

CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *CLINOPODIUM REVOLUTUM* Y ESTUDIO COMPUTACIONAL DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS CONTRA EL CÁNCER

Reneé Isabel Huamán Quispe^a, Jesús Alvarado-Huayhuaz^a, Karina dos Santos Machado^b, Ana Valderrama Negrón^{*a}

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La búsqueda de compuestos bioactivos contra el cáncer se potencia con el uso de herramientas computacionales y las bases de datos moleculares. *Clinopodium Revolutum* (CR) es una planta empleada con fines medicinales en diferentes males, sin embargo, hacen falta mayores estudios científicos que respalden su bioactividad. En este trabajo se analizan 55 componentes en el aceite esencial de CR, identificados por GC-MS, con potencial actividad anticancerígena mediante estudios *in silico*. Se seleccionaron los receptores de fármacos anticancerígenos, como la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK-2), la quinasa dependiente de ciclina 6 (CDK-6), la topoisomerasa-I (Topo I), la topoisomerasa-II (Topo II), el linfoma B de células (Bcl-2) y el receptor 2 del factor crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2). Todas estas estructuras fueron obtenidas del banco de datos de proteína PDB RCSB. Según las simulaciones de docking molecular se encontró que los compuestos perilaldehído y calamenene del aceite esencial presentaron mayor afinidad de interacción con las dianas farmacológicas CDK-2, CDK-6, Topo I y VEGFR. Los complejos de perilaldehído-receptor se simularon mediante dinámica molecular por 50 nanosegundos, identificando predominantemente interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno mediados por agua del solvente. Nuestros hallazgos muestran que los compuestos en el aceite esencial de CR presentan potencial actividad anticancerígena.

Palabras clave: *Clinopodium revolutum*, cáncer, docking molecular, dinámica molecular.

CHARACTERIZATION OF THE ESSENTIAL OIL OF *CLINOPODIUM REVOLUTUM* AND COMPUTATIONAL STUDY OF ITS BIOACTIVE COMPOUNDS AGAINST CANCER

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of death worldwide. The search for bioactive compounds against cancer is enhanced by the use of computational tools and molecular databases. *Clinopodium Revolutum* (CR) is a plant used for medicinal purposes in various ailments; however, further scientific studies are needed to support its bioactivity. In this work, 55 components in the essential oil of CR are analyzed, identified by GC-MS, with potential

^a Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima, Perú, anitacvn29@yahoo.com.mx.

^b COMBI-Lab, Grupo de Biología Computacional, Centro de Ciências Computacionais, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil

anticancer activity through *in silico* studies. Anticancer drug receptors were selected, such as cyclin-dependent kinase 2 (CDK-2), cyclin-dependent kinase 6 (CDK-6), topoisomerase-I (Topo I), topoisomerase-II (Topo II), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2). All these structures were obtained from the Protein Data Bank RCSB. According to molecular docking simulations, it was found that perilaldehyde from the essential oil showed higher interaction affinity with the pharmacological targets CDK-2, CDK-6, Topo I, and VEGFR. Perilaldehyde-receptor complexes were simulated by molecular dynamics for 50 nanoseconds, identifying predominantly hydrophobic interactions and hydrogen bonds mediated by solvent water in their stabilization. Our findings demonstrate that the compounds in the essential oil of CR present potential anticancer activity.

Keywords: *Clinopodium revolutum*, cancer, molecular docking, molecular dynamics.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. De acuerdo con el instituto nacional de enfermedades neoplásicas INEN, en el Perú la incidencia de cáncer en hombres y mujeres se ha incrementado en un 40 % en el periodo del 2020 al 2021, siendo mayor el número de casos provenientes del interior del país. Las neoplásicas más frecuentes en la población son; el cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y tiroides ¹.

Hoy en día, los productos naturales son una importante fuente rica en compuestos bioactivos con gran potencial terapéutico. Por ejemplo, la camptotecina y el taxol (paclitaxel) aislados de *Camptotheca acuminata* y *Taxus brevifolia* respectivamente., siguen siendo los muy importantes en la terapia contra el cáncer desde que sus mecanismos fueron descubiertos, por ejemplo, la camptotecina es capaz de intervenir en el proceso de replicación y transcripción del ADN a través de la formación del complejo topoisomerasa-ADN provocando la muerte celular. Por otro lado, el taxol se une a los microtúbulos causando una catástrofe mitótica en las células cancerosas ^{2,3}

Dada la gran variedad de plantas medicinales, la familia lamiaceae incluye una gran diversidad de especies con actividad farmacológica apreciable. Generalmente las especies de esta familia se caracterizan por ser arbustos de olor aromático ricos en compuestos de gran valor medicinal, esto debido a que cada especie perteneciente a esta familia posee una gran diversidad de metabolitos secundarios con buenas propiedades antibacteriales, antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y anticancerígenas ⁴. Dentro de las lamiaceae algunos metabolitos secundarios que podemos encontrar son los polifenoles; como: los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos, ligninas, cumarinas, antraquinonas y xantonas; que en el cuerpo exhiben importantes propiedades antioxidantes, antivirales, antifúngicas y anticancerígenas ⁵.

