



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CS. ODONTOLÓGICAS  
ÁREA DE QUÍMICA  
LABORATORIO DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS ACEITES  
ESENCIALES DE *THYMUS VULGARIS* Y *SCHINUS AREIRA* EN LÍNEAS  
CELULARES DE CARCINOMA ESPINO CELULAR ORAL CAL-27**

**Sheyla Lissete Cortés Gómez**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Mario Díaz Dosque**

**TUTORES ASOCIADOS**

**José Jara Sandoval**

**Rocío Santander Meyer**

**Adscrito a Proyecto FIA Código PYT-2017-0853**

**Santiago, Chile**

**2022**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CS. ODONTOLÓGICAS  
ÁREA DE QUÍMICA  
LABORATORIO DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS ACEITES  
ESENCIALES DE *THYMUS VULGARIS* Y *SCHINUS AREIRA* EN LÍNEAS  
CELULARES DE CARCINOMA ESPINO CELULAR ORAL CAL-27**

**Sheyla Lissete Cortés Gómez**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Mario Díaz Dosque**

**TUTORES ASOCIADOS**

**José Jara Sandoval**

**Rocío Santander Meyer**

**Adscrito a Proyecto FIA Código PYT-2017-0853**

**Santiago, Chile**

**2022**

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis primeramente a mi bisabuela Juana Campillay (QEPD). Con quien pude compartir sus últimos meses mientras realizaba este proyecto. Una mujer adelantada a su época, que me enseñó tanto en tan poco tiempo, siempre pendiente de todo aquel que conoció y que constantemente me alentó a seguir con mi camino académico, dándome ánimos sobre todo en este periodo de investigación.

A mis pacientes, que con sus sonrisas y agradecimientos me mostraron que poder ayudarles a recuperar su salud es una recompensa tan grande, que todo el trabajo vale la pena.

A mi pareja, a mi hermana y a mis cachorros, que se vivieron este proceso al lado mío, contra viento y marea, entre crisis y pandemia, con todos sus altos y bajos. Gracias por ser mi soporte, mis pilares. Sin todo su amor, comprensión y apoyo incondicional no podría haber completado esta tarea.

## AGRADECIMIENTOS

A mis tutores en esta investigación. Mario Díaz-Dosque, gracias por la oportunidad de incorporarme a este proyecto y acercarme más al mundo de las ciencias odontológicas. A José Jara, por abrirme las puertas del laboratorio y guiarme cuando todo se me hacía tan nuevo y desconocido. A Rocío Santander, por toda la paciencia y apoyo, por facilitar mi aprendizaje sobre temas que veía tan lejanos y por cada consejo, tanto en lo académico como en lo personal.

A todos aquellos docentes que con su calidez, paciencia y apoyo me permitieron aprender lo necesario para culminar este proceso de formación. Gracias por compartir sus experiencias y el cariño por lo que hacen.

Gracias a todos los funcionarios y personal de apoyo de la Facultad. Especialmente a Nelson Rojas que me ayudó con la recolección de muestras para este estudio, siempre con simpatía y ganas de colaborar.

Mi más profundo agradecimiento a todos quienes me acompañaron en este largo camino. A mi familia y amigos que me animaron en los días más difíciles, me ayudaron siempre, me tuvieron paciencia, confiaron en mis habilidades, celebraron cada pequeño triunfo y me entregaron todo el cariño necesario para poder seguir esforzándome cada día.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
Cáncer oral .....	8
Aceites esenciales .....	11
Extracción de aceites esenciales .....	13
Extracción por solventes.....	13
Extracción con agua .....	13
Métodos innovadores .....	15
Plantas con potencial de extracción .....	15
<i>Schinus areira</i> .....	16
<i>Thymus vulgaris</i> .....	20
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
Objetivo general .....	23
Objetivos específicos .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
1. Recolección de muestras: .....	24
2. Obtención de aceites esenciales.....	24
3. Caracterización química de los aceites esenciales .....	25
4. Evaluación del efecto citotóxico en células de carcinoma espino celular .....	26

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
Caracterización del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo) .....	28
Caracterización del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> (pimiento) .....	30
Citotoxicidad celular en líneas CAL-27 del aceite de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo).	32
Citotoxicidad celular en líneas CAL-27 del aceite de <i>Schinus areira</i> (pimiento).	33
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>42</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>52</b>

## RESUMEN

El cáncer es un grupo de enfermedades que causan preocupación a nivel mundial debido a su incidencia en alza y alta mortalidad. Entre ellos, el cáncer espino celular oral es de gran relevancia ya que suele ser diagnosticado en etapas tardías, los tratamientos convencionales son de difícil tolerancia, puede causar graves secuelas en los pacientes y tiene alta mortalidad en etapas avanzadas, lo que hace necesario buscar nuevas aproximaciones para su tratamiento. Los aceites esenciales (AEs) podrían ser una buena alternativa para nuevos tratamientos antitumorales coadyuvantes, ya que los AEs provenientes de diversas plantas han mostrado tener efecto citotóxico en líneas celulares tumorales con distintos grados de efectividad, entre ellos los de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Schinus areira* (pimiento).

En este estudio fueron extraídos, mediante arrastre por vapor de agua, AEs de *Thymus vulgaris* y *Schinus areira* provenientes de plantas cultivadas en la Región Metropolitana de Chile. Los mismos fueron caracterizados por GC-MS y evaluado su efecto citotóxico contra líneas de cáncer espino celular oral CAL-27 en tiempos de 48 y 72 horas mediante ensayo de viabilidad celular MTT.

Los componentes de *T. vulgaris* fueron principalmente monoterpenos, destacando el timol (43,43%) como compuesto principal. En el caso de *S. areira*, los compuestos más abundantes fueron  $\alpha$ -felandreno (15,49%), pseudolimoneno (11,31%), biciclogermacreno (8,55%) y cadineno (7,95%). Ambos AEs presentaron efectividad citotóxica en las líneas CAL-27 con un IC<sub>50</sub> de 23,47  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 26,95  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *Schinus areira* y 67,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 70,32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *Thymus vulgaris* a las 48 y 72 horas respectivamente.

Esta capacidad citotóxica demostrada en las líneas celulares CAL-27, indica que los AEs de *T. vulgaris* y *S. areira* podrían ser buenos candidatos para futuros tratamientos contra cáncer espino celular oral.

## INTRODUCCIÓN

### Cáncer Oral

Cáncer es una denominación genérica para un gran grupo de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento celular anómalo que supera los límites fisiológicos y suelen invadir el tejido circundante, además de provocar metástasis en puntos distantes al tumor primario. Según los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (2021), el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 2020 se le atribuyeron 9,9 millones de muertes y se prevé que los nuevos casos aumentarán a 30 millones en las próximas dos décadas (International Agency for Research on Cancer, 2020).

El cáncer es capaz de afectar a casi cualquier órgano o tejido y a distintos tipos de células. Cuando la proliferación se observa en las células epiteliales, recibe el nombre de carcinoma.

El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (2021) considera que las estructuras anatómicas que son afectadas por el cáncer oral son: los labios, los dos tercios de la parte anterior de la lengua, encías, mucosa bucal, piso de la boca, paladar duro y trigono retromolar. El más común de los cánceres en esta zona es el carcinoma escamoso o también llamado carcinoma espinocelular, que afecta a las células del estrato espinoso del epitelio y representa el 90% de los casos (García-García y Bascones, 2009). A su vez, el cáncer puede ser clasificado en cuatro etapas o estadios propuestos por el "American Joint Committee on Cancer" (AJCC), que considera como criterios las características del tumor (T), propagación a nodos linfáticos (N) y metástasis (M) (Egner y cols., 2010). Los detalles de esta clasificación son presentados en el Anexos 1.

A nivel mundial, la incidencia es de 4 casos nuevos cada 100.000 habitantes y su mortalidad de 2 cada 100.000 habitantes, que corresponde a 177.000 personas aproximadamente, siendo incidencia y mortalidad mayor en hombres. La distribución geográfica es desigual, la mayor incidencia y mortalidad se presenta en Melanesia y Asia central del sur, para ambos géneros (International Agency for Research on Cancer 2020).

En nuestro país no existen estudios actualizados sobre las características epidemiológicas de la enfermedad. De acuerdo con los “Registros poblacionales de Cáncer en Chile” para el periodo 2003-2007 (Ministerio de Salud 2012), la incidencia estimada de cáncer de la cavidad oral y faringe fue de 3,4 casos nuevos por 100.000 hombres y de 1,3 casos nuevos por 100.000 mujeres; la mortalidad de 3,2 cada 100.000 en hombres y 1,2 cada 100.000 en mujeres. Este es el único registro nacional publicado por el Ministerio de Salud y tiene grandes limitaciones ya que recopila información de solo 3 de las 15 regiones del país (Antofagasta, Los Ríos y Bío-Bío) y no ha existido una nueva actualización de los datos nacionales. Existen también los registros de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer que al 2018 muestran, para nuestro país, una incidencia de 1,3 cada 100.000 habitantes en hombres y 0,7 cada 100.000 en mujeres; y mortalidad de 0,69 cada 100.000 en hombres y 0,26 cada 100.000 en mujeres.

En el estudio de Riera y Martínez (2005) se analizaron registros anteriores, publicando que “la tasa bruta de mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile aumentó desde 1955 hasta 1980, sin embargo, para el periodo 1981 a 2002, la tasa se estabilizó manteniéndose relativamente constante, existiendo incluso una leve disminución”. Ramirez y cols., (2015) recopilaron datos desde los registros de defunciones del Departamento de Estadística e Información de Salud del MINSAL, estudiaron la mortalidad en el periodo 2002-2010 y plantean: *“Las tasas de mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile entre los años 2002 y 2010 fluctuaron entre 1,11 a 1,25 por 100.000 habitantes, manteniéndose estables a lo largo del periodo y sin presentar mayores cambios respecto a lo reportado por Riera et al (2005).”*

A pesar de no contar con registros nacionales actualizados y detallados, los estudios coinciden en que la incidencia y mortalidad son mayores en los hombres. Los factores de riesgo más importantes son el consumo de tabaco y alcohol, además de la edad, ya que la mayor cantidad de muertes se producen sobre los 45 años. También, se ha encontrado efecto oncogénico en infecciones por papiloma virus (HPV), principalmente asociados a HPV16, siendo un importante factor de riesgo en el cáncer orofaríngeo (Pezzuto y cols., 2015).

Respecto a la sobrevida, la investigación de Bórquez y cols. del Instituto nacional del cáncer (2011), nos muestra que la sobrevida global a los 5 años fue de 57% y 46,3% a los 10 años. El desglose por etapas que se puede observar en la Tabla 1 implica que, mientras más avanzada esté la enfermedad la sobrevida es menor, por lo que el diagnóstico temprano es fundamental, tomando el odontólogo general un rol clave en la detección temprana. Como las lesiones suelen ser asintomáticas en sus primeras etapas, en el momento que el paciente decide consultar al profesional, frecuentemente, se encuentra ya con un cuadro grave. Por lo que aún nos encontramos con que el mayor número de casos son diagnosticados en estadios III o IV que, a pesar de los avances técnicos y los descubrimientos de nuevos tratamientos, tienen un muy mal pronóstico (Yao y cols., 2007).

	<b>Etapas 1</b>	<b>Etapas 2</b>	<b>Etapas 3</b>	<b>Etapas 4</b>
<b>5 años</b>	85.7%	67%	52%	50.6%
<b>10 años</b>	85.7%	55.8%	34.7%	42%

**Tabla 1.** Sobrevida global en pacientes con cáncer intraoral por estadio. Estudio realizado en 137 pacientes, en el Instituto Nacional del Cáncer, año 2011.

Las estrategias terapéuticas se basan principalmente en la resección quirúrgica que busca la eliminación completa de la lesión y los nodos linfáticos afectados, además de terapias coadyuvantes como radioterapia (de rayo externo o braquiterapia) y/o quimioterapia (incluyendo agentes como cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo) que son indicadas principalmente en pacientes en estadio III y IV. Estos tratamientos son de alto costo económico y con efectos adversos importantes, por lo que al momento de decidir el plan terapéutico no sólo se tomará en cuenta las características de las lesiones, sino también la capacidad del paciente de tolerar la terapia (Rivera 2015). Lamentablemente, muchos pacientes que logran la cura sufren secuelas secundarias al tratamiento como mucositis, xerostomía, disfagia, pérdida de funciones orales, trismus y deformidades (Yao y cols., 2007). Además, existe entre un 25% y 48% de recurrencia luego de resecciones quirúrgicas locales aparentemente exitosas, siendo una de las causas principales la persistencia de células tumorales en los márgenes de la resección (Kademani 2007). La localización más habitual es la lengua y también es el sitio anatómico asociado a mayor mortalidad (De la Fuente y cols., 2016), es por ello que para este estudio se utilizaron células CAL-27 que son derivadas de

carcinoma de lengua. Además estas células son particularmente interesante para estudiar nuevos fármacos citotóxicos ya que son resistentes a cisplatino, sulfato de vindesina y actinomicina D (Gioanni y cols., 1988). Por lo tanto, encontrar alternativas terapéuticas efectivas en esta línea podría ayudar al manejo de pacientes con baja respuesta al tratamiento convencional y/o recurrencia.

Muchas son las investigaciones que están buscando mejores aproximaciones terapéuticas para lograr mayor efectividad, menor toxicidad, aumentar la sobrevida y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Pero aún existe gran discusión acerca de las nuevas técnicas quirúrgicas (Bulsara y cols., 2018), y las nuevas aproximaciones terapéuticas (Yao y cols., 2007; Chan y cols., 2015; Lau y cols., 2015).

