, muestra un potencial efecto antifúngico y citotóxico, y dado que en nuestro país se están evidenciando zonas de cultivo de esta planta, se requiere explorar si las especies cultivadas en nuestro país cuentan con metabolitos secundarios que posean estas actividades, y se convierta en una alternativa para el manejo de las infecciones fúngicas y neoplasias.

4. MARCO TEÓRICO

El *Origanum vulgare*, más conocido como orégano, es una planta cuyo nombre deriva del griego oros y ganos que significan “adorno” o “alegría de la montaña”, haciendo referencia a su bonito aspecto y agradable aroma. Por su parte, *vulgare* se refiere a la facilidad con la que puede ser encontrada. Esta planta pertenece al género *Origanum*, familia *Lamiaceae*, y es procedente de la región mediterránea predominantemente en Turquía, y en la región Eurasia occidental y suroeste (3). También se ha introducido en América del Norte, donde crece en varios estados a lo largo de la costa este y oeste. (5)

Tanto los aceites esenciales de la planta como diferentes extractos presentan actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, citotóxica e hipolipemiente. (6)

Diferentes metabolitos han sido los responsables de los efectos antes descritos de *O. vulgare*. La composición y calidad de los metabolitos puede verse afectada por las condiciones de crecimiento, etapa de madurez al momento de la recolección, factores ambientales, condiciones de estrés, tiempo de cosecha, métodos de secado, método de aislamiento del aceite esencial o incluso los solventes utilizados para el análisis. (6)

Los principales compuestos bioactivos responsables del efecto terapéutico del aceite esencial de *O. vulgare* en lo que tiene que ver con su actividad antibacteriana, antimicótica, antiviral e incluso antiparasitaria y citotóxica, corresponden a los terpenos en especial compuestos como timol, carvacrol, p- cimeno, γ - terpineno y linalol (7). Estos metabolitos han sido encontrados en tallos, flores y hojas de la planta. No obstante lo anterior, se puede evidenciar acción sinérgica anti-inflamatoria y antioxidante con flavonoides, taninos y glucósidos fenólicos. (8)

4.1 GENERALIDADES DEL ORÉGANO

4.1.1 PARTE UTILIZADA: Sumidades floridas (los extremos de las ramas que contienen flores y hojas) y los tallos.

4.1.2 NOMBRE CIENTÍFICO: *Origanum vulgare*

4.1.3 NOMBRES COMUNES: Orégano, Orégano Europeo, Orégano de España, mejorana silvestre, orégano silvestre.

4.1.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida
Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae
Subfamilia: Nepetoideae
Tribu: Mentheae
Género: *Origanum*
Especie: *Origanum vulgare* L. 1753 (Figura 1)



Figura 1. Clasificación taxonómica *Origanum vulgare*.
https://es.wikipedia.org/wiki/Origanum_vulgare

O. vulgare es una planta perenne con base leñosa, tallos herbáceos, altura promedio de 20 a 80 cm, con hojas opuestas en forma de “huevo” de tamaño variable entre 1 a 4 cm de largo y 0,5 a 2,5 cm de ancho, borde liso, variación en su punta que puede ser redonda o puntiaguda. Sus flores son de tamaño pequeño agrupadas en inflorescencias paniculadas, de color blanco o púrpura, y su corola consta de 5 pétalos unidos, con sépalos unidos, también fusionados (Figura 2). Se reconocen seis subespecies: *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*, subsp. *gracile*, subsp. *hirtum*, subsp. *virens*, subsp. *viridulum* y subsp. *vulgare*. Las tres primeras subespecies son típicas de la zona de distribución meridional de la especie y se consideran de alta calidad y ricas en aceites volátiles, a diferencia de las tres últimas subespecies que vegetan en regiones más septentrionales y son más pobres en aceites esenciales. (5)



Figura 2. Partes aéreas de *O. vulgare*. (9)

4.2 DISTRIBUCIÓN EN COLOMBIA

Los cultivos de *O. vulgare* se encuentran principalmente en el área Andina, principalmente en los departamentos de Valle, Cundinamarca, Antioquía y Norte de Santander (figura 3).



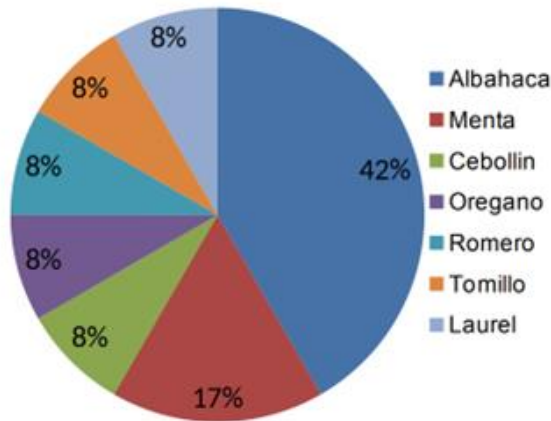
Figura 3. Distribución del *O. vulgare* en Colombia (SIB Colombia)

Por su biodiversidad, Colombia se ha convertido en exportador de diferentes plantas aromáticas (figura 4), principalmente se exporta a Canadá, Estados Unidos, Reino

Unido y Alemania. De los años 2012 - 2016 Colombia exportó 672 Toneladas. El orégano representa el 8% de las especies aromáticas objeto de exportación.

Las principales especies que exporta Colombia son en fresco y están priorizadas en el portafolio de exportación las siguientes:

PLANTAS AROMATICAS



Colombia tiene una participación inferior al 1% en las exportaciones mundiales de plantas aromáticas.

Colombia tiene acuerdos comerciales con Estados Unidos, Canadá y Unión Europea. Mercados demandante de estas especias.

Colombia exporta 75% principalmente a EEUU, Canadá el 10%, Inglaterra el 10% y 5 % otros destinos. EEUU es un país que estadísticamente se tiene identificado como el mayor importador de estas especias, hace compras de plantas aromáticas por más de 188 millones de dólares con un crecimiento anual del 9%

Figura 4. Exportación de *O. vulgare* en Colombia

4.3 USOS TRADICIONALES

El uso de *O. vulgare* ha sido referenciado desde la antigüedad de forma tradicional en el arte culinario, incluso mencionado en preservación de alimentos, sin embargo se reporta evidencia científica que incluye el manejo médico a múltiples patologías, lo que trae un interés especial por explorar las múltiples cualidades fitoquímicas y establecer los mecanismos de acción que puede tener frente a ciertas enfermedades, como gastrointestinales, respiratorias, además de su efecto antioxidante, antiinflamatorio, citotóxico, neuroprotector y el efecto antimicrobiano. (10,11)

4.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.4.1 COMPUESTOS VOLÁTILES

Dentro de estos encontramos los aceites esenciales (AE), los cuales son característicos en la planta, ya que conforman un método de protección contra las

plagas y microorganismos, así como también son de utilidad para atraer insectos de polinización y para el tratamiento de múltiples enfermedades. (12)

Mediante cromatografía de gases masas se ha logrado identificar la presencia desde cincuenta hasta ciento cincuenta y tres compuestos en el aceite esencial de *O. vulgare*, dependiendo de la zona de cultivo, representando el 99.2% de su composición total, dividiéndose en su mayoría en hidrocarburos monoterpenos (38.7%), seguidos por monoterpenos oxigenados (38%) y por último, pero sin ser menos importantes monoterpenos fenólicos (19%). (13). Como otros compuestos identificados se encuentran los sesquiterpenos. (14). Existe variación en la cantidad de los compuestos en los aceites esenciales, dependiendo del lugar de origen, condiciones ambientales de cultivo y la etapa de recolección de la planta. (5)

Los más representativos son los monoterpenos oxigenados entre ellos el carvacrol isómero del timol también presente en el aceite esencial, γ -terpineno, p -cimeno y b -cariofileno (5,12). El carvacrol y el timol (figura 5) son los dos metabolitos secundarios protagónicos que constituyen casi el 78-85% del aceite esencial de orégano y son responsables de las propiedades antimicrobianas de la planta en distintas especies de bacterias, hongos, parásitos e incluso virus. (7)

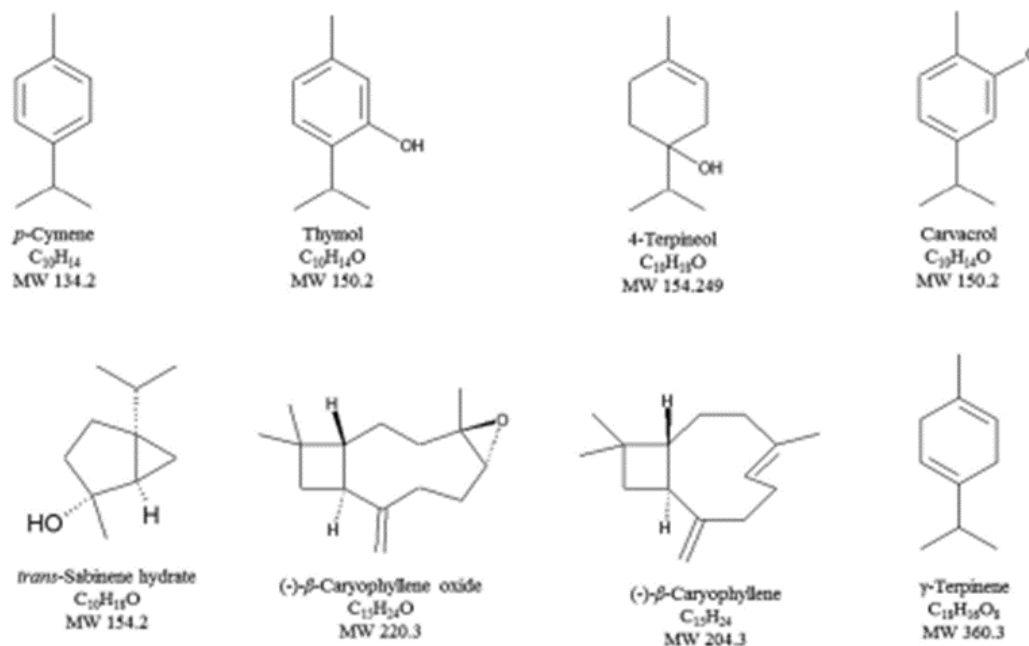


Figura 5. Principales componentes de aceite esencial de *O. vulgare* (monoterpenos hidrocarburos (p -cymene and γ -terpinene), monoterpenos oxigenados (thymol, 4-terpineol, carvacrol and *trans*-sabinene hydrate),

sesquiterpenos hidrocarbonos (bcaryophyllene) y sesquiterpenos oxigenados (b-caryophyllene oxide)) (9).

La actividad antimicrobiana de estos monoterpenoides radica en su capacidad de ingresar a las moléculas grasas que forman la membrana celular; es así como el timol se une a las proteínas de la membrana de la célula bacteriana y aumenta su permeabilidad, y de la misma forma, el carvacrol actúa sobre las células microbianas provocando daños estructurales y funcionales. (6,15). Igualmente se ha encontrado que el extracto de *O. vulgare* y sus componentes activos carvacrol y timol, interfieren con el gradiente de pH y la permeabilidad de la membrana de las bacterias. (15). El carvacrol además, interfiere en la expresión de citocinas proinflamatorias y de genes inflamatorios, logrando un importante efecto en el proceso de resolución de la infección (figura 6)

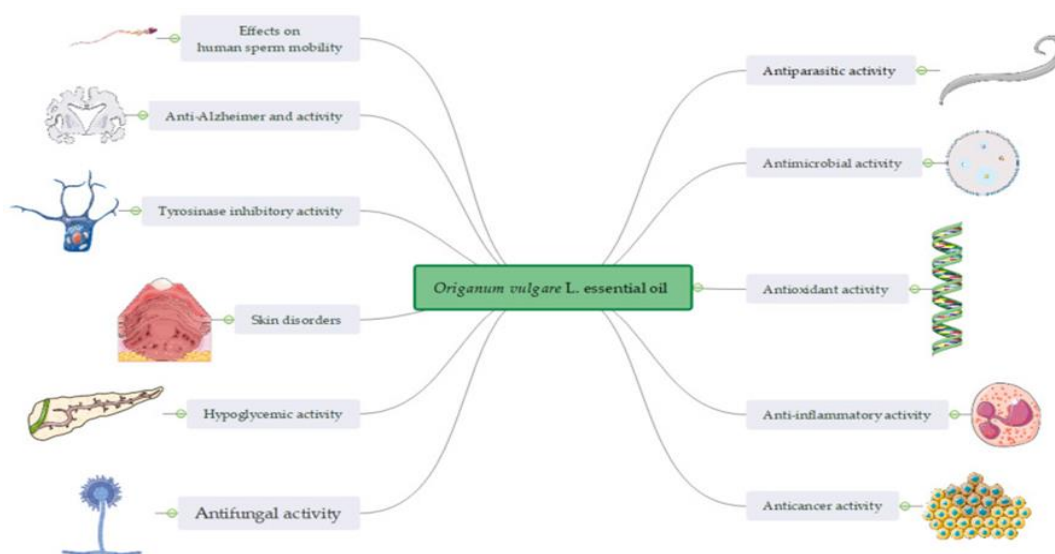


Figura 6. Efectos del aceite esencial de *O. vulgare*.

La actividad antifúngica de *O. vulgare* está relacionada con la presencia de timol y carvacrol. Estos compuestos alteran la integridad de la pared celular fúngica e interfieren con la síntesis de ergosterol.

Los extractos polares, así como el aceite esencial de *O. vulgare* tienen efecto contra cepas fúngicas para el humano, tales como *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus flavus*, *Malassezia furfur*, *Penicillium funiculosum*, y *Penicillium ochrochloron*.

Se ha evidenciado que las asociaciones del aceite de orégano con distintos fármacos de síntesis química como antibacterianos, antimicóticos, antiparasitarios

y antivirales, pueden lograr una mejor resolución de las infecciones, en calidad de tiempo, reduciendo costos por hospitalización, complicaciones y disminución de los efectos adversos. (16). En diversos estudios (tabla 1), se relacionan los microorganismos y patologías en las cuales el AE tiene efecto terapéutico.

Tabla 1: Actividad del aceite de orégano frente a principales patologías y microorganismos causantes.

| PATOLOGÍA | MICROORGANISMO | MECANISMO DE ACCIÓN DEL AE | REFERENCIA |
|---|-----------------------------------|---|--------------|
| Celulitis, Abscesos, neumonía | <i>Staphylococcus aureus</i> | El Carvacrol y el timol afectan la permeabilidad de la pared bacteriana. | (15,17–19) |
| Faringitis, otitis, impétigo, glomerulonefritis | <i>Streptococcus pyogenes</i> | El carvacrol actúa como un potente agente anti-biofilm de la bacteria con doble acción, previniendo y erradicándolo. | (20) |
| Acné | <i>Propionibacterium acnes</i> | La nano emulsión de AE rica en timol tiene un efecto antimicrobiano (7). | (6,21,22) |
| | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Metabolitos como el ácido rosmarínico, la quercetina, la apigenina y el carvacrol tienen fuerte efecto antioxidante y antiinflamatorio frente a lesiones de acné. (8) (2) | |
| Infección urinaria | <i>Escherichia coli</i> | El carvacrol puede estar involucrado en la inhibición de la flagelina de E. coli. | (6,15,23,24) |
| Infecciones gastrointestinales | <i>Helicobacter pylori</i> | El Carvacrol y el timol afectan la permeabilidad de la pared bacteriana | (25,26) |
| Disbiosis | <i>Salmonella enteritidis</i> | | |
| Vaginitis | <i>Candida albicans</i> | El carvacrol y el timol alteran la integridad de la pared celular de los hongos y con la interferencia de la síntesis de ergosterol. | (8,27–30) |
| Estomatitis | | | |
| VIH/SIDA | VIH | El carvacrol y su análogo el timol inhiben la fusión de células diana del VIH independientemente del tropismo viral. Los resultados de este estudio sugieren que estos fenoles alteran el contenido de colesterol de la membrana viral, bloqueando la entrada del VIH-1 en la célula diana. | (31) |

4.4.2 COMPUESTOS FENÓLICOS

De forma tradicional se ha atribuido al orégano propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, derivadas de los compuestos fenólicos. Este efecto se mantiene en maceraciones de metanol y etanol, extracto hidroalcohólico, incluso en la infusión y decocción de la planta. (32)

Los principales compuestos fenólicos identificados corresponden a los ácidos b - protocatechico, cafeico, ácido gentísico, clorogénico, p - cumarínico, rosmarínico y litospérmico.(13) Además de la identificación de flavonoides como hiperósido, isoquercitrina, rutina, quercitrina y luteolina.(11)

Se ha identificado al ácido rosmarínico como el principal metabolito implicado en los múltiples beneficios antimicrobianos y antiinflamatorios de la planta. (11–13,32,33)

A partir de extractos etanólicos de *O. vulgare*, se han identificado flavonoides con propiedades redox, que le confieren actividad antimicrobiana, siendo los gram positivos los que mostraron mayor sensibilidad en comparación con los gram negativos.(34)

4.5 TOXICOLOGÍA

Se ha logrado establecer mediante evaluación de la función renal y hepática, que la toxicidad de *O. vulgare* se presenta a dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg, produciendo un aumento de transaminasas.(35)

4.6 MICROORGANISMOS DE INTERÉS

La disponibilidad de los alimentos e inocuidad puede verse afectada por la contaminación de los mismos con diferentes tipos de gérmenes entre estos los hongos, los cuales pueden afectar la salud humana ocasionando diversas patologías. Lo anterior dado que los hongos contaminantes de productos agrícolas de consumo humano, pueden producir una diversa gama de metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas), como tricotecenos y fumonisinas, haciéndolos inadecuados para la alimentación. Los tricotecenos pueden actuar como factores de virulencia en las enfermedades de las plantas. Entre los hongos oportunistas podemos encontrar el *Fusarium*, agente patógeno causal de la fusariosis humana, la cual suele mostrar una amplia resistencia a los fármacos antimicóticos, (36) y *Botrytis cinerea*, otro fitopatógeno contaminante de los alimentos que ocasiona diversas patologías en el ser humano. Es así que la contaminación de los productos alimentarios de origen vegetal con estos patógenos afecta la seguridad alimentaria

y nutricional de la población, constituyéndose en un riesgo para la salud, generando además importantes pérdidas económicas.

4.6.1 *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum (FOx) es un hongo facultativo que pertenece al phylum Ascomycota. FOx generalmente afecta a plantas causando la marchitez vascular y la pudrición cortical en más de un centenar de cultivos de interés comercial (37). Este patógeno genera grandes pérdidas económicas en el sector agrícola, debido a que emplea diferentes estrategias de infección, dependiendo de la especificidad del hospedero (38). El daño causado por este patógeno está soportado en cifras, las cuales tienen una alta relevancia y que históricamente para América Latina y el Caribe se registran desde mediados del siglo XX. En esta época FOx destruyó aproximadamente 80.000 hectáreas de cultivos del principal banano de exportación (39). En Colombia, muchos cultivos han sido afectados por este patógeno, entre ellos la uchuva (*Physalis peruviana* L.), fruta nativa de la región andina, segundo producto de exportación más importante. También afecta otros cultivos como el pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y patata (*Solanum tuberosum* L.). Es un hongo de difícil control, puesto que ha desarrollado resistencia a muchos de los fungicidas utilizados para su control. Adicionalmente es persistente en el suelo, debido a su versatilidad fisiológica y su capacidad de producir clamidosporas (estructuras de resistencia) (40).

Las especies de *Fusarium* tienen distribución global, y se cree que aproximadamente diez complejos están relacionados con patógenos humanos, entre los cuales se encuentran *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. clamydosporum*, *F. dimerum*, *F. sambucinum*, *F. concolor* y *F. lateritium*. Entre estos, *F. solani* son los más comunes y virulentos, comprenden aproximadamente el 40-60% de las infecciones, seguidos por *F. oxysporum* (20%), *F. Fujikuroi* y *F. moniliforme* (10%).

