

Evaluación de formulaciones a base de *Chenopodium ambrosioides* o sus metabolitos secundarios en el modelo experimental de leishmaniasis cutánea

Juan Sebastian Cubides Cely - Código: 2161089  
Fabián David Sarmiento Santos - Código: 2161992

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Patricia Escobar Rivero

Bacterióloga, PhD

Codirector

Betsy Yaneth Muñoz Serrano

M. Sc

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

## **Agradecimientos**

Primero que todo damos gracias a Dios, por su gracia, sabiduría y acompañamiento durante todo el desarrollo de este trabajo.

A la Dra Patricia Escobar Rivero, por su gran dedicación, acompañamiento, entrega, paciencia, bondad, ejemplo y motivación que inculcó diariamente en nuestra formación durante nuestro trabajo como investigadores; lo aprendido será parte ahora en adelante en nuestras vidas y profesiones.

Al Dr. Fernando Rodríguez, exdirector del CINTROP, que en su momento nos permitió y nos guio para conocer el área de quimioterapia del CINTROP a cargo de la Dra Patricia Escobar.

A la M. Sc. Betsy Yaneth Muñoz Serrano por su invaluable acompañamiento, consejos, amistad y guía durante nuestra estadía en el grupo y el desarrollo de la tesis. La cual estuvo desde el principio acompañándonos e inculcando nuestro crecimiento como investigadores.

Al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) por permitirnos desarrollar nuestras habilidades en sus instalaciones y a nuestros apreciados compañeros del grupo que en nuestra investigación estuvieron presentes: Mary Elizabeth Salazar Villamizar, Diana Paola Peña, Heider Carreño García, Jorge A. Osorio Hernández, Angelica Vera Arias, Laura M. Chaparro Caballero, Laura Fernanda Neira y Omar Andrés Casadiego.

A nuestros padres, hermanos y familiares Hector Manuel Cubides Montaña, María del Carmen Cely Becerra, Wilson Sarmiento Mantilla, Solangel Santos Rey, Oscar Julián Cubides Cely, Luz Angelica Santos Rey, Mary Luth Sarmiento Mantilla, por su apoyo incondicional y respaldo emocional, económico y desinteresado.

A nuestra colega Laura Natalia Camargo Merchán por sus consejos e información pertinente que nos permitió conocer el grupo de investigación CINTROP, del cual orgullosamente ahora hacemos parte.

Al Dr. Julio Cesar Mantilla y el Departamento de Patología por el procesamiento de las biopsias.

A la Dra. Elena Stashenko y al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de masas de la UIS (CROM-MASS) por su colaboración en la caracterización de uno de nuestros metabolitos.

Al Dr. Arnold Rafael Romero Bohórquez y al grupo de investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) y sus integrantes, por su ayuda, consejo y guía en la síntesis del ascaridol además de permitirnos el uso de sus instalaciones y equipos para la realización de algunos de los objetivos de nuestra tesis.

A Lucía C. Novoa y al Laboratorio Químico de Análisis Instrumental de la UIS por el préstamo de los equipos para realizar algunas de nuestras caracterizaciones químicas.

Agradecimientos a Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50 y al programa Joven Investigadores convocatoria para el fortalecimiento de vocaciones y formación en CTeI para la reactivación económica en el marco de la postpandemia 2020- Numero 891.

## Tabla de contenido

Introducción	21
1. Objetivos	23
1.1 Objetivo General	23
1.2 Objetivos Específicos	23
2. Marco teórico y estado del arte	24
2.1. Leishmaniasis: enfermedad, epidemiología	24
2.2 La <i>Leishmania</i> : taxonomía, ciclo biológico	26
2.2.1 Taxonomía	26
2.2.2 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	27
2.3 Tratamientos actuales en leishmaniasis	29
2.4 Piel y sus estudios en LC	34
2.5 Formulaciones farmacéuticas	36
2.5.1 Formas farmacéuticas tópicas	36
2.5.2 Clasificación de las formas farmacéuticas	38
2.5.3 Criterios de selección de formas farmacéuticas	39
2.6 Tratamientos tópicos en LC	40
2.7 <i>Chenopodium ambrosioides</i> (paico, epazote)	43
2.7.1 Generalidades: que es, nombres, distribución geográfica, taxonomía	43
2.7.2 Usos de la planta en medicina	45
2.7.3 Aceite esencial (AE) de la planta de <i>C. ambrosioides</i>	46
2.8 Usos en <i>Leishmania</i> de los metabolitos y extractos de <i>C. ambrosioides</i>	52
2.9 Toxicidad del AE de <i>C. ambrosioides</i>	53
3. Método	54
3.1 Compuestos (metabolitos secundarios y epazote)	55
3.2 Síntesis del ascaridol	57