Los polifenoles son capaces de causar la muerte de células cancerosas a través de varios mecanismos apoptóticos ⁶. Los terpenoides son otro grupo de metabolitos secundarios que poseen importantes aplicaciones medicinales, los cuales se clasifican de acuerdo al número de unidades isopreno en; monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos y triterpenos, y además son el componente principal de los aceites esenciales ⁷. El papel

de los terpenos en la terapia contra el cáncer ha cobrado una gran importancia en los últimos años, debido a su poder antitumoral, antiproliferativo, apoptótico, antiangiogénico y antimetastático^{8,9}.

Por otro lado, los aceites esenciales son mezclas complejas compuestas por sustancias orgánicas volátiles, lipídicas y de olor fuerte. Generalmente los aceites esenciales presentan en su composición terpenoides (monoterpenos, monoterpénos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos), fenilpropanoides y compuestos fenólicos¹⁰. Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria de alimentos¹¹, pesticidas¹² y farmacéutica¹³ y cosméticos, fragancias¹⁴. De esta amplia gama de aplicaciones, en los últimos años se han estudiado sus actividades anticancerígenas¹⁵. Compuestos como el mentol, mentona, carvona, piperitenona, pulegona, terpinel-4-ol, α -tujona, 1,8-cineol, β -citronelal, geraniol, linalol, alcanfor, borneol, α -pineno, β -pineno, E,E-farnesol, óxido de cariofileno, espatulanol, γ -eudesmol, germacreno D, humuleno, δ -cadineno, timol, carvacol, cinamato de metilo son algunos ejemplos de los compuestos anticancerígenos presentes en los aceites esenciales de las extraídos de diferentes especies de la familia *Lamiaceae*¹⁶.

Entre los receptores biológicos anticancerígenos mayormente estudiados se encuentran; los inhibidores de quinasa dependientes de ciclina CDK, que son una familia de serina/treonina quinasa que actúan como proteínas reguladoras de los puntos de control durante el ciclo celular, conformado por; el crecimiento celular (G1), la replicación del ADN (S), mayor crecimiento y preparación para la fase final (Gap 2) y segregación cromosómica y división celular o mitosis (M)¹⁷. En resumen, la proteína quinasa 2 CDK-2 controla la fase G1/S y CDK-6 controla la fase G1 y la transcripción de la proteína retinoblastoma (Rb), ambas son responsables de regular la proliferación celular¹⁸. Los receptores de topoisomerasa I (topo I) y topoisomerasa II (topo II), son enzimas nucleares que catalizan la introducción de cambios topológicos en el ADN, es decir que durante la replicación y transcripción del ADN, la topo I y Topo II actúan como liberadores de tensión mediante la formación de rupturas transitorias monocatenarias y bicatenarias en la doble hélice del ADN, por lo cual las topoisomerasas son esenciales en la proliferación celular^{19,20}. Por otro lado existen reguladores apoptóticos encargados de mantener la homeostasis de los tejidos del cuerpo a través de la muerte celular programada, el cual es un proceso fisiológico que permite el recambio celular²¹. Sin embargo los reguladores apoptóticos que se encuentran en la familia BCL-2, son las responsables de modular el umbral de respuesta a una amplia variedad de estímulos apoptóticos implicados en varios tipos de carcinomas humanos^{22,23}. En cambio el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF y sus receptores VEGFR son indispensables en el proceso de regulación de la vascularización y angiogénesis^{24,25}. La unión VEGF/VEGFR-2 activa las vías de señalización en la angiogénesis, siendo el VEGFR-2 el principal receptor de VEGF²⁶. VEGFR-2 es el receptor de tirosina quinasa transmembrana que se correlaciona con la proliferación, división, motilidad, adhesión y angiogénesis celular, cuyo bloqueo inhibe la proliferación de células cancerosas²⁷.

Hoy en día los estudios *in silico* son una poderosa herramienta en la búsqueda de nuevos fármacos y elucidación de mecanismos de unión ligando-proteína. Estudios de acoplamiento molecular de los compuestos identificados en aceites esenciales han mostrado importantes aportes en cuanto a su potencial anticancerígeno. Compuestos

como (*E*)-*Z*-Farnesylacetone identificado en el aceite de *I. viscosa* demostró potencial poder antiangiogénico con una buena afinidad en los receptores VEGFR^{28,29}

C. revolutum (Ruiz & Pav.) Govaerts es un especie de la familia lamiaceae comúnmente conocida como “flor de arena” encontrada en la sierra de Huánuco-Perú a 3770 m.s.n.m.³⁰. Generalmente la flor de arena es usada para tratar problemas gastrointestinales, hepáticos y cálculos biliares. Hasta la fecha, son pocos los estudios realizados en esta especie, por lo que en la presente investigación se ha realizado el estudio *in silico* de los componentes químicos identificados en el aceite esencial de CR como posibles agentes con potencial anticancerígeno frente a seis receptores biológicos (CDK-2, CDK-6, Topo I, Topo II, BCL-2 y VEGFR-2), los cuales cumplen funciones clave en el ciclo celular, crecimiento celular y replicación del ADN empleando cálculos de acoplamiento y dinámica molecular.