La fusariosis es una infección que afecta a plantas, animales y humanos (41). Las especies de *Fusarium* causan un amplio espectro de infecciones en humanos, que van desde superficiales y localmente invasivas hasta diseminadas, siendo las infecciones más prevalentes la onicomicosis, las infecciones de la piel y la queratitis. Las infecciones invasivas pueden ser generalizadas y afectan a la piel, el cerebro, el torrente sanguíneo, los pulmones, los ojos y los huesos. Los pacientes con neutropenia grave y prolongada, especialmente aquellos con neoplasias hematológicas malignas, son los más susceptibles a las infecciones prevalentes (42). Las infecciones cutáneas son resultado de la diseminación del hongo principalmente en pacientes inmunocomprometidos. El patrón más común de enfermedad diseminada es la combinación de múltiples pápulas o nódulos eritematosos dolorosos, comúnmente con necrosis central. Tales ocurrencias se propagan por todo el cuerpo y liberan continuamente células fúngicas, lo que resulta

en un hemocultivo positivo y, a menudo, afectación pulmonar, con o sin afectación en otros sitios (Figura 7). Las vías respiratorias representan la principal puerta de entrada a la infección, seguidas por la piel en el sitio del tejido u onicomicosis, el uso de lentes de contacto y posiblemente las membranas mucosas. Antes de iniciar la terapia inmunosupresora, dada la gravedad asociada con la fusariosis diseminada, los signos de la presencia de infecciones de la piel o las uñas deben investigarse cuidadosamente, ya que constituyen el foco de la diseminación de hongos y a menudo se descuidan en los exámenes físicos iniciales (43).

a.



b.



Figura 7. Fusariosis humana (nih.gov) a. Compromiso cutáneo b. Onicomicosis

Se ha encontrado que las regiones endémicas de fusariosis son de naturaleza tropical y subtropical. Aunque la fusariosis se asocia con condiciones climáticas específicas, se ha informado que los aislamientos ambientales y clínicos causan infecciones fuera de las fronteras previamente establecidas. Este hongo tiene mecanismos eficientes de dispersión, y sus conidios alcanzan distancias considerables. Las infecciones son difíciles de tratar debido a la falta de consenso con respecto a los protocolos de tratamiento para la fusariosis en humanos causada por aislados multirresistentes. Además, es posible que los aislados ambientales de *Fusarium spp.* adquieran resistencia debido a la exposición previa a fungicidas que se utilizaron en los campos agrícolas, y estos aislados pueden diseminarse y, en consecuencia, infectar a los seres humanos. Quizás este proceso de infección pueda evitarse mediante la implementación de políticas públicas de control respecto a la venta y uso de fungicidas (44).

4.6.2 *Botrytis cinerea*:

El género de hongos *Botrytis* pertenece a la familia *Sclerotiniaceae*, Orden Helotiales. Está formado por una gran cantidad de especies de las cuales, algunas amenazan cultivos de importancia agrícola causando grandes pérdidas durante la producción y la postcosecha. *Botrytis spp.* es un grupo de hongos con un amplio rango de huéspedes y distribución geográfica. También tienen un gran impacto económico en las industrias hortícolas, causando enfermedades como el moho gris, el tizón de las hojas, el tizón de las flores y la podredumbre del tallo (Elad et al., 2016)

Entre los cultivos que ataca están fresa, tomate, cebolla, pimiento, ajo, brócoli, lechuga, melón, mango, zanahoria, maracuyá, uva, entre muchos otros. En flores como rosa y begonia también causa graves daños. Los síntomas de la enfermedad incluyen manchas de color grisáceo en las hojas, tallos, flores y frutos. Las manchas pueden cubrirse con una capa de esporas de color gris, especialmente si la humedad es alta. Las plantas y frutas se marchitan y se pudren pudiendo desarrollar esclerocios negros similares a pequeñas piedras. *Botrytis spp* es un hongo muy común en los campos agrícolas y se clasifica como necrotrofo, es decir, que ataca tejido dañado o senescente (en proceso de envejecimiento). De esta forma, el hongo entra al tejido a través de heridas o aberturas naturales. Las infecciones a tejidos no senescentes generalmente terminan en lesiones limitadas (45).

El control de *B. cinerea* se basa principalmente en fungicidas químicos, ya que las variedades resistentes no están disponibles para la mayoría de los cultivos. Sin embargo, el abuso de fungicidas puede provocar la generación de resistencia a fungicidas y contaminación ambiental (Phillips y McDougall, 2012). Por lo tanto, se necesitan algunas medidas de control alternativas y más respetuosas con el medio ambiente, como el control biológico, para el control de *B. cinerea*. Hasta la fecha, se han desarrollado muchos tipos de agentes de control biológico, incluyendo bacterias, hongos y extractos de plantas, para su control (45).

Las especies de *Botrytis* son patógenos fúngicos conocidos de varias plantas. En humanos se habían informado efectos en la salud como precipitantes alérgicos del asma y la neumonitis por hipersensibilidad (46). No obstante lo anterior, se evidencia el reporte de casos con compromiso pulmonar en paciente inmunocompetente (47). *Botrytis cinerea* se constituye en un fitopatógeno con impacto económico y social de alto alcance, responsable de la pérdida y desperdicio de alimentos, ocasionando pérdidas que ascienden entre USD 10 a 100 mil millones en todo el mundo, que además de amenazar la seguridad alimentaria mundial, también genera impacto en la salud (48).

Algunos estudios han evidenciado que el aceite esencial de *O. vulgare* mostró actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral prometedora contra varios

fitopatógenos, tales como *Botrytis cinerea* Pers., *Penicillium expansum* Link, *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. y E.H. Sm.) Leonian, *Rhizopus stolonifera* Vuillemin, *Aspergillus niger* van Tieghem, *Fusarium oxysporum* von Schlechtendal, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Clavibacter michiganensis* corrig. (Smith), y *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson (30,49,49,50).

4.7 CÁNCER

El cáncer se considera a un grupo de enfermedades, conformado por más de cien tipos de neoplasias malignas de diferente etiología y con capacidad de afectar distintos órganos y sistemas del cuerpo humano que comparten características similares (51).

Dentro de los factores determinantes en la aparición del cáncer se encuentran cambios que pueden ser causados por mecanismos intrínsecos como son la mutaciones generadas por errores en la reparación y replicación del ADN o cambios extrínsecos generados por agentes carcinogénicos como el humo del cigarrillo, el VPH, el Virus de la Hepatitis B, la obesidad, las dietas ricas en carbohidratos y pobres en frutas y verduras, las carnes rojas procesadas, la luz ultravioleta, sustancias químicas, sedentarismo, los nitratos, los altos niveles de estrés, la herencia, los alimentos contaminados por sustancias químicas como herbicidas, fungicidas, organofosforados, sustancias radioactivas, radiaciones ionizantes, entre otros factores producto de la sociedad moderna (52).

4.7.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER A NIVEL MUNDIAL

El comportamiento epidemiológico establece que el cáncer afecta cada vez un mayor número de individuos, constituyéndose en una las primeras causas de muerte a nivel mundial. Para el año 2020, se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones, es decir, casi una de cada seis de las defunciones que se registran de acuerdo a lo informado por la Organización Mundial de la salud en su informe del 22 de febrero de 2022 es como consecuencia de una lesión neoplásica, siendo los tipos de cáncer más comunes los de mama, pulmón, colon y recto, y próstata.

Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se deben al consumo de tabaco, a un elevado índice de masa corporal, al consumo de alcohol, a una baja ingesta de frutas y verduras y a la falta de actividad física, además, las infecciones oncogénicas, entre ellas las causadas por los virus de las hepatitis o el papiloma humanos, ocasionan aproximadamente el 30% de los casos de cáncer en los países de ingresos bajos y medianos, como se observa en las siguientes gráficas estadísticas de la OMS.

Según el informe de la base de datos en línea de GLOBOCAN de 2020 (figura 8), se prevé que el número anual de casos de cáncer en el mundo aumente de 19,3 millones en 2020 a 28,4 millones en 2025 (un aumento del 47 % en comparación con 2020), de acuerdo a su distribución mundial en ambos sexos, ocupando Asia el primer lugar con un 49.3% seguido de Europa con el 22.8% y Oceanía en el último lugar el 1.3%

Número estimado de casos nuevos en 2020, todos los cánceres, ambos sexos, todas las edades

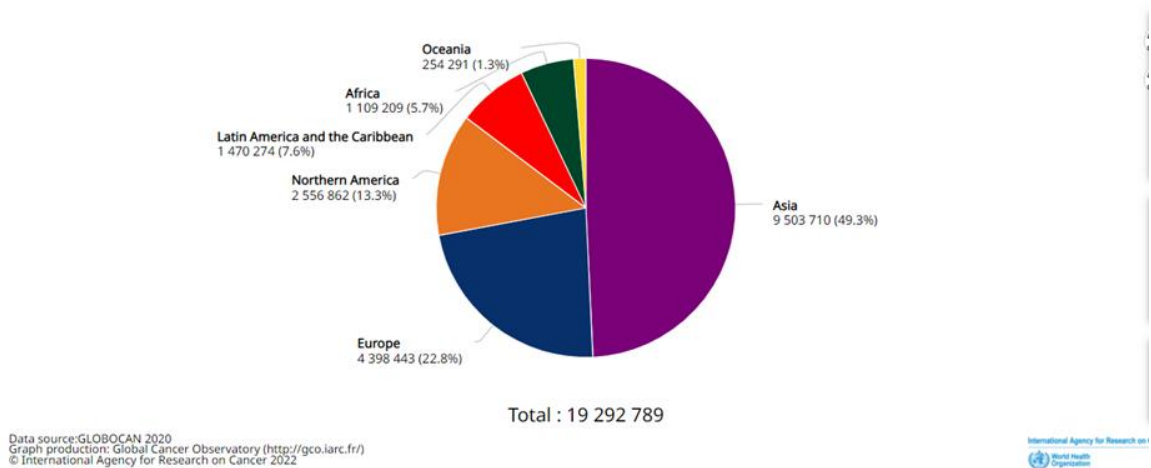


Figura 8. Número estimado de casos nuevos de cáncer para el 2020 ambos sexos a nivel mundial (53).

En cuanto a la distribución mundial de casos nuevos de cáncer según órgano afectado en ambos sexos, se evidencia que el primer lugar lo ocupa el cáncer de seno con un 11.7%, seguido del cáncer de pulmón con el 11,4%, colorrectal con un 10% y de próstata en el cuarto lugar con el 7.3% (figura 9)

Número estimado de casos nuevos en 2020, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades

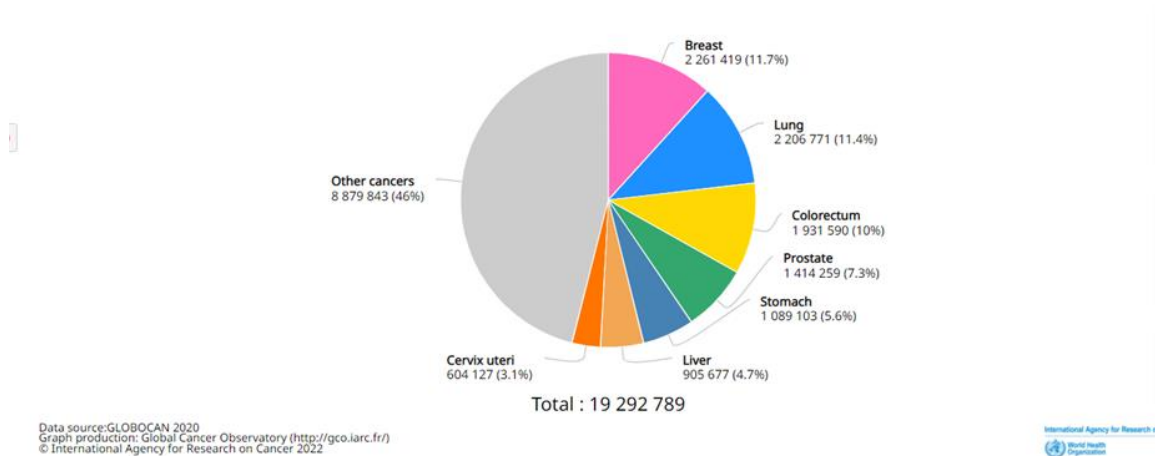


Figura 9. Distribución mundial de casos nuevos de cáncer en ambos sexos para el 2020 según órgano afectado (53).

Para el año 2020 en Colombia, el número de casos nuevos de cáncer para todas las edades y ambos sexos (figura 10), está ocupado en primer lugar por cáncer de mama (13.7%) seguido de cáncer de próstata (12.8%), colorrectal (9.5%) y estómago (7.3%).

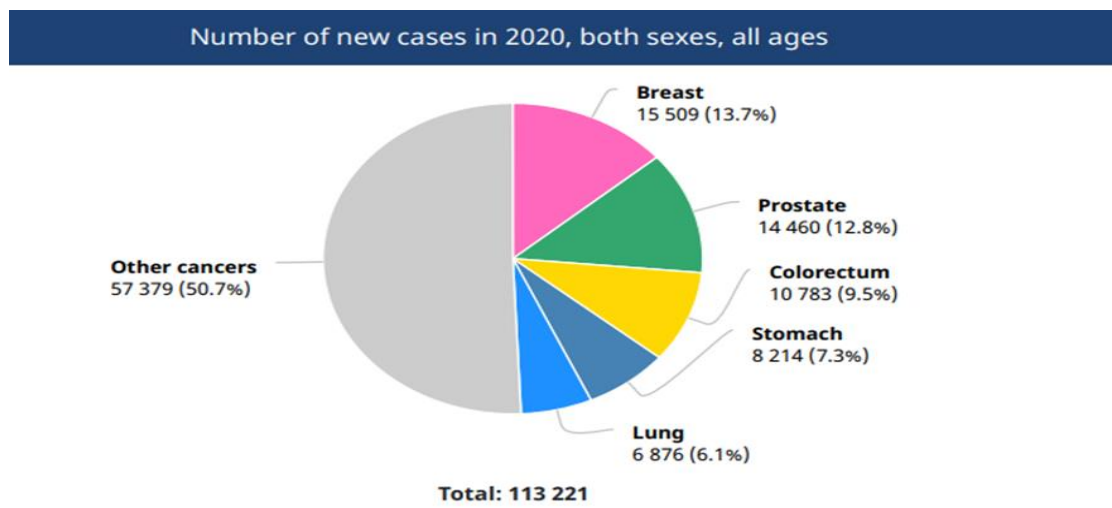


Figura 10. Número de casos nuevos de cáncer en hombres y mujeres de todas las edades para el 2020 en Colombia (53).

En cuanto a los casos nuevos en mujeres (figura 11), el cáncer de mama se encuentra ocupando el primer lugar (25.7%) seguido de cáncer colorrectal (9.6%) y de cérvix (7.9%).

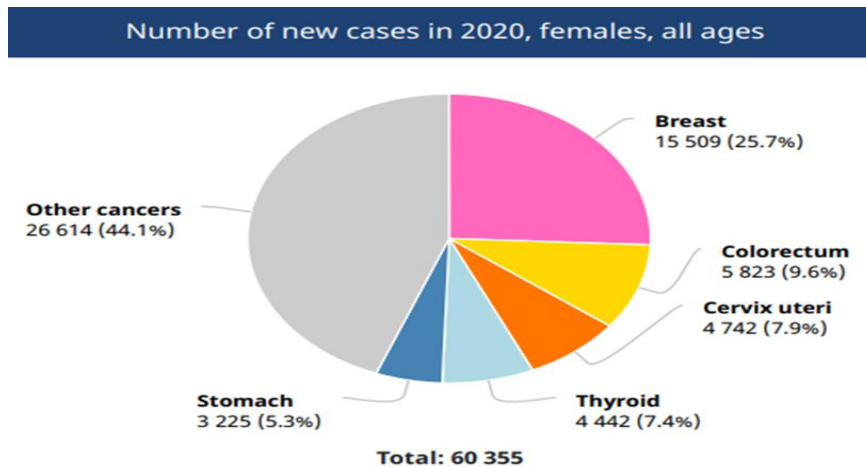


Figura 11. Número de casos nuevos de cáncer en mujeres de todas las edades para el 2020 en Colombia (53).

La distribución de casos nuevos de cáncer para los hombres (figura 12) está representado en primer lugar por el cáncer de próstata (27.4%) seguido de cáncer gástrico (9.4%) y colorrectal (9.4%).

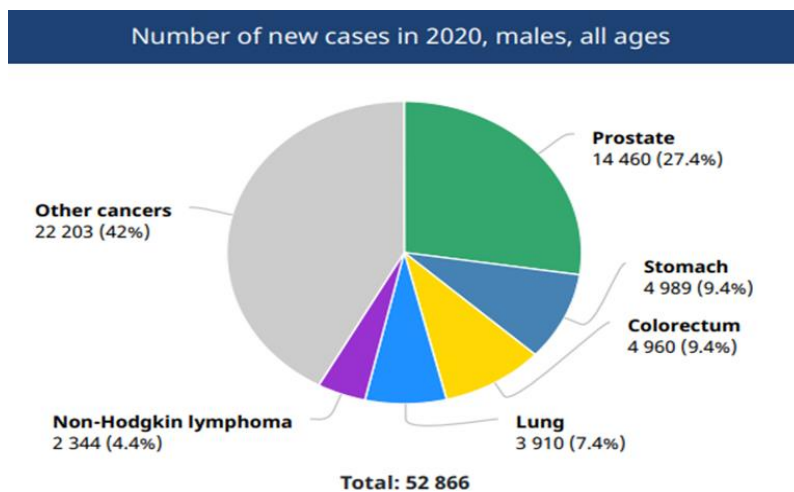


Figura 12. Número de casos nuevos de cáncer en hombres de todas las edades para el 2020 en Colombia (53).

Teniendo en cuenta que el cáncer de mama y de próstata tanto a nivel mundial como en Colombia se encuentran dentro de las primeras causas de morbilidad como

patologías de alto costo, se hace necesario buscar alternativas para su manejo, constituyéndose el *O. vulgare* por su potencial efecto citotóxico como una fuente alternativa de manejo para estas patologías.

4.7.2 BIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es producto de cambios que afectan el crecimiento y metabolismo celular, a partir de múltiples mutaciones en diferentes genes involucrados en el control celular, dentro de un microambiente tumoral que facilita y acelera la lesión cancerosa (54). Ocurren múltiples eventos dentro de una célula cancerosa que determinan su capacidad carcinogénica a partir de mutaciones que se expresan en cambios de los oncogenes inmunomoduladores (genes que impulsan el crecimiento celular y genes supresores que retardan el crecimiento celular) y alteran la estructura del ADN, haciendo que se pierda el patrón de replicación celular y se incremente de forma desbordada el número de células (55).

El proceso de apoptosis o muerte celular programada se altera y se dan cambios epigenéticos que contribuyen a perpetuar la existencia de las células neoplásicas. Esto conlleva a que la célula escape a los mecanismos de control de crecimiento, muerte celular programada, supere los mecanismos de vigilancia inmunológica, remodele el microambiente en el que se encuentra, ataque a sus propias células y realice metástasis hacia otros órganos (56).

El crecimiento de la célula tumoral se da en un microambiente tumoral caracterizado por formación de neovasos, áreas de hipoxia celular, revascularización episódica irregular y rápida, liberaciones de radicales libres, Ph extracelular ácido, sistema inmune alterado por macrófagos, neutrófilos e incluso algún tipo de linfocitos T y B, que han perdido su patrón fisiológico normal. Cambios celulares y de microambiente que determinan adaptación y resistencia a los diferentes tratamientos realizados como quimioterapia, radioterapia, etc., haciendo muy complejo el tratamiento (56).