### **Aceites esenciales**

Los aceites esenciales (AEs) son un fluido hidrófobo que contiene moléculas complejas de bajo peso molecular (usualmente <500 Da), volátiles, que son sintetizadas por plantas aromáticas. Se encuentran en vesículas que pueden estar ubicadas en varias partes de la planta como hojas, flores, frutos, semillas, cortezas y raíces (Bayala y cols., 2014).

Los componentes de los AEs son metabolitos secundarios, propios de cada familia de planta. Estos no son parte de los procesos metabólicos vitales de la planta, si no que permiten que la planta interactúe con microorganismos, insectos y otros seres vivos. Además, están involucrados en procesos de protección frente a factores ambientales como temperatura, humedad, tipo de suelo, radiación UV, etc. Por lo tanto, los aceites esenciales pueden tener una alta variabilidad, incluso dentro de una misma especie, ya que su composición puede ser afectada por características propias de cada planta, las condiciones a las que se enfrenta y el momento en que son recolectadas las muestras. Aquí radica la importancia de la caracterización de las muestras cuando se estudiará sus efectos farmacológicos.

Los numerosos componentes de los AEs, se pueden clasificar de manera simple en los siguientes grupos (Schoonhoven y cols., 2005):

- Terpenos y terpenoides: son un vasto grupo de compuestos que tienen como base unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) unidas entre sí de diferentes maneras, que varían en nivel de saturación y grupos funcionales. Pueden ser clasificados según el número de unidades de isopreno que los conforman: monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), etc.
- Componentes fenólicos: Poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo ( $OH^-$ ) además de otros constituyentes. Se clasifican según el número de carbonos en su esqueleto.

Los AEs poseen numerosos efectos farmacológicos que han sido aprovechados desde los inicios de la humanidad para remediar enfermedades. Cada región del mundo desarrolló el uso de plantas medicinales de manera única, utilizando las especies endémicas de cada lugar. Con el tiempo estas terapias locales pasaron a recibir el nombre de medicina tradicional y han sido preservadas hasta el día de hoy en el saber colectivo.

Esta amplia utilización de las hierbas y plantas ha incentivado la investigación de los principios activos que hacen posible sus efectos terapéuticos, desarrollándose así la farmacéutica tradicional que ha aislado, sintetizado y mejorado dichos compuestos desarrollando los fármacos que hoy conocemos (Avello y Cisternas, 2010).

Sin embargo, aún existe un gran terreno inexplorado del potencial terapéutico de las plantas, por lo que en los últimos años ha existido un auge en los estudios de las medicinas complementarias y particularmente de los aceites esenciales demostrando con bases científicas sus efectos farmacológicos (Bayala y cols., 2014). Debido a que han demostrado actividad antibiótica (Owen y Laird, 2018), antiviral (Schnitzler y cols., 2019), antitumoral (Russo y cols., 2015), analgésica (De Cássia y cols., 2017), antioxidante (De Lavor y cols., 2018), en la industria farmacéutica son utilizados en diferentes presentaciones (cápsulas, cremas, espray, ungüentos, etc.). En particular, los beneficios que han demostrado los AEs como tratamiento o complemento a fármacos tradicionales son, su eficacia de acción, bajo costo y pocos efectos secundarios (Edris, 2007).

## **Extracción de aceites esenciales**

Para lograr la extracción de los AEs pueden utilizarse diversas técnicas, pero todas se basan en romper la pared de las células vegetales para liberar las gotas de aceite que se encuentran en el citoplasma y luego colectarlas.

Existen dos vías principales para la extracción de los AEs. Una es conocida como extracción por solventes, en la que se mezclan solventes orgánicos con las muestras de plantas y luego de un proceso para la remoción de dicho solvente podemos obtener el AE. La utilización de estas técnicas, si bien pueden ser eficientes, no necesariamente son seguras, ya que en aplicaciones de carácter biomédico pueden quedar residuos a nivel de trazas que podrían generar efectos tóxicos. Por otro lado, están las vías de extracción con agua, siendo la más utilizada mediante vapor. Estas no requieren de una instalación muy sofisticada y el producto obtenido no presenta problemas de toxicidad por solventes orgánicos, por esa razón, es la metodología más recomendada para uso biomédico a diferencia del método anterior.

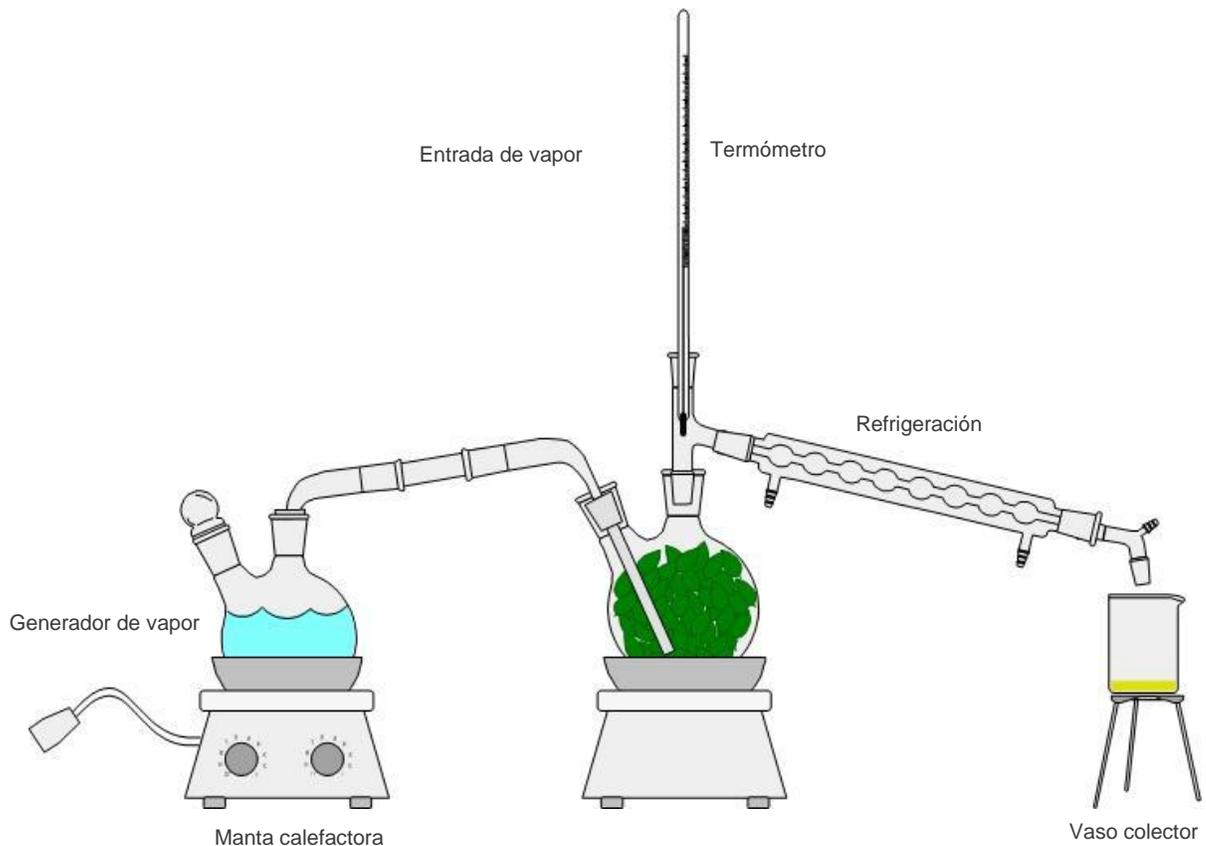
### **Extracción por solventes**

Esta técnica ha sido utilizada principalmente para realizar extracciones de flores que no resisten altas temperaturas. Son utilizados solventes comunes como acetona, éter de petróleo, hexano, metanol o etanol. Consiste en mezclar las plantas con el solvente, seguido de filtración y evaporación del solvente, cuyo resultado es una mezcla de cera, fragancia y aceite esencial. Se combina alcohol con la mezcla para que los aceites esenciales se disuelvan en él y luego se destila a baja temperatura. Este proceso es más complejo, demoroso y costoso que las técnicas con agua, además, es muy difícil obtener un resultado libre de solvente (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017).

### **Extracción con agua**

- **Hidrodestilación:** Es el método más antiguo y simple para la extracción. Las plantas son inmersas en agua dentro de un alambique y la mezcla es hervida, el vapor es condensado y decantado para separar el aceite del agua.

- Hidrodifusión: Este método es realizado a baja presión o al vacío, por lo que la temperatura del vapor puede ser menor a 100°C. Esta técnica puede ser utilizada en plantas secas que puedan ser dañadas a temperatura de ebullición (Abdul y cols.,2018).
- Destilación por arrastre de vapor: Es la técnica más usada y permite extraer el 93% del aceite esencial (Aziz y cols., 2018). Esta técnica consiste en calentar las plantas con vapor proveniente de un generador; producto del calor, el contenido de las células se expande y rompe las paredes celulares liberando las gotas de aceite. El vapor que pasa a través de las plantas forma un flujo portador del aceite esencial que es colectado y condensado, para luego ser decantado y así separar el aceite del agua (Baser, 2010). Este será el método a utilizar en este trabajo por las ventajas de extracción en su rendimiento y la obtención de un producto inocuo.



**Esquema 1.** Equipo de extracción por arrastre de vapor

### **Métodos innovadores**

Los métodos innovadores buscan mejorar algunas de las desventajas de los métodos tradicionales como alteraciones químicas que se producen en estas técnicas (hidrólisis, isomerización y oxidación), además de bajar la temperatura de trabajo y disminuir la cantidad de tiempo, agua y energía utilizada para la extracción. La utilización de microondas ha permitido mejorar las técnicas convencionales, además de nuevos métodos como extracción por fluidos supercríticos con CO<sub>2</sub>, extracción por líquido subcrítico, extracción por microondas libre de solvente, etc. Dichos métodos han logrado muy buenos resultados, sin embargo, requieren equipamiento de alta tecnología más costosos (Moghaddam y Mehdizadeh 2017; Aziz y cols., 2018).

### **Plantas con potencia de extracción**

Chile es un país de gran longitud que posee amplia variedad climática, lo que permite la existencia de gran biodiversidad, en donde podemos encontrar cuatro macrobioclimas principales: tropical, mediterráneo, templado y antiboreal. Esto hace que se pueda cultivar en él numerosas y diversas especies vegetales (Moreira-Muñoz y cols., 2017).

Para esta investigación, nos hemos centrado principalmente en dos especies de plantas presentes en la zona central. *Schinus molle* es un árbol comúnmente presente en la zona norte y centro de nuestro país, tiene gran distribución tanto en zonas urbanas como rurales y tiene bajas exigencias de cultivo, por lo que es de fácil acceso para su estudio y futuras aplicaciones (Ruiz y cols., 2009). La segunda especie de este estudio es *Thymus vulgaris*, tiene su origen en Europa y también es tolerante a diversas condiciones de cultivo, lo que favorece su posible disponibilidad (Stahl-Biskup y Venskutonis 2012). Ambas especies han mostrado diversos usos farmacológicos, entre los cuales se encuentra su poder antitumoral que será desarrollado a continuación.

### ***Schinus areira***

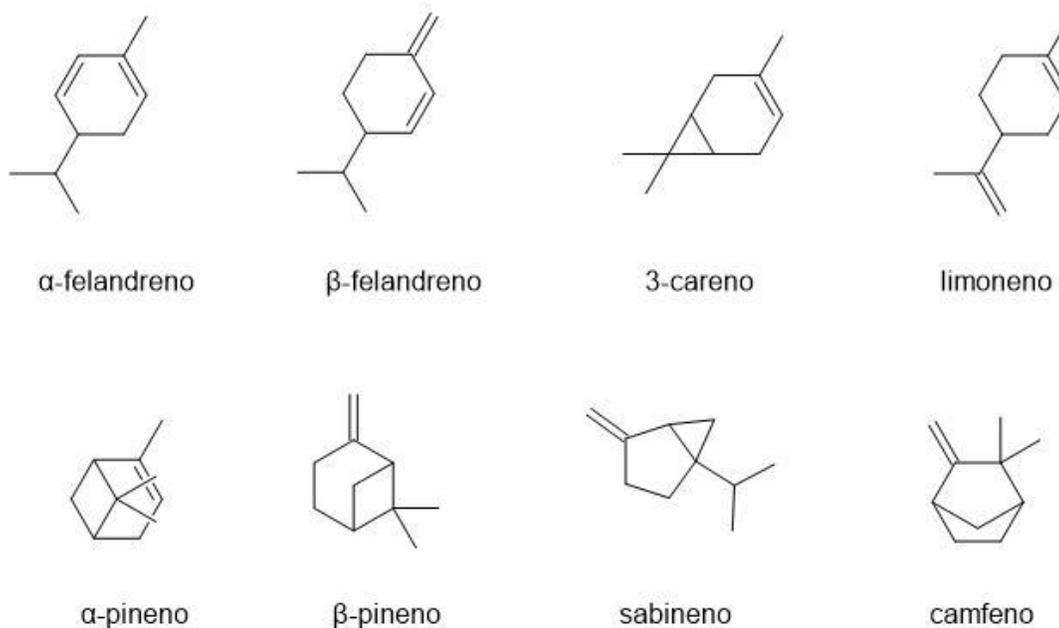
*Schinus areira* L. sinónimo de *Schinus molle* L. var. *areira* (L.) D.C. es comúnmente llamado pimienta, molle, aguaribay, terebinto, entre otros. Es un árbol perenne de la familia *Anacardiaceae* nativa de Sudamérica que se puede encontrar desde México hasta el norte de Argentina y Chile (Ruiz y cols., 2009). La taxonomía del género *S. areira* ha sido estudiada por diferentes autores, siendo clasificado por algunos como una subespecie de *Schinus molle*, sin embargo, Martínez-Crovetto (1963) evidenció mediante un análisis biométrico que *Schinus molle* y *Schinus areira* son especies diferentes. Dentro de este marco, en los estudios actuales no existe gran rigurosidad en la identificación y diferenciación de ambas especies, por lo tanto, a continuación, se presentan evidencias de estudios tanto de *S. areira* como de *S. molle*.

