

Evaluación de la actividad inmunomoduladora de biomoléculas de origen vegetal

Renato Pérez Rosés



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

Evaluación de la actividad inmunomoduladora de biomoléculas de origen vegetal



Renato Pérez Rosés
Tesis doctoral
2015



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia
Departament de Farmacologia i Química Terapèutica
Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia

Programa de doctorat: Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

Evaluación de la actividad inmunomoduladora de biomoléculas de origen vegetal

Memoria presentada por **Renato Pérez Rosés** para optar al título de doctor
por la Universidad de Barcelona

Doctorando:

Renato Pérez Rosés

Directores:

Dr. Salvador Cañigueral Folcarà

Dra. Ester Risco Rodríguez

Barcelona, mayo 2015

The history of science, like the history of all human ideas, is a history of irresponsible dreams, of obstinacy, and of error. But science is one of the very few human activities—perhaps the only one—in which errors are systematically criticized and fairly often, in time, corrected. This is why we can say that, in science, we often learn from our mistakes, and why we can speak clearly and sensibly about making progress there.

Karl Raimund Popper. *Conjectures and Refutations: The Growth of Scientific Knowledge*. Routledge, (1963).

The method of science depends on our attempts to describe the world with simple theories: theories that are complex may become untestable, even if they happen to be true. Science may be described as the art of systematic over-simplification—the art of discerning what we may with advantage omit.

Karl Raimund Popper. *The Open Universe: an Argument for Indeterminism*. Routledge; (1988).

Contribuciones científicas derivadas de esta tesis

Publicaciones de artículos en revistas:

- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Antioxidant activity of Tween-20 and Tween-80 evaluated through different *in vitro* tests. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2015; 67(5): 666-672. <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12369>
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Effect of some essential oils on phagocytosis and complement system activity. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63(5): 1496-1504. <http://dx.doi.org/10.1021/jf504761m>
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Antioxidant activity of some essential oils evaluated by different *in vitro* tests. (En proceso de redacción).

Publicaciones de resúmenes de congresos:

- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Effect of essential oils on the activity of human neutrophil myeloperoxidase *in vitro*. In *Planta Medica* 2012; 78(11): 1127.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Efecto de aceites esenciales sobre la fagocitosis en neutrófilos humanos. *Revista de Fitoterapia* 2012; 12(Supl 1): 187.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Inhibitory activity of nine essential oils on nitric oxide production by human leukocytes. *Planta Medica* 2009; 75(9): P17.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Influencia de seis aceites esenciales sobre la producción de óxido nítrico en leucocitos humanos. *Revista de Fitoterapia* 2019; 9(Supl 1): 125.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Antioxidant and complement modulating activities of five essential oils. *Planta Medica* 2007; 73(9): P489

Contribuciones a congresos:

- Vila R, Pérez-Rosés R, Risco E, Peñalver P, Cañigüeral S. Aceites esenciales antioxidantes. Jornada SEFIT - Antioxidantes naturales: mitos y realidades. Barcelona, 13 de Junio de 2014. Conferencia.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Effect of essential oils on the activity of human neutrophil myeloperoxidase *in vitro*. International congress on natural products research, New York City, July 28-August 1, 2012. Póster.

- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Efecto de aceites esenciales sobre la fagocitosis en neutrófilos humanos. III Congreso Iberoamericano de Fitoterapia, Foz do Iguazu (Brasil), 2-5 de Mayo de 2012. Póster.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Influencia de ocho aceites esenciales sobre la producción de óxido nítrico en leucocitos humanos. 2º Congreso Iberoamericano de Fitoterapia, Lisboa (Portugal), 8 al 10 de Octubre del 2009. Póster.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Inhibitory activity of nine essential oils on nitric oxide production by human leukocytes. 57th International Congress of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Geneva (Switzerland), 16th-20th August 2009. Póster.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Antioxidant activity of eleven essential oils by two different in vitro assays. 39th International Symposium on Essential Oils (Quedlingburg, Germany, 2008). Póster.
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigüeral S. Antioxidant and complement modulating activities of five essential oils. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (Graz, Austria, 2007). Póster.

Dedicatoria

A mis padres

Agradecimientos

Este trabajo debe su arquitectura y progreso satisfactorio al esfuerzo y la dedicación permanente con que se han entregado durante muchos años el Dr. Salvador Cañigüeral y la Dra. Ester Risco, mis directores. Incluyo asimismo a la Dra. Roser Vila entre mis preceptores, pues aunque nominalmente no aparezca citada entre los directores actuó como tal en todo momento. Durante cuatro años fui beneficiado con una beca de la Generalitat de Catalunya y el Fondo Social Europeo. La investigación contó además con el sostén financiero de la empresa Lidervet SL y el apoyo personal de Pedro Peñalver. Si ha llegado a buen término esta investigación se debe sin duda al trabajo de este colectivo al que me integré como becario.

Agradezco a mis compañeros del grupo de farmacognosia, Blanca Freixa, Abdel Hadi Al Jafari, Jaume Sanz, Simona Sciotto, Carol Vallverdú y Enric Gibert la amistad y el aprecio con que me han dispensado durante todos estos años. No me puedo quejar, creo que hubiera sido difícil encontrar mejores compañeros y amigos. Otros profesores, técnicos y compañeros de desvelos y sueños en el departamento me han brindado de igual manera su ayuda y amistad, a todos, gracias. No los quiero nombrar individualmente para no correr el peligro de ser injusto y olvidar alguno, pues muchos hace ya tiempo que abandonaron el departamento. Sin embargo, hago especial referencia a Mar Morales pues sin los cafés compartidos en su escritorio todo habría sido más aburrido, sin su eficiente auxilio, todo habría sido ciertamente más difícil.

Mi primera y mayor gratitud va dirigida a mi esposa, Chelo Jiménez. Su apoyo emocional sensible y su respaldo material indispensable son la causa más directa e inobjetable de que haya sido posible esta larguísima travesía que tiene mucho de utopía melancólica.

Como es natural para mis padres he sido un desvelo permanente, pero sería injusto reducir su papel a esta tesis pues a ellos les debo mi vida y mi educación. Mi hermano Hebert, su esposa Arelis, mi sobrina Karla y mi primo Miguel me han dado aliento en muchas ocasiones, gracias por vuestro permanente cariño. Pienso igualmente en todas mis tías y primos, algunos muy cercanos a mí me mantuvieron siempre presente mientras estuvieron vivos. A todos sin duda, les debo mucho y los recuerdo en este momento. Mis amigos de Cuba también han estado al tanto de mis desvelos, de ellos quiero mencionar a Julio César Escalona y Teresita Fernández pues han cooperado de variadas formas a que este proyecto saliera adelante.

A todos los que me habéis apoyado os expreso mi profunda gratitud.

Índice

Capítulo 1. Introducción y objetivos	1
Capítulo 2. Caracterización físico-química de las muestras	5
2.1. Introducción.....	5
2.2. Descripción de las muestras	6
2.3. Materiales y métodos	7
2.3.1. Análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas	7
2.3.2. Determinación de la densidad relativa	8
2.3.3. Determinación de la rotación óptica.....	8
2.3.4. Determinación del índice de refracción.....	8
2.4. Resultados	8
Capítulo 3. Actividad captadora de radicales libres y sobre la producción de ROS.....	15
3.1. Introducción.....	15
3.1.1. Generalidades.....	15
3.1.2. Actividad antioxidante de los aceites esenciales	17
3.2. Materiales y métodos	23
3.2.1. Ensayo de la actividad antioxidante por el método del DPPH.....	23
3.2.1.1. Fundamento del ensayo	23
3.2.1.2. Preparación de las muestras de aceites esenciales.....	23
3.2.1.3. Material	23
3.2.1.4. Solución de DPPH	24
3.2.1.5. Solución de quercetina (control positivo)	24
3.2.1.6. Método operatorio del ensayo de DPPH	24
3.2.1.7. Procesamiento de los resultados y estadística.....	25
3.2.2. Ensayo de la actividad sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos humanos	25
3.2.2.1. Fundamento del ensayo	25
3.2.2.2. Preparación de las muestras de aceites esenciales.....	27
3.2.2.3. Material	27
3.2.2.4. Solución de 2',7'-diclorofluorescina-diacetato (DCFH-DA)	28
3.2.2.5. Solución de azida sódica (NaN ₃)	28
3.2.2.6. Solución de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)	28
3.2.2.7. Solución de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	28
3.2.2.8. Solución de yoduro de propidio (IP).....	28
3.2.2.9. Solución de quercetina	29
3.2.2.10. Solución de paraformaldehído	29
3.2.2.11. Solución de hemólisis	29
3.2.2.12. Selección del tampón	29
3.2.2.13. Obtención de la suspensión de leucocitos humanos.....	29
3.2.2.14. Método operatorio en el ensayo de determinación de ROS por medio de la citometría de flujo	30
3.2.2.15. Parámetros analizados mediante el citómetro de flujo	31
3.2.2.16. Células estudiadas	32

3.2.2.17 Análisis de los datos.....	33
3.2.2.18. Procesamiento de los resultados y estadística	33
3.3. Resultados.....	33
3.4. Discusión	43
3.4.1. Actividad frente al radical DPPH.....	43
3.4.2. Actividad sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA	45
3.4.3. Actividad sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con H ₂ O ₂	49
Capítulo 4. Actividad sobre la enzima mieloperoxidasa	51
4.1. Introducción	51
4.1.1. Generalidades	51
4.1.2. Actividad de los aceites esenciales sobre la mieloperoxidasa	54
4.2. Materiales y métodos.....	58
4.2.1. Fundamento del ensayo	58
4.2.2. Material	59
4.2.3. Solución de hemólisis	59
4.2.4. Selección del tampón	60
4.2.5. Obtención de la suspensión de leucocitos humanos.....	60
4.2.6. Preparación de las muestras de aceites esenciales.....	60
4.2.7. Método operatorio en el ensayo de la MPO en presencia de células	60
4.2.8. Método operatorio en el ensayo de actividad de la MPO aislada.....	61
4.2.9. Análisis de los datos	62
4.2.10. Expresión de los resultados y procesamiento estadístico	62
4.3. Resultados.....	62
4.4. Discusión	67
Capítulo 5. Actividad sobre la producción de óxido nítrico	71
5.1. Introducción	71
5.1.1. Generalidades	71
5.1.2. Actividad de los aceites esenciales sobre la producción de NO	75
5.2. Materiales y métodos.....	81
5.2.1. Fundamento.....	81
5.2.2. Preparación de las muestras de aceites esenciales.....	81
5.2.3. Material	81
5.2.4. Solución de hemólisis	82
5.2.5. Selección del tampón	82
5.2.6. Obtención de la suspensión de leucocitos humanos.....	82
5.2.7. Método operatorio.....	83
5.2.8. Análisis de los datos	83
5.2.9. Procesamiento de los resultados y estadística.....	83
5.3. Resultados.....	83
5.4. Discusión	87
Capítulo 6. Actividad sobre el sistema del complemento	93
6.1. Introducción	93

6.1.1. Generalidades.....	93
6.1.2. Sistema del complemento.....	94
6.1.3. Vías de activación del sistema del complemento	94
6.1.4. Regulación del sistema del complemento.....	95
6.1.5. Mecanismos efectores del sistema del complemento.....	96
6.1.6. Actividad de los aceites esenciales sobre el sistema del complemento	97
6.2. Materiales y métodos.....	98
6.2.1. Fundamento.....	98
6.2.2. Material	98
6.2.3. Solución de VSB.....	99
6.2.4. Solución de Ca/Mg.....	99
6.2.5. Solución de EGTA.....	99
6.2.6. Solución de VSB ⁺⁺	99
6.2.7. Solución de EGTA-VB.....	99
6.2.8. Solución salina.....	99
6.2.9. Preparación de las muestras de aceites esenciales	99
6.2.10. Obtención de los eritrocitos de cordero	100
6.2.11. Obtención de los eritrocitos de conejo	100
6.2.12. Método operatorio.....	100
6.2.13. Cálculos, expresión de los resultados y análisis estadístico.....	101
6.3. Resultados	104
6.4. Discusión	110
Capítulo 7. Actividad sobre la fagocitosis	115
7.1. Introducción.....	115
7.1.1. Generalidades.....	115
7.1.2. Influencia de los aceites esenciales sobre la fagocitosis	116
7.2. Materiales y métodos.....	121
7.2.1. Fundamento.....	121
7.2.2. Material	121
7.2.3. Solución stop de la fagocitosis.....	122
7.2.4. Solución de apagamiento (quenching).....	122
7.2.5. Solución de yoduro de propidio (IP).....	122
7.2.6. Preparación de las muestras de aceites esenciales	123
7.2.7. Solución de hemólisis	123
7.2.8. Obtención de la suspensión de leucocitos humanos	123
7.2.9. Partículas para la fagocitosis	124
7.2.10. Opsonización de las microesferas	125
7.2.11. Control de la adherencia inespecífica.....	126
7.2.12. Método operatorio.....	126
7.2.13. Células estudiadas.....	127
7.2.14. Parámetros analizados	127
7.2.15. Cálculos, expresión de los resultados y análisis estadístico.....	128
7.3. Resultados	129
7.4. Discusión	133

Capítulo 8. Actividad antioxidante de los Tween	139
8.1. Introducción	139
8.2. Materiales y métodos.....	141
8.2.1. Ensayo de la actividad antioxidante por el método del DPPH.....	141
8.2.2. Ensayo de la actividad sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos humanos.....	141
8.2.3. Ensayo de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en ausencia de células	141
8.3. Resultados.....	141
8.4. Discusión	142
Capítulo 9. Discusión general y conclusiones	147
9.1. Discusión general	147
9.2. Conclusiones	151
Capítulo 10. Referencias bibliográficas	153

Listado de abreviaturas empleadas en el texto

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AE: Aceite esencial
ARN: Ácido ribonucleico
BHA: Butil-hidroxi-anisol
BHT: Butil-hidroxi-tolueno
Cl⁻: Anión cloruro
CN⁻: Anión cianuro
COX-2: Ciclooxygenasa-2
DAF: Factor de aceleración de la inactivación
DCF: 2',7'-Diclorofluoresceína
DCFH: 2',7'-Diclorofluorescina
DCFH-DA: 2',7'-Diclorofluorescina-diacetato
DE: Desviación estándar
DMSO: Dimetil-sulfóxido
DPPH: Radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
E-484: Estearil citrato
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
fMLP: N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina
FSC: Forward scatter
GC-FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas
HBSS: Solución salina de Hanks modificada
HO[•]: Radical hidroxilo
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HOCl: Ácido hipocloroso
IFN-γ: Interferón-γ
IL-1α: Interleucina-1α
IL-1β: Interleucina-1β
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
IP: Ioduro de propidio
LPS: Lipopolisacáridos de la membrana bacteriana
MAC: Complejo de ataque a la membrana
MASPs: Serín-proteasas asociadas a MBL
MBL: Proteína de unión a lectinas
MPO: Mieloperoxidasa
N₃⁻: Anión azida
NF-κB: Factor nuclear κB
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal
NO: Óxido nítrico
NO₂⁻: Ión nitrito
NO₂[•]: Radical dióxido de nitrógeno
NOS: Óxido nítrico sintasa
¹O₂: Oxígeno de singlete

O₃: Ozono
·O₂⁻: Anión superóxido
OCl⁻: Ión hipoclorito
ONOO⁻: Anión peroxinitrito
PAMPs: Pathogen associated molecular patterns
PGE2: Prostaglandinas E2
PMA: 13-Acetato-12-miristato de forbol
PRRs: Germ-line encoded pattern recognition receptors
RNS: Especies reactivas del nitrógeno
ROO[·]: Radicales peroxilos
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SSC: Side scatter
STAT-1α: Traductor de señales y activador de la transcripción 1α
TGF-β1: Factor de crecimiento transformador β1
TNF-α: Factor de necrosis tumoral-α

1

Introducción y objetivos

El empleo de antibióticos como promotores del crecimiento en los piensos empleados en la alimentación animal ha sido muy extenso durante varias décadas. Su utilización disminuye la aparición de enfermedades, mejora los ritmos de engorde y aumenta la productividad en las granjas. Sin embargo, existe en el conjunto de la sociedad una conciencia cada vez mayor de los problemas asociados a la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos y el consumo de productos animales contaminados con residuos metabólicos de estas sustancias. En consecuencia, la Unión Europea prohibió el empleo de cualquier antibiótico como agente de engorde en la alimentación animal a partir del primero de enero del año 2006. Esta decisión potenció la búsqueda y el empleo de sustancias de origen natural con efectos positivos similares en el desarrollo y crecimiento de los animales. Los aceites esenciales y otros extractos de plantas son algunos de los productos que han llamado la atención como promotores de la salud y el crecimiento animal (Hashemi & Davoodi, 2011). En varios ensayos *in vivo* se ha podido establecer que el empleo de aceites esenciales como promotores del crecimiento tiene un efecto positivo en el estatus inmunológico de los animales sometidos a estas dietas, conduciendo a una mejor salud y mayores tasas de crecimiento (Kettuen *et al.*, 2006; Schulze *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012).

Las consecuencias de la complementación dietética con aceites esenciales son diversas. Los aceites esenciales son mezclas más o menos complejas de compuestos orgánicos volátiles, a los que se debe su actividad biológica o terapéutica. Esa complejidad justifica la diversidad de efectos y mecanismos implicados en la promoción del crecimiento y la salud animal. Algunos aceites esenciales contribuyen al crecimiento y engorde de los animales al aumentar la producción de secreciones digestivas, así como por sus propiedades antioxidantes

o sus efectos antiinflamatorios. Otra actividad ampliamente conocida es la antibacteriana sobre bacterias patogénicas en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la actividad antibacteriana no siempre es suficiente para explicar los efectos de los aceites esenciales incorporados en la dieta animal. Algunos autores sugieren la posible modulación del sistema inmune del animal como mecanismo implicado. Sin embargo, la actividad inmunomoduladora de los aceites esenciales o sus componentes ha sido poco estudiada y necesita ser abordada en mayor profundidad (Brenes & Roura, 2010; Hashemi & Davoodi, 2011; Krishan & Narang, 2014).

La inmunidad se define como la resistencia a las enfermedades infecciosas. Incluye todos los mecanismos y respuestas empleadas por el organismo para defenderse contra el ataque de bacterias, virus o parásitos. El conjunto de células, tejidos y moléculas que participan en la resistencia contra las infecciones constituyen el sistema inmune. En los vertebrados superiores el sistema inmune agrupa una serie de mecanismos que protegen al individuo de las infecciones mediante la identificación y eliminación de los agentes patógenos. Es un sistema complejo que distingue a los patógenos de las propias células del organismo. Involucra una respuesta múltiple que incluye de forma simultánea mecanismos de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es fundamental en el despliegue de la protección inicial contra las infecciones, mientras que la inmunidad adaptativa se desarrolla más lentamente pero implementa una defensa más efectiva, eficiente y específica a largo plazo (Trichet, 2010).

Una alimentación equilibrada es fundamental para el desarrollo eficiente de las defensas inmunes. Las investigaciones realizadas en nutrición han identificado diversos factores dietéticos que afectan la respuesta inmune humana y animal. Entre estos factores se encuentra el aporte adecuado de aminoácidos, ácidos grasos, minerales y vitaminas. También el balance oxidativo y los compuestos antioxidantes están ligados de forma inextricable al normal funcionamiento del sistema inmune. Los antioxidantes protegen los lípidos de la peroxidación y son fundamentales para el mantenimiento de la fluidez de la membrana y la respuesta inmune ligada a los receptores de membrana. La inmunidad mejora cuando ciertos antioxidantes son incluidos en la dieta y en algunos casos pueden llegar a modificar la producción de citocinas inflamatorias después de una estimulación con lipopolisacáridos (Amar *et al.*, 2004). Por tanto, una intervención nutricional puede favorecer el equilibrio del sistema inmune. Algunos extractos vegetales son capaces de modular la respuesta inmune y su incorporación a la dieta puede aportar un beneficio adicional (Trichet, 2010). La inmunomodulación a través de sustancias naturales se puede considerar una alternativa para la prevención y cura de enfermedades, en muchos casos con un alto margen de seguridad. Por ello, actualmente existe un notable interés en la investigación de sustancias naturales con capacidad para mejorar la inmunidad (Liu *et al.*, 2012).

La estimación del efecto inmunomodulador de un producto natural es compleja, ya que resulta conveniente estudiar diversos aspectos y funciones del sistema inmune. Dado que los productos naturales generalmente actúan sobre la inmunidad innata, es conveniente estudiar primero la actividad sobre la misma. La combinación de diversos estudios *in vitro* es la opción más adecuada para conocer y comparar la respuesta de un conjunto de productos como se pretende en el presente trabajo. En particular, los estudios sobre la fagocitosis, la actividad del sistema del complemento, y la acción antioxidante y sobre la producción de especies reactivas de oxígeno permiten adquirir un conocimiento relevante del perfil de actividad de una sustancia sobre la inmunidad inespecífica.

Con base a los antecedentes expuestos, se ha elaborado la siguiente **hipótesis** de trabajo: *los aceites esenciales pueden ejercer sus efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la salud de los vertebrados superiores, al menos en parte, a través de una actividad inmunomoduladora.*

La voluntad de explorar esta hipótesis de trabajo nos llevó a proponer el siguiente **objetivo general**:

Evaluar la actividad inmunomoduladora in vitro de quince aceites esenciales, tres fracciones terpénicas y cuatro compuestos puros, todos bien caracterizados desde un punto de vista físico-químico.

El desarrollo de este objetivo general se realizó a través de los siguientes **objetivos específicos**:

1) *Caracterizar desde un punto de vista físico-químico los aceites esenciales, fracciones terpénicas y compuestos puros estudiados a través de diferentes pruebas.*

Para alcanzar este objetivo, las muestras se han analizado por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), así como la determinación de diversas constantes físicas (densidad relativa, índice de refracción y poder rotatorio).

2) *Estudiar su actividad antioxidante in vitro, tanto en modelos biológicos como no biológicos.*

Para ello, se valoraron las siguientes actividades:

- Actividad captadora de radicales libres empleando el radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).
- Actividad sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos humanos estimulados con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) o con H₂O₂, mediante citometría de flujo.
- Inhibición de la actividad mieloperoxidasa (MPO) tanto en preparados libres de células como en leucocitos humanos estimulados con lipopolisacáridos bacterianos.
- Actividad sobre la producción de óxido nítrico (NO) por leucocitos humanos estimulados con lipopolisacáridos bacterianos.

3) *Evaluar sus posibles efectos in vitro sobre la fagocitosis y el sistema del complemento.*

Este objetivo se desarrolló mediante:

- La valoración de la actividad sobre el sistema del complemento, tanto sobre la vía clásica como la vía alternativa.
- La evaluación de la actividad sobre la fagocitosis en neutrófilos humanos, mediante citometría de flujo.

Cabe señalar que la alta liposolubilidad de los aceites esenciales dificulta la preparación de las disoluciones para la realización de ensayos de actividad, generalmente en medio acuoso. En la literatura, habitualmente esto se resuelve mediante la utilización de tensioactivos, como los Tweens. En la puesta a punto de los ensayos de actividad antioxidante de los aceites esenciales, observamos que la

utilización de Tweens provocaba falsos positivos. Por ello, se realizó un estudio para conocer la actividad del Tween 20 y el Tween 80 sobre el DPPH, la MPO y la producción de ROS en neutrófilos humanos, que se incluye también en la presente tesis.

La tesis está organizada en 10 capítulos. El presente capítulo (capítulo 1) recoge la introducción y los objetivos de la tesis. En el capítulo 2 se resumen los aspectos relacionados con la caracterización físico-química de las muestras. Los capítulos 3, 4 y 5 reúnen información referida a los ensayos que exploran la actividad antioxidante de las muestras. Los capítulos 6 y 7 se refieren a los ensayos que evalúan el efecto de los aceites esenciales, sus fracciones o componentes aislados sobre el sistema del complemento o la fagocitosis. En el capítulo 8 se resumen los ensayos adicionales realizados con los surfactantes Tween 20 y Tween 80. Cada uno de los capítulos del 3 al 8 cuenta con su propia introducción y un breve repaso de los antecedentes existentes en la literatura científica. Se detalla en ellos la metodología seguida en cada ensayo realizado, los resultados de dichos ensayos y se realiza un análisis de estos resultados en el contexto de lo publicado en la literatura sobre el tema. Por último, en el capítulo 9 se realiza una discusión general e integrada de los resultados obtenidos y se presentan las conclusiones del trabajo. El conjunto de toda la bibliografía citada se recoge en el capítulo 10.

2

Caracterización físico-química de las muestras

2.1 Introducción

En el estudio de la actividad biológica de cualquier producto natural es importante que el mismo esté convenientemente caracterizado desde un punto de vista físico-químico. Esta necesidad resulta todavía más relevante cuando se trata de productos complejos como son los aceites esenciales. La caracterización físico-química de las muestras ensayadas en nuestra investigación consistió en la determinación cualitativa y cuantitativa de la composición de las muestras suministradas por la empresa Lidervet S.L y en la determinación de algunos de sus parámetros físico-químicos. Para conseguir este objetivo, se emplearon diferentes técnicas.

Las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y por cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (GC-FID). Los constituyentes de las diferentes muestras fueron identificados mediante los índices de retención obtenidos en el análisis GC-FID y los espectros de masas obtenidos por GC-MS. El porcentaje relativo de cada componente en la muestra fue calculado a partir de las áreas de los correspondientes picos mediante el procedimiento de normalización. También se determinó la densidad relativa, el índice de refracción y la rotación óptica de las muestras. En su conjunto, los ensayos analíticos permitieron una buena caracterización de los aceites esenciales y fracciones terpénicas estudiadas.

2.2 Descripción de las muestras

Fueron analizadas 21 muestras, proporcionadas todas por la empresa Lidervet S.L. Las muestras fueron adquiridas comercialmente por esta empresa y su listado se relaciona en la **Tabla 2.1**. A las muestras entregadas por Lidervet S.L. se incorporó el eugenol 99% (Sigma, referencia: E51791).

Tabla 2.1. Muestras de aceites esenciales, fracciones terpénicas y compuestos bajo estudio.

Aceite esencial o compuesto	Especie vegetal y parte utilizada de la planta
Aceite esencial del árbol del té	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betcher) Cheel hojas y ramas
Acetato de bornilo + acetato de isobornilo	---
Aceite esencial de cayeputi	<i>Melaleuca cajuputi</i> Powell hojas
Aceite esencial de cilantro	<i>Coriandrum sativum</i> L. frutos
Aceite esencial de clavo	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry botón floral
Terpenos de clavo	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry botón floral
Eugenol	---
Aceite esencial de enebro	<i>Juniperus communis</i> L. frutos
Aceite esencial de estragón	<i>Artemisia dracunculoides</i> L. hojas
Aceite esencial de jengibre	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe rizoma
Aceite esencial de laurel	<i>Laurus nobilis</i> L. hojas
Aceite esencial de limón	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f. pericarpios frescos
Terpenos de limón	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f. pericarpios frescos
Aceite esencial de niaulí	<i>Melaleuca quinquenervia</i> (Cav.) S. T. Blake ramas con hojas
Aceite esencial de nuez moscada	<i>Myristica fragrans</i> Houtt. semillas
Terpenos de nuez moscada	<i>Myristica fragrans</i> Houtt. semillas
Aceite esencial de orégano español	<i>Coridothymus capitatus</i> (L.) Rchb. f. partes aéreas floridas
Carvacrol 99%	---
Aceite esencial de palmarosa	<i>Cymbopogon martini</i> (Roxb.) Will. Watson hojas
Aceite esencial de romero	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. sumidades floridas
Aceite esencial de tomillo rojo	<i>Thymus zygis</i> L. partes aéreas floridas
Timol 99%	---

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas

Los análisis mediante cromatografía de gases fueron realizados en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 6890, equipado con un detector de ionización de llama y un inyector en modo “split”. Los datos cromatográficos fueron procesados utilizando el paquete de software AgilentChemStation™. Previo a la realización de los análisis, la idoneidad del equipo de cromatografía de gases fue comprobada mediante el ensayo establecido a tal efecto en la monografía general sobre aceites esenciales de la Farmacopea Europea (EDQM, 2012).

Las condiciones de análisis fueron diferentes para cada muestra. En caso de existir, se han seguido, en lo posible los métodos de la Farmacopea Europea (EDQM, 2012). Los análisis por GC-MS fueron realizados empleando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico MSD 5973 de Agilent Technologies, mediante una conexión directa entre la columna capilar y el espectrómetro de masas. Se obtuvieron espectros de masas entre $m/z=35$ y $m/z=400$, empleando una energía de ionización de 70 eV. El análisis de datos cromatográficos y espectroscópicos se realizó mediante el paquete de software Hewlett-Packard MS ChemStation™. Las condiciones fueron las mismas que las que se emplearon en la GC-FID para cada muestra.

Tanto los análisis por GC-FID como los análisis por GC-MS se realizaron utilizando una columna capilar con fase estacionaria polar, con las siguientes características:

- Marca: Supelco
- Modelo: Supelcowax 10™
- Material: sílice fundida
- Longitud: 60 m
- Diámetro interno: 0,25 mm
- Fase estacionaria: carbowax
- Espesor de película: 0,25 μm

Las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); empleando en ambos casos la misma columna capilar. La identificación de los componentes se realizó a partir de los índices de retención obtenidos del análisis por GC-FID y sus espectros de masas obtenidos del análisis por GC-MS. Los patrones de fragmentación obtenidos a partir de los espectros de masas para cada compuesto fueron cotejados con la información residente en las librerías de espectros asociadas al software del GC-MS (Wiley 6), nuestra propia biblioteca de espectros de masas y datos consultados en la bibliografía (Mc Lafferty *et al.*, 1993; EDQM, 2012).

Para la identificación también se utilizaron los índices de retención lineales determinados frente a una serie homóloga de n-alcanos. Se empleó una mezcla de n-alcanos suministrada por la compañía SUPELCO, referencia SP40000164 (lote LB18862), constituida por alcanos lineales con un número de átomos de carbono entre 8 (octano) y 23 (tricosano). Los índices de retención lineales determinados frente a una serie homóloga de esteres metílicos de ácidos grasos fueron igualmente determinados y utilizados en la identificación. La serie homóloga de esteres metílicos de ácidos grasos fue suministrada por LUCTA, S.A. Los índices calculados para cada componente de las muestras objeto de estudio fueron comparados con los de nuestra base de datos y en algunos casos con los

proporcionados por la bibliografía. El porcentaje de cada componente en las muestras fue determinado a partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por GC-FID, empleando el procedimiento de normalización y sin utilizar factores de respuesta.

2.3.2 Determinación de la densidad relativa

Para la realización de este procedimiento se siguió la metodología de ensayo descrita en la Farmacopea Europea (EDQM, 2012). Se tomó un picnómetro perfectamente seco al que se le determinó la masa. También se determinó la masa del picnómetro lleno de agua bidestilada a 20 °C. Se rellenó el picnómetro con las sustancias a ensayar a 20 °C y se determinó la masa. La densidad relativa de los aceites esenciales o fracciones terpénicas estudiadas se definió como el cociente entre la masa del aceite esencial (masa del picnómetro lleno de aceite esencial menos la masa del picnómetro vacío) y la masa del agua bidestilada (masa del picnómetro lleno de agua bidestilada menos la masa del picnómetro vacío). El resultado que se muestra es la media de tres mediciones independientes.

2.3.3 Determinación de la rotación óptica

Las determinaciones de rotación óptica se realizaron siguiendo las recomendaciones descritas en la Farmacopea Europea (EDQM, 2012). La temperatura de ensayo fue de 25 °C y se empleó un polarímetro Atago AP-300 que tenía como fuente de luz una lámpara de halógeno. Los ensayos se realizaron a una longitud de onda de 589 nm y los resultados se presentan como la media de tres mediciones independientes.

2.3.4 Determinación del índice de refracción

El índice de refracción se determinó siguiendo las recomendaciones descritas en la Farmacopea Europea (EDQM, 2012). Se empleó un refractómetro de mano modelo Atago R5000. Los resultados se presentan como la media de tres mediciones independientes. El rango de medición del refractómetro se encontraba entre 1,333-1,520.

2.4 Resultados

En la **Tabla 2.2** se resume la composición de los aceites esenciales y fracciones terpénicas ensayadas. Los resultados del análisis de las sustancias puras estudiadas no se incluyen en la **Tabla 2.2**. Su análisis por GC-FID y GC-MS evidenció una pureza superior al 99% para eugenol, carvacrol y timol. Por lo que se refiere a la mezcla de acetato de borniloy acetato de isobornilo, resultó ser un 76,8% de acetato de bornilo, un 21,7% de acetato de isobornilo y un 1,0% de α -terpineol, para un total identificado del 99,5%.

El conjunto de **Figuras 2.1** muestra las estructuras de los compuestos mayoritarios encontrados en los aceites esenciales y las fracciones terpénicas ensayadas. Los resultados de los ensayos complementarios de control de la calidad que se les realizaron a los aceites esenciales, fracciones terpénicas y compuestos puros se resumen en la **Tabla 2.3**.

Capítulo 2. Caracterización físico-química de las muestras

Tabla 2.2. Composición de los aceites esenciales y fracciones terpénicas ensayadas

Sustancia	Aceite esencial o fracción ^a																	
	LA ^a	CA	CL	CLT	CI	JE	EN	LI	LIT	NI	NU	NUT	PA	TR	RO	OE	ES	AT
α-Pineno	5.6	1.8	-	-	5.1	2.2	54.8	1.9	3.0	10.9	14.3	50.9	-	1.2	9.9	0.8	0.8	2.5
α-Tuyeno	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.6	-	2.0	3.7	-	0.6	0.4	1.4	-	1.2
Canfeno	-	-	-	-	0.9	7.3	0.4	-	0.1	-	-	0.7	-	0.8	4.3	-	-	-
6-Metil-5-hepten-2-eno	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Pineno	4.4	1.4	-	-	0.4	1.0	29.2	12.0	16.6	2.7	11.4	17.2	-	0.4	9.7	1.9	-	0.8
Sabineno	7.5	-	-	-	-	-	0.5	2.1	2.7	-	40.8	22.1	-	-	-	-	-	0.7
δ-3-Careno	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	1.1	-	-	-	1.3	-	-	-
Mirceno	-	1.4	-	-	0.5	-	7.6	1.6	1.7	-	3.3	-	0.2	1.8	2.1	1.4	-	-
α-Felandreno	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Terpineno	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1	-	-	1.2	-	0.3	-	5.9
Limoneno	1.1	5.7	-	-	2.1	7.9	4.1	70.3	69.1	7.1	4.1	0.5	-	0.6	-	0.8	2.5	1.1
β-Felandreno	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.3	-	2.6	-	-	-	-	-	-	-
1,8-Cineol	65.6	67.8	-	-	-	-	-	-	-	58.3	-	-	-	0.6	49.7	-	-	4.5
cis-β-Ocimeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	4.8	-
γ-Terpineno	0.7	-	-	-	3.7	-	-	6.8	1.4	1.2	3.4	-	-	4.6	0.4	5.4	-	16.5
trans-β-Ocimeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	3.2	-
p-Cimeno	2.2	1.6	-	-	1.8	-	0.5	1.6	4.3	2.4	1.3	0.7	-	23.2	1.7	8.1	-	9.3
Terpinoleno	-	-	-	-	0.5	-	-	0.3	-	0.9	1.5	-	-	-	-	-	-	2.9
α-Cubebeno	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	0.2	-	-
γ-Elemeno	-	-	-	-	-	0.6	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Capítulo 2. Caracterización físico-química de las muestras

Sustancia	Aceite esencial o fracción ^a																	
	LA ^a	CA	CL	CLT	CI	JE	EN	LI	LIT	NI	NU	NUT	PA	TR	RO	OE	ES	AT
Óxido de linalol	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Copaeno	-	-	-	1.6	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcanfor	-	-	-	-	5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.6	-	-	-
Linalol	-	3.1	-	-	74.0	0.4	-	-	-	-	-	-	3.1	4.5	0.8	1.2	-	-
Hidrato decís-sabineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-
β -Elemeno	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetate de bornilo	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-
β -Cariofileno	-	1.0	14.9	83.0	-	-	0.4	0.3	-	-	-	-	2.0	1.2	3.9	0.7	-	-
Isosativeno	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de isobornilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	2.8	1.0	-	-	-	-	-	-	-	2.4	4.4	-	-	-	0.7	3.3	-	44.5
Mirtenal	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sativeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5
<i>trans</i> -Carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarveol	0.7	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Verbenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-
β -Farneseno	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aromadendreno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.6	-	-	-	1.7
<i>ar</i> -Curcumeno	-	-	-	-	-	19.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estragol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87.8	-
δ -Terpineol	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Humuleno	-	0.7	1.7	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-
Neral	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-

Capítulo 2. Caracterización físico-química de las muestras

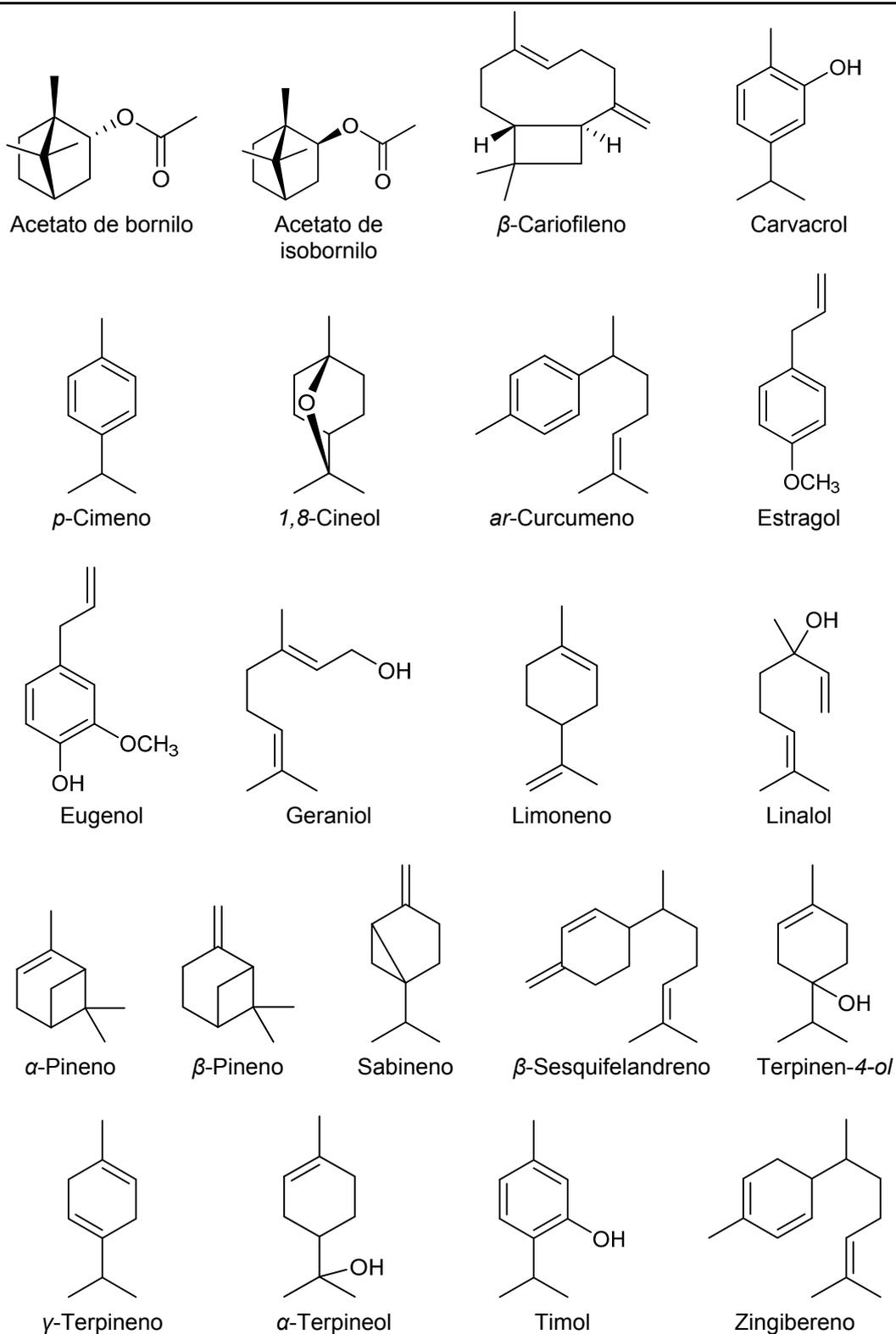
Sustancia	Aceite esencial o fracción ^a																	
	LA ^a	CA	CL	CLT	CI	JE	EN	LI	LIT	NI	NU	NUT	PA	TR	RO	OE	ES	AT
Formiato de geranilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-
Acetato de α -terpenilo	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Terpineol	6.4	11.6	-	-	0.5	0.5	-	0.3	-	6.0	-	-	-	-	1.7	-	-	3.3
Borneol	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	2.0	1.5	-	-	-
Ledeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6
Selineno	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacreno D	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranial	-	-	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-
Zingibereno	-	-	-	-	-	22.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valenceno	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Bisaboleno	-	-	-	-	-	9.2	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biclogermacreno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4
E.E- α -farneseno	-	-	-	-	-	3.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ -Cadineno	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5
Acetato de geranilo	-	-	-	-	3.2	-	-	-	-	-	-	-	8.1	-	-	-	-	-
γ -Cadineno	-	-	-	-	-	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mirtenol	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-
β -Sesquifelandreno	-	-	-	-	-	12.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cis</i> - α -Bisaboleno	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-
Nerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-
<i>cis</i> -Calemeneno	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	-	80.3	-	-	-	-	-
Safrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-

Capítulo 2. Caracterización físico-química de las muestras

Sustancia	Aceite esencial o fracción ^a																	
	LA ^a	CA	CL	CLT	CI	JE	EN	LI	LIT	NI	NU	NUT	PA	TR	RO	OE	ES	AT
Butirato de geranilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-
Valerato de geranilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-
Oxido de cariofileno	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxido de β -cariofileno	-	-	-	2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.4	-	0.7	-	-
Guaiol	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerolidol	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	2.3	-	-	0.7	-	-	-	-	-
Viridiflorol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.9	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Cedrol	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eugenol	-	-	81.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-
Elemol	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Timol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.0	-	0.4	-	0.6
Elemicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.3	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.3	-	72.7	-	-
α -Eudesmol	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Eudesmol	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Miristicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.3	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de eugenilo	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Farnesol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-
Total identificado (%)	100.0	99.3	99.9	98.4	100.0	95.4	99.7	100.0	99.9	100.0	100.0	97.8	99.5	99.6	100.0	100.0	99.1	99.5

^a Aceite esencial o fracción: LA: laurel, CA: cayeputi, CL: clavo, CLT: clavo terpenos, CI: cilantro, JE: jengibre, EN: enebro, LI: limón, LIT: limón terpenos, NI: niaulí, NU: nuez moscada, NUT: nuez moscada terpenos, PA: palmarosa, TR: tomillo rojo, RO: romero, OE: orégano español, ES: estragón, AT: árbol del té.

Estructuras de los componentes mayoritarios^a



^a Constituyentes en cantidad superior al 10% alguno de los aceites esenciales o fracciones estudiados

Figura 2.1. Estructuras químicas de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales y fracciones ensayados.

Tabla 2.3. Resultado de los ensayos de rotación óptica, índice de refracción y densidad relativa.

Aceite esencial o compuesto	Rotación óptica	Índice de refracción	Densidad relativa
Árbol del té	+8,60 °	1,477	0,898
Bornilo + isobornilo, acetatos de	-8,90 °	1,461	0,981
Cayeputi	-0,15 °	1,466	0,916
Cilantro	+10,00 °	1,461	0,864
Clavo	-1,15 °	>1,520	1,037
Clavo (terpenos)	-9,20 °	1,498	0,901
Eugenol	-1,58 °	>1,520	1,066
Enebro	-6,10 °	1,472	0,860
Estragón	+3,45 °	1,513	0,937
Jengibre	-23,60 °	1,485	0,884
Laurel	-12,40 °	1,462	0,916
Limón	+65,35 °	1,472	0,848
Limón (terpenos)	+40,75 °	1,469	0,843
Niaulí	-0,60 °	1,465	0,905
Nuez moscada	+31,05 °	1,475	0,904
Nuez moscada (terpenos)	+6,95 °	1,470	0,874
Orégano español	-2,86 °	1,506	0,935
Carvacrol	---	>1,520	0,976
Palmarosa	+0,60 °	1,472	0,881
Romero	-0,70 °	1,464	0,905
Tomillo rojo	+1,33 °	1,500	0,922
Timol	---	>1,520	0,976

3

Actividad captadora de radicales libres y sobre la producción de ROS

3.1 Introducción

3.1.1 Generalidades

Un antioxidante es definido como una sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones comparadas con aquellas de los sustratos oxidables, retrasa significativamente o impide la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes pueden actuar mediante uno o varios mecanismos como la interrupción de la formación de radicales libres, interrupción de su propagación o la promoción del sistema de defensa antioxidante en las células. La potencia antioxidante de un compuesto y su solubilidad en lípidos influyen en su accesibilidad a los radicales peróxidos, especialmente en la membrana o los sistemas miscelares y las emulsiones. En estos sistemas son necesarias características duales (hidrofílicas e hidrofóbicas) para una mayor acción (Amorati *et al.*, 2013). La efectividad antioxidante está relacionada con la energía de activación, con las constantes de reacción, el potencial de oxidación-reducción, la facilidad con la que el antioxidante se destruye o pierde (volatilidad y susceptibilidad al calor), y la solubilidad del antioxidante. Las reacciones de inhibición o la reacción de propagación de los radicales libres son ambas exotérmicas. A medida que las energías de disociación de los enlaces A:H (antioxidante) y R:H (sustrato oxidable) se incrementan, la energía de activación se incrementa también y disminuye la eficiencia antioxidante. Por el contrario, si las energías de disociación de los enlaces disminuyen, la eficiencia antioxidante se incrementa (Wanatabe *et al.*, 2010).

Los antioxidantes más efectivos son aquellos que interrumpen la reacción en cadena de formación de los radicales libres. Estos antioxidantes usualmente contienen anillos aromáticos o fenólicos y donan H^{\bullet} a los radicales libres formados durante la oxidación, convirtiéndose en radicales ellos mismos. Estos radicales intermedios son estabilizados por resonancia del electrón en el anillo aromático y la formación de estructuras quinónicas. Muchos de los fenoles carecen de posiciones propicias para un ataque del oxígeno molecular. Los antioxidantes sintéticos como el butil-hidroxi-anisol (BHA), el butil-hidroxi-tolueno (BHT) o los compuestos de origen natural, contienen funciones fenólicas que funcionan de esta manera. También los compuestos de origen vegetal con actividad antioxidante por lo general atrapan el radical oxígeno con compuestos fenólicos (Brewer, 2011). Sin embargo, existen muchos otros mecanismos que pueden llevar a un extracto natural a tener un efecto antioxidante. Por ejemplo, algunos terpenos insaturados (no fenólicos) se autooxidan de forma similar a los lípidos insaturados. Si estos terpenos poseen una estructura de ciclohexadieno como el γ -terpineno o el α -felandreno, sufren una autooxidación muy acelerada que conduce a la extinción inmediata de las cadenas de propagación de los radicales libres. Funcionan de hecho como antioxidantes y reducen el consumo de oxígeno (Amorati *et al.*, 2013).

En el sistema inmune, inflamación y estrés oxidativo están asociados. Una de las respuestas inflamatorias más abundantes es la llamada “explosión oxidativa” que aparece en monocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. La fagocitosis de las bacterias va acompañada de inflamación y en ella tiene lugar un intenso incremento en el consumo de oxígeno y formación del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este radical es convertido rápidamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), espontáneamente o por medio de la enzima superóxidodismutasa. El peróxido de hidrógeno puede ser reducido también por los iones de los metales bivalentes de transición como el Fe^{2+} . La acción de los metales bivalentes de transición sobre el peróxido de hidrógeno genera el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), uno de los agentes oxidantes más fuertes que puede a su vez reaccionar rápidamente con ácidos grasos poliinsaturados, resultando en la producción de los radicales peróxidos (ROO^{\bullet}). El peróxido de hidrógeno también puede oxidar los iones cloruro (Cl^-) a ácido hipocloroso ($HOCl$), un oxidante muy fuerte que puede reaccionar con las aminas, produciendo las cloraminas, algunas de las cuales son muy tóxicas. Estos radicales son denominados como especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés).

Durante el proceso de inflamación también ocurre la generación de otros radicales libres llamados especies reactivas del nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés). El óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) son dos ejemplos de este tipo de radicales. El óxido nítrico se produce en grandes cantidades por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en los macrófagos activados y los neutrófilos durante las reacciones inmunes y de respuesta frente a las infecciones. Las ROS y las RNS son generadas en los fagocitos con el propósito de neutralizar los organismos invasores, teniendo por lo tanto un papel importante en la defensa del organismo. Sin embargo, su sobreproducción puede ser responsable de los daños causados en los sitios de la inflamación. Estas especies reactivas tienen también otro papel muy importante en la inflamación al provocar la liberación de elementos o moléculas que son mensajeros celulares. Las ROS y las RNS actúan como moduladores de las proteín-quinasas, las lipasa-quinasas, las fosfatasa, los receptores de membranas, los canales iónicos y los factores de transcripción, incluyendo al factor nuclear- κB (NF- κB). Proteínas que en su conjunto regulan la expresión de las citoquinas fundamentales (Miguel, 2010).

3.1.2 Actividad antioxidante de los aceites esenciales

Muchos aceites esenciales presentan actividad antioxidante. Esta propiedad tiene gran interés para la industria alimentaria debido a sus posibilidades de empleo como aditivo y conservante. En relación a la salud animal o humana la capacidad de atrapar radicales libres o de inhibir su producción puede tener un papel muy importante en la prevención de ciertas enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardíacas o la propia función inmune. Un número cada vez mayor de evidencias relacionan estas enfermedades con el daño causado por los radicales libres. Si los aceites esenciales son capaces de atrapar o inhibir la producción de radicales libres, ellos también pueden actuar como agentes antiinflamatorios (Miguel, 2010).

La **Tabla 3.1** resume los estudios sobre la actividad antioxidante de los aceites esenciales determinada mediante el ensayo de captación del radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Debido a la gran cantidad de artículos publicados sobre este tema, se han incluido solamente artículos seleccionados bajo los siguientes criterios:

- Limitado a los aceites esenciales estudiados en el presente trabajo y sus principales componentes.
- Trabajos publicados entre 2002 y 2014.

Las publicaciones donde se estudia la actividad de los aceites esenciales sobre la producción de ROS mediante la citometría de flujo son recogidas en la **Tabla 3.2**. En este caso no se han limitado los años de búsqueda bibliográfica ni las especies vegetales consideradas.

A diferencia de lo que sucede con el ensayo del DPPH, los trabajos donde se examina el efecto sobre la producción de ROS de aceites esenciales o sus componentes mediante la citometría de flujo son bastante escasos. Este hecho resalta la novedad e importancia de nuestra investigación. El estudio en células vivas permite relacionar el efecto antioxidante con mecanismos biológicos que van más allá de la captación de radicales libres.

Tabla 3.1. Revisión de trabajos publicados que estudian la capacidad de captación de radicales libres “*in vitro*” mediante el ensayo de inhibición del radical libre estable del DPPH.

Aceite esencial o compuesto	Actividad sobre el DPPH	Referencia
Alcanfor	IC ₅₀ = 4780,0 µg/mL	Dawidowicz & Olszowy, 2014
<i>trans</i> -Anetol	A 20 mg/mL no se pudo calcular la IC ₅₀ .	Aazza <i>et al.</i> , 2011
<i>Artemisia dracuncululus</i>	IC ₅₀ = 3200,0 µg/mL 5000,0 µg/mL causaron un 16,0 % de inhibición. 1000,0 µg/mL causaron un 14,0 % de inhibición. 1000,0 µg/mL causaron un 10,0 % de inhibición.	Ayoughi <i>et al.</i> , 2011 Lin <i>et al.</i> , 2009 Lopes-Lutz <i>et al.</i> , 2008 Kordali <i>et al.</i> , 2005
β -Bisaboleno	5000,0 µg/mL causaron un 3,0 % de inhibición.	Lin <i>et al.</i> , 2009
Borneol	A 20 mg/mL no se pudo calcular la IC ₅₀ . 5000,0 µg/mL causaron un 2,0 % de inhibición. No fue activo entre 15425,0 µg/mL y 385625,0 µg/mL	Aazza <i>et al.</i> , 2011 Lin <i>et al.</i> , 2009 Slameňová <i>et al.</i> , 2009
3-Careno	A 20 mg/mL no se pudo calcular la IC ₅₀ .	Aazza <i>et al.</i> , 2011
δ -2-Careno	0,4 % (v/v) causaron un 13,0% de inhibición.	Emami <i>et al.</i> , 2007
β -Cariofileno	100,0 µg/mL causaron un 6,0 % de inhibición. 5000,0 µg/mL causaron un 7,0 % de inhibición.	Dar <i>et al.</i> , 2011 Lin <i>et al.</i> , 2009

Cariofileno, óxido de	IC ₅₀ = 18600,0 µg/mL	Papageorgiou <i>et al.</i> , 2008
Carvacrol	751,1 µg/mL causaron un 33,9% de inhibición. IC ₅₀ = 132,0 µg/mL IC ₅₀ = 105,0 µg/mL 1640,0 mg carvacrol/g de DPPH causaron un 50,0% de inhibición. IC ₅₀ = 4300 µg/mL IC ₅₀ = 433,0 µg/mL IC ₅₀ = 52,0 µg/mL IC ₅₀ = 248,0 µg/mL IC ₅₀ =160,2 µg/mL IC ₅₀ = 267,0 µg/mL. 500,0 µg/mL causaron un 79,2 % de inhibición. IC ₅₀ = 448,0 µg/mL IC ₅₀ = 267,0 µg/mL IC ₅₀ = 400,0 µg/mL	Ali <i>et al.</i> , 2013 Beena <i>et al.</i> , 2013 Giweli <i>et al.</i> , 2013 Lemonis <i>et al.</i> , 2013 Wang <i>et al.</i> , 2013 Öztürk, 2012 Aazza <i>et al.</i> , 2011 Ozkan & Erdogan, 2011 Rua <i>et al.</i> , 2011 Chen <i>et al.</i> , 2009 Lin <i>et al.</i> , 2009 Safaei-Ghomi <i>et al.</i> , 2009 Mastelic <i>et al.</i> , 2008 Kulisic <i>et al.</i> , 2004
<i>p</i> -Cimeno	IC ₅₀ >1000,0 µg/mL A 20 mg/mL no se pudo calcular la IC ₅₀ . 5000,0 µg/mL causaron < del 1,0 % de inhibición.	Öztürk, 2012 Aazza <i>et al.</i> , 2011 Lin <i>et al.</i> , 2009
Cinamaldehído	IC ₅₀ = 3100,0 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2013
1,8-Cineol	No activo 0,8 µL/mL causaron un 40,0% de inhibición. La máxima concentración ensayada no permitió calcular la IC ₅₀ . IC ₅₀ = 46,0 µg/mL 5,0 % (v/v) causaron un 3,0 % de inhibición. No activo. 4,0% (v/v) causaron un 43,0% de inhibición.	Ojeda-Sana <i>et al.</i> , 2013 SahinBasak & Candan, 2013 Aazza <i>et al.</i> , 2011 Hussain <i>et al.</i> , 2010 Yang <i>et al.</i> , 2010 Papageorgiou <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008b
Citral	IC ₅₀ = 7200,0 µg/mL	Wang <i>et al.</i> , 2013
<i>Citrus limon</i>	IC ₅₀ =6680,0 µg/mL 400,0 µL/mL causaron un 80,0% de inhibición. IC ₅₀ = 16145,0 µg/mL IC ₅₀ = 60,0 µg/mL. IC ₅₀ = 3,8 % (v/v)	Dawidowicz & Olszowy, 2014 Obob <i>et al.</i> , 2014 Aazza <i>et al.</i> , 2011 ChunYan <i>et al.</i> , 2010 Yang <i>et al.</i> , 2010
<i>Coriandrum sativum</i>	4000,0 µg/mL causaron un 56,0% de inhibición. 5000,0 µg/mL causaron un 20,0% de inhibición. <i>C. sativum</i> causó un 4,8% de inhibición. Actividad significativa 100,0 µg/mL causaron un 51,0% de inhibición. IC ₅₀ = 60000,0 µg/mL IC ₅₀ = 72,0 µg/mL Baja actividad antioxidante a las concentraciones ensayadas. 5000,0 µg/mL causaron un 30,0% de inhibición. IC ₅₀ = 170,0 g /mmol de DPPH	Aliakbarlu <i>et al.</i> , 2013 Alves-Silva <i>et al.</i> , 2013 Amariei <i>et al.</i> , 2013 Chaudhary <i>et al.</i> , 2013 Shalaby <i>et al.</i> , 2011 Sriti <i>et al.</i> , 2011 Romeilah <i>et al.</i> , 2010 Mikre <i>et al.</i> , 2007 Politeo <i>et al.</i> , 2006 Puertas-Mejia <i>et al.</i> , 2002
<i>Cymbopogon martinii</i>	IC ₅₀ = 51,0 µg/mL 5000,0 µg/mL causaron un 15,0 % de inhibición. No activo.	Tsai <i>et al.</i> , 2011 Lin <i>et al.</i> , 2009 Scherer <i>et al.</i> , 2009
β -Elemeno.	No activo.	Dar <i>et al.</i> , 2011
Estragol	IC ₅₀ = 5760,0 µg/mL	Dawidowicz & Olszowy, 2014
Eugenol	IC ₅₀ = 11,8 µg/mL	D'Avila Farías <i>et al.</i> , 2014

	IC ₅₀ = 200,0 µg/mL	Dawidowicz & Olszowy, 2014
	IC ₅₀ = 1,0 µg/mL	Seema Farhath <i>et al.</i> , 2013
	IC ₅₀ =1,34 µL/mL	Jumepaeng <i>et al.</i> , 2013
	1,6 µg/mL causaron un 50,0% de inhibición.	Nam & Kim, 2013
	8,0 µg/mL causaron un 70,0% de inhibición.	Padmakumari Amma <i>et al.</i> , 2013
	IC ₅₀ = 110,0 µg/mL	Petchsoongsakul & Pechyen, 2012
	IC ₅₀ = 16,0 µg/mL.	Gülçin, 2011
	IC ₅₀ < 9,0 µg/mL	Jung <i>et al.</i> , 2011
	IC ₅₀ = 0,54 Mol/Mol DPPH	Bortolomeazzi <i>et al.</i> , 2010
	40,0 µg/mL causaron inhibición de 259,0 µmol/mL de equivalentes de α- tocoferol.	Horchani <i>et al.</i> , 2010
	IC ₅₀ = 5,0 µg/mL	Politeo <i>et al.</i> , 2010
	IC ₅₀ = 9,0 µg/mL	Chen <i>et al.</i> , 2009
	500,0 µg/mL causaron un 93,0 % de inhibición.	Lin <i>et al.</i> , 2009
	IC ₅₀ = 5,0 µg/mL	Scherer & Teixeira Godoy, 2009
	Concentraciones entre 0,8 µg/mL y 16,4 µg/mL mostraron una alta actividad.	Slameňová <i>et al.</i> , 2009
	IC ₅₀ = 9,0 µg/mL	Mastelic <i>et al.</i> , 2008
	IC ₅₀ = 0,26 mol/ mol de DPPH	Bortolomeazzi <i>et al.</i> , 2007
	2,3 µg/mL causaron un 20,0% de inhibición.	Kadoma <i>et al.</i> , 2007
	IC ₅₀ = 1,3 µg/mL	Jirovetz <i>et al.</i> , 2006
	IC ₅₀ = 9,8 µg/mL	Ito <i>et al.</i> , 2005
	IC ₅₀ = 0,08% (v/v)	Fujisawa <i>et al.</i> , 2004
	4,6 µg/mL causaron un 43,0% de inhibición.	Tomaino <i>et al.</i> , 2004
Geranilo, acetato de	IC ₅₀ = 4,0 µg/mL	Seema Farhath <i>et al.</i> , 2013
Geraniol	IC ₅₀ = 25,0 µg/mL	Seema Farhath <i>et al.</i> , 2013
Gingerol	IC ₅₀ = 68,0 µg/mL	Seema Farhath <i>et al.</i> , 2013
<i>Juniperus communis</i>	IC ₅₀ = 34800,0 µg/mL El aceite esencial causó un 2,0 % de inhibición.	Höferl <i>et al.</i> , 2014 Amariet <i>et al.</i> , 2013
<i>Laurus nobilis</i>	50 µL/mL causaron un 83,3% de inhibición. 2000 ppm causaron un 45,0% de inhibición. 0,8 µL/mL causaron un 60,0% de inhibición.	Nehir El <i>et al.</i> , 2014 Turan, 2014 Sahin Basak & Candan, 2013
	IC ₅₀ = 59,2 µg/mL Semillas IC ₅₀ = 66,0 µg/mL, hojas IC ₅₀ = 53,0 µg/mL IC ₅₀ = 94655,0 µg/mL 200 ppm causaron una inhibición más efectiva que el BHT. Buena actividad antioxidante a las concentraciones ensayadas. 5000 µg/mL causaron un 68,0% de inhibición.	Yilmaz <i>et al.</i> , 2013 Saab <i>et al.</i> , 2012 Ozcan <i>et al.</i> , 2010 Nabiha <i>et al.</i> , 2009 Politeo <i>et al.</i> , 2007 Politeo <i>et al.</i> , 2006
Limoneno	IC ₅₀ =1870,0 µg/mL 0,8 µL/mL causaron un 55,0% de inhibición. A 20 mg/mL no se pudo calcular la IC ₅₀ . IC ₅₀ = 2,1% (v/v) 0,4 % (v/v) causaron un 1,0% de inhibición.	Dawidowicz & Olszowy, 2014 Sahin Basak & Candan, 2013 Aazza <i>et al.</i> , 2011 Yang <i>et al.</i> , 2010 Emami <i>et al.</i> , 2007
Linalilo, acetato de	A 20 mg/mL no se pudo calcular la IC ₅₀ .	Aazza <i>et al.</i> , 2011
Linalol	A 20 mg/mL no se pudo calcular la IC ₅₀ .	Aazza <i>et al.</i> , 2011

<i>Melaleuca alternifolia</i>	IC ₅₀ = 12,5 µg/mL. IC ₅₀ = 30,0 µg/mL 0,1% (v/v) causaron un 54,0% de inhibición.	Noumi <i>et al.</i> , 2011 Tsai <i>et al.</i> , 2011 Kim <i>et al.</i> , 2004
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	5000,0 µg/mL causaron un 4,0 % de inhibición.	Lin <i>et al.</i> , 2009
Mirceno	IC ₅₀ = 4,5 µL/mL 5000,0 µg/mL causaron un 3,0 % de inhibición.	Ojeda-Sana <i>et al.</i> , 2013 Lin <i>et al.</i> , 2009
<i>Myristica fragrans</i>	IC ₅₀ = 3930,0 µg/mL IC ₅₀ = 22000,0 µg/mL 5000,0 µg/mL causaron un 24,0% de inhibición. 0,4% (v/v) causaron un 89,0% de inhibición. 0,013 % (v/v) causaron un 52,0% de inhibición.	Nanasombat <i>et al.</i> , 2011 Jukic <i>et al.</i> , 2006 Politeo <i>et al.</i> , 2006 Singh <i>et al.</i> , 2005 Tomaino <i>et al.</i> , 2004
α-Pineno	IC ₅₀ = 18,0 µL/mL A 20 mg/mL no se pudo calcular la IC ₅₀ . 100,0 µg/mL causaron un 4,0 % de inhibición. 5,0 % (v/v) causaron un 3,0% de inhibición. IC ₅₀ = 20000,0 µg/mL 4,0% (v/v) causaron un 46,0% de inhibición. No activo.	Ojeda-Sana <i>et al.</i> , 2013. Aazza <i>et al.</i> , 2011 Dar <i>et al.</i> , 2011 Yang <i>et al.</i> , 2010 Papageorgiou <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008b Emami <i>et al.</i> , 2007
β-Pineno	IC ₅₀ = 10,0 % (v/v) 4,0% (v/v) causaron un 46,0% de inhibición. 0,4 % (v/v) causaron un 1,0% de inhibición.	Yang <i>et al.</i> , 2010 Wang <i>et al.</i> , 2008b Emami <i>et al.</i> , 2007
<i>Rosmarinus officinalis</i>	50 µL/mL causaron un 47,1% de inhibición. 50 µL/mL causaron un 51,0% de inhibición. IC ₅₀ =77,6 µL/mL 2000 ppm causaron un 15,0% de inhibición. <i>R. officinalis</i> causó un 3,3% de inhibición. IC ₅₀ =189,0 µg/mL Fenotipos: hojas anchas IC ₅₀ = 25,0 µL/mL, hojas estrechas IC ₅₀ =11,0 µL/mL IC ₅₀ = 12800,0 µg/mL. Actividad dosis dependiente. IC ₅₀ =1,26% (v/v) IC ₅₀ = 110,0 µg/mL IC ₅₀ < 11,5 µg/mL IC ₅₀ = 21,0 µg/mL IC ₅₀ = 121610,0 µg/mL IC ₅₀ = 17000,0 µg/mL IC ₅₀ = 8,6 % (v/v) IC ₅₀ = 28,0 µL/mL (v/v) 5000,0 µg/mL causaron un 8,0 % de inhibición. Buena actividad antioxidante. Buena actividad antioxidante. IC ₅₀ = 27,0 µg/mL IC ₅₀ = 3500,0 µg/mL Concentración no especificada causó un 92,0% de inhibición.. 4,0% (v/v) causaron un 62,0% de inhibición. IC ₅₀ = 3,82 µL/mL 0,2 % (v/v) causaron un 24,0% de inhibición. 233,0 µg/mL causaron un 7,0% de inhibición. Baja actividad antioxidante. 1,0% (v/v) causaron un 64,0% de inhibición.	Kačániová <i>et al.</i> , 2014 Karakaya <i>et al.</i> , 2014 Rašković <i>et al.</i> , 2014 Turan, 2014 Amariei <i>et al.</i> , 2013 Miladi <i>et al.</i> , 2013 Ojeda-Sana <i>et al.</i> , 2013 Yosr <i>et al.</i> , 2013 Martac & Podea, 2012 Beretta <i>et al.</i> , 2011 Kadri <i>et al.</i> , 2011 Hajlaoui <i>et al.</i> , 2010 Hussain <i>et al.</i> , 2010 Viuda-Martos <i>et al.</i> , 2010a Viuda-Martos <i>et al.</i> , 2010b Yang <i>et al.</i> , 2010 Zaouali <i>et al.</i> , 2010 Lin <i>et al.</i> , 2009 El-Massry <i>et al.</i> , 2008 Fakoor & Rasooli, 2008 Genena <i>et al.</i> , 2008 Papageorgiou <i>et al.</i> , 2008 Topal <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008b Bozin <i>et al.</i> , 2007 Gachkar <i>et al.</i> , 2007 Mata <i>et al.</i> , 2007 Mikre <i>et al.</i> , 2007 Sacchetti <i>et al.</i> , 2005

	Buena actividad antioxidante. IC ₅₀ = 140,0 g/mmol de DPPH	El-Ghorab, 2003 Puertas-Mejaeta <i>et al.</i> , 2002
Sabineno	0,4 % (v/v) causaron un 5,0% de inhibición.	Emami <i>et al.</i> , 2007
<i>Syzygium aromaticum</i>	IC ₅₀ = 330,0 µg/mL 4000,0 µg/mL causaron un 90,0% de inhibición. <i>S. aromaticum</i> causó un 93,7% de inhibición. 100,0 µg/mL causaron un 80,3% de inhibición. 10 000 µg/mL causaron un 70,0% de inhibición. IC ₅₀ = 5,0 µg/mL IC ₅₀ < 11,5 µg/mL IC ₅₀ = 5,0 µg/mL IC ₅₀ = 1119,0 µg/mL IC ₅₀ = 380,0 µg/mL IC ₅₀ = 5,0 µg/mL IC ₅₀ = 8,0 µg/mL IC ₅₀ = 36,0 µg/mL IC ₅₀ = 0,2 µg/mL Buena actividad antioxidante. IC ₅₀ = 0,1 µg/mL 5000,0 µg/mL causaron un 93,0% de inhibición. 0,0026 % (v/v) causaron un 35,0% de inhibición. Buena actividad antioxidante.	Dawidowicz & Olszowy, 2014 Aliakbarlu <i>et al.</i> , 2013 Amariei <i>et al.</i> , 2013 Elslimani <i>et al.</i> , 2013 Ramadan <i>et al.</i> , 2013 Riaz <i>et al.</i> , 2011 Hajlaoui <i>et al.</i> , 2010 Politeo <i>et al.</i> , 2010 Silvestri <i>et al.</i> , 2010 Viuda-Martos <i>et al.</i> , 2010b Scherer & Teixeira Godoy, 2009 Scherer <i>et al.</i> , 2009 Wang <i>et al.</i> , 2008a Chaieb <i>et al.</i> , 2007a Fazel <i>et al.</i> , 2007 Jirovetz <i>et al.</i> , 2006 Politeo <i>et al.</i> , 2006 Tomaino <i>et al.</i> , 2004 El-Ghorab & El-Massry, 2003
α-Terpineno	84,5 µg/mL causaron un 30,0% de inhibición.	Kim <i>et al.</i> , 2004
γ-Terpineno	IC ₅₀ = 22700,0 µg/mL IC ₅₀ >1000 µg/mL 0,4 % (v/v) causaron un 18,0% de inhibición. 177,1 µg/mL causaron un 12,0% de inhibición.	Chen <i>et al.</i> , 2014 Öztürk, 2012 Emami <i>et al.</i> , 2007 Kim <i>et al.</i> , 2004
α-Terpineol	IC ₅₀ = 332800,0 µg/mL	Bicas <i>et al.</i> , 2011
α-Terpineol	5000,0 µg/mL causaron un 1,0 % de inhibición.	Lin <i>et al.</i> , 2009
α-Terpinoleno	27,2 µg/mL causaron un 0,4% de inhibición.	Kim <i>et al.</i> , 2004
<i>Thymbra capitata</i>	200,0 µg /mL causaron un 85,4% de inhibición. IC ₅₀ = 102,0 µg/mL IC ₅₀ = 62000,0 - 74000,0 µg/mL IC ₅₀ = 61,0 µg/mL IC ₅₀ = 250,0 µg/mL	El Abed <i>et al.</i> , 2014 Tabti <i>et al.</i> , 2014 Chedia <i>et al.</i> , 2013 Albano <i>et al.</i> , 2012 Galego <i>et al.</i> , 2008
<i>Thymus zygis</i>	IC ₅₀ = 76,0 µg/mL IC ₅₀ = 400,0 µg/mL.	Amarti <i>et al.</i> , 2011 Dandlen <i>et al.</i> , 2010
Timol	IC ₅₀ = 250,0 µg/mL 751,1 µg/mL causaron un 35,0% de inhibición. IC ₅₀ = 168,0 µg/mL IC ₅₀ = 403,0 µg/mL IC ₅₀ = 400,0 µg/mL IC ₅₀ = 306,0 µg/mL IC ₅₀ = 51,0 µg/mL IC ₅₀ = 163,0 µg/mL IC ₅₀ = 107,4 µg/mL IC ₅₀ = 45,0 µg/mL 5000 µg/mL causaron un 84,0 % de inhibición. IC ₅₀ = 269,0 µg/mL IC ₅₀ = 500,0 µg/mL	Dawidowicz & Olszowy, 2014 Ali <i>et al.</i> , 2013 Beena <i>et al.</i> , 2013 Giweli <i>et al.</i> , 2013 Ojeda-Sana <i>et al.</i> , 2013 Öztürk, 2012 Aazza <i>et al.</i> , 2011 Ozkan & Erdogan, 2011 Rua <i>et al.</i> , 2011 Archana <i>et al.</i> , 2009 Lin <i>et al.</i> , 2009 Mastelic <i>et al.</i> , 2008 Kulisic <i>et al.</i> , 2004
α-Tuyeno	0,4 % (v/v) causaron un 5,0% de inhibición.	Emami <i>et al.</i> , 2007
<i>Zingiber officinale</i>	8000,0 µg/mL causaron un 36,1% de inhibición.	Bayala <i>et al.</i> , 2014

4000,0 µg/mL causaron un 63,0% de inhibición.	Aliakbarlu <i>et al.</i> , 2013
IC ₅₀ = 11700,0 µg/mL	Bellik <i>et al.</i> , 2013
500,0 µg/mL causaron un 30,0% de inhibición.	Jeena <i>et al.</i> , 2013
IC ₅₀ = 0,0144 % (v/v)	Wang <i>et al.</i> , 2012
0,8% (v/v) causaron un 29,0% de inhibición.	Padalia <i>et al.</i> , 2011
IC ₅₀ = 65,0 µg/mL	El-Baroty <i>et al.</i> , 2010
IC ₅₀ = 160,0 µg/mL.	El-Ghorab <i>et al.</i> , 2010
IC ₅₀ = 4385,0 µg/mL	Leelapornpisid <i>et al.</i> , 2008
0,5 % (v/v) causaron un 95,0 % de inhibición.	Singh <i>et al.</i> , 2008
200,0 µg/mL causaron un 52,0% de inhibición.	Wei & Shibamoto, 2007
1,0% (v/v) causaron un 55,0% de inhibición.	Sacchetti <i>et al.</i> , 2005

Tabla 3.2. Revisión de trabajos publicados que estudian la actividad de los aceites esenciales o sus constituyentes sobre la producción de ROS mediante la citometría de flujo.