PARTE EXPERIMENTAL

La Figura 1 resume la metodología desarrollada y en seguida se detalla en extenso cada uno de los puntos.

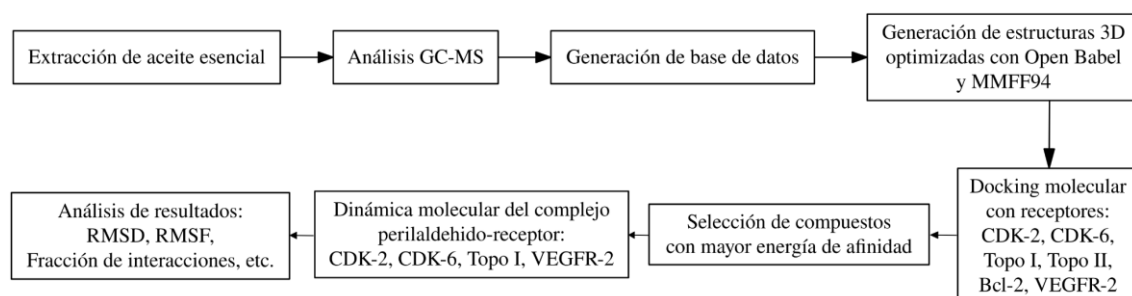


Figura 1. Resumen de la metodología.

Extracción del aceite esencial

Las hojas secas (13 Kg) de CR se sometieron a extracción por arrastre de vapor de agua. La mezcla de aceite-agua fue separada por diferencia de densidades, se adicionó sulfato de sodio para remover la humedad, seguidamente fue almacenado en un frasco ámbar a 4°C hasta su uso.

Análisis GC-MS

El análisis de los compuestos químicos del aceite esencial de CR fue realizado en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 5975B) del laboratorio de cromatografía de la universidad San Antonio Abad del Cusco. Se inyectó 0.1 uL del aceite esencial de CR en modo Split (100:1), a una columna capilar de fenil metil silioxano (25 m x 0.25 mm i.d., 0.5 um film thickness). La temperatura del horno inicialmente fue programada a 60°C con incrementos de 5°C/ min hasta llegar a 230 °C. Se empleó helio (1ml/min) como gas de arrastre. La energía de ionización por impacto de electrones fue de 70 eV, con 38 min como tiempo de ejecución. Los componentes de CR fueron identificados a través de la comparación de los espectros de masa de cada pico con los de la biblioteca de espectros de masa proporcionados por el

NIST 11 (The National Institute of Standards) a través del software MSD Chemstation B.030 (Agilnet).

Generación de base de datos

Los compuestos identificados fueron documentados en su representación SMILES empleando el repositorio PubChem. Se generaron las estructuras 3D de los compuestos empleando Open Babel 2.4.1 y luego se optimizaron las estructuras con mecánica molecular empleando el campo de fuerza MMFF94 para ser utilizadas en la siguiente etapa.

Docking molecular

En las simulaciones de docking molecular fueron considerados como ligandos los 55 compuestos de la base de datos, que se encuentra disponible en <https://bit.ly/3YRLqyv>. Como dianas farmacológicas en este estudio se consideraron los receptores CDK-2, CDK-6, Topo I, Topo II, Bcl-2 y VEGFR-2, con código identificador: 1DI8, 1XO2, 1T8I, 1ZXM, 2O2F y 2OH4, respectivamente, obtenidos de la base de datos de proteínas (<https://www.rcsb.org/>).

Los receptores fueron pretratados con Wizard de la suite Schrödinger, donde se eliminaron aguas de cristalización y otras moléculas co-cristalizadas. Para aproximar la simulación *in silico* a un sistema real, se editó el estado de protonación en los seis sistemas según el pH 7.4 con PropKa y se empleó el campo de fuerza OPLS para minimizar la energía del sistema. Se generó el grid box empleando cada ligando co-cristalizado como centro de una caja cúbica con 20 Å de arista. El acoplamiento molecular fue realizado con Glide de la suite Schrödinger en modo extra precisión.