3.3	Caracterizaciones organolépticas, fisicoquímicas y espectrales de metabolitos secundarios y excipientes formulaciones _____	58
3.3.1	Caracterización por FT-IR _____	59
3.3.2	Caracterización por GC-MS _____	60
3.3.3	Caracterización por HPLC-UV _____	61
3.3.4	Caracterización por UV-Vis _____	62
3.3.5	Pruebas de solubilidad _____	65
3.4	Formulaciones _____	66
3.5	Caracterización de las formulaciones _____	67
3.6	Estabilidad de las formulaciones _____	68
3.7	Ensayos <i>in vitro</i> _____	69
3.7.1	Parásitos y células _____	69
3.7.2	Ensayo antileishmania _____	69
3.7.3	Ensayo citotóxico _____	69
3.8	Ensayos actividad antileishmania <i>in vivo</i> _____	71
3.8.1	Ratones _____	71
3.8.2	Infección, tratamiento, seguimiento y sacrificio _____	71
3.8.3	Presencia de parásitos en improntas _____	72
3.8.4	Presencia del parásito en biopsias _____	72
3.9	Ensayos de toxicidad <i>in vivo</i> _____	73
3.9.1	Ensayo de irritación inducida por aplicación tópica e intradérmica _____	73
3.9.2	Análisis histopatológico _____	74
3.9.3	Prueba de micronúcleos _____	76
3.10	Análisis estadístico _____	76
4.	Resultados _____	77
4.1	Síntesis de ascaridol _____	78
4.2	Solubilidad de los metabolitos secundarios y del epazote _____	79

4.3	Caracterizaciones espectrales de los metabolitos secundarios, del epazote y del producto de síntesis del ascaridol (PSA)	82
4.3.1	<i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -C)	82
4.3.2	Carvacrol	84
4.3.3	$\alpha$ -Terpineno	87
4.3.4	Epazote	90
4.3.5	Producto de la síntesis del ascaridol (PSA)	92
4.4	Características fisicoquímicas y organolépticas de formulaciones y sus componentes (adicionalmente las de $\alpha$ -terpineno y PSA)	93
4.4.1	Formulaciones tipo solución (F) de <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -C)	94
4.4.2	Formulaciones tipo gel (G)	95
4.4.3	Formulaciones tipo ungüento (U) de epazote	97
4.4.4	Vehículos de las formulaciones: V1/V3, V2, VG1, VU1	98
4.4.5	$\alpha$ -Terpineno y PSA	99
4.5	Caracterizaciones espectrales de las formulaciones	100
4.5.1	Caracterización espectral de las formulaciones tipo solución (F) y vehículos	100
4.5.2	Caracterización espectral de las formulaciones tipo gel (G) y ungüento (U) y sus vehículos	103
4.6	Pruebas de estabilidad	108
4.6.1	Estabilidad térmica de las formulaciones y sus vehículos a diferentes tiempos	109
4.6.1.1	Estabilidad formulaciones tipo solución (F)	109
4.6.1.2	Estabilidad formulaciones tipo (G, U) y sus vehículos	113
4.6.2	Prueba de crema y coalescencia	117
4.6.3	Prueba de estrés mecánico	119
4.6.4	Prueba de ciclo térmico	121
4.6.4.1	Formulaciones tipo (F) y vehículos	121
4.6.4.2	Formulaciones tipo (G, U) y sus vehículos	122
4.7	Ensayos <i>in vitro</i>	123
4.7.1	Ensayos antileishmania	123
4.7.2	Ensayos citotoxicidad	125

4.8	Ensayos <i>in vivo</i> _____	128
4.8.1	Ensayos actividad antileishmania _____	128
4.8.1.1	Estudio histopatológico de las lesiones de LC después del tratamiento _____	133
4.8.2	Estudios de irritación de las formulaciones tipo solución aplicadas intradérmicamente (ratones sanos) _____	137
4.8.2.1	Estudio histopatológico de las secciones de piel después del tratamiento de irritación inducido por aplicación intradérmica _____	140
4.8.3	Estudios de irritación de los compuestos aplicados tópicamente _____	142
4.8.2.1	Estudio histopatológico de las secciones de piel después del tratamiento de irritación inducido por aplicación intradérmica _____	143
4.9	Prueba de genotoxicidad (prueba de micronúcleos) _____	146
5.	Discusión _____	147
6.	Conclusiones _____	159
	Referencias _____	161