Aceite esencial o compuesto	Ensayo	Resultados	Referencia
<i>Anethum graveolens</i>	Se emplea <i>Candidaalbicans</i> . Tratamientos entre 0,156 y 1,25 µL/mL. Incubación durante 12 h.	Incremento de la producción de ROS que fue dosis-dependiente.	Chen <i>et al.</i> , 2013
Borneol	Se emplean ratas que son tratadas. Se determina glutatión total en los hepatocitos.	Incremento en la cantidad de glutatión total en los hepatocitos de las ratas.	Horváthová <i>et al.</i> , 2012
Carvacrol	Se emplean glioblastomas no estimulados y son tratadas con 30,0;60,0 y 90,1 µg/mL de Carvacrol durante 24 h.	Incremento de la producción de ROS en glioblastomas en forma dosis-dependiente.	Liang & Lu, 2012
Citral	Se emplean linfocitos humanos no estimulados. Tratamientos de 200, 400 y 800 µg/mL.	Incremento significativo de la producción de ROS a todas las concentraciones ensayadas.	Sinha <i>et al.</i> , 2014
<i>Cymbopogon citratus</i>	Se emplean linfocitos humanos no estimulados. Tratamientos de 200, 400 y 800 µg/mL.	Incremento significativo de la producción de ROS a todas las concentraciones.	Sinha <i>et al.</i> , 2014
<i>Cymbopogon martinii</i>	Se emplean linfocitos humanos no estimulados. Tratamientos de 1000, 1500 y 2000 µg/mL.	Los tratamientos no produjeron cambios significativos respecto al control.	Sinha <i>et al.</i> , 2014
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Se emplean linfocitos humanos no estimulados. Tratamientos de 1000, 1500 y 2000 µg/mL.	Incremento significativo de la producción de ROS a todas las concentraciones.	Sinha <i>et al.</i> , 2014
Eugenol	Se emplean células no estimuladas.	La producción de ROS no se vio afectada.	Fujisawa <i>et al.</i> , 2004.
Geraniol	Se emplean linfocitos humanos no estimulados. Tratamientos de 1000, 1500 y 2000 µg/mL.	Los tratamientos no produjeron cambios significativos respecto al control.	Sinha <i>et al.</i> , 2014
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Se emplean leucocitos humanos estimulados por PMA. Tratamiento del 0,1%. Se emplean leucocitos humanos no estimulados y estimulados por tres estimulantes diferentes (PMA, fMLP y zimosan). Tratamiento del 0,1%.	Los tratamientos redujeron la producción de ROS. Incremento de la producción de ROS en leucocitos no estimulados. En leucocitos estimulados el tratamiento produjo inhibición (indiferente del estimulante).	Caldefie-Chezet <i>et al.</i> , 2006. Caldefie-Chezet <i>et al.</i> , 2004
Terpenos	Se toman células no estimuladas y se tratan con terpenos.	El tratamiento produjo un aumento en la producción de ROS.	Johard <i>et al.</i> , 1993
Vetiverol, acetato de	Se emplean linfocitos humanos no estimulados. Tratamientos de 200, 400 y 800 µg/mL	Incremento significativo de ROS a las concentraciones de 400 y 800 µg/mL.	Sinha <i>et al.</i> , 2014

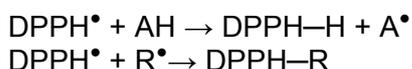
3.2 Materiales y métodos

Con el propósito de estudiar la actividad antioxidante de extractos y compuestos se han descrito numerosos ensayos experimentales *in vitro*. Algunos de estos ensayos implican la utilización de células vivas mientras que en otros no ocurre así.

3.2.1 Ensayo de la actividad antioxidante por el método del DPPH

3.2.1.1 Fundamento del ensayo

En este ensayo se siguió la metodología establecida por Brand-Williams *et al.*, (1995). La reacción con el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) en solución alcohólica se utiliza con el objetivo de evaluar la actividad antioxidante de un extracto o compuesto. La reducción de la absorbancia a una longitud de onda característica permite seguir el curso de la reacción. El DPPH[•] absorbe a los 515nm pero cuando reacciona con un antioxidante (AH) o con una especie radical (R[•]), la absorción a esa longitud de onda desaparece.



3.2.1.2 Preparación de las muestras de aceites esenciales

Se tomaron 10 µL de cada aceite esencial y se añadió este volumen a un eppendorf de 1,5 mL previamente tarado. La masa de esta alícuota se determinó en balanza analítica. Se completó el volumen hasta 1mL con etanol absoluto. Se sometió la mezcla a vortex durante 2 minutos. Esta solución se utilizó como solución madre. A partir de la solución madre se realizó una dilución $1/10$ empleando como solvente el etanol absoluto. Esta fue la primera solución de trabajo. La primera dilución fue seguida a su vez de 6 diluciones ($1/2$) consecutivas también empleando como solvente el etanol absoluto. La secuencia de diluciones realizadas fue la siguiente: solución madre (10 µL/mL) → $1/10$ (primera solución ensayada) → $1/2$ → $1/2$ → $1/2$ → $1/2$ → $1/2$ → $1/2$.

3.2.1.3 Material

- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) [Sigma, referencia: D9132].
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) [Sigma, referencia: D1435].
- Quercetina [Sigma, referencia: Q4951].
- Etanol absoluto [Sigma, referencia: 459844].
- Microtubo tipo Eppendorf 1,5 mL tapa plana [Rubilabor, referencia: 711.1500].
- Tubos plásticos de 15 mL. [Rubilabor, referencia: 644.2015].
- Placa microtiter 96 pocillos, fondo plano. [Rubilabor, referencia: 822.0005].
- Puntas de multipipeta de 200 µL (fine point LTS tips). Solo para empleo en multipipetas LTS (Rainin) [Rainin, referencia: RC-L250/10].
- Puntas de pipeta de 200 µL [Rubilabor, referencia: 16-2001].
- Punta de pipeta de 10 mL [Rubilabor, referencia: 511.0002].
- Punta de pipeta 100-1000 µL [Rubilabor, referencia: 015/162222].
- Espectrofotómetro para la lectura de las microplacas a 515 nm. [Microplate reader spectrophotometer, Benchmark Plus, BIORAD, USA, 2004].

3.2.1.4 Solución de DPPH

Solución madre de DPPH: Se toma 1g de DPPH y se disuelve en 100 mL de etanol absoluto para distribuir en alícuotas de 100 μ L que tendrán una concentración de 316 μ M/L. Se almacenan las alícuotas a -80 °C.

Solución de trabajo: Se toma el contenido de una alícuota de DPPH y se transfiere a un tubo de ensayo desechable de 15 mL donde se mezcla con 7,147 mL de etanol absoluto.

3.2.1.5 Solución de quercetina (control positivo)

Se empleó una solución de quercetina en dimetil-sulfóxido (DMSO) como control (+) de la actividad antioxidante. En un microtubo tipo eppendorf previamente tarado se pesó en balanza analítica 10 mg de quercetina. Posteriormente se añadió 1 mL de DMSO. Esta solución se utilizó como solución madre. A partir de la solución madre se realizó una dilución $1/10$ empleando como solvente el etanol absoluto. Esta fue la primera solución de trabajo. Esta primera dilución fue seguida a su vez de 6 diluciones ($1/2$) consecutivas, cada una la mitad de la solución anterior (empleando en estas diluciones el etanol absoluto). La secuencia de diluciones realizadas fue la siguiente: solución madre (10 mg/mL) \rightarrow $1/10$ (primera solución ensayada) \rightarrow $1/2 \rightarrow 1/2 \rightarrow 1/2 \rightarrow 1/2 \rightarrow 1/2 \rightarrow 1/2$. El DMSO fue ensayado por separado sin que presentara ninguna actividad intrínseca en este ensayo.

3.2.1.6 Método operatorio del ensayo de DPPH

Se toma una placa de fondo plano de la que se utilizan solo las primeras 6 columnas en cada experimento con el fin de disminuir el tiempo total de experimentación y medición (**Figura 3.1**).

La metodología del ensayo y la distribución de las muestras y controles es la siguiente:

1. En los pocillos designados como "muestra problema" se añaden 95 μ L de solución de trabajo de DPPH + 5 μ L de muestra problema.
2. En los pocillos designados como "blanco de la muestra problema" se añaden 95 μ L de etanol absoluto + 5 μ L de muestra problema.
3. En los pocillos designados como "DPPH, 0 % de inhibición" se añaden 95 μ L de DPPH + 5 μ L de etanol absoluto
4. En los pocillos designados como "blanco del DPPH" se añaden 100 μ L de etanol absoluto.
5. Se incuba la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad (para que el DPPH se afecte lo menos posible por la luz).
6. Se realiza la medición de la absorbancia a 515 nm.

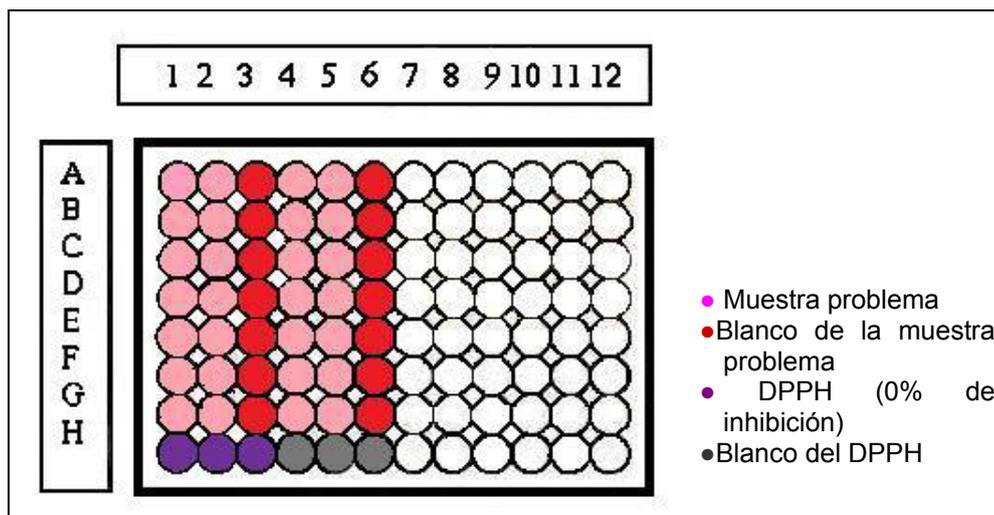


Figura 3.1. Representación esquemática de la distribución de las muestras y controles en una placa de microtiter de 96 pocillos.

3.2.1.7 Procesamiento de los resultados y estadística

La inhibición (%) del radical libre estable del DPPH fue calculada según la siguiente fórmula:

$$I(\%) = 100 - [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Donde:

I: inhibición (%)

A₀: Absorbancia del control negativo

A₁: Absorbancia de la muestra o tratamiento

Los resultados fueron resumidos en tablas donde se recogió el efecto de las diferentes concentraciones de las muestras sobre la inhibición (I, %). Los datos reflejan las medias ± desviación estándar (DE) de cuatro experimentos independientes. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos y los controles se realizaron mediante un análisis de varianza (*one-way ANOVA*) seguido de una prueba de Dunnett (*Dunnett's test*). Como nivel de significación se tomó una $p < 0.05$. La concentración inhibitoria 50 % (IC₅₀) fue calculada, cuando fue posible, por interpolación en una recta obtenida mediante regresión lineal. Esta recta se obtuvo de graficar la inhibición (%), *versus* el logaritmo de la concentración del aceite esencial (µg/mL). Para la realización de los cálculos y el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad, Prism versión 5.0 para Windows (San Diego, CA, USA).

3.2.2 Ensayo de la actividad sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos humanos

3.2.2.1 Fundamento del ensayo

El objetivo del ensayo consiste en la determinación de la producción intracelular de ROS en neutrófilos mediante la citometría de flujo. Para realizar esta determinación se utiliza la 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), sustancia que es empleada ampliamente como marcador para la determinación de la producción de

ROS en neutrófilos y macrófagos. Este marcador por sus propiedades lipófilas difunde rápidamente hacia el interior de las células, donde las esterasas citoplasmáticas lo desacetilan a 2',7'-diclorofluorescina (DCFH), compuesto no fluorescente. La DCFH queda atrapada en el interior de la célula por su mayor polaridad, concentrándose en el citoplasma. Este compuesto reacciona cuantitativamente con las ROS y se oxida a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) en una reacción catalizada por la peroxidasa. La DCF es un compuesto muy fluorescente a 530 nm (fluorescencia verde). Cuando la célula es tratada con estimulantes de la producción de ROS el incremento de éstos compuestos producirá una mayor oxidación de la DCFH, formando en consecuencia mayor cantidad de DCF. Se observará una mayor fluorescencia que será proporcional al aumento en la producción de ROS. La producción de ROS puede de esta forma ser cuantificada por el citómetro de flujo. Las células no estimuladas presentan poca fluorescencia por sí mismas y sirven de referencia para la comparación con las células estimuladas con diferentes compuestos.

Los compuestos más frecuentemente empleados para estimular la producción de ROS en las células son el H₂O₂, el 13-acetato-12-miristato de forbol (PMA por sus siglas en inglés), y el N-formil-metionil-leucil-fenil-alanina (fMPL por sus siglas en inglés). Estas sustancias tienen distintos mecanismos de estimulación de la producción de ROS. En nuestro caso hemos empleado el H₂O₂ y el PMA. El H₂O₂ tiene un efecto directo en la oxidación de la DCFH y es un precursor de las ROS. El H₂O₂ se puede producir intracelularmente por peroxisomas y mitocondrias y también puede difundir al interior de la célula desde el espacio extracelular cuando se libera por células especializadas durante la inflamación o en condiciones "in vitro" cuando es añadido en el medio. Los radicales libres del oxígeno y las ROS son igualmente capaces de activar el NF-κB en una variedad de células. Muchos de los genes sensibles al estatus redox de la célula poseen motivos κB en su región promotora y se unen al factor de transcripción NF-κB cuando este se encuentra activado. Por su parte, el PMA activa a la proteína quinasa C, la cual inicia entonces una cascada de respuestas que llevan a la fosforilación y la inactivación del IκB. La inactivación del IκB trae como consecuencia la translocación del NF-κB (p50/p65) desde el citosol al núcleo, donde se une al elemento receptor e induce la expresión de un grupo de genes de respuesta inmediata y temprana, involucrados en las respuestas inmunes e inflamatorias. Los neutrófilos estimulados con PMA liberan cantidades de O₂⁻ comparables a las observadas con agonistas fisiológicos (Robinson *et al.*, 1985; Shapira *et al.*, 1994; Ogata *et al.*, 2000; Sodsai *et al.*, 2007).

Puesto que algunas enzimas intracelulares como las catalasas o las peroxidases (especialmente la mieloperoxidasa) interfieren significativamente en la reacción de oxidación, la adición de azida sódica (NaN₃) disminuye estas interferencias en la oxidación de la DCFH. Posiblemente, la disminución en las interferencias por la adición de azida sódicas se produce por inactivación de estas enzimas intracelulares como la mieloperoxidasa. La azida sódica también inhibe la oxidación mitocondrial espontánea al inhibir la citocromo oxidasa. Sin embargo, la presencia de la azida sódica no afecta la viabilidad celular.

Entre las células relacionadas con la producción de ROS se encuentran los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos, los eosinófilos y las células endoteliales. El consumo de oxígeno y la oxidación durante la estimulación fagocítica son equivalentes o superiores en monocitos respecto a neutrófilos. Los monocitos, sin embargo, parecen convertir una menor parte del oxígeno consumido a O₂⁻ y H₂O₂ que los neutrófilos. Estas diferencias se relacionan con un elevado incremento en la respiración mitocondrial en monocitos fagocíticos, pero no en neutrófilos. En el caso

de los linfocitos, éstos presentan un mínimo estrés oxidativo. De las tres poblaciones celulares que coexisten en las muestras sanguíneas, procedentes de *buffycoats* (linfocitos, monocitos y neutrófilos), se ha estudiado la producción de ROS en neutrófilos. El método operatorio utilizado en nuestro trabajo fue el descrito por Pérez-García *et al.*, (1996). A este método se le realizaron algunas modificaciones para adaptarlo al empleo de microplacas y la utilización de aceites esenciales como sustancias bajo estudio.

3.2.2.2 Preparación de las muestras de aceites esenciales

Se tomaron 10 μL de cada aceite esencial y se añadió este volumen a un eppendorf de 1,5 mL previamente tarado. La masa de esta alícuota se determinó en balanza analítica. Se completó el volumen hasta 1 mL con solución salina de Hanks modificada sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esta solución de Hanks había sido previamente suplementada con un 10% de DMSO y 1,5% del emulgente alimentario E-484 (estearil citrato) con el fin de facilitar la solubilidad de los aceites esenciales. Los aditivos o solventes empleados fueron ensayados previamente para descartar que presentaran algún tipo de actividad por sí mismos. Estos resultados no se muestran por razones de espacio. Se sometió la mezcla a vortex durante 2 minutos que fueron seguidos de un tratamiento de 5 minutos en el equipo de ultrasonido. El resultado final fue una emulsión del aceite esencial con aspecto homogéneo. Esta emulsión se utilizó como solución madre. A partir de la solución madre se realizaron varias diluciones diferentes empleando como solvente solución salina de Hanks modificada sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . La primera dilución fue una dilución $1/_{6,6666}$ de la solución madre; o lo que es lo mismo, se tomaron 150 μL de solución madre y se añadió solución de Hanks modificada sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} hasta completar 1 mL en un eppendorf de 1,5 mL (0,15 % v/v en el eppendorf y $1,5 \times 10^{-2}$ % v/v en la placa). Esta fue la primera solución ensayada en algunas de las sustancias bajo estudio. Al añadir el tratamiento a la placa ocurre una dilución $1/_{10}$ de las concentraciones que se encuentran en el eppendorf. La segunda dilución también fue realizada a partir de la solución madre mediante una dilución $1/_{8}$. Se tomaron 125 μL de solución madre y se completaron con solución de Hanks modificada sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} hasta completar 1 mL en un eppendorf de 1,5 mL (0,125 % v/v en el eppendorf y $1,25 \times 10^{-2}$ % v/v en la placa). La tercera dilución fue realizada a partir de la solución madre mediante una dilución $1/_{10}$ (0,10 % v/v en el eppendorf y $1,0 \times 10^{-2}$ % v/v en la placa). Esta tercera dilución dio lugar a otras dos diluciones, una dilución $3/_{4}$ (0,075% v/v en el eppendorf y $7,5 \times 10^{-3}$ % v/v en la placa) y una dilución $1/_{2}$ (0,05% v/v en el eppendorf y $5,0 \times 10^{-3}$ v/v en la placa). Esta última dilución (0,05% v/v en el eppendorf) fue seguida de una serie de diluciones $1/_{2}$ y $1/_{10}$. La secuencia de estas diluciones fue la siguiente: $1/_{2} \rightarrow 1/_{2} \rightarrow 1/_{2} \rightarrow 1/_{10} \rightarrow 1/_{10}$.

3.2.2.3 Material

- Etilendiaminatetraacetato de sodiodihidratado ($\text{EDTA-Na}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). [Sigma, referencia: E6511].
- Azida sódica (NaN_3) [Sigma, referencia: 71289].
- 2',7'-diclorofluorescina-diacetato (DCFH-DA) [Sigma, referencia: D6883].
- Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) 30% [Sigma, referencia: H3410].
- Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) [Sigma, referencia: P8139].
- Ioduro de propidio [Sigma, referencia: P4170].
- Cloruro de amonio (NH_4Cl). [Sigma, referencia: A9434].
- Bicarbonato de potasio (KHCO_3). [Sigma, referencia: P9144]
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) [Sigma, referencia: D1435].
- Paraformaldehído [Sigma, referencia: 158127].

- Quercetina [Sigma, referencia: Q4951].
- Tween 20 [Sigma, referencia: P1379].
- Tween 80 [Sigma, referencia: P1754].
- Solución salina de Hanks modificada, más cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (HBSS). [Sigma, referencia: H8264].
- Solución salina de Hanks modificada, sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (HBSS) [Sigma, referencia: H6648].
- Ricinoleato de gliceril-polietilenglicol (E484) [suministrado por Lidervet, S.L.].
- Microtubo tipo eppendorf 1,5 mL tapa plana [Rubilabor, referencia: 711.1500].
- Tubos plásticos de 50 mL sin faldón [Rubilabor, referencia: 644.2050].
- Tubos plásticos de 15 mL [Rubilabor, referencia: 644.2015].
- Placa microtiter 96 pocillos, fondo plano. [Rubilabor, referencia: 822.0005].
- Puntas de multipipeta de 200 μL (fine point LTS tips). Solo para empleo en multipipetas LTS (Rainin) [Rainin, referencia: RC-L250/10].
- Puntas de pipeta de 200 μL [Rubilabor, referencia: 16-2001].
- Punta de pipeta de 10 mL [Rubilabor, referencia: 511.0002].
- Punta de pipeta 100-1000 μL [Rubilabor, referencia: 015/162222].
- *Buffycos* procedentes del *Banc de Sang i Teixits de Catalunya*.
- Citómetro de flujo: Cytomics FC 500 MPL system, Beckmancoulter, Inc. Pertenece a la Unidad de Citometría de los Servicios-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

3.2.2.4 Solución de 2',7'-diclorofluorescina-diacetato (DCFH-DA)

Se prepara una solución madre de DCFH-DA con DMSO (0,6 mg/mL). Se divide en alícuotas de 50 μL y se almacena a -80°C (evitar la exposición a la luz). Para cada experimento se utiliza una nueva alícuota.

3.2.2.5 Solución de azida sódica (NaN_3)

Se prepara una solución con una concentración de 100 μM en HBSS sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se conserva a temperatura ambiente.

3.2.2.6 Solución de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)

Se prepara una solución madre de PMA en DMSO (1 mg/mL) y posteriormente se preparan alícuotas de 20 μL para su almacenamiento a -80°C . Horas antes de su utilización se prepara la dilución adecuada con HBSS sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . La concentración final será de 10 μM .

3.2.2.7 Solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La solución de H_2O_2 se prepara antes de su utilización. La concentración final será de 100 μM .

3.2.2.8 Solución de yoduro de propidio (IP)

Se prepara una solución de 1 mg de IP en 1 mL de HBSS sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se conserva a 4°C . El yoduro de propidio permite una excelente discriminación de las células viables. Es una sustancia capaz de intercalarse y teñir el ADN de las células muertas o con la membrana celular dañada pero incapaz de atravesar la membrana celular intacta. La solución se manipula con todas las precauciones necesarias para materiales tóxicos.

3.2.2.9 Solución de quercetina

Se realiza una dilución de 10 mg de quercetina en 1 mL de DMSO. Se continúa con dos diluciones sucesivas 1/10 hasta llegar a la concentración de 100µg/mL. Esta fue la concentración ensayada como control (+) y la concentración efectiva en el pocillo de la microplaca fue de 10,0µg/mL. Las sucesivas diluciones fueron realizadas con solución salina de Hanks modificada sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . La secuencia de diluciones realizadas fue la siguiente: solución madre (10 mg/mL) → $1/_{10}$ → $1/_{10}$ (solución ensayada).

3.2.2.10 Solución de paraformaldehído

Con el objetivo de fijar las células y detener las reacciones de formación de ROS se prepara una solución de paraformaldehído en HBSS sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . La concentración será del 1% en solución peso/peso. La dilución se realiza en caliente (baño de maría) pues a temperatura ambiente el paraformaldehído tiene muy baja solubilidad.

3.2.2.11 Solución de hemólisis

Se prepara una solución madre (x10) que se conserva a 4 °C y que está compuesta por: NH_4Cl (8,99 g), KHCO_3 (1,0 g), EDTA-Na_4 (0,037 g), H_2O MilliQc.s.p. 100 mL. Esta solución madre se diluye 1:10 (v/v) en el mismo momento de uso. Con esta técnica se busca una acumulación de NH_4Cl en el interior de los eritrocitos. Se produce un aumento en la presión osmótica de los eritrocitos y como consecuencia la ruptura de la membrana celular, lo que facilita su eliminación selectiva (Bossuyt *et al.*; 1997).

3.2.2.12 Selección del tampón

Durante la manipulación de las células es necesario prevenir su agrupación, un fenómeno que se facilita si están presentes los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . En cambio, durante la realización del ensayo funcional activo, se prefiere el tampón HBSS más los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} .

3.2.2.13 Obtención de la suspensión de leucocitos humanos

Se obtienen los leucocitos a partir de *buffycoats* provenientes del *Banc de Sang i Teixits de Catalunya*. Los *buffycoats* son la capa amarillenta rica en células blancas y plaquetas obtenidas por centrifugación de la sangre procedente de voluntarios humanos sanos. El procedimiento que se emplea para la obtención de la suspensión de leucocitos es la hemólisis (*shock* hemolítico) mediante el empleo de una solución de cloruro amónico (Bossuyt *et al.*; 1997).

1. Se toman 500 µL de sangre total que se depositan en tubos plásticos de 15 mL. Se añaden 5 mL de solución de hemólisis ya diluída.
2. Tras 3 minutos de lisis, se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm y 4 °C y se elimina el sobrenadante.
3. El acúmulo de células obtenido se lava con solución de HBSS sin cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (5 mL) y se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm.
4. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante y el acúmulo de células se resuspende en HBSS sin cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (4mL).

La suspensión resultante contiene todo tipo de leucocitos y una cantidad variable de eritrocitos y restos celulares. La cantidad de restos se puede minimizar con sucesivos lavados y centrifugaciones. Se ha de tener en cuenta que un incremento

en el tiempo de lisis con cloruro amónico puede dar como resultado un aumento de la mortalidad y alteración en la morfología celular. Las preparaciones celulares se mantuvieron en hielo hasta su empleo, el cual nunca fue superior a las 2 horas.

3.2.2.14 Método operatorio en el ensayo de determinación de ROS por medio de la citometría de flujo

1. Se toman los tubos cónicos de 15 mL que contienen la suspensión de células y se añaden 40 μL de DCFH-DA a cada tubo. Se procede a la mezcla cuidadosamente.
2. Se añaden 40 μL de azida sódica a cada tubo y se mezcla cuidadosamente.
3. Se incuban los tubos durante 10 minutos en baño termostático a 37 °C, con agitación continua y en completa oscuridad. Este es el tiempo necesario para que la DCFH-DA penetre a las células.
4. Se realiza una centrifugación de los tubos durante 5 minutos a 2500 rpm y 4 °C. Se elimina el sobrenadante y se vuelve a resuspender el acúmulo de células en 4 mL de solución de HBSS más los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} .
5. Se toma una microplaca de fondo plano de 96 pocillos. Se utilizan los 48 primeros pocillos. Un grupo de pocillos pasará a ser el grupo control, otro grupo será el control estimulado (con H_2O_2 o PMA) y el resto de los pocillos incluirá los diferentes tratamientos. Uno de estos tratamientos será el control (+) de la inhibición de ROS. En nuestro caso hemos utilizado la quercetina. Cada control o tratamiento fue ensayado por duplicado. En la **Figura 3.2** se muestra la distribución de los controles y tratamientos a través de la microplaca.

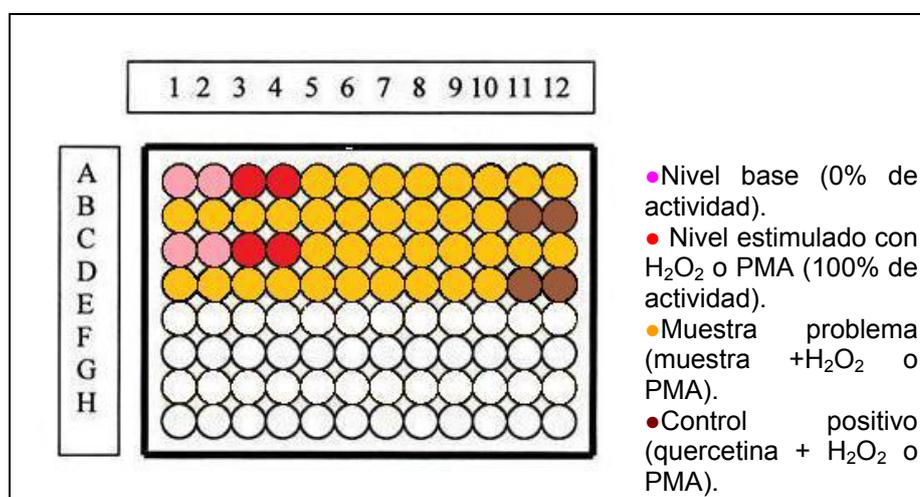


Figura 3.2. Representación esquemática de la distribución de las muestras y controles en una placa de microtiter de 96 pocillos.

6. De la suspensión de células fluorescentes preparadas con la DCFH-DA se toman 200 μL que se añaden a todos los pocillos del experimento (los pocillos tienen capacidad para 300 μL).
7. Se añaden 20 μL de tratamiento a los pocillos designados como tal. En los pocillos designados como control de nivel base y control de nivel estimulado se añaden 20 μL de HBSS más los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se incuban en la oscuridad durante 5 minutos a 37° C con agitación horizontal.
8. Se añaden 20 μL del estimulante de la producción de ROS (H_2O_2 o PMA) a todos los pocillos excepto a los controles de nivel basal de ROS, donde se

añade 20 μL de HBSS más los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se incubó 5 minutos a 37°C , con agitación horizontal.

9. Se fijan las células y se detiene la reacción con 50 μL de solución de paraformaldehído al 1% en cada pocillo. Después se sitúa la placa sobre una capa de hielo (0°C).
10. Cinco minutos antes del análisis por citometría se añaden 2 μL de yoduro de propidio (IP) en cada pocillo de la placa (concentración final 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.2.2.15 Parámetros analizados mediante el citómetro de flujo

En el citómetro de flujo fueron registrados los valores de dispersión lateral de la luz (sidescatter, abreviado: SSC) y dispersión frontal de la luz (forward scatter, abreviado: FSC). Además se determinó la intensidad de la fluorescencia verde (515-540 nm) para la detección de la 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) y de la fluorescencia roja (607 nm) para la detección del yoduro de propidio (IP). La intensidad de fluorescencia fue expresada como el valor de la media del canal de fluorescencia. También, se tuvo en cuenta que la estimulación de las ROS por el PMA o el H_2O_2 aumenta la FSC y la SSC en las diferentes poblaciones sanguíneas, especialmente en los neutrófilos. Este efecto se consideró al definir la población de neutrófilos pues se tomó el control estimulado (no tratado) con PMA o H_2O_2 como la muestra que marca las dimensiones de la región poblada por los neutrófilos. El protocolo de análisis de los datos procesados fue realizado mediante los histogramas que se exponen en las **Figuras 3.3, 3.4 y 3.5**.

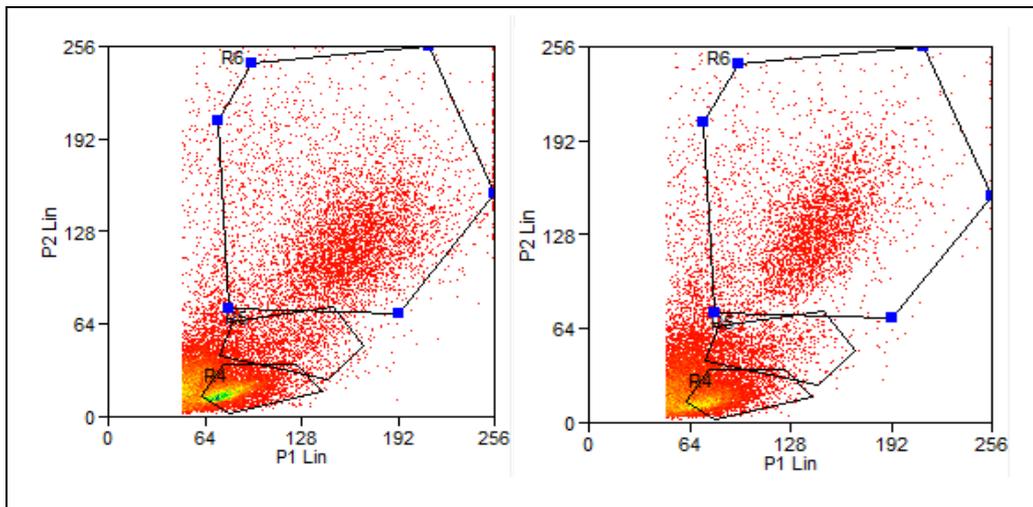


Figura 3.3. Histogramas biparamétricos que registran los valores de FSC y de SSC. La región 6 (R6) selecciona los neutrófilos. La región 4 (R4) selecciona linfocitos y la región 5 (R5) los monocitos. Aquí se representa el tamaño celular o de partícula frente a la granulosidad. Se observan las diferentes poblaciones celulares y sus aspectos morfológicos generales. También se aprecia si quedan restos de hematíes. En el histograma de la izquierda las células están en su estado basal y en el de la derecha han sido estimuladas con PMA. La población estimulada con PMA se desplaza hacia arriba.

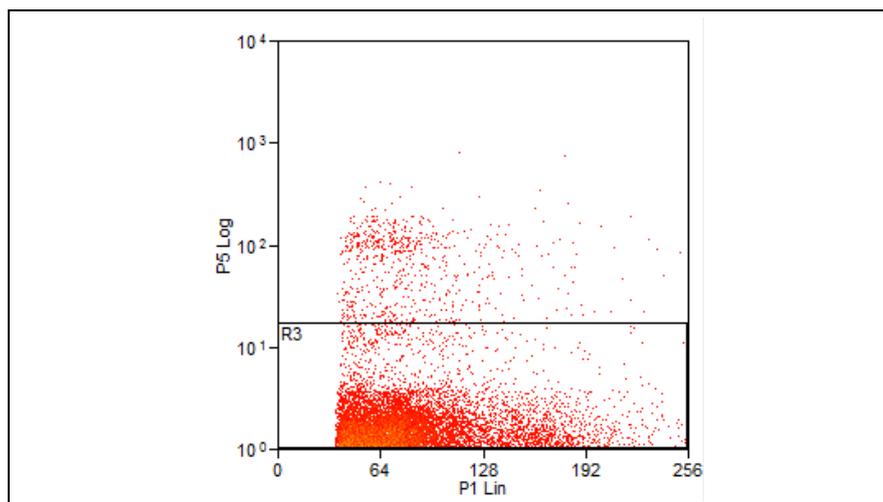


Figura 3.4. Histograma biparamétrico que registra la FSC y la fluorescencia roja asociada al IP (escala logarítmica). La región 3 (R3) selecciona los leucocitos viables, aquellos con fluorescencia roja inferior a un valor. Las células con fluorescencia roja superior a R3 se consideran muertas. En nuestros experimentos la viabilidad celular siempre fue mayor del 95 %.

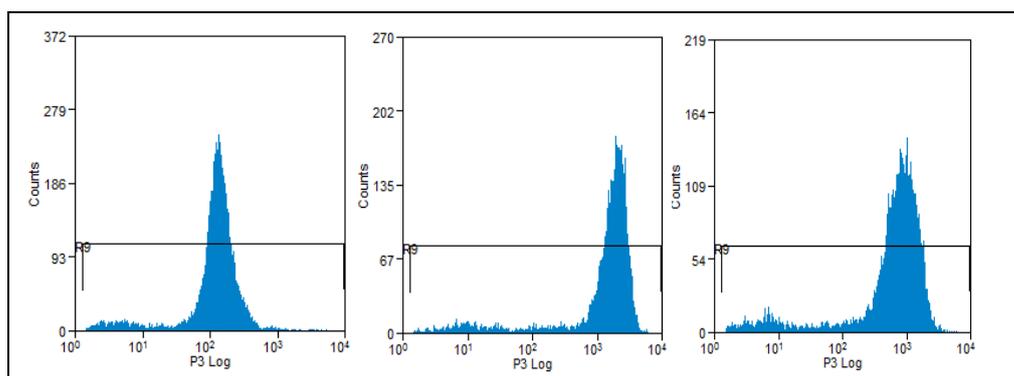


Figura 3.5. Secuencia de histogramas monoparamétricos de la intensidad de fluorescencia verde de la 2',7'-diclorofluoresceína (escala logarítmica). En los histogramas se aplican las regiones R6 y R3 (*gating*) para que del total de leucocitos solo fueran considerados los neutrófilos viables. De izquierda a derecha se puede ver en primer lugar un control de actividad basal, después vemos el desplazamiento a la derecha que provoca la estimulación con PMA y por último el efecto reductor de la fluorescencia (desplazamiento a la izquierda) que provoca el tratamiento con una muestra antioxidante en células estimuladas con PMA.

3.2.2.16 Células estudiadas

El mínimo de células estudiadas ha sido 50000, con un mínimo de 20000 neutrófilos en la suspensión de leucocitos. Todas las medidas se han realizado sobre la población viable (negativa frente al yoduro de propidio).

3.2.2.17 Análisis de los datos

La inhibición (%) de la producción de ROS causada por cada tratamiento se calcula en función de la disminución de la fluorescencia de las muestras tratadas respecto a los controles estimulados. La inhibición (%) de la producción de ROS fue calculada de la siguiente forma:

$$I(\%) = 100 - [(F_t - F_0) / (F_e - F_0)] \times 100$$

Donde:

I : inhibición (%)

F_t: valor de fluorescencia del tratamiento

F₀: valor de fluorescencia del control del nivel base

F_e: valor de fluorescencia del control estimulado

3.2.2.18 Procesamiento de los resultados y estadística

Los análisis citométricos han sido grabados como archivos (listmodes) para posteriormente ser reprocesados en un ordenador mediante el software especializado Summit versión 4.2 para Windows. Los resultados fueron resumidos en tablas donde se recogió el efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial sobre la inhibición (%) de la producción de ROS. Los datos reflejaron las medias ± desviación estándar (DE) de cuatro experimentos independientes. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos y los controles se realizaron mediante un análisis de varianza (*one-way ANOVA*) seguido de una prueba de Dunnett (*Dunnett's test*). Como nivel de significación se tomó una $p < 0.05$. La concentración inhibitoria 50 % (IC₅₀) fue calculada cuando fue posible por interpolación en una curva dosis-respuesta construida mediante una regresión no lineal que seguía un modelo de curva sigmoidea. Esta curva se obtuvo de graficar la inhibición (%) de la producción de ROS, *versus* el logaritmo de la concentración del aceite esencial (µg/mL). Para la realización de los cálculos y el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad, Prism versión 5.0 para Windows (San Diego, CA, USA).

3.3 Resultados

La **Tabla 3.3** recoge los resultados del ensayo del DPPH. Puesto que las diluciones de las diferentes muestras se hicieron tomando volúmenes iguales, las concentraciones están expresadas en % (v/v). Las equivalencias entre estas concentraciones y su valor en µg/mL para el ensayo del DPPH están reunidas en la **Tabla 3.4**. Las **Tablas 3.5 y 3.6** registran los resultados de los ensayos de actividad sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA y H₂O₂ respectivamente. En la **Tabla 3.7** se resumen los efectos del carvacrol sobre la producción de ROS en neutrófilos sin estimulación. Finalmente, las equivalencias entre las concentraciones expresadas en % (v/v) y su valor en µg/mL para el ensayo de actividad sobre la producción de ROS están recogidas en la **Tabla 3.8**.

Tabla 3.3. Resultados de los ensayos *in vitro* de captación del radical libre del DPPH.

Conc. (%, v/v)	Inhibición del radical libre del DPPH (%)												
	Aceites esenciales, fracciones o constituyentes												
	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel	Limón	Limón (terpenos)
Control	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0 ± 0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
9,8 x 10 ⁻⁵	4,7±2,6 *	2,8±1,0	2,2±0,1	2,3±0,7	3,9±4,6	0,8±5,1	5,7 ± 2,0	2,5±1,4	3,6±1,6 *	2,6±0,2	2,7±2,1	-0,4±4,2	0,8±2,2
2,0 x 10 ⁻⁴	2,9±1,7	3,6±1,6	2,8±1,4	3,1±1,4	10,9±4,2 *	-3,1±2,9	11,1 ± 2,3 *	1,6±1,4	1,3±1,2	0,8±0,5	4,6±2,1	0,1±3,6	1,4±1,9
3,9 x 10 ⁻⁴	2,3±1,6	3,5 ±0,8	3,0±0,7	4,8±2,7	19,1±6,2 *	-3,1±2,8	19,5 ± 3,2 *	4,4±2,2	2,4±2,5	1,3±0,9	4,0±2,1	0,6±2,8	0,2±1,0
7,8 x 10 ⁻⁴	1,2± 2,5	3,9±2,3 *	2,6±1,1	2,9±1,5	31,5±6,3 *	0,3±2,7	34,9 ± 5,5 *	2,1±1,1	2,1±1,2	1,7±1,7	3,8±2,5	1,2±3,9	2,0±1,7
1,6 x 10 ⁻³	2,2±1,1	2,7±2,3	3,5±1,7 *	4,0±2,7	53,4±8,9 *	-1,0±3,6	56,2 ± 8,3 *	3,7±2,3	2,7±1,4 *	1,2±2,0	4,1±3,4	2,5±2,4	2,7±1,8 *
3,1 x 10 ⁻³	3,8±2,4 *	4,3±2,2 *	3,0±1,9 *	5,2±3,9 *	72,7±5,2 *	1,4±3,2	75,8 ± 7,7 *	4,3±3,0 *	2,1±1,4	1,3±0,8	2,7±2,9	2,8±3,8	2,5±1,7
6,3 x 10 ⁻³	2,1±3,2	5,4±2,7 *	3,8±2,6 *	5,4±4,0 *	88,2±3,0 *	5,9±5,1 *	89,3 ± 3,1 *	5,3±3,8 *	3,3±1,6 *	3,5±3,2	5,7±2,8 *	5,0±7,2 *	2,0±1,2
1,3 x 10 ⁻²	3,8±0,7	2,3±1,3	3,3±1,0 *	5,2±3,6	94,2±0,6 *	4,8±3,7	n/a	3,2±0,9	5,9±2,2 *	2,4±1,5	3,9±3,4	5,0±3,0	3,2±0,9 *
2,5 x 10 ⁻²	4,0±1,2	4,4±2,0	4,5±1,5 *	5,7±1,5 *	n/a	9,9±1,6 *	n/a	3,8±1,5	8,0±1,3 *	3,0±1,9	8,1±2,9 *	5,0±1,0	3,5±1,7 *
5,0 x 10 ⁻²	8,6±1,2 *	9,5±5,2 *	4,9±1,5 *	10,7±1,9 *	n/a	15,9±1,9 *	n/a	5,3±3,5 *	10,5±0,2 *	9,1±9,5 *	14,1±3,1 *	5,2±1,6	4,5±1,3 *
IC₅₀ (µg/mL)	---	---	---	---	13,2±2,9	---	11,7±0,7	---	---	---	---	---	---

*Diferencias significativas (p<0.05). n/a Valor no disponible.

Tabla 3.3. Continuación.

Inhibición del radical libre del DPPH (%)												
Conc.	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										Control (+)	
%, v/v	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol			
Control	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0 ± 0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	µg/mL	Quercetina	
9,8 x 10 ⁻⁵	1,0±2,5	2,0±2,9	2,2±1,4	4,1±7,3	3,4±3,0	1,7 ± 1,9	2,5±0,2	2,5±2,3	3,0±4,3	Control	0,0±0,0	
2,0 x 10 ⁻⁴	0,8±2,6	1,5±1,6	2,2±1,4	2,4±7,5	2,8±3,9	2,7 ± 2,6	0,0±1,4	2,3±1,5	2,4±3,6	1,10	7,0 ± 5,6 *	
3,9 x 10 ⁻⁴	0,8±1,2	0,7±2,2	0,7±1,6	3,4±8,7	3,5±3,7	3,8 ± 3,3	1,8±1,1	2,9±1,6	5,4±3,9 *	2,10	12,8 ± 7,0 *	
7,8 x 10 ⁻⁴	1,0±2,3	2,9±1,1	0,7±1,5	5,0±7,0	5,6±4,7 *	2,5 ± 2,4	0,9±1,4	6,5±3,2 *	7,2±3,4 *	4,30	22,7 ± 11,5 *	
1,6 x 10 ⁻³	1,5±2,2	1,8±1,4	1,8±1,9	7,4±9,4 *	10,1±5,4 *	2,1 ± 2,2	1,4±1,7	9,4±4,3 *	10,7±3,2 *	8,60	42,0 ± 18,9 *	
3,1 x 10 ⁻³	2,2±1,5	3,8±1,7 *	2,5±2,8 *	12,6±6,0 *	15,0±2,8 *	2,9 ± 3,5	1,3±2,0	14,9±6,1 *	17,4±4,1 *	17,10	65,3 ± 20,1 *	
6,3 x 10 ⁻³	4,6±4,2 *	6,5±2,8 *	3,3±2,3 *	18,8±6,9 *	22,8±4,1 *	3,3 ± 2,7	1,3±2,6	16,9±3,4 *	25,8±5,2 *	34,20	87,2 ± 9,1 *	
1,3 x 10 ⁻²	6,0±1,6 *	6,7±0,6 *	4,4±1,4 *	17,6±8,8 *	31,1±3,9 *	4,1 ± 4,2	2,8±1,1	27,5±5,7 *	25,2±2,3 *	68,40	94,1 ± 1,8 *	
2,5 x 10 ⁻²	6,2±0,5 *	13,6±3,0 *	6,1±2,5 *	29,4±7,7 *	43,7±2,4 *	5,6 ± 4,9	1,4±0,9	31,4±1,0 *	39,0±4,3 *	136,80	---	
5,0 x 10 ⁻²	7,6±0,8 *	18,2±3,3 *	5,2±2,1 *	44,0±4,3 *	54,2±1,7 *	5,3 ± 3,3	1,7±1,5	42,3±2,6 *	53,0±4,2 *	273,60	---	
IC ₅₀ (µg/mL)	---	---	---	---	500,7±35,4	---	---	---	448,0±33,6	IC ₅₀ µg/mL	10,5±4,6	

* Diferencias significativas ($p < 0.05$). n/a Valor no disponible.

Tabla 3.4. Equivalencias entre concentraciones expresadas en % (v/v) y concentraciones expresadas µg/mL en el ensayo del DPPH.

Equivalencias entre concentraciones en % (v/v) y µg/mL para las sustancias ensayadas frente radical libre estable del DPPH											
% v/v	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
9,8 x 10 ⁻⁵	0,9	1,0	0,9	0,9	1,1	0,9	1,1	0,8	0,9	0,9	0,9
2,0 x 10 ⁻⁴	1,7	2,0	1,8	1,7	2,2	1,8	2,1	1,6	1,9	1,7	1,7
3,9 x 10 ⁻⁴	3,5	3,9	3,5	3,4	4,3	3,6	4,2	3,3	3,8	3,4	3,5
7,8 x 10 ⁻⁴	7,0	7,9	7,1	6,8	8,6	7,3	8,4	6,5	7,5	6,9	7,0
1,6 x 10 ⁻³	14,0	15,8	14,1	13,6	17,3	14,6	16,8	13,1	15,1	13,8	14,0
3,1 x 10 ⁻³	27,9	31,6	28,2	27,3	34,6	29,1	33,6	26,1	30,2	27,5	28,0
6,3 x 10 ⁻³	55,9	63,2	56,4	54,6	69,2	58,2	67,2	52,2	60,4	55,0	56,0
1,3 x 10 ⁻²	111,7	126,3	112,8	109,1	138,3	116,5	134,5	104,4	120,7	110,0	112,0
2,5 x 10 ⁻²	223,4	252,7	225,6	218,3	276,6	232,9	268,9	208,8	241,5	220,1	223,9
5,0 x 10 ⁻²	446,9	505,3	451,2	436,6	553,3	465,9	537,9	417,6	483,0	440,1	447,8

% v/v	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
9,8 x 10 ⁻⁵	0,8	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9	1,1	0,8	0,9	1,0	1,3
2,0 x 10 ⁻⁴	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8	2,2	1,7	1,8	2,0	2,7
3,9 x 10 ⁻⁴	3,3	3,3	3,5	3,4	3,4	3,7	4,4	3,4	3,5	3,9	5,3
7,8 x 10 ⁻⁴	6,7	6,6	6,9	6,8	6,9	7,4	8,8	6,8	7,0	7,8	10,6
1,6 x 10 ⁻³	13,3	13,2	13,9	13,5	13,7	14,8	17,6	13,5	14,0	15,7	21,2
3,1 x 10 ⁻³	26,6	26,5	27,8	27,0	27,4	29,6	35,2	27,1	28,1	31,3	42,4
6,3 x 10 ⁻³	53,2	53,0	55,5	54,0	54,8	59,2	70,3	54,1	56,2	62,7	84,9
1,3 x 10 ⁻²	106,4	106,0	111,0	108,0	109,7	118,4	140,6	108,3	112,4	125,3	169,8
2,5 x 10 ⁻²	212,8	212,0	222,1	216,1	219,3	236,7	281,3	216,6	224,7	250,7	339,6
5,0 x 10 ⁻²	425,7	424,0	444,2	432,2	438,6	473,4	562,6	433,2	449,5	501,3	679,1

Tabla 3.5. Resultados de los ensayos de actividad sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA.

Inhibición de la producción de ROS (%) en ensayos realizados con neutrófilos humanos estimulados con PMA													
Conc.	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes												
%, (v/v)	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel	Limón	Limón (terpenos)
Control (+)	77,9±14,1 *	66,4±12,3 *	62,8±8,3 *	68,3±11,6 *	64,5±3,0 *	67,5±8,8 *	76,3±1,0 *	75,8±11,1 *	68,5±12,7 *	78,0±10,1 *	67,9±8,5 *	73,0±16,0 *	59,8±1,6 *
Control (-)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
7,80 x 10 ⁻⁷	5,1±9,2	10,0±7,1	12,5±8,4 *	16,8±2,3 *	21,2±7,6 *	5,2±0,4	6,1±2,8	18,1±4,6 *	15,1±3,4 *	19,6±5,1 *	9,0±1,5 *	10,6±6,8 *	3,2±4,0
7,80 x 10 ⁻⁶	11,8±8,6	17,9±4,7 *	10,9±6,1 *	15,7±4,9 *	25,6±6,6 *	5,0±4,1	20,7±9,8 *	16,7±5,9 *	13,0±5,0 *	18,7±4,3 *	8,6±1,1 *	11,6±8,1 *	3,0±2,8
7,80 x 10 ⁻⁵	4,2±6,0	18,8±4,0 *	16,7±4,7 *	13,2±3,7 *	35,0±5,6 *	4,0±0,1	51,4±2,7 *	18,1±8,8 *	11,5±6,7 *	24,8±13,9 *	11,5±1,8 *	4,8±6,7	6,3±4,9
1,60 x 10 ⁻⁴	11,5±10,8	17,5±3,9 *	15,6±4,7 *	15,0±4,0 *	37,2±7,1 *	8,4±4,4 *	59,7±9,7 *	16,9±8,3 *	12,7±3,4 *	24,0±4,0 *	13,4±2,7 *	4,5±0,7	1,6±2,3
3,10 x 10 ⁻⁴	8,7±3,6	20,9±3,2 *	15,1±4,3 *	20,0±6,2 *	45,8±8,4 *	2,9±2,9	72,1±13,2 *	22,3±11,5 *	13,7±7,8 *	33,5±8,8 *	17,1±2,2 *	8,8±11,4	4,3±5,0
6,30 x 10 ⁻⁴	5,8±3,3	18,2±3,0 *	17,2±9,3 *	19,5±4,8 *	64,2±17,0 *	7,8±6,0	87,1±4,2 *	18,5±5,9 *	17,9±2,1 *	42,9±5,4 *	22,3±2,7 *	19,9±0,7 *	7,3±5,5
1,30 x 10 ⁻³	15,5±3,0 *	28,8±4,3 *	17,5±8,1 *	25,8±6,9 *	74,6±18,9 *	10,4±10,5	85,5±19,3 *	24,4±7,4 *	23,5±1,0 *	59,1±10,5 *	31,2±2,1 *	21,8±2,4 *	4,7±3,2
2,50 x 10 ⁻³	19,2±0,7 *	45,5±6,8 *	26,4±6,3 *	25,7±6,5 *	82,4±19,4 *	16,2±7,0 *	90,8±14,1 *	28,6±7,1 *	24,0±6,0 *	62,1±11,7 *	37,7±3,9 *	27,7±12,4 *	15,2±7,8 *
5,00 x 10 ⁻³	20,7±1,3 *	65,3±10,6 *	37,8±6,6 *	37,4±6,6 *	93,8±13,7 *	22,4±5,6 *	97,8±6,6 *	36,3±13,1 *	37,5±5,3 *	73,7±8,0 *	53,5±5,7 *	30,5±23,5 *	21,6±14,7 *
7,50 x 10 ⁻³	n/a	n/a	46,1±0,4 *	46,4±1,2 *	n/a	21,3±2,7 *	n/a	n/a	44,6±0,7 *	n/a	n/a	n/a	n/a
1,00 x 10 ⁻²	n/a	n/a	49,1±1,3 *	55,6±2,6 *	n/a	22,3±1,0 *	n/a	n/a	48,7±0,8 *	n/a	n/a	n/a	n/a
1,25 x 10 ⁻²	n/a	n/a	57,5±1,4 *	77,8±2,2 *	n/a	25,0±1,8 *	n/a	n/a	51,2±2,0 *	n/a	n/a	n/a	n/a
1,50 x 10 ⁻²	n/a	n/a	60,6±1,3 *	79,3±2,7 *	n/a	21,7±1,1 *	n/a	n/a	52,0±1,6 *	n/a	n/a	n/a	n/a
IC ₅₀ µg/mL	---	35,8±6,4	88,2±3,7	72,6±2,7	7,5±1,6	---	1,6±0,3	---	109,4±3,2	8,5±2,9	39,7±2,5	---	---

* Diferencias significativas ($p < 0.05$). n/a Valor no disponible.

Tabla 3.5. Continuación.

Inhibición de la producción de ROS (%) en ensayos realizados con neutrófilos humanos estimulados con PMA												
Conc.	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										Control (+)	
%, (v/v)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol			
Control (+)	69,2±12,3 *	63,8±4,4 *	61,3±12,5 *	75,2±10,1 *	61,1±21,6 *	70,1±12,3 *	63,0±24,2 *	51,1±8,5 *	68,3±4,8 *			
Control (-)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	µg/mL	Vitamina C	Quercetina
7,80 x 10 ⁻⁷	7,4±5,0	6,2±1,4 *	11,2±3,7 *	3,8±3,1	8,2±6,7	8,3±2,0	1,5±2,4	13,4±6,5 *	10,9±1,1 *	0,00	0,0±0,0	0,0±0,0
7,80 x 10 ⁻⁶	7,2±6,2	6,9±2,1 *	8,3±0,3	8,6±7,3	9,4±3,2	8,9±1,2	5,8±4,9	13,8±8,4 *	10,4±1,5 *	0,01	13,2±6,5 *	19,1±4,2 *
7,80 x 10 ⁻⁵	8,9±0,5 *	10,2±1,6 *	14,0±3,5 *	8,8±10,3	10,7±1,7 *	9,8±0,6	7,3±4,5	21,3±8,4 *	16,3±1,5 *	0,08	17,1±2,2 *	23,3±8,0 *
1,60 x 10 ⁻⁴	12,7±5,1 *	18,1±3,5 *	12,2±11,2	12,0±2,3 *	9,3±2,4	16,9±7,4 *	7,8±0,7	22,8±10,0 *	20,9±1,4 *	0,78	11,3±10,9	25,8±6,9 *
3,10 x 10 ⁻⁴	16,8±11,9 *	26,3±0,8 *	17,2±4,8 *	13,6±7,9 *	12,1±2,6 *	23,5±4,1 *	8,2±2,1	28,3±5,6 *	25,9±2,9 *	1,56	8,8±7,1	33,7±14,9 *
6,30 x 10 ⁻⁴	13,0±4,4 *	36,9±2,4 *	5,1±5,0	6,1±4,2	16,4±8,4 *	29,2±5,6 *	7,9±5,0	25,0±12,3 *	33,5±3,9 *	3,13	9,3±4,6	30,5±9,5 *
1,30 x 10 ⁻³	17,5±5,9 *	42,1±1,4 *	17,9±8,0 *	12,3±7,6 *	22,3±11,8 *	39,9±5,6 *	12,6±9,0 *	38,7±13,9 *	35,4±4,9 *	6,25	17,3±13,7 *	46,9±9,5 *
2,50 x 10 ⁻³	25,2±6,0 *	55,4±1,8 *	26,8±4,9 *	24,6±10,1 *	27,1±9,6 *	62,0±15,3 *	23,3±13,4 *	49,3±16,2 *	51,5±4,9 *	12,50	10,2±11,7	62,9±5,7 *
5,00 x 10 ⁻³	34,7±5,0 *	66,2±2,4 *	27,6±9,4 *	52,9±15,2 *	34,1±11,6 *	69,7±10,2 *	35,0±9,0 *	65,8±12,5 *	63,6±10,5 *	25,00	6,4±6,5	81,2±4,9 *
7,50 x 10 ⁻³	46,3±0,8 *	n/a	n/a	63,9±6,4 *	46,4±1,4 *	n/a	39,2±0,3 *	n/a	n/a	50,00	11,4±9,3	102,1±5,4 *
1,00 x 10 ⁻²	52,2±1,0 *	n/a	n/a	72,5±4,5 *	56,6±1,7 *	n/a	43,8±1,6 *	n/a	n/a	75,00	n/a	n/a
1,25 x 10 ⁻²	53,7±0,3 *	n/a	n/a	80,2±6,4 *	63,8±2,1 *	n/a	51,2±1,1 *	n/a	n/a	100,00	n/a	n/a
1,50 x 10 ⁻²	53,2±0,8 *	n/a	n/a	81,8±7,8 *	64,3±2,1 *	n/a	51,9±1,3 *	n/a	n/a	125,00	n/a	n/a
IC₅₀ µg/mL	98,7±3,3	14,6±2,2	---	49,1±3,8	88,7±4,0	16,4±2,7	125,3±3,7	23,1±5,0	24,5±2,6	IC₅₀ µg/mL	---	7,6±2,6

* Diferencias significativas (p<0.05). n/a Valor no disponible.

Tabla 3.6. Resultados de los ensayos de actividad sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con H₂O₂.

Inhibición de la producción de ROS (%) en ensayos realizados con neutrófilos humanos estimulados con H ₂ O ₂													
Conc.	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes												
%, (v/v)	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel	Limón	Limón (terpenos)
Control (+)	51,3±0,7*	68,0±5,4*	67,8±2,1	64,9±3,5*	68,2±13,9*	63,0±5,7*	69,1±7,5*	52,1±1,6*	65,3±4,9*	70,9±10,4*	68,6±2,7*	51,2± 3,6*	64,8±6,3*
Control (-)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
7,80 x 10 ⁻⁷	5,0±4,7	4,5±3,4	6,9±5,2	6,5±5,3	14,9±7,2*	5,8±4,4	8,2±5,1	4,1±3,5	3,5±3,2	11,3±9,4	4,3±3,9	2,6±2,0	7,0±6,2
7,80 x 10 ⁻⁶	2,5±3,0	3,9±6,1	3,1±2,8	7,3±5,9	18,4±5,9*	7,9±6,8	13,1±4,4*	6,0±4,8	3,7±3,4	17,3±3,6*	4,4± 4,1	2,3± 5,5	9,3±8,8
7,80 x 10 ⁻⁵	4,4±3,8	6,4±5,9	2,5±3,1	3,4±4,1	23,2±7,3*	4,7±3,9	39,3±17,6*	4,0±4,3	1,7±2,3	13,6±9,1*	12,2±11,7	9,7± 8,3	8,9±5,7
1,60 x 10 ⁻⁴	6,6±5,2	7,4±6,6	4,2±3,7	9,1±8,2	24,5±5,9*	4,1±4,0	46,7±23,0*	5,8±4,9	2,6±2,1	28,4±7,8*	3,1±1,2	1,4±3,2	9,1±9,7
3,10 x 10 ⁻⁴	9,8±7,6	11,7±9,4	7,4±6,5	5,5±4,8	19,6±6,0*	5,2±5,6	46,9±28,8*	1,9±3,3	7,3±5,5	18,5±12,0*	12,4±10,9	3,5±3,8	4,7±2,6
6,30 x 10 ⁻⁴	4,6±5,1	11,1±10,8	3,1±3,0	2,0±4,6	21,8±1,3*	3,4±2,7	54,4±24,6*	3,2±3,5	5,7±5,3	25,6±0,5*	11,1±10,5	11,0±9,7	6,6±4,1
1,30 x 10 ⁻³	8,3±7,4	12,1±10,3	9,5±7,7	4,9±4,0	43,9±16,2*	3,9±3,1	54,8±17,8*	3,4±2,7	6,5±5,9	21,9±2,7*	11,8±11,0	6,6±5,4	8,1±9,0
2,50 x 10 ⁻³	3,1±2,9	7,3±7,1	7,9±7,3	6,1±5,4	55,0±13,2*	16,4±5,8*	60,9±17,3*	2,0±2,2	5,4±5,5	11,9±5,8*	8,3±7,9	8,3±9,1	6,5±3,7
5,00 x 10 ⁻³	4,1±3,0	20,5±5,5*	7,6±5,1	16,2±12,7*	64,3±5,6*	20,8±11,4*	75,8±12,4*	-1,6±2,3	-2,4±3,6	18,8±1,4*	6,1±4,3	8,8± 5,7	9,5±5,8
IC ₅₀ µg/mL	---	---	---	---	22,6±4,0	---	27,1±5,8	---	---	---	---	---	---

* Diferencias significativas (p<0.05). n/a Valor no disponible. ^a Los valores para el orégano español y el carvacrol corresponden a la concentración estimuladora 50% (EC₅₀, µg/mL).

Tabla 3.6. Continuación.

Inhibición de la producción de ROS (%) en ensayos realizados con neutrófilos humanos estimulados con H ₂ O ₂												
Conc.	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes									Control (+)		
%, (v/v)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol	µg/mL	Vitamina C	Quercetina
Control (+)	65,1±1,7 *	61,3±5,7 *	66,7±3,9 *	63,1±5,7 *	62,7±4,3 *	69,7±4,7 *	62,2±3,5 *	75,5±3,6 *	69,4±4,5 *	0,00	0,0±0,0	0,0±0,0
Control (-)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,01	0,0±0,0	0,0±0,0
7,80 x 10 ⁻⁷	1,9±0,6	6,2±5,4	3,6±4,5	6,5±2,4	12,2±5,3 *	16,1±2,9 *	4,0±5,1	6,0±6,0	17,9±5,7 *	0,01	18,3±2,9 *	12,4±9,5 *
7,80 x 10 ⁻⁶	5,3±3,8	15,9±6,1 *	6,6±4,3	9,3±3,9	5,2±8,4	9,7±4,8	5,9±2,6	4,9±3,7	11,3±4,9 *	0,08	16,3±2,5 *	16,5±8,8 *
7,80 x 10 ⁻⁵	8,1±7,5	25,0±5,1 *	9,6±7,8	14,6±4,0 *	8,8±9,4	13,6±3,0 *	7,3±8,8	12,7±5,7 *	21,2±11,6 *	0,78	19,3±6,8 *	26,6±5,9 *
1,60 x 10 ⁻⁴	8,4±4,6	18,5±12,3 *	2,6±3,3	7,9±7,1	10,6±9,2	18,8±10,1 *	6,3±2,7	14,7±1,5 *	21,3±10,2 *	1,56	15,4±2,5 *	29,0±5,8 *
3,10 x 10 ⁻⁴	4,3±5,7	20,3±8,4 *	8,0±5,7	0,6±10,8	-19,7±14,8 *	19,3±6,5 *	5,2±7,4	16,9±5,1 *	31,5±10,2 *	3,13	24,9±12,5 *	43,6±3,2 *
6,30 x 10 ⁻⁴	1,5±3,6	19,5±10,1 *	5,5±4,0	-53,1±13 *	-70,7±18,1 *	18,8±2,3 *	8,6±5,2	27,5±9,3 *	38,7±0,9 *	6,25	30,0±11,6 *	59,2±6,8 *
1,30 x 10 ⁻³	5,7±4,0	17,0±7,1 *	3,9±3,2	-97,5±21,0 *	-125,7±9,0 *	14,0±5,4 *	9,2±8,0	21,4±9,7 *	33,8±3,1 *	12,50	26,8±19,1 *	71,7±0,7 *
2,50 x 10 ⁻³	3,6±3,3	16,5±6,6 *	6,3± 4,9	-136,9±11,1 *	-132,4±8,9 *	18,5±8,3 *	12,6±10,1	21,8±12,3 *	35,8±2,1 *	25,00	26,9±10,1 *	82,3±2,3 *
5,00 x 10 ⁻³	13,8±9,2	16,1±8,4 *	10,8±6,7	-72,2±16,4 *	-71,2±5,1 *	32,6±15,5 *	11,2±7,8	26,9±6,0 *	40,7±3,7 *	50,00	26,6±5,4 *	88,5±2,9 *
IC₅₀ µg/mL	---	---	---	6,1±3,4 ^a	4,6±3,2 ^a	---	---	---	---	IC₅₀ µg/mL	---	4,3±2,0

* Diferencias significativas ($p < 0.05$). n/a Valor no disponible. ^a Los valores para el orégano español y el carvacrol corresponden a la concentración estimuladora 50% (EC₅₀, µg/mL).

Tabla 3.7. Efecto del carvacrol sobre la producción de ROS en neutrófilos humanos sin estimulación.

Inhibición de la producción de ROS (%)	
Concentración %, (v/v)	Inhibición
Control (+)	53,8±3,2*
Control (-)	0,0±0,0
7,80 x 10 ⁻⁷	9,3±12,7
7,80 x 10 ⁻⁶	-4,3±5,5
7,80 x 10 ⁻⁵	-3,0±5,2
1,60 x 10 ⁻⁴	-22,5±7,7*
3,10 x 10 ⁻⁴	-23,9±5,7*
6,30 x 10 ⁻⁴	-32,3±1,7*
1,30 x 10 ⁻³	-41,2±1,2*
2,50 x 10 ⁻³	-50,7±7,1*
5,00 x 10 ⁻³	-34,9±5,9*
IC₅₀ µg/mL	---

* Diferencias significativas ($p < 0.05$).

Capítulo 3. Actividad captadora de radicales libres y sobre la producción de ROS

Tabla 3.8. Equivalencias entre concentraciones en % (v/v) y concentraciones en µg/mL para los ensayos de inhibición de ROS.