Los componentes del aceite esencial de *S. areira* tienen amplia variación química, incluso cuando proviene de árboles en zonas geográficas cercanas, que puede ser atribuida a factores genéticos y/o medioambientales (Gomes y cols., 2013; Cutro y cols., 2019), además es necesario tomar en cuenta de qué parte de la planta está siendo extraída la muestra, ya que AEs de hojas y frutos han mostrado composiciones diferentes (Descamps y cols., 2011; Sánchez y cols., 2012; Sampietro y cols., 2014). Estudios que han analizado aceites de *S. areira* extraídos de hojas y ramas, mediante extracción con agua, muestran como componentes principales: limoneno,  $\alpha$ -felandreno, sabineno,  $\alpha$ -pineno, canfeno y cariofileno. Esta información se ha detallado en la Tabla 2.

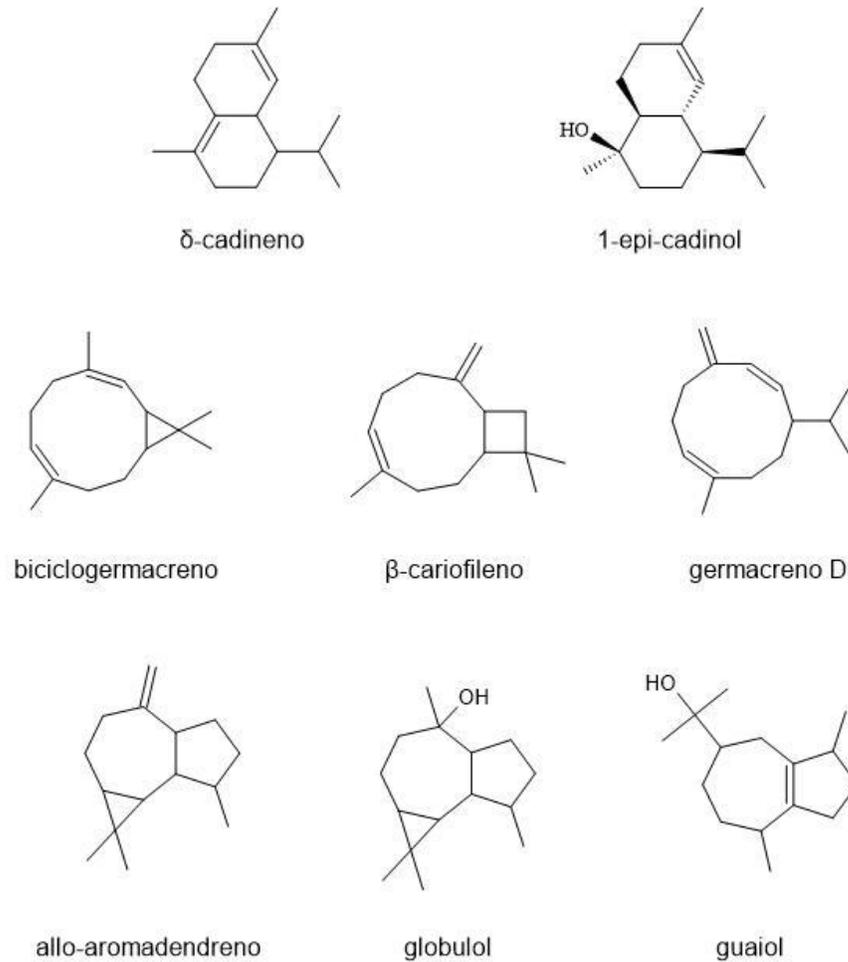
Esta amplia variabilidad podría implicar efectos biológicos diversos dependiendo qué compuestos químicos estén presentes y en qué proporción, por lo que se hace pertinente estudiarlo con mayor detalle.

Estudio	País	Muestra	Componentes principales
(Murray y cols., 2005)	Argentina	Hojas, frutos y ramas	Limoneno (28,6%) $\alpha$ -felandreno (10,1%) Sabineno (9,2%)
(Murray y cols., 2009)	Argentina	Hojas	$\beta$ -felandreno (17,2%) $\alpha$ -felandreno (16,2%) Canfeno (6,3%)
(Descamps y cols., 2011)	Argentina	Hojas	$\alpha$ -felandreno (28,5 %) 3-careno (20,8%) Canfeno (10,9%)
(Bigliani y cols., 2012)	Argentina	Hojas y flores	$\alpha$ -pineno (13,8%) Limoneno (12,8%) Canfeno (12,6%)
(Sampietro y cols., 2014)	Argentina	Hojas	Sabineno (26%) Biciclogermacreno (14,5%) E-citral (6,7%)
(Solis-Quispe y cols., 2016)	Perú	Hojas	$\alpha$ -felandreno (18,2%) Limoneno (9,4%) Canfeno (8,4%)
(Cutro y cols., 2019)	Argentina	Hojas	1-epi-cadinol (34,6%) $\delta$ -cadineno (15,5%) Aloaromadendreno (6,9%)

**Tabla 2.** Principales componentes de AEs de hojas de *Schinus areira* en estudios previos



**Figura 1.** Principales monoterpénos descritos en aceites esenciales de *S. areira*



**Figura 2.** Principales sesquiterpenos descritos en aceites esenciales de *S. areira*

En la medicina tradicional, *S. molle* y *S. areira* han sido utilizados de diferentes maneras para múltiples usos medicinales (Celaya y cols., 2014; Steider y cols., 2015). Aunque la evidencia científica de sus usos farmacológicos no es muy abundante, se ha demostrado una fuerte acción antibacterial (Cutro y cols. 2019), antioxidante (Murray y cols., 2009; Salazar-Aranda y cols., 2011) y antifúngica (Martins y cols., 2014).

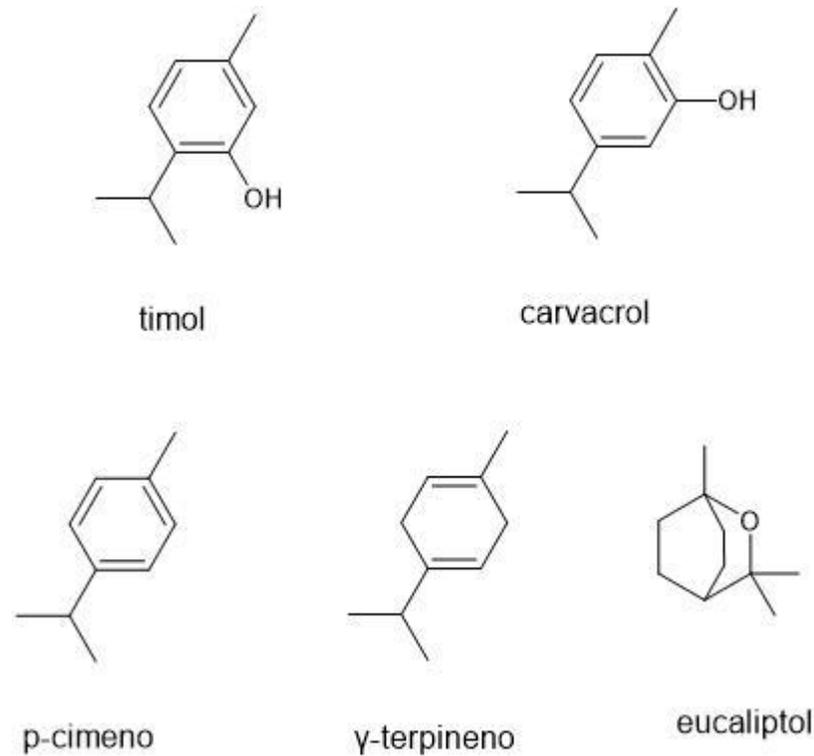
La evidencia de la capacidad antitumoral en ambas especies es escasa, además las metodologías y los componentes de los AEs son variados. En el caso de *Schinus Molle*, Ruffa y cols. (2002) estudiaron el efecto citotóxico del aceite de *S. molle* en líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HB 8065–Hep G2) mostrando que es efectivo y dosis dependiente. Diaz y cols. (2008) estudiaron la actividad citotóxica

del AE de hojas de *Schinus molle* en diferentes líneas celulares tumorales, el extracto con el que trabajaron tenía como principal componente  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -pineno. Descubrieron que las líneas celulares de cáncer de mama (EMT6) y leucemia humana (K562) son altamente sensibles a la acción citotóxica del AE, proponen la apoptosis como principal mecanismo de acción y la necrosis como mecanismo secundario. Otro estudio es el de Bendaoud y cols. (2010) donde estudiaron la actividad anticancerígena de *Schinus molle* y *Schinus terebinthifolius* en cáncer de mama (MCF-7). El aceite utilizado fue de frutos de ambas plantas y su componente principal fue  $\alpha$ -felandreno. Ambos aceites presentaron eficacia, pero la acción de *Schinus terebinthifolius* fue mayor.

En el caso de *Schinus areira*, estudios sobre su capacidad antioxidante lo han propuesto como un buen candidato para estudios de sus efectos antitumorales (Murray y cols., 2005; Rodriguez y cols., 2019). Su efecto citotóxico en líneas de cáncer de mama fue evaluado por Solis-Quispe y cols. en el 2016, demostrando su citotoxicidad en periodos de incubación de 24 horas ( $IC_{50} = 104.6 \mu\text{g/ mL}$ ). El aceite esencial extraído para dicho estudio tenía como componentes principales monoterpenos (58%), sin embargo, proponen que su efecto citotóxico podría estar relacionado a sesquiterpenos presentes en menor concentración, esto debido a que otros sesquiterpenos como cariofileno y  $\alpha$ -cadinol han presentado resultados efectivos en estudios previos contra líneas celulares de cáncer de colon y mamas.

### ***Thymus vulgaris***

Más conocido como tomillo, es una hierba perenne de la familia *Lamiáceae* con origen en el sur de Europa y comúnmente cultivada en climas templados y subtropicales, aunque es posible cultivarlo en cualquier clima mientras la temperatura media esté entre 7-20° C. Tolera suelos pobres y secas una vez establecido (Stahl-Biskup y Venskutonis 2012). La composición química del aceite esencial de *T. vulgaris* puede variar debido a diferentes factores que pueden ser propios de la planta, por la metodología de extracción del aceite esencial y también puede variar la identificación de sus componentes según la metodología y equipos utilizados. Sin embargo, en general se ha descrito que contiene como compuestos principales monoterpenos (Do Nascimento y cols., 2020). Estudios que han analizado la composición de AEs obtenidos por extracción de agua, han descrito que sus principales componentes son monoterpenos oxigenados, entre ellos el timol es el más frecuente, representando desde un 33% (Sertel y cols., 2011) hasta un 72% (Lee y cols., 2005) de la composición de los aceites estudiados. Otros monoterpenos frecuentemente descritos son el carvacrol, cimeno y  $\gamma$ -terpineno, que son parte de la misma ruta biosintética que el timol, según lo expuesto por Taherian y cols. (2009). Además de los ya nombrados, otros compuestos encontrados comúnmente son el eucaliptol, linalool y cariofileno. Como se ha mencionado antes, la composición de un AE puede ser diverso, incluso dentro de una misma especie, debido a diferentes factores que pueden afectar a cada planta, por lo que la actividad biológica de cada uno puede variar dependiendo de los componentes químicos presentes y su proporción.



**Figura 3.** Principales monoterpenos que componen los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*

El tomillo ha sido utilizado por siglos como agente saborizante, hierba culinaria y hierba medicinal. Existe registro desde el siglo I d.C. en el Mediterráneo, en el trabajo de Dioscórides, de su uso terapéutico (Stahl-Biskup y Venskutonis, 2012). Su uso farmacológico ha sido ampliamente estudiado, teniendo múltiples acciones: bacteriostático (Hosseinzadeh y cols., 2015), antioxidante (Lee y cols., 2005), cicatrizante (Costa y cols., 2019), antifúngico (Salehi y cols., 2018), expectorante (Stahl-Biskup y Venskutonis, 2012), antiviral (Nolkemper y cols., 2006), entre otros. Respecto a su acción antitumoral es menor la evidencia disponible. En el año 2010, Zu y cols. analizaron los efectos citotóxicos de diez aceites esenciales en células de carcinoma de pulmón (A549), carcinoma de próstata (PC-3) y cáncer mamario (MCF-7), el aceite esencial de tomillo fue el que tuvo mayor efecto en estas líneas celulares. Posteriormente, Sertel y cols. (2011) evidenciaron que el aceite esencial de tomillo, en concentraciones sub tóxicas, estimula la proliferación y viabilidad en células de carcinoma espinocelular oral (UMSCC1), sin embargo, en mayores concentraciones se encontró efecto citotóxico dosis-dependiente.

Las líneas celulares relacionadas al cáncer espiño celular oral son variadas y muestran diferentes mutaciones en su genoma, esto genera que tengan diferentes mecanismos de oncogénesis y su respuesta a los tratamientos también sea variable (Martin y cols., 2014). A pesar de que ya se ha visto la efectividad del AE de tomillo en líneas UMSCC1, la línea celular CAL-27 proviene de una ubicación anatómica diferente y su resistencia a agentes quimioterapéuticos las hace realmente relevantes a la hora investigar tomando en cuenta la alta mortalidad y recurrencia de la enfermedad.

## HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de *Schinus areira* y *Thymus vulgaris* tienen efecto citotóxico en líneas celulares de carcinoma espino celular oral.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica en células de carcinoma espinocelular de los aceites esenciales de *Schinus areira* y *Thymus vulgaris*.

### Objetivos específicos

1. Extracción de los aceites esenciales de *Schinus areira* y *Thymus vulgaris*.
2. Caracterización de los aceites esenciales de *Schinus areira* y *Thymus vulgaris*.
3. Determinación de la actividad citotóxica de los aceites esenciales de *Schinus areira* y *Thymus vulgaris* en células de carcinoma espinocelular oral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro*.

### Metodología:

#### 1. Recolección de muestras:

- A. Se recolectaron hojas de *Schinus areira* de individuos ubicados en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (33°25'22.5"S 70°39'08.0"W) comuna de Independencia, región Metropolitana, Santiago, Chile, durante la primavera 2019 y verano del año 2019-2020. La identificación de los individuos fue realizada por Alicia Marticorena, bióloga y botánica de la Universidad de Concepción, curadora del herbario de dicha universidad y participante del Comité de Clasificación de Especies Silvestres de la Comisión Nacional del Medio Ambiente, Gobierno de Chile.
- B. Se recolectaron hojas y ramas de *Thymus vulgaris* de individuos cosechados en la localidad de Chicauma (33°14'06.5"S 70°55'22.1"W) Lampa, región Metropolitana, Chile, durante la primavera 2019 y verano del año 2019-2020.

#### 2. Obtención de aceites esenciales

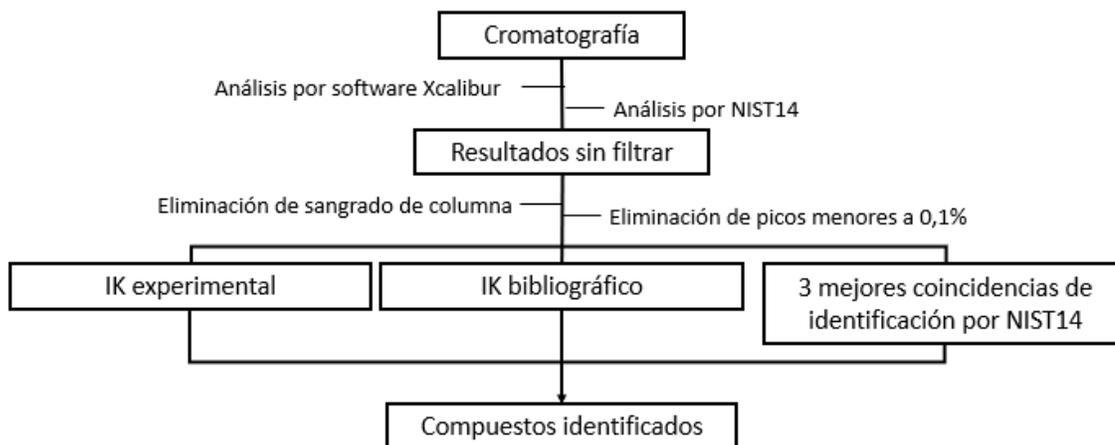
- A. Se extrajo aceite esencial de hojas de *Schinus areira* y de hojas y ramas de *Thymus vulgaris*, utilizando el método de extracción por arrastre de vapor ilustrado en el Esquema 1. Se empleó un matraz esférico de dos bocas donde se dispusieron 500 g aproximados de muestra (máxima capacidad del matraz). Para la producción de vapor se utilizó un segundo matraz esférico con agua destilada, que fue llevada a ebullición mediante manta de calentamiento durante 3 horas. Utilizando un tubo refrigerante, el vapor fue condensado, recolectado y el resultado fue decantado para separar el aceite esencial del agua mediante un embudo Gibson y posteriormente almacenado a -20°C.

### 3. Caracterización química de los aceites esenciales

A. Se realizó análisis y caracterización de los aceites obtenidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS) en equipo Thermos® Scientific TRACE 1300 con columna capilar de 60mx0,25mmx0,25um acoplado a espectrómetro de masas Thermos® TSQ 8000 Evo con analizador de triple cuádruplo.

GC		MS	
Gas	Helio	T° de transferencia de línea	250°C
Modo	Splitless	T° de fuente de iones	200°C
Temperatura del inyector	250°C	Modo de ionización	IE
Tiempo de splitless	5 min	Tiempo de inicio	11 min
Split Flow	50mL/min	Polaridad del ion	Positiva
Flujo de columna	1,2 mL/min	Rango de masa	40-400 m/z
Modo de flujo	Constante	Tiempo de escaneo	0,2 s
Columna	Rtx-5MS 60 m x 0,25mm x 0,25 µm		

**Tabla 3.** Parámetros utilizados en el análisis de los AEs



IK= Índice de Kovats

**Esquema 2.** Procedimiento seguido para el análisis de los resultados obtenidos para cada uno de los AEs

#### 4. Evaluación del efecto citotóxico en células de carcinoma espino celular

A. Cultivo celular: Los ensayos se realizaron utilizando células de carcinoma escamoso de lengua humano CAL-27 resistentes a cisplatino (ATCC® CRL-2095™), adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC).

Cultivadas en placas de 90mm, en medio DMEM alto en glucosa (Biological Industries SKU11-055-1N), con piruvato (Gibco SKU11360-070), solución antibiótica penicilina-estreptomina (Biological Industries SKU03-031-1B) y antimicótico anfotericina B (Biological Industries SKU 03-028-1B) suplementado con 10% suero fetal bovino (Biological Industries SKU04-127-1A), filtrado. Las células se incubaron a 37°C, el medio fue cambiado cada 2-3 días hasta alcanzar la confluencia de las células. Las células fueron soltadas de las placas con Tripsina-EDTA 0.05% (Biological Industries SKU03-050-1<sup>a</sup>) por 5 min, contadas en cámara de Neubauer por exclusión de azul de tripán, y sembradas en placas de 96 pocillos ( $3 \times 10^5$  células/mL) con 100  $\mu$ L de medio DMEM alto en glucosa.

B. Tratamiento: 24 horas después de la siembra, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de aceites esenciales diluidos en 1  $\mu$ L de DMSO (Sigma-Aldrich SKU D4540-1L). Se utilizaron concentraciones desde 18.08  $\mu$ g/mL a 33.9  $\mu$ g/mL de aceite esencial de *S. areira* en las placas incubadas por 48 y 72 horas. En el caso del aceite esencial de *T. vulgaris*, se utilizaron concentraciones desde 45  $\mu$ g/mL a 97.5  $\mu$ g/mL en las placas incubadas por 48hr y concentraciones desde 37.5  $\mu$ g/mL a 90  $\mu$ g/mL en las placas incubadas por 72 horas. Dichas concentraciones fueron determinadas por experimentaciones previas para encontrar el rango de dosificación que son efectivas para nuestras condiciones experimentales.

C. Evaluación de citotoxicidad mediante ensayo MMT: Posterior al tiempo de incubación, se removió el medio de las placas y se agregó 100 $\mu$ L de MTT (Molecular Probes™ M6494) 0.5 mg/mL y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Después, se removió el MTT y se agregaron 40  $\mu$ L/pocillo de solución de disolución (DMSO), se mantuvieron las placas en agitación por 15 min a

1500rpm y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Tecan Infinite® F50.

Esta técnica proporciona una estimación cuantitativa del número de células vivas en un cultivo, basándose en la capacidad que poseen las células viables de reducir el compuesto MTT amarillo (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) en formazán violeta, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Dentro de cada placa de 96 pocillos se realizó una columna de pocillos de control negativo, adicionando a estas células 1 µL DMSO por pocillo y sometidos al mismo ensayo de MTT descrito. El efecto citotóxico fue expresado como el porcentaje de viabilidad de las células tratadas en comparación con las células no tratadas (control) según la siguiente formula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \text{Absorbancia de células tratadas} / \text{absorbancia de células control} \times 100$$

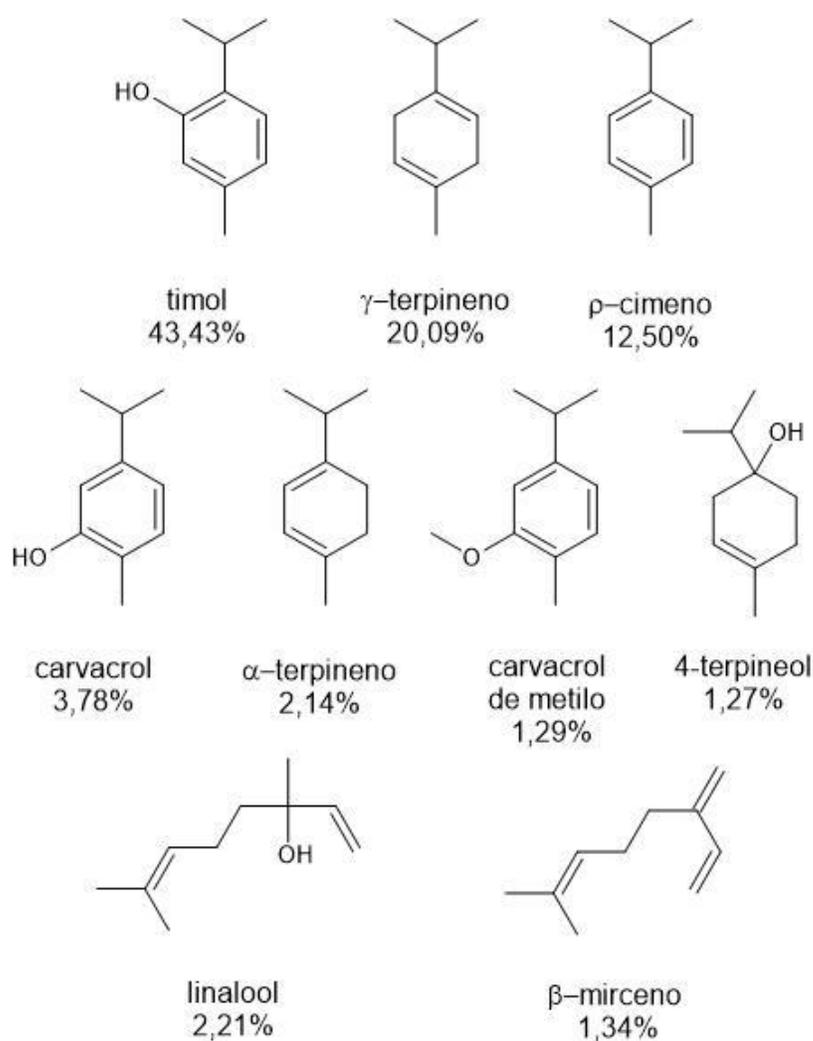
Se realizaron 7 experimentos independientes y en triplicado.

- D. Análisis de datos: El análisis estadístico fue realizado en el software Graphpad Prism mediante regresión no lineal ajustada a ensayo de dosis respuesta, y de aquí se obtuvo el valor de IC<sub>50</sub> (concentración del fármaco necesaria para lograr un 50% de la viabilidad celular).

## RESULTADOS

### Caracterización del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo)

La composición del aceite esencial obtenido de hojas y ramas frescas de *Thymus vulgaris* se presenta en la Tabla 4. Los componentes principales fueron: timol (43,43%),  $\gamma$ -terpineno (20,09%), *p*-cimeno (12,50%), cariofileno (4,51%), carvacrol (3,78%), linalool (2,21%),  $\alpha$ -terpineno (2,14%),  $\beta$ -mirceno (1,34%), carvacrol de metilo (1,29%) y 4-terpineol (1,27%).



**Figura 4.** Principales monoterpenos del aceite esencial de hojas y ramas de *Thymus vulgaris*

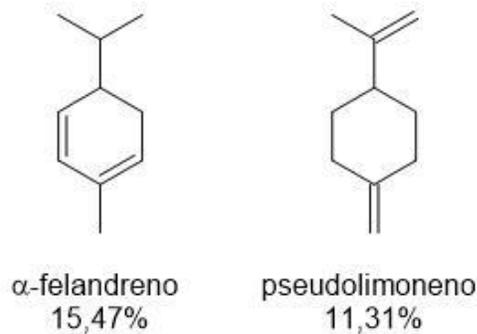
	Compuesto	Cas #	RT	IK exp	%	Identificación
1	S/I		16,42	941,64	0,63	RI, MS
2	S/I		18,29	992,79	0,51	RI, MS
3	$\beta$ -mirceno	123-35-3	18,67	1003,29	1,34	RI, MS
4	$\alpha$ -terpineno	99-86-5	19,66	1034,97	2,14	RI, MS, Co-I
5	$\rho$ -cimeno	99-87-6	19,94	1043,64	12,50	RI, MS, Co-I
6	eucaliptol	470-82-6	20,23	1052,49	0,38	RI, MS, Co-I
7	$\gamma$ -terpineno	99-85-4	21,10	1078,31	20,09	RI, MS
8	4-tujanol	546-79-2	21,41	1087,25	0,85	RI, MS
9	linalool	78-70-6	22,34	1116,53	2,21	RI, MS
10	endo-borneol	507-70-0	24,68	1192,33	0,80	RI, MS
11	4-terpineol	562-74-3	24,98	1201,85	1,27	RI, MS, Co-I
12	$\alpha$ -terpineol	98-55-5	25,37	1216,16	0,28	RI, MS
13	carvacrol de metilo	6379-73-3	26,81	1267,17	1,29	RI, MS
14	timol	89-83-8	28,21	1316,68	43,43	RI, MS
15	carvacrol	499-75-2	28,45	1325,88	3,78	RI, MS
16	$\beta$ -bourboneno	5208-59-3	31,04	1423,73	0,13	RI, MS
17	cariofileno	87-44-5	32,00	1462,05	4,51	RI, MS
18	S/I		32,87	1495,80	0,57	RI, MS
19	$\gamma$ -muuroleno	30021-74-0	33,33	1515,15	0,16	RI, MS
20	germacreno-D	23986-74-5	33,54	1524,16	1,14	RI, MS
21	$\alpha$ -muuroleno	31983-22-9	33,90	1539,49	0,25	RI, MS
22	$\gamma$ -cadineno	39029-41-9	34,30	1556,32	0,26	RI, MS
23	cadineno	523-47-7	34,45	1562,58	0,53	RI, MS
24	spatuleno	6750-60-3	35,95	1627,91	0,19	RI, MS
25	óxido de cariofileno	1139-30-6	36,14	1636,80	0,29	RI, MS
26	dehidroxi- isocalamendiol	1005276-30-1	37,22	1686,46	0,09	RI, MS
27	$\alpha$ -cadinol	481-34-5	37,66	1706,42	0,27	RI, MS
28	2,6-diisopropilnaftaleno	24157-81-1	39,20	1775,54	0,11	RI, MS

S/I: sin identificar. RT=tiempo de retención, IK exp= Índice de Kovats experimental, IR= índice de retención, MS= Espectro de masa, Co-I= Co-inyección de estándar.