## Lista de tablas

Tabla 1. _____	27
Taxonomía de leishmaniasis en las Américas _____	27
Tabla 2. _____	29
Tratamientos para leishmaniasis en las Américas, recomendaciones de la OMS _____	29
Tabla 3. _____	32
Efectos adversos de los tratamientos antileishmania _____	32
Tabla 4. _____	37
Formas farmacéuticas _____	37
Tabla 5. _____	38
Clasificación de formas farmacéuticas _____	38
Tabla 6. _____	39
Criterios de selección de formas farmacéuticas _____	39
Tabla 7. _____	40
Ensayos clínicos de tratamiento tópicos en pacientes con leishmaniasis cutánea _____	40
Tabla 8. _____	42
Ensayos murinos de tratamiento tópico para lesiones cutáneas _____	42
Tabla 9. _____	44
Descripción taxonómica de <i>C. ambrosioides</i> _____	44
Tabla 10. _____	46
Usos de la planta de <i>C. ambrosioides</i> _____	46
Tabla 11. _____	47
Métodos de extracción de aceites esenciales _____	47

Tabla 12. _____	49
Componentes del AE de <i>C. ambrosioides</i> _____	49
Tabla 13. _____	50
Actividades biológicas de ascaridol _____	50
Tabla 14. _____	56
Metabolitos secundarios de <i>C. ambrosioides</i> a utilizar en el proyecto _____	56
Tabla 15. _____	59
Pruebas espectroscópicas realizadas para los componentes activos _____	59
Tabla 16. _____	67
Caracterización espectroscópica y espectrométrica para cada formulación _____	67
Tabla 17. _____	68
Pruebas de estabilidad realizadas para cada formulación _____	68
Tabla 18. _____	70
Pruebas <i>in vitro</i> antileishmania y citotóxicas realizadas para los metabolitos y formulaciones	70
Tabla 19. _____	71
Grupos experimentales antileishmania _____	71
Tabla 20. _____	74
Grupos experimentales para tratamiento de irritación por aplicación tópica e intradérmica en ratones BALB/c sanos _____	74
Tabla 21. _____	76
VARIABLES EXPERIMENTALES _____	76
Tabla 22. _____	80
Resultados fotográficos pruebas de solubilidad _____	80
Tabla 23. _____	82

Descripción de la solubilidad de metabolitos secundarios y epazote en diferentes solventes	82
Tabla 24.	84
Identificación tentativa y tiempos de retención del <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno por GC-MS	84
Tabla 25.	87
Fraccionamiento molecular del carvacrol	87
Tabla 26.	90
Fraccionamiento molecular $\alpha$ -terpineno	90
Tabla 27.	91
Tiempos de retención HPLC-UV epazote	91
Tabla 28.	94
Características organolépticas y fisicoquímicas de formulaciones tipo solución (F) y sus componentes	94
Tabla 29.	96
Características organolépticas y fisicoquímicas de los componentes para formulaciones tipo gel (G1) de epazote	96
Tabla 30.	97
Características organolépticas y fisicoquímicas de los componentes para formulaciones tipo ungüento (U) conteniendo epazote	97
Tabla 31.	98
Características organolépticas y fisicoquímicas de los vehículos de las formulaciones	98
Tabla 32.	100
Características organolépticas y fisicoquímicas $\alpha$ -terpineno y el PSA	100
Tabla 33.	106
Tiempos de retención HPLC-UV / G1	106
Tabla 34.	106

Tiempos de retención HPLC-UV / VG1 _____	106
Tabla 35. _____	118
Características observables formulaciones tipo G y U _____	118
Tabla 36. _____	120
Resultados prueba estrés mecánico 5, 15, 30 minutos _____	120
Tabla 37. _____	124
Actividad de los compuestos y formulaciones en promastigotes de <i>L. (V.) braziliensis</i> _____	124
Tabla 38. _____	126
Citotoxicidad de los compuestos y formulaciones en células VERO y THP-1 _____	126
Tabla 39. _____	131
Resultados del tamaño de lesión en ratones infectados con <i>L. (V.) braziliensis</i> tratado con las formulaciones a 1, 5, 10 y 17 dosis _____	131
Tabla 40. _____	136
Características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c infectados con <i>L. (V.) braziliensis</i> después del tratamiento _____	136
Tabla 41. _____	138
Respuesta de los tratamientos de irritación aplicados intralesional y tópicamente _____	138
Tabla 42. _____	141
Características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c sanos al final del tratamiento de irritación por medio de aplicación intradérmica _____	141
Tabla 43. _____	145
Características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c sanos al final del tratamiento de irritación por medio de aplicación tópica _____	145
Tabla 44. _____	147



## Lista de figuras

Figura 1. _____	26
Incidencia leishmaniasis cutánea en población general, Colombia, a semana epidemiológica 40 de 2019 _____	26
Figura 2 _____	28
Ciclo de la <i>Leishmania</i> _____	28
Figura 3. _____	35
Estructura, partes y capas de la piel _____	35
Figura 4. _____	44
Fotografía de la planta <i>C. ambrosioides</i> _____	44
Figura 5. _____	49
Componentes principales del AE de <i>C. ambrosioides</i> _____	49
Figura 6. _____	55
Fases metodológicas del trabajo _____	55
Figura 7. _____	58
Esquema de seguimiento para síntesis de ascaridol _____	58
Figura 8. _____	60
Equipo FT-IR _____	60
Figura 9. _____	61
Equipo de GC-MS _____	61
Figura 10. _____	62
Equipo de HPLC-UV _____	62
Figura 11. _____	63
Equipo UV-Vis _____	63