Equivalencias entre concentraciones en % (v/v) y µg/mL para los ensayos de inhibición de la producción de ROS											
% v/v	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
$7,80 \times 10^{-7}$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$7,80 \times 10^{-6}$	0,08	0,09	0,07	0,07	0,08	0,07	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07
$7,80 \times 10^{-5}$	0,75	0,87	0,73	0,71	0,79	0,71	0,90	0,70	0,73	0,73	0,72
$1,60 \times 10^{-4}$	1,50	1,75	1,46	1,42	1,58	1,42	1,80	1,40	1,46	1,47	1,43
$3,10 \times 10^{-4}$	3,00	3,49	2,92	2,85	3,15	2,83	3,60	2,80	2,93	2,94	2,86
$6,30 \times 10^{-4}$	6,00	6,99	5,84	5,69	6,30	5,67	7,20	5,60	5,85	5,88	5,72
$1,30 \times 10^{-3}$	12,00	13,98	11,69	11,39	12,60	11,34	14,40	11,20	11,70	11,75	11,44
$2,50 \times 10^{-3}$	24,00	27,95	23,38	22,78	25,20	22,68	28,80	22,40	23,40	23,50	22,88
$5,00 \times 10^{-3}$	48,00	55,90	46,75	45,55	50,40	45,35	57,60	44,80	46,80	47,00	45,75
$7,50 \times 10^{-3}$	72,00	83,85	70,13	68,33	75,60	68,03	86,40	67,20	70,20	70,50	68,63
$1,00 \times 10^{-2}$	96,00	111,80	93,50	91,10	100,80	90,70	115,20	89,60	93,60	94,00	91,50
$1,25 \times 10^{-2}$	120,00	139,75	116,88	113,88	126,00	113,38	144,00	112,00	117,00	117,50	114,38
$1,50 \times 10^{-2}$	144,00	167,72	140,25	136,65	151,20	136,05	172,80	134,40	140,40	141,01	137,25
% v/v	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
$7,80 \times 10^{-7}$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$7,80 \times 10^{-6}$	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,09
$7,80 \times 10^{-5}$	0,70	0,68	0,73	0,72	0,69	0,77	0,81	0,75	0,76	0,74	0,87
$1,60 \times 10^{-4}$	1,41	1,36	1,46	1,45	1,37	1,54	1,63	1,49	1,51	1,47	1,74
$3,10 \times 10^{-4}$	2,82	2,72	2,92	2,90	2,74	3,07	3,25	2,98	3,03	2,95	3,49
$6,30 \times 10^{-4}$	5,63	5,44	5,84	5,79	5,48	6,14	6,51	5,97	6,05	5,89	6,98
$1,30 \times 10^{-3}$	11,26	10,88	11,68	11,59	10,96	12,29	13,01	11,94	12,10	11,79	13,95
$2,50 \times 10^{-3}$	22,53	21,75	23,35	23,18	21,93	24,58	26,03	23,88	24,20	23,58	27,90
$5,00 \times 10^{-3}$	45,05	43,50	46,70	46,35	43,85	49,15	52,05	47,75	48,40	47,15	55,80
$7,50 \times 10^{-3}$	69,08	65,25	70,05	69,53	65,78	73,73	78,08	71,63	72,60	70,73	83,70
$1,00 \times 10^{-2}$	92,10	87,00	93,40	92,70	87,70	98,30	104,10	95,50	96,80	94,30	111,60
$1,25 \times 10^{-2}$	115,13	108,75	116,75	115,88	109,63	122,88	130,13	119,38	121,00	117,88	139,50
$1,50 \times 10^{-2}$	138,16	130,51	140,10	139,05	131,55	147,45	156,15	143,26	145,20	141,45	167,40

3.4 Discusión

3.4.1 Actividad frente al radical DPPH

Los resultados de valoración de la actividad anti-radicalaria frente al DPPH se resumen en la **Tabla 3.3**. La actividad inhibitoria más intensa se obtuvo en el aceite esencial de clavo ($IC_{50} = 13,2 \mu\text{g/mL}$) y en el eugenol que es su principal constituyente (85,5% del total de la esencia de clavo, $IC_{50} = 11,7 \mu\text{g/mL}$). En ambos casos se alcanzaron valores de actividad similares a los de la quercetina ($IC_{50} = 10,5 \mu\text{g/mL}$), sustancia que fue empleada como control positivo. La fracción terpénica del aceite esencial de clavo resultó ser prácticamente inactiva. Este hecho apoya la hipótesis de que toda la actividad de captación de radicales libres de la esencia de clavo se debe al eugenol (**Figura 3.6**). El timol ($IC_{50} = 448,0 \mu\text{g/mL}$) y el carvacrol ($IC_{50} = 500,7 \mu\text{g/mL}$) mostraron una actividad débil en este ensayo (**Figura 3.7**). El aceite esencial de tomillo rojo que tiene como principal componente al timol (50,0% del total) y el aceite esencial de orégano Español, que a su vez tiene como constituyente mayoritario al carvacrol (72,7% del total) fueron también muy poco activos (**Figura 3.8**). En ninguno de los dos casos se pudo calcular la IC_{50} . En los aceites esenciales donde se encontró actividad hubo un comportamiento dosis-dependiente. Los resultados obtenidos para el eugenol, el carvacrol y el timol son similares a los obtenidos por Mastelicet *al.*, (2008).

El efecto antioxidante frente al radical libre estable del DPPH se estima que se debe a la capacidad que tiene un determinado compuesto o grupo de compuestos de donar hidrógenos. Esta actividad es más alta en los compuestos fenólicos como el eugenol, el timol o el carvacrol, aunque existen diferencias en la actividad anti-radical libre de estas sustancias (Brewer, 2011).

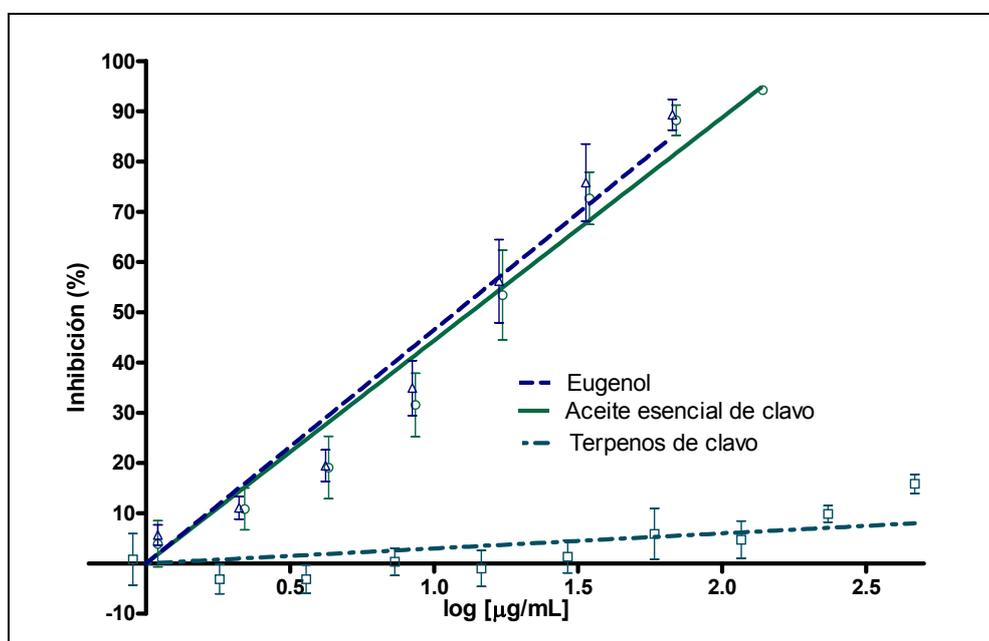


Figura 3.6. Inhibición (% , media \pm DE) del DPPH por el aceite esencial de clavo, el eugenol y la fracción terpénica del aceite esencial de clavo.

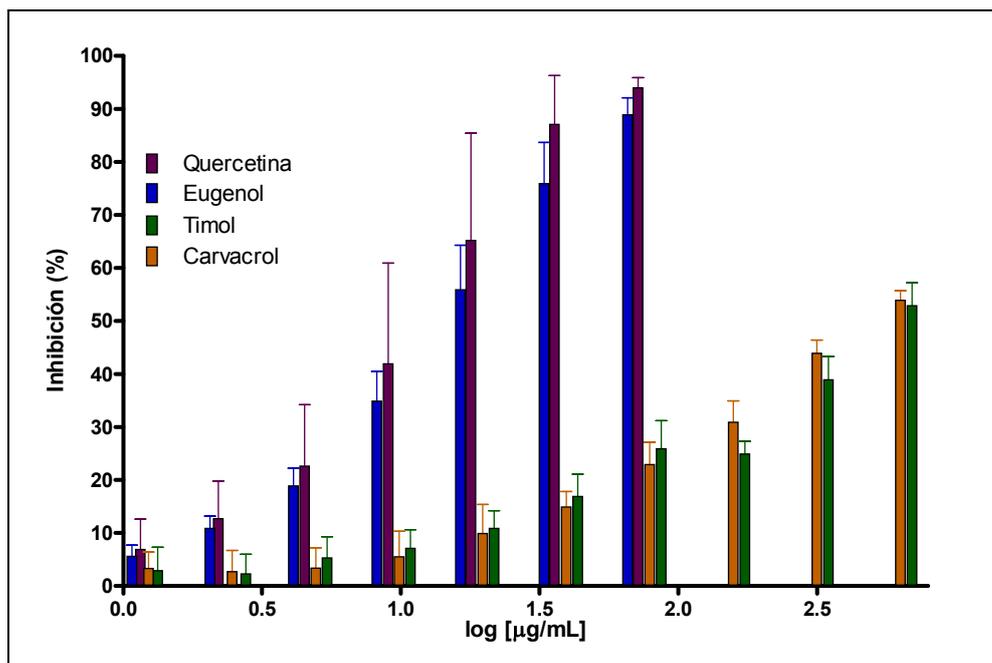


Figura 3.7. Inhibición (% , media \pm DE) del DPPH por el eugenol, el timol, el carvacrol y la quercetina.

Resulta lógico que la fracción terpénica del clavo, rica en β -cariofileno (83,0% del total) no manifestara actividad antioxidante frente al DPPH. Otros autores como Dar *et al.*, (2011) y Linet *et al.*, (2009) tampoco observaron actividad en el β -cariofileno frente al DPPH. El resto de las muestras se pueden considerar inactivas. Ciertos autores han llegado a estimar la IC_{50} de las muestras ensayadas, pero los valores publicados son extremadamente grandes o las metodologías empleadas difieren de las seguidas en nuestro caso. Amorati *et al.*, (2013) resaltan que los resultados del DPPH solo pueden ser comparados cuando se obtienen en condiciones idénticas.

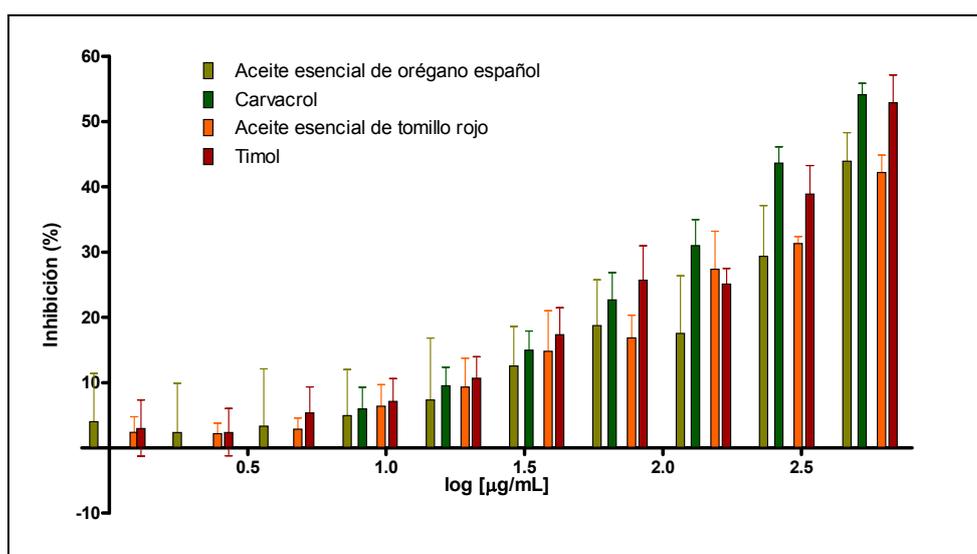


Figura 3.8. Inhibición (% , media \pm DE) del DPPH por el aceite esencial de orégano español, el aceite esencial de tomillo rojo, el carvacrol y el timol.

3.4.2 Actividad sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA

Los estudios de inhibición de la producción de ROS mediante la citometría de flujo aportan información novedosa que involucra otros mecanismos antioxidantes que difieren de la simple capacidad de captar radicales libres de una sustancia. La utilización de esta técnica para examinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales en células vivas es bastante escasa y la bibliografía publicada es limitada (**Tabla 3.2**).

En los ensayos de inhibición de la producción de ROS donde se empleaban neutrófilos estimulados con PMA el número de aceites esenciales activos fue mayor que en el ensayo de inhibición del DPPH (**Tabla 3.5**). Nuevamente el aceite esencial de clavo se encontraba entre los más activos ($IC_{50}=7.5 \mu\text{g/mL}$) aunque en esta ocasión también fueron muy activos los aceites esenciales de nuez moscada ($IC_{50}=14,6 \mu\text{g/mL}$), jengibre ($IC_{50}=8,5 \mu\text{g/mL}$) y palmarosa ($IC_{50}=16,4 \mu\text{g/mL}$). La actividad inhibitoria de estos aceites esenciales (**Figura 3.11**) fue similar a la del control positivo empleado, la quercetina ($IC_{50}=7,6 \mu\text{g/mL}$). La sustancia pura más activa de todas fue el eugenol ($IC_{50}=1,6 \mu\text{g/mL}$). El ensayo de los terpenos de clavo arrojó valores de inhibición muy bajos aunque fuesen estadísticamente significativos (**Figura 3.9**). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el eugenol es responsable de la actividad inhibitoria de ROS causada por el aceite esencial de clavo en los ensayos con neutrófilos estimulados con PMA (**Figura 3.9**).

Como se puede apreciar, el aceite esencial de jengibre fue el segundo más activo. La fracción terpénica del aceite esencial de nuez moscada tampoco puede explicar la alta actividad de su aceite esencial. Los valores de inhibición de la fracción terpénica fueron sustancialmente menores que los del aceite esencial a concentraciones similares (**Figura 3.10**).

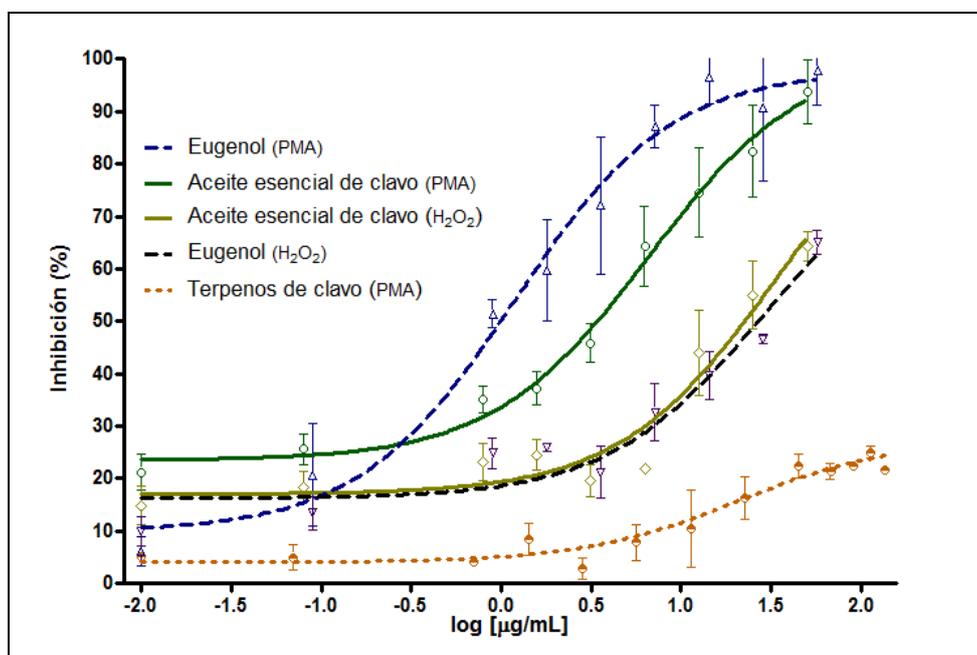


Figura 3.9. Inhibición (%; media \pm DE) de la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA y H₂O₂ por el aceite esencial de clavo, la fracción terpénica del aceite esencial de clavo y el eugenol.

Otros aceites esenciales también manifestaron actividad inhibitoria de la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA (IC_{50} entre 23 y 49 $\mu\text{g/mL}$) aunque no se asemejaran al control (+). Los aceites esenciales de laurel, tomillo rojo y orégano español también fueron muy activos. En el caso del tomillo rojo esta actividad se puede atribuir a su principal componente, el timol ($IC_{50} = 24,5 \mu\text{g/mL}$). Para el orégano español puede que influyan otros compuestos en su actividad pues el carvacrol ($IC_{50} = 88,7 \mu\text{g/mL}$) no alcanza a poseer la misma actividad que el aceite esencial del cual es el compuesto mayoritario. La mezcla de acetato de bornilo e isobornilo ($IC_{50} = 35,8 \mu\text{g/mL}$) también manifestó una actividad relativamente potente (Figura 3.10, 3.12).

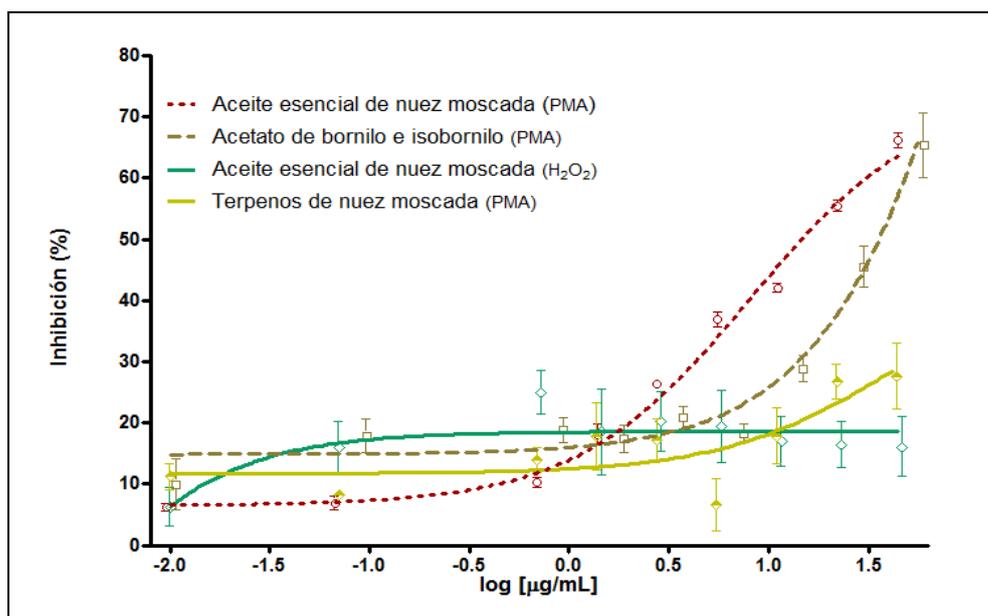


Figura 3.10. Inhibición (%; media \pm DE) de la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA y H₂O₂ por el aceite esencial de nuez moscada, la fracción terpénica de la nuez moscada y la mezcla de acetato de bornilo e isobornilo.

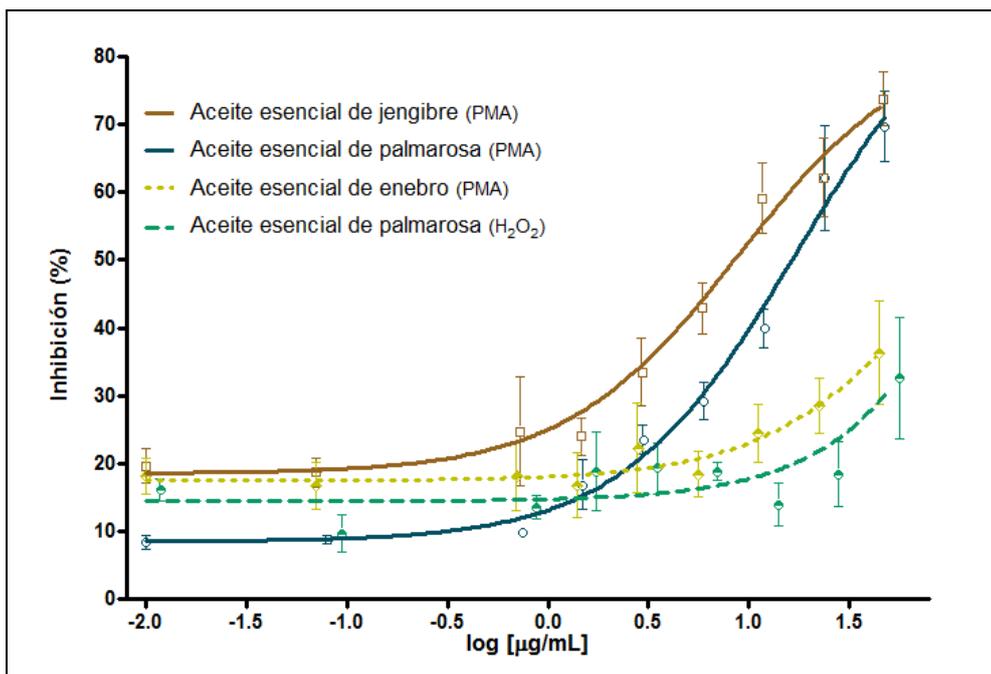


Figura 3.11. Inhibición (% , media \pm DE) de la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA y H_2O_2 por los aceites esenciales de jengibre, palmarosa y enebros.

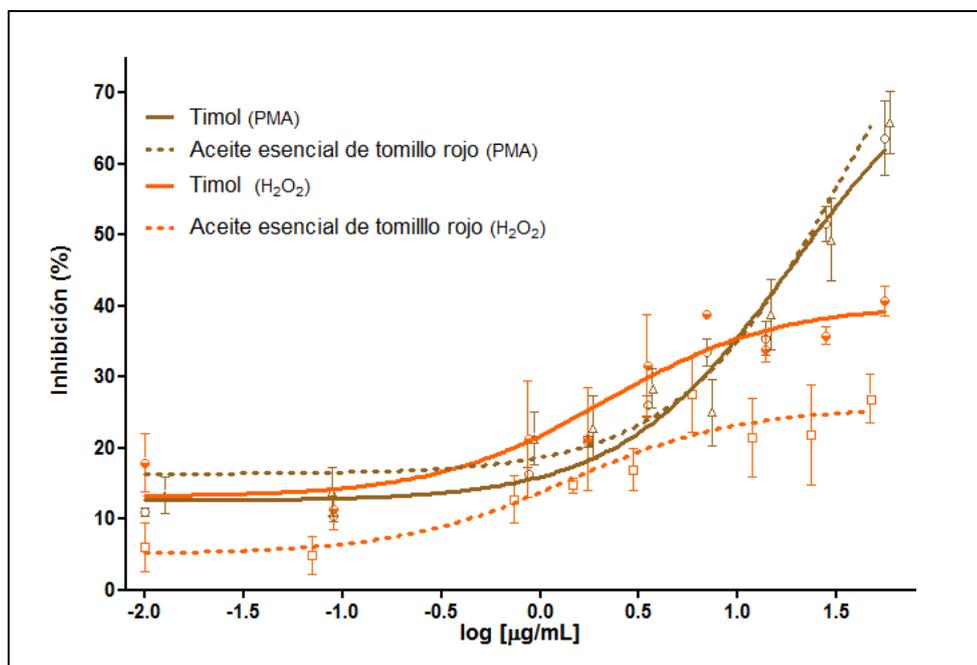


Figura 3.12. Inhibición (% , media \pm DE) de la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA y H_2O_2 por el aceite esencial de tomillo rojo y el timol.

En los aceites esenciales de niaulí, cayeputi, estragón, cilantro y romero la actividad de inhibición de la producción de ROS fue menor aunque pudo ser calculada la IC_{50} (IC_{50} entre 72 y 125 $\mu\text{g/mL}$). En los aceites esenciales del limón, árbol del té y enebros además de los terpenos de nuez moscada y clavo, la inhibición fue

estadísticamente significativa a la máxima concentración ensayada pero no se pudo calcular la IC₅₀ puesto que la inhibición no sobrepasó el 30% (**Figura 3.13, 3.14**).

La mayor parte de los aceites esenciales activos en este ensayo poseen mecanismos de acción que no están relacionados con la capacidad de captar radicales libres. El grueso de estos aceites esenciales fue activo en los ensayos de inhibición de la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA pero inactivos en el ensayo del DPPH. Es conocido que el PMA activa mediante una cascada de respuestas a la protein quinasa C, el factor nuclear-κB y un conjunto de otros genes y proteínas (Robinson *et al.*, 1985; Ogata *et al.*, 2000), mientras que en el ensayo del DPPH solo es posible detectar la capacidad de captar radicales libres. En consecuencia, la actividad inhibitoria de la producción de ROS por los aceites esenciales o sus componentes se encuentra relacionada con una o varias de las proteínas implicadas en la cascada de respuestas desencadenada por el PMA.

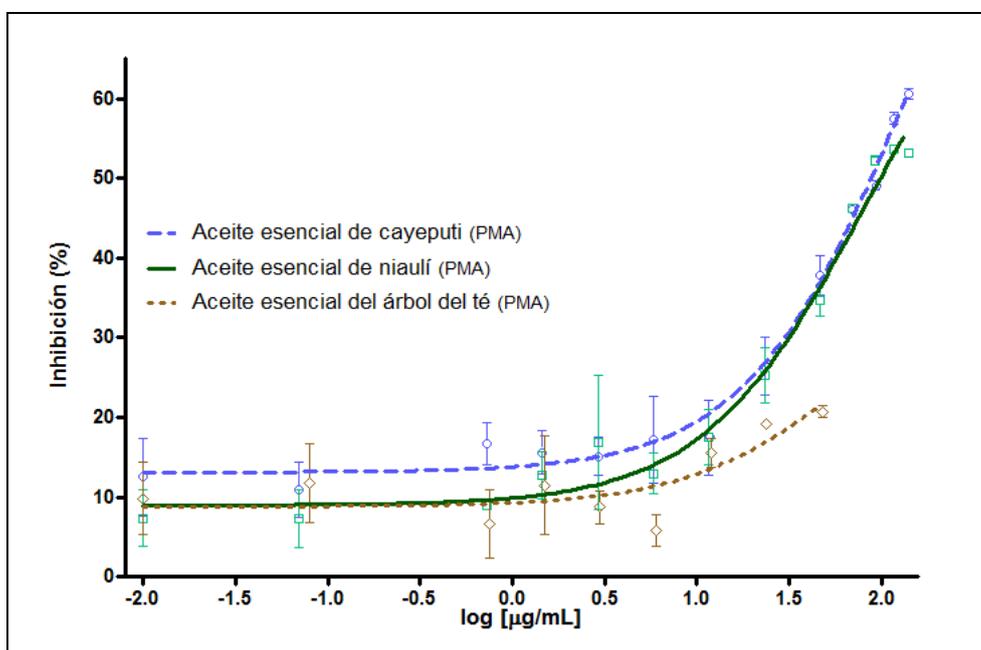


Figura 3.13. Inhibición (%; media \pm DE) de la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA por los aceites esenciales de cayeputi, niaulí y árbol del té.

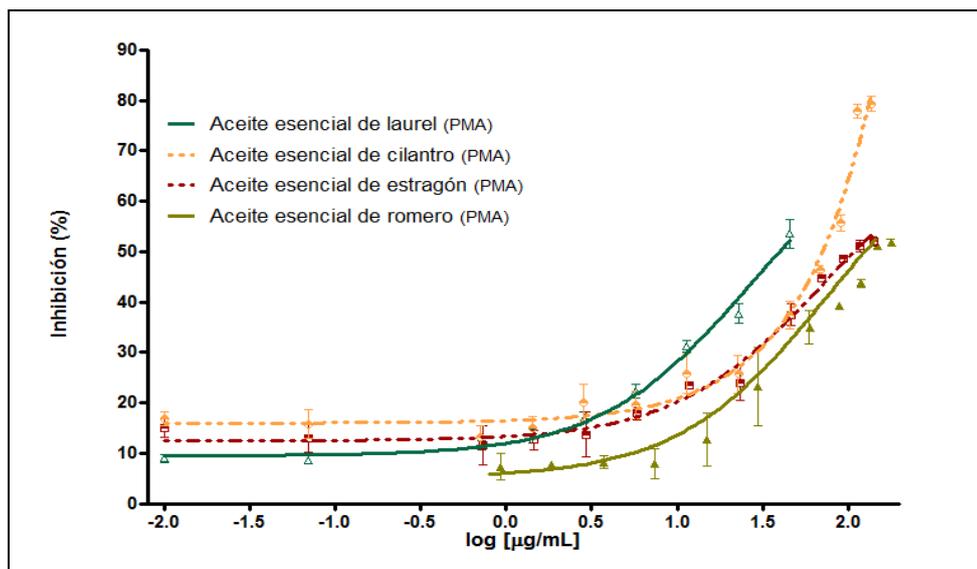


Figura 3.14. Inhibición (% media \pm DE) de la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA por los aceites esenciales de cilantro, estragón, laurel y romero.

3.4.3 Actividad sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con H_2O_2

Los resultados de los ensayos con neutrófilos estimulados con H_2O_2 se recogen en la **Tabla 3.6**. La mayor parte de las muestras manifestaron falta de actividad y ninguna igualó a la quercetina ($IC_{50} = 4,3 \mu g/mL$). Nuevamente, el aceite esencial de clavo ($IC_{50} = 22,6 \mu g/mL$) y el eugenol ($IC_{50} = 27,1 \mu g/mL$) fueron los más activos. El eugenol y el clavo mostraron un comportamiento casi paralelo en sus curvas de inhibición de ROS; esto confirma que la actividad del aceite esencial de clavo se debe casi en forma exclusiva al eugenol (**Figura 3.9**).

Los aceites esenciales de cilantro, palmarosa, tomillo rojo, los terpenos de clavo y el timol alcanzaron valores de actividad estadísticamente significativos a la mayor concentración ensayada pero no se pudo calcular la IC_{50} . La inhibición causada por los aceites esenciales activos en los ensayos con H_2O_2 siempre fue menor que la inhibición causada por esos mismos aceites esenciales en los ensayos con el PMA. Esto podría deberse a que la mayoría de las muestras ensayadas mostró poca capacidad de captar radicales libres. El H_2O_2 es un fuerte pro-oxidante, no solo a través de mecanismos biológicos y celulares sino por sí mismo, generando ROS de forma espontánea.

Mención especial merecen el aceite esencial de orégano español y el carvacrol que estimularon aún más la producción de ROS (aproximadamente un 70% de estimulación a concentraciones cercanas a los $50 \mu g/mL$) en el ensayo con H_2O_2 como estimulante (**Figura 3.15**). Anteriores reportes bibliográficos ya señalaban al carvacrol como capaz de aumentar la producción de ROS en fibroblastos de pulmón de hamster estimulados con H_2O_2 (Ündeğer *et al.*, 2009) y en glioblastomas humanos (Liang & Lu, 2012). Este efecto del carvacrol podría estar relacionado con un aumento de los niveles del Ca^{2+} libre en el citosol y la despolarización de la membrana mitocondrial por una disminución del potencial de membrana. El aumento de los niveles de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial generaría en consecuencia

incrementos en la producción de ROS (Liang & Lu, 2012; Bakkali *et al.*, 2008; Suntres *et al.*, 2015).

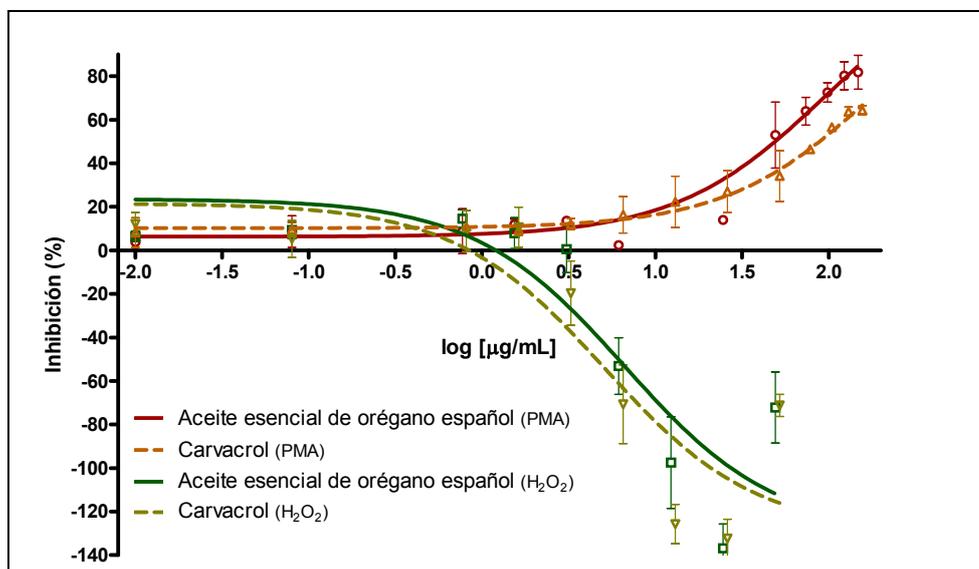


Figura 3.15. Inhibición (% , media \pm DE) de la producción de ROS en ensayos con neutrófilos estimulados con PMA y H₂O₂ por el aceite esencial de orégano español y el carvacrol.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que el carvacrol tiene efectos pro-oxidantes en ensayos de inhibición de ROS realizados con neutrófilos que no estaban estimulados (Tabla 3.9, Figura 3.16). Es posible que en el ensayo donde se utilizó H₂O₂ como estimulante apareciera un efecto sinérgico entre el carvacrol y el H₂O₂. Sin embargo, este comportamiento no apareció en el timol, isómero del carvacrol.

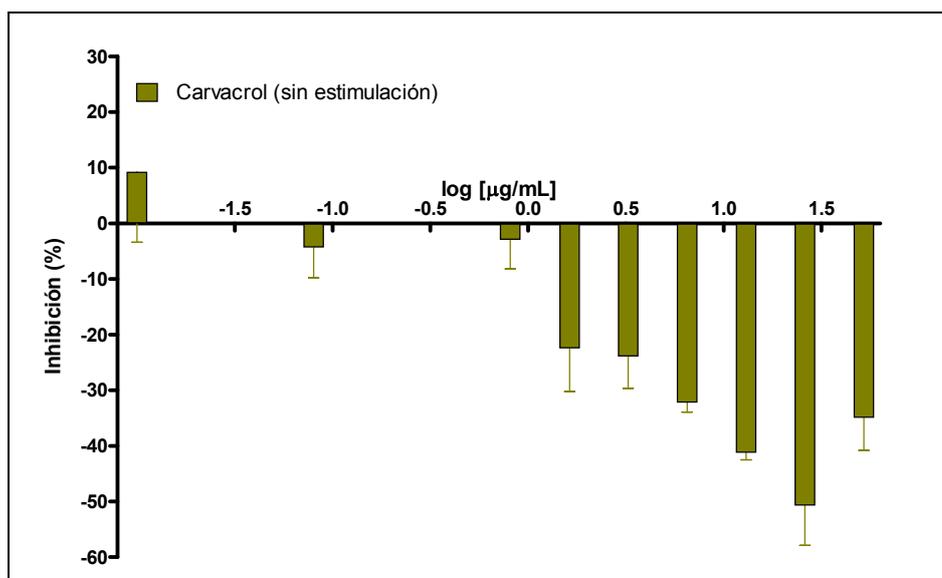


Figura 3.16. Inhibición (% , media \pm DE) de la producción de ROS en neutrófilos no estimulados por el carvacrol.

4

Actividad sobre la enzima mieloperoxidasa

4.1 Introducción

4.1.1 Generalidades

En 1941 Agner describió la purificación de una proteína intensamente verde que contenía hierro y que manifestaba actividad peroxidasa (Agner, 1941). Debido a su color verde la proteína fue inicialmente denominada verdoperoxidasa, pero estudios subsiguientes mostraron que la expresión de esta peroxidasa estaba restringida a las células de la línea mieloide y se cambió el nombre a mieloperoxidasa (MPO). Después de la descripción inicial de la MPO por Agner pasaron más de 30 años antes que el papel funcional de la enzima fuese elucidado. Klebanoff fue el primero en determinar que la MPO junto con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y un halogenuro constituían un sistema antimicrobiano muy potente y como tal, la MPO es un componente clave de la actividad microbicida dependiente de oxígeno en los fagocitos, en particular de los neutrófilos (Klebanoff, 1968; Klebanoff, 1970).

Durante mucho tiempo se ha considerado a la MPO como una enzima microbicida cuya función principal es generar especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la destrucción y muerte de los patógenos que han sido fagocitados. Evidencias más recientes han ampliado esta visión al demostrar que la MPO también está íntimamente involucrada en la homeostasis celular y es un factor importante en la iniciación y la progresión de varias enfermedades inflamatorias. En este contexto, la MPO y sus efectos han atraído considerable interés en los estudiosos de varias dolencias, destacándose sobretudo las enfermedades cardiovasculares (Van der Veen *et al.*, 2009).

La MPO es un miembro de la superfamilia de las enzimas peroxidasa de mamíferos con grupo prostético hemo. El gen de la MPO ha sido estudiado en otras especies y las comparaciones de secuencia demuestran que entre las diferentes especies hay una gran homología. Se puede afirmar en consecuencia, que el gen se ha conservado mucho durante la evolución (Van Tuinen *et al.*, 1987). La expresión del ARN mensajero de la MPO está limitada a la línea mieloides (aparece en neutrófilos, monocitos y algunas poblaciones de macrófagos). La MPO es almacenada en los gránulos azurófilos de los leucocitos y en las células mieloides completamente diferenciadas la síntesis de la MPO cesa. La principal fuente celular de la MPO son los neutrófilos y en los seres humanos los niveles de MPO en estas células van desde el 2 al 5% de la proteína total celular (Klebanoff, 2005). Dependiendo del medio ambiente local, el sistema de la MPO-H₂O₂ es capaz de generar una amplia variedad de especies oxidantes, incluyendo el ácido hipocloroso (HOCl), cloraminas, radicales hidroxilos (HO[•]), oxígeno de singlete (¹O₂) y el ozono (O₃). La generación de especies reactivas de cloro es una actividad específica de la MPO. Las actividades antimicrobianas que poseen estos productos le otorgan una "razón de ser" a la MPO en la respuesta inmune innata.

El ácido hipocloroso (HOCl) es el producto de la oxidación del cloruro por el H₂O₂. A pH fisiológico, el HOCl existe como una mezcla del ácido hipocloroso (HOCl) y el ión hipoclorito (OCl⁻). Estos productos tienen una vida media muy corta pero son compuestos altamente reactivos que pueden oxidar potencialmente grupos susceptibles de ser oxidados como los tioles, ésteres de tioles, grupos hemo y los ácidos grasos insaturados. En especial los residuos de cisteína de las proteínas y del glutatión reducido son susceptibles a la oxidación mediada por el HOCl. La aparición de puentes disulfuro puede provocar cambios importantes en la estructura terciaria de las proteínas. También se puede esperar que la oxidación del glutatión reducido a glutatión oxidado tenga un efecto importante en el estatus redox de la célula y efectos significativos en los procesos de señalización celular (Davies *et al.*, 2008). El HOCl también puede reaccionar con compuestos nitrogenados como son las aminas y amidas presentes en una amplia gama de sustratos biológicos que incluyen a los fosfolípidos, glucosaminoglicanos, ADN y ARN. Esto provoca la formación de cloraminas con vida media larga y algunas de las cuales han demostrado poseer también actividad oxidante (Klebanoff, 2005).

El óxido nítrico generado en condiciones normales por las paredes vasculares y su principal producto de oxidación, el ión nitrito (NO₂⁻), han sido identificados como sustratos adicionales para la MPO bajo ciertas condiciones fisiológicas. En los tejidos y los fluidos biológicos, existen concentraciones relativamente altas de NO₂⁻ (entre 1 y 5 μM), las cuales se incrementan mucho más durante la inflamación (>200 μM) y por lo tanto podrían servir como un importante reductor para la MPO. La oxidación del NO₂⁻ por la MPO y el H₂O₂ lleva a la formación del radical dióxido de nitrógeno (NO₂[•]) y el anión peroxinitrito (ONOO⁻). El hecho de que la MPO consuma el NO derivado del endotelio hace que se reduzca la biodisponibilidad del NO y se impida la vasodilatación y otras propiedades antiinflamatorias que puede presentar este compuesto (Eiserich *et al.*, 1998).

Los neutrófilos son células fagocíticas altamente móviles y constituyen el efector primario del sistema inmune innato. Tradicionalmente eran consideradas células de vida corta, completamente diferenciadas y cuya función principal es encontrar, ingerir y destruir una amplia gama de patógenos invasores. Los neutrófilos son las primeras células en llegar al lugar de la infección, pero también abandonan el sitio rápidamente. Esta respuesta aguda es acompañada por daño en los tejidos del organismo (Dale *et al.*, 2008).

Esta visión de los neutrófilos como fagocitos pasivos, ha cambiado y los neutrófilos son ahora reconocidos con un papel importante en el comienzo y orientación de una respuesta inmune efectiva. Los efectos inmunomoduladores están mediados por las citocinas y quimiocinas derivadas de neutrófilos que afectan y atraen otras células inmunes como los monocitos/macrófagos y las células dendríticas. Además, los mismos mediadores que son necesarios para la muerte de patógenos pueden modular las señales celulares (Nathan, 2003). Para realizar sus funciones, los neutrófilos fagocitan los patógenos, después de lo cual un compartimiento fagolisosomal se forma por fusión del fagosoma con gránulos intracelulares que contienen varios componentes bactericidas. Cuando ocurre la activación de los neutrófilos, los gránulos primarios liberan su contenido en el fagosoma. Al mismo tiempo, los componentes del complejo de la NADPH oxidasa son reclutados por la membrana interna del fagolisosoma y también por la membrana plasmática. La activación del complejo NADPH oxidasa produce radicales superóxido (O_2^-), el cual espontáneamente o a través de la enzima superóxido dismutasa produce la dismutación catalizada del O_2^- y se genera H_2O_2 . Como tal, el sustrato requerido para la generación de los oxidantes derivados de la MPO está formado (Eiserich, 2002).

La contribución del sistema MPO- H_2O_2 -haluro a la actividad microbicida de los fagocitos se ilustra por las situaciones en las cuales uno de los componentes del sistema está inhibido o ausente. Por ejemplo, así ocurre en los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, un síndrome de inmunodeficiencia primaria caracterizado por un mal funcionamiento de la enzima NADPH oxidasa. Estos pacientes sufren infecciones severas y en muchos casos fatales. Los neutrófilos de estos pacientes son incapaces de implementar una “explosión oxidativa” adecuada y están por lo tanto disminuidos en su capacidad microbicida. Sin embargo, el defecto puede ser remediado *in vitro* con la adición de H_2O_2 extracelular. También los inhibidores de las enzimas peroxidases como el anión azida (N_3^-) o el anión cianuro (CN^-), aunque no son específicos para la MPO disminuyen significativamente la capacidad de los neutrófilos normales de matar los microbios. Estos mismos inhibidores, por el contrario, tienen poco efecto en la actividad microbicida de los neutrófilos deficientes en MPO, deduciéndose así que tienen como diana a la enzima MPO en los neutrófilos normales (Klebanoff, 2005).

Sin embargo, la deficiencia del sistema MPO- H_2O_2 -haluro no tiene una importancia crítica para la actividad microbicida del fagocito en los seres humanos pues su ausencia no acarrea severas consecuencias. La deficiencia parcial o total de la MPO no es rara entre el común de la población. Estudios realizados en los Estados Unidos y en Europa han mostrado prevalencias de deficiencias hereditarias de la MPO que oscilan entre 1:1000 y 1:4000 (Parry *et al.*, 1981). La deficiencia parcial o total de la MPO es consecuencia de mutaciones génicas, habiendo sido descritas varias de ellas. Aunque las consecuencias clínicas de la deficiencia de MPO no han sido estudiadas extensamente si han aparecido algunos estudios sobre el tema. Kutter y colaboradores compararon 100 individuos con deficiencia total o parcial de la MPO con 118 individuos de referencia y niveles normales de MPO. La incidencia de infecciones severas y enfermedades inflamatorias crónicas fue significativamente mayor en el grupo deficiente de MPO pero sin que esta deficiencia afectara la capacidad de desarrollar una vida aparentemente normal (Kutter *et al.*, 2000). Una posible explicación para la manifestación leve de síntomas en el fenotipo deficiente en MPO podría ser que otros mecanismos microbicidas incrementan su actividad para compensar la falta de MPO (Klebanoff, 1970).

Dejando a un lado los efectos tóxicos directos, se ha visto también que el HOCl es capaz de modular la función y la actividad de varias células inmunes. En estudios *in vitro*, el HOCl activa el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y la fosforilación de residuos de tirosina en linfocitos B y T, provocando un incremento del calcio como segundo mensajero y la producción de mayores cantidades del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Schieven *et al.*, 2002). Actualmente está claro que la MPO puede ejercer efectos que son independientes de su actividad enzimática. En ratones a los que se les realizó una inyección intravenosa de MPO se hallaron incrementos de los niveles circulantes de TNF- α e IFN- γ (Lefkowitz *et al.*, 1996). En otro estudio realizado, la MPO retrasó la apoptosis de los neutrófilos humanos *in vitro* y prolongó la duración del daño inducido por la carragenina a los pulmones de ratones. Por ello se piensa que la MPO es también una señal de sobrevivencia para los neutrófilos y como tal podría influir en la duración de una respuesta inflamatoria (El Kebir *et al.*, 2008). En general la información que se posee sugiere que la MPO, a través de sus efectos en las cascadas de señales de células endoteliales e inflamatorias, es un importante modulador de los procesos inflamatorios (Matthijsen *et al.*, 2007).

Diversos estudios han implicado a la MPO en un amplio grupo de aspectos de las enfermedades cardiovasculares en humanos. La principal causa de las enfermedades cardiovasculares es la aterosclerosis. Numerosas evidencias implican la MPO en la patogénesis de la aterosclerosis, esto ha convertido a la MPO en una posible diana terapéutica en la prevención del riesgo y las enfermedades cardiovasculares. En estos momentos está bastante claro el nexo entre los niveles de MPO y el grado de la enfermedad arterial coronaria. Por ejemplo, en un estudio se demostró que los niveles basales de MPO fueron un buen predictor del riesgo futuro de sufrir enfermedad arterial coronaria. A esta conclusión se llegó después de analizar 3500 individuos aparentemente saludables, agrupados según edad y género, durante 8 años (Meuwese *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007).

Varias enfermedades inflamatorias crónicas se han relacionado con los oxidantes derivados de la acción de la MPO. Por ejemplo, en los fluidos sinoviales de los pacientes con artritis reumatoide aparece gran cantidad de neutrófilos activados en las áreas de erosión de los cartílagos. Los oxidantes derivados de la MPO pueden degradar varios de los componentes de las articulaciones, incluyendo el cartílago y el ácido hialurónico (Schiller *et al.*, 2003). Coincide también una acumulación considerable de neutrófilos junto a una actividad incrementada de la MPO en las lesiones de la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Kruidenier *et al.*, 2003). Resulta evidente que la MPO tiene un papel importante en la patofisiología de muchas enfermedades caracterizadas por una inflamación aguda o crónica. Como es lógico entonces, la detección de la MPO se emplea como marcador del flujo de neutrófilos y monocitos en los tejidos en cualquier investigación sobre inflamación.

4.1.2 Actividad de los aceites esenciales sobre la mieloperoxidasa

Existen relativamente pocas publicaciones que estudien la actividad de los aceites esenciales o sus constituyentes sobre la MPO en ensayos *in vitro*. Las publicaciones encontradas se resumen en la **Tabla 4.1**. Al ser la MPO un buen indicador de la presencia o infiltración de neutrófilos en el tejido inflamado, muchos autores determinan la actividad de esta enzima en los tejidos para estudiar la actividad antiinflamatoria de los aceites esenciales o sus constituyentes. Es por esta razón que la mayor parte de los ensayos publicados que vinculan los aceites esenciales con la MPO ha sido realizada *in vivo*. Estos se revisan en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.1. Revisión bibliográfica sobre la actividad de los aceites esenciales o sus constituyentes sobre la MPO en ensayos *in vitro*.

Aceite esencial o compuesto	Ensayo	Resultados	Referencia
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Leucocitos humanos tratados y después estimulados con PMA. Se determina la actividad de la MPO en el sobrenadante.	La MPO disminuyó significativamente por el tratamiento. No demostró actividad frente al DPPH.	Ribeiro Silva <i>et al.</i> , 2010
<i>Cymbopogon citratus</i>	Leucocitos humanos tratados y después estimulados con PMA. Se determina la actividad de la MPO en el sobrenadante.	La MPO disminuyó significativamente por el tratamiento. No demostró actividad frente al DPPH.	Ribeiro Silva <i>et al.</i> , 2010
Eugenol	Macrófagos peritoneales murinos. Se estimula oxidación tóxica por nicotina (10 mM) y se determinó la MPO en el sobrenadante. Neutrófilos humanos tratados y después de un lavado estimulados con fMLP. Se determinó MPO en el medio extracelular como indicador de la liberación de la MPO por los neutrófilos.	El tratamiento con eugenol redujo significativamente la toxicidad de la nicotina y restauró la actividad medida de la MPO a valores normales. Tratamientos de 102625 µg/mL, 205250 µg/mL y 410500 µg/mL redujeron significativamente la liberación de MPO por los neutrófilos. Tratamiento de 410500 µg/mL provocó reducción significativa en la viabilidad.	Kar Mahapatra <i>et al.</i> , 2009 Chen <i>et al.</i> , 2008

Tabla 4.2. Revisión bibliográfica sobre la actividad de los aceites esenciales o sus constituyentes sobre la MPO en ensayos *in vivo*.

Aceite esencial o compuesto	Ensayo	Resultados	Referencia
Anetol	Ratones con edema provocado en la oreja. Se determina MPO.	Aplicación tópica redujo significativamente la MPO en la oreja.	Perdigao Domiciano <i>et al.</i> , 2013
<i>Artemisia princeps</i>	Ratones con infección vaginal por <i>Gardnerella vaginalis</i> . Se determina MPO en tejido vaginal.	Un tratamiento de 20 µL al 10% (v/v) redujo significativamente los niveles de MPO.	Trinh <i>et al.</i> , 2011
α -Bisabolol	Ratas pre-tratadas con (α)-bisabolol e inyectadas con carragenina en cavidad peritoneal. Se determina MPO. Ratones con lesiones gástricas causadas por administración de etanol. Se determina MPO en el estómago.	Los tratamientos de 100 y 200 mg/kg redujeron significativamente la actividad de la MPO. Tratamientos de 100 y 200 mg/kg redujeron significativamente la actividad de la MPO.	Moura Rocha <i>et al.</i> , 2011a Moura Rocha <i>et al.</i> , 2011b
<i>Carum carvi</i>	Ratas con sepsis abdominal provocada por punción del ciego ligado. Se determina MPO en tejido hepático.	Tratamientos de 10 y 25 mg/kg restauraron a niveles normales las MPO en el tejido hepático.	Fatemi <i>et al.</i> , 2010

Carvacrol	Ratas como modelo de periodontitis. Se determina la MPO.	El tratamiento redujo significativamente la MPO gingival.	Botelho <i>et al.</i> , 2009
1,8-Cineol	Ratones con infección vaginal provocada por <i>Gardnerella vaginalis</i> . Se determina MPO en tejido vaginal. Ratas con colitis inducida por administración intrarrectal de ácido trinitrobenceno sulfónico. Se determinó la MPO.	Tratamiento de 20 µL al 10% (v/v) redujo significativamente los niveles de MPO. El tratamiento redujo significativamente la MPO en el tejido afectado.	Trinh <i>et al.</i> , 2011 Santos <i>et al.</i> , 2004
β-Citronelol	Ratones con inflamación dérmica inducida con β-glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	El compuesto (β)-Citronelol no manifestó actividad significativa en un tratamiento de 5 µL.	Maruyama <i>et al.</i> , 2005
<i>Cordia verbenacea</i>	Ratas con edema inducido en la pata. Se determinó la MPO en el edema.	Tratamiento redujo significativamente la MPO en el edema.	Passos <i>et al.</i> , 2007
<i>Croton argyrophyllus</i>	Ratas con edema inducido en la pata. Se determinó la MPO en el edema.	Tratamientos entre 10 y 100 mg/kg redujeron significativamente la actividad de la MPO en el edema.	Ramos <i>et al.</i> , 2013
<i>Curcuma longa</i>	Ratas con isquemia inducida por oclusión de arteria cerebral. Se determina la MPO en tejido isquémico.	Tratamiento de 500 mg/kg redujo significativa la MPO en el tejido isquémico.	Dohare <i>et al.</i> , 2008
<i>Eucalyptus globulus</i>	Ratones con inflamación dérmica inducida con β-glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	La actividad de la MPO disminuyó significativamente con el tratamiento.	Maruyama <i>et al.</i> , 2005
Geraniol	Ratas con candidiasis vaginal provocada. Se determina la MPO en la vagina. Ratones con inflamación dérmica inducida con β-glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	Se redujo significativamente el nivel de MPO e inflamación en la vagina. No manifestó actividad significativa en un tratamiento de 5 µL.	Maruyama <i>et al.</i> , 2008 Maruyama <i>et al.</i> , 2005
Geranio (género)	Ratones con edema inducido en la pata. Se determinó MPO en el tejido afectado.	Tratamiento redujo significativamente la actividad de la MPO.	Maruyama <i>et al.</i> , 2006
<i>Juniperus communis</i>	Ratones con inflamación dérmica inducida con β-glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	No mostró actividad.	Maruyama <i>et al.</i> , 2005
<i>Lavandula angustifolia</i>	Ratones con inflamación dérmica inducida con β-glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	La actividad de la MPO disminuyó significativamente con el tratamiento.	Maruyama <i>et al.</i> , 2005

Linalol	Ratones con inflamación dérmica inducida con β -glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	No manifestó actividad significativa en un tratamientos de 5 μ L.	Maruyama <i>et al.</i> , 2005
<i>Lippia sidoides</i>	Ratas con enfermedad periodontal inducida. Se determina MPO en tejido gingival.	El tratamiento redujo la MPO significativamente en el tejido gingival.	Botelho <i>et al.</i> , 2008
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Ratones con inflamación dérmica inducida con β -glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	La MPO disminuyó significativamente con el tratamiento.	Maruyama <i>et al.</i> , 2005
β -Mirceño	Ratas pre-tratadas a las que se les indujo úlcera gástrica. Se determina MPO en homogenado.	Tratamiento de 7,5 mg/kg disminuyó significativamente los niveles de MPO en la mucosa gástrica.	Bonamin <i>et al.</i> , 2014
<i>Myrtus communis</i>	Ratones a los que se le provocó edema en la oreja. Se determinó la MPO.	Tratamiento tópico redujo significativamente la MPO en el tejido de la oreja.	Maxia <i>et al.</i> , 2011
<i>Nigella sativa</i>	Ratas con isquemia inducida por oclusión arterial de los riñones. Se determina la MPO en el tejido isquémico.	Tratamiento de 0,2 mL/kg redujo significativamente los valores de MPO en el tejido isquémico.	Yildiz <i>et al.</i> , 2010
<i>Origanum onites</i>	Ratas con colitis inducida por administración intrarrectal del ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico. Se determinó la MPO.	Tratamientos intraperitoneal e intrarrectal redujeron significativamente la MPO.	Dundar <i>et al.</i> , 2008
<i>Perargonium asperum</i>	Ratones con inflamación dérmica inducida con β -glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	Tratamiento disminuyó la MPO significativamente.	Maruyama <i>et al.</i> , 2005
<i>Pistacia integerrima</i>	Ratas pre-tratadas y con administración intratraqueal de LPS. Se determina MPO en homogenado.	Tratamientos intraperitoneales de 7.5, 15 y 30 mg/kg redujeron significativamente la MPO.	Shirole <i>et al.</i> , 2014
<i>Protium heptaphyllum</i>	Ratones a los que se le provocó lesiones gástricas por administración de etanol. Se determina MPO en el estómago.	El tratamiento de 100 mg/kg redujo significativamente la MPO.	Valim Araujo <i>et al.</i> , 2011
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Ratones con colitis inducida por administración intrarrectal de ácido trinitrobenceno sulfónico. Se determina la MPO en los tejidos afectados.	Reducción significativa de la MPO a 1250 ppm. A 2500 y 5000 ppm no hay cambios. Comportamiento independiente de la dosis.	Juhas <i>et al.</i> , 2009
<i>Satureja Khuzestanica</i>	Ratones con colitis inducida por administración intrarrectal de ácido acético. Se determinó la MPO en el tejido con colitis.	Tratamientos de 1000 y 1500 ppm redujeron significativamente la MPO.	Ghazanfari <i>et al.</i> , 2006
Terpinen-4-ol	Ratones a los que se le provocó candidiasis oral. Se determinó la MPO.	Los tratamientos de 10 mg/mL redujeron significativamente la MPO en el homogenado de la lengua.	Ninomiya <i>et al.</i> , 2013

	Ratones con inflamación dérmica inducida con β -glucano de <i>Alcaligenes faecalis</i> . Se determinó la actividad de la MPO.	Tratamiento de 5 μ L no manifestó actividad.	Maruyama <i>et al.</i> , 2005
α -Terpineol	Ratones con infección vaginal provocada por <i>Gardnerella vaginalis</i> . Se determina MPO en tejido vaginal.	Tratamiento de 20 μ L al 10% (v/v) redujo significativamente los niveles de MPO.	Trinh <i>et al.</i> , 2011
<i>Thymus vulgaris</i>	Ratones con daño agudo del hígado por sobredosis de acetaminofen. Se determina MPO en el hígado.	Pre-tratamiento oral de 250 y 500 mg/kg redujo significativamente la MPO. Dosis de 125 mg/kg sin efecto.	Grespan <i>et al.</i> , 2014

Los ensayos *in vitro* que vinculan los aceites esenciales y la actividad de la mieloperoxidasa son bastante escasos. En un experimento donde se determinó la actividad de la MPO en el sobrenadante de leucocitos humanos tratados con los aceites esenciales de *Cymbopogon winterianus* Jowitt y *C. citratus* (DC) staff, la actividad de la enzima disminuyó con ambos tratamientos. Ya sea por inhibición de la liberación de la MPO por los leucocitos o por inhibición de la enzima propiamente dicha (Ribeiro Silva *et al.*, 2010). El tratamiento previo con eugenol también provocó una reducción de la liberación de la MPO al medio extracelular en neutrófilos humanos estimulados con N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). En este ensayo se buscó excluir cualquier inhibición directa de la enzima MPO causada por el eugenol pues las células fueron lavadas una vez realizado el tratamiento con el eugenol y antes de ser estimuladas con el fMLP (Chen *et al.*, 2008). Resultados similares se obtuvieron en otro experimento *in vitro* donde se trataron macrófagos peritoneales de ratones Swiss con eugenol (Kar Mahapatra *et al.*, 2009). Sin embargo, en la literatura no hemos podido encontrar hasta el momento referencias al efecto inhibitorio directo que podrían ejercer los aceites esenciales o sus componentes sobre la enzima MPO aislada.

Por lo que se refiere a los ensayos *in vivo*, varios aceites esenciales provocaron una reducción de la actividad de la MPO en los tejidos tratados. También tuvieron una actividad similar el β -mirreno el terpinen-4-ol, el anetol, el α -bisabolol, el carvacrol, el geraniol y el 1,8-cineol. Sin embargo, es importante señalar que mediante estos ensayos no se puede diferenciar si el efecto de los aceites esenciales se debió a que la enzima fue inhibida directamente, se impidió la liberación de la MPO de los neutrófilos o si fueron inhibidos los mecanismos de quimiotaxis que llevan a la acumulación de neutrófilos en los tejidos inflamados.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Fundamento del ensayo

La actividad de la enzima MPO se determinó mediante la oxidación del dihidrocloruro de o-dianisidina por acción del H_2O_2 (Bradley *et al.*, 1982). Esta reacción es catalizada por la MPO:



Los neutrófilos en solución salina de Hanks modificada (HBSS) son activados con LPS (concentración final de 100 μ g/mL) y estimulados a liberar la enzima

mieloperoxidasa al medio durante 30 min a 37°C. Las muestras no estimuladas ejercieron como controles. Posteriormente los neutrófilos fueron incubados a temperatura ambiente durante 15 min con 100 µL o-dianisidina (1,25 mg/mL en HBSS) suplementada con 0,004% de H₂O₂. La reacción se detuvo por la adición de azida sódica (NaN₃) [2 % (masa/vol)]. La actividad de MPO se determinó por medición de la absorbancia a 450 nm.

4.2.2 Material

- Clorhidrato de o-dianisidina [Sigma, referencia: D3252-5G].
- Azida sódica (NaN₃) [Sigma, referencia: S8032].
- H₂O₂ [Sigma, referencia: H3410].
- Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) 30% [Sigma, referencia: H3410].
- Lipopolisacaridos bacterianos (LPS) como estimulante de la liberación de la mieloperoxidasa por los neutrófilos. LPS de E. coli 0127:B8. [Sigma, referencia: L3129].
- Etilendiamina tetraacetato de sodio dihidratado (EDTA-Na₄•H₂O) [Sigma, referencia: E6511].
- Cloruro de amonio (NH₄Cl). [Sigma, referencia: A9434].
- Bicarbonato de potasio (KHCO₃). [Sigma, referencia: P9144]
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) [Sigma, referencia: D1435].
- Quercetina [Sigma, referencia: Q4951].
- Tween 20 [Sigma, referencia: P1379].
- Tween 80 [Sigma, referencia: P1754].
- Solución salina de Hanks modificada, más cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ (HBSS). [Sigma, referencia: H8264].
- Solución salina de Hanks modificada, sin los cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ (HBSS) [Sigma, referencia: H6648].
- Ricinoleato de gliceril-polietilenglicol (E484) [suministrado por Lidervet, S.L.].
- Microtubo tipo eppendorf 1,5 mL tapa plana [Rubilabor, referencia: 711.1500].
- Tubos plásticos de 50 mL sin faldón [Rubilabor, referencia: 644.2050].
- Tubos plásticos de 15 mL [Rubilabor, referencia: 644.2015].
- Placa microtiter 96 pocillos, fondo plano. [Rubilabor, referencia: 822.0005].
- Placas microtiter 96 pocillos, fondo U. [Rubilabor, referencia: 822.0001].
- Puntas de multipipeta de 200 µL (fine point LTS tips). Solo para empleo en multipipetas LTS (Rainin) [Rainin, referencia: RC-L250/10].
- Puntas de pipeta de 200 µL [Rubilabor, referencia: 16-2001].
- Punta de pipeta de 10 mL [Rubilabor, referencia: 511.0002].
- Punta de pipeta 100-1000 µL [Rubilabor, referencia: 015/162222].
- *Buffy coats* procedentes del *Banc de Sang i Teixits de Catalunya*.
- Espectrofotómetro para lectura de placas a 460 nm. [Microplate spectrophotometer, Benchmark Plus, BIORAD. País USA, 2004].

4.2.3 Solución de hemólisis

Se prepara una solución madre (x10) que se conserva a 4 °C y que está compuesta por: NH₄Cl (8,99 g), KHCO₃ (1,0 g), EDTA-Na₄ (0,037 g), H₂O MilliQ c.s.p. 100 mL. Esta solución madre se diluye 1:10 (v/v) en el mismo momento de uso. Con esta técnica se busca una acumulación de NH₄Cl en el interior de los eritrocitos. Se produce un aumento en la presión osmótica de los eritrocitos y como consecuencia la ruptura de la membrana celular, lo que facilita su eliminación selectiva (Bossuyt *et al.*; 1997).

4.2.4 Selección del tampón

Durante la manipulación de las células es necesario prevenir su agrupación, un fenómeno que se facilita si están presentes los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . En cambio, durante la realización del ensayo funcional activo, se prefiere el tampón HBSS más los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} .

4.2.5 Obtención de la suspensión de leucocitos humanos

Se obtienen los leucocitos a partir de *buffy coats* provenientes del *Banc de Sang i Teixits de Catalunya*. Los *buffy coats* son la capa amarillenta rica en células blancas y plaquetas obtenidas por centrifugación de la sangre procedente de voluntarios humanos sanos. El procedimiento que se emplea para la obtención de la suspensión de leucocitos es la hemólisis (*shock* hemolítico) mediante el empleo de una solución de cloruro amónico (Bossuyt *et al.*; 1997).

1. Se toman 500 μL de sangre total que se depositan en tubos plásticos de 15 mL. Se añaden 5 mL de solución de hemólisis ya diluída.
2. Tras 3 minutos de lisis, se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm y 4 °C y se elimina el sobrenadante.
3. El acúmulo de células obtenido se lava con solución de HBSS sin cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (5 mL) y se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm.
4. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante y el acúmulo de células se resuspende en HBSS sin cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (4 mL).

La suspensión resultante contiene todo tipo de leucocitos y una cantidad variable de eritrocitos y restos celulares. La cantidad de restos se puede minimizar con sucesivos lavados y centrifugaciones. Se ha de tener en cuenta que un incremento en el tiempo de lisis con cloruro amónico puede dar como resultado un aumento de la mortalidad y alteración en la morfología celular. Las preparaciones celulares se mantuvieron en hielo hasta su empleo, el cual nunca fue superior a las 2 horas.

4.2.6 Preparación de las muestras de aceites esenciales

Se tomaron 10 μL de cada aceite esencial. Se añadió este volumen de aceite esencial a un eppendorf de 1,5 mL previamente tarado. La masa de esta alícuota de aceite esencial se determinó en balanza analítica. Se completó el volumen hasta 1mL con DMSO. Los aditivos o solventes empleados fueron ensayados previamente para descartar que presentaran algún tipo de actividad por sí mismos. Se sometió la mezcla a vortex durante 2 minutos que fueron seguidos de 5 minutos en el equipo de ultrasonido. El resultado final fue una emulsión con aspecto homogéneo del aceite esencial. Esta emulsión se utilizó como solución madre. Utilizando esta solución madre y un grupo de eppendorfs se realizaron una serie de diluciones. En todos los casos se empleó como solvente a la solución de Hanks con los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Las diluciones fueron realizadas una a continuación de la otra y tuvieron la secuencia siguiente: (solución madre) $\rightarrow 1/10 \rightarrow 1/2 \rightarrow 1/10$. Al añadir el tratamiento a la placa ocurre una dilución $1/10$ de las concentraciones que se encuentran en el eppendorf. Fueron ensayadas todas las soluciones excepto la solución madre (9 en total).

4.2.7 Método operatorio en el ensayo de la MPO en presencia de células

1. En una placa de microtiter de fondo en U se depositan 200 μL de la solución de leucocitos humanos.

2. Se añaden 20 μL de la muestra en los distintos grupos de tratamiento y la quercetina (control positivo). Se añaden 20 μL de HBSS en los pocillos marcados como grupos control (control con LPS y control sin LPS).
3. Se incuba la placa 10 minutos a 37 °C con agitación horizontal.
4. Se añaden 10 μL de LPS (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentración final) en todos los pocillos. Se exceptúan los pocillos marcados como control sin LPS, en los cuales se añade 10 μL de HBSS.
5. Se incuba la placa durante 30 min a 37 °C con agitación horizontal.
6. Se centrifuga la placa a 2500 rpm durante 10 minutos.
7. Se toman 50 μL del sobrenadante libre de células de cada pocillo y se trasladan a una placa de microtiter de fondo en U. Posteriormente se añaden 50 μL de clorhidrato de o-dianisidina (1,25 mg/mL concentración final en HBSS suplementada con 0,004 % H_2O_2) y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Se detiene la reacción con 50 μL NaN_3 [2% (masa/vol)]. Se toman 50 μL de los pocillos y se trasladan a una placa de fondo plano con 150 μL de HBSS en cada pocillo. Se realiza la lectura de la absorbancia a 460 nm.

4.2.8 Método operatorio en el ensayo de actividad de la MPO aislada

1. En un tubo de 15 mL con 10 mL de suspensión de leucocitos se añade LPS 0,5 mL (1mg/mL~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentración final). Estas serán las células estimuladas. En otro tubo de 15 mL con 10 mL de suspensión de leucocitos se añade una cantidad similar de HBSS (0,5 mL). Este segundo tubo constituye el grupo de las células no estimuladas o control.
2. Se incuban ambos tubos de 15 mL durante 30 min. a 37 °C con agitación.
3. Se centrifugan los tubos de 15 mL a 4000 rpm durante 7 minutos a 4°C.
4. Se toma el sobrenadante libre de células de los tubos con leucocitos estimulados y no estimulados y se pasa a cubetas para su utilización.
5. En una placa de microtiter de fondo en U se depositan 100 μL del sobrenadante libre de células procedente de leucocitos humanos no estimulados en los pocillos designados como control sin LPS y 100 μL del sobrenadante procedente de los leucocitos humanos estimulados en el resto de los pocillos de la placa de microtiter.
6. Se añaden 10 μL de las soluciones decrecientes de las muestras y la quercetina (control positivo). Se añaden 10 μL de HBSS en los pocillos marcados como grupos control (control con LPS y control sin LPS).
7. Se incuba la placa 6 minutos a 37 °C con agitación horizontal.
8. Se añaden 100 μL de clorhidrato de o-dianisidina (1,25 mg/mL en HBSS) suplementada con 0,004 % H_2O_2 y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente (preparar la solución justo antes de usarla, para 25 mL se añaden 31,25 mg de clorhidrato de o-dianisidina y 300 μL de H_2O_2 al 30%).
9. Se toman 50 μL de los pocillos de la placa anterior y se trasladan a una placa de fondo plano que contenga en cada pocillo 150 μL de HBSS y 30 μL NaN_3 (2 % (masa/vol)). Se realiza la lectura de la absorbancia a 460 nm.

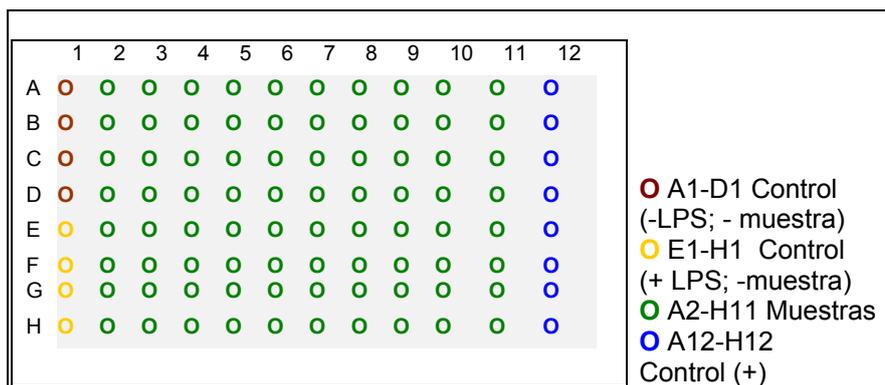


Figura 4.1. Distribución de las muestras y controles en una placa de microtiter de 96 pocillos.