Sumado a todo lo anterior, las células madres tumorales actúan dentro del tumor como células totipotenciales, con capacidad de generar líneas celulares neoplásicas destructivas que contribuyen a que el tumor se perpetúe de forma heterogénea, asegurando una ventaja de supervivencia selectiva sobre las demás células; todo esto facilitado por cambios en el ADN de la célula madre en cuanto a procesos de reparación de sí misma, cambios en los receptores de membrana, en su citoplasma así como en el microambiente propio para las células madre generado a partir de un mayor metabolismo glucolítico, derivado de una mayor expresión de las enzimas glucolíticas como el GLUT-1 (transportador de glucosa 1) y HK-1 (hexoquinasa 1) y PDK-1 (piruvato deshidrogenasa quinasa-1) que genera un mayor consumo de glucosa, garantizando perpetuidad con alta capacidad destructiva de forma local y a distancia a través de metástasis realizada por migración celular neoplásica a

través de contigüidad, vía hematológica y/o linfática, determinando destrucción y muerte celular de órganos y sistemas (51,57).

Entre los principales tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres se encuentran el cáncer de seno y de próstata, siendo el de próstata el que con detección temprana puede tener un mejor pronóstico; tiene como factores determinantes la edad del individuo, teniendo una alta incidencia y prevalencia en hombres mayores de 40 años, antecedentes familiares, alta ingesta de grasas de origen animal, obesidad con localización de adipocitos en región abdominal principalmente, la raza siendo mayor su incidencia en afroamericanos, mutaciones en genes (58).

4.7.3 CÁNCER DE PRÓSTATA

En su gran mayoría el 95% de los cánceres de próstata son adenocarcinomas acinares, el 5% restante son carcinomas de células neuroendocrinas, carcinomas de células transicionales o sarcomas originándose en un 70% en la zona periférica de la próstata, 20% en la zona de transición y 10% en la zona central de la próstata. Los tumores de bajo grado tienen una escasa diseminación, pero los de alto grado realizan metástasis a través de vías nerviosas, linfáticas y hematológica, siendo los principales órganos los huesos, vértebras lumbares, dorsales, cerebro, hígado y pulmón (59).

En sus fases iniciales el paciente afectado se encuentra asintomático; en fases avanzadas produce obstrucción de vías urinarias, irritación vesical, edema de miembros inferiores y dolor óseo en las áreas afectadas (60).

4.7.4 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama en la población femenina se incrementa cada vez más especialmente en los países en vías de desarrollo, afecta a más de 1,6 millones de mujeres cada año, y se prevé que aumente a 2,2 millones de casos anuales para 2025, siendo la segunda causa de muerte dentro de las mujeres, por lo que se hace necesario su detección temprana y tratamiento oportuno (61).

El cáncer de mama es una patología compleja que presenta un alto grado de heterogeneidad inter e intratumoral, a partir de defectos genéticos en la línea germinal siendo las mutaciones en los genes BRCA-1, BRCA-2, CHEK-2, RAD-51 y PALB-2. Además, se encuentran otros factores desencadenantes como exposición a estrógenos endógenos, tratamiento hormonal sustitutivo en la menopausia, haciendo necesario realizar su enfoque personalizado con el objetivo de obtener las mejores respuestas durante el tratamiento. Por esta razón se han utilizado diferentes técnicas de estratificación histológica de los cánceres de mama basadas principalmente en la expresión del receptor de estrógeno (ER), el receptor

de progesterona (PR) y el receptor ERBB2 (HER2), este último ha sido útil y sentó las bases para la clasificación de los cánceres de mama (62).

Adicionalmente entre otros factores se encuentran la edad, observándose un incremento en su incidencia después de la menopausia, sedentarismo, radiación ionizante, y consumo de alcohol (63).

Histológicamente se ha clasificado como: adenoma ductal siendo el más frecuente, con comportamiento clínico variable; carcinoma lobulillar que puede producir metástasis; carcinoma papilar, carcinoma tubular, carcinoma mucinoso, y medular puro. También se realiza clasificación molecular teniendo en cuenta el número de copias de genes como el RE, el RP y HER2, Ki67. Esta sumatoria establece una clasificación pronóstica definiéndose el cáncer Luminal A con expresión del gen RE y mala respuesta a la quimioterapia; luminal B con altos índices de proliferación y pronóstico negativo con amplificación del HER2 teniendo buena respuesta al tratamiento (64).

El proceso de metástasis más frecuente se da a nivel de ganglios linfáticos locales, hígado, hueso, pulmón y cerebro, lo que determina su evolución clínica, la cual es altamente heterogénea y depende de la detección temprana e inicio oportuno del tratamiento. Cuando se detecta de forma temprana lleva a curación del mismo o recidivas 10 o 20 años después con metástasis a distancia (63).

Como opciones terapéuticas se han planteado quimioterapia, cirugía, radioterapia posterior a la cirugía, tratamiento endocrino con modificadores selectivos del RE, inhibidores de la aromataasa, denosumab y bifosfonatos, y ablación ovárica. Dentro de todas las estrategias se han explorado también posibilidades desde la farmacología vegetal principalmente a partir de metabolitos secundarios, siendo el carvacrol el más estudiado, como potencial anticancerígeno a partir de regular el ciclo celular mediado por TRMPM7 (inhibidor de canales similar a la melastatina), siendo este un canal que se expresa ampliamente en los tejidos mamarios, proceso de inhibición que se realiza de acuerdo a la dosis y concentración (a mayor dosis y mayor concentración, mejores resultados) (65).

También se ha establecido que el carvacrol redujo significativamente la viabilidad celular neoplásica en la fase G0 /G1, así como disminución en las expresiones proteicas de P-RB, ciclina D1, CDK4 y CDK6, PI3K/p-AKT, lo que condujo a la inducción de la apoptosis mediada por la disminución de BCL2 y el aumento de las expresiones de la proteína Bax, además induce la apoptosis a través de la vía de señalización PI3K/AKT (66,67).

4.7.5 TRATAMIENTO DEL CÁNCER Y *Origanum vulgare*

En cuanto a tratamiento del cáncer, lo que lo hace particularmente difícil, es la gran cantidad de metabolitos que puede tener una lesión neoplásica, su alta capacidad de adaptación a los tratamientos, resistencia, proliferación y agresividad celular especialmente cuando está en fase avanzada, debido a su naturaleza heterogénea

general. Es decir, aunque generalmente se supone que cada tumor se origina a partir de una única célula transformada malignamente, con cada división celular, las células tumorales progresan formando una masa neoplásica de células mutuamente heterogéneas con un potencial mutagénico cada vez mayor. En última instancia, dan origen a células cancerosas con un fenotipo metastásico devastador y cambios metabólicos complejos que pueden diferir entre las células malignas del mismo tumor (60).

Tradicionalmente se han empleado diferentes estrategias para tratar el cáncer como quimioterapia, radioterapia, cirugía y se proponen nuevas estrategias desde la inmunoterapia como desbloqueo de linfocitos efectores, anticuerpos recombinantes, inmunoterapia fundamentada en células T modificadas genéticamente, virus oncolíticos, siendo un tipo de inmunoterapia que ataca y mata selectivamente las células cancerosas y mejora la inmunidad celular; vacunas contra el cáncer que estimulan la respuesta inmunitaria de la células; antígenos asociados al estroma tumoral; inhibidores que conduzcan a la pérdida de las características de células madre neoplásicas; cambios en el microambiente celular neoplásico caracterizado por una vascularización deficiente y una baja concentración de oxígeno; profármacos enzimáticos, y para el cáncer de próstata siendo su tratamiento con radioterapia, hormonoterapia y cirugía entre otros métodos que tienen una posibilidad terapéutica de éxito variable dependiendo de la heterogeneidad celular (68).

Considerando la agresividad de las lesiones tumorales y su rápido crecimiento, se plantea la búsqueda de nuevos esquemas de tratamiento basados en una terapia personalizada y combinada. Por lo que se explora en la farmacología vegetal nuevas posibilidades, siendo los metabolitos secundarios de *O. vulgare* una posibilidad terapéutica por su potencial actividad citotóxica (69).

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES

Los materiales empleados fueron los siguientes:

- **MATERIALES:**
- Orégano en polvo x 500g Ffab: 1/12/2021 F Venc: 31/12/2023 LOTE: 034121# O.E: 21121434.
- Sensidiscos estériles Marca HIMEDIA ®
- Cajas de Petri plásticas y estériles
- Toallas de papel absorbente
- Pipetas
- Micropipetas
- Frascos de vidrio
- Placas de 96 pozos

- **REACTIVOS**
- Éter de petróleo
- Diclorometano
- Metanol
- Etanol
- CO₂
- Cloroformo
- PDA (Papa Dextrosa Agar)
- Tween 20
- Acetato de etilo
- Metanol
- Medio RPMI
- Suero fetal bovino al 10%
- Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Taxol

- **LÍNEAS CELULARES TUMORALES**
- PC3 línea celular de adenocarcinoma de Próstata humano
- MCF-7: Línea celular de carcinoma ductal de mama
- MDA-MB-231: Línea celular de cáncer de mama hormono - independiente

- **FITOPATÓGENOS**
- *Fusarium oxysporum*
- *Botrytis cinerea*

5.2 METODOLOGÍA

El presente es un estudio experimental primario observacional sobre el potencial efecto antifúngico y citotóxico del *Origanum vulgare*.

Se desarrolló teniendo en cuenta dos aspectos fundamentales: químico y biológico. El aspecto químico involucró procesos de extracción a partir de las hojas de *O. vulgare*, así como la identificación de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones de baja a media polaridad, aceite esencial y fluido supercrítico por CG/EM.

En el aspecto biológico a los extractos, AE y FS se les evaluó la actividad antifúngica frente a dos hongos fitopatógenos y la actividad citotóxica (Método MTT) sobre tres líneas celulares tumorales.

6. DESARROLLO DEL PROYECTO

6.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se adquiere la materia prima conformada por tres bolsas de orégano en polvo x 500 mg, lote 034121# procedente del proveedor Mesa Hermanos & Cía. con su respectivo certificado de análisis (COAS) (Figura 13).

a.

| Referencia | | Cantidad | Descripción | Volumen | Peso |
|------------|--|----------|---------------------|---------|------|
| BOLSA | | 1.00 | OREGANO EN POLVO MP | 1.00 | 1.00 |

| TOTAL UNIDADES DESPACHADAS | TOTAL VOLUMEN DESPACHADO | TOTAL PESO DESPACHADO | DESPACHADA POR | TRANSPORTADA POR | RECIBIDA POR |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|---------------------|--------------|
| 1 (1) | 1.00 | 1.00 | Juan Ramirez | MANUEL ALFONSO TOUL | |

b.

| PARAMETRO | ESPECIFICACION | RESULTADO |
|-----------|----------------|-----------|
| Color | Característico | Conforme |
| Olor | Característico | Conforme |
| Sabor | Característico | Conforme |

| PARAMETRO | ESPECIFICACION | RESULTADO |
|-----------|----------------|-----------|
| Humedad | Máximo 15% | 7.2% |
| Cenizas | Máximo 7.5% | 2.7% |

| ENSAJO | ESPECIFICACION | RESULTADOS |
|------------------------|----------------|-------------|
| Guliformes locales NMP | <3 | <3 |
| Residuos de Mafny y | 3000 - 5000 µg | <5000 UFC/g |
| Residuos de Colistina | 100 - 1000 µg | <1000 UFC/g |
| Residuos de Sulfato de | 100 - 1000 µg | <1000 UFC/g |

c.



Figura 13. Material vegetal de *O. vulgare*. a y b. Certificado de análisis (COAS)
c. Material vegetal

6.2 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO

6.2.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTES POLARIDADES

Se tomaron 128 g del material vegetal en polvo de *Origanum vulgare*, los cuales fueron introducidos en el equipo de extracción tipo Soxhlet. Las extracciones se realizaron con 500 mL de disolventes en orden creciente de polaridad: éter de petróleo (EP), diclorometano (ED) y metanol (EM). Además de ello se realiza extracto etanólico total (EET) con 500 mL de etanol (Figura 14).

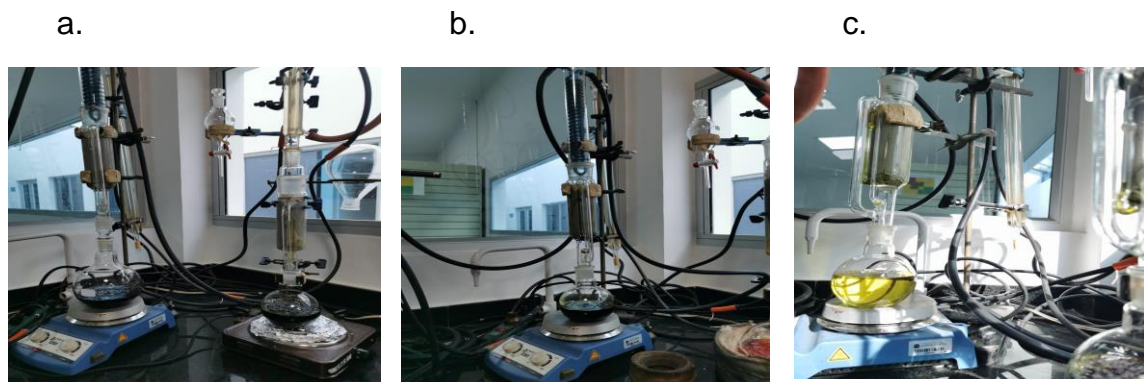


Figura 14. Obtención de extractos en equipo tipo Soxhlet. **a.** EP y EET; **b.** ED; **c.** EM.

Posteriormente, se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador a 80 rpm y temperatura de 40°C obteniendo: 2,92 g de EP; 1,43 g de ED; 13,30 g de EM y 20,55 g de EET. (Figura 15).

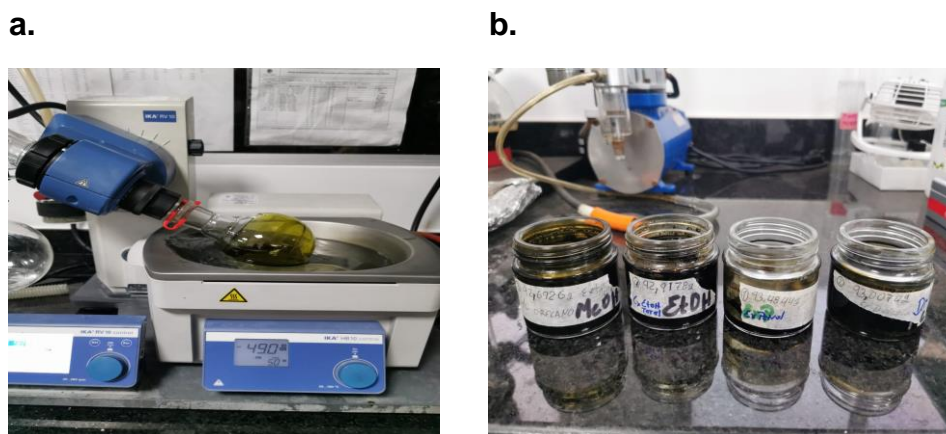


Figura 15. Obtención de extractos en rotaevaporador. **a.** Concentración en rotaevaporador. **b.** Extractos EP, ED, EM y EET.

6.2.2 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (AE)

La extracción del AE se realizó mediante el método de hidrodestilación. Para ello se tomaron 500 g de materia prima de *O. vulgare* en polvo, se agregó agua hasta cubrir en su totalidad y se llevó hasta temperatura de ebullición por 5 horas. Se obtuvieron 5 mL de aceite esencial (Figura 16).

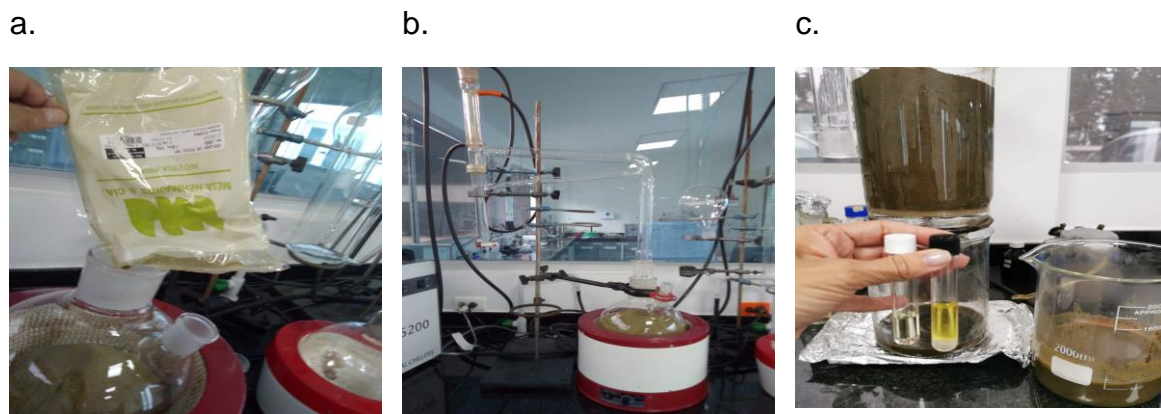


Figura 16. Obtención del AE por hidroddestilación. **a.** Material vegetal. **b.** Equipo de Hidroddestilación **c.** AE

6.2.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO (FS)

Por otra parte, 174,3 g de materia prima de *O. vulgare* se emplearon para la obtención del extracto con CO₂, en un equipo de extracción de fluidos supercríticos, a una presión de 5.000 PSI, temperatura de 40°C y un flujo entre 11 a 13 mL/min. Se realizaron 5 ciclos de 5 minutos cada uno. Se obtuvieron 2,43 g de extracto FS (Figura 17).

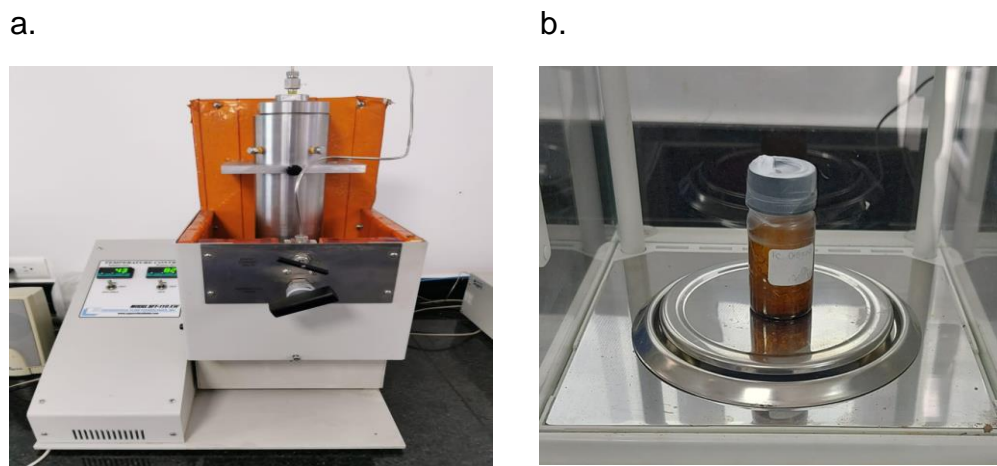


Figura 17. Obtención del extracto por FS. **a.** Equipo fluido supercrítico. **b.** Extracto FS

6.2.4 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium oxysporum*

La evaluación de la actividad antifúngica de extractos obtenidos de *O. vulgare* se realizó por medio de la medición del halo de crecimiento micelial del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. El medio PDA (Papa Dextrosa Agar) se preparó al 1.5% en frascos y se esterilizó. Los extractos se solubilizaron en una mezcla PDA al 1,5% y Tween 20 (5%). Se evaluaron 5 concentraciones (500, 250, 100, 50 y 10 µg/mL). Los tratamientos (180 µL por pozo) se dispusieron en placas excavadas (figura 18); posteriormente se inocularon plugs de micelio de 2 mm de diámetro en el centro de cada pozo. Las placas inoculadas fueron dispuestas en cámaras húmedas por 72 horas a temperatura ambiente (25°C). El PDA al 1.5% y el Tween 20 al 5% se emplearon como blanco y como control positivo el itraconazol. Se realizaron tres réplicas para cada tratamiento.