Figura 12. _____	63
Espectros IR de los metabolitos secundarios obtenidos de la literatura _____	63
Figura 13. _____	64
Espectros UV-Vis de los metabolitos secundarios obtenidos de la literatura _____	64
Figura 14. _____	65
Espectros de masas de los metabolitos secundarios obtenidos de la literatura _____	65
Figura 15. _____	75
Patrones histopatológicos de piel infectada con <i>L. (V.) braziliensis</i> _____	75
Figura 16. _____	78
Productos de síntesis de ascaridol obtenidos luego de purificación en columna _____	78
Figura 17. _____	79
Fotografía de cromatografía de capa fina para extractos de la síntesis de ascaridol obtenido experimentalmente _____	79
Figura 18. _____	83
Espectros IR, UV-Vis y cromatograma de $\beta$ -C _____	83
Figura 19. _____	86
Espectros IR, UV-Vis y cromatograma de carvacrol _____	86
Figura 20. _____	89
Espectros IR, UV-Vis y cromatograma de $\alpha$ -terpineno _____	89
Figura 21. _____	92
Espectros IR, UV-Vis y HPLC-UV de epazote _____	92
Figura 22. _____	93
Espectros IR del PSA obtenido _____	93
_____	93

Figura 23. _____	102
Espectros infrarrojos formulaciones tipo F (conteniendo $\beta$ -C) y vehículos _____	102
Figura 24. _____	104
Espectros infrarrojos formulaciones tipo G, U y sus vehículos _____	104
Figura 25. _____	105
Cromatograma de HPLC-UV de G1 y VG1 _____	105
Figura 26. _____	108
Cromatogramas GC y espectros de masas para U1 y VU1 _____	108
Figura 27. _____	110
Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para F1 _____	110
Figura 28. _____	111
Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para V1 _____	111
Figura 29. _____	112
Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para F2 _____	112
Figura 30. _____	113
Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para V2 _____	113
Figura 31. _____	114
Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para G1 _____	114
Figura 32. _____	115
Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para VG1 _____	115
Figura 33. _____	116
Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para U1 _____	116
Figura 34. _____	117
Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para VU1 _____	117

Figura 35. _____	118
Prueba de crema y coalescencia para para formulaciones tipo G y U y sus vehículos_____	118
Figura 36. _____	119
Resultados de estrés mecánico de las formulaciones _____	119
Figura 37. _____	120
Resultados de estrés mecánico de los vehículos de las formulaciones_____	120
Figura 38. _____	122
Prueba de ciclo térmico para para formulaciones tipo F y sus vehículos _____	122
Figura 39. _____	123
Prueba de ciclo térmico para para formulaciones tipo G y U y sus vehículos _____	123
Figura 40. _____	130
Actividad antileishmania e irritación de los tratamientos (vía tópica) por las formulaciones _	130
Figura 41. _____	133
Análisis estadístico grupos experimentales <i>in vivo</i> _____	133
Figura 42. _____	134
Cortes histológicos de las lesiones de LC después del tratamiento con las formulaciones usadas _____	134
Figura 43. _____	139
Irritación inducida al tratamiento con las formulaciones tipo solución aplicadas intradérmicamente_____	139
Figura 44. _____	140
Cortes histológicos de piel sana después de la prueba de irritación aplicada intradérmicamente con las formulaciones _____	140
Figura 45. _____	143

Cortes histológicos de piel sana después de la prueba de irritación aplicada tópicamente con las formulaciones \_\_\_\_\_ 143

## Listado de abreviaturas

**$\beta$ -C:** *trans*- $\beta$ -cariofileno

**AC:** acantosis

**DE:** desviación estándar

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**ES:** espongiosis

**EX:** exocitosis

**F:** formulaciones tipo solución

**FT-IR:** Infrarrojo por transformada de Fourier

**G:** formulaciones tipo gel

**GC-MS:** cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas

**H&E:** hematoxilina y Eosina

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia

**HQ:** hiperqueratosis

**INS:** Instituto Nacional de Salud

**IR:** Infrarrojo

**LC:** leishmaniasis cutánea

**LM:** leishmaniasis mucosa o mucocutánea

**LV:** leishmaniasis visceral

**OMS:** Organización mundial de la salud

**OPS:** Organización panamericana de la salud

**PBS:** buffer fosfato salino.

**PCR:** reacción en cadena de polimerasa

**PPG:** propilenglicol

**PQ:** paraqueratosis

**PSA:** producto de la síntesis de ascaridol

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**U:** formulaciones tipo ungüento

**UV-Vis:** ultravioleta visible

## Resumen

**Título:** Evaluación de formulaciones a base de *Chenopodium ambrosioides* y sus metabolitos secundarios en el modelo experimental de leishmaniasis cutánea\*

**Autor:** Juan Sebastian Cubides Cely, Fabian David Sarmiento Santos, Patricia Escobar Rivero, Betsy Yaneth Muñoz Serrano\*\*

**Palabras Clave:** *Chenopodium ambrosioides*, leishmaniasis cutánea, *L. (V.) braziliensis*, *trans-β*-cariofileno, carvacrol, paico, epazote.