4.2.9 Análisis de los datos

La inhibición (%) de la actividad de la MPO fue calculada a partir del valor de actividad de la MPO en los leucocitos estimulados con LPS y tratados con aceites esenciales *versus* los valores de actividad de la MPO en los leucocitos estimulados con LPS pero que no fueron tratados con los aceites esenciales (0% de inhibición). También existe un grupo control (nivel basal) que está constituido por los leucocitos que no fueron activados con LPS (100 % de inhibición). La quercetina, fue utilizada como control positivo en los tratamientos.

4.2.10 Expresión de los resultados y procesamiento estadístico

Los resultados fueron resumidos en tablas, los datos reflejaron las medias \pm desviación estándar (DE) de cuatro experimentos independientes. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos con el control (0 % de inhibición) para cada muestra se realizaron mediante un análisis de varianza (one-way ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett (Dunnett's test), $p < 0.05$. Las comparaciones entre el ensayo en ausencia de células y el ensayo en presencia de células para un mismo aceite esencial se realizaron mediante el "paired t test", $p < 0.05$. La concentración inhibitoria 50 % (IC_{50}) fue calculada cuando fue posible por interpolación en una curva dosis-respuesta construida mediante una regresión no lineal que seguía un modelo de curva sigmoidea. Esta curva se obtuvo de graficar el (%) de inhibición de la MPO *versus* el logaritmo de la concentración del aceite esencial ($\mu\text{g/mL}$). Para el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad, Prism versión 5.0 para Windows, San Diego, CA, USA.

4.3 Resultados

La **Tabla 4.3** recoge los resultados de los ensayos de actividad de aceites esenciales, fracciones y constituyentes sobre la MPO aislada y en presencia de células. También aparecen recogidos los resultados de las pruebas estadísticas en las cuales se compara la actividad en el ensayo sobre la MPO aislada con la actividad en el ensayo en presencia de células. Por su parte la **Tabla 4.4** recoge los resultados de estos mismos ensayos ante la quercetina (empleada como control +). Debido a que las diluciones de las diferentes muestras se hicieron tomando volúmenes iguales, las concentraciones están expresadas en % (v/v). Las equivalencias entre estas concentraciones y su valor en $\mu\text{g/mL}$ para los ensayos de la MPO están resumidas en la **Tabla 4.5**.

Capítulo 4. Actividad sobre la enzima mieloperoxidasa

Tabla 4.3. Actividad sobre la MPO aislada y en presencia de células.

Inhibición (%) de la MPO												
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes											
	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel	
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
7,81 x 10 ⁻⁶	1,2±3,5	-0,3±1,6	0,2±1,1	0,1±1,1	3,3±1,3 *	3,4±1,0 *	1,9±2,0	1,5±2,9	1,9±2,8	1,9±2,8	1,9±2,8	0,6±0,9
7,81 x 10 ⁻⁵	1,2±1,8	0,9±1,3	0,6±1,6	0,8±2,6	4,6±1,2 *	1,8±1,7	5,6±1,2 *	1,0±3,3	2,4±0,9	2,4±0,9	2,4±0,9	2,1±1,7
1,56 x 10 ⁻⁴	2,0±2,1	0,0±2,3	1,4±1,6	1,2±1,3	10,9±1,8 *	2,0±1,4	12,1±1,7 *	2,5±2,2	2,7±2,7	2,7±2,7	2,7±2,7	2,4±0,5
3,13 x 10 ⁻⁴	2,9±2,0	1,5±1,6	1,8±2,1	1,3±2,0	14,6±1,6 *	2,1±1,7	15,5±1,4 *	3,6±1,7	3,9±2,7 *	3,9±2,7 *	3,9±2,7 *	3,0±2,4 *
6,25 x 10 ⁻⁴	5,2±3,0 *	1,9±0,7	2,2±1,5	2,7±2,4	21,6±0,9 *	1,5±1,2	21,6±1,8 *	8,8±2,5 *	12,2±2,0 *	12,2±2,0 *	12,2±2,0 *	8,6±1,2 *
1,25 x 10 ⁻³	9,9±2,2 *	2,2±2,0	2,8±1,5 *	12,3±1,8 *	29,5±1,5 *	2,7±1,4	26,4±1,4 *	13,2±3,1 *	17,5±1,3 *	17,5±1,3 *	17,5±1,3 *	15,2±1,8 *
2,50 x 10 ⁻³	17,4±2,0 *	2,4±0,9	3,5±0,6 *	15,4±0,9 *	39,2±1,3 *	3,8±2,2 *	43,5±2,6 *	18,5±2,8 *	20,9±1,1 *	20,9±1,1 *	20,9±1,1 *	26,7±1,0 *
5,00 x 10 ⁻³	20,5±0,9 *	3,4±1,4 *	4,3±1,1 *	19,9±1,4 *	53,3±2,3 *	4,1±2,1 *	63,2±2,1 *	25,2±3,1 *	28,0±2,3 *	28,0±2,3 *	28,0±2,3 *	32,6±1,7 *
1,00 x 10 ⁻²	41,0±3,0 *	10,4±1,0 *	15,9±1,2 *	30,8±1,2 *	76,7±1,8 *	10,0±1,3 *	81,4±1,5 *	49,0±1,5 *	41,3±1,5 *	41,3±1,5 *	41,3±1,5 *	44,0±1,3 *
IC ₅₀ µg/mL	---	---	---	---	37,2±1,0	---	35,9±2,4	---	---	---	---	---
(A) vs (B)	---	*	*	---	*	*	*	*	---	*	*	---
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
7,81 x 10 ⁻⁶	-0,4±1,1	0,6±0,9	0,1±1,6	0,5±1,6	3,0±1,6 *	-0,4±1,0	3,0±3,2	-1,0±0,9	0,0±1,5	0,0±1,5	0,0±1,5	-0,5±1,1
7,81 x 10 ⁻⁵	0,1±1,0	0,7±0,7	0,8±0,5	-0,2±1,8	7,4±0,8 *	-0,1±0,9	6,8±1,9 *	0,0±1,3	0,2±1,8	0,2±1,8	0,2±1,8	1,1±0,6
1,56 x 10 ⁻⁴	0,1±1,4	0,6±1,4	-0,2±0,3	-0,2±2,3	14,2±0,7 *	-1,1±1,1	10,5±2,0 *	0,7±0,9	-1,3±0,7	-1,3±0,7	-1,3±0,7	1,4±1,5
3,13 x 10 ⁻⁴	0,6±1,5	1,8±2,2	1,2±1,1	1,5±1,5	22,7±1,3 *	1,4±0,3	16,7±2,6 *	2,7±1,0 *	0,6±1,3	0,6±1,3	0,6±1,3	5,2±1,3 *
6,25 x 10 ⁻⁴	-0,1±1,1	3,8±1,8 *	3,0±0,7 *	3,9±0,8 *	35,3±1,6 *	0,9±1,4	32,7±2,5 *	6,4±1,3 *	1,4±0,5	1,4±0,5	1,4±0,5	9,9±1,8 *
1,25 x 10 ⁻³	1,1±0,7	7,3±1,9 *	5,2±0,9 *	6,9±2,0 *	44,6±1,5 *	0,3±1,5	43,5±2,9 *	10,5±1,7 *	3,0±1,2	3,0±1,2	3,0±1,2	17,8±0,9 *
2,50 x 10 ⁻³	4,0±0,9 *	11,3±1,3 *	8,9±1,3 *	10,5±1,3 *	54,2±1,5 *	3,0±0,8 *	56,1±2,7 *	15,9±1,0 *	6,7±2,8 *	6,7±2,8 *	6,7±2,8 *	25,0±0,7 *
5,00 x 10 ⁻³	6,7±0,4 *	14,8±1,3 *	12,2±1,6 *	14,3±1,3 *	63,8±1,2 *	4,8±1,5 *	73,9±1,5 *	22,9±1,4 *	10,8±2,4 *	10,8±2,4 *	10,8±2,4 *	29,6±1,3 *
1,00 x 10 ⁻²	10,2±0,8 *	20,5±1,0 *	17,1±1,8 *	22,7±1,1 *	81,9±1,4 *	8,7±1,0 *	84,7±2,7 *	32,4±1,0 *	16,3±1,0 *	16,3±1,0 *	16,3±1,0 *	39,9±1,8 *
IC ₅₀ µg/mL	---	---	---	---	16,3±1,2	---	19,2±2,0	---	---	---	---	---

Inhibición (%±DE; n=4). *Diferencias significativas (p<0.05). (---) No es posible calcular el valor o las diferencias no son significativas.

Capítulo 4. Actividad sobre la enzima mieloperoxidasa

Tabla 4.3. Continuación.

Inhibición (%) de la MPO												
	Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										
		Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
MPO aislada (A)	0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	7,81 x 10 ⁻⁶	-0,3±1,2	0,1±1,2	3,2±3,2	1,4±1,4	1,3±1,8	-1,0±0,6	0,1±1,4	0,8±1,3	0,8±1,0	0,0±1,2	0,2±1,1
	7,81 x 10 ⁻⁵	0,2±0,9	-0,1±0,5	5,3±2,6 *	4,2±0,8 *	0,0±1,7	-0,6±1,0	1,2±2,0	0,7±1,5	0,9±1,6	0,3±1,0	1,1±0,9
	1,56 x 10 ⁻⁴	1,1±0,8	1,6±0,9	10,2±2,2 *	10,9±1,6 *	1,1±1,9	2,3±2,3	5,3±2,0 *	2,5±0,6 *	2,1±2,2	1,6±2,1	5,6±1,8 *
	3,13 x 10 ⁻⁴	1,9±0,6	2,7±2,0	14,7±1,7 *	14,2±0,2 *	1,6±1,9	6,4±1,2 *	13,1±1,9 *	2,5±1,1 *	1,9±1,9	8,6±1,6 *	11,6±1,5 *
	6,25 x 10 ⁻⁴	2,4±1,0 *	3,9±2,0 *	16,1±2,7 *	15,6±2,2 *	2,1±2,0	13,2±1,5 *	20,4±1,1 *	2,7±1,0 *	12,3±1,4 *	14,8±1,5 *	19,5±0,9 *
	1,25 x 10 ⁻³	3,9±1,9 *	4,7±1,7 *	21,8±1,2 *	18,1±1,9 *	5,6±1,0 *	22,6±1,2 *	29,5±1,2 *	9,0±0,8 *	19,6±0,8 *	22,3±1,6 *	27,1±1,6 *
	2,50 x 10 ⁻³	6,2±1,3 *	7,8±1,9 *	25,5±1,3 *	19,1±2,9 *	7,4±1,8 *	33,2±1,4 *	39,4±1,1 *	14,6±1,3 *	32,0±2,8 *	34,2±2,0 *	41,8±2,5 *
	5,00 x 10 ⁻³	8,9±0,5 *	11,3±1,0 *	31,9±2,6 *	21,9±2,2 *	12,0±0,6 *	42,9±2,3 *	55,0±1,0 *	18,1±0,7 *	40,2±0,9 *	45,8±1,4 *	53,0±1,7 *
	1,00 x 10 ⁻²	25,1±0,9 *	20,5±1,6 *	50,9±2,0 *	41,8±1,5 *	21,2±0,7 *	60,7±1,4 *	80,9±1,0 *	29,3±1,4 *	58,2±2,6 *	72,1±1,0 *	76,9±1,8 *
IC₅₀ µg/mL	---	---	---	---	---	58,9±5,3	35,9±1,4	---	67,1±5,3	45,3±2,1	39,7±2,6	
(A) vs (B)	---	---	*	*	*	*	---	*	---	*	---	---
Presencia de células (B)	0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	7,81 x 10 ⁻⁶	0,4±0,5	0,1±0,7	-0,2±1,0	0,2±1,5	1,6±1,0	1,7±1,2	-0,7±0,8	0,6±0,5	0,2±1,4	1,0±1,4 ns	0,7±0,3
	7,81 x 10 ⁻⁵	0,8±0,8	0,1±1,8	-0,3±1,1	-0,1±0,7	0,9±1,2	1,3±1,7	-0,4±1,2	-0,4±1,2	-0,4±0,7	0,6±2,3 ns	2,6±1,2
	1,56 x 10 ⁻⁴	-0,4±0,9	0,3±1,6	0,5±2,0	-0,6±1,0	3,4±1,2 *	4,0±2,2 *	4,0±0,9 *	0,5±2,1	1,5±2,2	3,9±2,1 *	7,0±1,7 *
	3,13 x 10 ⁻⁴	0,9±1,5	3,0±1,3 *	1,9±2,0	1,9±1,2	6,4±2,8 *	6,3±1,8 *	8,1±0,8 *	2,6±2,3 *	2,1±1,3	6,3±2,5 *	12,6±1,5 *
	6,25 x 10 ⁻⁴	3,4±1,4 *	5,4±1,6 *	4,5±1,8 *	3,1±0,8 *	7,7±1,4 *	8,8±1,2 *	13,5±1,7 *	5,9±1,3 *	4,6±1,2 *	12,1±0,8 *	18,6±2,8 *
	1,25 x 10 ⁻³	7,4±0,9 *	8,4±1,5 *	8,8±1,5 *	9,0±1,2 *	10,2±1,7 *	15,3±1,6 *	22,8±1,9 *	8,9±1,3 *	8,4±1,4 *	17,7±2,0 *	30,0±1,6 *
	2,50 x 10 ⁻³	10,7±1,2 *	11,8±2,2 *	13,2±1,9 *	13,8±0,9 *	13,4±1,6 *	28,0±1,4 *	33,4±1,9 *	13,0±0,5 *	11,8±1,9 *	26,3±0,6 *	44,9±2,2 *
	5,00 x 10 ⁻³	15,3±1,5 *	16,4±1,1 *	17,2±0,9 *	16,8±0,5 *	20,2±1,3 *	38,3±2,9 *	48,6±1,3 *	17,1±0,9 *	17,3±1,1 *	37,3±1,5 *	58,8±2,1 *
	1,00 x 10 ⁻²	22,7±1,7 *	26,0±1,3 *	28,0±1,6 *	26,0±1,1 *	29,7±1,6 *	57,6±2,2 *	67,0±1,2 *	23,6±1,3 *	26,6±1,7 *	54,4±1,9 *	72,9±1,8 *
IC₅₀ µg/mL	---	---	---	---	---	74,0±7,6	50,8±3,4	---	---	80,2±6,6	35,0±1,0	

Inhibición (%±DE; n=4). *Diferencias significativas (p<0.05). (---) No es posible calcular el valor o las diferencias no son significativas.

Tabla 4.4. Actividad de la quercetina (control +) sobre la MPO aislada y en presencia de células.

Inhibición (%) de la MPO		
Quercetina (µg/mL)	MPO aislada (A)	Presencia de células (B)
0,0000	0,0±0,0	0,0±0,0
0,0005	5,8±2,5 *	23,3±12,4 *
0,0050	10,8±1,7 *	37,8±3,8 *
0,0500	30,1±1,9 *	44,0±2,0 *
0,5000	45,5±2,6 *	50,3±2,0 *
5,0000	67,9±1,9 *	53,9±2,3 *
12,0000	85,2±2,3 *	71,2±3,2 *
25,0000	97,5±2,0 *	83,0±4,1 *
50,0000	100,0±1,0 *	93,3±2,1 *
IC₅₀ (µg/mL)	1,0±0,3	2,8±0,8
(A) vs (B)		---

Inhibición (%±DE; n=4). *Diferencias significativas (p<0.05). (---) Diferencias no significativas.

Capítulo 4. Actividad sobre la enzima mieloperoxidasa

Tabla 4.5. Equivalencias entre las concentraciones expresadas en % (v/v) y las concentraciones expresadas µg/mL.

Concentración (%, v/v)	Equivalencias entre concentraciones en % (v/v) y µg/mL										
	Concentración (µg/mL)										
	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
$7,81 \times 10^{-6}$	0,08	0,09	0,07	0,07	0,08	0,07	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07
$7,81 \times 10^{-5}$	0,75	0,87	0,73	0,71	0,79	0,71	0,90	0,70	0,73	0,73	0,71
$1,56 \times 10^{-4}$	1,50	1,75	1,46	1,42	1,58	1,42	1,80	1,40	1,46	1,47	1,43
$3,13 \times 10^{-4}$	3,00	3,49	2,92	2,85	3,15	2,83	3,60	2,80	2,93	2,94	2,86
$6,25 \times 10^{-4}$	6,00	6,99	5,84	5,69	6,30	5,67	7,20	5,60	5,85	5,88	5,72
$1,25 \times 10^{-3}$	12,00	13,98	11,69	11,39	12,60	11,34	14,40	11,20	11,70	11,75	11,44
$2,50 \times 10^{-3}$	24,00	27,95	23,38	22,78	25,20	22,67	28,80	22,40	23,40	23,50	22,88
$5,00 \times 10^{-3}$	48,00	55,90	46,75	45,55	50,40	45,35	57,60	44,80	46,80	47,00	45,75
$1,00 \times 10^{-2}$	96,00	111,80	93,50	91,10	100,80	90,70	115,20	89,60	93,60	94,00	91,50
	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
$7,81 \times 10^{-6}$	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,09
$7,81 \times 10^{-5}$	0,70	0,68	0,73	0,72	0,69	0,77	0,81	0,75	0,76	0,74	0,87
$1,56 \times 10^{-4}$	1,41	1,36	1,46	1,45	1,37	1,54	1,63	1,49	1,51	1,47	1,74
$3,13 \times 10^{-4}$	2,82	2,72	2,92	2,90	2,74	3,07	3,25	2,98	3,03	2,95	3,49
$6,25 \times 10^{-4}$	5,63	5,44	5,84	5,79	5,48	6,14	6,51	5,97	6,05	5,89	6,97
$1,25 \times 10^{-3}$	11,26	10,88	11,68	11,59	10,96	12,29	13,01	11,94	12,10	11,79	13,95
$2,50 \times 10^{-3}$	22,52	21,75	23,35	23,18	21,92	24,58	26,02	23,88	24,20	23,58	27,90
$5,00 \times 10^{-3}$	45,05	43,50	46,70	46,35	43,85	49,15	52,05	47,75	48,40	47,15	55,80
$1,00 \times 10^{-2}$	90,10	87,00	93,40	92,70	87,70	98,30	104,10	95,50	96,80	94,30	111,60

4.4 Discusión

En la **Tabla 4.3** se aprecian los efectos de las muestras ensayadas sobre la MPO aislada y en presencia de leucocitos humanos. El ensayo sobre la MPO aislada determina la inhibición directa sobre la enzima. El ensayo en presencia de células examina la acción sobre un conjunto de procesos que incluye a los mecanismos inflamatorios, la secreción de la enzima por los neutrófilos y la inhibición de la MPO. La mayor parte de aceites esenciales, sus fracciones y los compuestos puros ensayados tuvieron un comportamiento similar en ambos tipos de pruebas, mostrando un cierto grado de actividad inhibitora.

La **Tabla 4.4** recoge los resultados de la quercetina (control positivo). La quercetina resultó ser más activa en ambas pruebas que cualquier muestra ensayada, siendo un potente inhibidor de la MPO. En un ensayo de inhibición de la MPO publicado en la literatura se obtuvo para la quercetina un valor de $IC_{50}=1,35 \mu\text{g/mL}$ (Rebuglio-Vellosa *et al.*, 2009); un valor similar al que obtuvimos en nuestro ensayo en ausencia de células ($IC_{50}=1,0 \mu\text{g/mL}$).

Los aceites esenciales ricos en fenoles (clavo, tomillo rojo y orégano español) fueron los más activos. La IC_{50} calculada para estos aceites esenciales varió entre 37 y 59 $\mu\text{g/mL}$ en el ensayo en ausencia de células y entre 16 y 80 $\mu\text{g/mL}$ en los experimentos en presencia de leucocitos. Sus componentes principales, eugenol, timol y carvacrol, también mostraron una actividad importante. La IC_{50} calculada para estos compuestos varió de 35 a 40 $\mu\text{g/mL}$ en los experimentos libres de células y de 19 a 51 $\mu\text{g/mL}$ en presencia de leucocitos (**Figuras 4.2, 4.3 y 4.4**).

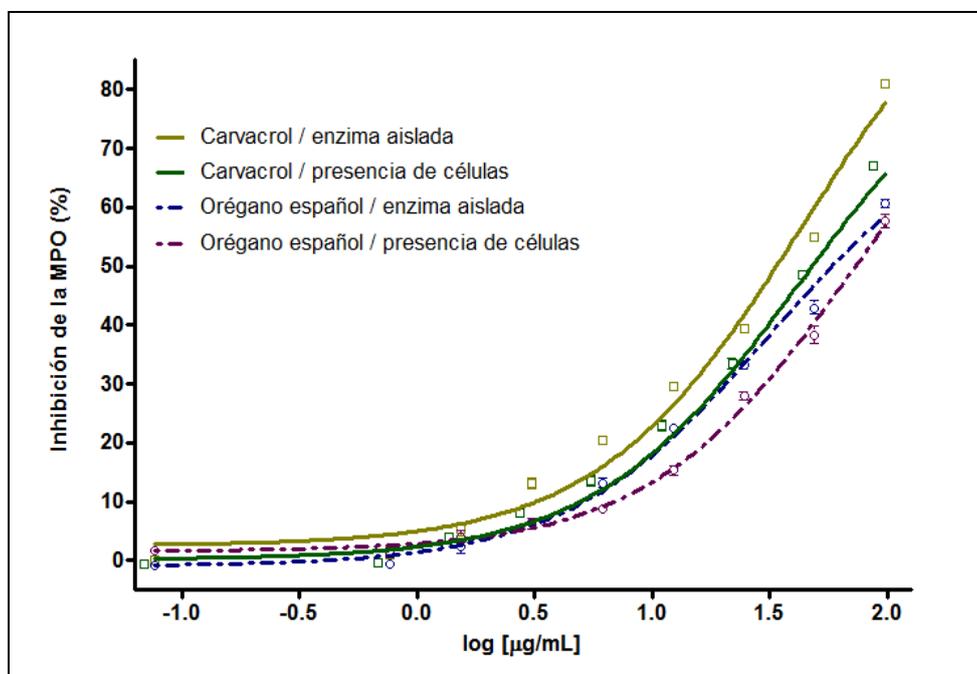


Figura 4.2. Inhibición (% media \pm DE) de la MPO aislada y en presencia de leucocitos humanos por el aceite esencial de orégano español y el carvacrol

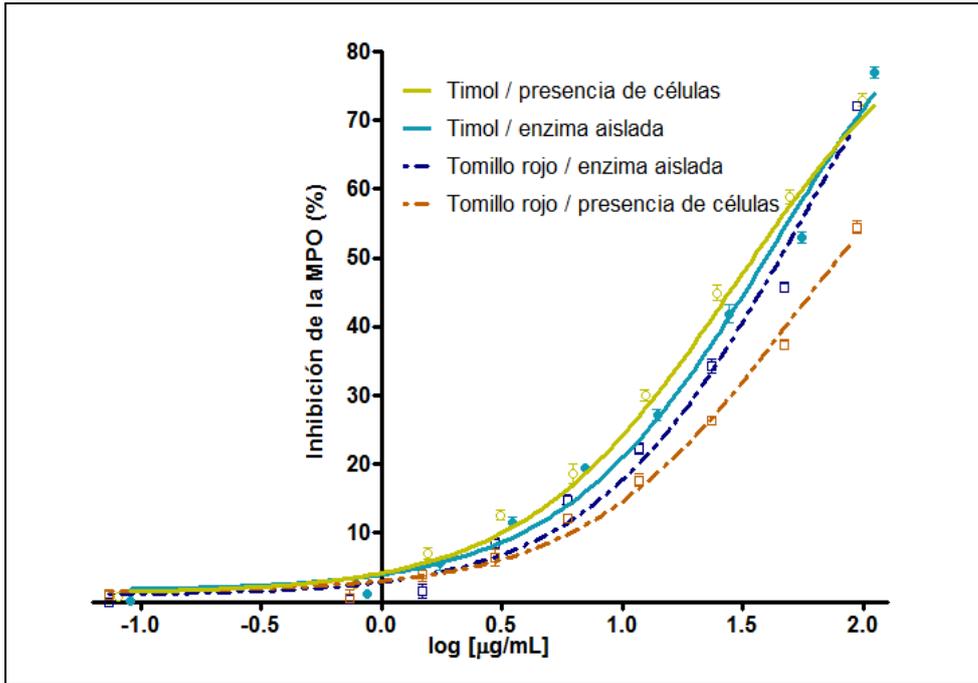


Figura 4.3. Inhibición (% , media \pm DE) de la MPO aislada y en presencia de leucocitos humanos por el aceite esencial de tomillo rojo y el timol.

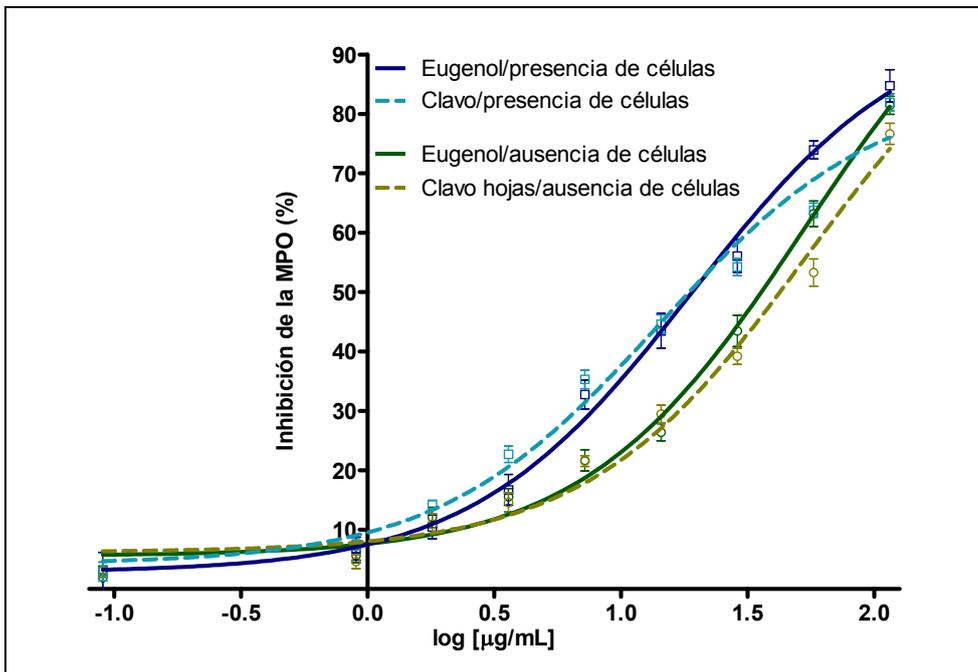


Figura 4.4. Inhibición (% , media \pm DE) de la MPO aislada y en presencia de leucocitos humanos por el aceite esencial de clavo y el eugenol.

Al examinar la literatura publicada encontramos que en un modelo de inflamación *in vivo* ya se había determinado que el carvacrol era capaz reducir la actividad de la MPO en el sitio inflamado (Botelho *et al.*, 2009). Sin embargo, sobre el aceite esencial de tomillo rojo o el timol no hemos encontrado publicados en la literatura ensayos de inhibición de la MPO.

Otros aceites esenciales ensayados también mostraron actividad inhibitoria de la MPO. En el experimento sobre la MPO aislada los aceites esenciales de laurel, enebro, niaulí, nuez moscada, romero, estragón, jengibre y árbol del té produjeron inhibiciones que variaron entre el 40% y el 60% a la concentración más alta examinada. Cuando los experimentos de inhibición *in vitro* de la MPO fueron realizados en presencia de leucocitos sólo los aceites esenciales de enebro y laurel alcanzaron actividades inhibitoras de entre el 30% y el 50% a la concentración más alta ensayada. Para la mayoría de los aceites esenciales examinados, la actividad encontrada en el experimento en ausencia de células fue mayor que en el experimento en presencia de leucocitos.

Con la esencia de romero sucedió como en otros aceites esenciales; el grado de inhibición en el ensayo en ausencia de células fue mayor que en el ensayo en presencia de células (**Figura 4.5**). Un ensayo publicado anteriormente en la literatura científica ya había encontrado que el aceite esencial de romero era capaz de reducir significativamente los valores de la MPO en los tejidos inflamados de ratones a los que se les había inducido colitis (Juhás *et al.*, 2009). En la composición de la esencia de romero predomina el 1,8-cineol (49,7%). Otro ensayo con ratas a las que se les indujo colitis también había confirmado que el 1,8-cineol puro reducía la actividad de la MPO en el tejido afectado (Santos *et al.*, 2004). A pesar de esto se puede destacar que no hemos podido encontrar referencias en la literatura a ensayos *in vitro* de inhibición de la MPO aislada por el aceite esencial de romero o el 1,8-cineol. En otros aceites esenciales no se pudo detectar diferencias significativas entre las inhibiciones determinadas en ausencia y en presencia de células. En este grupo aparecen los aceites esenciales de tomillo, orégano español, cayeputi, enebro, laurel, palmarosa, limón y timol.

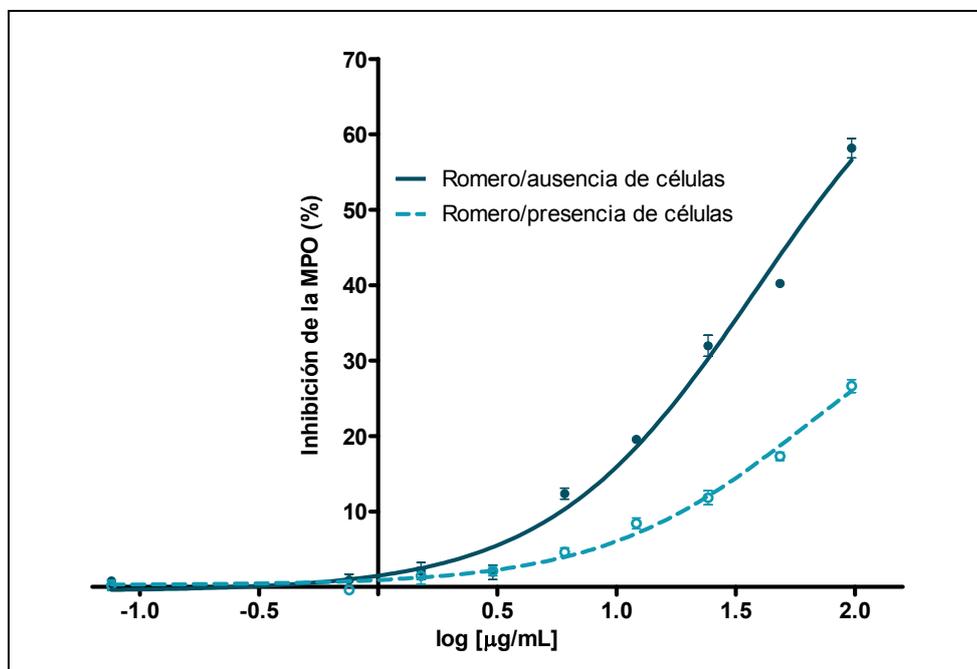


Figura 4.5. Inhibición (% , media \pm DE) por el aceite esencial de romero de la MPO aislada y en presencia de leucocitos humanos.

En cambio, el aceite esencial de clavo y el eugenol exhibieron un comportamiento muy diferente (**Figura 4.4**). Las IC_{50} calculadas para el clavo y el eugenol fueron mayores (menor actividad) en el ensayo en ausencia de células (37,2 $\mu\text{g/mL}$ para el clavo y 35,9, $\mu\text{g/mL}$ para el eugenol) que en el ensayo en el que estaban presentes los leucocitos (16,3 $\mu\text{g/mL}$ para el clavo y 19,2 $\mu\text{g/mL}$ para el eugenol). Estos resultados sugieren la participación de otros mecanismos que van más allá de la inhibición enzimática de la MPO. En la literatura publicada existen referencias a la capacidad del eugenol de inhibir la NADPH oxidasa y la desgranulación de los neutrófilos, además es conocido el poder de este compuesto de eliminar los radicales libres (Chen *et al.*, 2008). El efecto del eugenol mediante estos y otros mecanismos podría interferir con la secreción de la MPO, explicando así la mayor inhibición en la prueba realizada en presencia de leucocitos. La actividad del aceite esencial de clavo está relacionada sin duda con su contenido en eugenol pues ambas muestras presentan un comportamiento paralelo. Es totalmente novedoso que aquí se examinara el efecto inhibitor del eugenol sobre la MPO aislada pues no hemos encontrado referencias al respecto en la literatura.

En conclusión, la mayoría de aceites esenciales ensayados mostraron actividad inhibitora, más intensa en la MPO aislada que en presencia de leucocitos. Los más activos fueron los de clavo, tomillo rojo y orégano español, así como sus principales componentes (eugenol, timol y carvacrol). A diferencia de las demás muestras, el aceite esencial de clavo y el eugenol mostraron mayor actividad en presencia de leucocitos que sobre la MPO aislada, lo que sugiere que otros mecanismos, además de la inhibición enzimática, están también involucrados.

5

Actividad sobre la producción de óxido nítrico

5.1 Introducción

5.1.1 Generalidades

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa, omnipresente en todos los vertebrados, de vida media corta y que es producida por la enzima conocida como óxido nítrico sintasa (NOS) en una reacción que convierte la L-arginina y el oxígeno en citrulina y NO . El óxido nítrico difunde libremente a través de las células debido a su pequeño tamaño (cerca de 30 dalton). Existen tres isoformas de NOS: la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS, también llamada NOS1), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS o NOS2) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS o NOS3). Cada una de estas isoformas puede ser expresada en una gran variedad de tejidos y tipos celulares. Las actividades de la eNOS y la nNOS están reguladas por las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Ambas isoformas son clasificadas como NOS constitutivas y a pesar de ello también pueden ser inducidas en algunos casos. Por ejemplo, la eNOS puede ser expresada a un nivel mayor que su nivel constitutivo bajo ciertas condiciones como el ejercicio, estimulación de estrógenos, hipotermia y los esfuerzos extremos. El NO generado por la eNOS o la nNOS sirve como molécula mensajera intercelular que participa en varios procesos fisiológicos que van desde la regulación del tono vascular y modulación del flujo sanguíneo hasta el desarrollo del aprendizaje, la actividad neural y la memoria. Por otro lado, la expresión de la iNOS es inducida por sustancias pro-inflamatorias como la interleucina-1 α (IL-1 α), el interferón- γ (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), las endotoxinas o los lipopolisacáridos microbianos (LPS). Todos ellos producen niveles altos y sostenidos de NO . En este caso el NO funciona como un medio de defensa del organismo frente a las infecciones (Kanwar *et al.*, 2009; Villanueva &

Giulivi, 2010). Sin embargo, más recientemente, se ha demostrado que la iNOS también se expresa constitutivamente en neuronas, riñones, hígado, pulmones, colon y queratinocitos. Así, a la luz de las investigaciones más recientes, la expresión y la actividad de las diferentes isoformas de la NOS es específica de cada tipo de células (Villanueva & Giulivi, 2010).

La síntesis del óxido nítrico y el efecto subsiguiente depende no solo de los tipos de células en las cuales el óxido nítrico es producido, sino también de las condiciones particulares experimentadas por las células, los órganos y el organismo completo en el momento de su producción. Por ejemplo, la producción del óxido nítrico por las células vasculares endoteliales es usualmente continua y en relativamente poca cantidad, contribuyendo al mantenimiento de la presión arterial normal y de la homeostasis sanguínea (Villanueva & Giulivi, 2010). Durante el shock séptico sin embargo, la expresión de iNOS es inducida en las células vasculares endoteliales, que a su vez liberan altas concentraciones de óxido nítrico; un proceso asociado con la aparición de vasoplejía e hipotensión persistente (López *et al.*, 2004). En otro ejemplo, la producción de óxido nítrico es controlada metabólicamente y puede ser afectada por la distribución y la expresión de las arginasas y las dimetil-arginasas, las concentraciones limitadas de sustrato (L-arginina), o las concentraciones locales de citrulina (un inhibidor competitivo de la dimetil-arginina dimetil-amino-hidrolasa) o de la dimetil-arginina asimétrica (un inhibidor no competitivo de la nNOS). La compartimentalización de la producción de óxido nítrico dentro de las células explica sus diferentes funciones y papeles en diferentes condiciones clínicas (Villanueva & Giulivi, 2010).

El NO también se asocia a un gran número de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. La inflamación es una respuesta normal del organismo para proteger a los tejidos de las infecciones, el daño o la enfermedad. La respuesta inflamatoria es un proceso complejo con varios elementos característicos que incluyen la activación de los monocitos, los granulocitos y los linfocitos, además de la liberación y activación de mediadores de la inflamación, el sistema del complemento y mediadores humorales. El proceso inflamatorio comienza con un estímulo que libera prostaglandinas de las células. Los LPS, por ejemplo, pueden inducir la iNOS y la ciclooxigenasa-2 (COX-2). La COX-2 actúa produciendo la prostaglandina E2 (PGE2). A su vez la PGE2 actúa dentro de las células para producir varios tipos y cantidades de citocinas, que son agentes proinflamatorios que completan el proceso al atraer leucocitos activos al sitio de la lesión o infección. Estas células destruyen cualquier agente infeccioso o dañino y eliminan los desechos celulares del tejido dañado (Pacher *et al.*, 2007; Jin *et al.* 2010).

A pesar de su importante papel, un exceso en la producción de NO es patogénico para aquel tejido del organismo que sufre el incremento agudo de las concentraciones de NO. Al ser esta molécula un radical, es capaz de dañar el funcionamiento del tejido normal. La mayor parte del tiempo la inflamación constituye un salvavidas que permite que nuestro cuerpo se defienda del ataque de bacterias causantes de enfermedades, virus o parásitos. En situaciones agudas, el proceso termina pronto y la recuperación comienza. El problema se produce cuando el proceso inflamatorio persiste y se convierte en crónico. Diferentes condiciones patológicas como la inflamación crónica, enfermedades autoinmunes y el cáncer están relacionadas estrechamente con la producción de cantidades excesivas de NO (Pacher *et al.*, 2007; Villanueva & Giulivi, 2010).

Otro compuesto derivado del NO y tan importante como éste en el desarrollo de los procesos inflamatorios es el peroxinitrito. La generación concurrente de NO y

superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) puede producir un producto de reacción citotóxico, el peroxinitrito (ONOO^-). El ONOO^- es un potente oxidante que está implicado en un grupo de procesos neurodegenerativos y patofisiológicos. El ONOO^- puede difundir libremente a través de las bicapas de fosfolípidos de las membranas para reaccionar con una amplia variedad de moléculas diana, las cuales incluyen a los fosfolípidos, las proteínas y el ADN, llevando a la muerte celular vía necrosis o apoptosis. A pesar de no ser un radical él mismo, el peroxinitrito es más reactivo que las moléculas que le dieron origen, induce modificaciones en las proteínas y ha sido asociado con el desarrollo de un grupo de enfermedades. Entre las modificaciones de las proteínas inducidas por el ONOO^- se incluyen la oxidación de proteínas (en los residuos de metionina, cisteína, triptófano o tirosina) y la nitración (en los residuos de tirosina o triptófano). La nitración de los residuos de tirosina en las proteínas puede interferir con vías de señalización que utilizan la fosforilación/defosforilación de tirosinas y las cuales regulan la proliferación celular, apoptosis y la oxidación. También la nitración de las proteínas mediada por el ONOO^- puede alterar su estructura terciaria y cuando el daño es severo llevarlas a ser inaccesible para la degradación por el proteosoma. Más aun, la habilidad del peroxinitrito de modificar las lipoproteínas de baja densidad puede iniciar señales celulares de inflamación, mitosis o acumulación de colesterol, resultando de esta forma en aterosclerosis. En el organismo sin embargo, no existen enzimas antioxidantes endógenas que puedan eliminar el peroxinitrito (Li *et al.*, 2003; Virag *et al.* 2003; Shin *et al.*, 2005).

La inflamación crónica puede ser el motor que impulsa muchas de las más temidas enfermedades de los ancianos. Puede estar entre los causantes de la degeneración cardíaca y de la desestabilización de la placa de ateroma, llevando al infarto cardíaco y los accidentes cerebrovasculares. Destruye las neuronas en el cerebro de las víctimas del Alzheimer y facilita el desarrollo y progresión del cáncer. Se puede resumir que la inflamación crónica promueve el desarrollo y progresión de las enfermedades degenerativas puesto que: 1) impide la función endotelial y el revestimiento vascular; 2) incrementa la activación de las plaquetas y la formación de coágulos; 3) agota los antioxidantes intrínsecos; 4) genera radicales libres y amplifica el estrés oxidativo; 5) dificulta la cicatrización de las heridas y la reparación de los tejidos; 6) promueve el envejecimiento celular y la muerte prematura de las células; 7) suprime o amplifica la respuesta inmune (Kanwar *et al.*; 2009).

La regulación de la iNOS resulta muy estricta durante la transcripción y a nivel post-transcripcional. Ambos tipos de mecanismos son los medios más importantes de regulación de la expresión de la iNOS. Las vías que llevan a la inducción de la expresión de la iNOS varían dependiendo de la célula y de la especie. La activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT-1 α y en consecuencia la activación del promotor de la iNOS parece ser esencial para la inducción de la iNOS en la mayoría de las células humanas. Se ha visto que las secuencias de las regiones que flanquean el extremo 5' (secuencias promotoras) de los genes que codifican la iNOS en mamíferos, presentan homologías en los sitios de unión a muchos factores de transcripción. Después de la inducción, la iNOS produce NO en forma continua hasta que la enzima es degradada (Pautz *et al.*; 2010).

Las grandes cantidades de NO producido por la iNOS pueden tener efectos beneficiosos desde el punto de vista microbicida, antiviral, antiparasitario y antitumoral. En contraste, la inducción aberrante de iNOS podría tener consecuencias deletéreas y como hemos visto antes, está involucrada en la patofisiología de múltiples enfermedades humanas como el asma, la artritis, la

esclerosis múltiple, la colitis, la psoriasis, enfermedades neurodegenerativas, el desarrollo de tumores, el rechazo de los trasplantes o el shock séptico. A la vista de esta multitud de efectos y funciones es muy clara la importancia de la comprensión de los mecanismos que regulan la producción del NO por la iNOS (Lechner *et al.*; 2005). En contraste con la nNOS y la eNOS, la regulación de la actividad de la enzima es inusual para la iNOS. Sin embargo, puesto que la actividad de la iNOS depende de la accesibilidad a la arginina, la regulación del transporte de arginina o el consumo de la arginina por otras vías metabólicas se ha demostrado que regula la actividad de la enzima iNOS (Mori, 2007). Adicionalmente se han identificado algunas proteínas que interactúan con la iNOS y regulan su actividad. Por ejemplo, en las células del tejido muscular liso vascular de ratas, la iNOS se ha encontrado que interactúa con la proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII). Todos los tratamientos que afectan de forma crónica la actividad de la CaMKII o su expresión, inhiben en forma significativa la actividad específica de la iNOS después de una inducción con citocinas. También la proteína de shock térmico 90 (hsp90) ha sido descrita como un activador alostérico de la iNOS en experimentos donde se emplearon células HEK 293 humanas, transcientemente transfectadas con plásmidos de expresión para iNOS y hsp90 (Yoshida & Xia, 2003; Jones *et al.*, 2007; Pautz *et al.*, 2010).

El factor nuclear κ B (NF- κ B) constituye una familia de factores de transcripción eucariotas que participan en la regulación de varios genes celulares involucrados en el procesamiento inmediato y temprano de la respuesta inflamatoria y la respuesta inflamatoria aguda, así como genes involucrados en la supervivencia celular. A partir de la activación, el heterodímero de NF- κ B es rápidamente trasladado al núcleo, donde activa la transcripción de los genes diana. Estos, incluyen a varias citocinas inflamatorias, los genes que codifican a la COX-2, la iNOS, inmunoreceptores, moléculas de adhesión celular y genes antiapoptóticos (Lee *et al.*, 2006). NF- κ B parece ser un punto importante, central y común lo mismo para los activadores que para los inhibidores de la expresión de la iNOS. Los LPS, la IL-1 β , el TNF- α y el estrés oxidativo inducen la expresión de la iNOS en diferentes tipos celulares mediante la activación de NF- κ B. También la inhibición de la expresión de iNOS por numerosos agentes, tales como los glucocorticoides, TGF- β 1 y sustancias antioxidantes sucede debido a la inhibición de la activación de NF- κ B. Esta inhibición puede resultar de la captura directa de NF- κ B por las interacciones proteína-proteína, el bloqueo de la translocación nuclear de NF- κ B, la inhibición de la actividad de trans-activación de NF- κ B o de la estimulación de la expresión de I- κ B, el inhibidor específico de NF- κ B (Feng *et al.*, 2002; Pascual & Glass, 2006).

La inhibición de la generación de NO es potencialmente beneficiosa en enfermedades tan diversas como la migraña y el shock séptico. Los estudios en humanos han mostrado que los inhibidores no selectivos de las diversas isoformas de NOS revierten el colapso vascular en los pacientes durante el shock séptico y reducen el dolor de cabeza cuando son suministrados en gran cantidad (Ashina *et al.*, 1999). Sin embargo, es una opinión generalizada que una selectividad de isoformas es necesaria si se quisiera lograr una eficacia terapéutica con un margen razonable de seguridad. Ciertamente, un estudio sobre el shock séptico, mostró que mientras que los parámetros hemodinámicos mejoraron al utilizar inhibidores, la inhibición de las NOS provocó un incremento de la mortalidad. El interés se centra en lograr la inhibición de la iNOS sin afectar a la eNOS (Kanwar *et al.*, 2009). Los inhibidores más conocidos y mejor estudiados de las NOS derivan en su mayor parte del sustrato natural de esta enzima, el aminoácido L-arginina. Entre ellos se

puede mencionar la NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) (Villanueva & Giulivi, 2010).

5.1.2 Actividad de los aceites esenciales sobre la producción de NO

La gran mayoría de los ensayos que buscan determinar la influencia de los aceites esenciales sobre la producción de NO han sido realizados *in vitro* con distintos tipos de macrófagos estimulados por LPS o alguna otra sustancia que desencadena la respuesta inflamatoria aguda. En la **Tabla 5.1** se realiza una revisión bibliográfica de la actividad de los aceites esenciales o sus constituyentes sobre la producción de NO *in vitro*. La **Tabla 5.2** reseña los estudios *in vivo*. Ambas tablas incluyen solamente los trabajos que se refieren a los aceites esenciales investigados en la presente tesis o a sus componentes. Se observa que el número de aceites esenciales investigados es limitado, especialmente *in vivo*, y que predominan los estudios sobre sus constituyentes.

Tabla 5.1. Revisión bibliográfica de la actividad sobre la producción de NO en ensayos *in vitro* descrita para los aceites esenciales investigados en la presente tesis.

Aceite esencial o compuesto	Ensayo	Resultados	Referencia
Alcanfor	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ >200 µg/mL	Tung <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	No tuvo actividad el alcanfor.	Choi <i>et al.</i> , 2004
Borneol	Ensayo con neuronas del cortex cerebral sometidas a privación de oxígeno. Se determina NO por Griess e iNOS por inmunoblotting.	Disminuyó significativamente la producción de NO y la inducción de iNOS después de la privación de oxígeno.	Liu <i>et al.</i> , 2011
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ = 163,8 µg/mL	Choi <i>et al.</i> , 2004
Bornilo, acetato de	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ >200 µg/mL	Tung <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A 10 µg/mL la inhibición fue del 45,7%.	Tung <i>et al.</i> , 2008
Canfeno	Experimento con macrófagos de ratas. Las células fueron sometidas a stress oxidativo con ter-butil-hidroperóxido. Se determinó NO por Griess	El canfeno inhibió significativamente la producción de NO.	Tiwari & Kakkar, 2009
β-Cariofileno	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A 10 µg/mL la inhibición de la producción de NO fue del 50,9%.	Tung <i>et al.</i> , 2008
Cariofileno, óxido de	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ = 43,2 µg/mL	Tung <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A la concentración de 10 µg/mL se produjo una inhibición de la producción de NO del 54,0%.	Tung <i>et al.</i> , 2008
	Ensayo con macrófagos peritoneales de ratón estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ > 22,2 µg/mL	Matsuda <i>et al.</i> , 2001
Carvacrol	Ensayos de eliminación de NO en macrófagos murinos estimulados con LPS. Se determina actividad de NOS y producción y eliminación de NO.	Se redujo significativamente la producción de NO y la actividad de la NOS a 100 ng/mL. IC ₅₀ de inhibición del NO = 6,6 µg/mL.	Kavoosi <i>et al.</i> , 2012

	Ensayo con macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A 1, 10 y 100 µg/mL se redujo significativamente NO.	Guimarães <i>et al.</i> , 2012
	Ensayo con monocitos humanos estimulados con PMA. Se determina NO y la actividad de la NOS.	Redujo significativamente la producción de NO y la actividad de la NOS a 0,1 µg/mL.	Kavoosi & Teixeira da Silva, 2012
	Ensayo con macrófagos alveolares porcinos estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	Estimuló la producción de IL-1β por sí mismo pero inhibió la producción de IL-1β y NO en macrófagos estimulados.	Liu <i>et al.</i> , 2012b
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina el NO por Griess.	A 25 µM la inhibición (%) de NO fue: carvacrol (3,8 µg/mL) (35,1%).	Bourgou <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo de captación de radicales NO con empleo de nitroprusiato de sodio y reactivo de Griess.	Captó el radical NO de forma dosis dependiente (1 µg/mL - 1 mg/mL).	Guimarães <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	Inhibición de la producción de NO (IC ₅₀ en µg/mL): carvacrol (173,1)	Choi <i>et al.</i> , 2004
<i>p</i> -Cimeno	Ensayos con macrófagos murinos estimulados con LPS. Se determina NO y la actividad de NOS.	No tuvo actividad.	Kavoosi <i>et al.</i> , 2012
	Ensayo con monocitos humanos estimulados con PMA. Se determina producción de NO y actividad de la NOS.	El <i>p</i> -cimeno no manifestó actividad a esa concentración.	Kavoosi & Teixeira da Silva, 2012
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina el NO por Griess.	A 25 µM la inhibición fue 3,4 µg/mL, L-NAME (control positivo) a 250 µM (67,4 µg/ml) inhibición del 45,7%.	Bourgou <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	Inhibió la producción de NO.	Choi <i>et al.</i> , 2004
Cineol	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ =150,3 µg/mL	Choi <i>et al.</i> , 2004
Citral	Ensayo de relajación de anillos de aorta procedente de ratas. Se utilizó L-NAME para estudiar implicación de mecanismo ligado a NO.	Produjo relajación significativa y su efecto disminuyó en presencia de L-NAME, un inhibidor de la enzima NOS.	Lopes Pereira <i>et al.</i> , 2013
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ =149,6 µg/mL de la inhibición	Choi <i>et al.</i> , 2004
Citronelol	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ =170,1 µg/mL	Choi <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrus limon</i>	No se indica	No se indica el efecto del aceite esencial	Aazza <i>et al.</i> , 2014
<i>Cymbopogon martinii</i>	Ensayo de captación de radicales NO con empleo de nitroprusiato de sodio y reactivo de Griess.	IC ₅₀ = 56,9 µg/mL.	Tsai <i>et al.</i> , 2011
β-Elemeno	Ensayo con macrófagos peritoneales de rata estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A una concentración de 20,4 µg/mL la producción de NO se inhibió significativamente.	Lim <i>et al.</i> , 2002
Eucaliptol	Ensayo con macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Se determina iNOS y NF-κB por western blot.	El tratamiento con eucaliptol inhibió significativamente la expresión de iNOS y NF-κB.	Trinh <i>et al.</i> , 2011
<i>Eugenia uniflora</i>	Ensayo con macrófagos peritoneales murinos no estimulados y estimulados por <i>Leishmania amazonensis</i> . Se determina NO por Griess.	En macrófagos no estimulados hubo inhibición de NO a 100 y 50 µg/mL. No hubo efecto a 125, 12.5, 6.25 y 3.12 µg/mL. En macrófagos estimulados no hubo cambios significativos en ningún tratamiento.	da Franca Rodrigues <i>et al.</i> , 2013

Eugenol	Ensayo con macrófagos peritoneales murinos estimulados y no estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	En macrófagos no estimulados aumentó NO entre 0,001 y 1 µg/mL y disminuyó entre 10 y 100 µg/mL. En macrófagos estimulados disminuyó NO a todas las concentraciones ensayadas (0,001-1000 µg/mL).	Dibazar <i>et al.</i> , 2014
	Ensayo con macrófagos alveolares porcinos estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	El eugenol inhibió la producción de IL-1β y NO en los macrófagos estimulados con LPS.	Liu <i>et al.</i> , 2012b
	Ensayo con macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	El eugenol inhibió significativamente la producción de NO.	Chaurasia & Tripathi, 2011
	No se indica.	El NO manifestó capacidad de captar el radical NO.	Jung <i>et al.</i> , 2011
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina expresión de iNOS.	El eugenol inhibió la expresión de iNOS. También inhibió los factores de transcripción NF-κB y AP-1.	Yeh <i>et al.</i> , 2011
	Ensayo con macrófagos peritoneales aislados de ratones. Se estimuló la oxidación tóxica con nicotina (10 mM). Se determinó NO por Griess.	Redujo significativamente la toxicidad causada por la nicotina, restaurando los valores normales de NO.	Kar Mahapatra <i>et al.</i> , 2009
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A la concentración de 10 µg/mL la inhibición fue del 46,2%.	Tung <i>et al.</i> , 2008
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess, la expresión de iNOS por RT-PCR y la expresión de factores de transcripción por western blot.	Inhibición del NO de 19,5% a 16,4 µg/mL y de 49,7% a 1000 µM (164,2 µg/mL). Inhibe la expresión de iNOS a 10 y 100 µM. Inhibe la expresión de NF-κB, I-κBα, ERK1/2, y la cinasa p38.	Choi <i>et al.</i> , 2007
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess. Se determina la expresión de iNOS por western blot.	Viabilidad >90% hasta 65,7 µg/mL; IC ₅₀ = 16,4 µg/mL. Inhibición de la iNOS dosis dependiente.	Li <i>et al.</i> , 2006
Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ = 160,2 µg/mL	Choi <i>et al.</i> , 2004	
Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	Poca actividad. Se obtuvieron resultados similares con el iNOS.	Lee <i>et al.</i> , 2002	
iso-Eugenol	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess e iNOS por inmunoblotting.	Inhibió la producción de NO y la inducción de iNOS en modo dosis-dependiente.	Huang <i>et al.</i> , 2011
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess, expresión de iNOS por RT-PCR y expresión de los factores de transcripción por western blot.	Inhibe producción de NO en 78,3% a 16,4 µg/mL y 72,6% a 164,2 µg/mL. Inhibe expresión de iNOS a 10 y 100 µM. Inhibe la expresión de NF-κB, I-κBα, ERK1/2, y la cinasa p38.	Choi <i>et al.</i> , 2007
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess y la expresión de iNOS por western blot.	Viabilidad >90% hasta 8,2 µg/mL; IC ₅₀ 1,6 µg/mL. iNOS fue inhibida en modo dosis dependiente.	Li <i>et al.</i> , 2006
metil-Eugenol	Ensayo con células gliales de ratas estimuladas con LPS. Se determina el NO por Griess y la expresión de la iNOS por PCR.	A 10 µM (1,78 µg/mL) produjo una inhibición de la producción de NO y la expresión de la iNOS.	Choi <i>et al.</i> , 2010
Geranilo, acetato de	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determinó la transcripción de iNOS mediante RT-PCR.	El acetato de geranilo no tuvo efecto significativo sobre la transcripción de iNOS.	Lee <i>et al.</i> , 2009

Geraniol	Ensayo con células gliales de ratas estimuladas con LPS. NO por Griess.	A 2,0 µg/mL no produjo cambios en la producción de NO.	Elmann <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS y alendronato. Se determina NO por Griess.	Inhibió significativamente NO a 3,9; 7,7 y 15,4 µg/mL.	Marcuzzi <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess y iNOS por western blot.	Inhibió NO en modo dosis-dependiente. Disminuyó la expresión de iNOS.	Su <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos de ratas con stress oxidativo por ter-butil-hidroperóxido. NO por Griess	El geraniol inhibió significativamente la producción de NO.	Tiwari & Kakkar, 2009
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	No tuvo actividad el geraniol.	Choi <i>et al.</i> , 2004
E-2-Hexenal	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS e IFN-γ. Se determina NO por Griess.	IC ₅₀ =28,6 µg/mL	Choi <i>et al.</i> , 2004
Limoneno	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina el NO por Griess.	IC ₅₀ = 70,1 µg/mL	Conforti <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con linfoma de células T murinas. Células no estimuladas. Se determina el NO por Griess y la iNOS por western blot.	Incrementos en la producción de NO y de expresión de la iNOS.	Manuele <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina el NO por Griess e iNOS por western blot.	El tratamiento del 0,04% redujo la producción de NO y la expresión de la iNOS.	Yoon <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determinó la transcripción de iNOS por RT-PCR.	El limoneno no tuvo efecto significativo sobre la transcripción de iNOS.	Lee <i>et al.</i> , 2009
	Ensayo con macrófagos aislados a partir de ratones con tumor y ratones normales.	Incrementó NO en los macrófagos con tumor y no tuvo efecto en los normales.	Del Toro-Arreola <i>et al.</i> , 2005
Linalol	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO, iNOS IL-6 y TNF-α.	A 25 o 50 µg/mL se redujeron significativamente la producción de NO y la expresión de iNOS, IL-6 y TNF-α.	Maeda <i>et al.</i> , 2013
	Ensayo con monocitos humanos estimulados con PMA. Se determina NO y actividad de la NOS.	El linalol no manifestó actividad.	Kavoosi & Teixeira da Silva, 2012
	Ensayo con células gliales de ratas estimuladas con LPS. Se determina el NO por Griess.	La concentración de 2,5 µg/mL de linalol no provocó cambios en la producción de NO.	Elmann <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	linalol IC ₅₀ >200 µg/mL	Tung <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos J774.A1 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess y la expresión de la iNOS por western blot.	El linalol inhibió la producción de NO en modo dosis dependiente. La expresión de iNOS no se modificó.	Peana <i>et al.</i> , 2006
Mirceno	Ensayo de captación de radicales NO y ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A 0,32; 0,64 y 1,25 µL/mL se redujeron significativamente la producción de NO y captaron significativamente los radicales NO presentes.	Valente <i>et al.</i> , 2013b
	Ensayo con macrófagos peritoneales de rata estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	Se inhibió significativamente la producción de NO a la concentración de 13,6 µg/mL.	Lim <i>et al.</i> , 2002

Capítulo 5. Actividad sobre la producción de óxido nítrico

β -Pinenol	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina el NO por Griess.	A 25 μ M (3,5 μ g/mL) la inhibición fue del 33,8%.	Bourgou <i>et al.</i> , 2010
Sabineno	Ensayo de captación de radicales NO y ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A 0,64 y 0,32 μ L/mL se redujeron significativamente la cantidad de radicales NO y la producción de NO.	Valente <i>et al.</i> , 2013a
	Ensayo de captación de NO y con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. NO por Griess.	A 0,32; 0,64 y 1,25 μ L/mL se redujo NO y captaron significativamente los radicales NO presentes.	Valente <i>et al.</i> , 2013b
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. NO por Griess.	IC ₅₀ = 189,3 μ g/mL	Conforti <i>et al.</i> , 2010
Terpinen-4-ol	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina el NO por Griess.	A 25 μ M (3,9 μ g/mL) la inhibición fue de 20,8% y para el L-NAME (control positivo) a 250 μ M (67,4 μ g/mL) del 45,7%.	Bourgou <i>et al.</i> , 2010
α -Terpineno	Ensayo con macrófagos peritoneales de rata estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	La producción de NO fue inhibida por una concentración de 13,6 μ g/mL de α -terpineno.	Lim <i>et al.</i> , 2002.
γ -Terpineno	Ensayo con monocitos humanos estimulados con PMA. Se determina producción de NO y actividad de la NOS.	El γ -terpineno no manifestó actividad a esa concentración.	Kavoosi & Teixeira da Silva, 2012
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina el NO por Griess.	Con tratamiento de 25 μ M (3,4 μ g/mL) fue del 28,5%.	Bourgou <i>et al.</i> , 2010
α -Terpineol	Ensayo con macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Se determina iNOS y NF-kB por western blot.	El tratamiento con α -terpineol inhibió significativamente la expresión de iNOS y NF-kB.	Trinh <i>et al.</i> , 2011
	Ensayo con células endoteliales de conejo no estimuladas. NO determinado por citometría de flujo.	El α -terpineol provocó ligero aumento de la producción de NO.	Ribeiro <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determina NO por Griess.	A 10 μ g/mL la inhibición fue del 38,1%.	Tung <i>et al.</i> , 2008
Timol	Ensayo con macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Se determina iNOS y COX-2 por western blot.	Los tratamientos de 10, 20 y 40 μ g/mL resultaron en una reducción significativa de iNOS y COX-2.	Liang <i>et al.</i> , 2014
	Ensayos macrófagos murinos estimulados con LPS. Se determina eliminación del radical NO, producción de NO y actividad de NOS.	Se redujo NO y la actividad de la NOS sintasa a 100 ng/mL. IC ₅₀ de eliminación de NO fue 4,7 μ g/mL	Kavoosi <i>et al.</i> , 2012
	Ensayo con monocitos humanos estimulados con PMA. Se determinan NO y NOS.	Se redujo significativamente la producción de NO y la actividad de la NO sintasa a 0,1 μ g/mL.	Kavoosi & Teixeira da Silva, 2012
	Ensayo con PMN humanos estimulados con fMLP y PMA. Se determina NO por luminol y se añade L-argina como donador de NO.	Inhibición dosis dependiente de los picos de luminiscencia (NO). Menor concentración activa es 2,73 μ g/mL y la más activa examinada es 21,87 μ g/mL.	Braga <i>et al.</i> , 2006
	Ensayo con compuesto generador de NO. Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados con LPS. Se determinó el NO por Griess y la expresión de iNOS por PCR-RT.	Eliminado el NO generado en forma moderada. Producción de NO por macrófagos inhibida débilmente. Expresión de la iNOS no se modificó.	Ogiwara, 2005

Tabla 5.2. Revisión bibliográfica de la actividad sobre la producción de NO en ensayos *in vivo* descrita para los aceites esenciales investigados en la presente tesis.

Aceite esencial o compuesto	Ensayo	Resultados	Referencia
Anetol	Ensayo con ratones con daño agudo del pulmón inducido por LPS. Se determina la producción de NO. Pretratamiento de 62,5; 125; 250 y 500 mg/kg.	A 125 y 250 mg/kg se redujo significativamente la producción de NO. A 62,5 y 500 mg/kg no produjeron cambios significativos.	Kang <i>et al.</i> , 2013
Canfeno + geraniol	Ensayo con ratas con hepatotoxicidad provocada. Se determina iNOS por RT-PCR y RNS por citometría de flujo.	Las RNS y la iNOS se redujeron significativamente con tratamiento de canfeno/geraniol (1:1 v/v).	Singh <i>et al.</i> , 2012
β -Cariofileno	Ensayo con ratones con edema provocado en la pata. Se determina la expresión de la iNOS por western blot.	Inhibió significativamente la expresión de la iNOS.	Fernández <i>et al.</i> , 2007
Carvacrol	Ensayo con ratas con hepatotoxicidad inducida. Se determinó expresión de iNOS por Western blot. Ensayo con truchas con dieta suplementada en carvacrol. Se determinó el NO en sangre por Griess.	El tratamiento con carvacrol inhibió significativamente la expresión de la iNOS. Después de 8 semanas en las truchas suplementadas con carvacrol aumentó la producción de NO.	Aristatile <i>et al.</i> , 2013 Giannenas <i>et al.</i> , 2012
1,8-Cineol	Ensayo con ratas a las que se administró simultáneamente nicotina (3 mg/kg) y 1,8-cineol. Ensayo con ratones con infección vaginal de <i>Candida albicans</i> . La iNOS se determinó por western blot.	El tratamiento de 1 mg/kg provocó un aumento significativo de nitrito en sangre respecto al control. Después de 4 días de tratamiento se inhibió significativamente la expresión de iNOS.	Moon <i>et al.</i> , 2014 Trinh <i>et al.</i> , 2011
Eugenol	Ensayo <i>in vivo</i> con ratas con cardiotoxicidad provocada. Ensayo con ratones con tumor provocado en la piel. Se determinó la expresión de la iNOS por western blot.	El eugenol disminuyó la acumulación de NO en el tejido cardíaco. El tratamiento con eugenol disminuyó significativamente la expresión de la iNOS.	Fouad & Yacoubi, 2011 Kaur <i>et al.</i> , 2010
α -Humuleno	Ensayo con ratones con edema provocado en la pata. Se determina la expresión de la iNOS por western blot.	Inhibió significativamente la expresión de la iNOS.	Fernández <i>et al.</i> , 2007
Limoneno	Ensayo con ratas con estrés oxidativo inducido por doxorubicin. Alimentación suplementada al 5 y al 10% por 20 días. Ensayo en ratones con pleuritis inducida por LPS. Se determina la producción de NO.	Los tratamientos con limoneno redujeron significativamente iNOS, NO, NFkB y COX-2 Los tratamientos con limoneno inhibieron significativamente la producción de NO.	Rehman <i>et al.</i> , 2014 Souza <i>et al.</i> , 2003
Mirceno	Ensayo en ratones con pleuritis inducida por LPS. Se determina la producción de NO.	Los tratamientos con mirceno inhibieron significativamente la producción de NO.	Souza <i>et al.</i> , 2003
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Ensayo con codornices alimentadas con pienso suplementado. Se determinó el NO en sangre por Griess.	La dieta suplementada a razón de 140 mg/kg mantuvo los niveles de NO del grupo control.	Bulbul <i>et al.</i> , 2012
<i>Syzygium aromaticum</i>	Ensayo con larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> con dietas suplementadas a razón de 30 y 50 mg/L. Se determinó el NO en la hemolinfa por Griess.	El tratamiento provocó un aumento significativo a ambas concentraciones pero mucho mayor a 30 mg/L.	Cruz <i>et al.</i> , 2014
α -Terpineol	Ensayo con ratones con infección vaginal de <i>Candida albicans</i> . La iNOS se determinó por western blot.	Después de 4 días de tratamiento se inhibió significativamente la expresión de iNOS.	Trinh <i>et al.</i> , 2011
Timol	Ensayo con truchas arcoiris alimentadas con dietas suplementadas con timol. Se determinó el NO en sangre por Griess.	Después de 8 semanas en las truchas suplementadas con timol se mantuvo igual al control la producción de NO.	Giannenas <i>et al.</i> , 2012

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Fundamento

Las concentraciones de NO fueron medidas empleando la reacción de Griess. En esta reacción se detecta el anión nitrito (NO^-) pues el radical NO posee una vida media muy corta, lo que lo hace muy difícil de detectar. La medición es colorimétrica (540 nm) e involucra la formación de un cromóforo mediante la diazotación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguida de una copulación con una amina bicíclica (Green *et al.*, 1982; Griess 1879).

La determinación de la actividad sobre la producción de NO de las muestras bajo estudio en leucocitos humanos se realizó siguiendo la metodología descrita por Carreras *et al.* (1994). Este procedimiento sufrió ligeras modificaciones pues en lugar de emplear el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) como estimulante de la producción de NO se utilizaron lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Además, se añadió L-arginina al medio de reacción que actuó como fuente de NO. El acetato de NG-metil-L-arginina (L-NMMA), un reconocido inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa, fue empleado como control positivo.

5.2.2 Preparación de las muestras de aceites esenciales

Se tomaron 10 μL de cada aceite esencial que se añadieron a un eppendorf de 1,5 mL previamente tarado. Se determinó su masa en balanza analítica. Se completó el volumen hasta 1 mL con solución de Hanks con NaHCO_3 y sin fenol red. Esta solución había sido previamente suplementada con un 10% de DMSO y 1,5% del emulgente alimentario E-484 con el fin de facilitar la solubilidad de los aceites esenciales. Los aditivos o solventes empleados fueron ensayados previamente para descartar que presentaran algún tipo de actividad por sí mismos. Se sometió la mezcla a vortex durante 2 minutos que fueron seguidos de 5 minutos en el equipo de ultrasonido. Se obtuvo una emulsión del aceite esencial, designada como solución madre. A partir de la solución madre se realizaron una serie de diluciones empleando como solvente a la solución de Hanks con los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Las diluciones fueron secuenciales: (solución madre) $\rightarrow \frac{1}{10} \rightarrow \frac{1}{2} \rightarrow \frac{1}{10}$. Al añadir el tratamiento a la placa ocurre una dilución $\frac{1}{10}$ de las concentraciones que se encuentran en el eppendorf. Fueron ensayadas todas las soluciones excepto la solución madre y la solución inicial $\frac{1}{10}$ (9 en total).

5.2.3 Material

- Reactivo de Griess modificado [Sigma, referencia: G4410].
- L-arginina [Sigma, referencia: W381918].
- Lipopolisacáridos bacterianos (LPS) de E. coli 0127:B8 [Sigma, referencia: L3129].
- Nitrito de sodio (NaNO_2) [Sigma, referencia: S2252].
- Acetato de N^G-metil-L-arginina (L-NMMA) [Sigma, referencia: M7033].
- Etilendiamina tetraacetato de sodio dihidratado ($\text{EDTA-Na}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). [Sigma, referencia: E6511].
- Cloruro de amonio (NH_4Cl). [Sigma, referencia: A9434].
- Bicarbonato de potasio (KHCO_3). [Sigma, referencia: P9144].
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) [Sigma, referencia: D1435].
- Solución salina de Hanks modificada, más cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (HBSS). [Sigma, referencia: H8264].
- Solución salina de Hanks modificada, sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (HBSS) [Sigma, referencia: H6648].