Simulaciones de dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para evaluar la estabilidad de los mejores acoplamientos encontrados en la etapa anterior. Cuatro receptores fueron seleccionados: CDK-2, CDK-6, Topo I y VEGFR-2. La dinámica molecular fue realizada con el programa Desmond. La caja de simulación consistió en una caja ortorrómbica con aristas que distan 10 Å de la parte más externa del receptor, se adicionaron moléculas de agua usando TIP3P como modelo de solvente, iones de sodio y cloro para neutralizar el sistema y se estableció una concentración salina de 0.150 M. Con el campo de fuerza OPLS3 se equilibró el sistema con los ensambles isotérmico-isocórico e isobárico-isotérmico, a temperatura 310K con el termostato de Nosé-Hoover y una presión de 1.01325 bar con el baróstato de Martyna-Tobias-Klein, por 10 y 20 ps, respectivamente. Con este sistema equilibrado se realizó la etapa de producción de 50 ns, manteniendo constante el número de partículas, la temperatura (310K) y la presión (1.0 bar) (NPT), con la configuración predeterminada de relajación antes de la simulación. La animación de la trayectoria fue generada con 1000 frames por sistema. Se usó el módulo SID (Simulation interactions diagram) para la generación de la desviación cuadrática media (RMSD), fluctuación cuadrática media de la proteína (RMSF), diagrama de barras de la fracción de interacciones, diagrama de contactos ligando-proteína y propiedades del ligando (Ligand-RMSD, radio de giro, interacciones intramoleculares, área de superficie molecular, área de la superficie accesible al solvente y área de la superficie polar). Los cálculos con la suite Schrodinger fueron realizados en LIBIPMET de la Universidad

Nacional de Ingeniería y en el Centro de Ciencias Computacionales de la Universidade Federal do Rio Grande (FURG) en Brasil.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción del aceite esencial

De la extracción del aceite esencial de CR, se obtuvo un líquido amarillo pálido translucido (d: 0.912 g/ml), (I.R: 1.4864), cuya composición química se detalla en la tabla N°1.

Tabla 1. Composición química del aceite esencial encontrado en CR

| N° | Tiempo de retención | Compuesto | Contenido relativo (%) |
|----|---------------------|---------------------------------|------------------------|
| 1 | 4.97 | β -Tujeno | 0.89 |
| 2 | 5.15 | α -Pino | 9.80 |
| 3 | 5.45 | Canfeno | 0.24 |
| 4 | 6.02 | Sabineno | 10.53 |
| 5 | 6.14 | β -Pino | 18.64 |
| 6 | 6.35 | β -Mirceno | 0.50 |
| 7 | 7.01 | (+)-4-Carene | 0.36 |
| 8 | 7.20 | p-Cimeno | 0.50 |
| 9 | 7.33 | D-Limoneno | 3.77 |
| 10 | 7.40 | Eucaliptol | 0.14 |
| 11 | 7.51 | (E)- β - ocimeno | 1.14 |
| 12 | 7.78 | (Z)- β - ocimeno | 0.69 |
| 13 | 8.09 | γ -Terpineno | 1.15 |
| 14 | 8.33 | Cis- β - Terpeneol | 0.16 |
| 15 | 8.88 | α - Terpinoleno | 0.25 |
| 16 | 9.17 | Linalol | 0.19 |
| 17 | 9.28 | 1-nonanal | 0.11 |
| 18 | 9.48 | 1-octen-3-il-acetato | 0.38 |
| 19 | 9.83 | Ácido octanóico, éster metílico | 0.26 |
| 20 | 10.65 | 6-octenal, 3,7-dimetil-, (R)- | 0.37 |
| 21 | 10.71 | (-)- Mentona | 0.12 |
| 22 | 10.99 | Pinocarvona | 0.06 |
| 23 | 11.38 | 4- Terpeneol | 0.33 |
| 24 | 11.75 | α - Terpeneol | 0.09 |
| 25 | 12.11 | Decanal | 0.07 |
| 26 | 12.62 | Ácido nonanoico, éster metílico | 0.09 |