Con ayuda del software ImageJ²⁸ se obtuvieron las áreas de crecimiento micelial y se calcularon los porcentajes de inhibición mediante la siguiente fórmula: % de inhibición = $(B-T) * (100/B)$, donde B representa el diámetro del crecimiento micelial para el blanco y T representa el diámetro del crecimiento micelial de los tratamientos. Los datos de inhibición (%) se emplearon para construir las correspondientes curvas dosis respuesta, con el fin de calcular la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀ expresada en µg/mL) para cada extracto, usando una regresión no lineal en el programa GraphPad Prism versión 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.) para Windows.²⁹

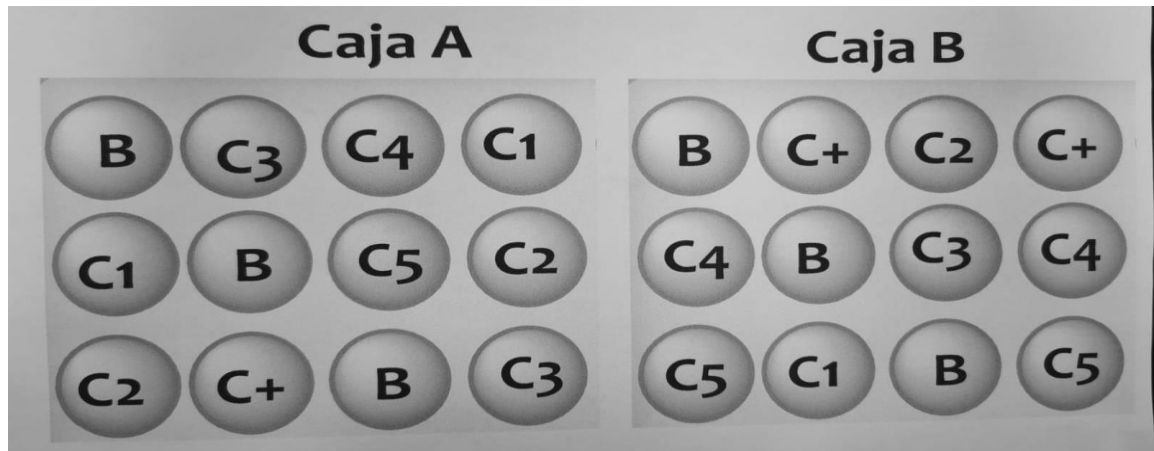


Figura 18. Distribución de los tratamientos para *Fusarium oxysporum*

6.2.5 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Botrytis cinerea*

La evaluación sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* se evaluó mediante el método de difusión en disco en agar de Kirby-Bauer. Se utilizaron las referencias de sensidiscos estériles (Himedia) impregnadas con 30µl de los extractos, AE y FS a 4 concentraciones (500, 250, 100, 50 y 10 µg/mL). Para determinar la actividad antifúngica se inocularon plugs de micelio de 5 mm de diámetro en el centro de cada caja de Petri. A continuación, se colocaron 3 sensidiscos impregnados a las diferentes concentraciones. Las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente (25°C) por 8 días. Como control positivo se utilizaron los sensi-discos empapados con el disolvente de la extracción (70).

Los datos de inhibición (%) se emplearon para construir las correspondientes curvas dosis respuesta, con el fin de calcular la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀ expresada en µg/mL) para cada extracto, usando una regresión no lineal en el programa GraphPad Prism versión 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.) para Windows.29.

7. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)

Las fracciones EP, ED, AE y el extracto por FS se analizaron por cromatografía de gases para determinar las diferencias en su composición, para lo cual se tomaron 5 mg de EP y DM, 10 µL del AE y de FS y se disolvieron en hexano. Se utilizó un equipo Shimadzu® Nexis GC 2020 acoplado a un automuestreador Shimadzu® AOC20iPlus, un detector de Masas Shimadzu® GCMS QP 2020NX y una columna SH-Rxi-5ms (30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm df) (figura 19).

Se usó como gas de arrastre helio grado 5.0 con flujo constante a 1 mL/min, inyector en modo Split (1:5) a 290°C, temperatura inicial del horno 50°C (3 min), se incrementó la temperatura 5°C/min hasta 100°C (4 min), una segunda rampa incrementando a razón de 8°C/min hasta 150°C (5 min) y una rampa final de 10°C/min hasta 300°C (5 min) para un tiempo total de análisis de 48 min. La temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y de la interfase de 300°C. Espectros de masas obtenidos por impacto electrónico a 70eV y el detector operó en modo SCAN 50 a 800 m/z.

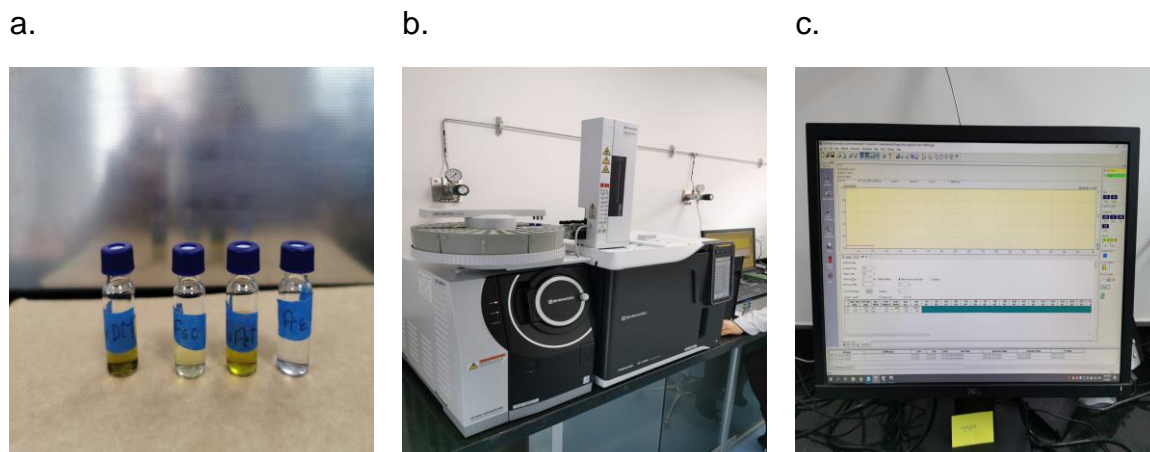


Figura 19. Equipo de GC-MS a. Extractos b. Equipo Shimadzu® Nexis GC 2020 c. Cromatograma.

8. ANÁLISIS DEL DESARROLLO DEL PROYECTO

8.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

La evaluación de la actividad citotóxica se realizó por medio del método MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol); éste colorante mide la capacidad metabólica de las células; el colorante amarillo es reducido en las células viables por los componentes de la cadena respiratoria (enzima succinato-deshidrogenasa), produciendo un compuesto azul (formazán), el cual es tóxico en la respiración celular. La cantidad de formazán que se produzca, es proporcional a las células sobrevivientes.

8.2 CULTIVO Y TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS

Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, alrededor de 7000 células por pozo en placas de 96 pozos bajo las siguientes condiciones: 5% CO₂ y 37°C por un tiempo de 24 horas o hasta que alcanzaron el 60% de confluencia en el pozo. En este punto se trataron con diferentes concentraciones del EP, DM, EET y el AE y FS (200, 100, 50, 25, 12,5 µg/mL). Se incubaron las células tratadas y controles por 48 horas, tiempo en el que se agregó el reactivo MTT; posteriormente, se incubaron por 4 horas a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó DMSO

(0,01% v/v), incubando a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán se disolvieron (5 min). Se determinó la absorbancia en un lector de microplacas Biorad a 570 nm. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producida. De esta manera se obtuvieron los datos necesarios para realizar el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) requerida para disminuir el 50% de la viabilidad celular. Se utilizó como control positivo de citotoxicidad el anticancerígeno comercial Taxol a la CI₅₀ establecida para cada línea celular: PC3: 0,05 µg/mL; MDA-MB-231:0,020 µg/mL; y MCF-7: 0.025 µg/mL.

8.3 METODOLOGÍA ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El cálculo de la viabilidad celular se obtuvo a partir de las absorbancias 570 nm, tomando como 100% los valores de absorbancia del control negativo. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Para calcular las concentraciones inhibitorias 50 (IC₅₀) se utilizó un modelo de regresión no lineal a partir de la viabilidad celular para cada una de las concentraciones evaluadas mediante el software GraphPad Prims 9.0. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías y las diferencias entre grupo control y los grupos tratados se determinaron a través de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, siendo consideradas diferencias significativas para $p < 0,05$.

8.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.4.1 ANÁLISIS DE GC-MS

La figura 20 muestra el cromatograma de EP y DM, así como del AE y FS de forma comparativa. Se evidencia la presencia de un compuesto en común con un porcentaje alto de coincidencia en todos los extractos objeto de análisis, el cual corresponde al carvacrol.

El extracto EP (OvuPet) muestra una menor concentración de compuestos en comparación con los restantes. En DM (Ovu DM) se observan unas señales a los 35 minutos de análisis que no se encuentran en los demás extractos analizados.

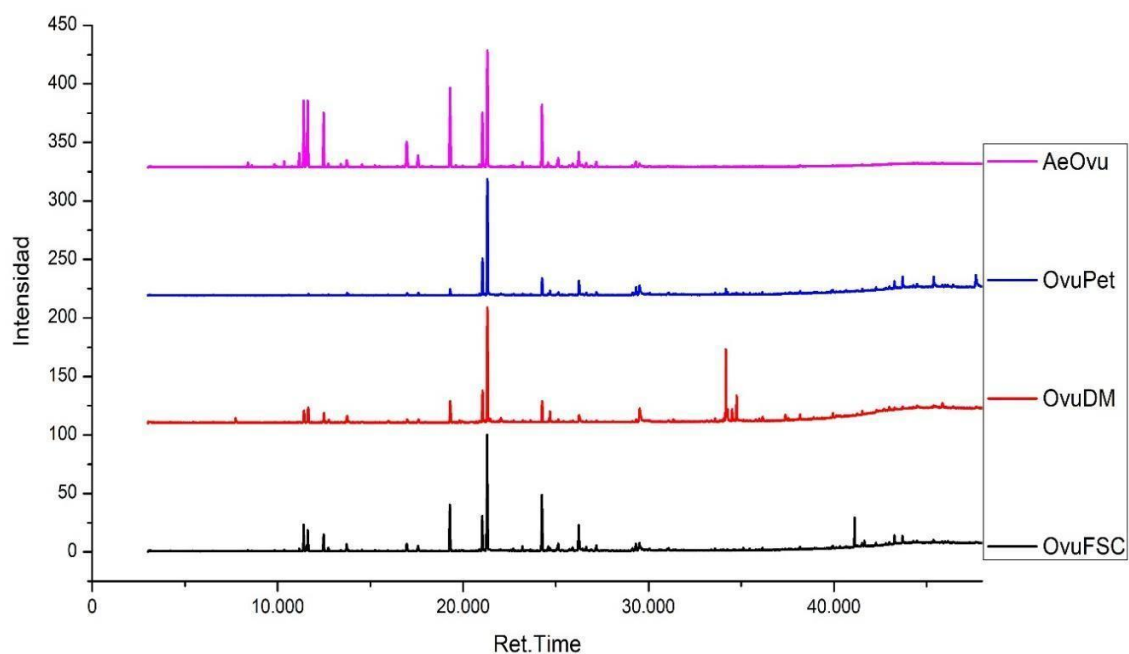


Figura 20. Resultado análisis GC-MS de *O. vulgare*

8.4.1.1 ANALISIS GC-MS DEL EXTRACTO EP DE *O. vulgare*

El análisis de este extracto evidencia la presencia de 35 compuestos, de los cuales los más representativos corresponden a carvacrol (terpeno), fenol,2-methyl-5-(1-methylethyl) (terpeno), tetrapentacontano (alcano), tetradecano (alcano) y cariofileno (terpeno), los cuales corresponden al 67,44% del área total del EP. El carvacrol representa el 37,88% del área total. El porcentaje de similaridad para estos compuestos supera el 90% excepto el trapentacontano (tabla 2).

Tabla 2. Componentes extracto de petróleo de *O.vulgare* obtenidos por GC-MS

| EXTRACTO DE PETRÓLEO | | | | |
|----------------------|-------|-------------------------------------|-----------|-------------|
| Ret Time | %Area | ID | CAS | Similaridad |
| 21.312 | 37.88 | Carvacrol | 499-75-2 | 93 |
| 21.048 | 11.25 | Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- | 499-75-2 | 93 |
| 47.653 | 6.76 | Tetrapentacontane | 5856-66-6 | 84 |
| 26.249 | 5.89 | Tetradecane | 629-59-4 | 94 |
| 24.262 | 5.66 | Caryophyllene | 87-44-5 | 94 |

| | | | | |
|--------|------|---|-------------|----|
| 29.516 | 3.58 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester | 84-66-2 | 95 |
| 45.378 | 3.44 | Tetrapentacontane | 5856-66-6 | 79 |
| 43.698 | 3.01 | Tetrapentacontane | 5856-66-6 | 83 |
| 29.326 | 2.95 | 5-Oxatricyclo[8.2.0.0 ^{4,6}]dodecane, 4,12,12-trimethyl-9-methylene-, (1R,4R,6R,10S)- | 1139-30-6 | 93 |
| 19.303 | 2.18 | 1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene | 1076-56-8 | 93 |
| 43.266 | 1.72 | 5,9,13,17-Tetramethyl 4,8,12,16-octadecatetraenoic acid | 0-0-0 | 79 |
| 34.168 | 1.42 | Neophytadiene | 504-96-1 | 91 |
| 24.685 | 1.34 | o-Methoxy-.alpha.,.alpha.-dimethylbenzyl alcohol | 21022-73-1 | 82 |
| 27.192 | 1.23 | cis-muurola-3,5-diene | 0-0-0 | 78 |
| 17.596 | 0.91 | (1S)-1,3,3-trimethylnorbornan-2-ol | 470-8-6 | 93 |
| 13.743 | 0.84 | Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)- | 15537-55-0 | 89 |
| 29.131 | 0.83 | 1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]- | 6750-60-3 | 87 |
| 25.141 | 0.74 | .alpha.-Caryophyllene | 6753-98-6 | 90 |
| 26.643 | 0.72 | .beta.-Bisabolene | 495-61-4 | 89 |
| 42.271 | 0.68 | 4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy- | 6068-80-0 | 70 |
| 44.483 | 0.67 | d-Mannitol, 1-decylsulfonyl- | 0-0-0 | 65 |
| 34.26 | 0.62 | 1-Dodecanol, 3,7,11-trimethyl- | 6750-34-1 | 84 |
| 42.988 | 0.54 | 4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy- | 6068-80-0 | 68 |
| 38.179 | 0.51 | Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)- | 55282-12-7 | 83 |
| 34.746 | 0.5 | 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol | 102608-53-7 | 88 |
| 35.112 | 0.48 | Bicyclo[6.1.0]nonane, 9-(1-methylethylidene)- | 56666-90-1 | 77 |
| 39.938 | 0.44 | 1-Octadecanesulphonyl chloride | 0-0-0 | 77 |
| 31.101 | 0.43 | 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- | 552-2-3 | 81 |

| | | | | |
|--------|------|---|------------|----|
| 36.147 | 0.43 | 2-Methylhexacosane | 1561-2-0 | 86 |
| 39.868 | 0.43 | Cholest-5-en-3-yl (9Z)-9-octadecenoate | 303-43-5 | 65 |
| 44.273 | 0.43 | d-Mannitol, 1-decylsulfonyl- | 0-0-0 | 63 |
| 41.523 | 0.42 | 4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy- | 6068-80-0 | 72 |
| 33.585 | 0.39 | Nonadecane | 629-92-5 | 84 |
| 40.658 | 0.37 | 8,11,14-Eicosatrienoic acid, (Z,Z,Z)- | 1783-84-2 | 74 |
| 35.458 | 0.31 | Bicyclo[6.1.0]nonane, 9-(1-methylethylidene)- | 56666-90-1 | 76 |

8.4.1.2 ANALISIS GC-MS DEL DM DE *O. vulgare*

Respecto a los metabolitos encontrados en el DM (tabla 3) se encontraron 24 compuestos, evidenciándose que los cinco principales corresponden a carvacrol, neophytadieno, timol, 1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene y cariofileno, para un total del 65.07% del área total del extracto. El carvacrol corresponde al 29,82%. La similitud se encuentra por encima del 90%.

Tabla 3. Componentes extracto diclorometano de *O. vulgare* obtenidos por GC-MS

| EXTRACTO DICLOROMETANO | | | | |
|------------------------|-------|--|-------------|-------------|
| Ret Time | %Area | ID | CAS | Similaridad |
| 21.312 | 29.82 | Carvacrol | 499-75-2 | 93 |
| 34.172 | 14.87 | Neophytadiene | 504-96-1 | 96 |
| 21.05 | 8.06 | Thymol | 89-83-8 | 92 |
| 19.304 | 6.49 | 1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene | 1076-56-8 | 94 |
| 24.264 | 5.83 | Caryophyllene | 87-44-5 | 94 |
| 34.75 | 5.04 | 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol | 102608-53-7 | 94 |
| 11.648 | 3.94 | Eucalyptol | 470-82-6 | 96 |
| 29.52 | 3.54 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester | 84-66-2 | 94 |
| 11.423 | 2.99 | p-Cymene | 99-87-6 | 94 |
| 24.688 | 2.79 | o-Methoxy-.alpha.,.alpha.-dimethylbenzyl alcohol | 21022-73-1 | 84 |

| | | | | |
|--------|------|---|-------------|----|
| 34.264 | 2.31 | 2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- | 14237-73-1 | 91 |
| 34.509 | 2.28 | 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol | 102608-53-7 | 93 |
| 12.497 | 2.17 | .gamma.-Terpinene | 99-85-4 | 95 |
| 13.743 | 1.87 | Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)- | 15537-55-0 | 91 |
| 7.736 | 1.09 | Ethanol, 2-butoxy- | 111-76-2 | 93 |
| 37.378 | 1.08 | Phytol | 150-86-7 | 86 |
| 45.854 | 0.97 | Silane, trimethyl[[[(3.beta.)-stigmast-5-en-3-yl]oxy]- | 2625-46-9 | 69 |
| 22.039 | 0.86 | Cyclohexasiloxane, dodecamethyl- | 540-97-6 | 83 |
| 38.181 | 0.83 | 2-Methylhexacosane | 1561-2-0 | 84 |
| 36.15 | 0.73 | 2-Methylhexacosane | 1561-2-0 | 87 |
| 39.941 | 0.69 | Sulfurous acid, octadecyl 2-propyl ester | 0-0-0 | 78 |
| 34.1 | 0.6 | 2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- | 14237-73-1 | 88 |
| 41.528 | 0.57 | 4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy- | 6068-80-0 | 70 |
| 33.589 | 0.56 | Nonadecane | 629-92-5 | 87 |

8.4.1.3 ANALISIS GC-MS DEL AE DE *O. vulgare*

Para el AE se encontraron 55 metabolitos secundarios en el análisis de GC-MS. El principal metabolito encontrado corresponde a carvacrol (17,43%), seguido de 1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene. Sin embargo, el porcentaje de similaridad para estos dos compuestos se encuentra por debajo de 90% (tabla 4).

Otros metabolitos encontrados con porcentaje de similaridad superior a 90% corresponden a benzene,1-methyl-4-(1-methylethyl), eucaliptol, cariofileno, timol y gamma.-terpineno, para un total de 73,07%.