- Ricinoleato de gliceril-polietilenglicol (E484) [suministrado por Lidervet, S.L.].
- Microtubo tipo eppendorf 1,5 mL tapa plana [Rubilabor, referencia: 711.1500].
- Tubos plásticos de 50 mL sin faldón [Rubilabor, referencia: 644.2050].
- Tubos plásticos de 15 mL [Rubilabor, referencia: 644.2015].
- Placa microtiter 96 pocillos, fondo plano. [Rubilabor, referencia: 822.0005].
- Placas microtiter 96 pocillos, fondo U. [Rubilabor, referencia: 822.0001].
- Puntas de pipeta de 200 μ L [Rubilabor, referencia: 16-2001].
- Punta de pipeta de 10 mL [Rubilabor, referencia: 511.0002].
- Punta de pipeta 100-1000 μ L [Rubilabor, referencia: 015/162222].
- *Buffy coats* procedentes del *Banc de Sang i Teixits de Catalunya*.
- Espectrofotómetro para lectura de placas a 540 nm. [Microplate spectrophotometer, Benchmark Plus, BIORAD. País USA, 2004].

5.2.4 Solución de hemólisis

Se prepara una solución madre (x10) que se conserva a 4 °C y que está compuesta por: NH_4Cl (8,99 g); KHCO_3 (1,0 g); EDTA-Na_4 (0,037 g); H_2O MilliQ c.s.p. 100 mL. Esta solución madre se diluye 1:10 (v/v) en el mismo momento de uso. Con esta técnica se busca una acumulación de NH_4Cl en el interior de los eritrocitos. Se produce un aumento en la presión osmótica de los eritrocitos y como consecuencia la ruptura de la membrana celular (Bossuyt *et al.*; 1997).

5.2.5 Selección del tampón

Durante la manipulación de las células es necesario prevenir su agrupación, un fenómeno que se facilita en presencia de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . En cambio, para el ensayo funcional activo, se prefiere el tampón HBSS más cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} .

5.2.6 Obtención de la suspensión de leucocitos humanos

Se obtienen los leucocitos a partir de *buffy coats* provenientes del *Banc de Sang i Teixits de Catalunya*. Los *buffy coats* son la capa amarillenta rica en células blancas y plaquetas obtenidas por centrifugación de la sangre procedente de voluntarios humanos sanos. El procedimiento que se emplea para la obtención de la suspensión de leucocitos es la hemólisis (shock hemolítico) mediante el empleo de una solución de cloruro amónico (Bossuyt *et al.*; 1997).

1. -Se toman 500 μ L de sangre total que se depositan en tubos plásticos de 15 mL. Se añaden 5 mL de solución de hemólisis ya diluida.
2. -Tras 3 minutos de lisis, se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm y 4 °C y se elimina el sobrenadante.
3. -El acúmulo de células obtenido se lava con solución de HBSS sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (5 mL) y se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm.
4. -Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante y el acúmulo de células se resuspende en HBSS sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (4 mL).

La suspensión resultante contiene leucocitos y una cantidad variable de eritrocitos y restos celulares. Los restos se pueden minimizar con sucesivos lavados y centrifugaciones. Un incremento en el tiempo de lisis con cloruro amónico puede resultar en un aumento de la mortalidad. Las preparaciones celulares se mantuvieron en hielo hasta su empleo, el cual nunca fue superior a las 2 horas.

5.2.7 Método operatorio

1. -En una placa de fondo en forma de U se depositan 200 μL de la solución de leucocitos humanos.
2. -Se añaden 20 μL de muestra en los distintos grupos de tratamiento. Se añaden 20 microlitros de solución de Hanks con los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en los pocillos marcados como grupos control.
3. -Se incuba la placa 10 minutos a 37 °C con agitación horizontal.
4. -Se añaden 20 μL de LPS (3 mg/mL) en todos los pocillos. Se exceptúan los pocillos marcados como control sin LPS (concentración en pocillo 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se añade L-Arg 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20 μL de solución 2 mg/mL) en todos los pocillos.
5. -Se incuba durante 1 hora a 37 °C con agitación horizontal.
6. -Se centrifuga la placa a 2700 rpm durante 12 minutos.
7. -Se toman 100 μL del sobrenadante libre de células de cada pocillo y se traslada a una placa de fondo plano. Posteriormente se añaden 100 μL del reactivo de Griess y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.
8. -Se realiza la lectura a 540 nm.
9. -Se realiza una curva patrón de NaNO_2 .

5.2.8 Análisis de los datos

Las concentraciones de NO se calcularon a partir de una recta patrón de nitrito de sodio. El sobrenadante de leucocitos no expuestos a LPS se empleó como control negativo. El L-NMMA fue utilizado como control positivo. Los resultados fueron expresados como (%) de inhibición de la producción de NO. Este índice fue calculado a partir del valor de concentración de NO en el sobrenadante de los leucocitos estimulados con LPS y tratados con aceites esenciales versus los valores de concentración de NO en el sobrenadante de los leucocitos estimulados con LPS pero que no fueron tratados con los aceites esenciales (0% de inhibición).

5.2.9 Procesamiento de los resultados y estadística

Los datos reflejaron las medias \pm desviación estándar (DE) de cuatro experimentos independientes. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos con el control (0 % de inhibición) para cada muestra se realizaron mediante un análisis de varianza (one-way ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett (Dunnett's test). Como nivel de significación se tomó una $p < 0.05$. La concentración inhibitoria 50 % (IC_{50}) fue calculada por interpolación en una curva dosis-respuesta construida mediante una regresión no lineal que seguía un modelo de curva sigmoidea. La curva reflejaba la inhibición relativa (%) del NO versus el logaritmo de la concentración de las muestras ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Para el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad Prism versión 5.0 para Windows (San Diego, CA, USA).

5.3 Resultados

La capacidad de inhibir la producción óxido nítrico por las muestras ensayadas se resume en la **Tabla 5.3**. Las equivalencias entre las concentraciones expresadas en % (v/v) y su valor en $\mu\text{g}/\text{mL}$ están recogidas en la **Tabla 5.4**.

Tabla 5.3. Inhibición de la producción de NO en leucocitos humanos estimulados.

Inhibición de la producción de NO (%)													
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes												
	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel	Limón	Limón (terpenos)
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
7,81 x 10 ⁻⁷	2,0±2,7	2,9±3,5	1,8±0,8	-0,6±3,3	2,6±3,7	2,2±4,5	0,7±2,1	1,7±3,0	1,0±1,4	0,0±1,6	-0,1±0,9	-1,0±4,1	-1,0±1,5
7,81 x 10 ⁻⁶	5,1±3,1*	2,8±2,8	3,8±2,2	3,8±1,9	5,6±3,9	8,2±2,7*	13,3±3,4*	2,6±1,6	1,4±0,8	-1,3±1,7	3,0±1,9	0,5±2,8	2,1±3,6
7,81 x 10 ⁻⁵	6,4±2,8*	7,4±0,5*	3,2±2,4	4,8±3,6	5,8±3,7	12,2±3,3*	17,7±5,3*	2,6±0,3	2,9±0,9*	13,0±3,2*	2,9±1,5	1,0±4,1	1,3±1,8
1,56 x 10 ⁻⁴	9,5±2,6*	9,5±1,7*	4,4±2,0*	4,4±3,1	9,4±1,0*	23,5±4,0*	23,2±2,2*	9,4±1,7*	4,3±0,8*	25,6±1,7*	1,2±1,5	4,4±1,4	0,9±3,4
3,13 x 10 ⁻⁴	7,4±1,5*	16,5±1,3*	3,9±1,7	-1,1±2,8	12,8±3,0*	30,0±5,0*	28,0±2,9*	7,7±1,0*	6,1±1,7*	43,0±2,1*	2,1±1,9	1,3±3,0	1,5±1,1
6,25 x 10 ⁻⁴	8,3±1,4*	24,3±3,4*	3,2±2,1	-7,7±3,5*	20,4±2,7*	28,9±1,5*	33,3±0,6	13,7±0,7*	7,9±1,6*	62,9±3,5*	0,6±2,2	0,2±2,6	1,3±3,6
1,25 x 10 ⁻³	9,4±1,9*	34,1±1,7*	4,4±4,2*	-15,6±4,3*	33,5±3,7*	32,7±2,3*	48,3±4,2*	18,5±1,8*	8,7±0,4*	62,0±2,4*	1,1±1,9	3,3±3,5	2,2±2,3
2,50 x 10 ⁻³	7,8±3,2*	46,3±2,0*	4,2±1,2	-22,5±1,5*	42,7±2,8*	35,3±3,5*	55,3±3,2*	39,0±2,0*	10,2±1,9*	n/a	2,2±1,4	0,7±4,1	1,6±2,0
5,00 x 10 ⁻³	9,9±2,7*	51,0±0,4*	2,8±1,7	-30,8±1,4*	53,3±2,5*	42,7±3,8*	59,0±3,8*	44,6±1,4*	27,2±1,5*	n/a	2,9±1,7	2,0±2,5	2,5±2,6
IC₅₀ µg/mL	---	41,9±7,1	---	---	39,8±6,1	---	19,0±1,8	---	---	4,3±0,4	---	---	---

* Diferencias significativas ($p < 0.05$). n/a Valor no disponible.

Tabla 5.3. Continuación.

Inhibición de la producción de NO (%)											
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes									Control positivo	
	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol	Conc. µg/mL	L-NMMA
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,00	0,0±0,0
7,81 x 10 ⁻⁷	0,9±2,7	2,3±3,1	-1,7±4,3	0,3±4,0	2,9±1,1	-2,6±3,4	2,2±1,1	-1,8±1,3	-0,2±1,8	0,02	0,9±1,2
7,81 x 10 ⁻⁶	3,0±1,5	5,1±3,6	-1,9±5,8	5,4±1,1*	0,7±1,1	2,3±3,5	1,0±2,0	-0,4±1,0	-0,1±2,7	0,20	-0,2±1,3
7,81 x 10 ⁻⁵	2,4±3,2	3,4±3,6	0,6±2,8	6,2±2,0*	4,4±2,2*	-0,4±4,2	2,1±0,9	-0,8±1,7	-3,7±1,6	1,95	3,3±2,1
1,56 x 10 ⁻⁴	3,6±3,5	3,8±2,9	-0,4±3,0	7,3±1,9*	13,6±2,2*	0,5±2,3	2,5±2,6	-1,7±1,9	-1,0±3,3	3,91	10,7±1,7*
3,13 x 10 ⁻⁴	3,0±1,1	1,8±3,4	1,3±2,0	11,6±1,5*	14,7±2,4*	2,1±3,6	0,8±3,2	-1,6±3,2	-1,4±2,6	7,81	22,3±2,6*
6,25 x 10 ⁻⁴	2,4±2,4	3,8±2,8	-3,5±3,8	19,3±1,4*	22,2±1,9*	0,0±2,3	-3,2±2,6	-0,1±1,5	-17,2±0,5*	15,63	32,3±2,3*
1,25 x 10 ⁻³	3,9±1,6	4,8±3,5	2,0±2,0	30,3±2,2*	33,8±2,0*	1,1±1,6	-21,7±1,4*	0,7±0,7	-29,1±0,9*	31,25	43,9±0,8*
2,50 x 10 ⁻³	1,4±1,8	13,8±5,9*	3,0±3,2	32,2±1,7*	44,1±2,7*	1,8±2,4	-31,1±1,4*	-0,9±2,3	-16,7±1,8*	62,50	56,7±1,6*
5,00 x 10 ⁻³	2,9±1,3	32,6±3,7*	16,9±1,1*	21,8±1,6*	54,2±2,9*	0,0±2,8	n/a	-1,0±1,8	-14,8±1,0*	125,00	77,3±1,6*
IC₅₀ µg/mL	---	---	---	---	39,3±6,8	---	---	---	---	IC₅₀ µg/mL	38,2±1,4

* Diferencias significativas ($p < 0.05$). n/a Valor no disponible.

Tabla 5.4. Equivalencias entre las concentraciones expresadas en % (v/v) y las concentraciones expresadas µg/mL.

Equivalencias entre concentraciones en % (v/v) y µg/mL											
Concentración (%, v/v)	Concentración (µg/mL)										
	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
$7,81 \times 10^{-7}$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$7,81 \times 10^{-6}$	0,08	0,09	0,07	0,07	0,08	0,07	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07
$7,81 \times 10^{-5}$	0,75	0,87	0,73	0,71	0,79	0,71	0,90	0,70	0,73	0,73	0,71
$1,56 \times 10^{-4}$	1,50	1,75	1,46	1,42	1,58	1,42	1,80	1,40	1,46	1,47	1,43
$3,13 \times 10^{-4}$	3,00	3,49	2,92	2,85	3,15	2,83	3,60	2,80	2,93	2,94	2,86
$6,25 \times 10^{-4}$	6,00	6,99	5,84	5,69	6,30	5,67	7,20	5,60	5,85	5,88	5,72
$1,25 \times 10^{-3}$	12,00	13,98	11,69	11,39	12,60	11,34	14,40	11,20	11,70	11,75	11,44
$2,50 \times 10^{-3}$	24,00	27,95	23,38	22,78	25,20	22,67	28,80	22,40	23,40	23,50	22,88
$5,00 \times 10^{-3}$	48,00	55,90	46,75	45,55	50,40	45,35	57,60	44,80	46,80	47,00	45,75

Concentración (%, v/v)	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
	$7,81 \times 10^{-7}$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$7,81 \times 10^{-6}$	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,09
$7,81 \times 10^{-5}$	0,70	0,68	0,73	0,72	0,69	0,77	0,81	0,75	0,76	0,74	0,87
$1,56 \times 10^{-4}$	1,41	1,36	1,46	1,45	1,37	1,54	1,63	1,49	1,51	1,47	1,74
$3,13 \times 10^{-4}$	2,82	2,72	2,92	2,90	2,74	3,07	3,25	2,98	3,03	2,95	3,49
$6,25 \times 10^{-4}$	5,63	5,44	5,84	5,79	5,48	6,14	6,51	5,97	6,05	5,89	6,97
$1,25 \times 10^{-3}$	11,26	10,88	11,68	11,59	10,96	12,29	13,01	11,94	12,10	11,79	13,95
$2,50 \times 10^{-3}$	22,52	21,75	23,35	23,18	21,92	24,58	26,02	23,88	24,20	23,58	27,90
$5,00 \times 10^{-3}$	45,05	43,50	46,70	46,35	43,85	49,15	52,05	47,75	48,40	47,15	55,80

5.4 Discusión

Los resultados de los ensayos de actividad sobre la producción de óxido nítrico están recogidos en la **Tabla 5.3**. Un exámen de los resultados nos muestra que solo los aceites esenciales de clavo y jengibre alcanzaron valores de IC_{50} inferiores a $50 \mu\text{g/mL}$ (**Figura 5.1**). El aceite esencial de clavo reveló una $IC_{50} = 39,8 \mu\text{g/mL}$, el cual es un valor análogo al compuesto inhibitor de referencia (L-NMMA, $IC_{50} = 38,2 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo, el aceite esencial de jengibre manifestó la actividad más intensa ($IC_{50} = 4,3 \mu\text{g/mL}$), casi 9 veces menor que el compuesto de referencia. Este resultado destaca la capacidad del aceite esencial de jengibre de prevenir el daño celular por exceso de NO. En la literatura científica no hemos encontrado hasta ahora referencias a esta actividad del aceite esencial de jengibre. Sin embargo, la actividad inhibitora sobre la producción de NO que poseen otros tipos de extractos de la raíz de *Zingiber officinale* ya ha sido investigada con anterioridad (Shen *et al.*, 2005). También aparecen referencias a la capacidad de inhibir la producción de NO en otras plantas de la familia de las zingiberáceas. El aceite esencial procedente del *Zingiber cassumunar* Rox fue capaz de inhibir la producción de NO en experimentos *in vitro* con macrófagos estimulados con LPS (Leelarungrayub & Suttajit, 2009). Por otro lado, el aceite esencial de *Curcuma longa* Linn inhibió la producción de NO en ratas con isquemia cerebral provocada. El aceite esencial de *Curcuma longa* Linn, aunque difiere en su composición de la esencia de jengibre ensayada por nosotros, comparte varios de sus principales componentes como son el zingibereno, el β -sesquifelandreno y el β -bisaboleno (Dohare *et al.*, 2008).

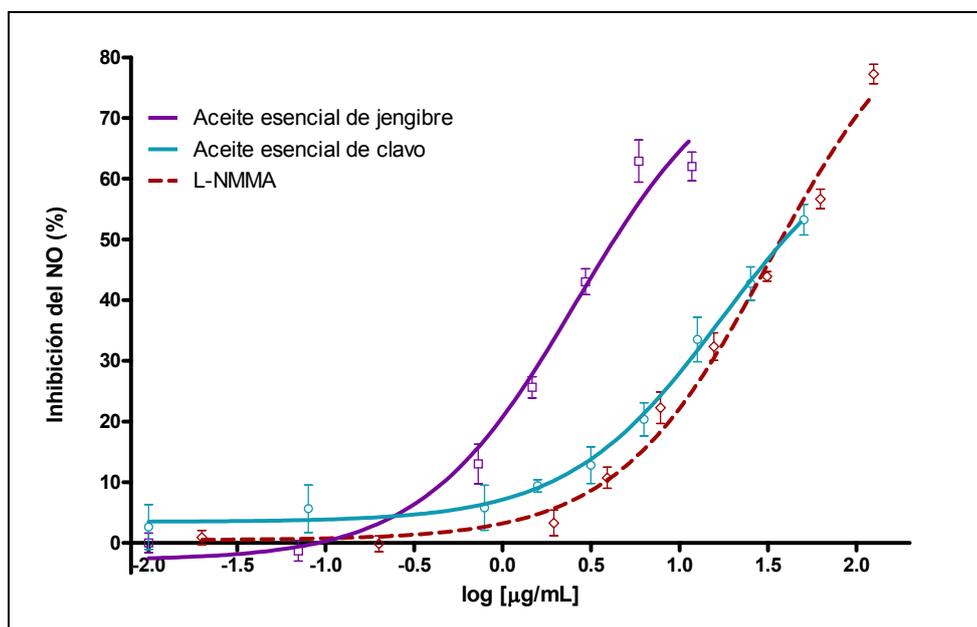


Figura 5.1. Inhibición (% , media \pm DE) de la producción de NO por el L-NMMA y los aceites esenciales de jengibre y clavo.

En el aceite esencial de clavo, la actividad inhibitora de la producción de NO se puede relacionar en gran medida con su alto contenido de eugenol (81,5%) (**Figura 5.2**). Este compuesto presentó una IC_{50} de $19,0 \mu\text{g/mL}$. También la fracción terpénica del clavo presentó una actividad que resultó ser significativa pero que no permitió calcular la IC_{50} para el rango de concentraciones ensayadas. El valor de $IC_{50} = 16,4 \mu\text{g/mL}$ que citan Li *et al.*, (2006) para el eugenol en un ensayo *in vitro* no

difiere mucho del obtenido en nuestros experimentos. La actividad del eugenol es probable que se encuentre relacionada con la capacidad de este compuesto de inhibir la expresión de la iNOS en forma dosis-dependiente. Además, el eugenol actúa sobre la expresión de otros factores de transcripción y proteínas implicadas en la expresión de la iNOS como son el TNF- α , el NF- κ B o la IL-1 β (Liu *et al.*, 2012b).

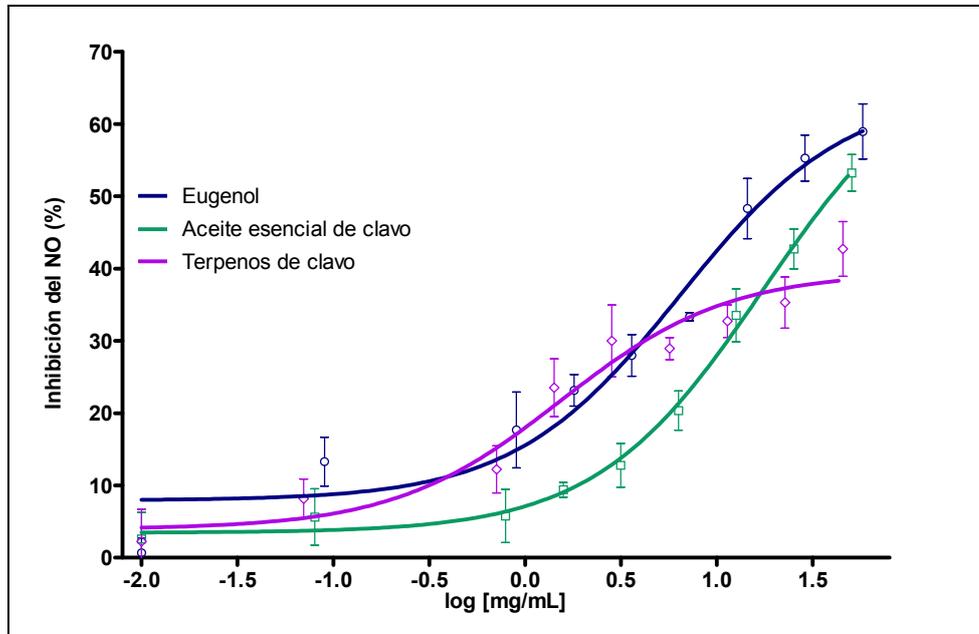


Figura 5.2. Inhibición (% , media \pm DE) de la producción de NO por el aceite esencial de clavo, la fracción terpénica del clavo y el eugenol.

Los principales componentes del aceite esencial de orégano español y del aceite esencial de tomillo rojo son el carvacrol y el timol respectivamente. Carvacrol y timol son monoterpenos fenólicos con una estructura que sólo se diferencia en la posición del grupo hidroxilo en el anillo aromático. Sin embargo, ambos compuestos muestran un comportamiento divergente en su efecto sobre la producción de NO. El carvacrol fue un inhibidor de la producción de NO (IC_{50} = 39,3 μ g/mL) mientras que el timol fue ligeramente estimulante de la producción de NO (14,8% a la concentración de 55,8 μ g/mL) (**Figura 5.3**). En cuanto al aceite esencial de orégano español no se han encontrado reportes previos en la literatura de su actividad sobre la producción de NO. En los experimentos realizados en nuestra investigación exhibió un efecto inhibidor del 21,8% a la concentración de 49,15 μ g/mL. Por su parte, el aceite esencial de tomillo rojo se mostró inactivo.

La mezcla de acetato de bornilo y acetato de isobornilo manifestó una actividad inhibidora de la producción de NO (IC_{50} = 41,9 μ g/mL) similar a la del L-NMMA. Tung *et al.* (2008) ya habían reportado actividad inhibidora en el acetato de bornilo que es el principal constituyente de la mezcla (**Figura 5.4**).

Por primera vez se estudió la actividad de los aceites esenciales de romero y de cilantro sobre la producción de NO. Ambos aceites esenciales mostraron una actividad estimulante sobre la producción de NO que fue dependiente de la concentración y alcanzó aproximadamente un 31% a la concentración más alta ensayada (**Figura 5.5**). El aceite esencial de cilantro está constituido en un 74,0 %

por linalol. De Almeida *et al.* (2007), en un ensayo *in vivo* con macrófagos murinos que fueron pre-tratados con aceite esencial de *Ocimum basilicum* y después incubados con *Giardia lamblia*, describen que la producción de NO en los macrófagos infectados aumentó en un 74,0% respecto al control. El aceite esencial de *Ocimum basilicum* contiene un 69,33 % de linalol, hecho que lo asemeja en la cantidad de este compuesto al aceite esencial de cilantro.

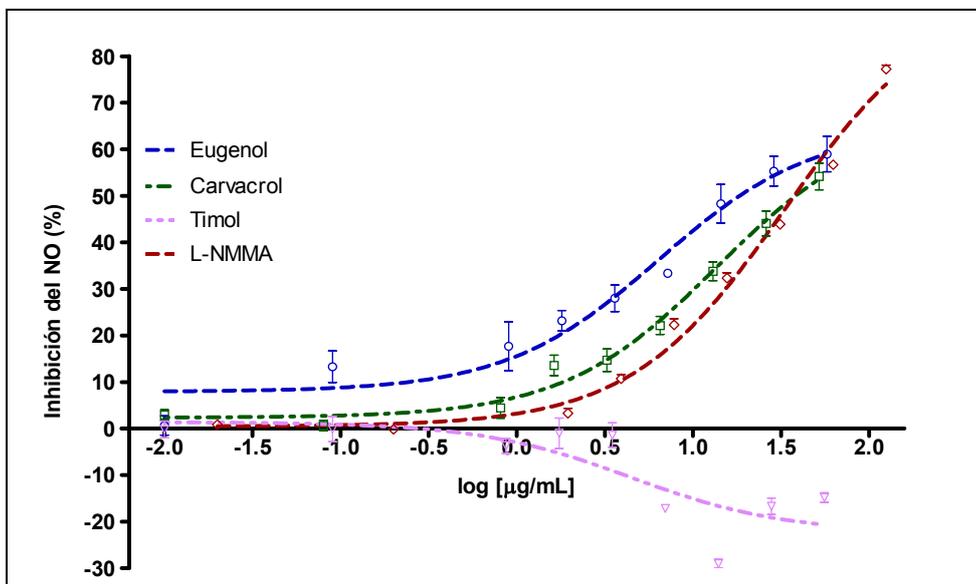


Figura 5.3. Inhibición (% , media±DE) de la producción de NO por los compuestos eugenol, carvacrol, timol y L-NMMA.

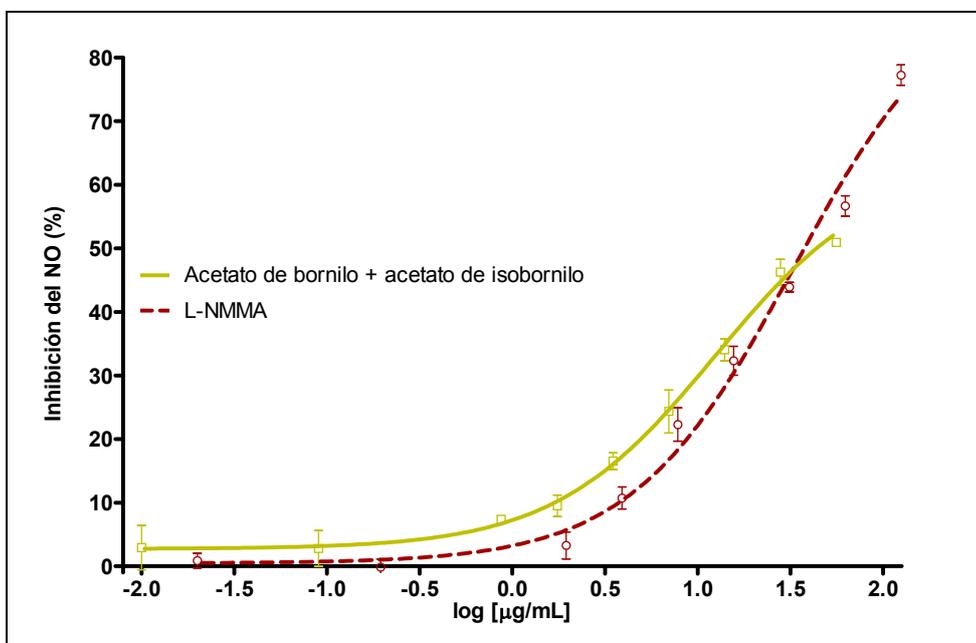


Figura 5.4. Inhibición (% , media±DE) de la producción de NO por la mezcla de acetato de bornilo + acetato de isobornilo y L-NMMA.

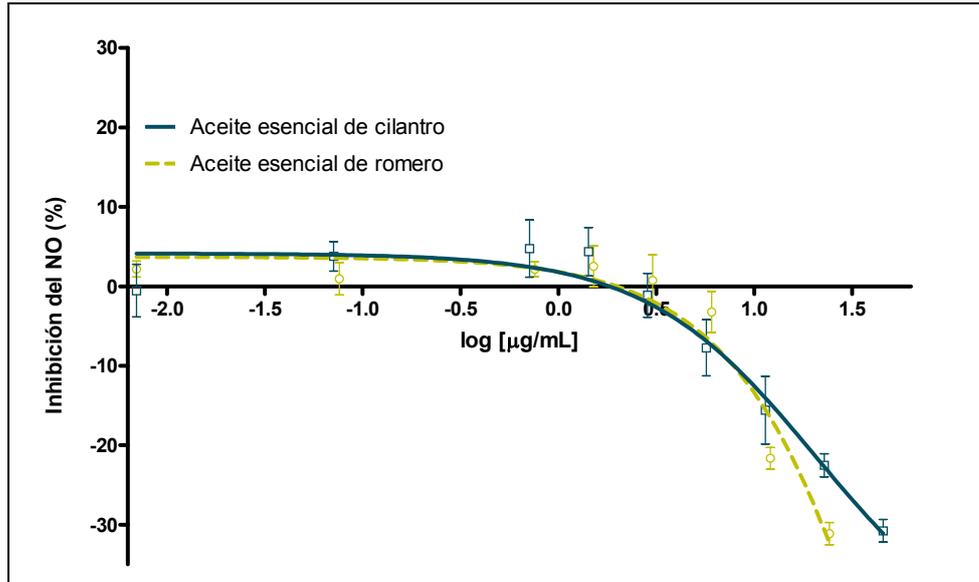


Figura 5.5. Inhibición (% , media±DE) de la producción de NO por los aceites esenciales de romero y cilantro.

Los aceites esenciales de nuez moscada, estragón, y enebro, así como la fracción terpénica de clavo, alcanzaron valores de inhibición significativos, del 20 al 45% a la concentración más alta ensayada, sin embargo la IC_{50} no pudo ser calculada (**Figura 5.6**). Los aceites esenciales de nuez moscada, enebro y estragón han sido examinados por primera vez en el presente trabajo. El principal componente del aceite de estragón es el estragol (87,8%), un fenilpropanoide que produce vasoconstricción en ratas por vía intravenosa en dosis de 5 y 10 mg/kg. Este efecto que fue reportado por Bezerra de Siqueira *et al.*, (2006) podría estar relacionado con la inhibición de la NO sintasa pues resultó anulado al realizar un pre-tratamiento con L-NAME (20 mg/kg). El L-NAME es un conocido inhibidor de la NOS. La fracción terpénica del clavo es rica en el sesquiterpeno hidrocarbonado β -cariofileno (83,0 %), compuesto que ya ha sido reportado con actividad en la literatura (Tung *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales de niaulí, árbol del té, laurel, palmarosa y cayeputi, no modificaron la producción de NO en los leucocitos humanos estimulados con LPS. Tampoco hemos podido encontrar referencias sobre ellos en trabajos previos. Podemos destacar el caso del aceite esencial de palmarosa que está compuesto en un 80,3% por el geraniol. Sobre esta sustancia hay algunos reportes donde se manifiesta carácter inhibitor y otros donde no tiene ningún efecto (Elmann *et al.*, 2010; Marcuzzi *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2010).

En el caso del aceite esencial de limón y su fracción terpénica no se encontró actividad. En ambos casos el limoneno es el componente principal. El limoneno ya ha sido ensayado con anterioridad para esta actividad en macrófagos de rata, siendo inactivo a bajas concentraciones (Del Toro-Arreola *et al.*, 2005) o manifestando actividad de inhibidor a concentraciones más altas del 0,04% (Yoon *et al.*, 2010).

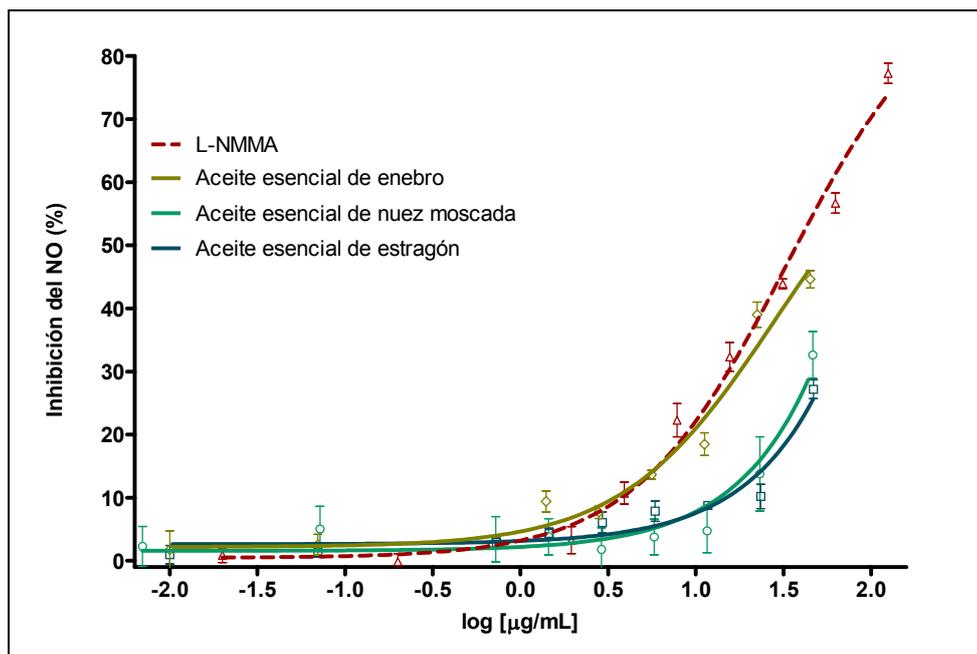


Figura 5.6. Inhibición (% , media±DE) de la producción de NO por el L-NMMA y los aceites esenciales de enebro, nuez moscada y estragón.

A manera de epílogo de lo analizado en este capítulo se puede afirmar que los aceites esenciales de jengibre y clavo, el eugenol, la mezcla de acetato de bornilo e isobornilo y el carvacrol fueron las sustancias con mayor actividad inhibitoria de la producción de NO en leucocitos humanos estimulados con LPS. La IC_{50} determinada para estas sustancias varió entre 4,3 y 41,9 µg/mL.

6

Actividad sobre el sistema del complemento

6.1 Introducción

6.1.1 Generalidades

El sistema inmune en los mamíferos está constituido por un conjunto de procesos bioquímicos que permiten la detección y eliminación eficiente de los patógenos que amenazan la viabilidad del organismo. La complejidad del sistema inmune es necesaria dado el gran número de patógenos diferentes que pueden causar enfermedades. Tradicionalmente, los procesos inmunes han sido divididos de acuerdo a su función en el sistema inmune adaptativo y el sistema inmune innato.

El sistema inmune adaptativo está organizado sobre la base de dos clases de linfocitos especializados: los linfocitos B y los linfocitos T. Ambos tipos de linfocitos poseen un repertorio extremadamente diverso de receptores de reconocimiento antígeno-específicos. Estos receptores permiten la identificación precisa de los patógenos para su posterior eliminación. Otras respuestas adaptativas aseguran la memoria inmunológica de larga duración contra posibles reinfecciones. En contraste, la rama innata de la inmunidad está compuesta de aquellos efectores inmunológicos que proporcionan respuestas inmunes inmediatas pero que no son específicas. Incluyen respuestas humorales evolutivamente primitivas, respuestas celulares y procesos mecánicos que juegan un papel primordial en la protección del organismo ante el desafío patogénico.

6.1.2 Sistema del complemento

El sistema del complemento es un integrante de importancia vital dentro de la inmunidad innata, representando además uno de sus principales mecanismos efectores. Fue descubierto en 1896 por Jules Bordet como uno de los componentes de la fracción del suero lábil al calor. Su nombre se debe a su capacidad de complementar las propiedades antibacterianas de los anticuerpos presentes en la fracción del suero estable frente al calor. La ciencia actual considera el sistema del complemento como un conjunto de proteínas asociadas a la membrana y séricas que pueden provocar respuestas inmunes inflamatorias y citolíticas altamente reguladas. Estas respuestas se desencadenan frente a organismos infecciosos (bacterias, virus, parásitos), daños en los tejidos (de causa física, química o neoplásica) o cualquier otra superficie celular que pueda ser identificada como ajena al organismo. Durante muchos años se creyó confinada la función del complemento a la inmunidad innata y con poco impacto sobre la respuesta adaptativa. Sin embargo, la distinción de funciones fue cuestionada a principios de la década de 1970 y a partir de ese momento los conocimientos que ilustran la relación entre las dos ramas de la respuesta inmune se han expandido dramáticamente (Dunkelberger & Song, 2010).

El complemento, un sistema de más de 30 proteínas del plasma y la superficie celular, llega a alcanzar una concentración de 3 g/L y constituye más del 15% de la fracción globular del plasma. Las proteínas del complemento están organizadas jerárquicamente formando una cascada proteolítica. Dicha cascada comienza con la identificación de las superficies patogénicas y lleva a la generación de potentes mediadores proinflamatorios (anafilotoxinas), la opsonización (recubrimiento) de la superficie patogénica con varias opsoninas del complemento (p. ej., C3b) y la lisis de la superficie patogénica mediante el ensamblaje de poros en la membrana que son conocidos como complejo de ataque a la membrana (MAC, *membrane attack complex*) (Walport, 2001).

El sistema del complemento, desde el punto de vista evolutivo, es un componente muy antiguo de los mecanismos de defensa del organismo. Su supervivencia evolutiva subraya la importancia de sus funciones. Originalmente se adscribía solamente a los vertebrados. Entre ellos se observa un alto grado de homología en la estructura y las funciones del complemento, desde los vertebrados evolutivamente más avanzados hasta aquellos tan antiguos filogenéticamente como el tiburón gata (*Ginglymostoma cirratum*). Sin embargo, estudios funcionales y genómicos entre las moléculas efectoras del complemento han encontrado proteínas análogas al complemento en *phyla* más antiguos como los *Echinodermata* (erizos de mar). La inmunidad adaptativa es, por contraste, más moderna desde el punto de vista evolutivo y generalmente se considera que está restringida a los vertebrados con mandíbula (Zhu *et al.*, 2005).

6.1.3 Vías de activación del sistema del complemento

El complemento puede ser activado a través de tres vías principales: la clásica, la alternativa y la vía de las lectinas. La vía clásica (CP, *Classical Pathway*) es movilizada cuando la proteína C1q se une a anticuerpos unidos a antígenos. Se activan las proteínas C1r y C1s, los cuales a su vez escinden C4 y C2. Por su parte, la vía de las lectinas (LP, *Lectin Pathway*) es activada cuando la proteína de unión a lectinas (MBL, *mannose-binding lectin*) se pone en contacto con motivos de carbohidratos patogénicos muy conservados. Esta unión activa a las enzimas serín-proteasas asociadas a MBL (MASPs-MBL-associated serine proteases) que de igual forma provoca la escisión de C4 y C2. Los productos de la fragmentación de

C4 y C2 dan origen a la convertasa C3 (C4bC2a), que comparten la vía de las lectinas y la vía clásica y que hidroliza a su vez la proteína C3 en los fragmentos C3b y C3a. Una molécula de C3b se puede asociar con C4bC2a para formar la convertasa C5 (C4bC2aC3b), presente también tanto en la vía clásica como en la de las lectinas.

La vía alternativa (AP, *Alternative Pathway*) se activa cuando C3 sufre una hidrólisis espontánea y da lugar a la convertasa inicial de C3 de la AP (C3(H₂O)Bb), en presencia de los factores B y D, lo que lleva a una amplificación de la fragmentación de C3 y la formación de la convertasa de C3 de la AP (C3bBb) y la convertasa de C5 (C3bBbC3b). La properdina facilita la activación de la vía alternativa al estabilizar las convertasas de la vía alternativa.

Las tres vías de activación culminan en la formación de las convertasas, que a su vez generan los efectores principales del sistema del complemento: las anafilotoxinas (C4a/C3a/C5a), el complejo de ataque a la membrana (MAC) y las opsoninas (p. ej., C3b). Las anafilotoxinas son potentes moléculas proinflamatorias que derivan de la fragmentación de las proteínas C4, C3 y C5. El MAC está constituido por el ensamblaje final de los componentes del complemento que van desde C5b hasta C9. Este complejo puede lisar las superficies identificadas como extrañas. La proteína C3b, induce la fagocitosis de las células o partículas opsonizadas y también sirve para amplificar la activación del sistema del complemento a través de la vía alternativa.

Recientemente han sido descritos dos mecanismos adicionales de la activación del complemento, aunque todavía no se les han atribuido funciones fisiológicas. El primer mecanismo involucra a la properdina que tiene un papel canónico en la activación de la vía alternativa al estabilizar la convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb). Sin embargo, las evidencias más recientes han demostrado que la properdina también puede promover el ensamblaje *de novo* de la convertasa C3 cuando se encuentra inmovilizada en una superficie inerte e iniciar la formación de la convertasa C3 en las superficies microbianas (tales como la de *Neisseria gonorrhoeae*) (Spitzer *et al.*, 2007). Adicionalmente se ha reportado otro mecanismo adicional en el que C3 y C5 pueden ser escindidas directamente por otras proteasas que no tienen relación con la cascada de activación del complemento, tales como la calicreína y la trombina, ambas involucradas en la coagulación (Markiewski *et al.*, 2007).

6.1.4 Regulación del sistema del complemento

Debido al potencial destructivo que tiene la activación del complemento, su acción debe ser confinada a las superficies patogénicas. Muchos de los pasos involucrados en la activación del complemento son controlados por inhibidores, de forma que el sistema final representa un balance homeostático intrincado entre la detección eficiente, la destrucción de los patógenos y la minimización del daño a los tejidos no directamente involucrados. La regulación del complemento sucede predominantemente en dos pasos dentro de las cascadas de activación. Un sitio de regulación son las enzimas convertasas durante su ensamblaje o cuando desempeñan su actividad enzimática. El otro punto preferente de regulación aparece durante el ensamblaje del MAC. Existe una serin proteasa Factor I que al catabolizar los fragmentos C4b y C3b impiden que lleguen a formar convertasas activas. Esta enzima se sintetiza en forma constitutiva. Con el objetivo de prevenir que ocurra una degradación de C3b que no sea específica, el Factor I requiere la

participación de diversos cofactores para que pueda realizar su actividad proteolítica. De esta forma se limita el daño solamente a los tejidos afectados.

El segundo destino potencial para los fragmentos de C3b/C4b es formar convertasas activas, lo cual constituye su imperativo biológico normal. Para prevenir la formación de las convertasas C3 no reguladas, existen varios mecanismos inhibidores del complemento. Un ejemplo importante lo constituye el factor de aceleración de la inactivación (DAF, Decay-Accelerating Factor), este factor sirve para inhibir el ensamblaje de nuevas convertasas C3 y disminuir la vida media de las convertasas preformadas (Turnberg & Botto, 2003).

6.1.5 Mecanismos efectores del sistema del complemento

La activación del complemento converge, no importa cual sea la vía activada, en tres mecanismos efectores generales. Estos mecanismos le permiten al sistema del complemento cumplir con sus imperativos fisiológicos de defensa del organismo y son:

- a) La lisis directa de la superficie diana por medio del ensamblaje del MAC. La activación del complemento y la generación de las convertasas C5 llevan a la liberación del producto de C5, C5b. La proteína C5b es la base del ensamblaje del MAC. C5b se asocia primeramente con C6, C7, y la superficie diana. C8 se une al complejo anterior y se inserta parcialmente en la membrana. Esto permite que C9 se introduzca en la bicapa lipídica donde entre 12 a 15 moléculas de C9 formarán un poro estable con aproximadamente 10 nm de diámetro. La formación del poro conlleva la lisis dirigida y específica de la superficie diana.
- b) La estimulación de la respuesta inmune mediante la generación de potentes anafilotoxinas proinflamatorias. Las anafilotoxinas son generadas por la escisión de C4, C3 y C5 con la consiguiente formación de C4a, C3a y C5a respectivamente. La unión de las anafilotoxinas a la región N-terminal de sus receptores correspondientes (C3aR y C5aR) permite cambios conformacionales en los dominios intracelulares de estos receptores y promueve la unión de la proteína G y la formación de segundos mensajeros intracelulares.
- c) La opsonización y eliminación de las superficies diana por medio de las opsoninas del complemento (C4b, C3b, C3bi) y con participación de los receptores del complemento de las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos). La generación de los fragmentos de C3b por medio de las convertasas C3 de todas las vías del complemento inicia la vía de la opsonización del complemento, un elemento importante en la identificación y eliminación de los cuerpos extraños. Los fragmentos opsónicos tales como C3b y los productos de su escisión son reconocidos por los receptores del complemento 1, 2, 3 y 4 (CR1-4) y CR1g. Los receptores de Fc se unen a la región Fc de los anticuerpos. La unión de los receptores del complemento a los cuerpos opsonizados media su fagocitosis por macrófagos y neutrófilos.

Cada vez es más evidente que las funciones del complemento en la defensa del organismo van mucho más allá de la respuesta inmune innata. En varios estudios se ha demostrado la importancia fundamental del buen funcionamiento de la vía clásica del complemento (C1q, C3 o C4) para que exista una correcta respuesta humoral a los antígenos. Se reportan muchos casos de ratones deficientes en los

receptores del complemento 1 y 2 (CR1/2) y que son incapaces de desarrollar una correcta respuesta humoral (Carroll, 2004). También parece que existe suficiente evidencia que vincula la activación del complemento y una respuesta inmune incrementada de las células T a nivel del organismo. Sin embargo, todavía en la actualidad no hay un consenso sobre el mecanismo preciso por el cual el sistema del complemento regula la inmunidad mediada por células T (Capasso *et al.*, 2006).

6.1.6 Actividad de los aceites esenciales sobre el sistema del complemento

Si bien en numerosos trabajos se ha estudiado la actividad de diferentes tipos de extractos vegetales sobre la actividad del complemento, los artículos que abordan el efecto de los aceites esenciales sobre el sistema del complemento son francamente escasos. En la **Tabla 6.1** se realiza una revisión bibliográfica de la actividad de los aceites esenciales o sus constituyentes sobre el sistema del complemento.

Tabla 6.1. Revisión bibliográfica de la actividad de los aceites esenciales sobre el sistema del complemento.

Aceite esencial o compuesto	Ensayo	Resultados	Referencia
Ácido mirístico	Ensayo <i>in vitro</i> de vías clásica y alternativa. Valoración de actividad por liberación de hemoglobina de eritrocitos sensibilizados.	No fue activo en ninguna vía.	Chung <i>et al.</i> , 2011 (artículo retirado posteriormente)
Ácido pelargónico	Ensayo <i>in vitro</i> de vías clásica y alternativa. Valoración de actividad por liberación de hemoglobina de eritrocitos sensibilizados.	En la vía clásica: IC ₅₀ 132,4 µM (20,9 µg/mL). En la vía alternativa no mostró actividad.	Chung <i>et al.</i> , 2011 (artículo retirado posteriormente)
<i>Cinnamomum cassia</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con ratas tratadas durante una semana. Se determina C3 y C4 en el suero.	Los niveles de C3 y C4 aumentaron significativamente en los grupos tratados con dosis de 200, 400 y 600 mg/kg respecto al grupo control.	Zhang <i>et al.</i> , 2011
Nonanal	Ensayo <i>in vitro</i> de vías clásica y alternativa. Valoración de actividad por liberación de hemoglobina de eritrocitos sensibilizados.	No fue activo en ninguna vía.	Chung <i>et al.</i> , 2011 (artículo retirado posteriormente)
β-Ocimeno	Ensayo <i>in vitro</i> de vías clásica y alternativa. Valoración de actividad por liberación de hemoglobina de eritrocitos sensibilizados.	No fue activo en ninguna vía.	Chung <i>et al.</i> , 2011 (artículo retirado posteriormente)
<i>Oryza sativa</i> (variedades roja y negra).	Ensayo <i>in vitro</i> de vías clásica y alternativa. Valoración de actividad por liberación de hemoglobina de eritrocitos sensibilizados.	En la vía clásica: arroz rojo IC ₅₀ 246 ppm (0,0246% v/v), arroz negro IC ₅₀ 193 ppm (0,0193% v/v). En la vía alternativa no mostraron actividad.	Chung <i>et al.</i> , 2011 (artículo retirado posteriormente)

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Fundamento

La actividad sobre el sistema del complemento fue medida siguiendo la metodología descrita por Klerx *et al.* (1983). Se emplearon ensayos *in vitro* donde se determinó el grado de hemólisis de eritrocitos que ejercieron como dianas para el complejo de ataque a la membrana generado tras la activación del sistema del complemento. Los eritrocitos ejercían simultáneamente como activadores y como células diana. La absorbancia de la hemoglobina liberada durante la hemólisis fue el parámetro utilizado para evaluar la actividad del sistema del complemento. A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición y la IC₅₀ siempre que fue posible. La IC₅₀ fue definida como la concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis relativa de eritrocitos, bajo condiciones estandarizadas.

La estandarización de las diferentes variables que influyen en el grado de hemólisis ha sido un factor importante. Entre estas variables se encuentran: la concentración de eritrocitos, fragilidad (edad) de estos eritrocitos, cantidad de anticuerpos utilizados para la sensibilización de los eritrocitos (IgG o IgM), fuerza iónica del sistema tampón, pH, tiempo de reacción, temperatura, y las concentraciones de los cationes divalentes (Ca²⁺ y Mg²⁺).

El ensayo de determinación de la actividad sobre la vía clásica del sistema del complemento utilizó sangre de cordero como fuente de eritrocitos. En este método ocurre una activación secuencial de los componentes de la vía clásica que tienen como diana los eritrocitos de cordero que han sido, previamente sensibilizados con anticuerpos anti-eritrocitos de cordero. El tampón utilizado contenía los cationes divalentes Ca²⁺ y Mg²⁺. En el estudio de la vía alternativa del sistema del complemento, el ensayo empleado fue similar al anterior, con la principal diferencia de uso de sangre de conejo como fuente de eritrocitos, en este caso no sensibilizados. Con el objetivo de evitar interferencias de la vía clásica (calcio-dependiente) en el ensayo de la vía alternativa se empleó el etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA), agente quelante del calcio. El magnesio, catión necesario para las dos vías, fue añadido en ambos ensayos. Como única fuente de los componentes del sistema del complemento (en ambas vías) se empleó suero humano proveniente de varios donantes sanos.

6.2.2 Material

- Solución de Alsever [Sigma, referencia: A3551].
- Eritrocitos de cordero en solución de Alsever (ver apartado).
- Eritrocitos de conejo en solución de Alsever (ver apartado).
- Anticuerpos antieritrocitos ovinos (red blood cells polyclonal antibody anti-sheep) [ICN ibérica, referencia: 55800].
- Solución tampón de barbital sódico (Veronal, VSB⁺⁺)(Gelatin veronal buffer) [Sigma, referencia: G6514].
- Solución tampón de barbital sódico (Veronal, EGTA-VB)
- Cloruro de sodio (NaCl) [Sigma, referencia: S5886].
- 5,5-dietil barbiturato de sodio (barbital sódico o veronal) [Sigma, referencia: B0500].
- Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂•6H₂O) [Sigma, referencia: M2393].
- Cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂•2H₂O) [Sigma, referencia: C3881].

- Etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA) [Sigma, referencia: E4378].
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [Sigma, referencia: M9397].
- Quercetina [Sigma, referencia: Q4951].
- Solución salina de Hanks modificada, más cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (HBSS). [Sigma, referencia: H8264].
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) [Sigma, referencia: D1435].
- Suero humano adquirido en el "Banc de Sang i Teixits de Catalunya".
- Microtubo tipo Eppendorf 1,5 mL tapa plana [Rubilabor, referencia: 711.1500]
- Tubos plásticos de 50 mL sin faldón [Rubilabor, referencia: 644.2050]
- Tubos plásticos de 15 mL. [Rubilabor, referencia: 644.2015]
- Placas microtiter de 96 pocillos, fondo U. [Rubilabor, referencia: 822.0001]
- Placas microtiter de 96 pocillos, fondo plano. [Rubilabor, referencia: 822.0005].
- Espectrofotómetro Microplate spectrophotometer, Benchmark Plus, BIORAD. País USA, 2004].

6.2.3 Solución de VSB

Se disuelven 41,5 g (0,71M) de NaCl y 5,1g (24,76 mmol) de Veronal (Barbital sódico) en 800 mL de agua Milli-Q. Se ajusta el pH a 7,35 y se enrasa hasta que se llega a 1 litro.

6.2.4 Solución de Ca/Mg

Se disuelven 10,17 g (50 mmol) de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 2,21 g (15 mmol) de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua Milli-Q.

6.2.5 Solución de EGTA

Se disuelven 7,6 g (20 mmol) de EGTA en 45 mL de agua Milli-Q, en presencia de NaOH y se ajusta el pH hasta 7,35 (solución a) y por otro lado se disuelven 3,075 g (12,4 mmol) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 45 mL de agua Milli-Q (solución b). Se mezclan las soluciones a y b y se enrasa a 100 mL. La concentración final de EGTA es de 200 nM y la de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 125 mM.

6.2.6 Solución de VSB⁺⁺

Se mezclan 200 mL de la solución madre de VSB con 1 mL de la solución madre de Ca/Mg. Se enrasa hasta 1 litro con agua Milli-Q. El pH será de 7,35.

6.2.7 Solución de EGTA-VB

Se mezclan 200 mL de la solución madre de VSB con 40 mL de la solución madre de EGTA. Se enrasa hasta 1 litro con agua Milli-Q. El pH será de 7,35.

6.2.8 Solución salina

Se disuelven 9 g de NaCl en un litro de agua Milli-Q.

6.2.9 Preparación de las muestras de aceites esenciales

Se toman 10 o 20 μL de cada aceite esencial dependiendo del ensayo a realizar. Se añade este volumen de aceite esencial a un eppendorf de 1,5 mL previamente tarado. La masa de esta alícuota de aceite esencial se determina en balanza

analítica. Se completa el volumen hasta 1mL con solución de Hanks previamente suplementada con un 10% de DMSO y 1,5% de E-484 (glicerol polietilenglicol ricinoleato), con el fin de facilitar la solubilidad de los aceites esenciales.

Con el objetivo de obtener una emulsión homogénea, la mezcla se somete a vortex durante 2 minutos, seguido de un tratamiento de 5 minutos en el equipo de ultrasonido. Esta emulsión se utiliza como solución madre. A partir de esta solución se realiza una dilución $1/10$ empleando como solvente VSB⁺⁺ (para la vía clásica) o EGTA-VB (para la vía alternativa), esta solución se denomina solución de trabajo. La primera solución a ensayar es una dilución $1/3$ de la solución de trabajo y el resto de las soluciones a ensayar son sucesivas diluciones $1/2$ de la primera solución a ensayar (**Figura 6.1**).

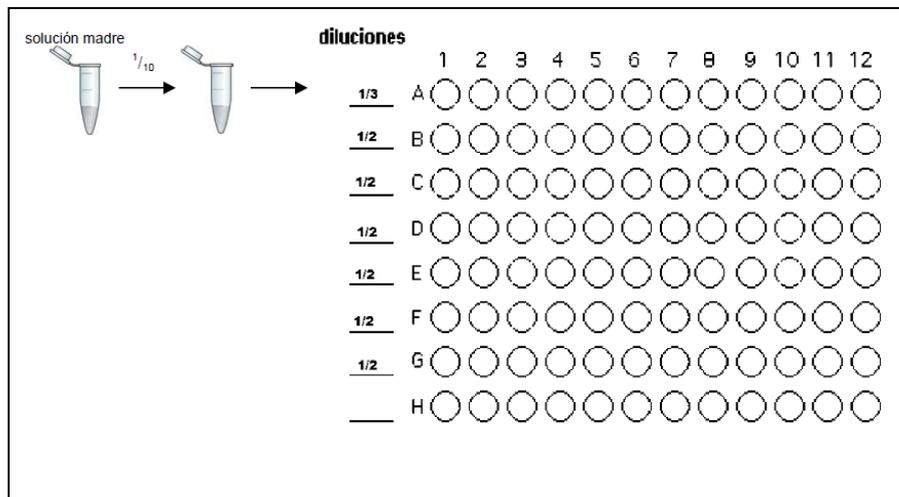


Figura 6.1. Representación esquemática de las diluciones realizadas durante los ensayos sobre las vías clásica y alternativa del complemento.

6.2.10 Obtención de los eritrocitos de cordero

Se ha utilizado sangre de cordero procedente de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. La sangre se recogió en solución Alsever y se transportó en hielo. Fue conservada a 4 °C hasta el momento de su utilización.

6.2.11 Obtención de los eritrocitos de conejo

La sangre de conejo fue obtenida partir de conejos machos New Zealand White (PiPetit/Harlan-Ibérica), de más de 1,5 Kg de peso. Estos se encontraban estabulados en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. La sangre fue extraída de la vena central de la oreja y fue recogida en un tubo con solución Alsever. Fue conservada a 4 °C hasta el momento de su utilización.

6.2.12 Método operatorio

Los ensayos se realizan en placas microtiter de fondo en U a las que se añaden las muestras de aceite esencial. Las muestras de aceite esencial se diluyen en forma secuencial en la placa en solución de VSB⁺⁺ (vía clásica) o en solución de EGTA-VB (vía alternativa). Inmediatamente después se añade una solución de suero

humano realizada en VSB⁺⁺ (vía clásica) o en EGTA-VB (vía alternativa). Se incuba 30 minutos a 37 °C. Se añaden los eritrocitos de cordero sensibilizados con anticuerpos de conejo antieritrocitos de cordero en la vía clásica, o en el caso de la vía alternativa se añaden los eritrocitos de conejo. Se incuba durante 60 minutos a 37 °C en la vía clásica o 30 minutos a 37 °C en la vía alternativa. Se centrifuga la placa microtiter 2 minutos a 2500 rpm. Se traspasan 50 µL del sobrenadante de cada pocillo a una placa microtiter de fondo plano. Previamente, se ha añadido 200 µL de agua Milli-Q en cada pocillo de la placa de fondo plano. Se mide la absorbancia a 405 nm.

Los controles del ensayo consisten en 50 µL del sobrenadante de pocillos en los que los eritrocitos han sido sometidos a diferentes tratamientos pero en iguales condiciones que las muestras a ensayar. En ninguno de los controles se añade muestra. Se refieren a: 100 % de hemólisis (eritrocitos en agua Milli-Q), 0 % de hemólisis (eritrocitos en VSB⁺⁺ o EGTA-VB), 0 % de inhibición (eritrocitos + suero humano activo), 100 % de inhibición (eritrocitos + suero humano inactivado).

Con el fin de expresar los resultados, se calcula el % de lisis (debe estar comprendido entre el 30 y el 70 %), el % de inhibición y la IC₅₀.

Los protocolos del ensayo hemolítico de actividad sobre la vía clásica y alternativa del sistema del complemento se muestran en las **Tablas 6.2 y 6.3**, respectivamente.

6.2.13 Cálculos, expresión de los resultados y análisis estadístico

Para la determinación de la actividad del suero se determina el porcentaje de lisis según la siguiente fórmula. El porcentaje de lisis debe estar comprendido entre 30 y 70%.

$$\text{Lisis (\%)} = \frac{\text{Media } DO_{405}(H1, H2, H3) - \text{Media } DO_{405}(H4, H5, H6)}{\text{Media } DO_{405}(H10, H11, H12) - \text{Media } DO_{405}(H7, H8, H9)} \times 100$$

Para el cálculo de la actividad inhibidora de la muestra respecto al control se sigue la siguiente fórmula.

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - \frac{(\text{Media } DO_{405} \text{ problema} - \text{Media } DO_{405} \text{ blanco del problema}) \times 100}{\text{Media } DO_{405} \text{ control} - \text{Media } DO_{405} \text{ blanco}}$$

Así, por ejemplo, para la concentración más alta de la muestra 1, se calculará utilizando:

- Para el problema: Media de la DO₄₀₅ de los pocillos A1 y A2
- Para el blanco del problema: DO₄₀₅ del pocillo A3
- Para el control: Media de la DO₄₀₅ de los pocillos H1, H2 y H3
- Para el blanco: Media de la DO₄₀₅ de los pocillos H4, H5 y H6

El valor de la resta Media de la DO₄₀₅ control – Media de la DO₄₀₅ blanco corresponde al 100% de actividad de lisis.

Tabla 6.2. Protocolo del ensayo hemolítico de actividad sobre la vía clásica del complemento

A. Preparación de los eritrocitos sensibilizados con el anticuerpo	
A.1 Lavado	<ul style="list-style-type: none"> - Mezclar entre 2 y 4 mL de los eritrocitos (dependiendo del estado de la sangre) con solución salina en un tubo plástico de 15 mL. - Centrifugar a 2500 rpm durante 5 min. - Eliminar el sobrenadante y resuspender el acúmulo de células formado en 10 mL de solución salina y volver a centrifugar. - Repetir el proceso dos veces más. Tras la tercera centrifugación guardar el acúmulo de células en hielo.
A.2 Preparación de la suspensión de eritrocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Resuspender el acúmulo de células (500 µL) en 10 mL (9,5 mL) de VSB⁺⁺ en un tubo de 50 mL, mantener en hielo. - Mezclar 100 µL de esta suspensión con 4,9 mL de agua Milli-Q en un tubo de 15 mL. Determinar la densidad óptica (DO) a 405 nm. Después se deberá añadir un volumen adicional de VSB⁺⁺ al tubo de 50 mL que contiene el acúmulo de células. Esto se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula que tiene en cuenta que la absorbancia de 4×10^8 células es de 0,522. $V \text{ de VSB}^{++} = (\text{Volumen inicial}) \times [(DO \text{ medida} - 0,522) / 0,522]$
A.3 Sensibilización de los eritrocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Mezclar 1 mL de anticuerpos (diluído 1:100) con 7 mL de VSB⁺⁺ en un tubo de 50 mL. - Añadir a la mezcla anterior 8 mL de la suspensión de eritrocitos e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. - Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el acúmulo de células en 16 mL de VSB⁺⁺. Mantener en hielo.
B. Distribución de los productos a ensayar en la placa microtiter (fondo en forma de U)	
Se van a disponer las muestras en las filas A hasta G (concentraciones decrecientes). Se puede disponer 100 µL de la primera muestra concentrada disuelta en VSB ⁺⁺ en A1, A2 y A3 y hacer sucesivas diluciones a la mitad (50 µL + 50 µL VSB ⁺⁺) en las filas B, C, D, E, F y G. El volumen final en cada pocillo será de 50 µL.	
C. Preparación de los controles de actividad hemolítica	
<ul style="list-style-type: none"> - Añadir 50 µL de VSB⁺⁺ a los pocillos del H1 al H6. Los pocillos H1-H3 serán los controles de la actividad del suero (0 % de inhibición). Los pocillos del H4 al H6 serán el blanco del suero (suero inactivado, 100 % de inhibición). - Añadir 100 µL de VSB⁺⁺ a los pocillos H7-H9 (0% de homólisis). - Añadir 100 µL de agua Milli-Q a los pocillos H10-H12 (100% de hemólisis). 	
D. Preparación de la dilución del suero y preincubación	
<ul style="list-style-type: none"> - Añadir 50 µL de la solución de suero inactivado (63 µL de suero inactivado + 5 mL de VSB⁺⁺) a los pocillos del H4 al H6 y a los pocillos designados como blancos de las muestras. - Mezclar 125 µL de suero con 8 mL de VSB⁺⁺ (cantidad regulada por la actividad del suero) y añadir 50 µL a los pocillos designados como control de la actividad del suero (0 % de inhibición) y los pocillos designados como muestras problema. - Tapar la placa y preincubar a 37°C durante 30 minutos. 	
E. Incubación	<ul style="list-style-type: none"> - Añadir 50 µL de los eritrocitos sensibilizados a cada pocillo de la placa. - Incubar a 37°C durante 60 minutos.
D. Medición de la hemólisis	<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugar las placas de microtiter (fondo en U) a 2500 rpm durante 2 minutos. - Añadir 200 µL de agua Milli-Q a los pocillos de una placa de microtiter de fondo plano. - Transferir 50 µL del sobrenadante de la hemólisis de la placa de microtiter de fondo en U (ya centrifugada) a la placa de microtiter de fondo plano. - Medir la Densidad óptica a 405 nm.

Tabla 6.3. Protocolo del ensayo hemolítico de actividad sobre la vía alternativa del complemento.

A. Preparación de los eritrocitos	
A.1 Lavado	<ul style="list-style-type: none"> - Mezclar 4 mL de los eritrocitos con 6 mL de solución salina en un tubo plástico de 15 mL. - Centrifugar a 2500 rpm durante 5 min. - Eliminar el sobrenadante y resuspender el acúmulo de células en 10 mL de solución salina y volver a centrifugar. - Repetir el proceso dos veces más. Tras la tercera centrifugación guardar el acúmulo de células en hielo.
A.2 Preparación de la suspensión de eritrocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Resuspender el acúmulo de células (500 μL) en 10 mL (9,5 mL) de EGTA-VB en un tubo de 50 ml, mantener en hielo. - Mezclar 100 μL de esta suspensión con 4,9 mL de agua Milli-Q en un tubo de 15 mL. Determinar la densidad óptica (DO) a 405 nm. Después se añade un volumen adicional de EGTA-VB al tubo de 50 ml que contiene el acúmulo de células según la siguiente fórmula que tiene en cuenta que la absorbancia de $1,15 \times 10^8$ células es de 1,230. - V de EGTA-VB = (Volumen inicial) x [(DO medida-1,230)/1,230] - Mantener en hielo.
B. Distribución de los productos a ensayar en la placa microtiter (fondo en forma de U)	
<p>Se van a disponer las muestras en las filas desde la A hasta G (concentraciones decrecientes). Se pueden disponer 100 μL de la primera muestra concentrada (disuelta en EGTA-VB) en A1, A2 y A3 y hacer sucesivas diluciones a la mitad (50 μL + 50 μL EGTA-VB) en las filas B, C, D, E, F y G. El volumen final en los pocillos será de 50 μL.</p>	
C. Preparación de los controles de actividad hemolítica	
<ul style="list-style-type: none"> - Añadir 50 μL de EGTA-VB a los pocillos H1 a H6. Los pocillos H1-H3 serán los controles de la actividad del suero (0 % de inhibición). H4-H6 es el blanco del suero (suero inactivado, 100 % de inhibición). - Añadir 75 μL de EGTA-VB a los pocillos H7-H9 (0% de homólisis). - Añadir 75 μL de agua Milli-Q a los pocillos H10-H12 (100% de hemólisis). 	
D. Preparación de la dilución del suero y preincubación	<ul style="list-style-type: none"> - Añadir 25 μL de la solución de suero inactivado (500 μL de suero inactivado + 500 μL de EGTA-VB) a los pocillos H4-H6 y blancos de las muestras. - Mezclar 1 ml de suero humano activo con 1 mL de EGTA-VB y añadir 25 μL a los pocillos control H1-H3 y problemas. - Tapar la placa y preincubar a 37°C durante 30 minutos.
E. Incubación	
<ul style="list-style-type: none"> - Añadir 25 μL de los eritrocitos de conejo a cada pocillo de la placa. - Incubar a 37°C durante 60 minutos. 	
D. Medición de la hemólisis	
<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugar las placas de microtiter (fondo en U) a 2500 rpm durante 2 minutos. - Añadir 200 μL de agua Milli-Q a los pocillos de una placa de microtiter de fondo plano. - Transferir 50 μL del sobrenadante de la hemólisis de la placa de microtiter de fondo en U (ya centrifugada) a la placa de microtiter de fondo plano. - Medir la Densidad óptica a 405 nm. 	

Los datos reflejaron las medias \pm desviación estándar (DE) de seis experimentos independientes para la vía clásica del complemento y de cuatro experimentos independientes en el caso de la vía alternativa. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos y el control se realizaron mediante un análisis de varianza (one-way ANOVA) seguido de una prueba Dunnett (Dunnett's test). Como nivel de significación se tomó una $p < 0.05$. La concentración inhibitoria 50 % (IC_{50}) fue calculada por interpolación en una curva dosis-respuesta construida mediante una regresión no lineal que seguía un modelo de curva sigmoidea. Esta curva se obtuvo de la gráfica correspondiente al (%) de inhibición de la hemólisis de los eritrocitos *versus* el logaritmo de la concentración del aceite esencial ($\mu\text{g/mL}$). Para la realización de los cálculos y el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6.3 Resultados

En la **Tabla 6.4** se indican las concentraciones de aceites esenciales, fracciones o componentes puros ensayados a las que se produjo la lisis de los eritrocitos. La actividad inhibitoria de las muestras sobre la vía clásica y alternativa del sistema del complemento se presenta en las **Tablas 6.5** y **6.6**, respectivamente. Finalmente, en la **Tabla 6.7** se muestra la relación entre las concentraciones expresadas en % (v/v) y su valor en $\mu\text{g/mL}$. Como sustancia activa de referencia en los ensayos de la vía clásica del sistema del complemento fue utilizada la quercetina ($IC_{50} = 33,7 \mu\text{g/mL}$). En los ensayos de la vía alternativa del sistema del complemento, se utilizó como referencia un extracto acuoso de *Azadirachta indica* ($IC_{50} = 226,4 \mu\text{g/mL}$).

Tabla 6.4. Concentración límite ($\mu\text{g/mL}$) a partir de la cual se provoca la lisis en los eritrocitos por las muestras ensayadas.

Actividad hemolítica			
Aceite esencial o compuesto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Aceite esencial o compuesto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Árbol del té	200	Limón	300
Bornilo + isobornilo, acetatos de	400	Limón (terpenos)	300
Cayeputi	320	Niaulí	300
Cilantro	350	Nuez moscada	350
Clavo	400	Nuez moscada (terpenos)	70
Clavo (terpenos)	350	Orégano español	300
Eugenol	350	Carvacrol	300
Enebro	80	Palmarosa	350
Estragón	350	Romero	250
Jengibre	250	Tomillo rojo	300
Laurel	350	Timol	400

Tabla 6.5. Inhibición de la vía clásica del complemento.

Inhibición (%) de la vía clásica del sistema del complemento											
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										
	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
5,21 x 10 ⁻⁴	3,6±1,4	12,6±6,5	11,9±11,7	3,6±3,3	9,8±6,7	4,1±4,5	4,1±1,1	n/a	8,6±2,3	n/a	6,5±3,2*
1,04 x 10 ⁻³	13,7±7,2*	10,1±4,1	30,0±10,6*	6,4±4,1	12,9±7,4*	13,2±8,6	15,3±3,3*	n/a	12,6±4,9	n/a	3,6±3,3
2,08 x 10 ⁻³	8,5±4,9*	14,5±6,9	17,5±15,1*	12,2±5,8*	15,2±2,6*	23,9±11,4*	12,8±2,6*	2,6±3,1	22,2±9,7*	3,9±1,6	6,2±2,1*
4,17 x 10 ⁻³	16,6±5,3*	29,2±16,8*	14,9±9,9*	19,0±8,2*	27,2±4,3*	19,1±13,5*	35,4±2,7*	7,1±4,7	36,1±14,0*	5,8±3,0	12,9±4,9*
8,33 x 10 ⁻³	49,2±3,4*	35,3±15,2*	38,4±5,3*	30,5±4,1*	54,6±5,3*	33,1±18,4*	63,5±2,4*	23,3±9,5*	61,6±6,3*	18,5±6,8*	23,1±3,2*
1,67 x 10 ⁻²	64,6±5,4*	67,9±9,5*	80,1±6,4*	46,8±6,9*	89,3±9,1*	28,7±13,5*	57,9±4,9*	n/a	61,8±5,1*	32,8±3,3*	53,9±4,7*
3,33 x 10 ⁻²	n/a	91,9±4,8*	81,7±5,0*	72,8±8,8*	96,0±3,8*	12,5±1,9	n/a	n/a	72,1±9,7*	n/a	82,9±4,4*
6,67 x 10 ⁻²	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
IC₅₀ µg/mL	97,0±4,2	126,1±4,1	97,3±4,6	154,4±3,5	74,9±3,2	---	78,3±3,9	---	64,8±3,4	---	155,4±3,5

*Diferencias significativas (p<0.05). n/a Valor no disponible.