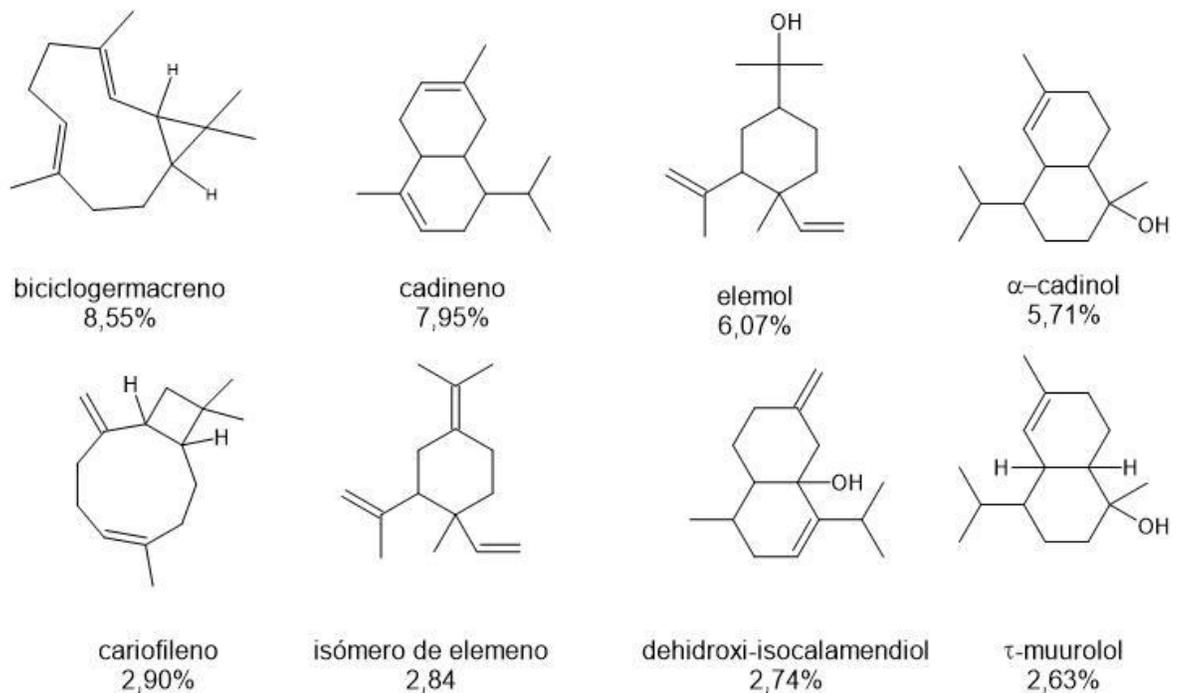
**Tabla 4.** Composición del aceite esencial de hojas y ramas de *Thymus vulgaris*

### Caracterización del aceite esencial de *Schinus areira*

La composición del aceite esencial obtenido de hojas de *Schinus areira* se presenta la Tabla 5. Los componentes principales fueron:  $\alpha$ -felandreno (15,49%), pseudolimoneno (11,31%), biciclogermacreno (8,55), cadineno (7,95%), elemol (6,07%),  $\alpha$ -cadinol (5,71%), cariofileno (2,9%), isómero de elemeno (2,84%), dehidroxi-isocalamendiol (2,63%) y  $\tau$ -muurolol (2,63%).



**Figura 5.** Principales monoterpenos del aceite esencial de *Schinus areira*



**Figura 6:** Principales sesquiterpenos del aceite esencial de *Schinus areira*

	Compuesto	Cas #	RT	IK exp	%	Identificación
1	$\alpha$ -pineno	80-56-8	16,70	949,66	1,08	RI, MS
2	$\beta$ -mirceno	123-35-3	18,67	1003,29	1,22	RI, MS
3	$\alpha$ -felandreno	99-83-2	19,25	1022,05	15,47	RI, MS
4	$\rho$ -cimeno	99-87-6	19,93	1043,33	2,17	RI, MS
5	pseudolimoneno	499-97-8	20,13	1049,45	11,31	RI, MS
6	isómero de elemeno	3242-08-8	29,61	1369,27	2,84	RI, MS
7	$\alpha$ -copaeno	3856-25-5	30,73	1411,10	0,20	RI, MS
8	$\beta$ -elemeno	515-13-9	31,09	1425,76	2,38	RI, MS
9	$\alpha$ -gurjuneno	489-40-7	31,69	1449,80	1,56	RI, MS
10	cariofileno	87-44-5	31,99	1461,66	2,90	RI, MS
11	aromandendreno	489-39-4	32,49	1481,17	0,70	RI, MS
12	$\alpha$ -humuleno	6753-98-6	32,87	1495,80	1,34	RI, MS
13	S/I		33,07	1503,91	0,79	RI, MS
14	$\gamma$ -muuroleno	30021-74-0	33,33	1515,15	1,16	RI, MS
15	germacreno-D	23986-74-5	33,53	1523,74	0,25	RI, MS
16	S/I		33,76	1533,55	0,85	RI, MS
17	biciclogermacreno	24703-35-3	33,94	1541,18	8,55	RI, MS
18	$\gamma$ -cadineno	39029-41-9	34,30	1556,32	1,95	RI, MS
19	cadineno	523-47-7	34,46	1563,00	7,95	RI, MS
20	$\alpha$ -cadineno	24406-05-1	34,85	1579,15	0,58	RI, MS
21	elemol	639-99-6	35,10	1589,41	6,07	RI, MS
22	S/I		35,39	1601,43	0,58	RI, MS
23	palustrol	5986-49-2	35,75	1618,50	0,65	RI, MS
24	germacreno D-4-ol	198991-79-6	35,85	1623,21	0,52	RI, MS
25	spatulol	6750-60-3	35,95	1627,91	1,97	RI, MS
26	globulol	51371-47-2	36,13	1636,33	0,62	RI, MS
27	viridiflorol	552-02-3	36,33	1645,64	1,11	RI, MS
28	eudesmol	473-15-4	36,52	1654,44	0,02	RI, MS
29	S/I		36,63	1659,51	6,63	RI, MS
30	di-epi-1,10-cubenol	73365-77-2	37,07	1679,65	0,21	RI, MS
31	$\gamma$ -eudesmol	1209-71-8	37,17	1684,19	1,79	RI, MS
32	dehidroxi-isocalamendiol	1005276-30-1	37,22	1686,46	2,74	RI, MS
33	$\tau$ -muurolol	19912-62-0	37,36	1692,79	2,63	RI, MS
34	$\delta$ -cadinol	19435-97-3	37,44	1696,40	0,41	RI, MS
35	$\alpha$ -cadinol	481-34-5	37,67	1706,88	5,71	RI, MS
36	S/I		37,93	1718,74	0,80	RI, MS
37	cadaleno	483-78-3	38,13	1727,81	0,28	RI, MS
38	isocalamenediol	25330-21-6	39,80	1802,01	2,00	RI, MS

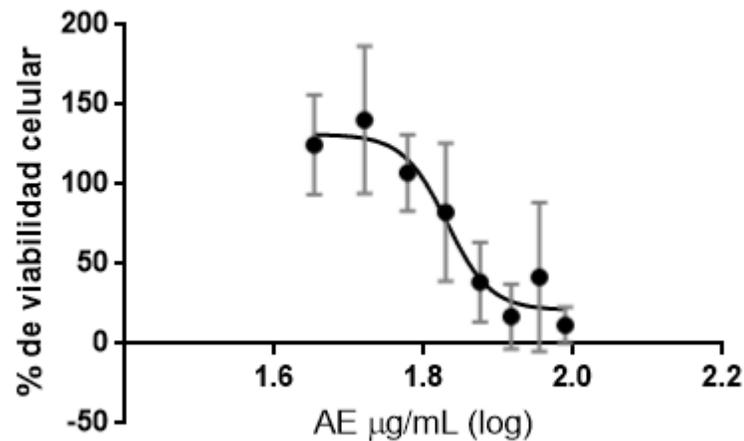
S/I: sin identificar. RT=tiempo de retención, IK exp= Índice de Kovats experimental, RI= índice de retención, MS= Espectro de masa, Co-I= Co-inyección de estándar.

**Tabla 5.** Componentes del aceite esencial de hojas de *Schinus areira*

### Citotoxicidad celular en líneas celulares CAL-27 del aceite de *Thymus vulgaris* (tomillo)

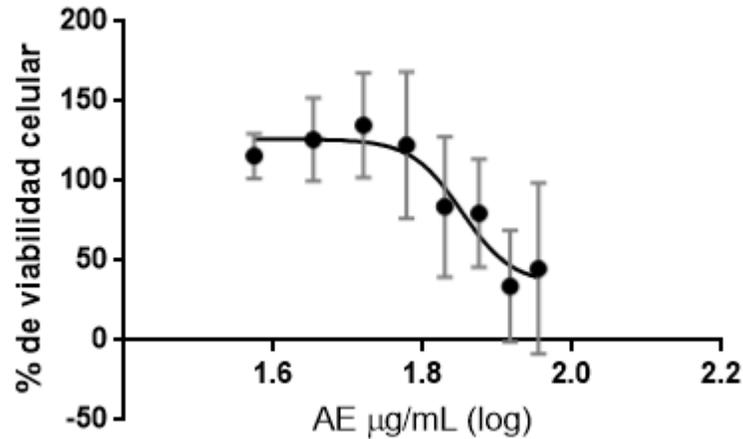
La citotoxicidad del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en líneas celulares de cáncer espino celular oral CAL-27, que fue determinada mediante ensayo MTT, es mostrada en los gráficos 1 y 2. El experimento se realizó en siete pasajes distintos de líneas CAL-27, en triplicado cada vez. Las curvas de dosis-respuesta muestran un leve aumento en la viabilidad en comparación con el control en las dosis sub tóxicas, con un *peak* a la concentración de 52,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AE tanto a las 48 h (140%) como a las 72 h (135%). Luego muestran un descenso de la viabilidad logrando un efecto máximo cercano al 10% de viabilidad celular a las 48 h y al 45% a las 72 h. El  $\text{IC}_{50}$  para estas curvas fue de 67,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 48 h y 70,32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 72 h.

#### Efecto del AE de *T. vulgaris* (tomillo) sobre células CAL-27



**Gráfico 1.** Efecto del AE de *Thymus vulgaris* en la viabilidad de células CAL-27 tratadas con concentraciones desde 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 97.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 48 h mediante ensayo MTT.

### Efecto del AE de *T. vulgaris* (tomillo) sobre células CAL-27

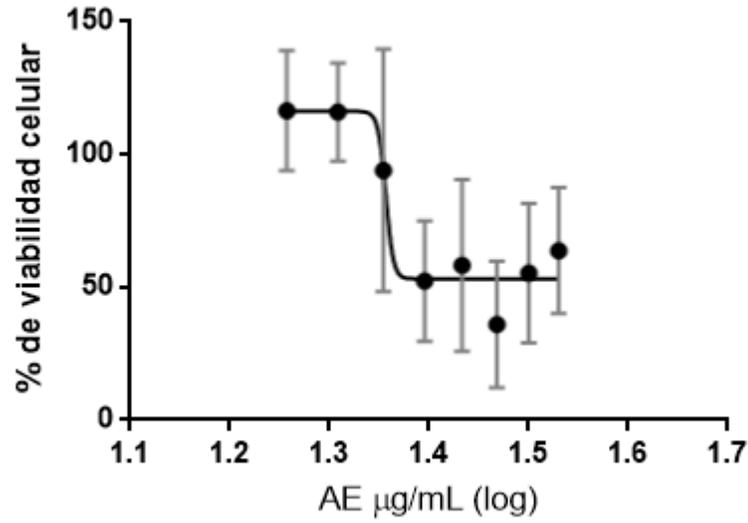


**Gráfico 2.** Efecto del AE de *Thymus vulgaris* en la viabilidad de células CAL-27 tratadas con concentraciones desde 37,5  $\mu\text{g/mL}$  a 90  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h mediante ensayo MTT.