Tabla 4. Componentes del aceite esencial de *O. vulgare* obtenidos por GC-MS

| ACEITE ESENCIAL | | | | |
|-----------------|-------|-----------|-------|-------------|
| Ret Time | %Area | ID | CAS | Similaridad |
| 21.313 | 17,43 | Carvacrol | 0-0-0 | 85 |

| | | | | |
|--------|-------|---|------------|----|
| 19.298 | 13,37 | 1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene | 1076-56-8 | 89 |
| 11.407 | 9,66 | Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- | 99-87-6 | 92 |
| 11.621 | 9,08 | Eucalyptol | 470-82-6 | 97 |
| 24.255 | 8,78 | Caryophyllene | 87-44-5 | 96 |
| 21.043 | 7,49 | Thymol | 89-83-8 | 91 |
| 12.48 | 7.26 | .gamma.-Terpinene | 99-85-4 | 98 |
| 16.96 | 5.42 | Terpinen-4-ol | 562-74-3 | 96 |
| 26.235 | 2.36 | Tetradecane | 629-59-4 | 94 |
| 17.571 | 2.24 | (1S)-1,3,3-trimethylnorbornan-2-ol | 470-8-6 | 95 |
| 11.165 | 1.77 | (+)-4-Carene | 29050-33-7 | 94 |
| 25.129 | 1.38 | .alpha.-Humulene | 6753-98-6 | 96 |
| 13.727 | 1.18 | Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, cis- | 7299-41-4 | 93 |
| 27.18 | 0.95 | cis-muurola-3,5-diene | 0-0-0 | 81 |
| 29.311 | 0.87 | 5-Oxatricyclo[8.2.0.0 ^{4,6}]dodecane, 4,12,12-trimethyl-9-methylene-, (1R,4R,6R,10S)- | 1139-30-6 | 93 |
| 10.355 | 0.7 | .beta.-Myrcene | 123-35-3 | 95 |
| 11.549 | 0.63 | D-Limonene | 5989-27-5 | 90 |
| 26.631 | 0.62 | .beta.-Bisabolene | 495-61-4 | 90 |
| 29.506 | 0.58 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester | 84-66-2 | 92 |
| 24.584 | 0.56 | trans-.alpha.-Bergamotene | 13474-59-4 | 93 |
| 8.394 | 0.55 | Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- | 5/02/2867 | 94 |
| 23.206 | 0.53 | Copaene | 3856-25-5 | 94 |
| 14.548 | 0.46 | 2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis- | 29803-82-5 | 92 |
| 25.898 | 0.43 | (-)-Germacrene D | 23986-74-5 | 91 |
| 13.41 | 0.42 | Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- | 586-62-9 | 92 |
| 9.829 | 0.41 | 4(10)-Thujene | 3387-41-5 | 94 |

| | | | | |
|--------|------|--|----------------|----|
| 12.733 | 0.41 | 5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol | 17699-16-0 | 94 |
| 20.87 | 0.36 | Carvacrol | 499-75-2 | 86 |
| 25.053 | 0.36 | cis-.beta.-Farnesene | 28973-97-9 | 92 |
| 15.248 | 0.31 | 2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis- | 29803-82-5 | 90 |
| 21.14 | 0.31 | Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- | 499-75-2 | 88 |
| 19.608 | 0.26 | 1,3-Cyclohexadiene, 1,3,5,5,6,6-hexamethyl- | 0-0-0 | 78 |
| 8.608 | 0.25 | 1R-.alpha.-Pinene | 7785-70-8 | 94 |
| 29.116 | 0.24 | 1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, (1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]- | [1aR-6750-60-3 | 88 |
| 22.714 | 0.2 | Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)- | 97-53-0 | 85 |
| 26.902 | 0.2 | Cedrene | 11028-42-5 | 82 |
| 25.733 | 0.19 | Cedrene | 11028-42-5 | 86 |
| 19.978 | 0.15 | 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- | 78-70-6 | 85 |
| 9.934 | 0.14 | Butanoic acid, 3,7-dimethyl-2,6-octadienyl ester, (E)- | 106-29-6 | 88 |
| 25.337 | 0.14 | 1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, (1aR,4aS,7R,7aR,7bS)-(-)- | 25246-27-9 | 86 |
| 26.43 | 0.14 | (4S,4aR,6R)-4,4a-Dimethyl-6-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene | 54868-40-5 | 84 |
| 18.291 | 0.13 | 2-Cyclohexen-1-ol, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-, cis- | 16721-38-3 | 87 |
| 29.593 | 0.13 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diundecyl ester | 3648-20-2 | 72 |
| 10.781 | 0.12 | .alpha.-phellandrene (only name in Wiley6) | 1529-99-3 | 87 |
| 24.746 | 0.1 | Aromandendrene | 489-39-4 | 85 |
| 31.087 | 0.1 | 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, (1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]- | [1aR-552-2-3 | 77 |
| 31.013 | 0.09 | (1R,4aR,7R,8aR)-7-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1,4a-dimethyldecahydronaphthalen-1-ol | 4666-84-6 | 77 |
| 36.139 | 0.08 | Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester | 0-0-0 | 83 |

| | | | | |
|--------|------|---|------------|----|
| 38.173 | 0.08 | Docosane | 629-97-0 | 81 |
| 39.932 | 0.08 | Sulfurous acid, octadecyl 2-propyl ester | 0-0-0 | 75 |
| 33.577 | 0.07 | Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester | 0-0-0 | 83 |
| 41.519 | 0.07 | 4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy- | 6068-80-0 | 70 |
| 22.583 | 0.06 | Copaene | 3856-25-5 | 79 |
| 23.627 | 0.06 | Sulfurous acid, dodecyl 2-propyl ester | 0-0-0 | 82 |
| 35.105 | 0.05 | Spiro[androst-5-ene-17,1'-cyclobutan]-2'-one, 3-hydroxy-, (3.beta.,17.beta.)- | 60534-16-9 | 72 |

8.4.1.4 ANALISIS GC-MS DEL EXTRACTO POR FS DE *O. vulgare*

En el análisis GC-MS del FS al igual que en los demás extractos analizados, se evidencia la presencia predominante de carvacrol (23,51%); además de compuestos encontrados en los otros extractos como cariofileno, 1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene, phenol,2-methyl-5-(1-methylethyl) y tetradecano, constituyendo estos seis compuestos en el 58,45% del total del área (tabla 5), con una similaridad mayor al 90%. Se identificaron 41 compuestos en el FS.

Tabla 5. Componentes del extracto por FS de *O. vulgare* obtenidos por GC-MS

| FLUIDO SUPER CRITICO | | | | |
|----------------------|-------|--|-----------|-------------|
| Ret Time | %Area | ID | CAS | Similaridad |
| 21.297 | 23.51 | Carvacrol | 499-75-2 | 93 |
| 24.252 | 11.65 | Caryophyllene | 87-44-5 | 95 |
| 19.284 | 10.41 | 1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene | 1076-56-8 | 97 |
| 21.033 | 6.77 | Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- | 499-75-2 | 93 |
| 26.236 | 6.11 | Tetradecane | 629-59-4 | 94 |
| 11.405 | 5.16 | Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)- | 527-84-4 | 96 |
| 11.626 | 4.15 | Eucalyptol | 470-82-6 | 97 |
| 41.109 | 4.04 | Dronabinol | 8/03/1972 | 90 |
| 12.478 | 3.2 | .gamma.-Terpinene | 99-85-4 | 97 |
| 16.961 | 2.24 | 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- | 562-74-3 | 95 |

| | | | | |
|--------|------|---|------------|----|
| 29.313 | 1.72 | 5-Oxatricyclo[8.2.0.04,6]dodecane, trimethyl-9-methylene-, (1R,4R,6R,10S)- 4,12,12- | 1139-30-6 | 92 |
| 25.131 | 1.71 | Humulene | 6753-98-6 | 94 |
| 13.722 | 1.6 | 5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol | 546-79-2 | 93 |
| 29.507 | 1.58 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester | 84-66-2 | 94 |
| 17.57 | 1.36 | (1S)-1,3,3-trimethylnorbornan-2-ol | 470-8-6 | 94 |
| 27.183 | 1.34 | cis-muurola-3,5-diene | 0-0-0 | 80 |
| 43.264 | 1.28 | 5,9,13,17-Tetramethyl octadecatetraenoic acid 4,8,12,16- | 0-0-0 | 82 |
| 43.693 | 1.24 | Octadecane, ethanediylbis(oxy)]bis- 1,1'-[(1-methyl-1,2- | 35545-51-8 | 75 |
| 26.633 | 0.96 | .beta.-Bisabolene | 495-61-4 | 91 |
| 41.64 | 0.8 | 6H-Dibenzo[b,d]pyran-1-ol, 6,6,9-trimethyl-3-pentyl- | 521-35-7 | 75 |
| 24.583 | 0.76 | trans-.alpha.-Bergamotene | 13474-59-4 | 93 |
| 23.204 | 0.72 | Copaene | 3856-25-5 | 91 |
| 41.51 | 0.67 | ((3aS,6S,6aR,9aS,9bR)-6a-hydroxy-6-methyl-3- methylene-2,9-dioxodecahydroazuleno[4,5-b]furan- 9a(4H)-yl)methyl 2-methylpropanoate | 0-0-0 | 66 |
| 12.735 | 0.65 | 5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol # | 546-79-2 | 91 |
| 25.899 | 0.61 | (-)-Germacrene D | 23986-74-5 | 89 |
| 29.121 | 0.61 | (-)-Spathulenol | 77171-55-2 | 87 |
| 11.166 | 0.5 | Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- | 586-62-9 | 90 |
| 42.267 | 0.44 | 4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)- 3,5-dihydroxy-7-methoxy- | 6068-80-0 | 70 |
| 25.053 | 0.43 | cis-.beta.-Farnesene | 28973-97-9 | 90 |
| 45.372 | 0.4 | d-Mannitol, 1-decylsulfonyl- | 0-0-0 | 65 |
| 24.675 | 0.39 | o-Methoxy-.alpha.,.alpha.-dimethylbenzyl alcohol | 21022-73-1 | 77 |
| 31.09 | 0.37 | Cubenol | 21284-22-0 | 81 |
| 35.108 | 0.36 | Bicyclo[6.1.0]nonane, 9-(1-methylethylidene)- | 56666-90-1 | 78 |
| 31.017 | 0.31 | (1R,4aR,7R,8aR)-7-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1,4a- dimethyldecahydronaphthalen-1-ol | 4666-84-6 | 79 |

| | | | | |
|--------|------|---|------------|----|
| 38.175 | 0.31 | 2-Methylhexacosane | 1561-2-0 | 82 |
| 22.709 | 0.3 | Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-, acetate | 93-28-7 | 77 |
| 42.985 | 0.3 | d-Mannitol, 1-decylsulfonyl- | 0-0-0 | 66 |
| 39.932 | 0.28 | Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester | 0-0-0 | 76 |
| 36.144 | 0.27 | Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester | 0-0-0 | 85 |
| 33.581 | 0.26 | Dodecane, 2,6,10-trimethyl- | 3891-98-3 | 85 |
| 35.456 | 0.23 | Bicyclo[6.1.0]nonane, 9-(1-methylethylidene)- | 56666-90-1 | 77 |

8.4.2 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*

Las mediciones de las áreas se usaron para determinar el porcentaje del crecimiento de la cepa con el objetivo de determinar cuál de los tratamientos ejercía un mayor efecto sobre *F. oxysporum*. Los resultados en este estudio no mostraron porcentajes de inhibición para la cepa analizada, observándose un efecto contrario al esperado, ya que los tratamientos evaluados promovieron el crecimiento micelial de este fitopatógeno (figuras 21, 22, 23, 24, 25 y 26).

a.

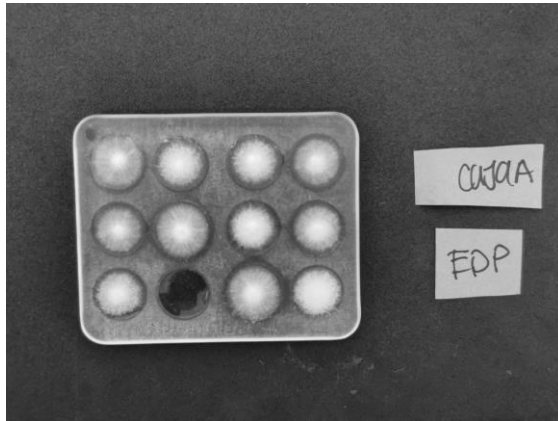


b.



Figura 21. Cajas excavadas con *Fusarium oxysporum* y extracto etanólico total.
a. Caja A b. Caja B

a.



b.



Figura 22. Cajas excavadas con *F. oxysporum* y EP. Caja A. b. Caja B

a.

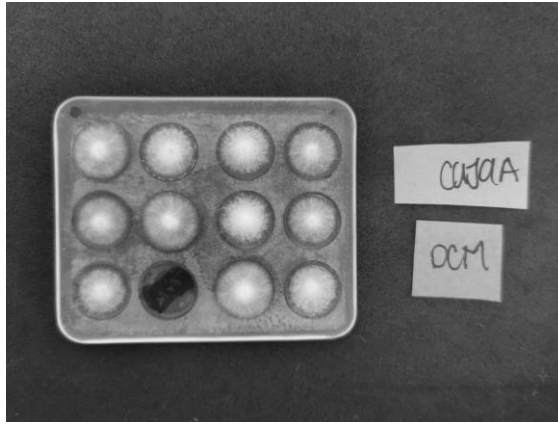


b.



Figura 23. Cajas excavadas con *F. oxysporum* y extracto por FS. Caja A b. Caja B

a.



b.

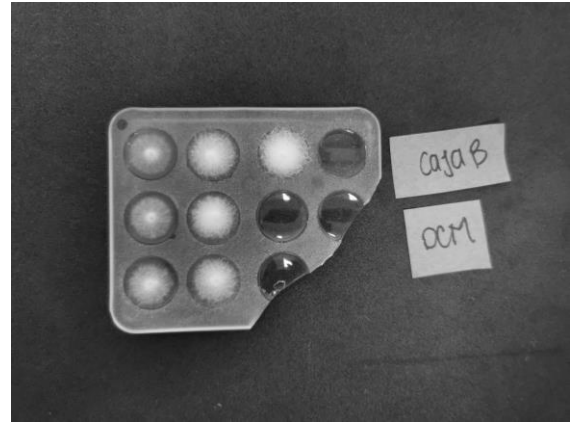
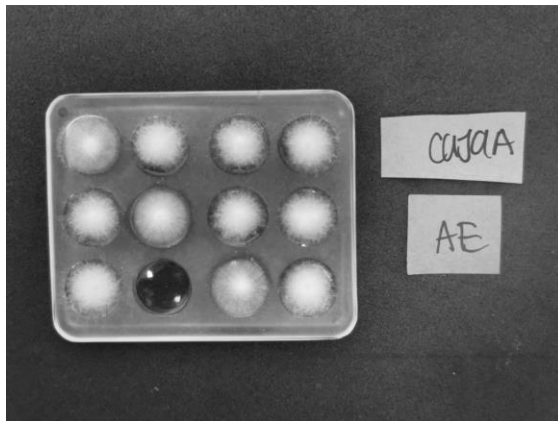


Figura 24. Cajas excavadas con *F. oxysporum* y extracto ED. Caja A b. Caja B

a.



b.



Figura 25. Cajas excavadas con *F. oxysporum* y AE. Caja A b. Caja B



Figura 26. Cajas excavadas con *F. oxysporum* y control positivo itraconazol

En nuestro estudio el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de *F. oxysporum* fue muy semejante en las cinco concentraciones evaluadas a lo largo del tiempo de experimentación, dado que promovieron el crecimiento micelial presentando valores de $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de fungicidas sobre *F. oxysporum*

| Tratamiento | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------|--------------------------------|
| EP | >500 |
| ED | >500 |
| EM | >500 |
| AE | >500 |
| FS | >500 |

En nuestro estudio se observó una promoción del crecimiento micelial >80% para *F. oxysporum*. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en estudios previos realizados por Cid-Lucero y colaboradores (2020), donde los extractos acuosos de *Cylindropuntia imbricata* promovieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* (71). No obstante, nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos por Deleanu y colaboradores (2018), en donde evaluaron el AE de orégano sobre *F. oxysporum* y $1\mu\text{L}$ de aceite de orégano fue suficiente para casi un 75% de inhibición del crecimiento micelial (72).

En los ensayos realizados en *Botrytis cinerea* no se observó inhibición del crecimiento a ninguna de las concentraciones evaluadas (Figuras 27 y 28). Al igual que lo observado con *F. oxysporum* se evidencia que no hubo inhibición del crecimiento micelial, por el contrario, el hongo cubrió por completo los sensibilizadores en algunas de las concentraciones evaluadas. En otras no se evidenció de forma concluyente su efecto sobre el crecimiento del hongo.

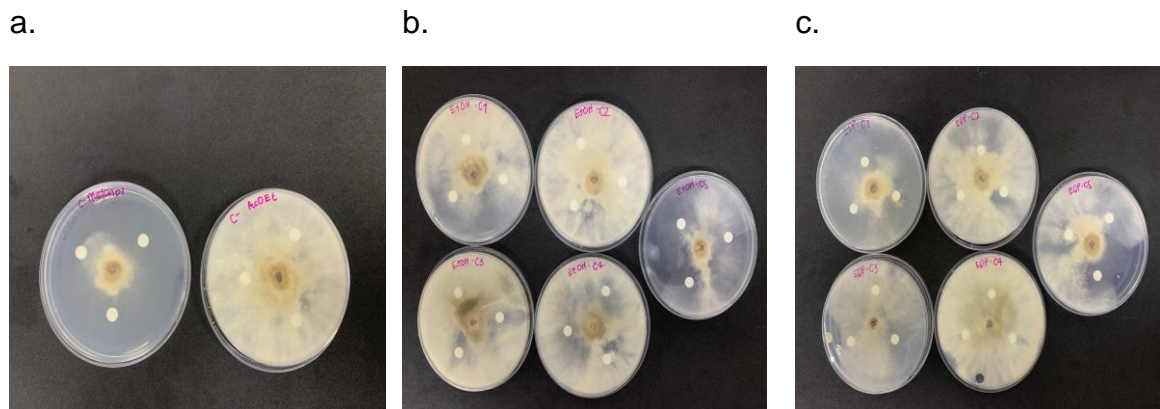


Figura 27. Cajas de Petri con *Botrytis cinerea* a. Control negativo b. EET. c. EP.

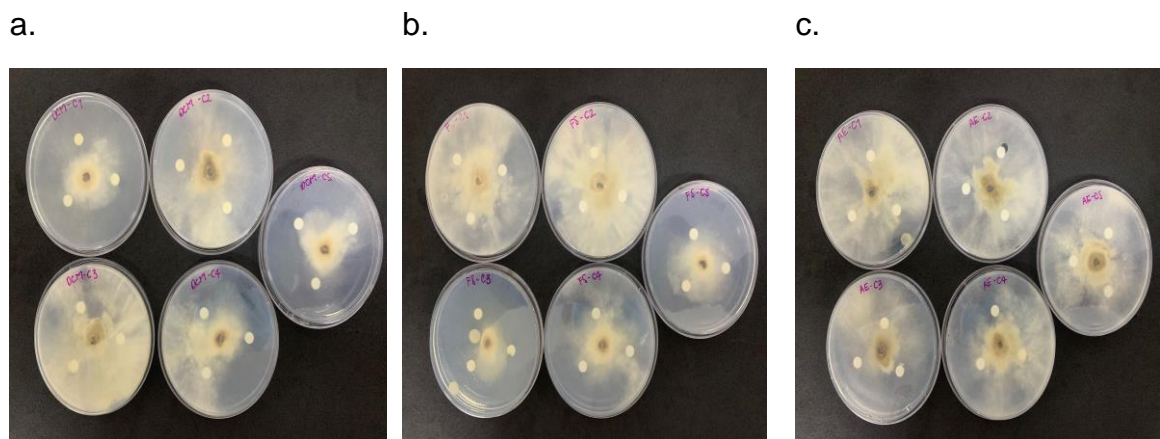


Figura 28. Cajas de Petri con *B. cinerea* a. ED. b. Extracto por FS. c. AE.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Yun Zhao y cols (2021) donde evidencian que el AE de *O. vulgare* a concentraciones de 250 mg/L inhibió el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *B. cinerea* in vitro en un 96,39%. Cabe aclarar que las concentraciones usadas por este grupo son superiores a las evaluadas en el presente estudio (10 a 500 µg/mL) (73).