| | | | |
|----|-------|--|-------|
| 27 | 12.76 | (R)- Citronelol | 0.06 |
| 28 | 13.13 | (+)-Pulegona | 0.08 |
| 29 | 13.66 | (R)-(+)-citronelato de metilo | 0.41 |
| 30 | 14.11 | (-)- Perilaldehído | 0.05 |
| 31 | 16.19 | α -Cubebene | 4.17 |
| 32 | 16.92 | Copaeno | 2.93 |
| 33 | 17.17 | (-)- β - Borboneno | 0.50 |
| 34 | 17.31 | β - cubebene | 6.37 |
| 35 | 17.72 | Calamenene | 0.10 |
| 36 | 17.84 | α -Gurjunene | 0.45 |
| 37 | 18.16 | Cariofileno | 10.78 |
| 38 | 18.35 | β -coapeno | 0.23 |
| 39 | 18.74 | α -Selineno | 0.05 |
| 40 | 18.99 | Humuleno | 0.44 |
| 41 | 19.18 | Aloaromadendreno | 0.25 |
| 42 | 19.51 | (+)- Calarena | 0.15 |
| 43 | 19.76 | (E)-Germacreno | 10.36 |
| 44 | 19.86 | β - Selineno | 0.63 |
| 45 | 20.00 | Biciclo[4.4.0]dec-1-eno, 2- | 0.25 |
| 46 | 20.12 | isopropil-5-metil-9-metileno- 1,5,5-trimetil-6-metileno- ciclohexeno | 2.96 |
| 47 | 20.28 | α -Farneseno | 0.36 |
| 48 | 20.36 | 8-Isopropenil-1,5-dimetil- ciclodeca-1,5-dieno | 2.57 |
| 49 | 20.58 | 4-epi-cubedol | 0.8 |
| 50 | 20.75 | (+)-delta-Cadineno | 1.52 |
| 51 | 21.67 | (E)-Nerolidol | 0.07 |
| 52 | 21.91 | Palustrol | 0.06 |
| 53 | 22.14 | (-)-espatulenol | 0.27 |
| 54 | 22.29 | Óxido de cariofileno | 0.43 |
| 55 | 23.97 | γ -pachulene | 0.13 |

Docking molecular

Las energías de afinidad obtenidas son mostradas en gráficos de barras en la Figura 2, para los 10 compuestos principales. Se encontró a los compuestos (-)-perilaldehído y calamenene como los más frecuentes y con mayor afinidad en su respectivo receptor, siendo (-)-perilaldehído el mejor posicionado en cuatro receptores: CDK-2, CDK-6, Topo I VEGFR-2.

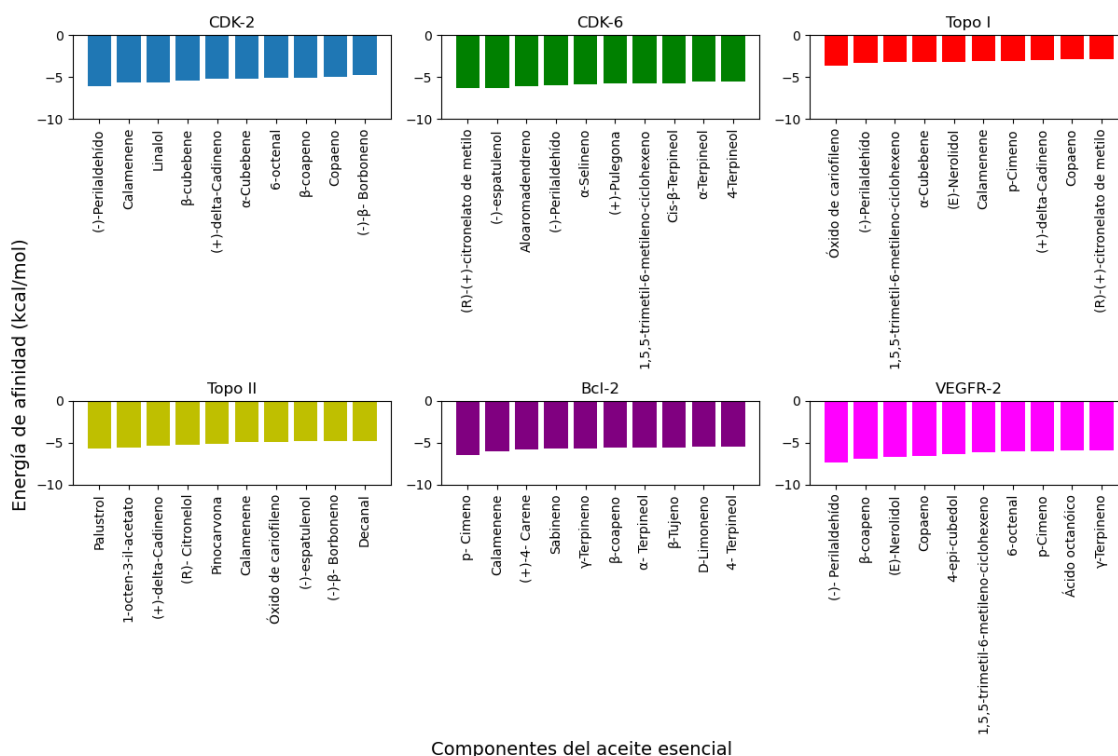


Figura 2. 10 principales complejos ligando-receptor en cada sistema (CDK-2, CDK-6, Topo I, Topo II, Bcl-2 y VEGFR-2) con respecto a su energía de afinidad.