**Descripción:** La leishmaniasis cutánea (LC) es una enfermedad de la piel producida por parásitos de *Leishmania*, transmitidos por vectores del género *Lutzomyia*. Esta enfermedad constituye un problema serio de salud pública en Colombia, especialmente para las poblaciones de áreas rurales. Los tratamientos existentes son pocos, de efectividad variable, acceso limitado, con reacciones adversas y contraindicaciones.

Las plantas son portadoras de innumerables moléculas activas contra diversos patógenos. El *Chenopodium ambrosioides* o paico es una planta aromática y medicinal que se ha utilizado por siglos en medicina alternativa por sus características antiparasitarias.

El objetivo de este trabajo fue preparar y evaluar la efectividad de formulaciones farmacéuticas a base de *C. ambrosioides* o sus metabolitos secundarios en el modelo experimental de LC.

Se utilizaron los compuestos *trans-β*-cariofileno (B-C), carvacrol,  $\alpha$ -terpineno y un extracto comercial de epazote. Se prepararon formulaciones tipo solución (F), gel (G) y ungüento (U); a las cuales se le realizaron caracterizaciones organolépticas, fisicoquímicas y espectrales; así como pruebas de estabilidad y ciclo térmico a diferentes temperaturas, estrés mecánico y crema y coalescencia. Con las formulaciones también se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* en los modelos de LC por *L. (V.) braziliensis*.

Se desarrollaron y caracterizaron exitosamente las formulaciones. Únicamente F1 tuvo actividad antileishmania con valores de  $CI_{50}$   $2,58 \pm 0,06$   $\mu\text{g/mL}$  pero presentó citotoxicidad con valores de  $CC_{50}$   $1,41 \pm 0,09$   $\mu\text{g/mL}$  en células VERO y  $CC_{50}$   $2,40 \pm 0,03$   $\mu\text{g/mL}$  en THP-1. Además se determinó su estabilidad térmica a diferentes temperaturas durante 60 días, evidenciada por la no variación en sus espectros infrarrojo. La reducción del tamaño de las lesiones en ratones infectados con *L. (V.) braziliensis* con F1 fue del 62%. Esta formulación fue la más promisoría en el tratamiento de LC. La aplicación intradérmica produjo irritación, contraria a la aplicación tópica. Ninguno de los tratamientos usados produjeron genotoxicidad.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Patricia Escobar Rivero. Bacterióloga, M.Sc, PhD, Departamento de Ciencias Básicas, UIS. Codirector: Betsy Yaneth Muñoz Serrano. M.Sc. CINTROP-UIS

## Abstract

**Title:** Evaluation of formulations based on *Chenopodium ambrosioides* and its secondary metabolites in the experimental model of cutaneous leishmaniasis\*

**Author:** Juan Sebastian Cubides Cely, Fabian David Sarmiento Santos, Patricia Escobar Rivero, Betsy Yaneth Muñoz Serrano<sup>1</sup>

**Key Words:** *Chenopodium ambrosioides*, cutaneous leishmaniasis, *L. (V.) braziliensis*, *trans*- $\beta$ -caryophyllene, carvacrol, paico, epazote.

**Description:** Cutaneous leishmaniasis (CL) is a skin disease caused by *Leishmania* parasites, transmitted by vectors of the genus *Lutzomyia*. This disease constitutes a serious public health problem in Colombia, especially for populations in rural areas. Existing treatments are few, with variable efficacy, limited access and with adverse reactions and contraindications.

Plants are carriers of innumerable active molecules against various pathogens. *Chenopodium ambrosioides* or paico is an aromatic and medicinal plant that has been used for centuries in alternative medicine for its antiparasitic properties.

The objective of this work was to prepare and evaluate the efficacy of pharmaceutical formulations based on *C. ambrosioides* or its secondary metabolites in the experimental model of LC.

Compounds *trans*- $\beta$ -caryophyllene (B-C), carvacrol,  $\alpha$ -terpinene and a commercial extract of epazote were used. Solution (F), gel (G) and ointment (U) type formulations were prepared; also organoleptic, physicochemical and spectral characterizations were carried out; as well as test of stability and thermal cycle at different temperatures, mechanical stress and cream and coalescence. *In vitro* and *in vivo* tests were also carried out in the CL models caused by *L. (V.) braziliensis*.