Tabla 6.5. Continuación.

Inhibición (%) de la vía clásica del sistema del complemento											
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										
	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
5,21 x 10 ⁻⁴	n/a	5,1±7,1	3,9±3,0	10,6±3,5	7,3±5,4	n/a	8,6±1,6	2,8±2,3	5,8±3,4	9,2±2,2*	n/a
1,04 x 10 ⁻³	3,3±3,3	2,3±2,5	7,2±3,0	12,2±9,7	5,8±2,7	4,9±0,2	16,9±7,6*	6,9±3,4	16,3±4,0*	11,7±3,9*	9,6±6,8
2,08 x 10 ⁻³	7,1±7,4	2,9±2,0	18,2±10,7*	21,7±9,0*	9,2±5,9*	2,4±10,3	15,7±7,5*	21,2±5,5*	13,1±13,4*	18,2±2,1*	12,0±9,4
4,17 x 10 ⁻³	8,1±4,5	9,7±3,2	18,5±10,2*	26,6±14,7*	11,2±7,1*	15,0±8,6	35,7±7,1*	36,3±4,5*	16,5±4,7*	34,1±2,4*	21,8±18,0*
8,33 x 10 ⁻³	13,4±7,4*	25,3±11,3*	50,9±6,7*	42,5±18,6*	n/a	37,2±9,9*	63,9±6,2*	50,1±4,3*	19,7±6,4*	54,4±3,2*	42,4±18,3*
1,67 x 10 ⁻²	20,4±6,1*	47,7±17,6*	63,3±9,8*	49,6±13,9*	n/a	63,3±4,4*	54,2±19,2*	66,6±6,3*	26,7±12,4*	78,7±3,4*	66,5±15,1*
3,33 x 10 ⁻²	32,7±0,5*	38,8±19,4*	n/a	32,7±14,0*	n/a	n/a	n/a	63,7±4,7*	n/a	n/a	68,8±14,0*
6,67 x 10 ⁻²	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
IC₅₀ µg/mL	---	---	91,3±4,2	---	---	118,1±7,8	78,1±4,7	75,2±3,0	---	67,8±2,9	125,5±4,4

*Diferencias significativas (p<0.05). n/a Valor no disponible.

Tabla 6.6. Inhibición de la vía alternativa del complemento.

Inhibición (%) de la vía alternativa del sistema del complemento											
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										
	Árbol del té	Bornilo + isobornilo, acetatos de	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
5,21 x 10 ⁻⁴	1,6±1,8	4,2±0,9	1,2±0,6	3,4±2,0	n/a	9,5±10,8	4,1±3,1	0,7±0,7	6,1±6,4	2,3±1,9	2,7±1,0
1,04 x 10 ⁻³	4,1±1,9	3,2±2,2	2,0±1,5	3,0±1,7	6,3±1,5	6,7±5,2	3,5±2,6	7,3±8,6	5,5±5,0	2,6±2,3	2,8±1,0
2,08 x 10 ⁻³	2,4±2,5	1,9±0,7	2,5±0,5	4,0±4,4	2,1±0,9	6,4±6,6	4,7±1,7	2,2±1,6	5,1±1,7	1,4±0,8	3,3±2,1
4,17 x 10 ⁻³	1,1±0,3	2,1±1,0	2,4±2,0	3,6±1,8	11,4±11,4	5,4±0,6	2,8±1,4	1,8±1,9	1,1±0,9	2,3±0,3	4,0±3,0
8,33 x 10 ⁻³	1,4±1,6	3,1±1,2	2,9±1,5	4,4±1,0	14,2±17,4	3,8±1,0	2,5±0,7	0,8±0,1	1,2±1,3	0,9±0,0	3,0±1,0
1,67 x 10 ⁻²	3,6±1,7	3,0±2,7	2,5±1,4	0,7±0,1	3,6±2,7	n/a	3,9±3,6	n/a	3,8±1,1	0,4±0,3	2,7±1,6
3,33 x 10 ⁻²	n/a	4,4±2,5	3,2±1,8	4,6±1,3	6,0±3,1	n/a	4,3±0,7	n/a	7,2±4,5	n/a	2,8±2,4
6,67 x 10 ⁻²	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
IC₅₀ µg/mL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

*Diferencias significativas (p<0.05). n/a Valor no disponible.

Tabla 6.6. Continuación.

Inhibición (%) de la vía alternativa del sistema del complemento											
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										
	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
5,21 x 10 ⁻⁴	2,7±2,7	0,3±0,2	3,0±2,8	5,3±3,1	3,3±2,0*	2,9±1,9	3,2±2,3	1,2±1,4	2,5±2,0	1,7±1,5	2,1±1,4
1,04 x 10 ⁻³	2,8±0,6	2,7±0,3*	n/a	4,1±2,2	1,0±0,3	1,6±2,0	3,0±2,4	1,8±1,0	2,6±2,5	2,2±2,0	4,1±2,8
2,08 x 10 ⁻³	2,4±2,2	3,6±1,9*	6,0±5,3	7,5±5,6	2,2±1,8	5,6±3,9	2,4±0,6	1,8±1,8	3,9±4,3	3,4±1,1 *	2,8±3,2
4,17 x 10 ⁻³	2,8±3,2	2,3±1,0*	3,3±2,2	5,2±1,8	2,3±1,7	3,8±1,2	2,3±2,0	2,7±0,4	2,6±2,4	3,3±1,2	2,2±1,8
8,33 x 10 ⁻³	2,3±1,6	1,3±0,1	n/a	6,2±4,3	1,1±1,3	5,0±2,8	3,4±2,7	2,3±2,3	2,8±0,1	3,1±2,1	2,9±1,3
1,67 x 10 ⁻²	4,0±1,9	3,1±0,3*	8,6±7,8	11,5±10,8	3,3±1,1*	3,6±0,0	4,0±2,0	2,6±1,0	2,2±0,7	4,0±2,0 *	3,5±2,4
3,33 x 10 ⁻²	1,1±1,3	2,2±0,8*	4,6±2,8	9,4±3,1	4,2±1,2*	5,4±4,0	4,6±2,4	3,1±0,9	1,7±0,9	2,6±1,2	4,3±3,7
6,67 x 10 ⁻²	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
IC ₅₀ µg/mL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

*Diferencias significativas (p<0.05). n/a Valor no disponible.

Tabla 6.7. Equivalencias entre las concentraciones expresadas en % (v/v) y las concentraciones expresadas µg/mL.

Equivalencias entre concentraciones en % (v/v) y µg/mL											
Concentración (%, v/v)	Concentración (µg/mL)										
	Árbol del té	Bornilo + Isobornilo (acetato)	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
5,21 x 10⁻⁴	4,7	5,8	4,8	4,6	5,4	4,7	5,5	4,5	4,9	4,8	4,8
1,04 x 10⁻³	9,4	11,6	9,7	9,2	10,9	9,5	11,0	8,9	9,8	9,6	9,5
2,08 x 10⁻³	18,9	23,3	19,3	18,4	21,8	18,9	22,0	17,9	19,5	19,3	19,1
4,17 x 10⁻³	37,8	46,6	38,6	36,7	43,5	37,8	44,0	35,7	39,0	38,5	38,1
8,33 x 10⁻³	75,5	93,2	77,3	73,4	87,0	75,6	88,1	71,4	78,0	77,0	76,3
1,67 x 10⁻²	151,0	186,3	154,5	146,8	174,0	151,3	176,2	142,8	156,0	154,0	152,5
3,33 x 10⁻²	302,0	372,7	309,0	293,7	348,0	302,6	352,3	285,7	312,0	308,0	305,0
6,67 x 10⁻²	604,0	745,3	618,0	587,3	696,0	605,1	704,7	571,3	624,0	616,0	610,0
	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
5,21 x 10⁻⁴	4,4	4,4	4,7	4,8	4,4	5,0	5,4	4,9	4,8	4,7	5,8
1,04 x 10⁻³	8,8	8,8	9,4	9,7	8,8	9,9	10,8	9,8	9,7	9,4	11,6
2,08 x 10⁻³	17,6	17,6	18,9	19,3	17,6	19,8	21,7	19,6	19,3	18,8	23,3
4,17 x 10⁻³	35,2	35,1	37,8	38,6	35,1	39,7	43,4	39,1	38,7	37,6	46,5
8,33 x 10⁻³	70,4	70,3	75,5	77,3	70,3	79,3	86,8	78,3	77,3	75,3	93,0
1,67 x 10⁻²	140,8	140,5	151,0	154,5	140,5	158,7	173,5	156,5	154,7	150,5	186,0
3,33 x 10⁻²	281,7	281,0	302,0	309,0	281,0	317,3	347,0	313,0	309,3	301,0	372,0
6,67 x 10⁻²	563,3	562,0	604,0	618,0	562,0	634,7	694,0	626,0	618,7	602,0	744,0

6.4 Discusión

Como paso previo a la realización de los ensayos del complemento, se evaluó la actividad hemolítica de los aceites esenciales, fracciones terpénicas y sustancias bajo estudio. Este ensayo nos permitió establecer los límites razonables de validez del ensayo del complemento y al mismo tiempo nos aportó nociones sobre la citotoxicidad de las muestras ensayadas. Los ensayos de actividad hemolítica *in vitro* han sido empleados en el cribado de sustancias y agentes tóxicos puesto que son una herramienta simple que permite detectar citotoxicidad y toxicidad sobre las membranas (Cabral de Oliveira *et al.*, 2011). Los resultados de actividad hemolítica de las muestras bajo estudio se resumen en la (Tabla 6.4). Los aceites esenciales de nuez moscada, clavo, niaulí, cayeputi, estragón, cilantro, laurel, palmarosa, limón, tomillo rojo y orégano español, además de los terpenos del clavo y de limón, el eugenol, el acetato de bornilo, el timol y el carvacrol, producen la lisis únicamente a concentraciones superiores a 300 µg/mL. Los aceites esenciales del árbol del té, romero y jengibre la producen a concentraciones entre 200 y 300 µg/mL. Los aceites esenciales o fracciones anteriormente mencionados mostraron en general una baja toxicidad. Únicamente el aceite esencial de enebro (rico en los monoterpenos α -pineno (54,8%) y β -pineno (29,2%)) y los terpenos de nuez moscadas (fracción rica en los monoterpenos α -pineno (50,9%) y β -pineno (17,2%)) produjeron la lisis de los eritrocitos a concentraciones inferiores a 100 µg/mL. Estos monoterpenos parecen incrementar la lisis de los eritrocitos, proceso que podría estar relacionado con la capacidad del α -pineno y el β -pineno de afectar la integridad de la membrana, su permeabilidad y la consiguiente pérdida del control sobre los procesos quimio-osmóticos y finalmente la muerte y lisis celular (Uribe *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 2000). La actividad hemolítica de las muestras bajo estudio nos condiciona la validez de los ensayos del complemento a aquellos resultados que aparecen a concentraciones inferiores a los límites a partir de los cuales ocurre la actividad hemolítica.

En la valoración de la actividad sobre el sistema del complemento se observaron diferentes grados de inhibición para la vía clásica, mientras que todos los aceites esenciales fueron inactivos sobre la vía alternativa a las concentraciones ensayadas (Tablas 6.5 y 6.6). Estos resultados son muy novedosos pues no se encontró ninguna información similar en la literatura científica sobre aceites esenciales. Sin embargo, un patrón parecido de comportamiento ha sido descrito en otros extractos o sustancias de naturaleza terpenoide (Lee *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2008).

Una mirada más cercana a los resultados nos muestra que el eugenol (IC_{50} = 78 µg/mL) y el aceite esencial de clavo (IC_{50} = 75 µg/mL) muestran una IC_{50} semejante aunque relativamente moderada. Puesto que los terpenos de clavo casi no presentaron actividad, se puede deducir que el eugenol es el principal responsable de la actividad en el aceite esencial de clavo. Las curvas de inhibición de las tres muestras, aceite esencial de clavo, su fracción terpénica y el eugenol se muestran en la Figura 6.2, y puede observarse el comportamiento prácticamente paralelo entre el aceite esencial de clavo y el eugenol.

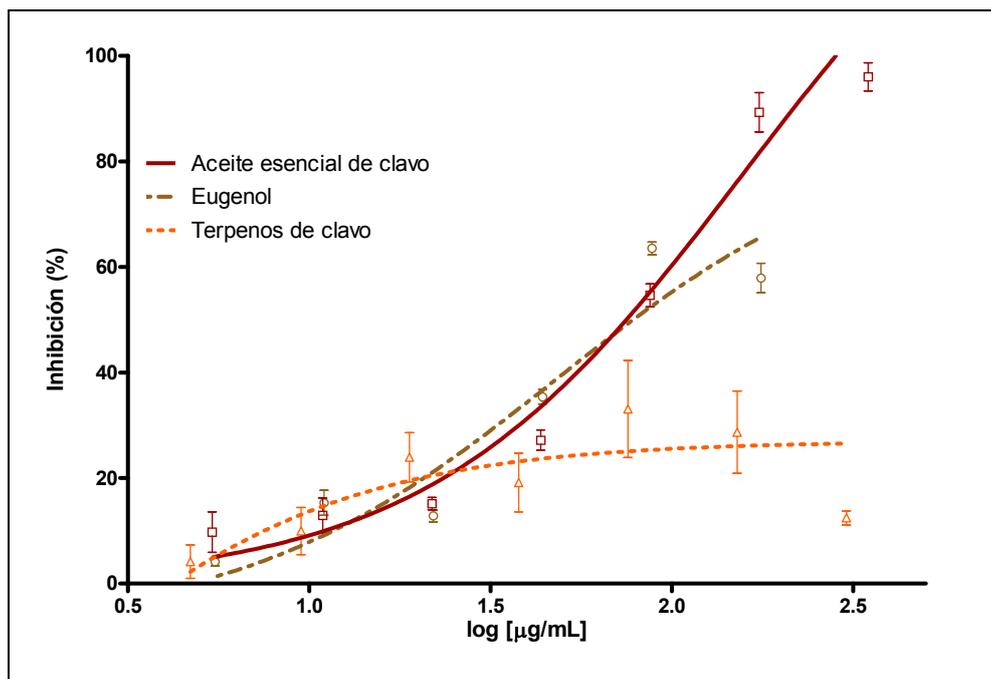


Figura 6.2. Inhibición (% , media +DE) de la vía clásica del complemento por el aceite esencial de clavo, su fracción terpénica y el eugenol.

Otros aceites esenciales ricos en compuestos fenólicos también manifestaron una actividad inhibitoria parecida sobre la vía clásica del sistema del complemento, como es el caso del tomillo rojo (IC_{50} de 67,8 $\mu\text{g/mL}$), el orégano español (IC_{50} de 118,1 $\mu\text{g/mL}$) o el estragón (IC_{50} de 64,8 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 6.3**). Se destaca además que el carvacrol, el principal componente del orégano español, ha mostrado una mayor actividad que el aceite esencial, con una IC_{50} de 78,1 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, el timol, componente mayoritario de la esencia del tomillo, ha mostrado una menor actividad que el aceite esencial, con una IC_{50} de 125,5 $\mu\text{g/mL}$. De este modo, estos resultados podrían indicar que el carvacrol es el principal responsable de la actividad sobre la vía clásica del complemento del orégano español, y que en el caso del tomillo rojo estarían implicados otros compuestos además del timol. Según los datos presentados, es posible observar un comportamiento similar de los compuestos fenólicos ensayados (eugenol, carvacrol y timol) frente a la vía clásica del sistema complemento (**Figura 6.4**).

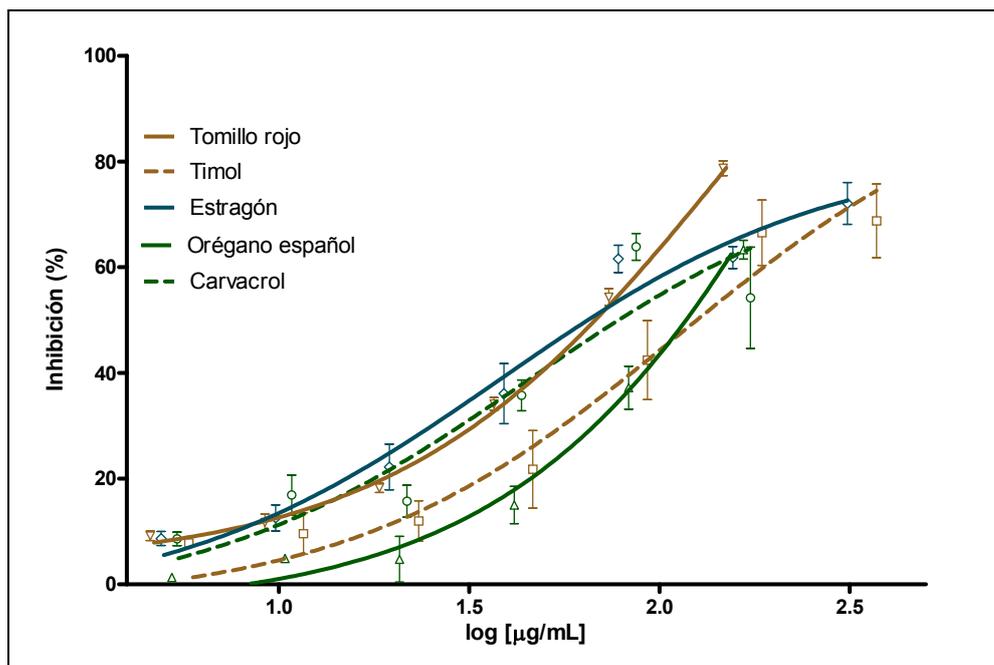


Figura 6.3. Inhibición (% , media +DE) de la vía clásica del complemento por los aceites esenciales de orégano español, tomillo rojo, estragón y los compuestos timol y carvacrol.

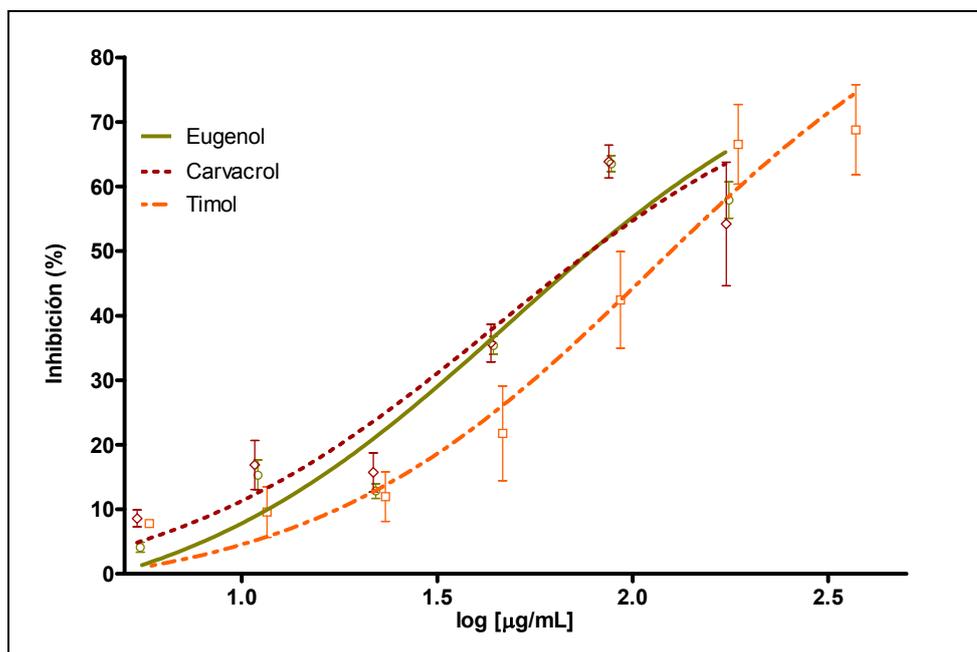


Figura 6.4. Inhibición (% , media +DE) de la vía clásica del complemento por los compuestos eugenol, carvacrol y timol.

Los algunos aceites esenciales provenientes del género *Melaleuca*, niaulí, árbol del té y cayeputi, han mostrado también una actividad inhibitora moderada sobre la vía clásica del sistema del complemento, con una IC_{50} de 91,3 $\mu\text{g/mL}$, 97,0 $\mu\text{g/mL}$ y 97,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dos de estos aceites esenciales tienen en común el componente principal, el 1,8-cineol (58,3% en el niaulí y 67,8 % en el cayeputi).

Compuesto que también está presente en el laurel (65,6%) con una IC_{50} de 155,4 $\mu\text{g/mL}$ y en el aceite esencial de romero aunque en menor proporción (49,7%), y que ha sido menos activo (inhibición del 27% a la concentración de 154,7 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.01$). Todo lo anterior sugiere un posible papel para este compuesto en la actividad de inhibición del complemento. En el aceite esencial del árbol del té predomina, sin embargo, el terpinen-4-ol con un 44,5%.

La **Figura 6.5** muestra la comparación de la actividad sobre la vía clásica de los aceites esenciales que poseen 1,8-cineol (niaulí, cayeputi, laurel y romero). Otros aceites esenciales o sus fracciones ricas en monoterpenos oxigenados también fueron inhibidores moderados o débiles de la vía clásica del complemento. El aceite esencial del cilantro (74,0% de linalool) y el de palmarosa (80,3% de geraniol) mostraron una IC_{50} de 154 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Finalmente, en la mezcla de acetato de bornilo y acetato de isobornilo la IC_{50} fue de 126 $\mu\text{g/mL}$.

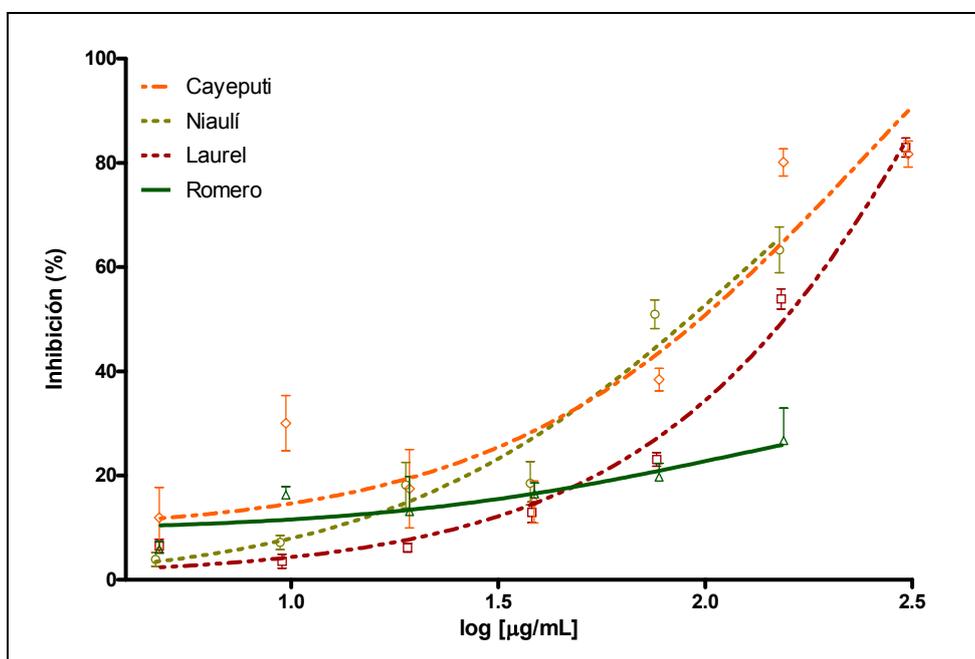


Figura 6.5. Inhibición (%; media +DE) de la vía clásica del complemento por los aceites esenciales de cayeputi, niaulí, laurel y romero.

De la información analizada se puede concluir que todas las muestras fueron inactivas sobre la vía alternativa del complemento, mientras que algunas mostraron actividad inhibitoria sobre la vía clásica. Sobre esta vía, los aceites esenciales ricos en compuestos oxigenados, ya sean fenilpropanoides o monoterpenos oxigenados, fueron los que mostraron mayor actividad inhibitoria. Entre ellos, las sustancias fenólicas y en especial el eugenol y el carvacrol fueron los más activos. En general, los resultados sugieren que estos compuestos son los principales responsables de la actividad de los aceites esenciales que los contienen como componentes mayoritarios. Las muestras ricas en hidrocarburos monoterpénicos, en cambio, resultaron ser poco activas.

7

Actividad sobre la fagocitosis

7.1 Introducción

7.1.1 Generalidades

Fagocitosis (del griego phagein, comer y kytos, célula), es el proceso por medio del cual algunas células rodean partículas sólidas con su membrana celular y forman una vesícula interna llamada fagosoma en los fagocitos y los protozoos. Es una forma específica de endocitosis, que implica la internalización en vesículas de partículas sólidas. La fagocitosis está involucrada en la adquisición de nutrientes por algunas células y, en el sistema inmune, es el principal mecanismo empleado para eliminar patógenos y desechos celulares. Las bacterias, las células de los tejidos muertos y pequeñas partículas minerales son ejemplos de partículas que pueden ser fagocitadas. En los organismos unicelulares, este proceso es homólogo a comer, mientras que en los animales pluricelulares ha sido adaptado a la eliminación de residuos celulares y patógenos.

La fagocitosis es un mecanismo dependiente de la actina por el cual las células fagocíticas ingieren partículas de gran tamaño, usualmente mayores de 0,5 μm de diámetro. La fagocitosis está conservada filogenéticamente en los mamíferos y ha evolucionado hacia un proceso muy complejo. Elie Metchnikoff fue el primero que a finales del siglo XIX lo describió y le fue concedido por ello el premio Nobel de medicina en 1908. Cien años después, la teoría celular de la inmunidad propuesta por Metchnikoff ha soportado la prueba del tiempo, pero ahora somos conscientes que el proceso fagocítico es mucho más complicado de lo inicialmente imaginado y solo estamos comenzando a describir sus intrincados mecanismos moleculares.

El reconocimiento innato de los agentes patogénicos está mediado por una serie de receptores de reconocimiento de patrones moleculares codificados en la línea germinal (*germ-line encoded pattern recognition receptors* o PRRs) que pueden estar unidos a la membrana o libres. Estos PRRs reconocen determinantes antigénicos o estructuras microbianas altamente conservadas como pueden ser los polisacáridos bacterianos o los β -glucanos fúngicos. Los determinantes antigénicos altamente conservados son conocidos como patrones moleculares asociados a los patógenos (*pathogen associated molecular patterns* o PAMPs) (Janeway & Medzhitov, 2002). Los PRRs libres o solubles incluyen a las colectinas, las ficolinas, pentraxinas y el complemento. Estas proteínas recubren u “opsonizan” el agente infeccioso, el cual puede entonces ser “ingerido” a través de receptores opsónicos específicos. Algunas de estas proteínas pueden también regular la expresión en la superficie de otros receptores fagocíticos y por lo tanto ejercen una influencia indirecta en la fagocitosis. Los PRRs unidos a la membrana tales como la Dectin-1, reconocen directamente los microorganismos y median su fagocitosis (Kerrigan & Brown, 2009).

El reconocimiento de los patógenos por los fagocitos induce la expresión del factor nuclear κ B (NF- κ B) y en consecuencia la liberación de citocinas inflamatorias. Por ejemplo, la interleucina 8 (IL-8) es producida en gran cantidad por los neutrófilos activados y contribuye a la infiltración de los leucocitos en el sitio de la infección. Adicionalmente, otras citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 estimulan la respuesta inflamatoria aguda y activan otras células inmunes (Steevels & Meyaard, 2011).

Los fagocitos, entre los cuales se encuentran los neutrófilos, monocitos y los macrófagos, pueden reconocer, fagocitar y eliminar a los patógenos invasores y de esa forma tener un papel crucial en la defensa de los organismos. Inherente en su capacidad de matar, está el hecho que estas células contienen numerosas moléculas que son capaces de dañar al propio organismo. En el proceso de muerte de los microbios, los gránulos lisosomales y las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species* o ROS) pueden salir al medio celular, causando un severo daño tisular. Un exceso en la producción de ROS, por ejemplo, juega un importante papel en la patogénesis de enfermedades caracterizadas por una inflamación persistente, tales como la aterosclerosis y la enfermedad obstructiva pulmonar crónica (Nathan & Ding, 2010). No es sorprendente por lo tanto que muchos mecanismos regulatorios sean requeridos para el control de la respuesta inflamatoria, para la prevención de una activación inapropiada o la limitación temporal de la respuesta inmune (Steevels & Meyaard, 2011).

7.1.2 Influencia de los aceites esenciales sobre la fagocitosis

La influencia de diferentes extractos vegetales sobre la fagocitosis ha sido abordada en varios estudios. No obstante, las publicaciones que analizan la actividad de los aceites esenciales sobre la fagocitosis son relativamente escasas. En la **Tabla 7.1** se resume la revisión bibliográfica de la actividad de los aceites esenciales o sus componentes sobre la fagocitosis.

Tabla 7.1. Revisión bibliográfica de la actividad de los aceites esenciales o sus constituyentes sobre la fagocitosis.

Aceite esencial o compuesto	Ensayo	Resultados	Referencia
Alcanfor	Aplicación tópica <i>in vivo</i> en ratones depilados. Se evalúa el aclaramiento de la tinta india inyectada.	Este compuesto promovió la fagocitosis en forma moderada.	Kato & Gozsy, 1955
	Ratones y ratas fueron tratadas y expuestas a aerosol de <i>Staphylococcus aureus</i> marcado radioactivamente. Se determinó fagocitosis de los <i>S. aureus</i> .	Sin cambios significativos en la fagocitosis de las ratas y ratones tratados con inhalaciones. El compuesto no afectó la fagocitosis.	Goldstein <i>et al.</i> , 1976
	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos peritoneales aislados de ratón tratados durante 24 horas. Se midió fagocitosis de eritrocitos de pollo.	Tratamientos de 3, 10, 30 y 90 µg/mL no tuvieron influencia sobre la fagocitosis.	Silva-Filho <i>et al.</i> , 2014
<i>Allium sativum</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con ratones. Se inyectaron eritrocitos de pollo y se estimó % de fagocitosis en macrófagos peritoneales mediante microscopía óptica. También se inyectó tinta china y se midió el ritmo de aclaración plasmático por fagocitosis.	Los tratamientos de 400 y 600 mg/kg produjeron incrementos significativos en el porcentaje de fagocitosis y en el ritmo de aclaración plasmático de la tinta china por fagocitosis.	Gu <i>et al.</i> , 2010
	Ensayo <i>in vivo</i> con pollos suplementados en la alimentación.	Los tratamientos de 100 y 200 mg/kg aumentaron significativamente la actividad fagocítica y el índice fagocítico.	El-Latif <i>et al.</i> , 2013
<i>Azadirachta indica</i>	Se evaluó la función fagocítica en macrófagos peritoneales de ratas. Para estimar fagocitosis se emplearon levaduras fluorescentes opsonizadas. El ensayo se realizó 5 días después del tratamiento.	El tratamiento disminuyó en forma dosis dependiente las cantidades de macrófagos peritoneales aislados. También incrementó la actividad fagocítica a la dosis de 120 mg/kg pero no tuvo efecto a la dosis de 300 mg/kg.	SaiRam <i>et al.</i> , 1997
3-Careno	Para el ensayo <i>in vitro</i> se emplearon macrófagos alveolares de ratas que fueron pre-tratados con 3-careno durante 15 min. Se incubó durante 1h con levaduras marcadas y se determinó fagocitosis.	Disminuyó la viabilidad de los macrófagos a todas las concentraciones. La fagocitosis disminuyó significativamente a 0,068 µg/mL. A mayor concentración las células estaban muertas.	Johansson & Lundborg, 1997
1,8-Cineol	Ratones y ratas fueron tratadas y expuestas a aerosol de <i>Staphylococcus aureus</i> marcado radioactivamente. Se determinó ingestión por fagocitosis de los <i>Staphylococcus aureus</i> .	No hubo cambios significativos en la fagocitosis de las ratas tratadas con inhalaciones respecto al grupo control de ratas y ratones no tratados. Los compuestos no afectaron la fagocitosis.	Goldstein <i>et al.</i> , 1976

<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con pollos. La fagocitosis se mide directamente en microscopio por ingestión de microesferas por los polimorfonucleares.	La actividad fagocítica (número relativo de células que fagocitaron 3 partículas) se incrementó a las tres concentraciones ensayadas (0,025%; 0,05% y 0,1%) pero el índice de actividad fagocítica (número de partículas fagocitadas respecto al número total de células fagocíticas) solo se incrementó a 0,025%.	Faix <i>et al.</i> , 2009
Citronelilo, acetato de	Se evaluó la fagocitosis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por medio del aclaramiento de la tinta china y del azul tripano. No se aportan más detalles.	Este compuesto estimuló la fagocitosis.	Gozsy & Kato, 1958
<i>Eucalyptus globulus</i>	Actividad fagocítica <i>in vitro</i> de macrófagos humanos. Control positivo de macrófagos pre-tratados con LPS. Actividad fagocítica de PMN aislados de sangre periférica de ratas tratadas con 5-fluorouracil y tratados con aceite esencial de eucalipto durante 15 días.	El tratamiento incrementó la fagocitosis en forma dosis dependiente. El tratamiento durante 15 días <i>in vivo</i> provocó recuperación de los niveles de granulocitos circulantes y actividad fagocítica respecto al control tratado con 5-fluorouracil. Los niveles de monocitos no variaron.	Serafino <i>et al.</i> , 2008
<i>Eugenia uniflora</i>	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos peritoneales de ratón. Se determina fagocitosis por absorbancia de zymosan coloreado que fue fagocitado.	Tratamientos de 25, 12.5, 6.25 y 3.12 µg/mL produjeron incrementos significativos de la actividad fagocítica. No se produjo cambios a 100 ni a 50 µg/mL.	da Franca Rodrigues <i>et al.</i> , 2013
Eugenol	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos peritoneales de ratón. Se determina fagocitosis por conteo de partículas de latex fagocitadas mediante microscopía óptica.	El índice fagocítico se redujo respecto al control en el grupo tratado con nicotina y volvió a recuperarse con el tratamiento de nicotina + eugenol (15 µg/mL).	Mahapatra <i>et al.</i> , 2011
Eugenol (en dos cementos dentales)	Se utilizan células peritoneales de ratones. Se pusieron en contacto 1h con <i>Saccharomyces boulardii</i> muertas para estimar fagocitosis.	La fagocitosis fue significativamente reducida en presencia de los cementos dentales.	de Oliveira-Mendes <i>et al.</i> , 2003
Eugenol (mezclado con formol y cresol)	Se realizó un ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos de ratas. Como ensayo de la función fagocítica se midió la capacidad de adherencia de los macrófagos a una superficie plástica. Al ser la adherencia el primer paso de la fagocitosis teóricamente habría coincidencia.	La mezcla formol-cresol-eugenol disminuyó significativamente el índice de adherencia (AI) de los macrófagos. La mitad de la inhibición máxima de AI se logró con una dilución de 1:334,5	Segura <i>et al.</i> , 1998
α -Felandreno	Ratones inyectados con células de leucemia y tratados con α -felandreno durante dos semanas.	Tratamientos de 25 y 50 mg/kg incrementaron fagocitosis en macrófagos de muestras sanguíneas.	Lin <i>et al.</i> , 2014

<i>Houttuynia cordata</i>	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos. Se evalúa la función fagocítica.	La función fagocítica mejoró con el tratamiento.	Jin, 2012
<i>Lavandula angustifolia</i>	Actividad fagocítica <i>in vitro</i> de macrófagos humanos. Control positivo de macrófagos pre-tratados con LPS. Actividad fagocítica de PMN aislados de sangre periférica de ratas tratadas con 5-fluorouracil.	El tratamiento no modificó la actividad fagocítica.	Serafino <i>et al.</i> , 2008
Limóneno	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos peritoneales aislados de ratón inoculados con linfoma murino y tratados con limóneno (10 % de la dieta) durante 9 días. Se incubaron con <i>E.coli</i> durante 30 min. Se empleó un modelo <i>in vivo</i> en ratas con tubo directo al estómago. También se realizaron ensayos <i>in vitro</i> de evaluación de la fagocitosis empleando macrófagos alveolares. Se evaluó la fagocitosis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por medio del aclaramiento de la tinta china y del azul tripano. No se aportan más detalles.	Los macrófagos procedentes de ratones con linfoma no tratados presentaban fagocitosis disminuida. Esta capacidad fue restaurada con la inclusión del limóneno en la dieta. El limóneno incrementó la actividad fagocítica de macrófagos alveolares a las concentraciones (250; 500 y 1000 mg/kg/día durante 8 días). Se incrementó la actividad fagocítica en los macrófagos tratados <i>in vitro</i> . El lavado broncoalveolar presentó mayor fagocitosis con el tratamiento de 1000 mg/kg/día. Este compuesto estimuló la fagocitosis.	del Toro-Arreola <i>et al.</i> , 2005 Hamada <i>et al.</i> , 2002 Gozsy & Kato, 1958
Linalilo, acetato de	Se evaluó la fagocitosis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por medio del aclaramiento de la tinta china y del azul tripano. No se aportan más detalles.	Este compuesto estimuló la fagocitosis.	Gozsy & Kato, 1958
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Actividad fagocítica <i>in vitro</i> de macrófagos humanos. Control positivo de macrófagos pre-tratados con LPS. Actividad fagocítica de PMN aislados de sangre periférica de ratas tratadas con 5-fluorouracil y tratados durante 15 días.	El tratamiento no modificó la actividad fagocítica pero incrementó el % de macrófagos muertos.	Serafino <i>et al.</i> , 2008
Mentol	Ratones y ratas fueron tratadas y expuestas a aerosol de <i>Staphylococcus aureus</i> marcado radioactivamente. Se determinó fagocitosis de los <i>S. aureus</i> .	No hubo cambios significativos en la fagocitosis de las ratas tratadas con inhalaciones. El compuesto no afectó la fagocitosis.	Goldstein <i>et al.</i> , 1976
Metil-nonil-cetona	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos. Se evalúa la función fagocítica.	La función fagocítica mejoró con el tratamiento con el componente puro metil-nonil-cetona.	Jin, 2012

<i>Ocimum basilicum</i>	Se evaluó capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales de ratón pre-tratados durante 24h. Después los macrófagos se pusieron en contacto con eritrocitos de oveja opsonizados.	El tratamiento causó inhibición parcial de la fagocitosis a las concentraciones de 1:8000 y 1:4000. A concentraciones de 1:1000 y 1:2000 la inhibición fue total. La viabilidad celular no se vio afectada.	Courrèges & Benencia, 2002
<i>Origanum minutiflorum</i>	Se partió de macrófagos y granulocitos aislados de peces infectados con <i>Myxobolus</i> sp. Los fagocitos se incubaron con esferas 24h y se determinó % fagocitosis y capacidad fagocítica.	El tratamiento en dosis de 8 ml/5 kg de dieta durante 30 días no causó ningún cambio significativo en el % de fagocitosis ni en la capacidad fagocítica.	Karagouni <i>et al.</i> , 2005
α -Pino	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos peritoneales. Se realizó tratamiento durante 48 h y se determinó fagocitosis de partículas de zymosan por medición de absorbancia.	La actividad fagocítica de los macrófagos aumentó a las concentraciones de 100, 200 y 400 μ g/mL.	da Franca Rodrigues <i>et al.</i> , 2015
<i>Rheum palmatum</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con macrófagos peritoneales de ratón. Se determina la función fagocítica. Los tratamientos fueron por administración oral o inhalación.	Se incrementó la función fagocítica de los macrófagos aislados a partir de ratones bajo tratamiento.	Zhang <i>et al.</i> , 1997
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con pollos suplementados en la alimentación.	Los tratamientos de 100 y 200 mg/kg aumentaron significativamente la actividad fagocítica y el índice fagocítico.	El-Latif <i>et al.</i> , 2013
<i>Salvia officinalis</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con pollos, dieta suplementada con el AE al 0,05% durante 5 semanas. Se determina actividad fagocítica por conteo de partículas de latex fagocitadas en neutrófilos sanguíneos.	La actividad fagocítica se mantuvo igual en los grupos tratados y no tratados. El AE no tuvo ningún efecto por sí mismo.	Ryzner <i>et al.</i> , 2013
<i>Syzygium aromaticum</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con dos especies de peces. Se determina fagocitosis relativa en macrófagos sanguíneos.	Tratamientos de 20, 40 60 ppm durante 10 min. incrementaron la fagocitosis relativa	Azad <i>et al.</i> , 2014
<i>Syzygium cumini</i>	Ensayo <i>in vitro</i> con macrófagos peritoneales. Se realizó tratamiento durante 48 h y se determinó fagocitosis de partículas de zymosan por medición de absorbancia.	La actividad fagocítica de los macrófagos aumentó a las concentraciones de 200 y 400 μ g/mL.	da Franca Rodrigues <i>et al.</i> , 2015
<i>Thymus vulgaris</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con dos especies de peces. Se determina fagocitosis relativa en macrófagos sanguíneos.	Tratamientos de 20, 40 60 ppm durante 10 min. incrementaron la fagocitosis relativa	Azad <i>et al.</i> , 2014
	Ensayo <i>in vivo</i> con pollos suplementados en la dieta. Se midió actividad fagocítica en sangre.	Tratamiento de 0,5 g/kg de aceite esencial +0,4 mg selenio/kg en pienso estimuló la fagocitosis.	Placha <i>et al.</i> , 2014

	Ensayo <i>in vivo</i> con pollos suplementados en la dieta. Se midió actividad fagocítica de los neutrófilos.	Se observó incremento de actividad fagocítica a 200 mg/kg. No se observó incremento a 100 y 300 mg/kg.	Saleh <i>et al.</i> , 2014
Timol	Aplicación tópica <i>in vivo</i> en ratones depilados. Se evalúa el aclaramiento de la tinta india inyectada.	Este compuesto promovió la fagocitosis en forma moderada.	Kato & Gozsy, 1955
<i>Zingiber officinale</i>	Ensayo <i>in vivo</i> con pollos suplementados en la dieta. Se midió actividad fagocítica de los neutrófilos.	Se observó incremento de actividad fagocítica a 100 y 300 mg/kg. No se observó incremento a 200 mg/kg.	Saleh <i>et al.</i> , 2014

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Fundamento

Con el propósito de estudiar la fagocitosis se han descrito varios tipos de ensayos experimentales *in vitro*. El proceso básico de estos ensayos es la incubación de células con capacidad fagocítica junto a partículas susceptibles de ser fagocitadas, así como la monitorización del índice de ingestión de estas partículas o su disminución en el medio. Es importante la distinción entre las partículas fagocitadas y las que quedan adheridas a la membrana celular (Hed, 1986).

En nuestro trabajo hemos adoptado con ligeras variaciones para el empleo de microplacas el método establecido por Risco-Rodríguez en su tesis doctoral (Risco-Rodríguez, 2000). Se ha utilizado un ensayo que utiliza microesferas fluorescentes añadidas a una suspensión de células con capacidad fagocítica. Tras un tiempo de incubación se detiene el proceso fagocítico y mediante una solución de “apagamiento” se elimina la fluorescencia de las microesferas adheridas a la superficie celular. Las células fluorescentes, que son aquellas que poseen en su interior microesferas fagocitadas, son estudiadas por citometría de flujo. Este ensayo es capaz de distinguir entre las microesferas fagocitadas y las que han quedado adheridas a la membrana celular. El ensayo permite también una cuantificación de la fagocitosis independientemente de las variaciones de pH intrafagosomal (Lehman *et al.*, 1998). Es importante haber establecido unas condiciones exactas de protocolo experimental, ya que la fagocitosis y el subsiguiente proceso de digestión incluye múltiples pasos y varios factores pueden influir en el mismo.

7.2.2 Material

- Etilendiamina tetraacetato de sodio dihidratado (EDTA-Na₄•H₂O). [Sigma, referencia: E6511].
- Cloruro de sodio (NaCl) [Sigma, referencia: S5886].
- EDTA disodio (Edetate disodium) [Sigma, referencia: E0399].
- Azul tripano [Sigma, referencia: T6146].
- Microesferas fluorescentes 2 µm de diámetro (FluoSpheres® Yellow-green (505/515), 2,0 µm; 2,0% de sólidos, 2 mL) [Invitrogen, Molecular Probes, referencia: F8827].
- Ioduro de propidio [Sigma, referencia: P4170].
- Cloruro de amonio (NH₄Cl). [Sigma, referencia: A9434].
- Bicarbonato de potasio (KHCO₃). [Sigma, referencia: P9144]

- Dimetil-sulfóxido (DMSO) [Sigma, referencia: D1435].
- Paraformaldehído [Sigma, referencia: 158127].
- Lipopolisacáridos bacterianos (LPS). LPS de *E. coli* 0127:B8. [Sigma, referencia: L3129].
- Suero humano (Sera human) [Sigma, referencia: S2257].
- Solución salina de Hanks modificada, más cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (HBSS). [Sigma, referencia: H8264].
- Solución salina de Hanks modificada, sin los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (HBSS) [Sigma, referencia: H6648].
- Ricinoleato de gliceril-poliétilenglicol (E484) [suministrado por Lidervet, S.L.].
- Microtubo tipo eppendorf 1,5 mL tapa plana [Rubilabor, referencia: 711.1500].
- Tubos plásticos de 50 mL sin faldón [Rubilabor, referencia: 644.2050].
- Tubos plásticos de 15 mL [Rubilabor, referencia: 644.2015].
- Placa microtiter 96 pocillos, fondo plano. [Rubilabor, referencia: 822.0005].
- Placas microtiter 96 pocillos, fondo U. [Rubilabor, referencia: 822.0001].
- Puntas de multipipeta de 200 μL (fine point LTS tips). Solo para empleo en multipipetas LTS (Rainin) [Rainin, referencia: RC-L250/10].
- Puntas de pipeta de 200 μL [Rubilabor, referencia: 16-2001].
- Punta de pipeta de 10 mL [Rubilabor, referencia: 511.0002].
- Punta de pipeta 100-1000 μL [Rubilabor, referencia: 015/162222].
- *Buffy coats* procedentes del *Banc de Sang i Teixits de Catalunya*.
- Citómetro de flujo: Cytomics FC 500 MPL system, Beckman coulter, Inc. Pertenece a la Unidad de Citometría de los Servicios-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

7.2.3 Solución stop de la fagocitosis

Solución al 0,9% p/v de NaCl y con 0,02% p/v de EDTA disódico (Robinson *et al.*, 1994). El EDTA permite captar los cationes del medio, necesarios para el proceso fagocítico. Esta solución se añadió a 0 °C, previniendo la adhesión de las microsferas a la membrana de las células fagocíticas (Zielińska & Fenrych, 1997).

7.2.4 Solución de apagamiento (quenching)

Durante la fagocitosis algunas microsferas quedan adheridas a la superficie celular sin ser internalizadas. Este hecho aumentaría erróneamente el conteo del número de partículas fagocitadas. Al proceso de disminución o eliminación de la fluorescencia inespecífica se le conoce como apagamiento (*quenching*). En este proceso ocurre la interacción de una molécula fluorescente con un solvente que disminuye la producción cuantitativa de fluorescencia (Hed, 1977; Henderson *et al.*, 1998). Las diferencias observadas en los resultados por la utilización de la solución de *quenching* varía entre un 3,1% en muestras control y un 4,2% en muestras estimuladas con LPS según algunos autores. Son valores bajos debido a que las microsferas utilizadas presentan una baja unión inespecífica (Martin & Bhakdi, 1992; Risco-Rodríguez, 2000). Una solución madre de azul tripano fue preparada a una concentración de 3 mg/mL y se conservó a 0 °C. Horas antes de su utilización se preparó una dilución con 3 partes de solución madre y 4 de HBSS modificada, con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (Robinson *et al.*, 1994).

7.2.5 Solución de yoduro de propidio (IP)

Se preparó una solución de 1 mg de yoduro de propidio en 1 mL de HBSS con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se conservó a 4 °C.

7.2.6 Preparación de las muestras de aceites esenciales

Se tomaron 10 μL de cada aceite esencial y se añadió este volumen a un eppendorf de 1,5 mL previamente tarado. La masa de esta alícuota se determinó en balanza analítica. Se completó el volumen hasta 1mL con solución salina de Hanks modificada, más cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esta solución de Hanks había sido previamente suplementada con un 10% de DMSO y 1,5% del emulgente alimentario E-484 (gliceril-polietilenglicol-ricinoleato) con el fin de facilitar la solubilidad de los aceites esenciales. Los aditivos o solventes empleados fueron ensayados previamente para descartar que presentaran algún tipo de actividad por sí mismos. Se sometió la mezcla a vortex durante 2 minutos que fueron seguidos de un tratamiento de 5 minutos en el equipo de ultrasonido. El resultado final fue una emulsión del aceite esencial con aspecto homogéneo. Esta emulsión se utilizó como solución madre.

A partir de la solución madre se realizó una dilución $1/10$ empleando como solvente solo solución salina de Hanks modificada, más cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esta primera dilución fue seguida de una nueva dilución $1/2$ que fue la primera solución ensayada. Siguieron después una serie de diluciones $1/2$ y $1/10$ que fueron también ensayadas. La secuencia de diluciones realizadas fue la siguiente: solución madre (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) $\rightarrow 1/10 \rightarrow 1/2$ (primera solución ensayada) $\rightarrow 1/2 \rightarrow 1/10 \rightarrow 1/10$. Al añadir el tratamiento a la placa ocurre una dilución $1/10$ de las concentraciones que se encuentran en el eppendorf. Fueron ensayadas todas las soluciones excepto la solución madre y la primera dilución $1/10$ (9 en total).

7.2.7 Solución de hemólisis

Se prepara una solución madre (x10) que se conserva a 4 °C y que está compuesta por: NH_4Cl (8,99 g), KHCO_3 (1,0 g), EDTA-Na_4 (0,037 g), H_2O MilliQ c.s.p. 100 mL. Esta solución madre se diluye 1:10 (v/v) en el mismo momento de uso. Con esta técnica se busca una acumulación de NH_4Cl en el interior de los eritrocitos. Se produce un aumento en la presión osmótica de los eritrocitos y como consecuencia la ruptura de la membrana celular, lo que facilita su eliminación selectiva (Bossuyt *et al.*; 1997).

7.2.8 Obtención de la suspensión de leucocitos humanos

Se han utilizado dos tipos de soluciones de Hanks modificada (HBSS). Una solución de HBSS modificada, sin cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} y sin rojo de fenol para la preparación de la suspensión de células fagocíticas. Para el ensayo funcional de fagocitosis, sin embargo, se ha tenido que substituir esta solución tampón por otra de HBSS modificada, con presencia de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} y sin rojo de fenol. Esto es debido a que durante la manipulación de las células es necesario prevenir su agrupación, un fenómeno que se facilita si aparecen los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} . En cambio, la fagocitosis como ensayo funcional activo, sí necesita de la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Robinson *et al.*, 1994). Parece ser que ambos cationes son requeridos para la interacción de los neutrófilos con el material opsonizado (Roos *et al.*, 1981).

Se obtienen los leucocitos a partir de *buffy coats* provenientes del *Banc de Sang i Teixits de Catalunya*. Los *buffy coats* son la capa amarillenta rica en células blancas y plaquetas obtenidas por centrifugación de la sangre procedente de voluntarios humanos sanos. El procedimiento que se emplea para la obtención de la suspensión de leucocitos es la hemólisis (*shock* hemolítico) mediante el empleo de una solución de cloruro amónico (Bossuyt *et al.*; 1997).

Para el procedimiento de hemólisis se prepara una solución madre (x10) que se conserva a 4 °C: NH₄Cl (8,99 g); KHCO₃ (1g); EDTA-Na₄ (0,037 g); H₂O MilliQ c.s.p. 100 mL. Se diluye la solución madre 1:10 (v/v) en el momento de uso.

1. Se toman 500 µL de sangre total que se depositan en tubos plásticos de 15 mL. Se añaden 5 mL de solución de hemólisis ya diluída.
2. Tras 3 minutos de lisis, se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm y 4 °C y se elimina el sobrenadante.
3. El acúmulo de células obtenido se lava con solución de HBSS sin cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ (5 mL) y se centrifuga 5 minutos a 2500 rpm.
4. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante y el acúmulo de células se resuspende en HBSS sin cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ (10 mL).

La suspensión resultante contiene todo tipo de leucocitos y una cantidad variable de eritrocitos y restos celulares. La cantidad de restos se puede minimizar con sucesivos lavados y centrifugaciones. Se ha de tener en cuenta que un incremento en el tiempo de lisis con cloruro amónico puede dar como resultado un aumento de la mortalidad y alteración en la morfología celular. Las preparaciones celulares se mantuvieron en hielo hasta su empleo, el cual nunca fue superior a las 2 horas.

7.2.9 Partículas para la fagocitosis

En el presente trabajo se ha optado por el uso de microesferas fluorescentes. Se han seleccionado las microesferas Fluospheres (Invitrogen, molecular probes) de carboxilato modificado, con un diámetro de 2 µm y con fluorescencia amarilla-verde (505/515 nm). La excitación de estas partículas se produce muy eficazmente a 488-490 nm, emitiendo una intensa fluorescencia. La concentración utilizada es de 5,5 x 10⁷ microesferas/mL. Se conservan a temperatura ambiente protegidas de la luz. Son microesferas altamente cargadas y relativamente hidrófilas, que son estables en soluciones con altas concentraciones de electrolitos (hasta 1M de sal univalente).

Las microesferas de carboxilato modificado pueden adsorber proteínas y otras macromoléculas, pero con mucha menos intensidad que las microesferas hidrofóbicas. Además son apropiadas para las aplicaciones en sistemas biológicos porque, al estar altamente cargadas, se reduce la atracción por las células, reduciéndose la unión inespecífica, ya que las uniones inespecíficas son el resultado de interacciones hidrofóbicas, lo que las hace apropiadas para su aplicación en experimentos sobre fagocitosis.

Por citometría de flujo podemos visualizar estas microesferas fluorescentes, la intensidad de fluorescencia es suficiente para poder visualizar las partículas individuales. Las pequeñas dimensiones de estas esferas no afectan la sensibilidad del citómetro para las células, ya que no hay solapamientos entre esferas y células en la discriminación mediante la dispersión lateral (*side scatter*) y frontal de la luz (*forward scatter*). En la **Figura 7.1** se muestra un histograma biparamétrico donde aparecen conjuntamente las microesferas y las células.

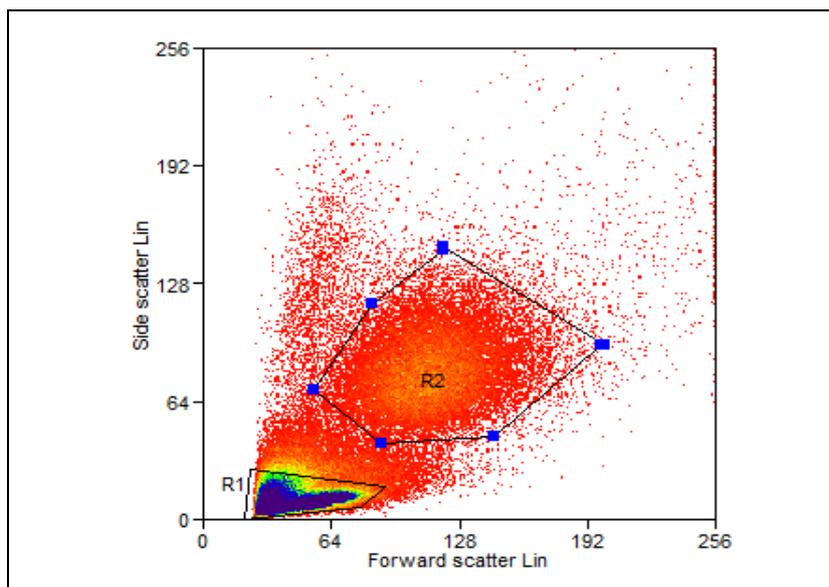


Figura 7.1. Histograma biparamétrico de una suspensión de células sanguíneas y microesferas fluorescentes. Representa el tamaño celular o de partícula frente a la granulosidad. Las poblaciones celulares y las microesferas se distinguen mediante la dispersión lateral y frontal de la luz. La región R1 recoge las esferas libres y la región R2 incluye a los neutrófilos, las células objeto de nuestro estudio.

7.2.10 Oponización de las microesferas

La oponización es el proceso por el que se hacen susceptibles las partículas a la fagocitosis. La incubación de partículas con opsoninas facilita la fagocitosis mediante la interacción con receptores específicos en las células fagocíticas. En el presente trabajo, se ha seguido la siguiente metodología para la oponización de las partículas fluorescentes que serán fagocitadas:

1. Fueron mezclados suavemente 400 μL de HBSS con los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} con 200 μL de suero humano en un tubo de vidrio cónico de 15 mL.
2. Se añadieron 12 μL de la suspensión de microesferas fluorescentes y se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos en baño termostático y una ligera agitación. Durante la incubación el tubo permaneció cubierto de papel de aluminio.
3. Se procedió a centrifugar la mezcla a temperatura ambiente, durante 3 minutos a 3500 rpm.
4. Se desechó el sobrenadante y el acúmulo de microesferas fluorescentes fue resuspendido en 1200 μL de HBSS con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} .
5. Las microesferas fluorescentes ya oponizadas fueron guardadas en la oscuridad recubiertas de papel de aluminio.

7.2.11 Control de la adherencia inespecífica

La adhesión de las partículas a fagocitar es precedida por un proceso activo de movimiento celular (quimiotaxis) y profusión del citoplasma (pseudopodia), que está influenciado por factores solubles (endotoxinas, interleucinas, etc.). Este proceso, al igual que la ingestión en la célula, depende de la temperatura y de la energía, entre otros factores. Algunos autores, para corregir la adherencia inespecífica utilizan una muestra control incubada a 4 °C, lo que inhibiría la fagocitosis pero no la adherencia inespecífica (Santos *et al.*, 1995). En nuestro caso, las células fueron fijadas añadiendo 50 µL de paraformaldehído al 1% al pocillo control donde se esperaba que no hubiese actividad fagocítica (0% fagocitosis). Este control constituyó la referencia de la adherencia inespecífica en nuestras condiciones de ensayo (**Figura 7.2**).

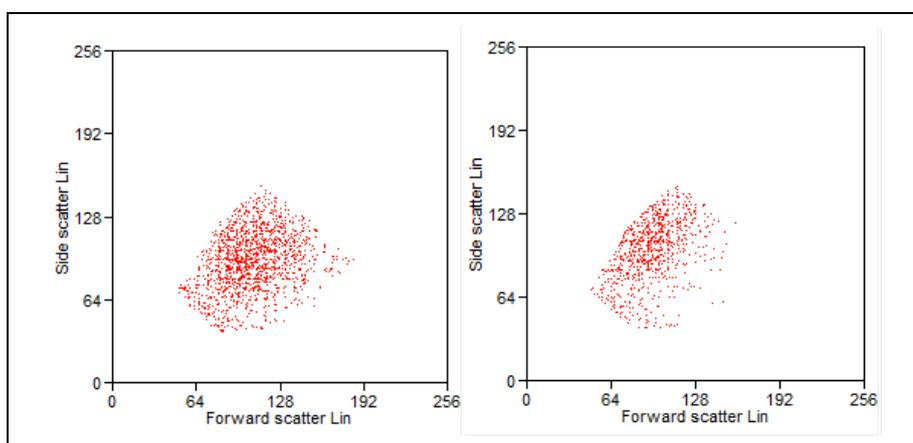


Figura 7.2. Comparación mediante dos histogramas biparamétricos de la fagocitosis de microesferas por neutrófilos en dos controles diferentes. En el de la izquierda (nivel base de la fagocitosis) las células fueron incubadas con microesferas durante 45 min a 37 °C. En el de la derecha (control de la adherencia inespecífica) las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1% e inmediatamente incubadas con microesferas durante 45 min a 37 °C. En ninguno de los dos casos se añadió LPS u otra sustancia estimulante de la fagocitosis. En ambas muestras se contaron 25403 ± 23 neutrófilos vivos y solo se muestran los unidos a esferas fluorescentes: 1556 ± 23 en el control del nivel base de la fagocitosis y solamente 834 ± 19 en el control de adherencia inespecífica.

7.2.12 Método operatorio

1. Se tomaron alícuotas de 200 µL de la suspensión de células fagocíticas y se pusieron en los 48 primeros pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano (los pocillos tienen capacidad para 300 µL). Durante el período de incubación, la agitación fue continua para que la fagocitosis no quedase limitada por la falta de contacto.
2. Se añadió el tratamiento (20 µL) en los pocillos designados como tratamiento. En los controles negativos (nivel base de la fagocitosis y control de la adherencia inespecífica) se puso 20 µL de HBSS con cationes. En los pocillos designados como control positivo se añadió 20 µL de LPS (1 mg/mL). Se realizó una preincubación de 10 minutos a 37 °C con agitación horizontal.

3. Se añadieron 20 μL de la solución de microesferas fluorescentes a todos los pocillos. En los pocillos indicados como control de la adherencia inespecífica se añadieron a continuación e inmediatamente 50 μL de paraformaldehído al 1%. Estos pocillos representarán el grupo de células donde no hay ningún tipo de actividad fagocítica (0% fagocitosis).
4. Se incubó la placa a 37 °C con agitación horizontal durante 45 minutos.
5. Se añadieron 50 μL de solución Stop a 0 °C a cada pocillo de la placa.
6. -Se añadieron 2 μL de la solución de yoduro de propidio a cada pocillo de la placa. Se alcanzó una concentración final de yoduro de propidio de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este compuesto se empleó con el propósito de permitir la discriminación de las células viables.
7. Se añadieron 20 μL de la solución quenching a 0 °C a cada pocillo de la placa.
8. Se añadieron 50 μL de paraformaldehído al 1% en todos los pocillos menos en los marcados como control negativo al que ya se le había añadido con anterioridad.
9. Se hicieron las determinaciones planeadas en el citómetro de flujo.

En la **Figura 7.3** se muestra la distribución de los controles y tratamientos a través de la microplaca.

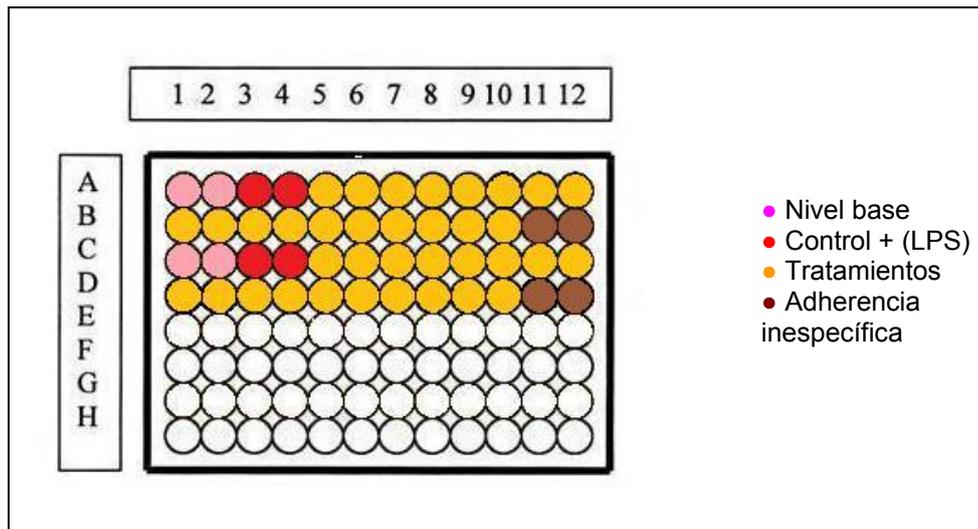


Figura 7.3. Representación esquemática de la distribución de las muestras y controles en una placa de microtiter de 96 pocillos.

7.2.13 Células estudiadas

El mínimo de células estudiadas en total ha sido 50000, con un mínimo de 20000 neutrófilos en la suspensión de leucocitos. Todas las medidas se han realizado sobre la población viable (negativa frente al yoduro de propidio).

7.2.14 Parámetros analizados

Fueron registrados los valores de dispersión lateral de la luz (side scatter) y dispersión frontal de la luz (forward scatter), la intensidad de la fluorescencia verde (para las microesferas fluorescentes) y de la fluorescencia roja (para el yoduro de propidio). La fluorescencia de las microesferas se midió entre los 515 y los 548 nm

y la fluorescencia del ioduro de propidio sobre los 607 nm. La intensidad de fluorescencia fue expresada como el valor de la media del canal de fluorescencia.

7.2.15 Cálculos, expresión de los resultados y análisis estadístico

El protocolo de análisis de los datos procesados fue realizado mediante los histogramas que se recogen en las **Figuras 7.1, 7.4 y 7.5**. En el estudio de la actividad de las muestras de aceite esencial sobre la fagocitosis se calcularon los siguientes parámetros:

1. Capacidad fagocítica (CF). Es el porcentaje de células vivas de una población que han fagocitado una o más partículas.
2. Estimulación de la fagocitosis (EF). Se refiere a la variación en porcentaje de la capacidad fagocítica (CF) en las células tratadas con respecto a las células control. Se calcula de la siguiente forma:

$$EF = \frac{(CF \text{ muestra} - CF \text{ control})}{CF \text{ control}} \times 100$$

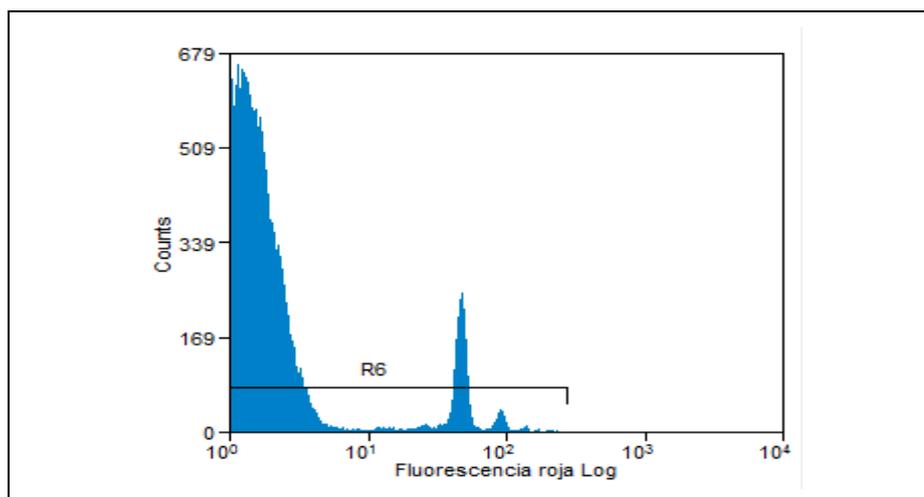


Figura 7.4. Histograma monoparamétrico de la fluorescencia roja del ioduro de propidio (escala logarítmica) del total de células o partículas. Se delimita la región R6 para seleccionar las células vivas. Las células con un valor de fluorescencia roja superior al recogido en la región R6 se consideran muertas. En nuestros experimentos la viabilidad celular siempre se encontró por encima del 95 %.

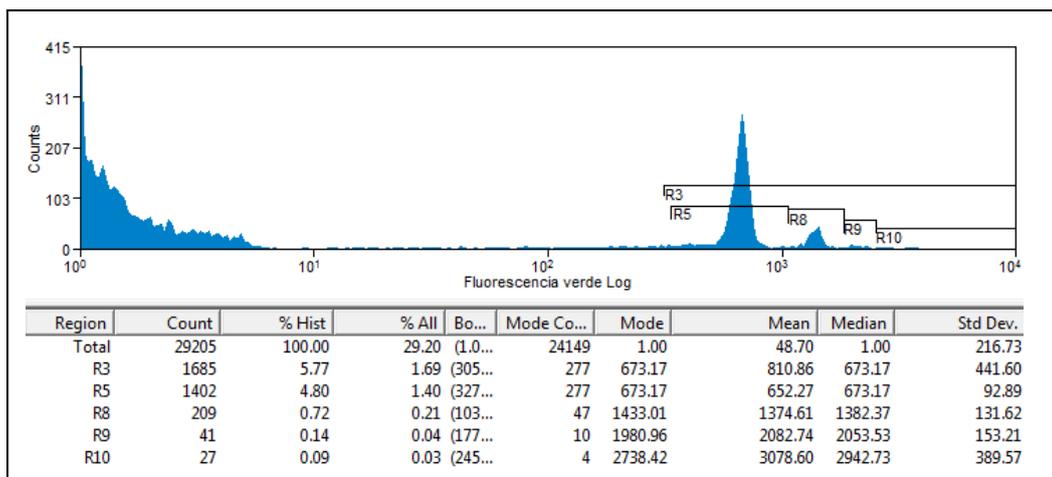


Figura 7.5. Histograma monoparamétrico de la fluorescencia verde (escala logarítmica). En el histograma fueron aplicadas las regiones 2 (neutrófilos) y 6 (células vivas). Es por ello que aquí solo se representa la fluorescencia verde de los neutrófilos vivos. Se crearon diferentes marcadores o regiones para seleccionar los distintos picos de fluorescencia, según se fagocitasen 1 (R5), 2 (R8), 3 (R9), 4 o más microesferas (R10). R3 comprende el total de neutrófilos que fagocitaron microesferas.

Los análisis citométricos han sido grabados como archivos (listmodes) para posteriormente ser reprocesados en un ordenador mediante el software especializado Summit versión 4.2 para Windows. Los resultados fueron resumidos en tablas donde se recogió el efecto de diferentes concentraciones de aceite esencial sobre el parámetro “estimulación de la fagocitosis”. Los datos reflejaron las medias \pm desviación estándar (DE) de cuatro experimentos independientes. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos y los controles se realizaron mediante un análisis de varianza (one-way ANOVA) seguido de una prueba Dunnett (Dunnett’s test). Como nivel de significación se tomó una $p < 0.05$. La concentración inhibitoria 50 % (IC_{50}) fue calculada cuando fue posible por interpolación en una curva dosis-respuesta construida mediante una regresión no lineal que seguía un modelo de curva sigmoidea. Esta curva se obtuvo de graficar la estimulación de la fagocitosis (%), *versus* el logaritmo de la concentración del aceite esencial ($\mu\text{g/mL}$). Para la realización de los cálculos y el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad, Prism versión 5.0 para Windows (San Diego, CA, USA).