Simulaciones de dinámica molecular

Se seleccionó al perilaldehído para las simulaciones de dinámica molecular por ser el componente con mayor potencial de efecto anticancerígeno multitarget en CR, según los resultados de docking molecular. Por lo tanto, los receptores seleccionados para esta etapa fueron CDK-2, CDK-6, Topo I y VEGFR, ya que en Topo II y Bcl-2, el ligando perilaldehído no aparece en el top 10 del docking molecular. Las trayectorias de las simulaciones de dinámica molecular pueden ser visualizadas en https://www.youtube.com/playlist?list=PLRMN3GUrx4qz4zm99sms4o5sY_2kWuB-G.

Los complejos ligando-receptor CDK-2, CDK-6 y VEGFR presentaron mayor estabilidad en comparación con Topo-I, de acuerdo con los resultados de la desviación cuadrática media (RMSD) mostrada en la Figura 3.

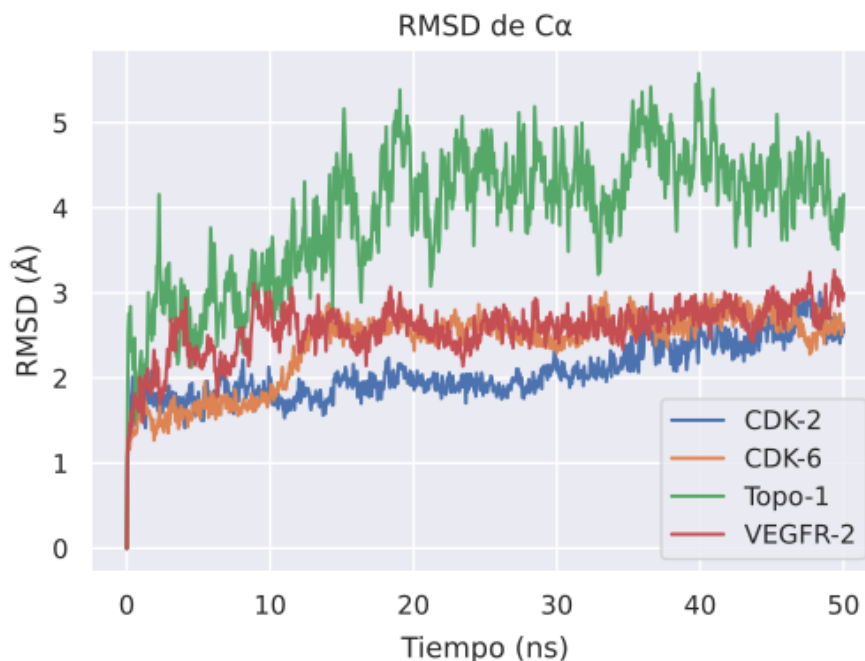


Figura 3. Desviación cuadrática media (RMSD) del C α de las simulaciones de dinámica molecular de perilaldehído con las proteínas CDK-2, CDK-6, Topo I VEGFR-2.

En general, los residuos presentan fluctuaciones relativamente bajas, de acuerdo con la desviación cuadrática media, en los puntos de contacto entre el ligando y el receptor, como se observa en la Figura 4 (líneas verdes verticales). Estudios relacionados con la búsqueda por cribado virtual y/o docking molecular de productos naturales con potencial actividad farmacológica muestran que valores promedio de estabilidad se encuentran por debajo de 2 y 6 Å, para RMSD y RMSF, respectivamente. Se observa en la Figura 5, que en CDK-2, CDK-6 y VEGFR-2 son predominantes las interacciones hidrofóbicas (barras moradas) y de acuerdo con el RMSD (Figura 3) y RMSF (Figura 4) podemos reconocer que estos complejos son más estables que el sistema perilaldehído-Topo I.

Este último complejo ya manifestaba una afinidad menor, como se observó en la Figura 2, sin embargo, esta energía de afinidad por encima de -5 kcal/mol, puede estar asociada con el relativo gran volumen en la cavidad del sistema proteína-doble hélice de ADN, cuando se elimina el ligando co-cristalizado en la etapa de pretratamiento.

El ligando (-)-perilaldehído por su gran afinidad con estas dianas farmacológicas en su sitio activo se perfila como el compuesto con mayor potencial anticancerígeno en el aceite esencial de CR.