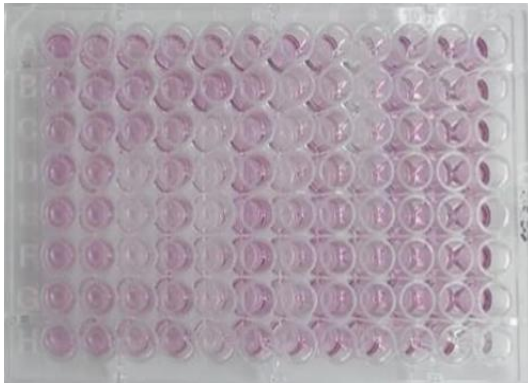
Resultados similares a los antes mencionados fueron observados por Huiyu Hou y cols (2020) donde determinan que el AE de *O.vulgare* inhibió completamente el crecimiento micelial de *B. cinerea* a la concentración de 0,5 mg/mL. A este respecto se podría plantear la posibilidad de que el efecto antifúngico de *O. vulgare* se presenta a partir de concentraciones que superan los 500 µg/mL (74).

8.4.3 ACTIVIDAD CITOTÓXICA

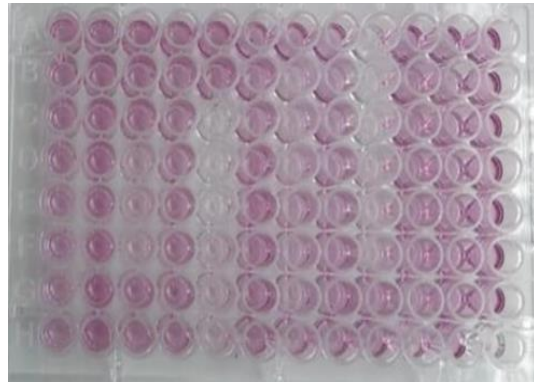
Para determinar la actividad citotóxica, las células tumorales PC3, MDA-MB-231 y MCF-7 fueron tratadas con los extractos obtenidos de *O. vulgare*, con un rango de concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12,5 µg/mL.

La figura 29 muestra los resultados obtenidos al realizar la prueba MTT con las diferentes líneas celulares, en los que se puede observar que las células viables metabolizan el formazán tomando una coloración violácea.

a.



b.



c.

d.

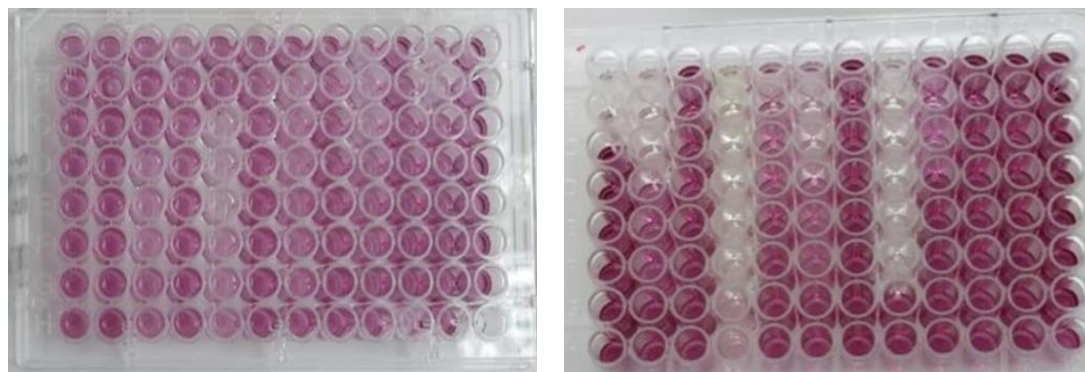


Figura 29. Resultados MTT en las diferentes líneas celulares tumorales. **a.** MCF-7 **b.** MDA-MB-231 **c.** PC3 **d.** DMSO

En la Tabla 7, se muestran las IC_{50} para los extractos AE y FS de *O. vulgare* sobre las diferentes líneas celulares tumorales.

Tabla 7. IC_{50} de extractos de *O. vulgare* sobre líneas celulares tumorales PC3, MDA-MB-231 y MCF7.

| IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | Tratamientos | Líneas celulares tumorales | | |
|--------------------------------|--------------|----------------------------|------------|-------|
| | | PC3 | MDA-MB-231 | MCF7 |
| | EP | 108.1 | | |
| | ED | 29.8 | | |
| | ET | 104.3 | | |
| | AE | 25.41 | 84,81 | 106,5 |
| | FS | 22.9 | 460 | >200 |

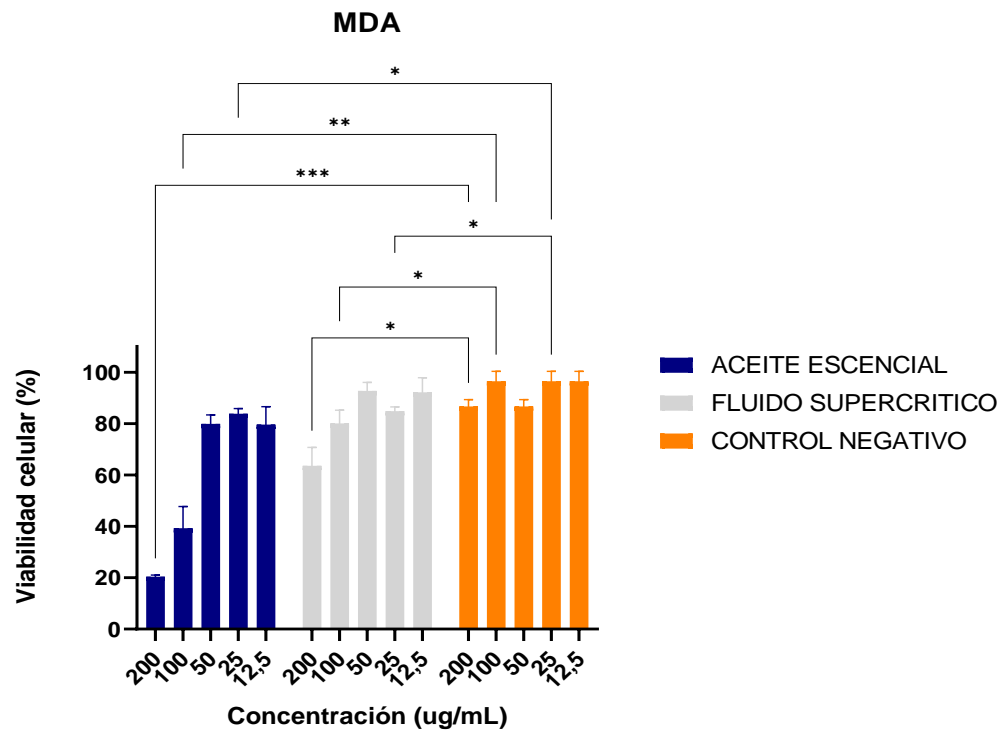
8.4.3.1 LINEA CELULAR MDA-MB-231

Sobre la línea celular MDA-MB-231 se observa que el AE a las diferentes concentraciones evaluadas (200, 100, 50, 25 y 12,5 $\mu\text{g/MI}$) disminuye la viabilidad celular en mayor proporción que el extracto obtenido por FS (figura 30 a). Lo anterior

se corrobora con los valores calculados de IC₅₀ y del área bajo la curva calculados a partir de la figura 30 b. (IC₅₀: 84,81; 460,00, AUC=76,18; 101,0 respectivamente).

Adicionalmente, el efecto citotóxico del AE sobre esta línea celular tumoral es concentración dependiente, y estadísticamente significativo en comparación con el grupo de células no tratadas (control negativo) ($p < 0,05$; ANOVA a dos vías; post hoc de Dunnett)

a.



b.

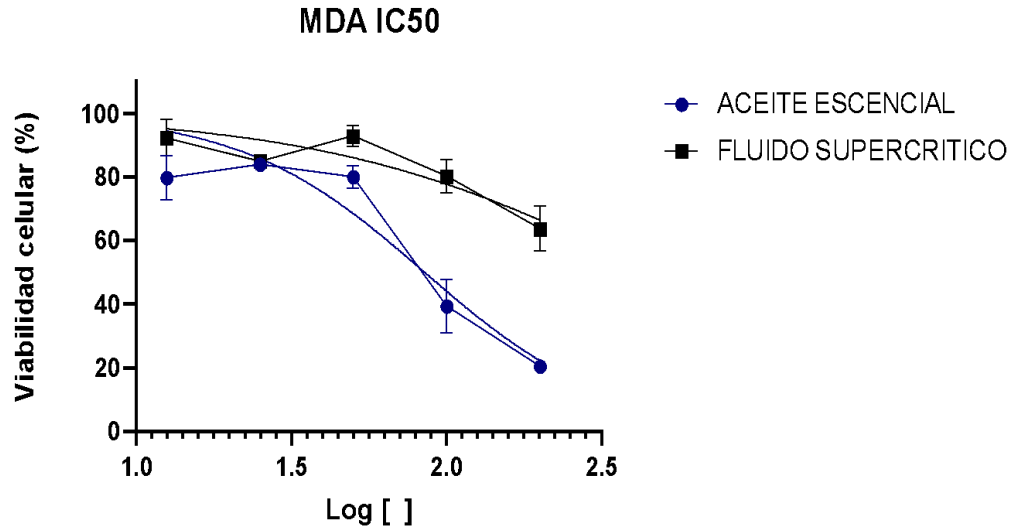


Figura 30. Evaluación citotóxica de los extractos AE y FS de *O. vulgare* frente a la línea celular MDA-MB-231. a. Porcentaje de viabilidad celular. b. IC₅₀

En estudio realizado en 2013 por Grbović y cols, se evidencian resultados similares a los encontrados en este estudio en los cuales el *O. vulgare* muestra efecto citotóxico sobre la línea tumoral MDA-MB-231, el cual es dosis dependiente. Después de 24 horas de tratamiento a las concentraciones de 250 y 500 µg/mL inhibió al 50% de las células. En este estudio se observa que en las concentraciones de 200 y 100 µg/mL la mortalidad celular fue del 80 y 60% respectivamente, evidenciándose el potencial efecto citotóxico del *O. vulgare* sobre esta línea celular tumoral. Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$) (75).

En el mismo sentido, en estudio realizado por Makrane y cols en 2018 sobre la especie *O. majorana* muestra que todos los extractos (acuoso, éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, metanólico y extractos acuosos empobrecidos) a diferentes concentraciones mostraron efecto citotóxico; para ello utilizaron la medición de índices de viabilidad celular mediante la prueba WST-1; el efecto observado fue dosis-dependiente a las 72 horas de tratamiento (rango estudiado 15,6 a 500 µg/mL). La viabilidad celular disminuyó drásticamente a las concentraciones más altas. Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$), y son similares a los obtenidos en nuestro estudio (76).

En revisión de literatura sobre los mecanismos de acción del carvacrol y el timol realizada por Alves Sampaio y cols (2021) con datos obtenidos entre 2003 y 2021, informan que su efecto se relaciona con la inducción de la apoptosis, citotoxicidad, detención de los ciclos celulares, actividad anti metastásica, y también muestran diferentes efectos sobre las vías de señalización (MAPKs y PI3K/AKT/mTOR). El

timol en células de cáncer de mama líneas celulares MDA-MB-231 Y MCF-7 inhibe la proliferación celular y apoptosis a través de la vía mitocondrial, ocasionando daño oxidativo al ADN mediante la modulación Bax/BCL-2, disminuye los niveles de procaspasa 8, 9 y 3, y los niveles de caspasa 3, y detiene el ciclo celular en la fase S mediante la sobreexpresión de la proteína P21.

En estudio realizado sobre cuatro líneas celulares de cáncer de mama, Mboge y cols (2019) indican que el cariofileno ocasiona un daño en la membrana celular al mejorar la biosíntesis de los ácidos grasos y colesterol provocando la muerte celular; además de ello activa los procesos inflamatorios a través de la señalización de la interleucina 10 y 1, induciendo estrés celular mediado por ROS.

En cuanto al eucaliptol, otro de los metabolitos secundarios encontrados en el AE y FS, Mohd Izham y cols (2021) en estudio sobre la línea tumoral de cáncer de mama MDA-MB-231 indican que este muestra actividad citotóxica relacionada con inducción de apoptosis sin describir los mecanismos por lo que se requiere de mayores estudios a este respecto (77).

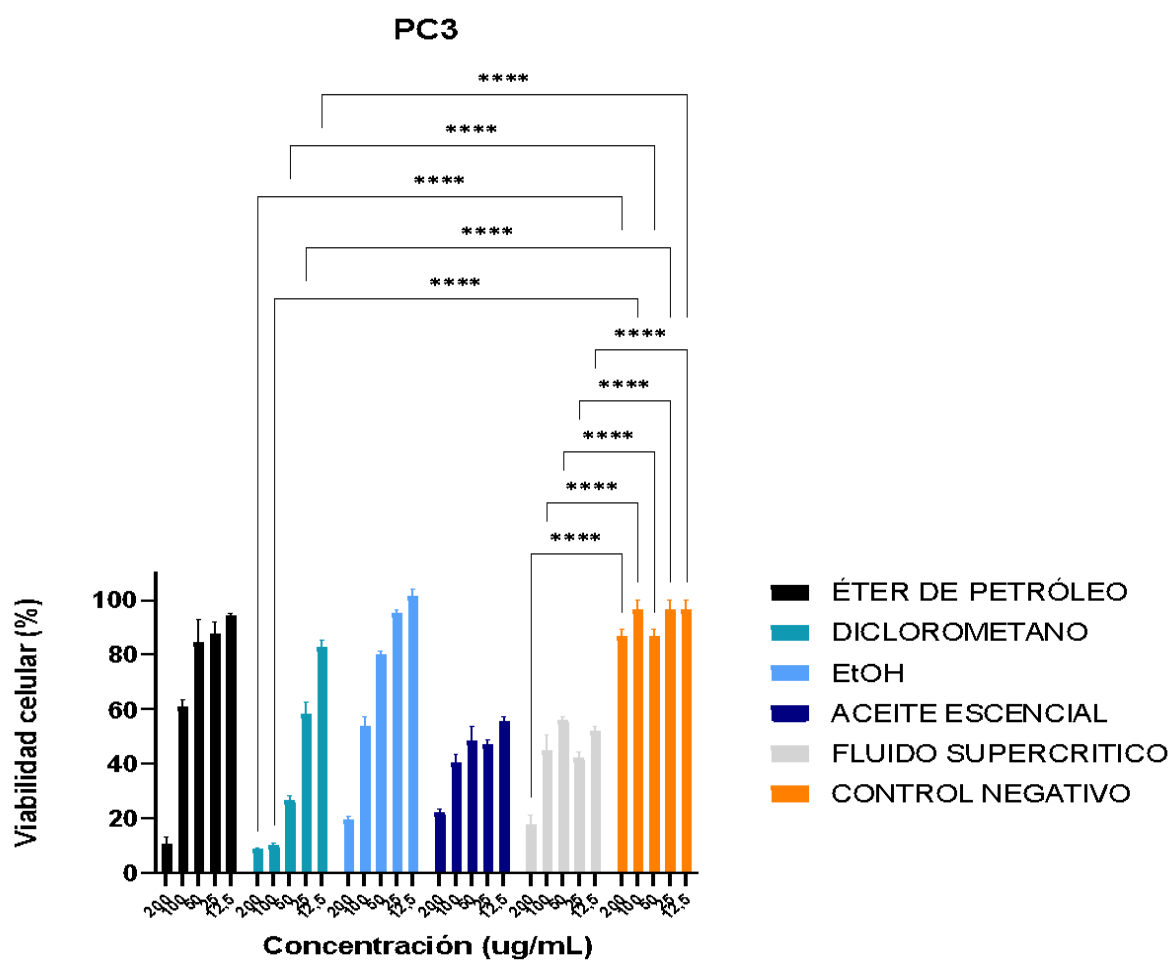
8.4.3.2 LINEA CELULAR PC3

Para la línea celular PC3 se evidencia que los tratamientos de DM, AE y FS muestran los menores porcentajes de viabilidad celular en comparación con las células tratadas con los extractos de EP y ET (figura 31 a).

Esto corroborado con los valores de IC₅₀ de FS, AE y DM los cuales se encuentran en un rango de 22 a 30 µg/mL en comparación con EP y ET que se encuentran por encima de 100 µg/mL. Adicionalmente, las menores áreas bajo la curva fueron observadas para DM, AE y FS (figura 31 b). (IC₅₀: 22.9; 25.41; 29.8; 108.1; 104.3; AUC= EP: 85,99; DM: 42,50; ET: 87,18; AE: 52,80; FS: 53,68 respectivamente).

Al igual que en la línea celular MDA-MB-231 el efecto citotóxico de FS, AE y DM sobre la línea celular tumoral PC3 es concentración dependiente, estableciéndose que, a mayor concentración, mayor efecto. Los resultados son estadísticamente significativos en comparación con el grupo control negativo, excepto para los extractos EP y ET a concentración de 50 µg/mL, y para el extracto etanólico total a concentración de 25 µg/mL. (p<0,05; ANOVA a dos vías; post hoc de Dunnett).

a.



b.

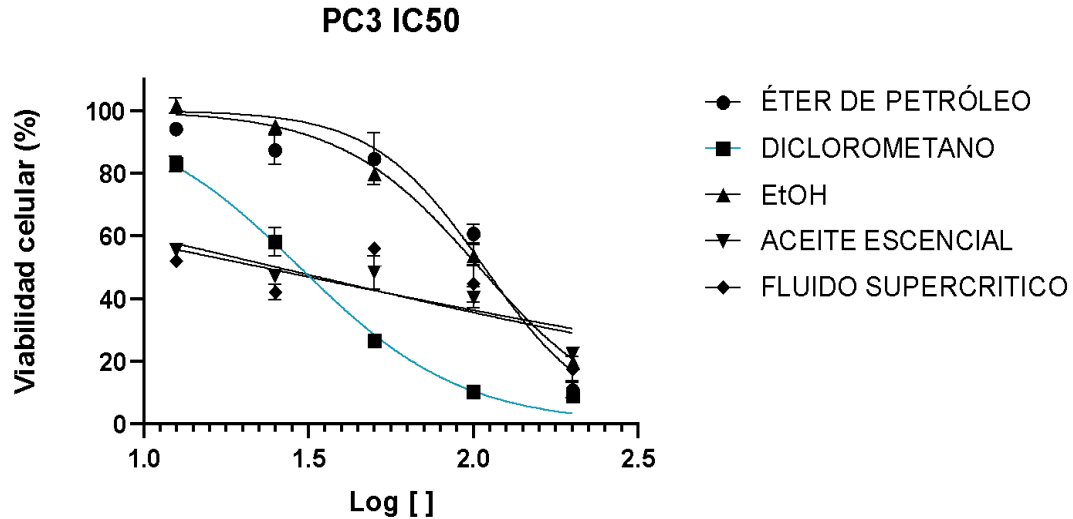


Figura 31. Evaluación citotóxica de los extractos EP, DM, ET, AE y FS de *O. vulgare* frente a la línea celular PC3. a. Porcentaje de viabilidad celular b. IC₅₀

En 2019 Heidarian y cols evalúan el efecto citotóxico del carvacrol en la línea celular tumoral PC3 evidenciando disminución tanto la proliferación celular como la viabilidad de manera dependiente de la dosis a diferentes concentraciones (0–800 μ M). Los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$). En comparación con este estudio, se evidencia que el metabolito secundario carvacrol fue el principal componente de los diferentes extractos de *O. vulgare* evaluados, con posible efecto citotóxico sobre la línea celular PC3. En nuestro estudio la viabilidad celular con los diferentes extractos mostró efecto citotóxico concentración dependiente, mostrando mayor efecto en los extractos FS, AE y DM, con significancia estadística ($p < 0,05$) (58).