Formulations were successfully developed and characterized. Only F1 had antileishmanial activity with IC<sub>50</sub> values of  $2.58 \pm 0.06$   $\mu\text{g/mL}$  but presented cytotoxicity with CC<sub>50</sub> values of  $1.41 \pm 0.09$   $\mu\text{g/mL}$  in VERO cells and CC<sub>50</sub>  $2.40 \pm 0.03$   $\mu\text{g/mL}$  in THP-1. In addition, its thermal stability developed at different temperatures for 60 days, evidenced by the non-variation in its infrared spectra. The reduction size in lesion in mice infected with *L. (V.) braziliensis* using F1 was 62%. This formulation was the most promising of the tested in the treatment of CL. Intradermal application produced irritation, contrary to topical application. None of the treatments used produce genotoxicity.

---

\* Thesis

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Thesis director: Patricia Escobar Rivero. Bacteriologist, PhD. Co-director: Betsy Yaneth Muñoz Serrano. M. Sc.

## Introducción

La leishmaniasis cutánea (LC) es una enfermedad dermatológica que se caracteriza por presentar lesiones especialmente en las zonas expuestas del cuerpo (accesibles al vector). Estas se presentan como pápulas, nódulos o úlceras que pueden ser únicas o múltiples, las cuales cuando sanan dejan cicatrices de por vida (OMS, 2021). La LC está asociada a problemas de malnutrición, desplazamiento de población, malas condiciones de vivienda, entre otros. Las opciones farmacológicas son pocas (i.e. los antimonios pentavalentes, anfotericina B, mitelfosina, pentamidina, paromomicina) y la mayoría presentan problemas como toxicidad, larga duración del tratamiento y reacciones adversas graves, que a menudo conducen al abandono del tratamiento. Además, los fármacos más utilizados no eliminan por completo los parásitos de todas las personas infectadas (Amato et al., 2008). Por lo tanto, es urgente y necesario desarrollar nuevas opciones terapéuticas. Los productos naturales pueden ofrecer una fuente ilimitada de diversidad química para identificar nuevos fármacos. Los nuevos medicamentos deberían ser menos tóxicos o no tóxicos, seguros, más eficientes, menos costosos y fácilmente disponibles, especialmente para las poblaciones de bajos ingresos (Oryan, 2015).

El *Chenopodium ambrosioides* (paico, hierba santa, epazote) es una planta originaria de América, que crece en suelos húmedos y bajos, de olor fuerte, y con alrededor de 40 cm de altura (Zavala et al., 2017); la cual junto con sus extractos y compuestos mayoritarios como ascaridol, carvacrol, óxido de cariofileno entre otros, han sido evaluados en modelos de LC mostrando actividad contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania*, así como en algunos modelos *in vivo* en ratones con LC (Monzote et al., 2006). Debido a esta característica del *C. ambrosioides*, el objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de formulaciones farmacéuticas conteniendo extractos de *C. ambrosioides* o sus derivados en el modelo *in vitro* y en ratones infectados por *L. (V.) braziliensis*, una de las especies más prevalentes en la LC del Nuevo Mundo.

En la primera parte de este trabajo se muestra el diseño, la caracterización y el estudio de la estabilidad de las formulaciones tipo solución (F1, F2, F3), tipo gel (G1), tipo ungüento (U1) y sus vehículos. Para ello se utilizaron técnicas espectrométricas y espectroscópicas, donde se caracterizaron los compuestos y las formulaciones usadas, además de una caracterización organoléptica y fisicoquímica de las mismas.

En la Fase 2 se realizaron ensayos *in vitro* con los compuestos y formulaciones para determinar su actividad antileishmania en promastigotes de *L. (V.) braziliensis* así como su actividad citotóxica en células THP-1 y VERO. Se analizaron las biopsias de piel provenientes de los ensayos *in vivo* y se realizaron análisis histopatológico de las mismas con el fin evidenciar la actividad antileishmania y citotóxica de las formulaciones.

En la Fase 3 se realizó un esquema de tratamiento para las pruebas *in vivo*, analizando la actividad antileishmania de las formulaciones en ratones BALB/c infectados con *L. (V.) braziliensis*, con el fin de determinar si las formulaciones a base de *C. ambrosioides* o sus metabolitos secundarios poseían actividad antileishmania en el modelo de LC por *L. (V.) braziliensis*, reduciendo el tamaño de las lesiones.

En la Fase 4 se realizaron pruebas de genotoxicidad en extractos de médula para detectar micronúcleos, así como la irritación inducida por aplicación tópica e intradérmica *in vivo*, analizado mediante histopatología finalizado el tratamiento.