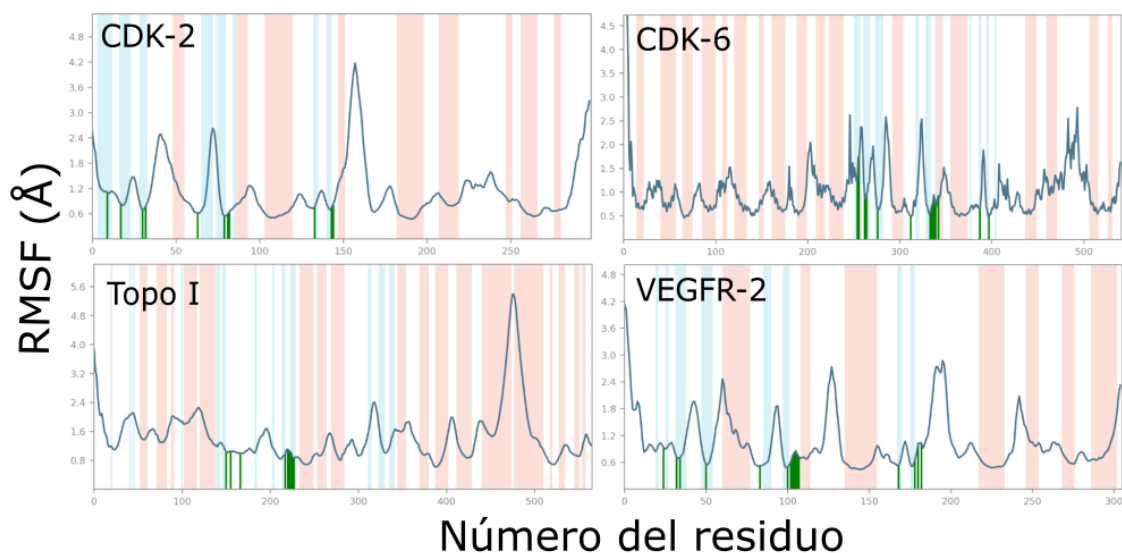


Figura 4. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los residuos en las simulaciones de dinámica molecular de perilaldehído con las proteínas CDK-2, CDK-6, Topo-I y VEGFR-2. Las líneas verdes indican los puntos de contacto entre el ligando y el receptor. Las regiones celestes y naranja indican estructuras beta y alfa, respectivamente.

Fracción de Interacciones

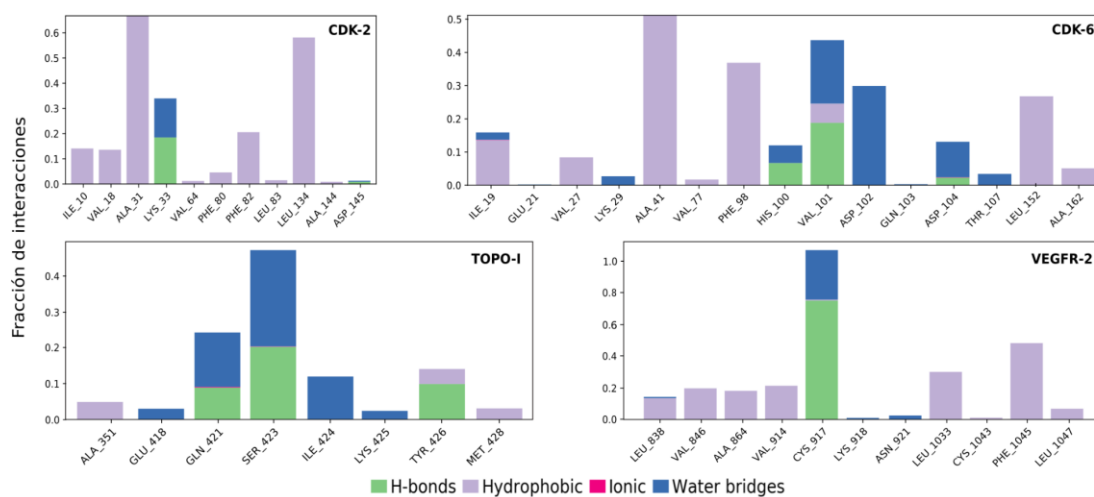


Figura 5. Fracción de interacciones intermoleculares de las simulaciones de dinámica molecular de perilaldehído con las proteínas CDK-2, CDK-6, Topo I VEGFR-2.

CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Clinopodium Revolutum* posee propiedades medicinales promisorias contra el cáncer. En este trabajo se reportan 55 compuestos orgánicos en el aceite esencial de CR, obtenidos por GC-MS, de los cuales, (-)-perilaldehído muestra gran afinidad multitarget contra el cáncer, principalmente en las dianas farmacológicas CDK-2, CDK-6, Topo I VEGFR-2, donde mostró alta estabilidad de acuerdo a nuestros estudios computacionales. Estos hallazgos pueden dar continuidad al diseño y optimización de fármacos contra el cáncer mediante derivados de perilaldehído, calamenene, entre otros.