En otro estudio realizado por Yun Luo y cols en 2016 en la línea celular tumoral PC3 con relación al carvacrol, evidenciaron que se redujo la viabilidad de las células de manera dependiente de la concentración (250, 500 y 750 μ M de carvacrol), disminuyendo la tasa de proliferación celular significativamente ($p < 0,05$, $n = 6$). Resultados similares a los evidenciados en el presente estudio (78).

Respecto al metabolito secundario carvacrol, Tridade y cols (2019) evidencian el potente efecto antiproliferativo y citotóxico sobre la línea celular PC3 al unirse con el compuesto B-ciclodextrina, generando complejos estables que aumentan la solubilidad y biodisponibilidad del carvacrol. Otros estudios realizados sobre la línea celular PC3 por Heidariany y cols (2019) muestran que el carvacrol reduce la proliferación celular y la viabilidad con efecto concentración dependiente, inhibiendo la expresión del gen IL-6 y por consiguiente

disminuyendo la síntesis de proteína IL-6; además reduce los niveles de PSTAT3 Y PAkt.

Por otra parte, Delgado y cols (2021) evidencian que en células de cáncer de próstata PC3 el cariofileno actúa a nivel de la mitocondria induciendo la despolarización de la membrana y liberando la proteína proapoptótica Bax de Bcl-xL y BIM/BCL-2, proceso mediado por la activación de las caspasas 3 y 7 de la mitocondria (79).

8.5.3.3 LINEA CELULAR MCF-7

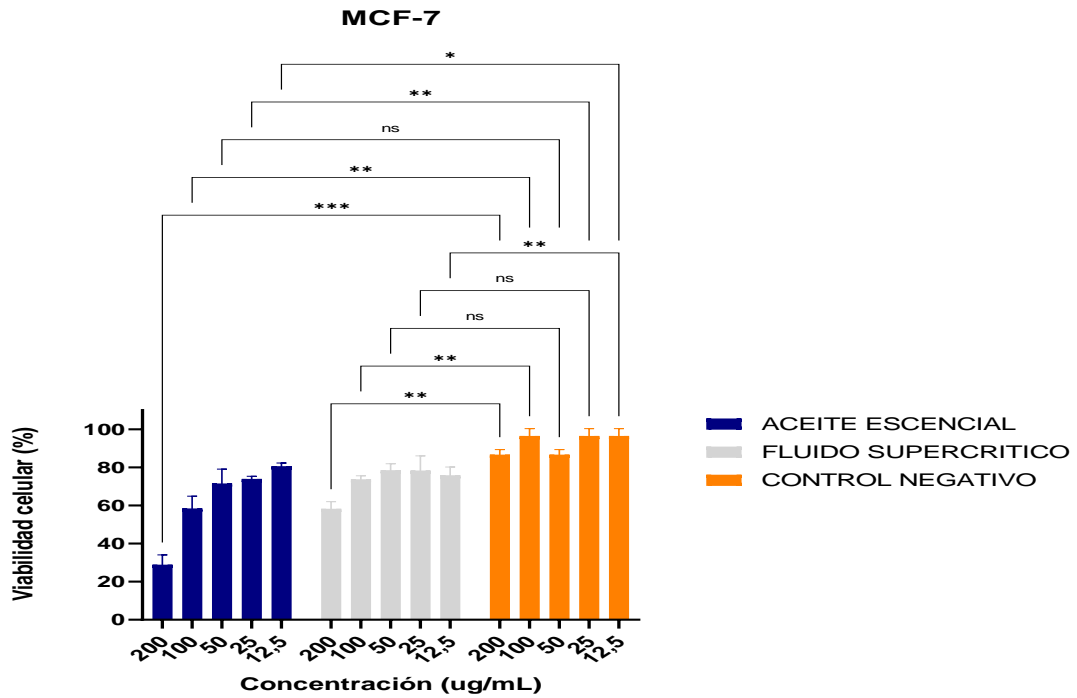
En la figura 32 a. se evidencia que para la línea celular MCF-7 el menor porcentaje de viabilidad celular se presenta con el AE. Para la fracción obtenida por FS, el porcentaje de viabilidad celular para la mayor concentración evaluada fue de 58,25%.

Observando el comportamiento de las células tratadas con el AE, únicamente las concentraciones de 200 y 100 $\mu\text{g/mL}$ alteraron la viabilidad celular. Las concentraciones más bajas no mostraron efecto citotóxico.

Al comparar los valores de IC_{50} (figura 32 b), se evidencia que el AE tiene un menor valor (mayor efecto citotóxico) en comparación con el FS (>200 $\mu\text{g/mL}$). (IC_{50} : 106,5; >200; $\text{AUC}=\text{AE}$: 77,86; FS: 89,60 respectivamente).

Los dos tratamientos evaluados sobre la línea celular MCF-7, muestran diferencias significativas con respecto al grupo control negativo, excepto para las concentraciones de 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$. ($p < 0,05$; ANOVA a dos vías; post hoc de Dunnett).

a.



b.

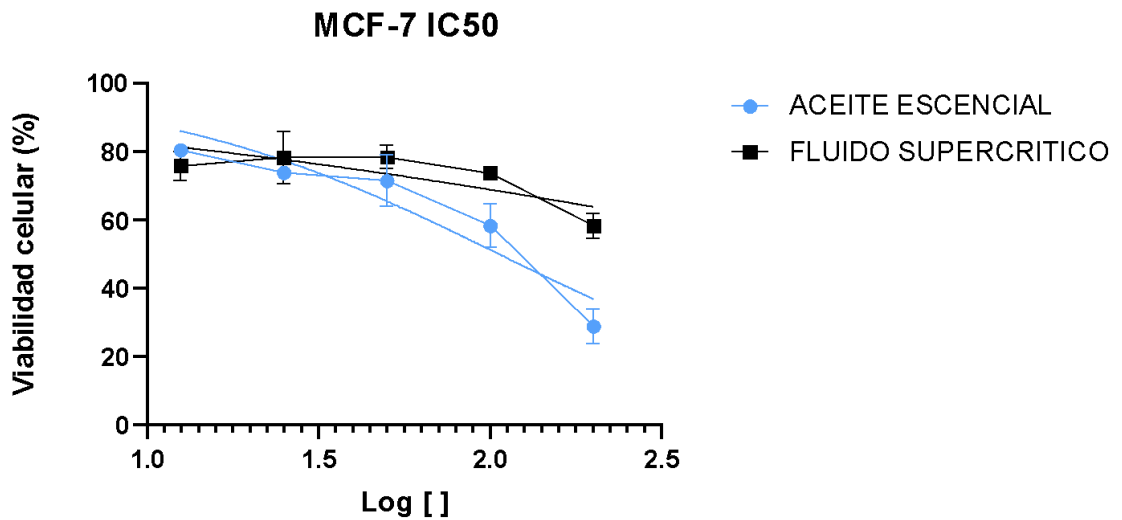


Figura 32. Evaluación citotóxica de los extractos AE y FS de *O. vulgare* frente a la línea celular MCF-7. a. Porcentaje de viabilidad celular b. IC₅₀

Estudios anteriores realizados por Ashok mari y cols (2021) sobre la línea celular tumoral MCF-7 expuesta a diferentes concentraciones de carvacrol, informan una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular con la mitad del valor de concentración inhibitoria máxima de 200 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0,05$). Resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio donde el AE evidencia efecto citotóxico a concentraciones de 200 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (66).

Por otra parte, Leilei Li y cols en 2021 evidencian que el carvacrol inhibía de manera concentración dependiente la viabilidad de las células de cáncer de mama MCF-7. Se evaluaron concentraciones de 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μM mediante ensayo CCK-8 para medir el efecto del tratamiento sobre la viabilidad celular, evidenciando que el carvacrol a 50-500 μM inhibía de forma dependiente de la dosis la viabilidad celular, resultados concordantes con los encontrados en esta investigación (65).

Respecto a los metabolitos encontrados en el análisis CG-MS, Kamran y cols (2022) con relación al mecanismo de acción del timol, indican que este detiene el ciclo celular en la fase G0/G1 y actúan deteriorando la membrana mitocondrial mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); además aumentan la expresión de la proteína Bax y reduce la proteína BCL-2 activando las caspasas y la apoptosis. En cuanto al carvacrol, este ejerce su efecto bloqueando MMP-2 y MMP-9, bloqueando la expresión de ciclinas B1 y la progresión de la fase G2/M, además estimula la apoptosis mediante la fosforilación de Bax y JNK; suprime la proliferación celular al inhibir la vía de señalización MAPK y PI3K/Akt. En cáncer de mama MCF-7 activa la apoptosis mediante la modulación de la expresión de las proteínas P53, BCL-2 y Bax; activa las caspasas 9 y 3, y fragmenta el ADN. Los terpenoides tienen efecto sinérgico al ser administrados de forma concomitante con medicamentos como doxorrubicina, cisplatino, plactaxel y 5-fluoruracilo especialmente en células cancerosas multirresistentes.

9. CRONOGRAMA

Tabla 8. Cronograma

| Actividades / Meses | Sept | Oct | Nov | Dic | Enero | Feb | Marzo | Abril | Mayo |
|---|------|-----|-----|-----|-------|-----|-------|-------|------|
| Planificación de la investigación | | | | | | | | | |
| Problema | | | | | | | | | |
| Pregunta | | | | | | | | | |
| Revisión de literatura | | | | | | | | | |
| Trabajo de campo | | | | | | | | | |
| Adquisición materia prima | | | | | | | | | |
| Elaboración de extractos | | | | | | | | | |
| Realización de CG/EM | | | | | | | | | |
| Montaje de cultivos de hongos | | | | | | | | | |
| Montaje de cultivos de líneas celulares neoplásicas | | | | | | | | | |
| Procesamiento, tabulación, interpretación | | | | | | | | | |
| Recolección de datos | | | | | | | | | |
| Análisis de datos | | | | | | | | | |
| Resultados | | | | | | | | | |
| Comunicación de resultados | | | | | | | | | |

10. CONCLUSIONES

En los resultados obtenidos respecto a la evaluación de la actividad antifúngica en *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* no se evidenció inhibición de crecimiento a las concentraciones evaluadas, por el contrario promueve su crecimiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad para la línea celular tumoral MDA-MB-231, se evidencia que el AE a las concentraciones de 200 y 100 µg/mL disminuye la viabilidad celular entre el 20 y 40%, observándose un mayor efecto en comparación con el FS (>60%).

Para la línea celular tumoral PC3 los tratamientos de DM, AE y FS presentaron mayor citotoxicidad que la observada con EP y ET, concentración dependiente, es decir para 200, 100 y 50 µg/mL es mayor el efecto citotóxico en comparación con las otras concentraciones.

En la línea celular MCF-7 para el tratamiento con AE se observa alteración de la viabilidad celular para las concentraciones de 200 y 100 µg/mL, con porcentajes de viabilidad entre el 28 y 58%; en las concentraciones restantes no se evidenció efecto citotóxico, así como tampoco en el FS.

Los extractos obtenidos (EP, ED, AE y FS) fueron analizados con GC-MS encontrando que el metabolito secundario con mayor concentración corresponde al carvacrol con un porcentaje de similitud mayor al 90%. Este hallazgo confirma lo descrito en la literatura respecto a la composición química del *O. vulgare*, y su potencial actividad citotóxica.

Los metabolitos secundarios encontrados en los extractos analizados, actúan mediante diferentes mecanismos para ejercer su efecto citotóxico. Los principales mecanismos de acción están dados por la inducción de la apoptosis, supresión en la expresión de diversos oncogenes y proteínas, protección del ADN, y destrucción de la membrana mitocondrial según lo descrito en la literatura.

11. RECOMENDACIONES

En cuanto a la actividad antifúngica de *Origanum vulgare* contra *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, es importante continuar la investigación dado que en otros estudios revisados se encontró actividad antifúngica a mayores concentraciones que las evaluadas.

Respecto a la actividad citotóxica, consideramos importante completar los estudios de citotoxicidad en las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 y MCF-7 para el EP, ED Y EET con el objetivo de establecer comparaciones con la línea celular PC3. Además, dado que se demostró la presencia de efecto citotóxico para el AE y FS, se recomienda continuar con estudios que permitan establecer el tipo de muerte celular inducida por los extractos (apoptosis vs necrosis) y los efectos a largo plazo sobre cultivos de líneas celulares (ensayo de clonogenicidad), y de acuerdo a estos resultados plantear la posibilidad de realizar experimentos en animales para determinar la actividad antitumoral.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. lyssa R Letourneau:David C. Hooper,;Keri K Hall, MD, MS (Beta-lactam antibiotics: Mechanisms of action and resistance and adverse effects – UpToDate, 4 de agosto de 2021. - UpToDate [Internet]. [citado 18 de mayo de 2022]. Disponible en: [https://www.uptodate.com.recursosonlinea.juanncorpas.edu.co:2443/contents/search?search=lyssa%20R%20Letourneau:David%20C.%20Hooper,:Keri%20K%20Hall,%20MD,%20MS%20\(Beta-lactam%20antibiotics:%20Mechanisms%20of%20action%20and%20resistance%20and%20adverse%20effects%20%E2%80%93%20UpToDate,%204%20de%20agosto%20de%202021.&sp=0&searchType=PLAIN_TEXT&source=USER_INPUT&searchControl=TOP_PULLDOWN&searchOffset=1&autocomplete=false&language=&max=0&index=&autocompleteTerm=&rawSentence=](https://www.uptodate.com/recursosonlinea.juanncorpas.edu.co:2443/contents/search?search=lyssa%20R%20Letourneau:David%20C.%20Hooper,:Keri%20K%20Hall,%20MD,%20MS%20(Beta-lactam%20antibiotics:%20Mechanisms%20of%20action%20and%20resistance%20and%20adverse%20effects%20%E2%80%93%20UpToDate,%204%20de%20agosto%20de%202021.&sp=0&searchType=PLAIN_TEXT&source=USER_INPUT&searchControl=TOP_PULLDOWN&searchOffset=1&autocomplete=false&language=&max=0&index=&autocompleteTerm=&rawSentence=)
2. Andrisic L, Dudzik D, Barbas C, Milkovic L, Grune T, Zarkovic N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biol.* abril de 2018;14:47-58.
3. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol.* 1 de enero de 2020;88(1):26-40.
4. Antimicrobial Peptides - PMC [Internet]. [citado 18 de mayo de 2022]. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.recursosonlinea.juanncorpas.edu.co:2443/pmc/articles/PMC5298395/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/recursosonlinea.juanncorpas.edu.co:2443/pmc/articles/PMC5298395/)
5. Lombrea A, Antal D, Ardelean F, Avram S, Pavel IZ, Vlaia L, et al. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *Int J Mol Sci.* 17 de diciembre de 2020;21(24):9653.
6. Fikry S, Khalil N, Salama O. Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express.* 26 de marzo de 2019;9(1):41.
7. Čabarkapa I, Čolović R, Đuragić O, Popović S, Kokić B, Milanov D, et al. Antibiofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. *Biofouling.* 16 de marzo de 2019;35(3):361-75.
8. Bhat V, Sharma SM, Shetty V, Shastry CS, Rao CV, Shenoy S, et al. Characterization of Herbal Antifungal Agent, *Origanum vulgare* against Oral *Candida* spp. Isolated from Patients with *Candida*-Associated Denture

- Stomatitis: An In vitro Study. *Contemp Clin Dent*. junio de 2018;9(Suppl 1):S3-10.
9. Pezzani R, Vitalini S, Iriti M. Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. *Phytochem Rev*. diciembre de 2017;16(6):1253-68.
 10. Veenstra JP, Johnson JJ. Oregano (*Origanum vulgare*) extract for food preservation and improvement in gastrointestinal health. *Int J Nutr*. 2019;3(4):43-52.
 11. Oniga I, Puşcaş C, Silaghi-Dumitrescu R, Olah NK, Sevastre B, Marica R, et al. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules*. 19 de agosto de 2018;23(8):2077.
 12. Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Vazquez-Olivo G, Heredia JB. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. 14 de junio de 2017;22(6):989.
 13. Simirgiotis MJ, Burton D, Parra F, López J, Muñoz P, Escobar H, et al. Antioxidant and Antibacterial Capacities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from the Arid Andean Region of Chile and its Chemical Characterization by GC-MS. *Metabolites*. 16 de octubre de 2020;10(10):414.
 14. Khan M, Khan ST, Khan M, Mousa AA, Mahmood A, Alkathlan HZ. Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. *AMB Express*. 31 de octubre de 2019;9:176.
 15. Liaqat I, Mahreen A, Arshad M, Arshad N. Antimicrobial and toxicological evaluation of *Origanum vulgare*: an *in vivo* study. *Braz J Biol [Internet]*. 6 de agosto de 2021 [citado 7 de noviembre de 2021];83. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/bjb/a/z3FSRSg3WzTXMmRWTSdLxwk/?lang=en>
 16. Vasconcelos NG, Croda J, Silva KE, Motta MLL, Maciel WG, Limiere LC, et al. *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits the growth of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Rev Soc Bras Med Trop*. 27 de junio de 2019;52:e20180502.
 17. Bahmani M, Taherikalani M, Khaksarian M, Soroush S, Ashrafi B, Heydari R. Phytochemical Profiles and Antibacterial Activities of Hydroalcoholic Extracts of *Origanum vulgare* and *Hypericum perforatum* and Carvacrol and Hypericin as a Promising Anti-*Staphylococcus aureus*. *Mini Rev Med Chem*. 2019;19(11):923-32.
 18. Fratini F, Mancini S, Turchi B, Friscia E, Pistelli L, Giusti G, et al. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential

- oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiological Research*. 1 de enero de 2017;195:11-7.
19. Ghitea TC, El-Kharoubi A, Ganea M, Bimbo-Szuhai E, Nemeth TS, Ciavoi G, et al. The Antimicrobial Activity of *Origanum vulgare* L. Correlated with the Gastrointestinal Perturbation in Patients with Metabolic Syndrome. *Molecules*. 8 de enero de 2021;26(2):283.
 20. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel)*. 8 de agosto de 2017;4(3):58.
 21. Chuang LT, Tsai TH, Lien TJ, Huang WC, Liu JJ, Chang H, et al. Ethanolic Extract of *Origanum vulgare* Suppresses *Propionibacterium acnes*-Induced Inflammatory Responses in Human Monocyte and Mouse Ear Edema Models. *Molecules*. 9 de agosto de 2018;23(8):1987.
 22. Taleb MH, Abdeltawab NF, Shamma RN, Abdelgayed SS, Mohamed SS, Farag MA, et al. *Origanum vulgare* L. Essential Oil as a Potential Anti-Acne Topical Nanoemulsion—In Vitro and In Vivo Study. *Molecules*. 28 de agosto de 2018;23(9):2164.
 23. Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, Plessas S, Theodoridou I, Papaemmanouil V, et al. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1 de diciembre de 2015;26(1):23289.
 24. Lee JH, Kim YG, Lee J. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;123(6):1420-8.
 25. Harmati M, Gyukity-Sebestyen E, Dobra G, Terhes G, Urban E, Decsi G, et al. Binary mixture of *Satureja hortensis* and *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oils: in vivo therapeutic efficiency against *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2017;22(2):e12350.
 26. Barbosa LN, Alves FCB, Andrade BFMT, Albano M, Rall VLM, Fernandes AAH, et al. Proteomic analysis and antibacterial resistance mechanisms of *Salmonella Enteritidis* submitted to the inhibitory effect of *Origanum vulgare* essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Proteomics*. 1 de marzo de 2020;214:103625.