### Citotoxicidad celular en líneas CAL-27 del aceite de *Schinus areira* (pimiento)

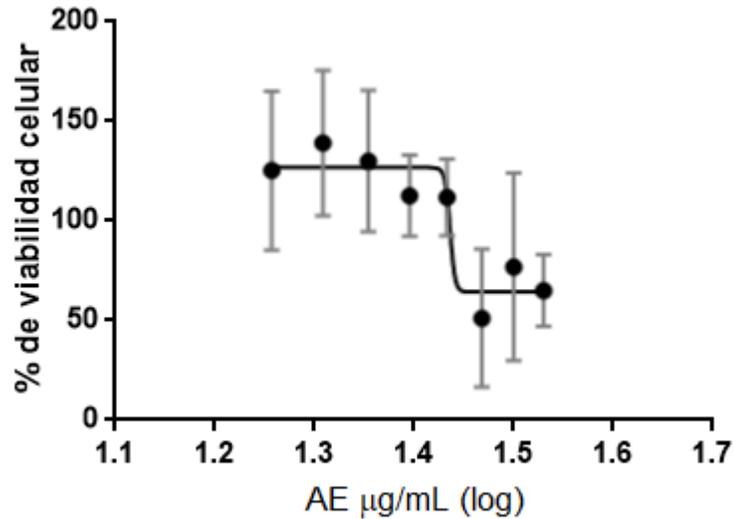
La citotoxicidad del aceite esencial de *Schinus areira* en líneas celulares de cáncer espinoso celular oral CAL-27, que fue determinada mediante ensayo MTT, es mostrada en los gráficos 3 y 4. El experimento se realizó en siete pasajes distintos de líneas CAL-27, en triplicado cada vez. Las curvas de dosis-respuesta muestran un leve aumento en la viabilidad (135%) en comparación con el control (100%) en las dosis sub tóxicas y luego un rápido descenso de la viabilidad celular logrando un efecto máximo cercano al 65% de viabilidad en ambos tiempos. El  $\text{IC}_{50}$  para estas curvas fue de 23,47  $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h y 26,95  $\mu\text{g/mL}$  a las 72 h.

### Efecto del AE de *S. areira* (pimiento) sobre células CAL-27



**Gráfico 3.** Efecto del AE de *Schinus areira* en la viabilidad de células CAL-27 tratadas con concentraciones desde 18,08 µg/mL a 33,09 µg/mL por 48 h mediante ensayo MTT.

### Efecto del AE de *S. areira* (pimiento) sobre células CAL-27



**Gráfico 4.** Efecto del AE de *Schinus areira* en la viabilidad de células CAL-27 tratadas con concentraciones desde 18,08 µg/mL a 33,09 µg/mL por 72 h mediante ensayo MTT.

## DISCUSIÓN

Las muestras de plantas utilizadas en este estudio fueron recolectadas en las temporadas de primavera 2019 y verano 2019-2020 en la región Metropolitana de Santiago de Chile (el tomillo en la comuna de Lampa y el pimiento en la comuna de Independencia). El tomillo fue recolectado antes de su etapa de floración y los individuos de pimiento poseían pocos frutos (por ello los frutos no fueron incluidos dentro de las muestras para este estudio). En la zona centro de Chile se ha experimentado una fuerte sequía desde el año 2010, en la que han disminuido las precipitaciones en un 30%, lo que puede generar cambios en la vegetación que requiere adaptarse a estas nuevas condiciones climáticas y al estrés generado por déficit de humedad. Las respuestas de la vegetación ante una baja disponibilidad hídrica suelen estar relacionadas a sus regulaciones estomáticas, ajuste osmótico y defensas antioxidantes (Orrego, 2021). Corell y cols. (2009) demostraron que la composición de AEs obtenidos de *Salvia officinalis* y *S. lavandulifolia subsp. vellerea* sufrieron alteraciones al ser expuestas a déficit hídrico, además de variar su composición dependiendo de la estación del año en que fueron recolectadas. Por lo tanto, esto podría explicar diferencias en la composición de nuestros AEs en relación a estudios anteriores similares, sería interesante estudiar de qué manera afecta la baja disponibilidad hídrica a las especies *Schinus areira* y *Thymus vulgaris*, evaluar otros factores que podrían generar una diferencia en sus componentes y si aquello modifica su actividad citotóxica.

El vehículo utilizado para este estudio fue DMSO, fue aplicado como control a la misma concentración que la utilizada en las células tratadas con AEs (1% v/v), para que cualquier efecto citotóxico producido por el vehículo no interfiriese con la evaluación de la acción de cada aceite esencial. La aplicación de DMSO puede provocar citotoxicidad en diferentes grados en distintas líneas celulares, por lo que se recomienda usar a bajas concentraciones (Nguyeny cols., 2020).

Respecto a la caracterización de los AEs, en el aceite extraído de *T. vulgaris* se lograron identificar 25 compuestos que corresponden al 98,29% del aceite. De la composición total, 90,36% corresponden a monoterpenos (36,07% monoterpenos

oxigenados) y 7,93% corresponden a sesquiterpenos (véase Tabla 6). El timol fue el compuesto más abundante del aceite esencial de tomillo utilizado, ocupando el 43,43% del total. Este tipo de composición también se ha visto en otros aceites esenciales de tomillo, según lo presentado por Do Nascimento y cols. (2020) en los estudios internacionales analizados, el timol fluctúa entre un 18,11% a un 55,44% del total de los aceites. Es común que se presente un componente principal y le sigan porcentualmente otros componentes de la misma vía biosintética como son el carvacrol,  $\rho$ -cimeno y  $\gamma$ -terpineno (Taherian y cols., 2009). Lemos y cols. (2017) encontraron una composición similar en AEs de plantas cosechadas en Brasil, donde el timol,  $\rho$ -cimeno y  $\gamma$ -terpineno componen más del 70% de los AEs estudiados. Según sus análisis, el AE de tomillo tiene mayor efectividad antioxidante y antibacteriana cuando la concentración de timol es mayor y varía en las diferentes estaciones del año, teniendo un *peak* en octubre (primavera). Y si bien el timol y carvacrol fueron los únicos componentes con actividad antioxidante, es más efectivo el aceite en su totalidad comparado con los compuestos testeados por separado, lo que sugiere una actividad sinérgica entre sus componentes.

	AE de <i>S. areira</i>	AE de <i>T. vulgaris</i>
Monoterpenos hidrocarburos	31,25%	36,07%
Monoterpenos oxigenados	0%	54,29%
Monoterpenos totales	31,25%	90,36%
Sesquiterpenos hidrocarburos	32,60%	7,09%
Sesquiterpenos oxigenados	26,50 %	0,84%
Sesquiterpenos totales	59,10%	7,93%
Total de compuestos identificados	90,35%	98,29%

**Tabla 6.** Resumen de tipo de compuestos agrupados por familia en AE de *Schinus areira* y *Thymus vulgaris*

Según lo visto en nuestra experimentación (véase sección Resultados) y expresado en las curvas de dosis-respuesta, el AE de tomillo recolectado provoca un aumento en la proliferación de las líneas CAL-27 a concentraciones subtóxicas y luego un efecto citotóxico dosis-dependiente, corroborando lo observado en el estudio de Sertel y cols. (2011) que también obtuvieron este tipo de comportamiento de las líneas UMSCC1. Esto se podría explicar debido a que el timol tiene efecto antioxidante/pro-oxidante, es decir, su efecto puede ser protector o lesivo dependiendo de su concentración, el tipo de célula y el tiempo aplicado (Ozkan y

Erdogan, 2012). El efecto citotóxico de nuestro aceite muestra un IC<sub>50</sub> mucho menor que el observado en el estudio de Sertel y cols. , 67,5 µg/mL versus 369,55 µg/mL, respectivamente, esto podría deberse a la mayor proporción de timol que se encuentra en nuestro aceite, similar a lo observado por Lemos y cols. (2017) respecto al efecto antioxidante; puede deberse también al efecto de componentes que se encuentran en menor proporción como β-cariofileno (4.51%) que ha demostrado anteriormente efectividad citotóxica en líneas tumorales (Dahham y cols., 2015).

La mayor eficacia en nuestras experimentaciones fue obtenida por el AE de tomillo a las 48 h, logrando reducir la viabilidad celular a un 10% aproximado, en comparación al 65 % logrado con el aceite de *S areira*. Sin embargo, el efecto máximo de nuestro AE es menor que el observado en las líneas UMSCC1 del estudio de Sertel y cols., esto podría responder a susceptibilidades propias de cada línea celular. Las células UMSCC1 también pertenecen a carcinoma espinocelular oral, pero provienen de piso de boca y son sensibles a tratamientos de quimioterapia convencionales; en cambio CAL-27 proviene de un tumor de lengua y son resistentes a sulfato de vindesina, cisplatino y actinomicina D, lo que demuestra que posee mecanismos para resistir estos efectos citotóxicos (Gioani y cols., 1988; Gosepath y cols., 2008) . Se nos hace relevante recalcar la importancia de continuar con investigaciones en líneas celulares provenientes de lengua, ya que los carcinomas espinocelulares en esta localización son los que presentan mayor incidencia y mortalidad en Chile (De La Fuente y cols., 2016).

El timol, particularmente, ha sido estudiado y demostrado su efecto citotóxico al reducir la viabilidad en células de cáncer de pulmón, cáncer hepático, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer cérvico uterino, cáncer de vejiga, carcinoma de laringe (Hep), carcinoma espino celular oral (CAL27, SCC4, SCC9), cáncer de próstata, melanoma, glioma, mastocitomas, osteosarcoma y leucemia (Alves Sampaio y cols., 2021). De La Chapa y cols. (2018) proponen que en líneas celulares CAL-27 el efecto citotóxico ocurre por apoptosis mediada por disfunción mitocondrial, ya que altera los potenciales de membrana mitocondriales (lo mismo demostraron en células Hela), aumenta la liberación de radicales libres y posteriormente se produce apoptosis.

En cuanto a la seguridad del AE de tomillo, Rojas-Armas y cols., 2019 realizaron un estudio *in vivo* en ratas albinas Holtzman con AE de tomillo extraído de plantas ubicadas en Lima, Perú. Dicho AE contenía principalmente timol (46,47%),  $\gamma$ -terpineno (20,27%) y  $p$ -cimeno (15,8%), composición muy similar a nuestro aceite estudiado. Determinaron que, administrado por vía oral, es moderadamente tóxico en test agudos (2000 mg/kg) y en los test de 28 días no existen efectos secundarios a concentraciones menores de 250 mg/kg/día. En el estudio *in vivo* de De la Chapa y cols. (2018), aplicaron timol a concentraciones de 640  $\mu$ g/mL mediante inyecciones a lesiones tumorales y demostraron que no tiene efectos adversos en tejidos no tumorales adyacentes a las lesiones. Lo que indicaría que es seguro trabajar con las dosis citotóxicas encontradas para CAL-27 (<100  $\mu$ g/mL).

Por otra parte, podemos analizar la caracterización del AE extraído de *S. areira*. Se lograron identificar 33 compuestos que corresponden al 90,35% del aceite. A diferencia del AE de tomillo, encontramos principalmente presencia de sesquiterpenos (Véase Tabla 6). De la composición total, 28 de los 33 compuestos fueron identificados como sesquiterpenos, lo que corresponde al 59,1% del aceite, la mitad de ellos son oxigenados (26,5% del total) y 31,25% del total corresponden a monoterpenos no oxigenados.  $\alpha$ -felandreno fue el compuesto más abundante del aceite esencial de pimiento utilizado, representando el 15,47% del total, los compuestos que le siguen son pseudolimoneno (11,31%) y biciclogermacreno (8,55%). Este tipo de composición no se observó en otros estudios previos. Otras investigaciones que han trabajado con aceites con proporciones similares de  $\alpha$ -felandreno y que también ha sido su componente principal, es la de Solis-Quispe y cols. (2016) de Perú y la de Cutro y cols. (2019) de Argentina, sin embargo, en ambos casos dichos aceites estaban compuestos principalmente por monoterpenos. Esta mayor variabilidad en la composición del AE de *S. areira*, podría hablar de una mayor susceptibilidad a los factores medioambientales a los que se ve expuesto cada individuo.

De acuerdo a lo observado en nuestra experimentación (véase sección resultados) y expresado en las curvas de dosis-respuesta, el AE de pimiento recolectado provoca un leve aumento en la proliferación de las líneas CAL-27 a concentraciones subtóxicas llegando al 135%, este fenómeno no ha sido documentado, pero podría

tener relación con su efecto antioxidante como ocurre con el AE de *T. vulgaris*. Luego de ello, produce un rápido descenso en la viabilidad y, por tanto, un efecto citotóxico dosis-dependiente, similar a lo ocurrido en el estudio de Solis-Quispe y cols. (2015) quienes también observaron un efecto citotóxico en células de cáncer de mamas. Bendaoud y cols. (2010) asimismo analizaron el efecto citotóxico en líneas de cáncer de mama de AEs de *S. molle* y *S. Terebinthiphlious*, lo interesante de su investigación es que sugieren que existe una relación entre la capacidad antitumoral con el contenido de sesquiterpenos del AE, ya que en su investigación el aceite más efectivo fue el que contenía mayor proporción de sesquiterpenos, aunque no fueran estos su componente principal, además que el efecto citotóxico de algunos sesquiterpenos ha sido descrito en otros modelos celulares por lo que sería de interés investigar cuál es la susceptibilidad de células de cáncer oral a estos componentes. En cuanto a la eficacia de los esquemas propuestos por las investigaciones citadas, no queda claro el efecto máximo logrado. En el caso de nuestro aceite, hubo una disminución de la viabilidad máxima del 65%, aunque no presenta una buena efectividad en este aspecto, sería relevante investigar sobre otros mecanismos que puedan tener efecto sinérgico en la acción antitumoral como pueden ser: impedir la proliferación, migración e invasión celular, sensibilización a otros fármacos o efectos sistémicos como potenciador del sistema inmune.

No se encontraron estudios que analizaran la capacidad antitumoral de  $\alpha$ -felandreno o pseudolimoneno de manera aislada. En el caso del biciclogermacreno, existe un estudio que habla de su actividad antitumoral. Grecco y cols. (2015) estudiaron el efecto del AE de *Nectandra neucantha* que tenía como componente principal biciclogermacreno y determinaron que existía actividad citotóxica en 6 líneas tumorales y que biciclogermacreno podría ser responsable, al menos en parte, de esa acción.