AGRADECIMIENTO

RIHQ y JAAH agradecen a FONDECYT (Convenio 237- 2015-FONDECYT) por el apoyo financiero otorgado a través de la beca de doctorado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vallejos-Sologuren CS. Situación del Cáncer en el Perú. Diagnóstico. 2020; 59 (2): 77–85.
2. Oberlies NH, Kroll DJ. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J Nat Prod.* 2004;67(2):129-35.
3. Huang M, Lu JJ, Ding J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Nat Prod Bioprospect.* 2021;11(1):5-13.
4. Nieto G. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. *Medicines (Basel).* 2017;4(3):63. doi: 10.3390/medicines4030063.
5. Rasouli H, Farzaei MH, Khodarahmi R. Polyphenols and Their Benefits: A Review. *Int J Food Prop.* 2017; 20(S2): S1700-S1741.
6. Alam MN, Almoyad M, Huq F. Polyphenols in Colorectal Cancer: Current State of Knowledge including Clinical Trials and Molecular Mechanism of Action. *Biomed Res Int.* 2018;2018:4154185. doi: 10.1155/2018/4154185.
7. Joshee N, Dhekney SA, Parajuli P. *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy*; Springer International Publishing; 2019.
8. El-Baba C, Baassiri A, Kiriako G, Dia B, Fadlallah S, Moodad S, Darwiche N. Terpenoids' anti-cancer effects: focus on autophagy. *Apoptosis.* 2021; 26(9-10):491-511.
9. Kamran S, Sinniah A, Abdulghani MAM, Alshawsh MA. Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review. *Cancers (Basel).* 2022;14(5):1100. doi: 10.3390/cancers14051100.
10. Jugreet BS, Suroowan S, Rengasamy RRR, Mahomoodally MF. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils *Trends Food Sci Technol.* 2020; 101: 89–105.
11. Falleh H, Ben Jemaa M, Saada M, Ksouri R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chem.* 2020; 330:127268. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127268.

12. Maes C, Bouquillon S, Fauconnier ML. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. *Molecules*. 2019;24(14):2539. doi: 10.3390/molecules24142539.
13. Baptista-Silva S, Borges S, Ramos OL, Pintado M, Sarmento B. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. *J Essent Oil Res*. 2020; 32 (4): 279–295.
14. Sharmeen JB, Mahomoodally FM, Zengin G, Maggi F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules*. 2021;26(3):666. doi: 10.3390/molecules26030666.
15. Abelan US, de Oliveira AC, Cacoci ÉSP, Martins TEA, Giacon VM, Velasco MVR, Lima CRRC. Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review. *J Cosmet Dermatol*. 2022;21(4):1407-1418.
16. Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr J*. 2010; 25 (6): 407–426.
17. Mesquita LSSD, Luz TRSA, Mesquita JWCD, Coutinho DF, Amaral FMMD, Ribeiro MNDS, et al. Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. *Food Rev Int*. 2019; 35(2): 105–131.
18. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003;36(3):131-49.
19. Nurhayati APD, Lianingsih F, Indiani AM, Ghaissani SS. In Silico Study of Natural Pyridoacridine Against CDK- 2 and CDK-6 Cancer. *Eco Env Cons*. 2021; 27 (Special Issue): S25-S30.
20. Skok Ž, Zidar N, Kikelj D, Ilaš J. Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets. *J Med Chem*. 2020;63(3):884-904.
21. Şöhretoğlu D, Barut B, Sari S, Özel A, Arroo R. In vitro and in silico assessment of DNA interaction, topoisomerase I and II inhibition properties of chrysofenetin. *Int J Biol Macromol*. 2020;163:1053-1059.
22. Bai L, Wang S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu Rev Med*. 2014; 65:139-55.
23. Pena JC, Thompson CB, Recant W, Vokes EE, Rudin CM. Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1999; 85(1):164-70.
24. Adefolaju-Gbenga A, Mwakikunga A. Lopinavir and Curcumin Directly Alters BAX/BCL2 and VEGF165b mRNA Levels to Suppress Human Squamous Cervical Carcinoma Cell Growth. *Int J Morphol*. 2019; 37(2): 584–591.
25. Wang X, Bove AM, Simone G, Ma B. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:599281. doi: 10.3389/fcell.2020.599281.
26. Liu G, Chen T, Ding Z, Wang Y, Wei Y, Wei X. Inhibition of FGF-FGFR and VEGF-VEGFR signalling in cancer treatment. *Cell Prolif*. 2021;54(4):e13009. doi: 10.1111/cpr.13009.
27. DaDakowicz D, Zajkowska M, Mroczko B. Relationship between VEGF Family Members, Their Receptors and Cell Death in the Neoplastic Transformation of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(6):3375. doi: 10.3390/ijms23063375.
28. Modi SJ, Kulkarni VM. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Med Drug Discov*. 2019; 2: 100009. doi: 10.1016/j.medidd.2019.100009.

29. Nadia B, Mesli F, Zahra BF, Merad-Boussalah N, Radja A, Muselli A, et al. Chemical composition variability and vascular endothelial growth factor receptors inhibitory activity of *Inulaviscosa* essential oils from Algeria. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;40(8):3462-3480.
30. Serrano CA, Calsino B, Tupa AL, Huamán RI, Ludeña M, Rodríguez EF. Cuantificación de ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rosmarínico en tres especies peruanas de *Clinopodium* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae). *Arnaldoa*. 2016; 23 (1): 333 – 350.