7.3 Resultados

El efecto de las muestras ensayadas sobre la fagocitosis se resume en la **Tabla 7.2**. Como control positivo se emplearon lipopolisacáridos bacterianos (LPS) de *E. coli*. La **Tabla 7.3** muestra la relación entre las concentraciones expresadas en % v/v y las concentraciones expresadas en $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 7.2. Resultados de los ensayos de fagocitosis.

Estimulación de la fagocitosis (%)											
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										
	Árbol del té	Bornilo + Isobornilo (acetato)	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Control (+)	54,2±15,7*	33,5±1,7*	40,9±5,3*	23,2±5,0*	52,7±31,0*	90,8±17,2*	73,6±14,7*	26,5±1,9*	42,7±19,5*	69,4±2,8*	49,0±2,8*
Ad. Inesp.	-67,4±15,3*	-59,5±4,7*	-43,3±2,5*	-61,6±15,3*	-74,5±2,9*	-49,3±6,8*	-61,7±10,0*	-62,1±2,4*	-59,2±11,1*	-64,5±7,1*	-65,2±2,5*
7,8 x 10 ⁻⁷	-18,8±19,6	1,9±3,5	5,2±2,3	-1,3±8,8	-1,7±8,0	6,5±1,5	-1,4±1,7	0,4±0,1	-3,6±1,1	-1,7±3,5	3,8±4,2
7,8 x 10 ⁻⁶	-14,1±13,2	4,0±4,2	7,0±2,9	0,0±10,7	1,4±7,3	4,9±0,5	-0,7±4,0	-1,3±0,5	0,2±3,3	1,9±3,4	5,3±2,2
7,8 x 10 ⁻⁵	-19,2±20,1	4,9±2,6	9,4±3,3*	1,2±7,6	-1,1±6,0	3,4±1,6	-1,4±3,2	0,2±1,2	0,6±3,6	3,1±2,6	4,2±1,1
1,6 x 10 ⁻⁴	-8,4±14,7	2,8±4,4	10,3±1,3*	3,5±10,5	2,4±8,9 ns	6,6±1,9	0,3±3,4	-0,2±0,8	-0,2±2,9	2,2±6,6	3,6±3,5
3,1 x 10 ⁻⁴	-10,1±10,2	4,5±0,4	11,0±3,3*	4,9±8,6	8,2±10,3	9,3±0,7	0,1±4,1	-3,3±3,1	1,5±3,3	-1,3±5,8	0,0±3,4
6,3 x 10 ⁻⁴	-13,2±13,4	-0,2±7,1	4,5±4,5	2,0±7,4	0,1±16,4	9,1±1,5	-1,4±3,6	-10,4±0,8*	-1,1±4,5	-2,3±6,8	1,9±3,4
1,3 x 10 ⁻³	-17,7±16,7	0,6±6,1	7,5±3,1	4,8±9,2	-14,8±14,2	22,5±1,1*	-1,8±4,3	-14,0±5,0*	-0,5±3,7	-17,5±1,1*	1,4±3,2
2,5 x 10 ⁻³	-24,5±17,1	-0,1±6,6	2,2±2,2	-1,5±7,6	-18,2±12,6	13,2±1,6*	-20,7±3,1*	-24,3±10,5*	-5,2±0,9	-19,4±1,0*	-24,6±3,0*
5,0 x 10 ⁻³	-35,2±20,2*	21,3±2,6*	4,1±8,7	-12,8±2,2	-36,1±15,5*	-14,6±1,7*	-29,4±5,2*	n/a	-12,9±1,4	-28,5±1,4*	-38,7±3,1*
IC ₅₀ µg/mL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

*Diferencias significativas (p<0.05). Ad. Inesp: Adherencia inespecífica. n/a Valor no disponible.

Tabla 7.2. Continuación.

Estimulación de la fagocitosis (%)											
Conc. %, v/v	Aceites esenciales, sus fracciones o sustancias constituyentes										
	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Control (+)	45,6±16,2*	50,5±7,9*	113,2±23,9*	90,7±5,7*	37,0±5,5*	43,7±2,2*	71,2±5,4*	89,2±4,5*	51,5±3,0*	40,6±2,2*	52,5±10,6*
Ad. Inesp.	-67,6±2,0*	-48,7±0,9*	-69,4±14,6*	-67,1±14,7*	-63,0±2,3*	-50,9±2,4*	-52,2±2,4*	-56,0±2,9*	-59,6±4,3*	-59,7±9,9*	-32,5±12,0*
7,8 x 10 ⁻⁷	-3,7±5,2	3,4±0,3	2,3±2,6	0,6±3,3	-0,6±6,4	4,4±2,4	4,5±2,8	0,8±2,6	1,7±3,3	0,0±3,0	-10,6±11,2
7,8 x 10 ⁻⁶	0,0±5,6	4,7±2,0	3,2±3,0	1,6±3,4	2,1±6,3	13,1±4,4*	19,9±0,8*	0,6±3,2	3,9±5,3	4,5±0,9	-43,3±4,9
7,8 x 10 ⁻⁵	-1,9±7,3	4,2±3,0	-0,1±4,7	0,8±3,0	9,2±4,3	16,3±3,0*	16,6±2,8*	2,8±2,0	4,8±1,8	2,5±4,4	-52,6±9,5*
1,6 x 10 ⁻⁴	-3,3±6,4	4,2±2,1	-10,5±6,8	0,3±2,6	10,9±6,5	16,2±2,8*	17,2±2,6*	3,0±1,2	4,4±3,3	2,3±5,4	-42,6±16,9*
3,1 x 10 ⁻⁴	0,0±7,6	6,1±2,0	-32,0±25,0	1,7±3,4	9,1±7,2	9,8±1,5*	10,4±1,5*	1,2±3,8	2,7±1,9	3,5±2,2	-52,6±0,1*
6,3 x 10 ⁻⁴	-3,7±10,3	4,7±0,8	-47,6±31,5*	0,3±3,3	-11,5±14,0	0,9±2,6	2,7±2,6	1,0±4,4	6,0±1,5	-4,0±2,4	-74,2±25,6*
1,3 x 10 ⁻³	-0,5±12,7	6,4±2,4	-43,1±22,8*	-19,5±1,4*	-7,2±8,4	0,0±4,0	0,6±4,3	0,5±3,9	5,0±5,3	3,7±5,3	-77,8±20,0*
2,5 x 10 ⁻³	-15,1±12,3	4,6±1,4	-38,7±9,4*	-30,3±1,3*	-24,9±11,7*	-8,8±4,3*	-6,1±2,3*	-10,5±2,5*	7,6±3,1*	-20,8±2,7*	-69,3±26,9*
5,0 x 10 ⁻³	-41,0±14,2*	-9,7±6,4*	-39,1±28,3*	-33,8±2,7*	-38,5±2,0*	-16,2±2,2*	-14,9±4,1*	-22,1±1,9*	-11,3±2,5*	-38,0±1,0*	-72,2±25,0*
IC ₅₀ µg/mL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,5±5,0

*Diferencias significativas (p<0.05). Ad. Inesp: Adherencia inespecífica. n/a Valor no disponible.

Tabla 7.3. Equivalencias entre las concentraciones expresadas en % (v/v) y las concentraciones expresadas en µg/mL.

Equivalencias entre concentraciones expresadas en % (v/v) y las expresadas en µg/mL											
Concentración %, v/v	Concentración (µg/mL)										
	Árbol del té	Bornilo + Isobornilo (acetato)	Cayeputi	Cilantro	Clavo	Clavo (terpenos)	Eugenol	Enebro	Estragón	Jengibre	Laurel
$7,8 \times 10^{-7}$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$7,8 \times 10^{-6}$	0,08	0,09	0,07	0,07	0,08	0,07	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07
$7,8 \times 10^{-5}$	0,75	0,87	0,73	0,71	0,79	0,71	0,90	0,70	0,73	0,73	0,72
$1,6 \times 10^{-4}$	1,50	1,75	1,46	1,42	1,58	1,42	1,80	1,40	1,46	1,47	1,43
$3,1 \times 10^{-4}$	3,00	3,49	2,92	2,85	3,15	2,83	3,60	2,80	2,93	2,94	2,86
$6,3 \times 10^{-4}$	6,00	6,99	5,84	5,69	6,30	5,67	7,20	5,60	5,85	5,88	5,72
$1,3 \times 10^{-3}$	12,00	13,98	11,69	11,39	12,60	11,34	14,40	11,20	11,70	11,75	11,44
$2,5 \times 10^{-3}$	24,00	27,95	23,38	22,78	25,20	22,68	28,80	22,40	23,40	23,50	22,88
$5,0 \times 10^{-3}$	48,00	55,90	46,75	45,55	50,40	45,35	57,60	44,80	46,80	47,00	45,75

%, v/v	Limón	Limón (terpenos)	Niaulí	Nuez moscada	Nuez moscada (terpenos)	Orégano Español	Carvacrol	Palmarosa	Romero	Tomillo rojo	Timol
$7,8 \times 10^{-7}$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
$7,8 \times 10^{-6}$	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,09
$7,8 \times 10^{-5}$	0,70	0,68	0,73	0,72	0,69	0,77	0,81	0,75	0,76	0,74	0,87
$1,6 \times 10^{-4}$	1,41	1,36	1,46	1,45	1,37	1,54	1,63	1,49	1,51	1,47	1,74
$3,1 \times 10^{-4}$	2,82	2,72	2,92	2,90	2,74	3,07	3,25	2,98	3,03	2,95	3,49
$6,3 \times 10^{-4}$	5,63	5,44	5,84	5,79	5,48	6,14	6,51	5,97	6,05	5,89	6,98
$1,3 \times 10^{-3}$	11,26	10,88	11,68	11,59	10,96	12,29	13,01	11,94	12,10	11,79	13,95
$2,5 \times 10^{-3}$	22,53	21,75	23,35	23,18	21,93	24,58	26,03	23,88	24,20	23,58	27,90
$5,0 \times 10^{-3}$	45,05	43,50	46,70	46,35	43,85	49,15	52,05	47,75	48,40	47,15	55,80

7.4 Discusión

Los ensayos de estimulación de la fagocitosis arrojaron resultados relativamente homogéneos para el conjunto de aceites esenciales, fracciones o componentes puros estudiados (**Tabla 7.2**), ya que la mayor parte de estas sustancias inhibió la fagocitosis. Excepcionalmente, algunos constituyentes o fracciones de aceites esenciales mostraron cierto efecto estimulante sobre la fagocitosis. La mezcla de acetato de bornilo + acetato de isobornilo estimuló la fagocitosis de forma moderada pero significativa (21,3%) a la máxima concentración ensayada (55,90 $\mu\text{g/mL}$). Por su parte, los terpenos del clavo, compuestos mayoritariamente por β -cariofileno (83,0%), estimularon también de forma moderada la fagocitosis a las concentraciones de 11,34 y 22,68 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la inhibieron a la concentración más alta ensayada (45,35 $\mu\text{g/mL}$), mostrando así un comportamiento complejo.

Algunos autores han encontrado efectos estimulantes sobre la fagocitosis en algunos aceites esenciales como *Rheum palmatum*, *Allium sativum* y *Houttuynia cordata* (Zhang *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 2010; Jin, 2012). También compuestos como el acetato de citronelilo y el acetato de linalilo han estimulado la fagocitosis en experimentos publicados (Gozsy & Kato, 1958). El ajo (*Allium sativum* L) en particular posee reportes de uso medicinal que se remontan por lo menos a 1500 años antes de Cristo cuando los antiguos egipcios la empleaban en el tratamiento de heridas, infecciones, tumores y parásitos intestinales (Gu *et al.*, 2010).

Los aceites esenciales de cayeputi, estragón y cilantro no manifestaron actividad alguna sobre la estimulación de la fagocitosis a las concentraciones ensayadas, o esta actividad fue tan baja que puede ser despreciada. En la literatura hemos encontrado varios ejemplos de aceites esenciales que no exhibieron ningún efecto sobre la actividad fagocítica de macrófagos humanos, de peces o murinos. Entre estos aceites esenciales se encuentran el de *Lavandula angustifolia*, el de *Origanum minutiflorum* o los compuestos puros como el alcanfor, el mentol o el 1,8-cineol (Goldstein *et al.*, 1976; Karagouni *et al.*, 2005; Serafino *et al.*, 2008). Sin embargo, en nuestro caso, la mayoría de los aceites esenciales, sus fracciones, o componentes puros ensayados mostraron una actividad inhibitoria sobre la estimulación de la fagocitosis en mayor o menor medida. A la mayor concentración ensayada, los aceites esenciales de nuez moscada, clavo, nialulí, árbol del té, laurel, limón, tomillo rojo y jengibre alcanzaron o sobrepasaron el 25% de inhibición de la estimulación de la fagocitosis (**Figura 7.6**). También alcanzaron o sobrepasaron un 25% de inhibición de la estimulación de la fagocitosis los terpenos de nuez moscada, el eugenol y el timol.

El timol (**Figura 7.7**) resultó ser la más activa de las sustancias estudiadas y la única donde se pudo calcular la IC_{50} de inhibición de la estimulación de la fagocitosis con un valor de 1,5 $\mu\text{g/mL}$. El timol, en la bibliografía, aparece reportado mas como un promotor moderado de la fagocitosis, pero los resultados no fueron obtenidos *in vitro* sino *in vivo* y utilizando la aplicación tópica como vía de administración (Kato & Gozsy, 1955). El timol constituye un 50,0% del aceite esencial de tomillo rojo, por ello fue lógico encontrar en dicha esencia una inhibición superior al 25% de la estimulación de la fagocitosis a la máxima concentración ensayada.

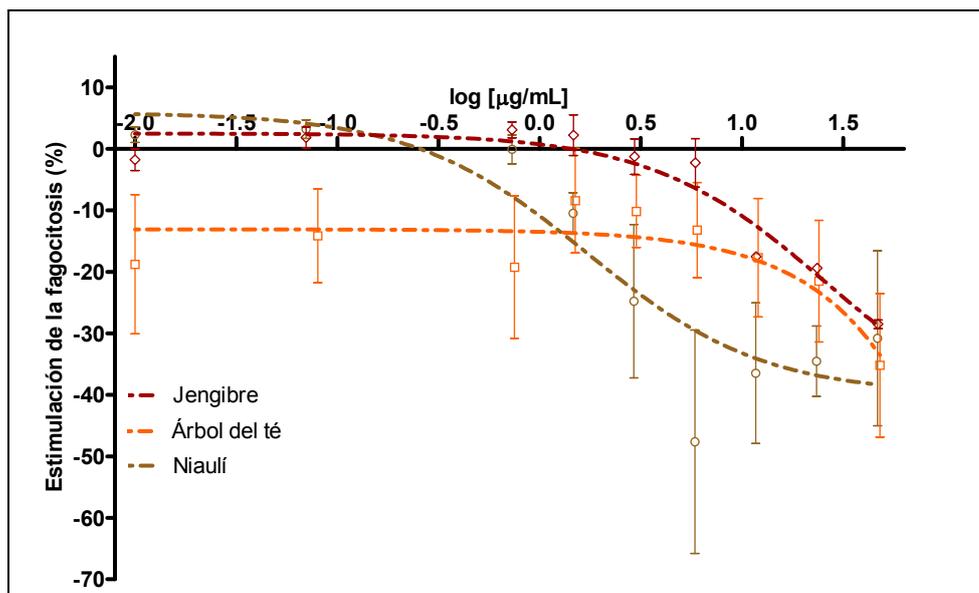


Figura 7.6. Estimulación de la fagocitosis (% , media±DE) por los aceites esenciales de jengibre, árbol del té y niaulí.

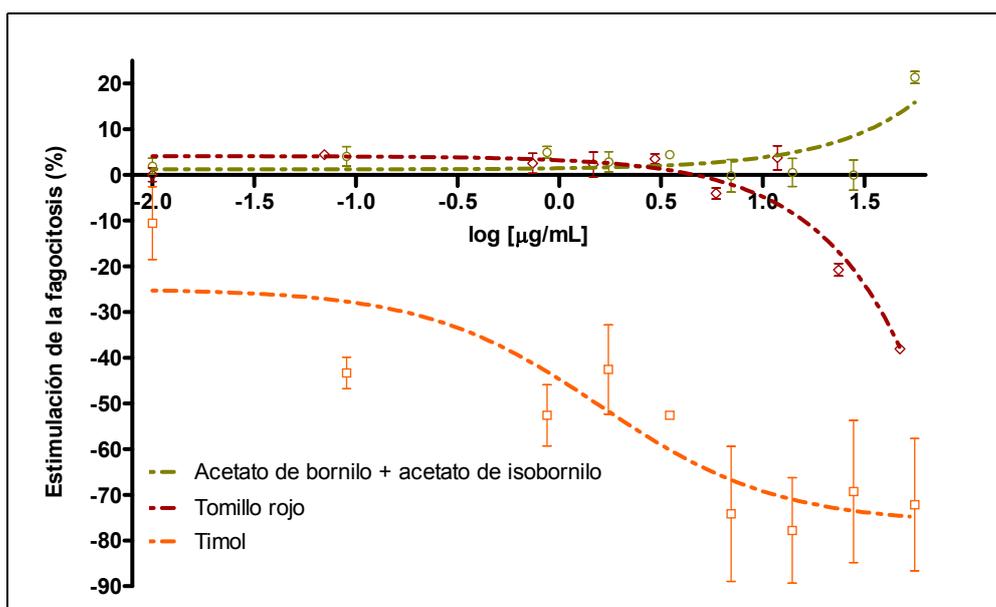


Figura 7.7. Estimulación de la fagocitosis (% , media±DE) por la mezcla de acetato de bornilo + acetato de isobornilo, el aceite esencial de tomillo rojo y el timol.

El eugenol, principal componente del aceite esencial de clavo (81,5%), manifestó en nuestros experimentos un efecto inhibitorio sobre la estimulación de la fagocitosis (**Figura 7.8**). Este compuesto ha sido examinado en varios artículos de la bibliografía con resultados disímiles aunque no necesariamente contradictorios. Evaluaciones *in vitro* del eugenol por algunos autores resultaron en una disminución de la fagocitosis o de los pasos previos de esta (Segura *et al.*, 1998; de Oliveira-Mendes *et al.*, 2003). Otros experimentos también *in vitro*, encontraron sin embargo, que macrófagos que habían sido previamente tratados con nicotina y con

capacidad fagocítica disminuída la recuperaban con el tratamiento con eugenol (Mahapatra *et al.*, 2011). Tampoco es el eugenol el único aceite esencial o componente puro que en la literatura se refiere como inhibidor de la fagocitosis, pues también lo hacen *in vitro* el 3-careno, el foliol, el linearol y el aceite esencial de *Ocimum basilicum* (Johansson & Lundborg, 1997; Courreges & Benencia, 2002; de las Heras *et al.*, 2007).

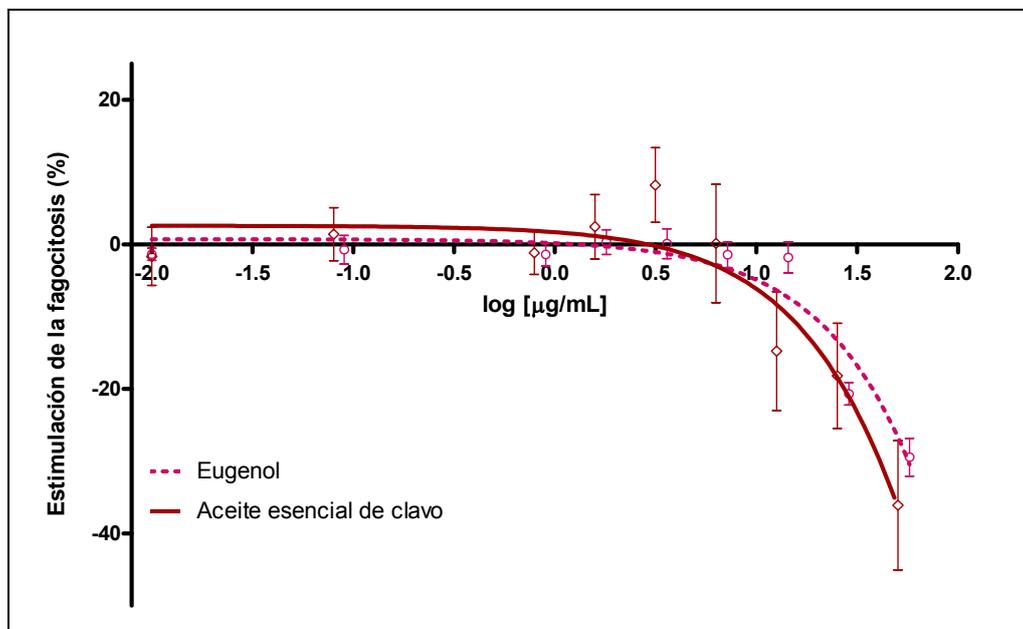


Figura 7.8. Estimulación de la fagocitosis (%; media±DE) por el aceite esencial de clavo y el eugenol.

El limoneno, que constituye el 70,3% del aceite esencial de limón y el 69,1% de los terpenos de limón, ha mostrado, en ensayos *in vivo* e *in vitro*, un efecto estimulante de la fagocitosis o de recuperación de la capacidad fagocítica en macrófagos que la tenían disminuída (Gozsy & Kato, 1958; Hamada *et al.*, 2002; del Toro-Arreola *et al.*, 2005). Estos resultados no coincidieron con los nuestros, pero es importante resaltar que el tipo de células y las metodologías utilizadas en esos ensayos fue diferente. Los aceites esenciales de enebro, romero, palmarosa, orégano y los terpenos de limón, junto al carvacrol también inhibieron la estimulación de la fagocitosis en forma significativa aunque no alcanzaron el 25% de inhibición a la máxima concentración ensayada. La actividad del carvacrol fue menor que la de su isómero, el timol (**Figura 7.9**).

En ciertas ocasiones, una actividad fagocítica disminuída por el efecto de los aceites esenciales podría ser una buena estrategia para reducir la morbilidad y la intensidad con que cursa una enfermedad. Se tiene evidencia de que en algunos casos los agentes patógenos son capaces de neutralizar las funciones protectoras de los neutrófilos y en vez de proteger los neutrófilos se convertirían en promotores de la enfermedad. La causa estaría en que la invasión celular lograda mediante el proceso fagocítico permitiría en ciertas infecciones una proliferación y protección del agente patógeno en el interior de los propios neutrófilos. Se ha identificado este mecanismo de infección en la leishmaniasis, la *Chlamydia pneumoniae*, el *Mycobacterium tuberculosis*, el virus de Epstein-Barr y el citomegalovirus (Appelberg, 2007). Confirma esta hipótesis que una reducción selectiva del número de

neutrófilos mediante la administración de anticuerpos monoclonales tuvo un efecto protector en ratones infectados con *Chlamydia pneumoniae* (Rodríguez *et al.*, 2005).

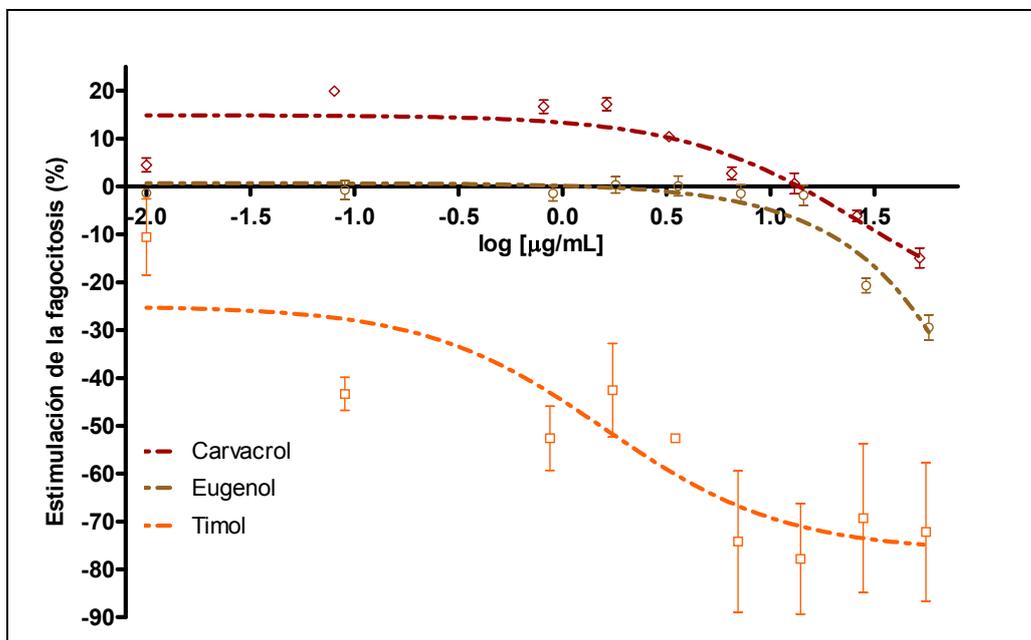


Figura 7.9. Estimulación de la fagocitosis (% , media±DE) por los compuestos eugenol, timol y carvacrol.

Por otro lado, los antibióticos son conocidos moduladores sobre muchos de los componentes del sistema inmune; efectos que amplían y complementan sus más conocidas propiedades antibacterianas. Por ejemplo, los antibióticos del grupo de los macrólidos causan una reducción significativa de la respuesta quimiotáctica a las citoquinas. Este fenómeno tiene como resultado una disminución marcada de la neutrofilia en las vías respiratorias de pacientes con distintas enfermedades inflamatorias pulmonares (Altenburg *et al.*, 2011). Hace más de cuatro décadas, Forsgren y Schmeling (1977) habían reportado una inhibición similar de la quimiotaxis en neutrófilos que era provocada por la rifampicina, las tetraciclinas y el cloranfenicol.

Se puede decir que existe un conjunto de evidencias que indican que los antibióticos y los aceites esenciales poseen modos de acción que no están ligados a su actividad antimicrobiana cuando actúan frente a una infección. Además, los neutrófilos expresan los receptores Fc que son responsables de la fagocitosis y la muerte intracelular de los patógenos microbianos que han sido opsonizados. La actividad de los receptores Fc puede ser bloqueada por los inhibidores de ROS y por los inhibidores del sistema H₂O₂-mieloperoxidasa-cloruros (Fialkow *et al.*, 2007). Coincidentemente, la inhibición de la producción de ROS y del sistema H₂O₂-mieloperoxidasa-cloruros por los aceites esenciales ha sido reportada por nuestro grupo en estudios preliminares (Pérez-Rosés *et al.*, 2007; Pérez-Rosés *et al.*, 2012). Todo lo anterior demuestra la consistente relación que existe entre la inhibición de ROS y la reducción de la fagocitosis.

Muchos aceites esenciales poseen una probada actividad anti-inflamatoria *in vivo* e *in vitro*. Una parte de los efectos anti-inflamatorios podrían estar mediados por un

efecto inmunomodulador, inhibidor del proceso fagocítico. Los macrófagos y neutrófilos son una parte integral del sistema inmune y juegan un papel importante en la iniciación y regulación de la respuesta inmune. La fagocitosis en macrófagos y neutrófilos va generalmente acompañada de una explosión oxidativa. Aunque estas células son críticas para el control y la eliminación de un amplio número de patógenos, ellas también pueden producir daño asociado con la generación de productos tóxicos.

En el momento de la infección los macrófagos son activados y se incrementa la actividad fagocítica junto a la liberación de citocinas y otros intermediarios reactivos que activan también el NF- κ B, llevando a la síntesis de varias citocinas inflamatorias y la iNOS (Chaurasia *et al.*, 2010). El efecto inhibitorio sobre la fagocitosis podría explicar una parte de los efectos anti-inflamatorios de muchos aceites esenciales (Courrèges & Benencia, 2002). Puesto que la inflamación es reconocida como un elemento patogénico en el devenir de muchas enfermedades, la inmunomodulación de la fagocitosis mediante fitofármacos puede resultar un atractivo enfoque terapéutico para el tratamiento de numerosas enfermedades. En otros casos, por ejemplo, las propiedades inmunosupresoras de algunas sustancias se asocia a otros efectos como pueden ser las propiedades anti-diabéticas. La glibenclamida es un ejemplo de anti-diabético que inhibe la expresión de la iNOs y la función de los macrófagos en general (Wu *et al.* 1995).

Los aceites esenciales por nosotros estudiados resultaron ser en su mayoría inhibidores *in vitro* de la fagocitosis por neutrófilos. Presentaron por lo general una actividad que fue modesta pero que resultó ser estadísticamente significativa, siendo el timol la sustancia con mayor actividad inhibidora. Es de destacar que el carvacrol manifestó un comportamiento claramente diferenciado de su isómero posicional, el timol. El carvacrol fue menos activo que el timol.

8

Actividad antioxidante de los Tween

8.1 Introducción

Los detergentes no iónicos del grupo de los Tween® (polisorbatos) son ampliamente utilizados en el laboratorio. Sirven como emulsionantes para sustancias lipófilas y puesto que han demostrado ser menos tóxicos que los tensioactivos iónicos para las membranas biológicas, suelen estar entre los preferidos (Davis *et al.*, 1970). Además, al ser más hidrofóbicos, los detergentes no iónicos poseen mayor capacidad para disolver los fármacos poco solubles, son emulsionantes muy eficientes, y pueden ser empleados en los sistemas de administración de fármacos. El Tween-80 y el Tween-20 tienen estructuras y propiedades similares. Estructuralmente, ambos poseen una porción hidrofílica (sorbitol polietoxilado) y una porción hidrofóbica (restos de ácido oleico o láurico). En soluciones acuosas tienden a autoagregarse y cuando sobrepasan la concentración micelar crítica forman partículas coloidales, o sea, micelas esféricas hidrófilas por fuera y lipófilas por dentro. El tamaño de las partículas varía entre 5 y 25 nm en dependencia de las propiedades fisicoquímicas del medio. Debido a su naturaleza facilitan la dispersión de una gran variedad de materiales inmiscibles.

En nuestro caso, el Tween 20 y el Tween 80 se seleccionaron inicialmente como agentes coadyuvantes para disolver los aceites esenciales en medios acuosos, debido a su amplio uso con esta finalidad en experimentación farmacológica, como queda patente en la bibliografía (Moura-Rocha *et al.*, 2011; Valim-Araujo *et al.*, 2011; Weiszhar *et al.*, 2012).

Ambos se utilizan ampliamente como tensioactivos de uso farmacéutico en diferentes preparaciones orales y parenterales. Su aplicación intravenosa está aprobada por la Agencia Europea del Medicamento (Weiszhar *et al.*, 2012). Sorprendentemente, se sabe muy poco acerca de cómo los surfactantes afectan a las células o los procesos enzimáticos. La idea que predomina es que más allá de una cierta concentración crítica son tóxicos debido a su efecto deletéreo sobre las biomembranas. Sin embargo, otros efectos menos evidentes de los polisorbatos también han sido reportados (Hunzicker, 2009).

Varios tensioactivos no iónicos se han demostrado capaces de inhibir a ciertas proteínas transportadoras y los Tween han sido reportados con actividad sobre diversas bombas de transporte (Rege *et al.*, 2001; Rege *et al.*, 2002). El Tween-80 inhibe la proliferación linfocitaria inducida por la Concanavalina A y estudios recientes señalan al propio Tween-80 como capaz de influir en la actividad de los canales iónicos y el crecimiento celular. Los resultados publicados muestran como el Tween-80 disminuye significativamente la actividad de los canales de cloruro regulados por volumen y detiene a las células en la fase G0/G1 del ciclo celular además de inhibir la proliferación de una gran variedad de tipos celulares (Du *et al.*, 2011).

El Tween-80 cuando es utilizado como excipiente también puede influir en las propiedades toxicológicas y farmacológicas de los medicamentos. Las reacciones de hipersensibilidad, típicas de las reacciones anafilácticas no inmunes (pseudoalergias), se caracterizan por la liberación de histamina y de anticuerpos IgE. Un grupo de estas reacciones de hipersensibilidad han sido asociadas al Tween-80 en medicamentos que lo contenían (Ardavanis *et al.*, 2004; Coors *et al.*, 2005; Price & Hamilton, 2007).

Algunos de estos efectos adversos pueden ser etiológicamente relacionados con la activación del complemento a través de las vías clásica y alternativa (Weiszhar *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2013). Además, en algunos ensayos enzimáticos el Tween-20 y el Tween-80 han mostrado cierta actividad inhibitoria o estimulante. Por ejemplo, una mutanasa extracelular producida por la cepa MP-1 del *Paenibacillus curdlanolyticus* fue estimulada por la adición de Tween-20 y Tween-80 (Pleszczyńska *et al.*, 2012).

En los primeros ensayos realizados en este trabajo utilizando Tween 20 y Tween 80, se observó que presentaban actividad inhibitoria de la producción de ROS en neutrófilos humanos, y podían interferir, por tanto, en los resultados obtenidos con los aceites esenciales. Por este motivo, y debido al interés y la novedad de estos resultados, se valoró la capacidad de captación de radicales libres del Tween 20 y el Tween 80 mediante el ensayo del DPPH y el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la enzima MPO. Las concentraciones ensayadas fueron las que habitualmente se refieren en la bibliografía cuando se emplean como coadyuvantes de disolución en experimentación farmacológica. Los resultados obtenidos se presentan en este capítulo.

8.2 Materiales y métodos

8.2.1 Ensayo de la actividad antioxidante por el método del DPPH

En este ensayo se siguió la metodología anteriormente descrita para los aceites esenciales (ver capítulo 3, apartado 3.2.1). Las concentraciones de Tween 20 y Tween 80 ensayadas se situaron en un rango entre 0 y 1% (v/v).

8.2.2 Ensayo de la actividad sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos humanos

En este ensayo se siguió la metodología descrita para los aceites esenciales en el capítulo 3 (apartado 3.2.2). Las concentraciones de Tween 20 y Tween 80 ensayadas se situaron en un rango entre 0 y 1% (v/v).

8.2.3 Ensayo de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en ausencia de células

Se siguió igual metodología que la descrita en el ensayo de actividad de la MPO en ausencia de células descrita en el capítulo 4, apartado 4.2.1. Las concentraciones de Tween 20 y Tween 80 ensayadas se situaron en un rango entre 0 y 0,5% (v/v).

8.3 Resultados

Los resultados de los ensayos realizados se recogen en las **Tablas 8.1 y 8.2**.

Tabla 8.1. Actividad inhibidora del Tween 80 y el Tween 20 sobre el DPPH y la producción de ROS en neutrófilos humanos estimulados con PMA o H₂O₂.

Sustancia	Concentración		Inhibición (%)		
	% (v/v)	µg/mL	DPPH [*]	ROS-PMA	ROS-H ₂ O ₂
Tween 80	0,00	0,00	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	1,0 x 10 ⁻⁴	1,06	0,8±0,9	6,3±4,6*	7,1±2,2*
	1,0 x 10 ⁻³	10,60	1,3±1,9	15,6±3,7*	13,3±1,4*
	1,0 x 10 ⁻²	106,00	0,9±1,2	29,3±2,7*	26,0±4,9*
	1,0 x 10 ⁻¹	1060,00	5,1±3,2*	43,2±4,9*	38,8±1,3*
	10,0 x 10 ⁻¹	10600,00	3,0±1,9	52,8±0,8*	53,2±4,7*
IC ₅₀ (µg/mL)			---	8674,9±835,7	8785,6±2040,8
Tween 20	0,00	0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	1,0 x 10 ⁻⁴	1,1	2,1±1,4	9,0±5,3 *	7,5±2,5
	1,0 x 10 ⁻³	11,0	3,3±2,6	24,0±3,9 *	12,6±3,3
	1,0 x 10 ⁻²	110,0	2,7±2,4	38,9±3,7 *	26,9±11,3 *
	1,0 x 10 ⁻¹	1100,0	4,2±2,3*	54,2±5,8 *	56,0±3,8 *
	10,0 x 10 ⁻¹	11000,0	2,6±0,5	65,5±2,9 *	75,3±3,1 *
IC ₅₀ µg/mL			---	903,5±206,3	1492,9±101,4
Quercetina					
IC ₅₀ µg/mL			10,5±4,6	7,6±2,6	4,3±2,0

Los valores de inhibición del DPPH (n = 4) y los valores de inhibición de la producción de ROS en neutrófilos humanos (n=6) se expresan como media ± desviación estándar (%).

*Diferencias significativas en relación al grupo control (p<0,05).

La viabilidad celular media en los ensayos de ROS fue del 95%, con excepción de la máxima concentración ensayada de ambos Tween, donde la viabilidad media fue del 90%.

Tabla 8.2. Actividad inhibidora del Tween 20 y el Tween 80 sobre la MPO en ausencia de células.

Sustancia	Concentración		Inhibición (%)
	% (v/v)	µg/mL	
Tween-20	0,0000	0,0	0,0±0,0
	0,0001	1,1	-1,0±2,3
	0,0005	5,5	0,6±1,0
	0,0050	55,0	-20,0±0,8 *
	0,0500	550,0	-78,3±1,8 *
	0,0625	687,5	-84,8±1,8 *
	0,1250	1375,0	-105,2±1,9 *
	0,2500	2750,0	-128,0±1,4 *
	0,5000	5500,0	-105,3±3,6 *
Tween-80	0,0000	0,00	0,0±0,0
	0,0001	1,06	0,2±1,0
	0,0005	5,30	-0,6±0,5
	0,0050	53,00	-37,7±1,4 *
	0,0500	530,00	-64,3±1,4 *
	0,0625	662,50	-80,6±0,9 *
	0,1250	1325,00	-90,3±2,3 *
	0,2500	2650,00	-85,0±2,0 *
	0,5000	5300,00	-57,6±2,0 *
Quercetina			
IC ₅₀ (µg/mL)			1,0±0,3

Los valores de inhibición se expresan como media ± desviación estándar, (n= 4).
Diferencias significativas en relación al grupo control (p<0,05).

8.4 Discusión

El Tween-20 y el Tween-80 son dos tensioactivos no iónicos ampliamente utilizados en el laboratorio. Existe una extensa literatura científica que cita su uso en gran variedad de ensayos y experimentos de laboratorio. Sin embargo, la actividad intrínseca de estos dos detergentes no iónicos no ha sido suficientemente investigada, de ahí el interés y la novedad de los resultados que aquí se presentan.

Como se muestra en la **Tabla 8.1** el Tween-20 y el Tween-80 no mostraron actividad frente al radical libre estable del DPPH. Este resultado sugiere que estos compuestos tienen una capacidad muy limitada de captación de radicales libres. La actividad en torno al 5% que aparece en alguna de las concentraciones estudiadas no tiene ningún significado práctico. La capacidad de captar radicales libres en el ensayo del DPPH está vinculada a la capacidad de una sustancia o grupo de sustancias de donar hidrógeno. Esta capacidad como se ha demostrado está ausente en el Tween-20 y el Tween-80.

Los resultados de los ensayos de inhibición de la producción de ROS en neutrófilos humanos estimulados se muestran en la **Tabla 8.1** y la **Figura 8.1**. El Tween-20 y el Tween-80 inhibieron la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA o H₂O₂ a todas las concentraciones ensayadas. El Tween-20 fue más activo que el Tween-80 en ambos experimentos. El Tween-20 mostró una mayor actividad inhibidora sobre las células estimuladas con PMA que sobre las células estimuladas con H₂O₂. La IC₅₀ para el Tween-20 fue de 0,9 mg/mL en células estimuladas con PMA y de 1,5 mg/mL en células estimuladas con H₂O₂. Estas concentraciones

equivalen a un 0,08% (v/v) y un 0,14% (v/v) respectivamente. Por su parte el Tween-80 mostró una actividad similar en ambos ensayos. La IC_{50} fue de 8,7 mg/mL en las células estimuladas con el PMA y de 8,8 mg/mL en las células estimuladas con H_2O_2 . Estas concentraciones equivalen a un 0,82% (v/v) y un 0,83% (v/v) respectivamente. La viabilidad celular fue siempre mayor del 95% por lo que el efecto biológico observado no estaba relacionado con una posible acción perjudicial sobre las biomembranas.

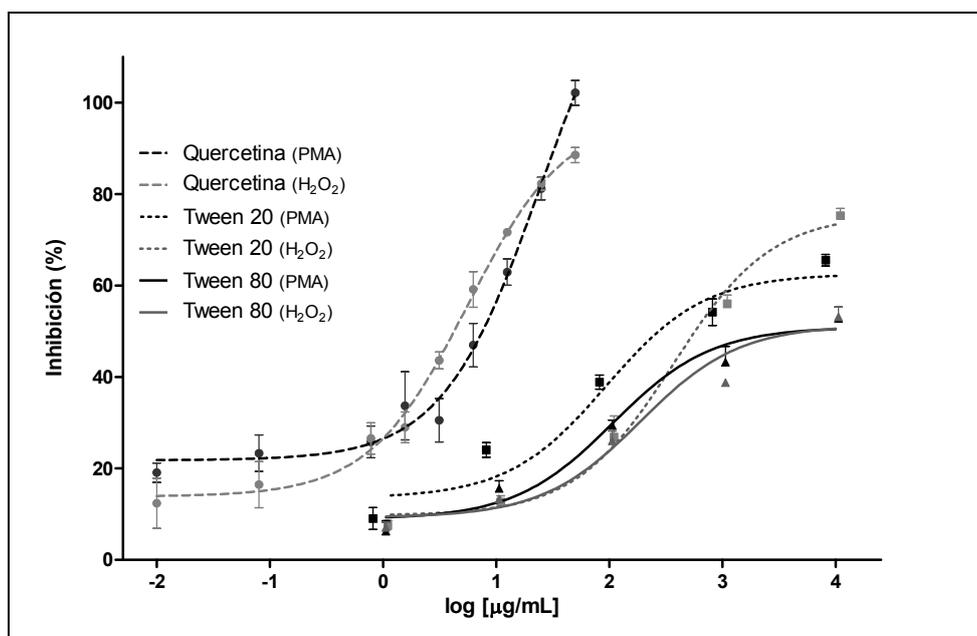


Figura 8.1. Inhibición (% , media \pm DE) de la producción de ROS en neutrófilos humanos estimulados con PMA y H_2O_2 por el Tween-20, el Tween-80 y la quercetina.

No se puede proponer un mecanismo de acción a partir de los resultados obtenidos. A pesar de ello la inactividad frente al DPPH sugiere que la acción antioxidante del Tween-20 y el Tween-80 sobre la producción de ROS no está relacionada con la capacidad de estos compuestos de eliminar los radicales libres; es más probable que se produzca algún tipo de interacción biológica.

Las concentraciones de Tween que fueron ensayadas en nuestro trabajo variaron entre el 0,0001% y el 1,0% v/v. Este amplio recorrido cubriría la mayor parte de los reportes encontrados en la literatura sobre el empleo de los Tween en farmacología experimental. No obstante, a pesar de ser infrecuentes, es posible encontrar en la literatura científica referencias al uso de los Tween a concentraciones de hasta el 12% v/v (Maruyama *et al.*, 2005; Moura-Rocha *et al.*, 2011a; Moura-Rocha *et al.*, 2011b; Valim-Araujo *et al.*, 2011).

Otras actividades biológicas del Tween-20 o el Tween-80, distintas a las aquí ensayadas, ya han sido reportadas en la literatura. Además del conocido efecto perjudicial sobre las biomembranas cuando se alcanza una concentración crítica, se han encontrado actividades de otra naturaleza cuando se emplean a las concentraciones habituales de uso como emulsionantes. Por ejemplo, se ha demostrado que el Tween-80 inhibe la hidroxilación microsomal de diferentes sustratos y aumenta la reducción del Citocromo C por el NADPH (Burke *et al.*,

1975; Sanghvi *et al.*, 1982). El Tween-80 fue además capaz de inhibir la P-glicoproteína (un péptido transportador del intestino humano y de otros tejidos) y los canales de cloruro regulados por volumen, implicados en la regulación del ciclo celular en las células de mamífero (Rege *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003, Du *et al.*, 2011). Por su parte el Tween 20 funcionó como inhibidor de la enzima violaxantina de-epoxidasa, una enzima del ciclo de las xantófilas en las plantas, ciclo que participa en la disipación del exceso de energía luminosa como calor (Kuwabara *et al.*, 1998).

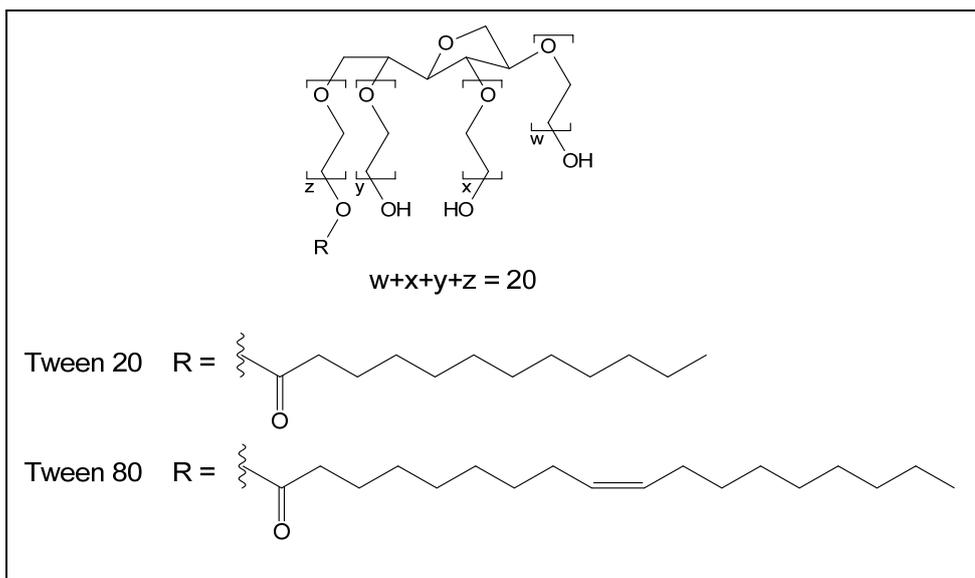


Figura 8.2. Estructura del Tween 20 y el Tween 80.

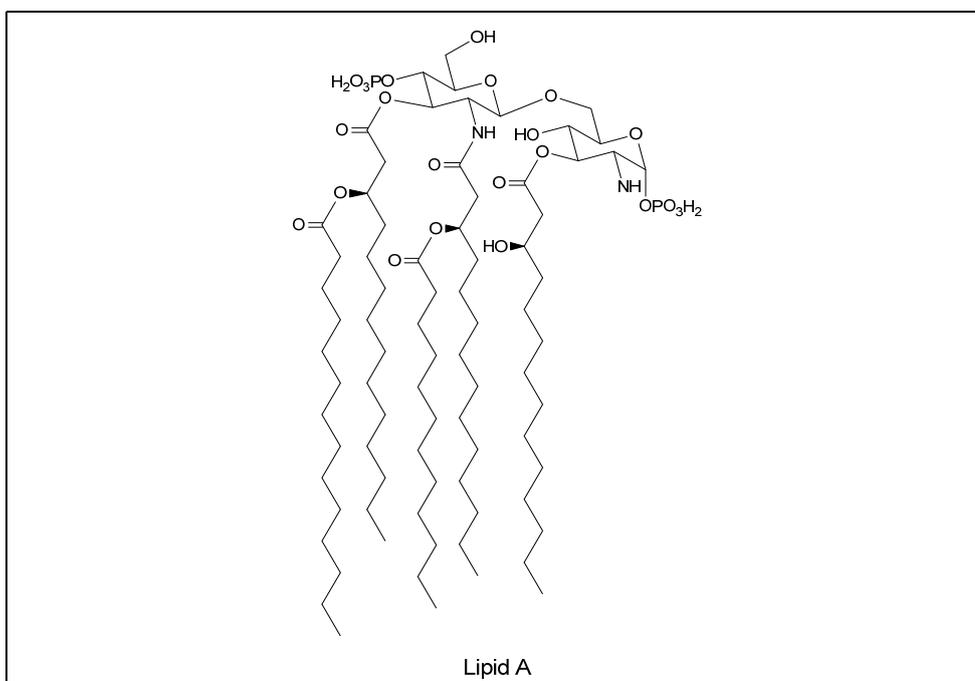


Figura 8.3. Estructura del lípido A.

Una posible relación de los efectos del Tween con los procesos de inflamación o de producción de ROS se encuentra en el hecho de que existe cierta semejanza estructural entre los Tween (especialmente del Tween 20) y el lípido A de los polisacáridos de las bacterias gram-negativas (**Figura 8.2 y Figura 8.3**). Esta idea ya había sido sugerida por Hunzicker (2009). Una vez dentro de la célula, los Tween también podrían liberar ácidos grasos que activen o inhiban los receptores tipo Toll y el NF-kappa B en función del receptor, tipo de célula o el ácido graso en concreto del que se trate, así fue demostrado por Lee *et al.* (2004). En relación con los procesos de inflamación, los Tween también han evidenciado su capacidad de causar la activación del complemento a través de las vías clásica y alternativa (Weiszhar *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2013).

La actividad del Tween-80 y el Tween-20 sobre la MPO aislada se muestra en la **Tabla 8.2** y la **Figura 8.4**. Ambos detergentes estimularon significativamente la MPO a concentraciones que oscilan entre el 0,005% y el 0,5% (v/v). Este resultado es completamente nuevo y no se había informado de él previamente en la literatura. Sin embargo, Kim *et al.* (2007) ya habían citado un aumento de la actividad de la peroxidasa de rábano picante en presencia del Tween-80. Los autores sugieren que el efecto podría ser debido a un mayor acceso al sustrato o a una disminución de la inactivación de la enzima causada por los radicales libres o la adsorción de los productos de la reacción.

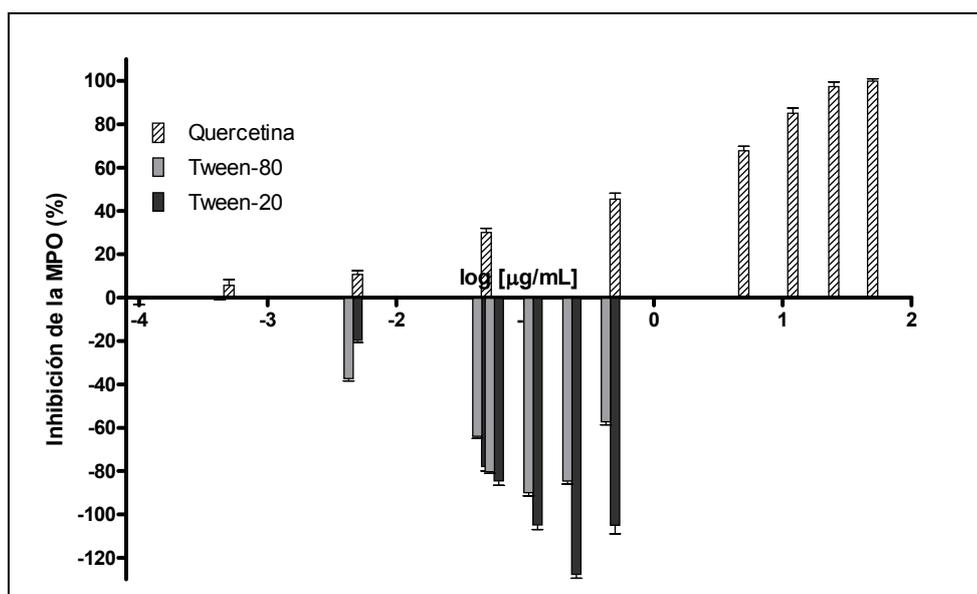


Figura 8.4. Inhibición (% , media \pm DE) de la MPO por el Tween-20, el Tween-80 y la quercetina.

En conclusión, los datos experimentales aportados muestran que los detergentes no iónicos Tween 20 y Tween 80 tienen actividad antioxidante; particularmente en los ensayos sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA o H_2O_2 , y sobre la actividad de la MPO. Estas actividades se manifestaron a concentraciones a las que por lo general se aplican como emulsionantes en la farmacología experimental. La amplitud del empleo de los Tween hace aconsejable evaluar cuidadosamente su posible influencia sobre los resultados esperados cuando se realiza el diseño experimental.

9

Discusión general y conclusiones

9.1 Discusión general

Los aceites esenciales tienen una presencia muy extendida en la industria y la vida diaria. Nos interesa en particular, puesto que está en el origen del proyecto, su empleo como aditivos alimentarios promotores del crecimiento de animales de granja. Una adecuada complementación de la dieta podría preservar las funciones inmunes y reducir la aparición de infecciones y enfermedades. Nuestro trabajo se basa en la hipótesis de que mediante el empleo de determinados aceites esenciales se puede reforzar la inmunocompetencia y la respuesta inmune innata.

A través de diferentes ensayos realizados en nuestro estudio, se exploraron las capacidades antioxidantes e inmunomoduladoras de un grupo de aceites esenciales y algunas de sus fracciones terpénicas o componentes aislados. En cada capítulo en el que se han descrito los resultados obtenidos para cada ensayo ya se han discutido los mismos. La actividad encontrada en varios de estos ensayos es novedosa en muchos casos. La presente sección pretende abordar la discusión desde un punto de vista global y extraer conclusiones a la vista del conjunto de resultados.

En la **Tabla 9.1** se resumen los resultados obtenidos a lo largo de nuestra investigación. Esta tabla permite tener una visión de conjunto de los resultados de la tesis.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la actividad antioxidante e inmunomoduladora es particularmente alta en aceites esenciales cuyos constituyentes mayoritarios son compuestos fenólicos (clavo, tomillo rojo y orégano

español). La actividad de estos aceites esenciales puede atribuirse en buena medida a dichos constituyentes (eugenol, timol y carvacrol, respectivamente). Esta relación es particularmente clara entre el eugenol y el aceite esencial de clavo pues manifiestan una actividad casi paralela en todos los ensayos realizados. Los aceites esenciales ricos en monoterpenos oxigenados no fenólicos también fueron activos en varios de los ensayos. Entre ellos, es interesante resaltar el grupo de aceites esenciales con 1,8-cineol como componente mayoritario (laurel, cayeputi, niaulí y romero) que mostraron una destacable actividad, especialmente, como inhibidores de la producción de ROS en neutrófilos humanos estimulados con PMA y como inhibidores de la vía clásica del sistema del complemento.

Tabla 9.1. Resumen de los resultados obtenidos.

Aceite esencial o compuesto	DPPH (IC ₅₀ , µg/mL)	ROS / PMA (IC ₅₀ , µg/mL)	ROS / H ₂ O ₂ (IC ₅₀ , µg/mL) ^a	NO (IC ₅₀ , µg/mL)	MPO aislada (IC ₅₀ , µg/mL)	MPO con células (IC ₅₀ , µg/mL)	Vía clásica (IC ₅₀ , µg/mL)	Vía alternativa (IC ₅₀ , µg/mL)	Fagocitosis (%) ^b
Árbol del té	---	---	---	---	---	---	97,0	---	-35,2
Bornilo + isobornilo, acetatos de	---	35,8	---	41,9	---	---	126,1	---	21,3
Cayeputi	---	88,2	---	---	---	---	97,3	---	4,1
Cilantro	---	72,6	---	---	---	---	154,4	---	-12,8
Clavo	13,2	7,5	22,6	39,8	37,2	16,3	74,9	---	-36,1
Clavo (terpenos)	---	---	---	---	---	---	---	---	-14,6
Eugenol	11,7	1,6	27,1	19,0	35,9	19,2	78,3	---	-29,4
Enebro	---	---	---	---	---	---	---	---	-24,3
Estragón	---	109,4	---	---	---	---	64,8	---	-12,9
Jengibre	---	8,5	---	4,3	---	---	---	---	-28,5
Laurel	---	39,7	---	---	---	---	155,4	---	-38,7
Limón	---	---	---	---	---	---	---	---	-41,0
Limón (terpenos)	---	---	---	---	---	---	---	---	-9,7
Niaulí	---	98,7	---	---	---	---	91,3	---	-39,1
Nuez moscada	---	14,6	---	---	---	---	---	---	-33,8
Nuez moscada (terpenos)	---	---	---	---	---	---	---	---	-38,5
Orégano español	---	49,1	6,1 ^a	---	58,9	74,0	118,1	---	-16,2
Carvacrol	500,7	88,7	4,6 ^a	39,3	35,9	50,8	78,1	---	-14,9
Palmarosa	---	16,4	---	---	---	---	75,2	---	-22,1
Romero	---	125,3	---	---	67,1	---	---	---	-11,3
Tomillo rojo	---	23,1	---	---	45,3	80,2	67,8	---	-38,0
Timol	448,0	24,5	---	---	39,7	35,0	125,5	---	-72,2
L-NMMA	---	---	---	38,2	---	---	---	---	---
Quercetina	10,5	7,6	4,3	---	1,0	2,8	33,7	---	---

a) Los valores del orégano español y el carvacrol representan estimulación en relación al control.
 b) Estimulación a $5,0 \times 10^{-3}$ % (v/v), excepto para el aceite esencial de enebro ($2,5 \times 10^{-3}$ %, v/v).

La mayor parte de aceites esenciales ensayados carecen de actividad antioxidante no biológica, ya que no son activos sobre el DPPH. Sin embargo, muchos de ellos son activos sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA, lo que pone de manifiesto su capacidad antioxidante biológica. Por tanto, los ensayos químicos no revelan la capacidad real de un aceite esencial de influir sobre el estado redox de la célula y su empleo en solitario puede resultar insuficiente para detectar actividad antioxidante de interés biológico. Los compuestos fenólicos y los aceites esenciales ricos en los mismos, son los que presentan actividad en una mayor variedad de ensayos. Por ejemplo, el aceite esencial de clavo y el eugenol mostraron actividad destacable tanto sobre la producción de ROS y de NO, como sobre la MPO y el DPPH, siendo los más activos en muchos de los ensayos. Estos efectos sobre el estado redox tienen una indudable conexión con la modulación del sistema inmune (Faix *et al.*, 2009; Trichet, 2010; Halder *et al.*, 2011).

La toxicidad de los aceites esenciales sobre las membranas es otra característica gobernada por la composición. En nuestros experimentos dieron mayor toxicidad el aceite esencial de enebro y los terpenos de nuez moscada, cuya composición se caracteriza, en los dos casos, por la riqueza en α -pineno y β -pineno. Ambos causaron la lisis de los eritrocitos a concentraciones inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$. Estos monoterpenos serían capaces de alterar la integridad de la membrana y su permeabilidad, provocar la pérdida del control sobre los procesos quimio-osmóticos y finalmente la muerte y lisis celular (Uribe *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 2000).

Los aceites esenciales aspirantes a convertirse en promotores del crecimiento animal tienen, generalmente, un marcado efecto antibacteriano (Peñalver *et al.*, 2005), aunque también son importantes sus efectos antioxidantes e inmunomoduladores. Con el empleo de los aceites esenciales se busca mantener saludable el sistema digestivo del animal, a pesar de estar en un ambiente libre de antibióticos (Brenes & Roura, 2010). Es conocido que las enfermedades intestinales disminuyen la asimilación de los nutrientes y en consecuencia retrasan los ritmos de crecimiento y engorde. De todos los aceites esenciales examinados en nuestro trabajo el aceite esencial de clavo y su principal componente el eugenol, mostraron el perfil más prometedor para su empleo en la alimentación animal. La actividad antibacteriana del aceite esencial de clavo y del eugenol ha sido extensamente estudiada y existen innumerables reportes en la bibliografía (Chaieb *et al.*, 2007a; Chaieb *et al.*, 2007b; Ordóñez *et al.*, 2008). Su uso en piensos animales contribuiría al control de las bacterias patogénicas en el tracto digestivo y mejoraría la salud general del animal. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, el aceite esencial de clavo y el eugenol presentan el mejor perfil de actividad antioxidante, incluyendo la captación de radicales libres. Ello disminuiría significativamente la degradación oxidativa de los nutrientes contenidos en los piensos (Chaieb *et al.*, 2007a; Chaieb *et al.*, 2007b; Viuda-Martos *et al.*, 2010b). Existen reportes en la bibliografía que señalan que el suministro de aceites esenciales con efecto antioxidante aumenta la estabilidad durante la refrigeración y el almacenamiento de las carnes producidas a partir de animales alimentados con estos piensos (Brenes & Roura, 2010).

Igualmente destacable es la actividad antioxidante biológica ejercida por el aceite esencial clavo y el eugenol. Ambos fueron los productos más activos en el ensayo de producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA y fueron los únicos que mantuvieron una actividad alta cuando los neutrófilos fueron estimulados con H_2O_2 . También tuvieron una buena actividad de inhibición de la producción de NO y nuevamente fueron los únicos en los que la actividad en el ensayo de la MPO en presencia de células fue notablemente mayor que sobre la MPO aislada.

Los resultados anteriores no dejan lugar a dudas sobre la superposición de varios mecanismos en la acción antioxidante del aceite esencial de clavo y el eugenol. La potenciación de los mecanismos antioxidantes en la célula es fundamental para el correcto funcionamiento del sistema inmune pues previene el daño oxidativo en fagocitos y linfocitos, células muy expuestas a la explosión oxidativa que acompaña la respuesta inmune. Los antioxidantes pueden incluso modular la función fagocítica pues permiten restaurar el necesario equilibrio del sistema inmune, actuando como potenciadores temporales de la respuesta inmune. Una característica valiosa en cualquier promotor del crecimiento que se pretenda usar (Trichet, 2010).

El eugenol y el aceite esencial de clavo, así como otros aceites esenciales investigados, presentan una actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema del complemento y de la fagocitosis. Estos resultados son coherentes con los de Halder *et al.* (2011), quienes, en ensayos realizados *in vivo*, observaron también que el aceite esencial de clavo puede modular la respuesta inmune, aumentando la inmunidad humoral y disminuyendo la inmunidad mediada por células. El vínculo entre el sistema inmune y los mecanismos antioxidantes es múltiple. Los efectos antioxidantes de los aceites esenciales podrían estar mediados por un efecto inmunomodulador sobre el proceso fagocítico o el sistema del complemento. Este mecanismo parece funcionar también en sentido inverso pues la actividad de los receptores Fc de los neutrófilos puede ser bloqueada por los inhibidores de ROS (Fialkow *et al.*, 2007). Este vínculo refuerza la relación que existe entre la inhibición de ROS y la reducción de la fagocitosis. Aunque parezca contradictorio, una fagocitosis disminuida por el efecto de los aceites esenciales puede en ocasiones reducir la morbilidad y la intensidad con que cursa una enfermedad. Algunos patógenos son capaces de neutralizar a los neutrófilos, que en vez de proteger se convertirían en promotores de la enfermedad. La causa estaría en que el propio proceso fagocítico permitiría una proliferación y protección del agente patógeno en el interior de los neutrófilos (Rodríguez *et al.*, 2005; Altenburg *et al.*, 2011).

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que el clavo y el eugenol presentan el mejor perfil antioxidante e inmunomodulador de entre todos los candidatos examinados. Estos resultados avalan su empleo como promotor del crecimiento en piensos animales.

Los compuestos fenólicos e isómeros de posición carvacrol y timol tuvieron un comportamiento distinto en muchos de los ensayos realizados. Diferencia que no fue tan manifiesta en aquellos ensayos donde las células no estaban presentes (DPPH y MPO aislada) y sin embargo si fue mucho más evidente en los ensayos que se realizaron en presencia de células (NO, ROS/PMA, ROS/H₂O₂, MPO con células, vía clásica del complemento, fagocitosis). Esta diferencia llegó a ser particularmente notable en el caso del ensayo de inhibición de ROS en neutrófilos estimulados con H₂O₂, pues el carvacrol tuvo efectos pro-oxidantes a diferencia del timol que fue prácticamente inactivo. Los resultados sugieren que los mecanismos de acción de carvacrol y timol implican proteínas capaces de diferenciar entre estas dos estructuras.

Finalmente, se puede destacar que durante la puesta a punto de los ensayos biológicos se observó que el Tween 20 y el Tween 80 podían interferir los resultados. Ambos detergentes son habitualmente muy empleados para disolver los aceites esenciales en medios acuosos. Estos compuestos estimulaban la MPO aislada e inhibían la producción de ROS en neutrófilos estimulados por PMA y H₂O₂. Su utilización por lo tanto debería tener en cuenta sus efectos biológicos más allá de su efecto surfactante.

9.2 Conclusiones

1. Todos los aceites esenciales, fracciones y compuestos ensayados mostraron algún grado de actividad inhibitoria de la MPO, estadísticamente significativa, como mínimo a la máxima concentración ensayada. Los aceites esenciales más activos fueron el clavo, el tomillo rojo y el orégano español. Sus principales componentes, eugenol, timol y carvacrol también fueron muy activos.
2. La mayoría de los aceites esenciales examinados presentan mayor actividad inhibitoria de la MPO en ausencia de células que en presencia de leucocitos. En cambio, el aceite esencial de clavo y el eugenol tienen mayor actividad en presencia de leucocitos, lo cual sugiere la participación de otros mecanismos que van más allá de la propia inhibición del enzima.
3. Los aceites esenciales de jengibre y clavo, el eugenol, la mezcla de acetato de bornilo e isobornilo y el carvacrol fueron las sustancias con mayor actividad inhibitoria de la producción de NO en leucocitos humanos estimulados con LPS, con IC_{50} entre 4,3 y 41,9 $\mu\text{g/mL}$.
4. La máxima capacidad antioxidante frente al radical libre estable del DPPH se obtuvo para el eugenol y el aceite esencial de clavo. Carvacrol y timol fueron débilmente activos. Los valores de IC_{50} del aceite esencial de clavo (13,2 $\mu\text{g/mL}$) y del eugenol (11,7 $\mu\text{g/mL}$) fueron similares al control positivo, la quercetina (10,5 $\mu\text{g/mL}$).
5. Los aceites esenciales y compuestos con mayor actividad inhibitoria ($IC_{50} < 30$ $\mu\text{g/mL}$) de la producción de ROS en neutrófilos humanos estimulados con PMA fueron los aceites esenciales de clavo, jengibre, nuez moscada, palmarosa y tomillo rojo, así como los compuestos eugenol y timol. El aceite esencial de clavo y el eugenol fueron los inhibidores más activos tanto sobre neutrófilos estimulados con PMA ($IC_{50} = 7,5$ y $1,6$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) como con H_2O_2 ($IC_{50} = 22,6$ y $27,1$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).
6. Timol y carvacrol, a pesar de su similitud estructural, presentan un perfil de actividad muy diferente sobre la producción de ROS en neutrófilos humanos. El timol muestra actividad inhibitoria sobre neutrófilos estimulados tanto con PMA ($IC_{50} = 24,5$ $\mu\text{g/mL}$) como con H_2O_2 (40,7% de inhibición a 55,8 $\mu\text{g/mL}$). En cambio, el carvacrol tiene menor actividad inhibitoria sobre neutrófilos estimulados con PMA ($IC_{50} = 88,7$ $\mu\text{g/mL}$) y es pro-oxidante cuando son estimulados con H_2O_2 ($EC_{50} = 4,6$ $\mu\text{g/mL}$). Además, el carvacrol es capaz de inducir la producción de ROS por sí mismo en neutrófilos no estimulados.
7. Todas las sustancias sometidas a experimento en el ensayo de actividad sobre la vía alternativa del complemento fueron inactivas. En la vía clásica, los aceites esenciales de estragón, tomillo rojo, clavo y palmarosa, así como el carvacrol y el eugenol fueron los más activos, con valores de IC_{50} inferiores a 80 $\mu\text{g/mL}$. Los compuestos oxigenados, ya sean fenilpropanoides o monoterpenos oxigenados predominan entre los aceites esenciales que han resultado más activos.
8. El aceite esencial de enebro y los terpenos de nuez moscada (ambos ricos en α -pineno y β -pineno) fueron las sustancias más tóxicas sobre la integridad de la

membrana, causando la lisis de los eritrocitos a concentraciones inferiores a 100 µg/mL.

9. Solo la mezcla de los acetatos de bornilo e isobornilo manifestó cierta actividad estimulante de la fagocitosis por neutrófilos humanos. La mayor parte de aceites esenciales presentaron actividad inhibidora, siendo los aceites esenciales de nuez moscada, clavo, niaulí, árbol del té, laurel, limón, tomillo rojo y jengibre, así como los terpenos de nuez moscada, el eugenol y el timol los que sobrepasaron el 25% de inhibición de la fagocitosis. El timol fue la sustancia con mayor actividad inhibidora, con una $IC_{50} = 1,5 \mu\text{g/mL}$. Carvacrol y timol manifestaron un comportamiento claramente diferenciado, siendo el primero mucho menos activo que el segundo.
10. En términos generales, en los diferentes ensayos realizados, la actividad fue mayor en los aceites esenciales ricos en compuestos fenólicos o monoterpenos oxigenados. La disparidad de comportamiento observada entre los isómeros posicionales carvacrol y timol fue más evidente en los ensayos con presencia de células.
11. El aceite esencial de clavo y el eugenol fueron las sustancias con un mejor perfil antioxidante e inmunomodulador cuando se considera el conjunto de modelos experimentales utilizados. Los resultados obtenidos evidencian que el eugenol, componente mayoritario del aceite esencial de clavo, es el principal responsable de su actividad. Todo ello avala su empleo como promotores del crecimiento en piensos animales.
12. Los detergentes no iónicos Tween 20 y Tween 80 tienen actividad antioxidante y su uso para solubilizar las muestras ensayadas puede interferir en los resultados obtenidos. En particular, inhibieron la producción de ROS en neutrófilos estimulados con PMA o H_2O_2 , siendo el Tween-20 más activo que el Tween 80. Además, estimularon significativamente la actividad de la enzima mieloperoxidasa en ausencia de células y fueron, sin embargo, inactivos en el ensayo de captación del radical libre estable DPPH.