El mecanismo por el cual el AE de pimiento logra su efecto citotóxico no se ha determinado. El estudio de Diaz y cols. (2008) propone la apoptosis como mecanismo principal y la necrosis como mecanismo secundario, sin embargo el aceite empleado para este estudio dista en composición al nuestro, ya que contenía principalmente  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno, por lo que se requieren más investigaciones

para determinar si aceites con una composición mayor de  $\alpha$ -felandreno y sesquiterpenos compartirían los mismo mecanismos de acción propuestos.

Acerca de la seguridad del AE de *S. areira*, Rodríguez y cols. (2019) comprobaron que el AE extraído en Argentina, con componente principal  $\alpha$ -felandreno, es anti mutagénico y antioxidante y proponen como principal compuesto activo en estas acciones al globulol debido a su acción protectora del ADN frente a factores lesivos. En su estudio *in vivo* del 2014, Rossetti observó que el AE de *S. areira* extraído de plantas ubicadas en Argentina (componente más abundante  $\alpha$ -pineno), podría participar en los mecanismos moduladores de la inflamación, poseer efectos alérgenos inespecíficos e inducir hipotensión en conejos *in vivo* normotensos y ejercer un efecto inotrópico negativo en ratones *ex vivo* tratados con el AE de *S. areira* (300 mg/kg intravenoso). A nivel dérmico, Bras y cols. (2011) observaron sólo eritema local, de leve a moderado, al aplicar extracto hexánico de *S. areira* en ratas, que se resolvieron dentro de 48 h. Por todo lo anterior, las dosis requeridas de AE de *S. areira* para producir un efecto antitumoral se encuentran en un rango seguro. Sin embargo, aun hace falta continuar con la experimentación ya que la respuesta en animales y humanos no es idéntica y la variación en la composición podría también modificar las consecuencias de su utilización.

En relación a los tiempos de aplicación de los tratamientos, podemos observar en ambos AEs que la eficiencia de los aceites no mostró mejoría al dejarlos actuar por mayor tiempo. Ambos IC<sub>50</sub> fueron mayores a las 72 h en comparación con los tratamientos de 48 h, esto indica que su efecto no es dependiente del tiempo de aplicación, por lo que se sugiere investigar la reacción de las células CAL-27 a tratamientos de menor duración y determinar así cuál es el esquema terapéutico más efectivo.

## CONCLUSIÓN

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* extraído para este estudio tiene como principal componente monoterpenos y entre ellos, el más abundante fue timol (43,43%), le siguen  $\gamma$ -terpineno (20,09%), p-cimeno (12,5%) y cariofileno (4,51%). Este tipo de composición es similar a la descrita anteriormente en otros estudios.

El aceite esencial de *Schinus areira* extraído para este estudio contiene principalmente sesquiterpenos (59,10%) y los compuestos más abundantes fueron  $\alpha$ -felandreno (15,47%), pseudolimoneno (11,31%) y biciclogermacreno (8,55%). No se había descrito con anterioridad un AE con una proporción de sesquiterpenos tan alta.

Las diferencias en la composición de los aceites estudiados con los descritos en otras investigaciones pueden deberse a cambios en las condiciones medioambientales en las que se desarrolla cada planta, en este sentido cobra relevancia evaluar los efectos de la sequía que afecta a la zona centro de Chile.

Ambos aceites esenciales lograron efectos citotóxicos en líneas celulares CAL-27, el más eficaz fue el AE de *Thymus vulgaris* a las 48 h que logró una disminución de la viabilidad celular cercana al 10% y el menor IC<sub>50</sub> (67.5  $\mu$ g/mL). La mayor efectividad del aceite de *T vulgaris*, puede deberse a su alta proporción de timol que ha demostrado, en estudios anteriores, actividad citotóxica en numerosas líneas tumorales. Se requiere aún mayor investigación sobre la actividad de cada uno de los compuestos y qué factores determinan su mayor o menor expresión.

A dosis sub tóxicas, ambos aceites aumentaron levemente la viabilidad celular. Este fenómeno requiere de mayor investigación, pero podría estar relacionado a la capacidad antioxidante de cada aceite.

El AE de *Thymus vulgaris* puede ser un buen candidato para futuros tratamientos contra cáncer espinocelular oral, por lo que se debe continuar estudiando sus efectos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves Sampaio, Laeza, Lícia Tairiny Santos Pina, Mairim Russo Serafini, Débora Dos Santos Tavares, Adriana Gibara Guimarães. 2021. "Antitumor Effects of Carvacrol and Thymol: A Systematic Review." *Frontiers in Pharmacology* 12(July). doi: 10.3389/fphar.2021.702487.
- Aziz, Zarith Asyikin Abdul, Akil Ahmad, Siti Hamidah Mohd Setapar, Alptug Karakucuk, Muhammad Mohsin Azim, David Lokhat y cols. 2018. "Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review." *Current Drug Metabolism* 19(13):1100–1110. doi: 10.2174/1389200219666180723144850.
- Bayala, Bagora, Imael H. N. Bassole, Riccardo Scifo, Charlemagne Gnoula, Laurent Morel, Jean Marc A. Lobaccaro y cols. 2014. "Anticancer Activity of Essential Oils and Their Chemical Components - A Review." *American Journal of Cancer Research* 4(6):591–607.
- Bendaoud, Houcine, Mehrez Romdhane, Jean Pierre Souchard, Sylvie Cazaux, Jalloul Bouajila. 2010. "Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of Schinus Molle L. and Schinus Terebinthifolius Raddi Berries Essential Oils." *Journal of Food Science* 75(6):466–72. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x.
- Bigliani, María C., Víctor Rossetti, Ezequiel Grondona, Silvina Lo Presti, Patricia M. Paglini, Virginia Rivero y cols. 2012. "Chemical Compositions and Properties of Schinus Areira L. Essential Oil on Airway Inflammation and Cardiovascular System of Mice and Rabbits." *Food and Chemical Toxicology* 50(7):2282–88. doi: 10.1016/j.fct.2012.04.025.
- Borquez, Pablo, Felipe Capdeville, Arturo Madrid, Marcelo Veloso, Marcela Carcamo. 2011. "Sobrevida Global y Por Estadios de 137 Pacientes Con Cáncer Intraoral: Experiencia Del Instituto Nacional Del Cáncer." *Revista Chilena de Cirugía* 63(4):351–55. doi: 10.4067/S0718-40262011000400003.
- Bras, Cristina, Fernanda Gumilar, Norberto Gandini, Alejandra Minetti, Adriana

- Ferrero. 2011. "Evaluation of the Acute Dermal Exposure of the Ethanolic and Hexanic Extracts from Leaves of Schinus Molle Var. Areira L. in Rats." *Journal of Ethnopharmacology* 137(3):1450–56. doi: 10.1016/j.jep.2011.08.036.
- Bulsara, Vishal M., Helen V. Worthington, Anne Marie Glenny, Janet E. Clarkson, David I. Conway, Michaelina Macluskey. 2018. "Interventions for the Treatment of Oral and Oropharyngeal Cancers: Surgical Treatment." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018(12). doi: 10.1002/14651858.CD006205.pub4.
- De Cássia da Silveira e Sá, Rita, Tamires Cardoso Lima, Flávio Rogério da Nóbrega, Anna Emmanuela Medeiros de Brito, Damião Pergentino de Sousa. 2017. "Analgesic-like Activity of Essential Oil Constituents: An Update." *International Journal of Molecular Sciences* 18(12). doi: 10.3390/ijms18122392.
- Celaya, Liliana S., Marta H. Alabrudzińska, Ana C. Molina, Carmen I. Viturro, Silvia Moreno. 2014. "The Inhibition of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus by Essential Oils Isolated from Leaves and Fruits of Schinus Areira Depending on Their Chemical Compositions." *Acta Biochimica Polonica* 61(1):41–46. doi: 10.18388/abp.2014\_1921.
- Corell, Mireia. 2009. "Efecto Del Estrés Hídrico En La Fisiología, Producción y Calidad de Los Aceites Esenciales En Salvia Officinalis y S. Lavandulifolia Subsp. Vellerea. [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla] Repositorio institucional del Consejo Superior de Investigaciones Científicas SCIC
- Costa, Michelle Fonseca, Aimée Obolari Durço, Thallita Kelly Rabelo, Rosana de Souza Siqueira Barreto, Adriana Gibara Guimarães. 2019. "Effects of Carvacrol, Thymol and Essential Oils Containing Such Monoterpenes on Wound Healing: A Systematic Review." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 71(2):141–55.
- Cutro, Andrea C., M. Victoria Castelli, Silvia N. López, Manuel A. Rosales, Axel Hollmann, Sergio A. Rodriguez. 2019. "Chemical Composition of Schinus Areira Essential Oil and Antimicrobial Action against Staphylococcus Aureus." *Natural Product Research*. doi: 10.1080/14786419.2019.1675065.
- Dahham, Saad S., Yasser M. Tabana, Muhammad A. Iqbal, Mohamed B. K.

- Ahamed, Mohammed O. Ezzat, Aman S. A. Majid y cols. 2015. "The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria Crassna*." *Molecules* 20(7):11808–29. doi: 10.3390/molecules200711808.
- Descamps, Lilian R., Carolina Sánchez Chopa, Adriana A. Ferrero. 2011. "Activity of *Schinus Areira* (Anacardiaceae) Essential Oils against the Grain Storage Pest *Tribolium Castaneum*." *Natural Product Communications* 6(6):887–91.
- Diaz, Cecilia, Silvia Quesada, Oscar Brenes, Gilda Aguilar, José F. Ciccio. 2008. "Chemical Composition of *Schinus Molle* Essential Oil and Its Cytotoxic Activity on Tumour Cell Lines." *Natural Product Research* 22(17):1521–34. doi: 10.1080/14786410701848154.
- Edge, Stephen; Byrd, David; Compton, Carolyn; Fritz, April; Greene, Frederick; Trotti, Andy. 2010. *AJCC Cancer Staging Manual*. Vol. 304. 7a ed. editada por A. Edge, Stephen; Byrd, David; Compton, Carolyn; Fritz, April; Greene, Frederick; Trotti. USA: Springer.
- Edris, Amr E. 2007. "Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review." *Phytother. Res* 21(2):308–23. doi: 10.1002/ptr.
- García-García, V., Martínez A. Bascones. 2009. "Cáncer Oral: Puesta Al Día." *Avances En Odontoestomatología* 25(5):239–48. doi: 10.4321/s0213-12852009000500002.
- Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E y cols.1988. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol*;24(9):1445-55. doi: 10.1016/0277-5379(88)90335-5. PMID: 3181269.
- Gomes, V., G. Agostini, F. Agostini, A. C. Atti dos Santos, M. Rossato. 2013. "Variation in the Essential Oils Composition in Brazilian Populations of *Schinus Molle* L. (Anacardiaceae)." *Biochemical Systematics and Ecology* 48:222–27. doi: 10.1016/j.bse.2013.01.003.

- Gosepath EM, Eckstein N, Hamacher A, Servan K, von Jonquieres G, Lage H y cols. 2008. Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. *Int J Cancer*. 1;123(9):2013-9. doi: 10.1002/ijc.23721. PMID: 18688867.
- Grecco, Simone Dos S., Euder Glendes A. Martins, Natália Girola, Carlos R. De Figueiredo, Alisson L. Matsuo, Marisi G. Soares y cols. 2015. "Chemical Composition and in Vitro Cytotoxic Effects of the Essential Oil from *Nectandra Leucantha* Leaves." *Pharmaceutical Biology* 53(1):133–37. doi: 10.3109/13880209.2014.912238.
- Hosseinzadeh, Saleh, Azizollah Jafarikukhdan, Ahmadreza Hosseini, Raham Armand. 2015. "The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review" *International Journal of Clinical Medicine* 06(09):635–42. doi: 10.4236/ijcm.2015.69084.
- Institute, National Cancer. 2021. "Oral Cavity, Oropharyngeal, Hypopharyngeal, and Laryngeal Cancer Prevention (PDQ®)–Patient Version." Recuperado en Enero 2021 de <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/oral-prevention-pdq>.
- International Agency for Research on Cancer. 2020. "Global Cancer Observatory: Cancer Today." *GLOBOCAN*. Recuperado en Enero 2021 de <https://gco.iarc.fr/today>.
- Kademani, Deepak. 2007. "Oral Cancer." *Mayo Clinic Proceedings* 82(7):878–87. doi: 10.4065/82.7.878.
- De La Chapa, Jorge J., Prajjal Kanti Singha, Debbie R. Lee, Cara B. Gonzales. 2018. "Thymol Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma Growth via Mitochondria-Mediated Apoptosis." *Journal of Oral Pathology & Medicine* 47(7):674–82. doi: 10.1111/jop.12735.
- De La Fuente Ávila, Matteo, Mauricio Díaz Jara, Benjamín Martínez Rondanelli. 2016. "Carcinoma Espinocelular de Lengua: Estudio de Sobrevida a 5 Años." *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* 9(1):74–78.

doi: 10.1016/j.piro.2016.01.001.