27. Karaman M, Bogavac M, Radovanović B, Sudji J, Tešanović K, Janjušević L. *Origanum vulgare* essential oil affects pathogens causing vaginal infections. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;122(5):1177-85.
28. Pradebon Brondani L, Alves da Silva Neto T, Antonio Freitag R, Guerra Lund R. Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Médicale*. 1 de marzo de 2018;28(1):94-100.
29. Vahedi G, Khosravi AR, Shokri H, Moosavi Z, Delirez N, Sharifzadeh A, et al. Fungicidal effect of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida glabrata* and its cytotoxicity against macrophages. *J Herbmed Pharmacol*. 24 de marzo de 2016;5(2):78-84.
30. Baj T, Biernasiuk A, Wróbel R, Malm A. Chemical composition and in vitro activity of *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Thymus serpyllum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils towards oral isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Open Chemistry*. 1 de enero de 2020;18(1):108-18.
31. Mediouni S, Jablonski JA, Tsuda S, Barsamian A, Kessing C, Richard A, et al. Oregano Oil and Its Principal Component, Carvacrol, Inhibit HIV-1 Fusion into Target Cells. *J Virol*. 16 de julio de 2020;94(15):e00147-20.
32. De Santis F, Poerio N, Gismondi A, Nanni V, Di Marco G, Nisini R, et al. Hydroalcoholic extract from *Origanum vulgare* induces a combined anti-mycobacterial and anti-inflammatory response in innate immune cells. *PLoS One*. 4 de marzo de 2019;14(3):e0213150.
33. Parra C, Muñoz P, Bustos L, Parra F, Simirgiotis MJ, Escobar H. UHPLC-DAD Characterization of *Origanum vulgare* L. from Atacama Desert Andean Region and Antioxidant, Antibacterial and Enzyme Inhibition Activities. *Molecules*. 6 de abril de 2021;26(7):2100.
34. Hambardzumyan S, Sahakyan N, Petrosyan M, Nasim MJ, Jacob C, Trchounian A. *Origanum vulgare* L. extract-mediated synthesis of silver nanoparticles, their characterization and antibacterial activities. *AMB Express*. 5 de septiembre de 2020;10:162.
35. García-Pérez ME, Alfonso-Castillo A, Lores OF, Batista-Duharte A, Lemus-Rodríguez Z. Toxicological evaluation of an aqueous suspension from leaves and stems of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 30 de enero de 2018;211:29-37.
36. Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, et al. *Fusarium* Pathogenomics. *Annu Rev Microbiol*. 8 de septiembre de 2013;67(1):399-416.

37. Dananjaya SHS, Udayangani RMC, Shin SY, Edussuriya M, Nikapitiya C, Lee J, et al. In vitro and in vivo antifungal efficacy of plant based lawsone against *Fusarium oxysporum* species complex. *Microbiol Res.* agosto de 2017;201:21-9.
38. Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales HA, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra JM, Martínez-Escudero E. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica.* abril de 2015;64(2):194-205.
39. Shabani F, Kumar L, Esmaeili A. Future distributions of *Fusarium oxysporum* f. spp. in European, Middle Eastern and North African agricultural regions under climate change. *Agriculture, Ecosystems & Environment.* 1 de diciembre de 2014;197:96-105.
40. Osorio-Guarín JA, Enciso-Rodríguez FE, González C, Fernández-Pozo N, Mueller LA, Barrero LS. Association analysis for disease resistance to *Fusarium oxysporum* in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L). *BMC Genomics.* 18 de marzo de 2016;17(1):248.
41. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* diciembre de 2013;32(12):1491-500.
42. Taj-Aldeen SJ. Reduced Multidrug Susceptibility Profile Is a Common Feature of Opportunistic *Fusarium* Species: *Fusarium* Multi-Drug Resistant Pattern. *J Fungi (Basel).* 10 de abril de 2017;3(2):E18.
43. Garcia RR, Min Z, Narasimhan S, Bhanot N. *Fusarium* brain abscess: case report and literature review. *Mycoses.* enero de 2015;58(1):22-6.
44. van Diepeningen AD, Al-Hatmi AMS, Brankovics B, de Hoog GS. Taxonomy and Clinical Spectra of *Fusarium* Species: Where Do We Stand in 2014? *Curr Clin Micro Rpt.* 1 de septiembre de 2014;1(1):10-8.
45. Characterization of a novel genomovirus in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* - ClinicalKey [Internet]. [citado 18 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www-clinicalkey-es.recursosenlinea.juanncorpas.edu.co:2443/#!/content/journal/1-s2.0-S0042682220302336>
46. Jurgensen CW, Madsen A. Exposure to the airborne mould *Botrytis* and its health effects. *Ann Agric Environ Med.* 2009;16(2):183-96.

47. Hashimoto S, Tanaka E, Ueyama M, Terada S, Inao T, Kaji Y, et al. A case report of pulmonary *Botrytis* sp. infection in an apparently healthy individual. *BMC Infect Dis.* diciembre de 2019;19(1):684.
48. Richards JK, Xiao CL, Jurick WM. *Botrytis* spp.: A Contemporary Perspective and Synthesis of Recent Scientific Developments of a Widespread Genus that Threatens Global Food Security. *Phytopathology®.* marzo de 2021;111(3):432-6.
49. Gruřová D, Caputo L, Elshafie HS, Baranová B, De Martino L, Sedlák V, et al. Thymol Chemotype *Origanum vulgare* L. Essential Oil as a Potential Selective Bio-Based Herbicide on Monocot Plant Species. *Molecules.* 29 de enero de 2020;25(3):E595.
50. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 1 de noviembre de 2016;210:402-14.
51. Andrisic L, Dudzik D, Barbas C, Milkovic L, Grune T, Zarkovic N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biol.* abril de 2018;14:47-58.
52. Papel del tumor y la autofagia del huésped en el metabolismo del cáncer - PubMed [Internet]. [citado 18 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31160394/>
53. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [citado 18 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
54. Golemis EA, Scheet P, Beck TN, Scolnick EM, Hunter DJ, Hawk E, et al. Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. *Genes Dev.* 1 de julio de 2018;32(13-14):868-902.
55. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* junio de 2018;22(12):3855-64.
56. Inmunoterapia contra el cáncer mejorada con nanotecnología: la inmunología se encuentra con la nanotecnología - PubMed [Internet]. [citado 18 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32942725/>
57. Barbato L, Bocchetti M, Di Biase A, Regad T. Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells.* 18 de agosto de 2019;8(8):E926.
58. Heidarian E, Keloushadi M. Antiproliferative and Anti-invasion Effects of Carvacrol on PC3 Human Prostate Cancer Cells through Reducing pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 Signaling Proteins. *Int J Prev Med.* 2019;10:156.

59. Khan F, Khan I, Farooqui A, Ansari IA. Carvacrol Induces Reactive Oxygen Species (ROS)-mediated Apoptosis Along with Cell Cycle Arrest at G0/G1 in Human Prostate Cancer Cells. *Nutr Cancer*. octubre de 2017;69(7):1075-87.
60. Papież MA, Krzyściak W. Biological Therapies in the Treatment of Cancer-Update and New Directions. *Int J Mol Sci*. 28 de octubre de 2021;22(21):11694.
61. Barrios CH, Reinert T, Werutsky G. Global Breast Cancer Research: Moving Forward. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 23 de mayo de 2018;38:441-50.
62. Yeo SK, Guan JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer*. noviembre de 2017;3(11):753-60.
63. Zujewski JA, Dvaladze AL, Ilbawi A, Anderson BO, Luciani S, Stevens L, et al. Knowledge Summaries for Comprehensive Breast Cancer Control. *J Glob Oncol*. septiembre de 2018;4:1-7.
64. Arthur RS, Wang T, Xue X, Kamensky V, Rohan TE. Genetic Factors, Adherence to Healthy Lifestyle Behavior, and Risk of Invasive Breast Cancer Among Women in the UK Biobank. *J Natl Cancer Inst*. 10 de enero de 2020;112(9):893-901.
65. Li L, He L, Wu Y, Zhang Y. Carvacrol affects breast cancer cells through TRPM7 mediated cell cycle regulation. *Life Sci*. 1 de febrero de 2021;266:118894.
66. Mari A, Mani G, Nagabhishek SN, Balaraman G, Subramanian N, Mirza FB, et al. Carvacrol Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis through PI3K/AKT Signaling Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Chin J Integr Med*. septiembre de 2021;27(9):680-7.
67. Herrera-Calderon O, Yepes-Pérez AF, Quintero-Saumeth J, Rojas-Armas JP, Palomino-Pacheco M, Ortiz-Sánchez JM, et al. Carvacrol: An In Silico Approach of a Candidate Drug on HER2, PI3K α , mTOR, hER- α , PR, and EGFR Receptors in the Breast Cancer. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2020;2020:8830665.
68. Graham K, Unger E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:6049-58.
69. Sampaio LA, Pina LTS, Serafini MR, Tavares DDS, Guimarães AG. Antitumor Effects of Carvacrol and Thymol: A Systematic Review. *Front Pharmacol*. 2021;12:702487.
70. Ospina LMP, Muñoz PB, Matulevich J, Teherán AA, Villamizar LB. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Three Plant Species from the

Sabana of Bogota (Colombia): *Myrcianthes leucoxylla*, *Vallea stipularis* and *Phyllanthus salviifolius*. *Nat Prod Commun.* diciembre de 2016;11(12):1913-8.

71. Galán JV, Cid-Lucero A, Fernández RG. Efecto promotor del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp. en condiciones in vitro de extractos acuosos y etanólico de dos especies de *Cylindropuntia*. *TECNOCENCIA Chihuahua.* 2020;14(3):126-41.
72. Deleanu M, Popa E, Popa M. Chemical Composition and Active Properties Evaluation of Wild Oregano (*Origanum Vulgare*) and Ginger (*Zingiber Officinale-Roscoe*) Essential Oils. *Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition-*. 1 de agosto de 2018;69:1927-33.
73. Zhao Y, Yang YH, Ye M, Wang KB, Fan LM, Su FW. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Origanum vulgare* against *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry.* 15 de diciembre de 2021;365:130506.
74. Hou H, Zhang X, Zhao T, Zhou L. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PeerJ.* 14 de agosto de 2020;8:e9626.
75. Grbović F, Stanković MS, Ćurčić M, Đorđević N, Šeklić D, Topuzović M, et al. In Vitro Cytotoxic Activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Plants (Basel).* 25 de junio de 2013;2(3):371-8.
76. Makrane H, El Messaoudi M, Melhaoui A, El Mzibri M, Benbacer L, Aziz M. Cytotoxicity of the Aqueous Extract and Organic Fractions from *Origanum majorana* on Human Breast Cell Line MDA-MB-231 and Human Colon Cell Line HT-29. *Adv Pharmacol Sci.* 23 de agosto de 2018;2018:3297193.
77. Izham MNM, Hussin Y, Rahim NFC, Aziz MNM, Yeap SK, Rahman HS, et al. Physicochemical characterization, cytotoxic effect and toxicity evaluation of nanostructured lipid carrier loaded with eucalyptol. *BMC Complementary Medicine and Therapies.* 7 de octubre de 2021;21(1):254.
78. Luo Y, Wu JY, Lu MH, Shi Z, Na N, Di JM. Carvacrol Alleviates Prostate Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion through Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1469693.
79. Delgado C, Mendez-Callejas G, Celis C. Caryophyllene Oxide, the Active Compound Isolated from Leaves of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) with Antiproliferative and Apoptotic Effects on PC-3 Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Line. *Molecules.* 12 de octubre de 2021;26(20):6142.

13. ANEXOS

Anexo A. IC₅₀ de AE y FS de *O. vulgare* sobre línea celular tumoral MDA-MB-231.

| EXTRACTOS / IC50 | ACEITE ESCENCIAL | FLUIDO SUPERCRITICO |
|---|-------------------|---------------------|
| log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope | | |
| Best-fit values | | |
| LogIC50 | 1,928 | 2,663 |
| HillSlope | -1,459 | -0,8139 |
| IC50 | 84,81 | 460 |
| 95% CI (profile likelihood) | | |
| LogIC50 | 1,831 to 2,029 | 2,425 to 3,236 |
| HillSlope | -2,267 to -0,9701 | -1,356 to -0,4547 |
| IC50 | 67,74 to 106,8 | 266,2 to 1723 |
| Goodness of Fit | | |
| Degrees of Freedom | 13 | 13 |
| R squared | 0,8644 | 0,7014 |
| Sum of Squares | 1398 | 579,9 |
| Sy.x | 10,37 | 6,679 |
| Number of points | | |
| # of X values | 15 | 15 |
| # Y values analyzed | 15 | 15 |

Anexo B. Análisis estadístico de AE y FS de *O. vulgare* sobre línea celular tumoral MDA-MB-231

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff | 95,00% CI of diff | Below threshold ? | Summary | P Value |
|--|-----------|-------------------|-------------------|---------|---------|
| 200 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 66,31 | 58,63 to 73,98 | Yes | *** | 0,0004 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 23,08 | 4,193 to 41,96 | Yes | * | 0,0313 |
| 100 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 57,2 | 35,46 to 78,93 | Yes | ** | 0,004 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 16,44 | 3,787 to 29,10 | Yes | * | 0,0225 |
| 50 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 6,774 | -1,840 to 15,39 | No | ns | 0,0976 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | -6,035 | -14,38 to 2,311 | No | ns | 0,1214 |
| 25 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 12,66 | 3,133 to 22,18 | Yes | * | 0,0234 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 11,64 | 1,781 to 21,50 | Yes | * | 0,0333 |
| 12,5 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 16,88 | -0,4152 to 34,17 | No | ns | 0,0533 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 4,36 | -9,676 to 18,40 | No | ns | 0,5084 |

Anexo C. IC₅₀ de EP, DM, AE y FS de *O. vulgare* sobre línea celular tumoral PC3.

| EXTRACTOS / IC50 | ÉTER DE PETRÓLEO | DICLOROMET ANO | EtOH | ACEITE ESCENCIAL | FLUIDO SUPERCRITICO |
|---|------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope | | | | | |
| Best-fit values | | | | | |
| LogIC50 | 2,034 | 1,474 | 2,018 | 1,405 | 1,36 |
| HillSlope | -2,588 | -1,768 | -2,058 | -0,4327 | -0,3806 |
| IC50 | 108,1 | 29,8 | 104,3 | 25,41 | 22,9 |
| 95% CI (profile likelihood) | | | | | |
| LogIC50 | 1,974 to 2,089 | 1,443 to 1,505 | 1,997 to 2,040 | 1,207 to 1,546 | 0,5284 to 1,654 |
| HillSlope | -4,042 to -1,796 | -2,012 to -1,558 | -2,271 to -1,869 | -0,5760 to -0,2957 | -0,6549 to -0,1249 |
| IC50 | 94,30 to 122,8 | 27,76 to 31,98 | 99,27 to 109,7 | 16,12 to 35,15 | 3,376 to 45,08 |
| Goodness of Fit | | | | | |
| Degrees of Freedom | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| R squared | 0,9393 | 0,9862 | 0,9927 | 0,7907 | 0,4463 |
| Sum of Squares | 863,7 | 173,7 | 99,45 | 419,8 | 1577 |
| Sy.x | 8,151 | 3,656 | 2,766 | 5,683 | 11,01 |
| Number of points | | | | | |
| # of X values | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| # Y values analyzed | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |

Anexo D. Análisis estadístico de EP, DM, AE y FS de *O. vulgare* sobre línea celular tumoral PC3.

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95,00% CI of diff | Below threshold ? | Summary | P Value |
|--|------------|-------------------|-------------------|---------|---------|
| 200 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ÉTER DE PETRÓLEO | 75,81 | 68,77 to 82,85 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. DICLOROMETANO | 77,7 | 70,66 to 84,73 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. EtOH | 66,98 | 59,94 to 74,02 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 64,17 | 57,14 to 71,21 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 69,07 | 62,03 to 76,10 | Yes | **** | <0,0001 |
| 100 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ÉTER DE PETRÓLEO | 35,72 | 28,68 to 42,76 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. DICLOROMETANO | 86,22 | 79,18 to 93,25 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. EtOH | 42,61 | 35,57 to 49,65 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 56,12 | 49,08 to 63,16 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 51,56 | 44,52 to 58,60 | Yes | **** | <0,0001 |
| 50 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ÉTER DE PETRÓLEO | 1,896 | -5,142 to 8,934 | No | ns | 0,9334 |
| CONTROL NEGATIVO vs. DICLOROMETANO | 60,04 | 53,00 to 67,07 | Yes | **** | <0,0001 |

| | | | | | |
|--|-------|------------------|-----|------|---------|
| CONTROL NEGATIVO vs. EtOH | 6,686 | -0,3517 to 13,72 | No | ns | 0,068 |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 38,26 | 31,22 to 45,30 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 30,47 | 23,43 to 37,51 | Yes | **** | <0,0001 |
| 25 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ÉTER DE PETRÓLEO | 9,012 | 1,974 to 16,05 | Yes | ** | 0,0071 |
| CONTROL NEGATIVO vs. DICLOROMETANO | 38,25 | 31,21 to 45,28 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. EtOH | 1,426 | -5,612 to 8,464 | No | ns | 0,9789 |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 49,03 | 41,99 to 56,07 | Yes | **** | <0,0001 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 54,25 | 47,21 to 61,29 | Yes | **** | <0,0001 |

Anexo E. IC₅₀ de AE y FS de *O. vulgare* sobre línea celular tumoral MCF-7.

| EXTRACTOS / IC50 | ACEITE ESCENCIAL | FLUIDO SUPERCRITICO |
|--|-------------------|---------------------|
| log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope | | |
| Best-fit values | | |
| LogIC50 | 2,027 | 3,061 |
| HillSlope | -0,8509 | -0,3257 |
| IC50 | 106,5 | >200 |
| 95% CI (profile likelihood) | | |
| LogIC50 | 1,917 to 2,167 | 2,548 to 5,173 |
| HillSlope | -1,155 to -0,6003 | -0,5453 to -0,1246 |
| IC50 | 82,56 to 146,7 | 353,2 to 149074 |
| Goodness of Fit | | |

| | | |
|---------------------|-------|--------|
| Degrees of Freedom | 13 | 13 |
| R squared | 0,843 | 0,4902 |
| Sum of Squares | 832 | 544,6 |
| Sy.x | 8 | 6,472 |
| RMSE | 7,709 | 6,237 |
| Number of points | | |
| # of X values | 15 | 15 |
| # Y values analyzed | 15 | 15 |

Anexo F. Análisis estadístico de AE y FS de *O. vulgare* sobre línea celular tumoral MCF-7.

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff | 95,00% CI of diff | Below threshold ? | Summary | P Value |
|--|-----------|-------------------|-------------------|---------|---------|
| 200 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 57,72 | 45,06 to 70,38 | Yes | *** | 0,0006 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 28,43 | 19,10 to 37,77 | Yes | ** | 0,0013 |
| 100 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 38,08 | 22,10 to 54,07 | Yes | ** | 0,0038 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 22,71 | 12,96 to 32,47 | Yes | ** | 0,0054 |
| 50 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 15,17 | -5,226 to 35,56 | No | ns | 0,0953 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 8,207 | -0,2911 to 16,71 | No | ns | 0,0554 |
| 25 | | | | | |

| | | | | | |
|---|-------|-----------------|-----|----|--------|
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 22,55 | 12,35 to 32,75 | Yes | ** | 0,0075 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 18,18 | -1,451 to 37,81 | No | ns | 0,0605 |
| 12,5 | | | | | |
| CONTROL NEGATIVO vs. ACEITE ESCENCIAL | 15,92 | 6,085 to 25,75 | Yes | * | 0,0148 |
| CONTROL NEGATIVO vs. FLUIDO SUPERCRITICO | 20,61 | 9,664 to 31,55 | Yes | ** | 0,0059 |