Algunos resultados obtenidos permitieron comprender que los tratamientos tópicos para LC en modelos *in vivo* requieren de más investigación y profundización dado que es necesario aumentar la eficacia vs efectividad del tratamiento alternativos con compuestos naturales, así como la estabilidad de las formulaciones.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Evaluar la efectividad de formulaciones farmacéuticas a base de *C. ambrosioides* o sus metabolitos secundarios en el modelo experimental de leishmaniasis cutánea (LC).

### 1.2 Objetivos Específicos

Diseñar y caracterizar fisicoquímicamente las formulaciones farmacéuticas a base de *C. ambrosioides* o sus metabolitos secundarios.

Demostrar la actividad antiparasitaria y citotóxica de formulaciones farmacéuticas a base de *C. ambrosioides* o sus metabolitos secundarios en modelos experimentales.

## 2. Marco teórico y estado del arte

### 2.1. Leishmaniasis: enfermedad, epidemiología

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades producidas por parásitos intracelulares pertenecientes al subgénero *Viannia* o *Leishmania* transmitida por la picadura de insectos flebótomos hembra del género *Lutzomyia* (OPS, 2022). Una vez ocurrida la infección esta puede permanecer en la piel, o extenderse por vía linfática local, también puede acceder a las mucosas o diseminarse a órganos con elevado contenido en macrófagos como el bazo, hígado y médula ósea; lo anterior, depende de la especie de *Leishmania* causante de la infección. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis es una de las siete enfermedades tropicales más importantes y representa un grave problema de salud mundial con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y con desenlaces potencialmente fatales (OMS, 2022). En el mundo hay entre 12 y 15 millones de personas infectadas de leishmaniasis y 350 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad. Se estima que ocurren entre 1,5 y 2 millones de casos nuevos cada año y causa 70.000 muertes por año (Reithinger et al., 2007).

La leishmaniasis presenta tres formas clínicas diferentes clasificadas como: cutánea (LC), mucosa / mucocutánea (LM) y visceral (LV). La LC es la forma más frecuente de esta infección y produce en su mayoría lesiones ulcerosas que dejan cicatrices de por vida (OPS, 2022). Las lesiones están presentes en todo el cuerpo, especialmente en las zonas más expuestas a las picaduras como las extremidades superiores e inferiores. Sus presentaciones clínicas pueden ser: cutánea localizada (simple o múltiple), cutánea diseminada, cutánea difusa y cutánea atípica (OPS, 2022). La lesión de LC generada por las especies del Nuevo Mundo (región que se extiende desde la península mexicana de Yucatán, al norte, hasta la Argentina, al sur) varían desde lesiones cerradas como pápulas, nódulos y placas que pueden ser de aspecto verrugoso hasta las formas ulceradas (INS, 2010). La presentación más frecuente es la úlcera indolora con compromiso linfático y adenopatía regional. La úlcera típica es redondeada, de bordes elevados, eritematosos, acordonados, con centro granulomatoso limpio y base infiltrada. Regularmente son indoloras y de

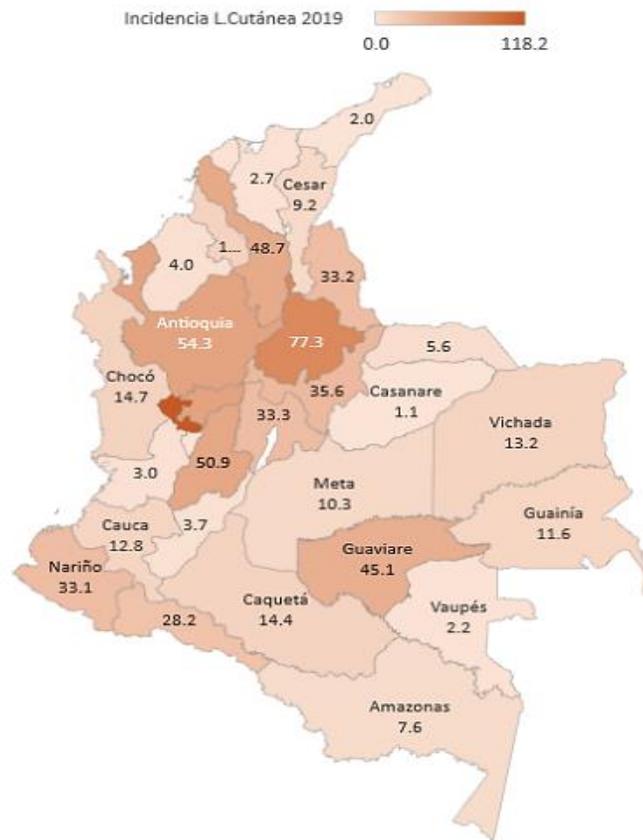
crecimiento lento (INS, 2010). Cuando hay sobreinfección bacteriana las úlceras se tornan dolorosas, de fondo sucio, secreción purulenta, recubiertas por costra, eritema y signos inflamatorios locales. Se pueden presentar como lesiones únicas o múltiples (INS, 2010). La enfermedad puede tornarse crónica luego de 12 semanas sin cierre de la úlcera o con la transformación de la misma en una placa verrugosa de bordes elevados recubiertos con escamas y/o costras que coinciden con los bordes de la cicatriz de la lesión inicial (INS, 2010).