10

Referencias bibliográficas

- Aazza S, Lyoussi B, Megias C, Cortes-Giraldo I, Vioque J, Figueiredo AC, Miguel MG. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils. *Natural Product Communications* 2014; **9**(4): 587-594.
- Aazza S, Lyoussi B, Miguel MG. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules* 2011; **16**(9): 7672-7690. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16097672>
- Adams RP. Identification of essential oils by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.
- Agner K. Verdoperoxidase: a ferment isolated from leucocytes. *Acta Chem. Scand. A* 1941; **2**(Suppl.8): 1-62.
- Albano SM, Sofia LA, Graca MM, Pedro LG, Barroso JG, Cristina FA. Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants. *Records of Natural Products* 2012; **6**(1): 35-48.
- Aliakbarlu J, Sadaghiani SK, Mohammadi S. Comparative evaluation of antioxidant and anti food-borne bacterial activities of essential oils from some spices commonly consumed in Iran. *Food Science and Biotechnology* 2013; **22**(6): 1487-1493. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-013-0242-2>
- Ali HM, Abo-Shady A, Sharaf Eldeen HA, Soror HA, Shousha WG, Abdel-Barry OA, Saleh AM. Structural features, kinetics and SAR study of radical scavenging and antioxidant activities of phenolic and anilinic compounds. *Chemistry Central Journal* 2013; **7**: 53. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-153X-7-53>
- Altenburg J, de Graaff CS, van der Werf TS, Boersma WG. Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics-Part 1: Biological mechanisms. *Respiration* 2011; **81**(1): 67-74. <http://dx.doi.org/10.1159/000320319>

- Alves-Silva JM, Dias dos Santos SM, Pintado ME, Perez-Alvarez JA, Fernandez-Lopez J, Viuda-Martos M. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control* 2013; **32**(2): 371-378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.022>
- Amar EC, Kiron V, Satoh S, Watanabe T. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish & Shellfish Immunology* 2004; **16**(4): 527-537. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2003.09.004>
- Amariei S, Ciornei S, Sanduleac E. Antioxidant activity of some essential oils. *Food and Environment Safety* 2013; **12**(2): 143-147.
- Amarti F, Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Farah A, Khia A, Guedira A, Rahouti M, Chaouch A. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Thymys zygis* of Morocco. *Phytotherapie-Heidelberg* 2011; **9**(3): 149-157.
- Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry* 2013; **61**(46): 10835-10847. <http://dx.doi.org/10.1021/jf403496k>
- Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends in Microbiology* 2007; **15**(2): 87-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.009>
- Archana PR, Rao BN, Ballal M, Rao BSS. Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2009; **680**(1-2): 70-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.09.010>
- Ardavanis A et al. Tryfonopoulos D, Yiotis I, Gerasimidis G, Baziotis N, Rigatos G. Non-allergic nature of docetaxel-induced acute hypersensitivity reactions. *Anti-Cancer Drugs* 2004; **15**(6): 581-585.
- Aristatile B, Al-Assaf AH, Pugalendi KV. Carvacrol suppresses the expression of inflammatory marker genes in D-galactosamine-hepatotoxic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2013; **6**(3): 205-211. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60024-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60024-3)
- Ashina M, Lassen LH, Bendtsen L, Jensen R, Olesen J. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on chronic tension-type headache: a randomised crossover trial. *Lancet* 1999; **353**(9149): 287-289. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)01079-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(98)01079-4)
- Ayoughi F, Barzegar M, Sahari MA, Naghdibadi H. Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracuncululus* L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. *Journal of Agricultural Science and Technology (Tehran, Islamic Republic of Iran)* 2011; **13**(1), 79-88.
- Azad IS, Al-Yaqout A, Al-Roumi M. Antibacterial and immunity enhancement properties of anaesthetic doses of thyme (*Thymus vulgaris*) oil and three other anaesthetics in *Sparidentax hasta* and *Acanthopagrus latus*. *Journal of King Saud University-Science* 2014; **26**: 101-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.12.003>
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology* 2008; **46**(2): 446-475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bayala B, Bassole IHN, Gnoula C, Nebie R, Yonli A, Morel L, Lobaccaro JM, Figueredo G, Nikiema JB, Simpore J. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from burkina faso. *PloS one* 2014; **9**(3): e92122. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092122>
- Beena KD, Rawat DS. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013; **23**(3): 641-645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.001>

- Bellik Y, Benabdesselam F, Ayad A, Dahmani Z, Boukraa L, Nemmar A, Iguer-Ouada M. Antioxidant activity of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe as affected by chemical environment. *International Journal of Food Properties* 2013; **16**(6): 1304-1313. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2011.584257>
- Beretta G, Artali R, Facino RM, Gelmini F. An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; **55**(5): 1255-1264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.026>
- Bezerra de Siqueira RJ, Caldas Magalhaes PJ, Leal-Cardoso JH, Pinto Duarte G, Lahlou S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. *Life Sciences* 2006; **78**(20): 2365-2372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.042>
- Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz ALTG, De Carvalho JE, Pastore GM. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food and Chemical Toxicology* 2011; **49**(7), 1610-1615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.012>
- Bonamin F, Moraes TM, dos Santos RC, Kushima H, Faria FM, Silva MA, Junior IV, Nogueira L, Bauab TM, Souza Brito ARM, da Rocha LRM, Hiruma-Lima CA. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chemico-Biological Interactions* 2014; **212**: 11-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.009>
- Bortolomeazzi R, Sebastianutto N, Toniolo R, Pizzariello A. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry* 2007; **100**(4): 1481-1489. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.039>
- Bortolomeazzi R, Verardo G, Liessi A, Callea A. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chemistry* 2010; **118**(2), 256-265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.115>
- Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry* 1997; **30**(3):124-133. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19970615\)30:3<124::AID-CYTO3>3.3.CO;2-V](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19970615)30:3<124::AID-CYTO3>3.3.CO;2-V)
- Botelho MA, Martins JG, Ruela RS, Rachid I, Santos JA, Soares JB, Franca MC, Montenegro D, Ruela WS, Barros LP, Queiroz DB, Araujo RS, Sampaio FC. Protective effect of locally applied carvacrol gel on ligature-induced periodontitis in rats: a tapping mode AFM study. *Phytotherapy Research* 2009; **23**(10): 1439-1448. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2798>
- Botelho MA, Rao VS, Montenegro D, Bandeira MAM, Cruz-Fonseca SG, Pinto-Nogueira NA, Albuquerque-Ribeiro R, Castro-Brito GA. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phytotherapy Research* 2008; **22**(4): 442-449. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2325>
- Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany* 2010; **76**(2): 210-216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.009>
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; **55**(19): 7879-7885. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0715323>
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology* 1982; **78**: 206-209. <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>

- Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Galastri L, Marceca MT, Guffanti EE. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology* 2006; **76**(2), 61-68. <http://dx.doi.org/10.1159/000089719>
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 1995; **28**(1): 25-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brenes A, Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology* 2010; **158**(1-2): 1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>
- Brewer MS. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2011; **10**: 221-247. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Bulbul A, Bulbul T, Biricik H, Yesilbag D, Gezen SS. Effects of various levels of rosemary and oregano volatile oil mixture on oxidative stress parameters in quails. *African Journal of Biotechnology* 2012; **11**(7): 1800-1805.
- Burke MD, Bridges JW, Parke DV. The effects of the non-ionic detergent tween 80 on hepatic microsomal hydroxylation. *Xenobiotica* 1975; **5**(5): 261-277.
- Cabral de Oliveira A, Hillard EA, Pigeon P, Damasceno-Rocha D, Rodrigues FAR, Montenegro RC, Costa-Lotufo LV, Goulart MOF, Jaouen G. Biological evaluation of twenty-eight ferrocenyl tetrasubstituted olefins: Cancer cell growth inhibition, ROS production and hemolytic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; **46**(9): 3778-3787. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.043>
- Caldefie-Chezet F, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP, Guillot J. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytotherapy research* 2006; **20**(5): 364-70. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1862>
- Caldefie-Chezet F, Guerry M, Chalchat JC, Fusillier C, Vasson MP, Guillot J. Anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radical Research* 2004; **38**(8), 805-811. <http://dx.doi.org/10.1080/1071576042000220247>
- Capasso M, Durrant LG, Stacey M, Gordon S, Ramage J, Spendlove I. Costimulation via CD55 on human CD4+ T cells mediated by CD97. *J Immunol* 2006; **177**(2): 1070-1077. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1070>
- Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Letters* 1994; **341**(1): 65-68. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80241-6](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(94)80241-6)
- Carroll MC. The complement system in B cell regulation. *Mol Immunol* 2004; **41**(2-3): 141-146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2004.03.017>
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *Phytother. Res.* 2007a; **21**(6): 501-506. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2124>
- Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R, Hajlaoui H, Mahdouani K, Abdelly C, Bakhrouf A. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses* 2007b; **50**(5): 403-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01391.x>
- Chaudhary SK, Maity N, Nema NK, Bhadra S, Saha BP, Mukherjee PK. Angiotensin Converting Enzyme Inhibition Activity of Fennel and Coriander Oils from India. *Natural Product Communications* 2013; **8**(5): 671-672.

- Chaurasia JK, Pandey N, Tripathi YB. Effect of hexane fraction of leaves of *Cinnamomum tamala* Linn on macrophage functions. *Inflammopharmacol* 2010; **18**(3):147-154. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-009-0029-5>
- Chaurasia JK, Tripathi YB. Chemical characterization of various fractions of leaves of *Cinnamomum tamala* Linn toward their antioxidant, hypoglycemic, and anti-inflammatory property. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2011; **33**(3): 466-472. <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2010.538850>
- Chedia A, Ghazghazi H, Dallali S, Houssine S, Brahim H, Abderazzak M. Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitatus* L. essential oils from two Tunisian localities (Sousse and Bizerte). *International Journal of Agronomy & Plant Production* 2013; **4**(8): 1772-1781.
- Chen DC, Lee YY, Yeh PY, Lin JC, Chen YL, Hung SL. Eugenol inhibited the antimicrobial functions of neutrophils. *Journal of endodontics* 2008; **34**(2): 176-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.004>
- Chen F, Shi Z, Neoh KG, Kang ET. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering* 2009; **104**(1): 30-39. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22363>
- Chen Q, Gan Z, Zhao J, Wang Y, Zhang S, Li J, Ni Y. In vitro comparison of antioxidant capacity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) oils and their main components. *LWT-Food Science and Technology* 2014; **55**(2): 632-637. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.017>
- Chen Y, Zeng H, Tian J, Ban X, Ma B, Wang Y. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology* 2013; **62**(Pt 8): 1175-1183. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.055467-0>
- Choi CY, Park KR, Lee JH, Jeon YJ, Liu KH, Oh S, Kim DE, Yea SS. Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF- κ B, ERK1/2, and p38 kinase. *European Journal of Pharmacology* 2007; **576**(1-3), 151-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.034>
- Choi WS, Park BS, Lee SE, Park KJ, Kim SY, Lee YH. Inhibitory effects on nitric oxide synthesis by flavors. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 2004; **47**(2): 51-55.
- Choi YK, Cho GS, Hwang S, Kim BW, Lim JH, Lee JC, Kim HC, Kim WK, Kim YS. Methyl Eugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. *Free Radical Research* 2010; **44**(8): 925-935. <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2010.490837>
- Chung, IM, Yeo MA, Kim SJ, Moon HI. Anti-complement activity of essential oils from red and black rice bran. *Int J Food Sci Nutr* 2011; **62**(3): 215-218. <http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2010.503187>
- Chun Yan H, Hong P, Zhen Yu Z, Jing S. Evaluation of antioxidant and antitumor activities of lemon essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; **4**(18): 1910-1915. <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR10.436>
- Conforti F, Tundis R, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, De Cindio B, Menichini F, Houghton PJ. Protective effect of Pimpinella anisoides ethanolic extract and its constituents on oxidative damage and its inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Medicinal Food* 2010; **13**(1): 137-141. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2008.0154>
- Coors EA, Seybold H, Merk HF, Mahler V. Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactoid reactions. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2005; **95**(6):593-599. [http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61024-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61024-1)
- Courrèges MC, Benencia F. *In vitro* antiphagocytic effect of basil oil on mouse macrophages. *Fitoterapia* 2002; **73**(5): 369-374. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00117-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00117-X)

- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell, HC, Gustafson, JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 2000; **88**(1): 170-175. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>
- Cruz GS, Wanderley-Teixeira V, Oliveira JV, Correia AA, Breda MO, Alves TJS, Cunha FM, Teixeira AAC, Dutra KA, Navarro DMAF. Bioactivity of Piper hispidinervum (Piperales: Piperaceae) and Syzygium aromaticum (Myrtales: Myrtaceae) oils, with or without formulated Bta on the biology and immunology of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) *Journal of Economic Entomology* 2014; **107**(1): 144-153. <http://dx.doi.org/10.1603/EC13351>
- da Franca Rodrigues KA, Amorim LV, Guerra de Oliveira JM, Noleto Dias C, Coutinho Moraes DF, de Aguiar Andrade EH, Soares Maia JG, Portela Carneiro SM, de Amorim Carvalho FA. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013; **2013**: Article ID 279726, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/279726>
- da Franca Rodrigues KA, Amorim LV, Noleto Dias C, Coutinho Moraes DF, Portela Carneiro SM, de Amorim Carvalho FA. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; **160**: 32-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024>
- Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008; **112**(4): 935-945. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-12-077917>
- Dandlen SA, Lima AS, Mendes MD, Miguel MG, Faleiro ML, Sousa MJ, Pedro LG, Barroso J, Figueiredo AC. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 2010; **25**(3): 150-155. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1972>
- Dar MY, Shah WA, Rather MA, Qurishi Y, Hamid A, Qurishi MA. Chemical composition, *in vitro* cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). *Food Chemistry* 2011; **129**(4): 1606-1611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.016>
- Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008; **10**(7): 1199-1234. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2007.1927>
- D'Avila Farias M, Souto Oliveira P, Pereira Dutra FS, Jacobsen Fernandes T, de Pereira CMP, Quintana de Oliveira S, Moro Stefanello F, Leonetti Lencina C, Gatto Barschak A. Eugenol derivatives as potential anti-oxidants: is phenolic hydroxyl necessary to obtain an effect? *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2014; **66**(5): 733-746. <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12197>
- Davis WW, Pfeiffer RR, Quay JF. Normal and promoted gastrointestinal absorption of water-soluble substances I: Induced rapidly reversible hyperabsorptive state in the canine fundic stomach pouch. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1970; **59**(7): 960-963. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600590708>
- Dawidowicz AL, Olszowy M. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural product research* 2014; **28**(22): 1952-1963. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.918121>
- De Almeida I, Sales Alviano D, Pereira Vieira D, Barreto Alves P, Fitzgerald Blank A, Lopes AHCS, Sales Alviano C, Rosa MSS. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol Res* 2007; **101**(2): 443-452. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0502-2>
- Del Toro-Arreola S, Flores-Torales E, Torres-Lozano C, Del Toro-Arreola A, Tostado-Pelayo K, Ramirez-Duenas MG, Daneri-Navarro A. Effect of d-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *International Immunopharmacology* 2005; **5**(5): 829-838. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2004.12.012>

- de Oliveira-Mendes ST, Ribeiro-Sobrinho AP, Teixeira-de Carvalho A, de Souza-Cortes MI, Vieira-Leda Q. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *Journal of endodontics* 2003; **29**(2): 95-99. <http://dx.doi.org/10.1097/00004770-200302000-00002>
- Dibazar SP, Fateh S, Daneshmandi S. Immunomodulatory effects of clove (*Syzygium aromaticum*) constituents on macrophages: *In vitro* evaluations of aqueous and ethanolic components. *Journal of Immunotoxicology* 2014; 1-8. <http://dx.doi.org/10.3109/1547691X.2014.912698>
- Dohare P, Garg P, Sharma U, Jagannathan NR, Ray M. Neuroprotective efficacy and therapeutic window of curcuma oil: in rat embolic stroke model. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2008a; **8**(55): 1472-1492. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-8-55>
- Dohare P, Varma S, Ray M. Curcuma oil modulates the nitric oxide system response to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Nitric Oxide* 2008b; **19**(1): 1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.020>
- Dundar E, Olgun EG, Isiksoy S, Kurkcuoglu M, Baser KHC, Bal C. The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2008; **59**(6): 399-408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2007.11.009>
- Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research* 2010; **20**(1): 34-50. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Du RH, Tang YB, Zhou JG, Guan YY. Effects of Tween 80 on volume-regulated chloride channel and cell proliferation in rat basilar artery smooth muscle cell. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011; **63**(2): 253-260. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01209.x>
- EDQM. European Pharmacopoeia. 7th Edition (7.5). Strasbourg: Council of Europe, 2012. <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
- Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lulis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 2002; **296**(5577): 2391-2394. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1106830>
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxidederived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; **391**(6665): 393-397. <http://dx.doi.org/10.1038/34923>
- El Abed N, Kaabi B, Smaali MI, Chabbouh M, Habibi K, Mejri M, Nejib Marzouki M, Ben Hadj Ahmed S. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thymus capitata* Essential Oil with Its Preservative Effect against *Listeria monocytogenes* Inoculated in Minced Beef Meat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014; **2014**. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/152487>
- El-Baroty GS, Abd El-Baky HH, Farag RS, Saleh MA. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African Journal of Biochemistry Research* 2010; **4**(6): 167-174.
- El-Ghorab AH. Supercritical fluid extraction of the egyptian rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves and *Nigella sativa* L. seeds volatile oils and their antioxidant activities. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2003; **6**(2): 67-77. <http://dx.doi.org/10.1080/0972-060X.2003.10643331>
- El-Ghorab AH, El-Massry KF. Free radical scavenging and antioxidant activity of volatile oils of local clove and cinnamon isolated by supercritical fluid extraction [SFE] *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2003; **6**(1): 9-20. <http://dx.doi.org/10.1080/0972-060X.2003.10643322>
- El-Ghorab AH, Nauman M, Anjum FM, Hussain S, Nadeem M. A Comparative Study on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Ginger (*Zingiber officinale*) and Cumin

- (*Cuminum cyminum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 2010; **58**(14): 8231-8237. <http://dx.doi.org/10.1021/jf101202x>
- El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. Circulation Research 2008; **103**(4): 352-359. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000326772.76822.7a>
- El-Latif ASA, Saleh NS, Allam TS, Ghazy EW. The effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and garlic (*Allium sativum*) essential oils on performance, hematological, biochemical and immunological parameters of broiler chickens. British Journal of Poultry Sciences 2013; **2**(2): 16-24. <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.bjps.2013.2.2.74145>
- Elmann A, Mordechay S, Rindner M, Ravid U. Anti-neuroinflammatory effects of geranium oil in microglial cells. Journal of Functional Foods 2010; **2**(1): 17-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2009.12.001>
- El-Massry, K. F.; Farouk, A.; Abou-Zeid, M. Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L) volatile oil. Journal of Essential Oil-Bearing Plants 2008; **11**(5): 536-543. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643663>
- Elslimani FA, Elmhdwi MF, Elabbar F, Dakhil OO. Estimation of antioxidant activities of fixed and volatile oils extracted from *Syzygium aromaticum* (clove). Der Chemica Sinica 2013; **4**(3): 120-125.
- Emami SA, Javadi B, Hassanzadeh MK. Antioxidant Activity of the Essential Oils of Different Parts of *Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica* and *Juniperus oblonga*. Pharmaceutical Biology 2007; **45**(10): 769-776. <http://dx.doi.org/10.1080/13880200701585931>
- Faix S, Faixova Z, Plachá I, Koppel J. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on antioxidative status in broiler chickens. Acta Veterinaria Brno 2009; **78**(3): 411-417. <http://dx.doi.org/10.2754/avb200978030411>
- Fakoor MH, Rasooli I. Pathogen control by antioxidative characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Acta Horticulturae 2008; **786** (Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants, 2007): 125-136.
- Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Ashrafihelan J. Hepatoprotective effects of γ -irradiated caraway essential oils in experimental sepsis. Applied Radiation and Isotopes 2010; **68**(2): 280-285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.10.052>
- Fazel M, Omidbeygi M, Barzegar M, Naghdi BH. Influence of heating on antiradical activity of essential oils of thyme, summer savory and clove by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. Journal of Medicinal Plants 2007; **6**(22): 54-63.
- Feng X, Guo Z, Nourbakhsh M, Hauser H, Ganster R, Shao L, Geller DA. Identification of a negative response element in the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) promoter: the role of NF-kappa B-repressing factor (NRF) in basal repression of the iNOS gene. PNAS 2002; **99**(22): 14212-14217. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.212306199>
- Fernandes ES, Passos GF, Medeiros R, Da Cunha FM, Ferreira J, Campos MM, Pianowski LF, Calixto JB. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. European Journal of Pharmacology 2007; **569**(3): 228-236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.059>
- Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. Free Radical Biology & Medicine 2007; **42**(2): 153-164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030>
- Forsgren A, Schmeling D. Effect of Antibiotics on Chemotaxis of Human Leukocytes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1977; **11**(4): 580-584. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.11.4.580>

- Forslund T, Sundqvist T. Nitric oxide regulates the chemiluminescence from stimulated human neutrophils. *APMIS* 1995; **103**(7-8): 813-817. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1699-0463.1995.tb01439.x>
- Fouad AA, Yacoubi MT. Mechanisms underlying the protective effect of eugenol in rats with acute doxorubicin cardiotoxicity. *Archives of Pharmacal Research* 2011; **34**(5): 821-828. <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-011-0516-2>
- Fujisawa S, Atsumi T, Ishihara M, Kadoma Y. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. *Anticancer Research* 2004; **24**(2B): 563-570.
- Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* 2007; **102**(3): 898-904. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.035>
- Galego L, Almeida V, Goncalves V, Costa M, Monteiro I, Matos F, Miguel G. Antioxidant activity of the essential oils of *Thymbra capitata*, *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina*, and *Calamintha baetica*. *Acta Horticulturae* 2008; **765**, 325-333.
- Ghazanfari G, Minaie B, Yasa N, Nakhai LA, Mohammadirad A, Nikfar S, Dehghan G, Boushehri VS, Jamshidi H, Khorasani R, Salehnia A, Abdollahi M. Biochemical and histopathological evidences for beneficial effects of *Satureja Khuzestanica* Jamzad essential oil on the mouse model of inflammatory bowel diseases. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2006; **16**(7): 365-372. <http://dx.doi.org/10.1080/15376520600620125>
- Genena AK, Hense H, Smania A Jr., Machado de Souza S. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) - a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos (Campinas, Brazil)* 2008; **28**(2), 463-469. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000200030>
- Giannenas I, Triantafillou EI, Stavrakakis S, Margaroni M, Mavridis S, Steiner T, Karagouni E. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2012; **350-353**: 26-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.027>
- Giweli AA, Džamić AM, Soković MD, Ristić MS, Marin PD. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. *Central European Journal of Biology* 2013; **8**(5): 504-511. <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-013-0150-0>
- Goldstein E, Cooper AD, Tarkington B. Effect of inhaling medication vapors from a colds preparation on murine pulmonary bacterial defense systems. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1976; **2**(2): 371-388. <http://dx.doi.org/10.1080/15287397609529440>
- Gozsy B, Kato L. Reticuloendothelial system-stimulating compounds and their mechanism of action. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 1958; **36**(3): 319-326. <http://dx.doi.org/10.1139/o58-036>
- Grespan R, Pazinato Aguiar R, Nunes Giubilei F, Rocco Fuso R, Damiao MJ, Bersani Amado C, Nakamura Cuman RK, Leite Silva E, Graton Mikcha J, Hernandez L. Hepatoprotective effect of pretreatment with *Thymus vulgaris* essential oil in experimental model of acetaminophen-induced injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014; **2014**: Article ID 954136, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/954136>
- Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen". *Chem. Ber.* 1879; **12**(426). <http://dx.doi.org/10.1002/cber.187901201117>

- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982; **126**(1): 131-138. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Gu B, You J, Li Y, Duan C, Fang M. Enteric-coated garlic supplement markedly enhanced normal mice immunocompetence. *European Food Research and Technology* 2010; **230**(4): 627-634. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-009-1202-1>
- Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SCH, Antonioli AR, Boniardin LR, Silva FA, Santos JPA, Rocha RF, Moreira JCF, Araújo AAS, Gelain GP, Quintans-Júnior LJ. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2010; **107**(6): 949-957. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00609.x>
- Guimarães AG, Xavier MA, Santana MT, Camargo EA, Santos CA, Brito FA, Barreto EO, Cavalcanti SCH, Antonioli AR, Oliveira RCM, Quintans-Júnior LJ. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2012; **385**(3): 253-263. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-011-0715-x>
- Gülçin I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure-Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Food* 2011; **14**(9): 975-985. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2010.0197>
- Hajlaoui H, Snoussi M, Noumi E, Zanetti S, Ksouri R, Bakhrouf A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of five Tunisian aromatic plants. *Italian Journal of Food Science* 2010; **22**(3): 320-329.
- Halder S, Mehta AK, Mediratta PK, Sharma KK. Essential Oil of Clove (*Eugenia caryophyllata*) augments the Humoral Immune Response but Decreases Cell Mediated Immunity. *Phytother. Res.* 2011; **25**(8): 1254-1256. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3412>
- Hamada M, Uezu K, Matsushita J, Yamamoto S, Kishino Y. Distribution and immune responses resulting from oral administration of D-limonene in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2002; **48**(2): 155-160. <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.48.155>
- Hashemi RS, Davoodi H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Vet Res Commun* 2011; **35**(3): 169-180. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-010-9458-2>
- Hed J. Methods for distinguishing ingested from adhering particles. *Methods in Enzymology* 1986; **132**: 198-204. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(86\)32008-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(86)32008-1)
- Hed J. The extinction of fluorescence by crystal violet and its use to differentiate between attached and ingested microorganisms in phagocytosis. *FEMS Microbiology Letters* 1977; **1**(6): 357-361. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1977.tb00651.x>
- Henderson LO, Marti GE, Gaigalas A, Hannon WH, Vogt RF. Terminology and nomenclature for standardization in quantitative fluorescence cytometry. *Cytometry* 1998; **33**(2): 97-105. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19981001\)33:2<97::AID-CYTO3>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19981001)33:2<97::AID-CYTO3>3.0.CO;2-H)
- Höferl M, Stoilova I, Schmidt E, Wanner J, Jirovetz L, Trifonova D, Krastev L, Krastanov A. Chemical composition and antioxidant properties of juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil. Action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. *Antioxidants* 2014; **3**(1): 81-98. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox3010081>
- Horchani H, Ben Salem N, Zarai Z, Sayari A, Gargouri Y, Chaabouni M. Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized *Staphylococcus aureus* lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. *Bioresource Technology* 2010; **101**(8): 2809-2817. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.082>
- Horváthová E, Kozics K, Srančíková A, Hunáková L, Gálová E, Ševčovičová A, Slameňová D. Borneol administration protects primary rat hepatocytes against exogenous oxidative DNA damage. *Mutagenesis* 2012; **27**(5): 581-588. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/ges023>

- Huang MH, Chang LW, Sung WC, Vong WJ, Wang BS. Protective effects of three smoke flavouring phenols on oxidative damage and nitric oxide production. *Food Chemistry* 2011; **126**(4): 1655-1661. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.049>
- Hunzicker GM. A novel regulatory system in plants involving medium-chain fatty acids. *Planta* 2009; **231**(1): 143-153. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-009-1032-1>
- Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; **41**(4): 1070-1078. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000400027>
- Ito M, Murakami K, Yoshino M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology* 2005; **43**(3): 461-466. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.019>
- Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; **20**: 197-216. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jeena K, Liju VB, Kuttan R. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of essential oil from ginger. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 2013; **57**(1): 51-62.
- Jin CH, Lee HJ, Park YD, Choi DS, Kim DS, Kang SY, Seo KI, Jeong IY. Isoeugenol inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages through the heme oxygenase-1 induction and inhibition of the interferon- β -STAT-1 pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; **58**(2): 860-867. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9033333>
- Jin J. Methyl n-nonylketone as an active principle of Herba Houttuyniae and its mechanism. *Zhongguo Linchuang Yaoxue Zazhi* 2012; **21**(1): 23-26.
- Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanov A, Schmidt E. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; **54**(17): 6303-6307. <http://dx.doi.org/10.1021/jf060608c>
- Johansson A, Lundborg M. Effects of low concentrations of 3-carene on alveolar macrophages *in vitro*. *Toxicology* 1997; **120**(2): 99-104. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(97\)03641-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(97)03641-X)
- Johard U, Eklund A, Hed J, Lundahl J. Terpenes enhance metabolic activity and alter expression of adhesion molecules (Mac-1 and L-selectin) on human granulocytes. *Inflammation* 1993; **17**(4): 499-509.
- Jones RJ, Jourdeuil D, Salerno JC, Smith SM, Singer HA. INOS regulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2007; **292**(6): H2634-H2642. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01247.2006>
- Juhas S, Bukovska A, Cikos S, Czikkova S, Fabian D, Koppel J. Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in mice. *Acta Veterinaria Brno* 2009; **78**(1): 121-127. <http://dx.doi.org/10.2754/avb200978010121>
- Jukic M, Politeo O, Milos M. Chemical composition and antioxidant effect of free volatile aglycons from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) compared to its essential oil. *Croatica Chemica Acta* 2006; **79**(2): 209-214.
- Jumepaeng T, Prachakool S, Luthria DL, Chanthai S. Determination of antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity of the essential oils from citronella grass and lemongrass. *International Food Research Journal* 2013; **20**(1): 481-485.
- Jung J, Lee J-H, Bae KH, Jeong C-S. Anti-gastric actions of eugenol and cinnamic acid isolated from *Cinnamomi Ramulus*. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 2011; **131**(7): 1103-1110. <http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.131.1103>

- Kačániová M, Vukovič N, Horská E, Šalamon I, Bobková A, Hleba L, Mellen M, Vatlák A, Petrová J, Bobko M. Antibacterial activity against *Clostridium* genus and antiradical activity of the essential oils from different origin. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 2014; **49**(7), 505-512. <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2014.896673>
- Kadoma Y, Atsumi T, Okada N, Ishihara M, Yokoe I, Fujisawa S. Radical-scavenging activity of natural methoxyphenols vs. synthetic ones using the induction period method. *Molecules* 2007; **12**(2), 130-138. <http://dx.doi.org/10.3390/12020130>
- Kadri A, Zarai Z, Ben Chobba I, Békir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from the South-Western of Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; **5**(25), 5999-6004. <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR11.423>
- Kang P, Kim KY, Lee HS, Min SS, Seol GH. (2013). Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Life sciences* 2013; **93**(24): 955-961. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.10.014>
- Kanwar JR, Kanwar RK, Burrow H, Baratchi S. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Current Medicinal Chemistry* 2009; **16**(19): 2373-2394. <http://dx.doi.org/10.2174/092986709788682155>
- Karagouni E, Athanassopoulou F, Lytra A, Komis C, Dotsika E. Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*. *Veterinary parasitology* 2005; **134**(3-4): 215-228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.020>
- Karakaya S, Nehir El S, Karagozlu N, Sahin S, Sumnu G, Bayramoglu B. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary. *Journal of Food Science and Technology* 2014; **51**(6): 1056-1065. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0610-y>
- Kar Mahapatra S, Chakraborty SP, Majumdar S, Bag BG, Roy S. Eugenol protects nicotine-induced superoxide mediated oxidative damage in murine peritoneal macrophages in vitro. *European Journal of Pharmacology* 2009; **623**(1-3): 132-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.019>
- Kato L, Gozsy B. Stimulation of the cell-linked defense forces of the skin. Mechanism of action of certain topical agents. *Can Med Assoc J.* 1955; **73**(1): 31-34.
- Kaur G, Athar M, Alam MS. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Molecular Carcinogenesis* 2010; **49**(3): 290-301. <http://dx.doi.org/10.1002/mc.20601>
- Kavoosi G, Teixeira da Silva JA. Inhibitory effects of *Zataria multiflora* essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in glucose-stimulated human monocyte. *Food and Chemical Toxicology* 2012; **50**(9): 3079-3085. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.002>
- Kavoosi G, Teixeira da Silva JA, Saharkhiz MJ. Inhibitory effects of *Zataria multiflora* essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012; **64**(10): 1491-1500. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01510.x>
- Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 2009; **214**(7): 562-575. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.003>
- Kettunen H, Ouwehand A, Schulze H, Rautonen N. Dietary essential oil supplementation enhanced intestinal immunocompetence in young broiler chicks. *Reproduction Nutrition Development* 2006; **46**(Suppl. 1): S101 (P-180).
- Kim EY, Chae HJ, Chu KH. Enzymatic oxidation of aqueous pentachlorophenol. *Journal of Environmental Sciences* 2007; **19**(9): 1032-1036. [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60168-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60168-5)
- Kim HJ, Chen F, Wu C, Wang X, Chung HY, Jin Z. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry 2004; **52**(10): 2849-2854.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf035377d>
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. Science 1970; **169**(3950): 1095-1097. <http://dx.doi.org/10.1126/science.169.3950.1095>
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J. Leukoc. Biol. 2005; **77**(5): 598-625.
<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1204697>
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. Journal of Bacteriology 1968; **95**(6): 2131-2138.
- Klerx JPMA, Beukelman CJ, Van Dijk H, Willers JMN. Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. Journal of Immunological Methods 1983; **63**(2): 215-220. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90425-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90425-8)
- Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia dracuncululus* and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracuncululus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* Essential Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005; **53**(24): 9452-9458.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf0516538>
- Krishan G, Narang A. Use of essential oils in poultry nutrition: A new approach. J Adv Anim Res 2014; **1**(4): 156-162. <http://dx.doi.org/10.5455/javar.2014.a36>
- Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CBHW, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. J. Pathol. 2003; **201**(1): 28-36. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1409>
- Kulic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry 2004; **85**(4): 633-640.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024>
- Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? Acta Haematol. 2000; **104**(1): 10-15. <http://dx.doi.org/10.1159/000041062>
- Kuwabara T, Hasegawa M, Takaichi S. Reaction system for violaxanthin De-epoxidase with PSII membranes. Plant and Cell Physiology 1998; **39**(1): 16-22.
- Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. Seminars in Cancer Biology 2005; **15**(4): 277-289.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.04.004>
- Lee JH, Chang KM, Kim GH. Composition and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* essential oil: suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, cytokines and cellular adhesion. Journal of the Science of Food and Agriculture 2009; **89**(10): 1762-1769. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3653>
- Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, Lee WH, Fitzgerald KA, Hwang DH. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. Journal of Biological Chemistry 2004; **279**(17): 16971-16979. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M312990200>
- Leelapornpisid P, Chansakaow S, Chaiyasut C, Wongwattananukul N. Antioxidant activity of some volatile oils and absolutes from Thai aromatic plants. Acta Horticulturae 2008; **786**(Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants, 2007), 61-65.
- Leelarungrayub D, Suttajit M. Potential antioxidant and anti-inflammatory activities of Thai plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) essential oil. International Journal of Essential Oil Therapeutics 2009; **3**(1): 25-30.
- Lee SK, Hong CH, Huh SK, Kim SS, Oh OJ, Min HY, Park KK, Chung WY, Hwang JK. Suppressive effect of natural sesquiterpenoids on inducible cyclooxygenase (COX-2)

- and nitric oxide synthase (iNOS) activity in mouse macrophage cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2002; **21**(2): 141-148. <http://dx.doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v21.i2.70>
- Lee SM, Park JG, Lee YH, Lee CG, Min BS, Kim JH, Lee HK. Anti-complementary activity of triterpenoides from fruits of *Zizyphus jujuba*. *Biol Pharm Bull* 2004; **27**(11): 1883-1886. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.27.1883>
- Lefkowitz SS, Gelderman MP, Lefkowitz DL, Moguilevsky N, Bollen A. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by macrophages exposed to myeloperoxidase. *J. Infect. Dis.*1996; **173**(5): 1202-1207. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/173.5.1202>
- Lehmann AK, Halstensen A, Bassøe CF. Flow cytometric quantitation of human opsonin-dependent phagocytosis and oxidative burst responses to meningococcal antigens. *Cytometry* 1998; **33**(4): 406-413. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19981201\)33:4<406::AID-CYTO3>3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19981201)33:4<406::AID-CYTO3>3.0.CO;2-L)
- Lemonis I, Tsimogiannis D, Louli V, Voutsas E, Oreopoulou V, Magoulas K. Extraction of Dittany (*Origanum dictamnus*) using supercritical CO₂ and liquid solvent. *Journal of Supercritical Fluids* 2013; **76**: 48-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.019>
- Liang D, Li F, Fu Y, Cao Y, Song X, Wang T, Wang W, Guo M, Zhou E, Li D, Yang Z, Zhang N. Thymol Inhibits LPS-Stimulated Inflammatory Response via Down-Regulation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in Mouse Mammary Epithelial Cells. *Inflammation* 2014; **37**(1): 214-222. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-013-9732-x>
- Liang WZ, Lu CH. Carvacrol-induced [Ca²⁺]_i rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life sciences* 2012; **90**(17-18): 703-711. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.027>
- Li J, Su J, Li W, Liu W, Altura BT, Altura BM. Peroxynitrite induces apoptosis in canine cerebral vascular muscle cells: possible relation to neurodegenerative diseases and strokes. *Neuroscience Letters* 2003; **350**(3): 173-177. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00881-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00881-4)
- Lim SS, Shin KH, Ban HS, Kim YP, Jung SH, Kim YJ, Ohuchi K. Effect of the essential oil from the flowers of *Magnolia sieboldii* on the lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and prostaglandin E₂ by rat peritoneal macrophages. *Planta Medica* 2002; **68**(5): 459-462. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2002-32085>
- Lin CW, Yu CW, Wu SC, Yih KH. DPPH free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of forty-two kinds of essential oils. *Yaowu Shipin Fenxi* 2009; **17**(5): 386-395.
- Lin JJ, Lu KW, Ma YS, Tang NY, Wu PP, Wu CC, Lu HF, Lin JG, Chung JG. Alpha-phellandrene, a natural active monoterpene, influences a murine WEHI-3 leukemia model in vivo by enhancing macrophage phagocytosis and natural killer cell activity. *In vivo* 2014; **28**(4): 583-588-
- Li SY, Ru YJ, Liu M, Xu B, Péron A, Shi XG. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. *Livestock Science* 2012; **145**(1-3) 119-123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.01.005>
- Liu R, Zhang L, Lan X, Li L, Zhang TT, Sun JH, Du GH. Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion: involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor kappaB signaling pathway. *Neuroscience* 2011; **176**: 408-419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.029>
- Liu X, Zhao M, Wu K, Chai X, Yu H, Tao Z, Wang J. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.). *Food Chemistry* 2012a; **131**(2): 685-690. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.063>
- Liu Y, Song M, Che TM, Bravo D, Pettigrew JE. Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages *in vitro*. *Journal of animal science* 2012b; **90**(8), 2774-2783. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2011-4304>

- Li W, Tsubouchi R, Qiao S, Haneda M, Murakami K, Yoshino M. Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. *Biomedical Research* 2006; **27**(2): 69-74. <http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.27.69>
- Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry* 2008; **69**(8), 1732-1738. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>
- Lopes Pereira S, Mesquita Marques A, Takashi Sudo R, Coelho Kaplan MA, Zapata-Sudo G. Vasodilator activity of the essential oil from aerial parts of *Pectis brevipedunculata* and its main constituent citral in rat aorta. *Molecules* 2013; **18**(3): 3072-3085. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18033072>
- Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, Grover R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Critical Care Medicine* 2004; **32**(1): 21-30. <http://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000105581.01815.C6>
- Maeda H, Yamazaki M, Katagata Y. Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil inhibits LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2013; **77**(3): 482-486. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120692>
- Mahapatra SK, Bhattacharjee S, Chakraborty SP, Majumdar S, Roy S. Alteration of immune functions and Th1/Th2 cytokine balance in nicotine-induced murine macrophages: Immunomodulatory role of eugenol and N-acetylcysteine. *International Immunopharmacology* 2011; **11**(4): 485-495. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2010.12.020>
- Manuele MG, Barreiro-Arcos ML, Davicino R, Ferraro G, Cremaschi G, Anesini, C. Limonene Exerts Antiproliferative Effects and Increases Nitric Oxide Levels on a Lymphoma Cell Line by Dual Mechanism of the ERK Pathway: Relationship with Oxidative Stress. *Cancer Investigation* 2010; **28**(2):135-145. <http://dx.doi.org/10.3109/07357900903179583>
- Marcuzzi A, Tommasini A, Crovella S, Pontillo A. Natural isoprenoids inhibit LPS-induced-production of cytokines and nitric oxide in aminobisphosphonate-treated monocytes. *International Immunopharmacology* 2010; **10**(6): 639-642. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2010.03.008>
- Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol* 2007; **28**(4):184-192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2007.02.006>
- Martac I, Podea P. Determination of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oil Isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Carpathian Journal of Food Science and Technology* 2012; **4**(2): 40-45.
- Martin E, Bhakdy S. Flow cytometric assay for quantifying opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by peripheral blood leukocytes. *J Clin Microbiol* 1992; **30**(9): 2246-2255.
- Maruyama N, Ishibashi H, Hu W, Morofuji S, Inouye S, Yamaguchi H, Abe S. Suppression of carrageenan- and collagen II-induced inflammation in mice by geranium oil. *Mediators of Inflammation* 2006; **4**(3): 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/MI/2006/62537>
- Maruyama N, Sekimoto Y, Ishibashi H, Inouye S, Oshima H, Yamaguchi H, Abe S. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation* 2005; **2**(1): 1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-9255-2-1>
- Maruyama N, Takizawa T, Ishibashi H, Hisajima T, Inouye S, Yamaguchi H, Abe S. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with

- vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2008; **31**(8): 1501-1506. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.31.1501>
- Mastelic J, Jerkovic I, Blazevic I, Poljak-Blazi M, Borovic S, Ivancic-Bace I, Smrecki V, Zarkovic N, Brcic-Kostic K, Vikić-Topic D, *et al.* Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; **56**(11): 3989-3996. <http://dx.doi.org/10.1021/jf073272v>
- Mata AT, Proenca C, Ferreira AR, Serralheiro MLM, Nogueira JMF, Araujo MEM. Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* 2007; **103**(3): 778-786. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.017>
- Matsuda H, Kageura T, Oda M, Morikawa T, Sakomoto Y, Yoshikawa M. Effects of constituents from the bark of *Magnolia obovata* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2001; **49**(6): 716-720. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.49.716>
- Matthijsen RA, Huugen D, Hoebers NT, de Vries B, Peutz-Kootstra CJ, Aratani Y, Daha MR, Tervaert JWC, Buurman WA, Heeringa P. Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion. *Am. J. Pathol.* 2007; **171**(6): 1743-1752. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.070184>
- Maxia A, Frau MA, Falconieri D, Karchuli MS, Kasture S. Essential oil of *Myrtus communis* inhibits inflammation in rats by reducing serum IL-6 and TNF- α . *Natural Product Communications* 2011; **6**(10): 1545-1548.
- McLafferty FW, Stauffer DB, Stenhagen E, Heller SR. *The Wiley/ MBS registry of mass spectral data.* New York: John Wiley & Sons, 1993.
- Meuwese MC, Stroes ESG, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJP, Khaw KT, Boekholdt SM. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; **50**(2): 159-165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2007.03.033>
- Miguel MG. Antioxidant and antiinflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules* 2010; **15**: 9252-9287. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15129252>
- Mikre W, Rohloff J, Hymete A. Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils obtained from important aromatic plants of Ethiopia. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2007; **10**(6): 465-474. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2007.10643580>
- Miladi H, Ben Slama R, Mili D, Zouari S, Bakhrouf A, Ammar E. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science* 2013; **5**(6): 729-739. <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2013.56090>
- Min BS, Lee IS, Chang MJ, Yoo JK, Na MK, Hung TM, Thuong PT, Lee JP, Kim JH, Kim JC, Woo MH, Choi JS, Lee HK, Bae KH. Anticomplementary activity of triterpenoids from the whole plant of *Aceriphyllum rossii* against the classical pathway. *Planta Med* 2008; **74**(7): 726-729. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1074534>
- Moon HK, Kang P, Lee HS, Min SS, Seol GH. Effects of 1,8-cineole on hypertension induced by chronic exposure to nicotine in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2014; **66**(5): 688-693. <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12195>
- Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *The Journal of Nutrition* 2007; **137**(6): 1616S-1620S.
- Moura-Rocha NF, Vasconcelos-Rios ER, Rodrigues-Carvalho AM, Santos-Cerqueira G, de Araújo-Lopes A, Moreira-Leal LKA, Leite Dias M, Pergentino de Sousa D, Forenço de Sousa FC. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents.

- Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2011a; **384**(6): 525-533. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-011-0679-x>
- Moura Rocha NF, Valente de Oliveira G, Ramos de Araújo FY, Vasconcelos Rios ER, Rodrigues Carvalho AM, Freire Vasconcelos L, Silveira Macêdo D, Gomes Soares PM, Pergentino De Sousa D, Florenço de Sousa FC. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2011b; **44**(4): 455-461. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.08.020>
- Nabiha B, Abdelfateh EO, Faten K, Paul WJ, Michel M, Moncef CM. Chemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* floral buds essential oil. Journal of Essential Oil-Bearing Plants 2009; **12**(6): 694-702. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643777>
- Nam H, Kim MM. Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. Food and Chemical Toxicology 2013; **55**: 106-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.050>
- Nanasombat S, Wuttigol P. Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. Food Science and Biotechnology 2011; **20**(1), 45-53. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-011-0007-8>
- Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. Cell 2010; **140**(6): 871-882. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>
- Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signalling. J. Clin. Invest. 2003; **111**(6): 769-778. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI18174>
- Nehir El S, Karagozlu N, Karakaya S, Sahin S. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from *Laurus nobilis* L. leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation. Food and Nutrition Sciences 2014; **5**(2): 97-106. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.52013>
- Ninomiya K, Hayama K, Ishijima SA, Maruyama N, Irie H, Kurihara J, Abe S. Suppression of inflammatory reactions by terpinen-4-ol, a main constituent of tea tree oil, in a murine model of oral candidiasis and its suppressive activity to cytokine production of macrophages *in vitro*. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2013; **36**(5): 838-844. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00033>
- Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Trabelsi N, Ksouri R, Valentin E, Bakhrouf A. Chemical composition, antioxidant and antifungal potential of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Eucalyptus globulus* essential oils against oral *Candida* species. Journal of Medicinal Plants Research 2011; **5**(17), 4147-4156.
- Oboh G, Olasehinde TA, Ademosun AO. Essential Oil from Lemon Peels Inhibit Key Enzymes Linked to Neurodegenerative Conditions and Pro-oxidant Induced Lipid Peroxidation. Journal of Oleo Science 2014; **63**(4): 373-381. <http://dx.doi.org/10.5650/jos.ess13166>
- Ogata N, Yamamoto H, Kugiyama K, Yasue H, Miyamoto E. Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor- κ B in human endothelial cells. Cardiovascular Research 2000; **45**(2): 513-521. [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00364-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00364-8)
- Ogiwara T. Radical scavenging activity of phenol, m-cresol and thymol and their cytotoxicity. Meikai Daigaku Shigaku Zasshi 2005; **33**(2): 199-208.
- Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juarez MA, Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control 2013; **31**(1): 189-195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022>
- Ordóñez G, Llopis N, Peñalver P. Efficacy of Eugenol Against a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Experimental Infection in Commercial Layers in Production. J. Appl. Poult. Res. 2008; **17**: 376-382. <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2007-00109>

- Ozcan B, Esen M, Sangun MK, Coleri A, Caliskan M. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology* 2010; **31**(5): 637-641.
- Ozkan A, Erdogan A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology* 2011; **35**(6): 735-742. <http://dx.doi.org/10.3906/biy-1011-170>
- Öztürk M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry* 2012; **134**(1): 48-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.054>
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* 2007; **87**(1): 315-424. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Padalia RC, Verma RS, Sah AN, Karki N, Sundaresan V, Sakia D. Leaf and rhizome oil composition of *Zingiber officinale* Roscoe and their antibacterial and antioxidant activities. *Asian Journal of Traditional Medicines* 2011; **6**(2), 73-82.
- Padmakumari Amma KP, Priya Rani M, Sasidharan I, Sreekumar MM. Comparative chemical composition and *in vitro* antioxidant activities of essential oil isolated from the leaves of *Cinnamomum tamala* and *Pimenta dioica*. *Natural Product Research* 2013; **27**(3): 290-294. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.668691>
- Papageorgiou V, Gardeli C, Mallouchos A, Papaioannou M, Komaitis M. Variation of the Chemical Profile and Antioxidant Behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller Grown in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; **56**(16): 7254-7264. <http://dx.doi.org/10.1021/jf800802t>
- Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann. Intern. Med.* 1981; **95**(3): 293-301. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-95-3-293>
- Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2006; **17**(8): 321-327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.005>
- Passos GF, Fernandes ES, da Cunha FM, Ferreira J, Pianowski LF, Campos MM, Calixto JB. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; **110**(2): 323-333. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032>
- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2010; **23**(2): 75-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2010.04.007>
- Peana AT, Marzocco S, Popolo A, Pinto A. (-)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sciences* 2006; **78**(7): 719-723. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.065>
- Peñalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *Acta Pathol., Microbiol. Immunol. Scand.* 2005; **113**: 1-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130101.x>
- Perdigao Domiciano T, de Oliveira Dalalio MM, Leite Silva E, Versuti Ritter AM, Estevas-Silva CF, Seara Ramos F, Caparroz-Assef SM, Cuman, Nakamura Cuman RK, Bersani-Amado CA. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2013; **386**(4): 331-338. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0820-5>
- Pérez-García F, Marín E, Cañigueral S, Adzet T. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: Involvement of an antioxidant mechanism. *Life Sciences* 1996; **59**(24): 2033-2040. [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(96\)00556-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(96)00556-5)

- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigueral S. Antioxidant and complement modulating activities of five essential oils. *Planta Medica* 2007; **73**(09): P-489. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-987269>
- Pérez-Rosés R, Risco E, Vila R, Peñalver P, Cañigueral S. Effect of essential oils on the activity of human neutrophil myeloperoxidase in vitro. *Planta Medica* 2012; **78**(11): PF61. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1320608>
- Petchsoongsakul N, Pechyen C. Characterization of Eugenol Extracted from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) for Food Packaging Materials. *Advanced Materials Research* 2012; **506**: 603-606. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.506.603>
- Placha I, Takacova J, Ryzner M, Cobanova K, Laukova A, Stropfova V, Venglovska K, Faix S. Intestine integrity and antioxidant status of broilers. *British Poultry Science* 2014; **55**(1): 105-114. <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2013.873772>
- Pleszczyńska M, Wiater A, Skowronek M, Szczodrak J. Purification and characterization of mutanase produced by *Paenibacillus curdlanolyticus* MP-1. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 2012; **42**(4): 335-347. <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2011.622329>
- Politeo O, Jukic M, Milos M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica Chemica Acta* 2006; **79**(4): 545-552.
- Politeo O, Jukic M, Milos M. Chemical composition and antioxidant activity of free volatile aglycones from laurel (*Laurus nobilis* L.) compared to its essential oil. *Croatica Chemica Acta* 2007; **80**(1): 121-126.
- Politeo O, Jukic M, Milos M. Comparison of chemical composition and antioxidant activity of glycosidically bound and free volatiles from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Journal of Food Biochemistry* 2010; **34**(1): 129-141. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00269.x>
- Price KS, Hamilton RG. Anaphylactoid reactions in two patients after omalizumab administration after successful long-term therapy. *Allergy and Asthma Proceedings* 2007; **28**(3): 313-319. <http://dx.doi.org/10.2500/aap.2007.28.3003>
- Puertas-Mejia M, Hillebrand S, Stashenko E, Winterhalter P. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 2002; **17**(5): 380-384. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1110>
- Qiu S, Liu Z, Hou L, Li Y, Wang J, Wang H, Du W, Wang W, Qin Y, Liu Z. Complement activation associated with polysorbate 80 in beagle dogs. *International Immunopharmacology* 2013; **15**(1): 144-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.10.021>
- Ramadan MF, Asker MMS, Tadros M. Lipid profile, antiradical power and antimicrobial properties of *Syzygium aromaticum* oil. *Grasas y Aceites* (Sevilla, Spain) 2013; **64**(5): 509-520. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.011713>
- Ramos JMO, Santos CA, Santana DG, Santos DA, Alves PB, Thomazzi SM. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2013; **23**(4): 644-650. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000045>
- Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine* 2014; **14**(1): 225. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-225>
- Rebuglio-Vellosa JC, Khalil NM, Ortega-Gutierrez V, Macedo dos Santos VAFF, Furlan M, Brunetti IL, de Faria Oliveira OMM. *Salacia campestris* root bark extract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; **45**(1): 99-107. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502009000100012>

- Rege BD, Kao JPY, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002; **16**(4-5): 237-246. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00055-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00055-6)
- Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE. Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; **90**(11): 1776-1786. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.1127>
- Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, Khan R, Oday-O-Hamiza, Lateef A, Hassan SK, Rashid S, Ali N, Zeeshan M, Sultana S. D-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NFκB in kidneys of Wistar rats. *Experimental Biology and Medicine* 2014; **239**(4): 465-476. <http://dx.doi.org/10.1177/1535370213520112>
- Riaz T, Abbasi MA, Umar MI, Aziz-Ur R, Shahzadi T, Khan KM, Ahmad VU. Comparison of antioxidant potential of volatile oils of *Syzygium aromaticum* and *Illicium verum* relative to conventionally used standards. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 2011; **33**(2): 200-204.
- Ribeiro Silva M, Matos Ximenes R, Martins da Costa JG, Leal LKAM, de Lopes AA, de Barros Viana GS. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2010; **381**(5): 415-426. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0494-9>
- Ribeiro TP, Porto DL, Menezes CP, Antunes AA, Silva DF, De Sousa DP, Nakao LS, Braga VA, Medeiros IA. Unravelling the cardiovascular effects induced by α-terpineol: a role for the nitric oxide-cGMP pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2010; **37**(8): 811-816. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05383.x>
- Risco-Rodríguez ME. Sangre de drago: estudio sobre la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora [tesis doctoral]. Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia. Departament de Farmacologia i Química Terapèutica; 2000.
- Robinson JM, Badwey JA, Karnovsky ML, Karnovsky MJ. Release of superoxide and change in morphology by neutrophils in response to phorbol esters: antagonism by inhibitors of calcium-binding proteins. *The Journal of cell biology* 1985; **101**(3): 1052-1058. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.101.3.1052>
- Robinson JP, Carter WO, Narayanan PK. Oxidative product formation analysis by flow cytometry. En: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA. (Eds.) *Methods in Cell Biology. Flow Cytometry. Segunda Edición. Parte A. Capítulo 28, volumen 41*: pp. 437-447. Academic Press, Inc. 1994.
- Rodríguez N, Fend F, Jennen L, Schiemann M, Wantia N, Prazeres da Costa CU, Dürr S, Heinzmann U, Wagner H, Miethke T. Polymorphonuclearneutrophils improve replication of *Chlamydia pneumoniae* in vivo upon MyD88-dependent attraction. *The Journal of Immunology* 2005; **174**(8): 4836-4844. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4836>
- Romeilah RM, Fayed SA, Mahmoud GI. Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *Journal of Applied Sciences Research* 2010; **6**(1): 50-62.
- Roos D, Bot AA, van Schaik ML, de Boer M, Daha MR. Interaction between human neutrophils and zymosan particles: the role of opsonins and divalent cations. *J Immunol* 1981; **126**(2): 433-440.
- Rua J, Fernandez-Alvarez L, de Castro C, Del Valle P, de Arriaga D, Garcia-Armesto MR. Antibacterial activity against foodborne *Staphylococcus aureus* and antioxidant capacity of various pure phenolic compounds. *Foodborne pathogens and disease* 2011; **8**(1):149-157. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2010.0659>
- Ryzner M, Takáčová J, Čobanová K, Plachá I, Venglovská K, Faix Š. Effect of dietary *Salvia officinalis* essential oil and sodium selenite supplementation on antioxidative status and

- blood phagocytic activity in broiler chickens. *Acta Veterinaria Brno* 2013; **82**(1): 43-48. <http://dx.doi.org/10.2754/avb201382010043>
- Saab AM, Tundis R, Loizzo MR, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R, Menichini F, Esseily F, Menichini F. Antioxidant and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. *Natural Product Research* 2012; **26**(18): 1741-1745. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2011.608674>
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 2005; **91**(4): 621-632. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- Safaei-Ghomi J, Ebrahimabadi AH, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry* 2009; **115**(4): 1524-1528. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.051>
- Sahin Basak S, Candan F. Effect of *Laurus nobilis* L. Essential Oil and its Main Components on α -glucosidase and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity. *Iran J Pharm Res.* 2013; **12**(2): 367-379.
- SaiRam M, Sharma SK, Ilavazhagan G, Kumar D, Selvamurthy W. Immunomodulatory effects of NIM-76, a volatile fraction from Neem oil. *Journal of ethnopharmacology* 1997; **55**(2): 133-139. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(96\)01487-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(96)01487-0)
- Saleh N, Allam T, El-latif AA, Ghazy E. The effects of dietary supplementation of different levels of thyme (*Thymus vulgaris*) and ginger (*Zingiber officinale*) essential oils on performance, hematological, biochemical and immunological parameters of broiler chickens. *Global Veterinaria* 2014; **12**(6): 736-744. <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.06.83189>
- Sanghvi A, Grassi E, Bartman C, Diven WF. Effect of detergents on in vitro 7α -hydroxycholesterol formation by rat liver microsomes. *Lipids* 1982; **17**(9): 644-649. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02535372>
- Santos FA, Silva RM, Campos AR, de Araújo RP, Lima-Júnior RCP, Rao VSN. 1,8-Cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food and Chemical Toxicology* 2004; **42**(4): 579-584. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.001>
- Santos JL, Montes MJ, Gutierrez F, Ruiz C. Evaluation of phagocytic capacity with a modified flow cytometry technique. *Immunol. Lett.* 1995; **45**(1-2):1-4. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-2478\(94\)00180-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0165-2478(94)00180-Y)
- Scherer R, Teixeira Godoy H. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* 2009; **112**(3), 654-658. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- Scherer R, Wagner R, Duarte MCT, Godoy HT. Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2009; **11**(4): 442-449. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>
- Schieven GL, de Fex H, Stephenson L. Hypochlorous acid activates tyrosine phosphorylation signal pathways leading to calcium signaling and TNF α production. *Antioxidants & Redox signaling* 2002; **4**(3): 501-507. <http://dx.doi.org/10.1089/15230860260196308>
- Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Current Medicinal Chemistry* 2003; **10**(20): 2123-2145. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867033456828>

- Schulze H, Kettunen H, Ouwehand AC, Rautonen N. Dietary essential oil supplementation can affect broiler performance and digesta microbial community. *Reproduction Nutrition Development* 2006; **46**(Suppl. 1): S114 (P-213).
- Seema Farhath MS, Vijaya PP, Vimal M. Antioxidant activity of Geraniol, Geranial acetate, Gingerol and Eugenol. *Research in Pharmacy* 2013; **3**(1): 1-6.
- Segura JJ, Jimenez-Rubio A, Guerrero JM, Calvo JR, Feito JJ. Effect *in vitro* of Tifell (formocresol-eugenol) on macrophage adhesion. *International endodontic journal* 1998; **31**(2): 112-116. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2591.1998.00121.x>
- Serafino A, Vallebona PS, Andreola F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M, Rasi G, Garaci E, Pierimarchi P. Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunology* 2008; **9**(17): no indica página. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-9-17>
- Shalaby EA, Nasr NF, El Sherief SM. An in vitro study of the antimicrobial and antioxidant efficacy of some nature essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; **5**(6): 922-931.
- Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke TE. Involvement of Protein Kinase C and Protein Tyrosine Kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production by human monocytes. *The Journal of Immunology* 1994; **153**(4): 1818-1824.
- Shen CL, Hong KJ, Kim SW. Comparative effects of ginger root (*Zingiber officinale* Rosc.) on the production of inflammatory mediators in normal and osteoarthrotic sow chondrocytes. *Journal of Medicinal Food* 2005; **8**(2): 149-153. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2005.8.149>
- Shin SG, Kim JY, Chung HY, Jeong JC. Zingerone as an antioxidant against peroxynitrite. *J. Agric. Food Chem.* 2005; **53**(19): 7617-7622. <http://dx.doi.org/10.1021/jf051014x>
- Shirole RL, Shirole NL, Kshatriya AA, Kulkarni R, Saraf MN. Investigation into the mechanism of action of essential oil of *Pistacia integerrima* for its antiasthmatic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2014; **153**(3): 541-551. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.02.009>
- Silva-Filho SE, Silva-Comar FMS, Marques-Wiirzler LA, do Pinho RJ, Grespan R, Bersani-Amado CA, Nakamura-Cuman RK. Effect of camphor on the behavior of leukocytes in vitro and in vivo in acute inflammatory response. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2014; **13**(12): 2031-2037. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i12.13>
- Silvestri JDF, Paroul N, Czyewski E, Lerin L, Rotava L, Cansian RL, Mossi A, Toniazco C, de Oliveira D, Treichel H. Profile of chemical composition and antioxidant and antibacterial activities of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata* Thunb). *Revista Ceres* 2010; **57**(5): 589-594.
- Singh BK, Tripathi M, Chaudhari BP, Pandey PK, Kakkar P. Natural terpenes prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress and release of apoptotic proteins during nimesulide-hepatotoxicity in rats. *PLoS One* 2012; **7**(4): e34200. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034200>
- Singh G, Kapoor I PS, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CAN. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology* 2008; **46**(10), 3295-3302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.017>
- Singh G, Marimuthu P, De Heluani CS, Catalan C. Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (Aril part). *Journal of Food Science* 2005; **70**(2): M141-M148. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07105.x>
- Sinha S, Jothiramajayam M, Ghosh M, Mukherjee A. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* 2014; **68**: 71-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.036>

- Slameňová D, Horváthová E, Wsóllová L, Šramková M, Navarová J. Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2009; **677**(1-2), 46-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.05.016>
- Sodsai A, Piyachaturawat P, Sophasan S, Suksamrarn A, Vongsakul M. Suppression by *Curcuma comosa* Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells. *International Immunopharmacology* 2007; **7**(4): 524-531. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2006.12.013>
- Souza MC, Siani AC, Ramos MFS, Menezes-de-Lima O Jr, Henriques MGMO. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two asteraceae species. *Pharmazie* 2003; **58**(8): 582-586.
- Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 2007; **179**(4): 2600-2608. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2600>
- Sriti J, Wannas WA, Talou T, Vilarem G, Marzouk B. Chemical composition and antioxidant activities of Tunisian and Canadian coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit. *Journal of Essential Oil Research* 2011; **23**(4), 7-15. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2011.9700462>
- Steevels TAM, Meyaard L. Immune inhibitory receptors: Essential regulators of phagocyte function. *Eur. J. Immunol.* 2011; **41**(3): 575-587. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201041179>
- Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015; **55**(3): 304-318. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Su YW, Chao SH, Lee MH, Ou TY, Tsai YC. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E2 production in macrophages. *Planta Medica* 2010; **76**(15): 1666-1671. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249947>
- Tabti L, El Amine Dib M, Gaouar N, Samira B, Tabti B. Antioxidant and Antifungal Activity of Extracts of the Aerial Parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns Against Four Phytopathogenic Fungi of *Citrus sinensis*. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2014; **9**(1): 49-54.
- Tang WHW, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, Jasper S, Hazen SL, Klein AL. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; **49**(24): 2364-2370. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.053>
- Tiwari M, Kakkar P. Plant derived antioxidants - Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. *Toxicology in Vitro* 2009; **23**(2): 295-301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.014>
- Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, Saija A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry* 2004; **89**(4): 549-554. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.011>
- Topal U, Sasaki M, Goto M, Otles S. Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2008; **59**(7-8): 619-634. <http://dx.doi.org/10.1080/09637480701553816>
- Trichet VV. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 2010; **41**(3): 356-372. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x>
- Trinh HT, Lee IA, Hyun YJ, Kim DH. *Artemisia princeps* Pamp. essential oil and its constituents eucalyptol and α -terpineol ameliorate bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting bacterial growth and NF- κ B activation. *Planta Medica* 2011; **77**(18): 1996-2002. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1280094>

- Tsai ML, Lin CC, Lin WC, Yang CH. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2011; **75**(10), 1977-1983. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.110377>
- Tung YT, Chua MT, Wang SY, Chang ST. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technology* 2008; **99**(9): 3908-3912. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.050>
- Tung YT, Yen PL, Lin CY, Chang ST. Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. *Pharmaceutical Biology* 2010; **48**(10): 1130-1136. <http://dx.doi.org/10.3109/13880200903527728>
- Turan S. Efficiency of various plant essential oils in stabilization of canola oil and of its purified triacylglycerols. *Journal of Essential Oil Research* 2014; **26**(3): 166-176. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.840810>
- Turnberg D, Botto M. The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. *Mol Immunol* 2003; **40**(2-4):145-153. [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890\(03\)00110-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(03)00110-X)
- Ündeğer Ü, Başaran A, Degen GH, Başaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and chemical toxicology* 2009; **47**(8): 2037-2043. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.020>
- Uribe S, Ramirez J, Peña A. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* 1985; **161**(3): 1195-1200.
- Valente J, Zuzarte M, Goncalves MJ, Lopes MC, Cavaleiro C, Salgueiro L, Cruz MT. Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil. *Food and Chemical Toxicology* 2013a; **62**: 349-354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.083>
- Valente J, Zuzarte M, Liberal J, Goncalves MJ, Lopes MC, Cavaleiro C, Cruz MT, Salgueiro L. *Margotia gummifera* essential oil as a source of anti-inflammatory drugs. *Industrial Crops and Products* 2013b; **47**: 86-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.036>
- Valim-Araujo DAO, Takayama C, de-Faria FM, Socca EAR, Dunder RJ, Manzo LP, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito ARM. Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2011; **21**(4): 721-729. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000117>
- Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: How, Where and Why? *Nature Reviews Drug Discovery* 2002; **1**(12): 939-950. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd960>
- Van der Veen BS, de Winther MPJ, Heeringa P. Myeloperoxidase: Molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009; **11**(11): 2899-2937. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.2538>
- Van Tuinen P, Johnson KR, Ledbetter SA, Nussbaum RL, Rovera G, Ledbetter DH. Localization of myeloperoxidase to the long arm of human chromosome 17: relationship to the 15; 17 translocation of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 1987; **1**(3): 319-322.
- Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; **49**(3): 307-316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004>
- Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicology Letters* 2003; **140-141**: 113-124. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00508-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00508-8)

- Viuda-Martos M, El Gendy AENGs, Sendra E, Fernandez-Lopez J, Abd El Razik KA, Omer EA, Perez-Alvarez JA. Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Listeria Activities of Essential Oils Obtained from Some Egyptian Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010a; **58**(16): 9063-9070. <http://dx.doi.org/10.1021/jf101620c>
- Viuda-Martos M, Navajas YR, Zapata ES, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal* 2010b; **25**(1): 13-19. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1951>
- Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; **344**(14):1058-1066. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200104053441406>
- Wang HF, Wang YK, Yih KH. DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five kinds of essential oils. *Journal of Cosmetic Science* 2008a; **59**(6): 509-522. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00531.5.x>
- Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry* 2008b; **108**(3): 1019-1022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.046>
- Wang W, Zhang L, Li N, Zu Y. Chemical composition and in vitro antioxidant, cytotoxicity activities of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil. *African Journal of Biochemistry Research* 2012; **6**(6): 75-80. <http://dx.doi.org/10.5897/AJBR11.122>
- Wang XW, Cui YK, Tian SQ, Zhao RY. Antioxidant activities of oregano oil, carvacrol, citral and cinnamaldehyde. *Shipin Gongye Keji* 2013; **34**(14): 311-313.
- Watanabe Y, Nakanishi H, Goto N, Otsuka K, Kimura T, Shuji Adachi S. Antioxidative properties of ascorbic acid and acyl ascorbates in ML/W emulsion. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2010; **87**(12):1475-1480. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-010-1632-8>
- Wei A, Shibamoto T. Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; **55**(5): 1737-1742. <http://dx.doi.org/10.1021/jf062959x>
- Weiszhar Z, Czucz J, Révész C, Rosivall L, Szebeni J, Rozsnyay Z. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; **45**(4): 492-498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.09.016>
- Wu CC, Thiemermann C, Vane JR. Glibenclamide-induced inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in cultured macrophages and in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 1995; **114**(6): 1273-1281. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13343.x>
- Yang SA, Jeon SK, Lee EJ, Shim CH, Lee IS. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research* 2010, **24**(2): 140-151. <http://dx.doi.org/10.1080/14786410802496598>
- Yeh JL, Hsu JH, Hong YS, Wu JR, Liang JC, Wu BN, Chen IJ, Liou SF. Eugenolol and glyceryl-isoegenol suppress LPS-induced iNOS expression by down-regulating NF-κB and AP-1 through inhibition of MAPKS and AKT/IκBα signaling pathways in macrophages. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2011; **24**(2): 345-356.
- Yildiz F, Coban S, Terzi A, Savas M, Bitiren M, Celik H, Aksoy N. Protective effects of *Nigella sativa* against ischemia-reperfusion injury of kidneys. *Renal Failure* 2010; **32**(1): 126-131. <http://dx.doi.org/10.3109/08860220903367577>
- Yilmaz ES, Timur M, Aslim B. Antimicrobial, Antioxidant Activity of the Essential Oil of Bay Laurel from Hatay, Turkey. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2013; **16**(1): 108-116. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2013.764158>

- Yoon WJ, Lee NH, Hyun CG. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Oleo Science* 2010; **59**(8): 415-421. <http://dx.doi.org/10.5650/jos.59.415>
- Yoshida M, Xia Y. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**(38): 36953-36958. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M305214200>
- Yosr Z, Hnia C, Rim T, Mohamed B. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* 2013; **43**: 412-419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.044>
- Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology* 2010; **48**(11): 3144-3152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.010>
- Zhang B, Chen H, Xu A, Chen J, Sheng S. Effects of volatile oil from *Rheum palmatum* on immunologic function in mice. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials* 1997; **20**(2): 85-88.
- Zhang H, Yao M, Morrison RA, Chong S. Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. *Archives of pharmaceutical research* 2003; **26**(9): 768-772. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02976689>
- Zhang Q, Zhang B, Li LZ, Ran JH, Lin ZJ. Effect of *Cinnamomum cassia* oil on endocrine and immune system in normal rats. *Zhonghua Zhongyiyao Zazhi* 2011; **26**(8): 1723-1726.
- Zhu Y, Thangamani S, Ho B, Ding JL. The ancient origin of the complement system. *EMBO J* 2005; **24**(2):382-394. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600533>
- Zielińska M, Fenrych W. The application of a flow cytometric assay for evaluation of phagocytosis of neutrophils. *Acta biochimica polonica* 1997; **44**(1): 121-126.