- De Lavor, Érica Martins, Antônio Wilton Cavalcante Fernandes, Roxana Braga de Andrade Teles, Ana Ediléia Barbosa Pereira Leal, Raimundo Gonçalves de Oliveira, Mariana Gama e Silva y cols. 2018. "Essential Oils and Their Major Compounds in the Treatment of Chronic Inflammation: A Review of Antioxidant Potential in Preclinical Studies and Molecular Mechanisms." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018. doi: 10.1155/2018/6468593.
- Lee, Seung Joo, Katumi Umano, Takayuki Shibamoto, Kwang Geun Lee. 2005. "Identification of Volatile Components in Basil (*Ocimum Basilicum* L.) and Thyme Leaves (*Thymus Vulgaris* L.) and Their Antioxidant Properties." *Food Chemistry* 91(1):131–37. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.05.056.
- Lemos, Mayara Fumiere, Henrique Poltronieri Pacheco, Aline Cristina Guimarães, Marcio Fronza, Denise Coutinho Endringer, Rodrigo Scherer. 2017. "Seasonal Variation Affects the Composition and Antibacterial and Antioxidant Activities of *Thymus Vulgaris*." *Industrial Crops and Products* 95:543–48. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.11.008.
- Marcia Avello, L., F. Isabel Cisternas. 2010. "Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile." *Revista Médica de Chile* 138(10):1288–93. doi: 10.4067/s0034-98872010001100014.
- Martin, Daniel, Martin C. Abba, Alfredo A. Molinolo, Lynn Vitale-Cross, Zhiyong Wang, Moraima Zaida y cols. 2014. "The Head and Neck Cancer Cell Oncogenome: A Platform for the Development of Precision Molecular Therapies." *Oncotarget* 5(19):8906–23. doi: 10.18632/oncotarget.2417.
- Martínez-Crovetto, Raúl. 1963. "Estudio taxonomico biometrico de *Scinus molle* y *Schinus areira* (anacardiaceae)." *Bonplandia* 1(3):225. doi: 10.30972/bon.133942.
- Martins, Maria Do Rosário, Silvia Arantes, Fátima Candeias, Maria Teresa Tinoco, Júlio Cruz-Morais. 2014. "Antioxidant, Antimicrobial and Toxicological Properties of *Schinus Molle* L. Essential Oils." *Journal of Ethnopharmacology* 151(1):485–92. doi: 10.1016/j.jep.2013.10.063.

- Ministerio de Salud. 2012. "Primer Informe de Registros Poblacionales de Cáncer de Chile. Quinquenio 2003-2007." *Ministerio de Salud* 178.
- Moghaddam, Mohammad, Leila Mehdizadeh. 2017. "Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents." Pp. 379–419 in *Soft Chemistry and Food Fermentation*. Elsevier.
- Moreira-Muñoz, Andres; Morales, Vanezza; Muñoz, Mélica. 2017. "Biogeografía de La Flora Endémica de Chile." *Revista Del Jardín Botánico Chagual* 15:30–42.
- Murray, Ana P., María A. Frontera, María A. Tomas, María C. Mulet. 2005. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry Study of the Essential Oils of Schinus Longifolia (Lindl.) Speg., Schinus Fasciculata (Griseb.) I. M. Johnst., and Schinus Areira L.* Vol. 60.
- Murray, Ana P., Maria S. Vela Gurovic, Silvana A. Rodriguez, María G. Murray, Adriana A. Ferrero. 2009. "Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Schinus Areira L. and Schinus Longifolia (Lindl.) Speg." *Natural Product Communications* 4(6):873–76.
- Do Nascimento, Lidiane Diniz, Angelo Antônio Barbosa de Moraes, Kauê Santana da Costa, João Marcos Pereira Galúcio, Paulo Sérgio Taube, Cristiane Maria Leal Costa y cols. 2020. "Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications." *Biomolecules* 10(7):1–37.
- Nguyen, Sinh Truong, Huyen Thi-Lam Nguyen, Kiet Dinh Truong. 2020. "Comparative Cytotoxic Effects of Methanol, Ethanol and DMSO on Human Cancer Cell Lines." *Biomedical Research and Therapy* 7(7):3855–59. doi: 10.15419/bmrat.v7i7.614.
- Nolkemper, Silke, Jürgen Reichling, Florian Stintzing, Reinhold Carle, Paul Schnitzler. 2006. "Antiviral Effect of Aqueous Extracts from Species of the Lamiaceae Family against Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in Vitro." *Planta Medica* 72(15):1378–82. doi: 10.1055/s-2006-951719.

- Organization, World Health. 2021. "Cancer Overview." Recuperado en Enero 2021 de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Orrego Cancino, Ricardo. 2021. "Análisis de Las Respuestas de Distintas Coberturas Arbóreas (Nativas y Forestales) a Epidodios de Sequía En La Zona Centro - Sur de Chile (34°S - 39°S) Durante Los Años 2000 - 2018." Universidad de Chile.
- Owen, Lucy, Katie Laird. 2018. "Synchronous Application of Antibiotics and Essential Oils: Dual Mechanisms of Action as a Potential Solution to Antibiotic Resistance." *Critical Reviews in Microbiology* 44(4):414–35. doi: 10.1080/1040841X.2018.1423616.
- Ozkan, Aysun, Ayse Erdogan. 2012. "A Comparative Study of the Antioxidant/Prooxidant Effects of Carvacrol and Thymol at Various Concentrations on Membrane and DNA of Parental and Drug Resistant H1299 Cells." *Natural Product Communications* 7(12):1557–60. doi: 10.1177/1934578x1200701201.
- Pezzuto, Francesca, Luigi Buonaguro, Francesco Caponigro, Franco Ionna, Noemy Starita, Clorinda Annunziata y cols. 2015. "Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies." *Oncology* 89(3):125–36. doi: 10.1159/000381717.
- Ramirez, Valeria, Pamela Vásquez-Rozas, Pamela Ramírez-Eyraud. 2015. "Mortalidad Por Cáncer Oral y Faríngeo En Chile, Años 2002-2010." *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* 8(2):133–38. doi: 10.1016/j.piro.2015.02.015.
- Riera S, Paula, Benjamín Martínez R. 2005. "Morbilidad y Mortalidad Por Cáncer Oral y Faríngeo En Chile." *Revista Médica de Chile* 133(5):555–63. doi: 10.4067/S0034-98872005000500007.
- Rivera, Cesar. 2015. "The Challenge of the State of Susceptibility to Oral Cancer." *Journal Oral Of Research* 4(1):8–9. doi: 10.17126/joralres.2015.003.

- Rodriguez, Silvana, Rosa Ana Sueiro, Ana Paula Murray, José Manuel Leiro. 2019. "Bioactive Sesquiterpene Obtained from Schinus Areira L. (Anacardiaceae) Essential Oil." *Proceedings* 41(1):85. doi: 10.3390/ecsoc-23-06649.
- Rojas-Armas, Juan, Jorge Arroyo-Acevedo, Manuel Ortiz-Sánchez, Miriam Palomino-Pacheco, Américo Castro-Luna, Norma Ramos-Cevallos y cols. 2019. "Acute and Repeated 28-Day Oral Dose Toxicity Studies of Thymus Vulgaris L. Essential Oil in Rats." *Toxicological Research* 35(3):225–32. doi: 10.5487/TR.2019.35.3.225.
- Rossetti, Víctor Luis. 2014. "Efectos Morfométricos, Bioquímicos y Cardiovasculares Del Aceite Asencial y de Terpenos Hidrocarburos de Schinus Areira (Anacardiaceae ) En Un Modelo Experimental En Animales." Universidad Nacional de Cordoba.
- Ruffa, M. J., G. Ferraro, M. L. Wagner, M. L. Calcagno, R. H. Campos, L. Cavallaro. 2002. "Cytotoxic Effect of Argentine Medicinal Plant Extracts on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line." *Journal of Ethnopharmacology* 79(3):335–39. doi: 10.1016/S0378-8741(01)00400-7.
- Ruiz, Ana, M. Mercado, M. Guantay, G. Ponessa. 2009. "Morfoanatomía y Arquitectura Foliar de Schinus Areira (Anacardiaceae)." *Lilloa* 46(1–2):137–46.
- Russo, Rossella, Maria Tiziana Corasaniti, Giacinto Bagetta, Luigi Antonio Morrone. 2015. "Exploitation of Cytotoxicity of Some Essential Oils for Translation in Cancer Therapy." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015.
- Salazar-Aranda, Ricardo, Luis Alejandro Pérez-López, Joel López-Arroyo, Blanca Alicia Alanís-Garza, Noemi Walksman de Torres. 2011. "Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011. doi: 10.1093/ecam/nep127.
- Salehi, Bahare, Abhay Prakash Mishra, Ila Shukla, Mehdi Sharifi-Rad, María del Mar Contreras, Antonio Segura-Carretero y cols. 2018. "Thymol, Thyme, and Other Plant Sources: Health and Potential Uses." *Phytotherapy Research* 32(9):1688–1706.

- Sampietro, Diego A., María Melina E. Belizan, Zareath P. Terán Baptista, Marta A. Vattuone, Cesar A. N. Catalán. 2014. "Essential Oils from Schinus Species of Northwest Argentina: Composition and Antifungal Activity." *Natural Product Communications* 9(7). doi: 10.1177/1934578X1400900734.
- Sánchez Chopa, Carolina, Lilian R. Descamps. 2012. "Composition and Biological Activity of Essential Oils against *Metopolophium dirhodum* (Hemiptera: Aphididae) Cereal Crop Pest." *Pest Management Science* 68(11):1492–1500. doi: 10.1002/ps.3334.
- Schnitzler, Paul. 2019. "Essential Oils for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections." *Chemotherapy* 64(1):1–7. doi: 10.1159/000501062.
- Schoonhoven, Louis; van Loon, Joop; Dicke, Marcel. 2005. *Insect-Plant Biology*. 2nd ed. Oxford UK: Oxford University Press.
- Sertel, Serkan; Eichhorn, Tolga; Plinkkert, Peter K; Efferth, Thomas. 2011. "Cytotoxicity of Thymus Vulgaris Essential Oil toward Human Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma." *Anticancer Research* 31(81):81–88.
- Solis-Quispe, Leoncio, Ciro Tomaylla-Cruz, Yolanda Callo-Choquelvica, Anita Solís-Quispe, Idania Rodeiro, Ivones Hernández y cols. 2016. "Chemical Composition, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Essential Oil from Schinus Areira L. and Minthostachys Spicata (Benth.) Epl. Grown in Cuzco, Peru." *Journal of Essential Oil Research* 28(3):234–40. doi: 10.1080/10412905.2015.1120691.
- Stahl-Biskup, Elisabeth, Rimantas P. Venskutonis. 2012. "Thyme." Pp. 499–525 in *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*. Vol. 1. Elsevier Inc.
- Steider, Paulo, Doleski Muhd, Camila, Helena Ferreira Cuelho, Juliana Calil Brondani, C. Melânia, Palermo Manfron. 2015. *Chemical Composition of the Schinus Molle L. Essential Oil and Their Biological Activities Composición Química y Actividad Biológica Del Aceite Esencial de Schinus Molle L*. Vol. 49.
- Taherian, Abbas Ali, Mahdi Babaei, Abbas Ali Vafaei, Morteza Jarrahi, Majid Jadidi, Hassan Sadeghi. 2009. "Antinociceptive Effects of Hydroalcoholic Extract of

Thymus Vulgaris.” *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22(1):83–89.

Yao, Mike, Joel B. Epstein, Bijal J. Modi, Kristen B. Pytynia, Arno J. Mundt, Lawrence E. Feldman. 2007. “Current Surgical Treatment of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.” *Oral Oncology* 43(3):213–23. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.04.013.

Zanoni, Daniella Karassawa, Snehal G. Patel, Jatin P. Shah. 2019. “Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications.” *Current Oncology Reports* 21(6):52. doi: 10.1007/s11912-019-0799-x.

Zu, Yuangang, Huimin Yu, Lu Liang, Yujie Fu, Thomas Efferth, Xia Liu, Nan Wu. 2010. “Activities of Ten Essential Oils towards *Propionibacterium Acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells.” *Molecules* 15(5):3200–3210. doi: 10.3390/molecules15053200.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### **Sistema de estadificación tumor, nodo, metástasis (TNM) del American Joint Committee on Cancer (AJCC) para cáncer oral. (7ª edición, 2010)**

##### Definición de tumor primario (T)

TX	Tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor < 2cm y profundidad de invasión < 5mm
T2	Tumor < 2cm y profundidad de invasión > 5mm y < 10mm o Tumor > 2cm y < 4cm y profundidad de invasión < 10mm
T3	Tumor > 4cm o cualquier tumor con profundidad de invasión > 10mm
T4	T4a El tumor invade solo las estructuras adyacentes (p. Ej., A través del hueso cortical de la mandíbula o el maxilar, o involucra el seno maxilar o la piel de la cara)
	T4b El tumor invade el espacio masticatorio, las placas pterigoideas o la base del cráneo y / o recubre la arteria carótida interna

*Actualizado a los cambios realizados para cáncer oral en la 8va edición (Zanoni y cols., 2019)*

##### Nodos linfáticos regionales

NX	nodos linfáticos no pueden ser evaluados
N0	Sin metástasis en nodos linfáticos regionales
N1	Metástasis en un único nodo linfático ipsilateral, ≤ 3cm en su máxima extensión
N2	N2a Metástasis en un único nodo linfático ipsilateral, > 3cm < 6cm en su máxima extensión o
	N2b Metástasis en múltiples nodos linfáticos ipsilaterales, <6 cm en su máxima extensión
	N2c Metástasis en nodos linfáticos bilaterales o contralaterales, < 6cm en su máxima extensión
N3	Metástasis en un nodo linfático >6cm en su máxima extensión

Metástasis distante (M)

M0	Sin metástasis distante
M1	Con metástasis distante

Etapa anatómica / grupos de prognosis

Etapa 0	Tis	N0	M0
Etapa I	T1	N0	M0
Etapa II	T2	N0	M0
Etapa III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
Etapa IVA	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
Etapa IVB	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
	cualquier T	N3	M0
	T4b	cualquier N	M0
Etapa IVC	cualquier T	cualquier N	M1