A nivel mundial aproximadamente el 95% de los casos de LC se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central (OMS, 2022). En 2020, más del 85% de los nuevos casos aparecieron en 10 países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Iraq, Libia, Pakistán, Perú, República Árabe Siria y Túnez. Se calcula que cada año hay en el mundo entre 600.000 y 1 millón de nuevos casos únicamente de LC (OMS, 2022).

En Colombia, la leishmaniasis se presenta de forma endémica en sitios localizados en áreas rurales del país, los cuales generalmente están alejados de los centros de salud de las zonas urbanas (INS, 2019). Estos sitios rurales cuentan con las condiciones ecológicas y epidemiológicas propicias (presencia del agente, infestación por el vector y reservorios) para la aparición de focos de leishmaniasis en sus tres formas clínicas: visceral, cutánea y moco cutáneo (INS, 2019). En el 2016 se confirmaron 10.743 casos de leishmaniasis en Colombia, de los cuales 10.561 correspondieron a la LC (INS, 2016). En Colombia el 60 % de la población está en riesgo de adquirir esta forma clínica (Salgado et al., 2019). En el 2018, los datos obtenidos por el Instituto Nacional de Salud (INS) para LC, mostraron que el 76,6% de infectados corresponde al sexo masculino, un 65% de los casos se encuentran en el grupo de edad de 15 a 44 años (población económicamente activa), siendo el 57% de régimen de afiliación subsidiado, y el 80% de los casos corresponde al área rural (INS, 2018). Más recientemente, los datos tomados durante el 2019 (**Figura 1**) para los casos de LC, según boletín epidemiológico semanal del INS realizado a 100.000 habitantes de riesgo (área rural), se encontraron 118,2 casos en el departamento de Risaralda, 77,3 en Santander, 54,3 Antioquia, 50,9 Tolima, 48,7 Bolívar, donde Santander es uno de los departamentos con más incidencia de esta forma de la enfermedad (INS, 2019).

## Figura 1.

*Incidencia leishmaniasis cutánea en población general, Colombia, a semana epidemiológica 40 de 2019*



*Nota:* Datos de incidencia de leishmaniasis cutánea en los diferentes departamentos de Colombia durante el 2019. Tomado de: (INS, 2019).

## 2.2 La *Leishmania*: taxonomía, ciclo biológico

### 2.2.1 Taxonomía

Los protozoarios del género *Leishmania* integrados en el orden Kinetoplastea y a la familia Trypanosomatidae son parásitos de mamíferos que incluyen aproximadamente 30 especies, divididas en tres subgéneros de acuerdo con el sitio de desarrollo del parásito: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) y *Leishmania* (*Saurollesishmania*). La (**Tabla 1**) muestra la

taxonomía de las especies de *Leishmania* que afectan al ser humano en las Américas (Isaza Jaimes et al., 2018).

**Tabla 1.**

*Taxonomía de leishmaniasis en las Américas.*

<b>Taxonomía de <i>Leishmania</i> en las Américas</b>					
Subreino	Protozoario				
Orden	Kinetoplastea				
Familia	Typanosomatidae				
Genero	<i>Leishmania</i>				
Subgénero	<i>Leishmania</i>		<i>Vianna</i>		
Complejo	<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (L.) mexicana, L. (L.) amazonensis</i>		<i>L. (V.) braziliensis</i>	
		<i>L. (L.) venezuelensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) panamensis</i>	
				<i>L. (L.) pifanoi</i>	<i>L. (L.) cuyanensis</i>
				<i>L. (L.) chagasi</i>	<i>L. (L.) colombiensis</i>
		<i>L. donovani</i>			

*Nota:* Tomado de: (Isaza Jaimes et al., 2018).

Las especies de *Leishmania* del nuevo mundo que causan la LC humana incluyen los miembros del complejo *L. (V.) braziliensis*, *L.(V) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(V) shawi* y *L. (V.) peruviana* y la *L. (L.) mexicana*, *L.(L) amazonensis*, *L.(L) venezuelensis*, por otra parte, las especies que causan LC en el viejo mundo incluyen *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*. Los organismos viscerotrópicos (*L. infantum* o *L. donovani*) también ocurren ocasionalmente en la LC sin la intervención de leishmaniasis visceral (Spickler, 2017).

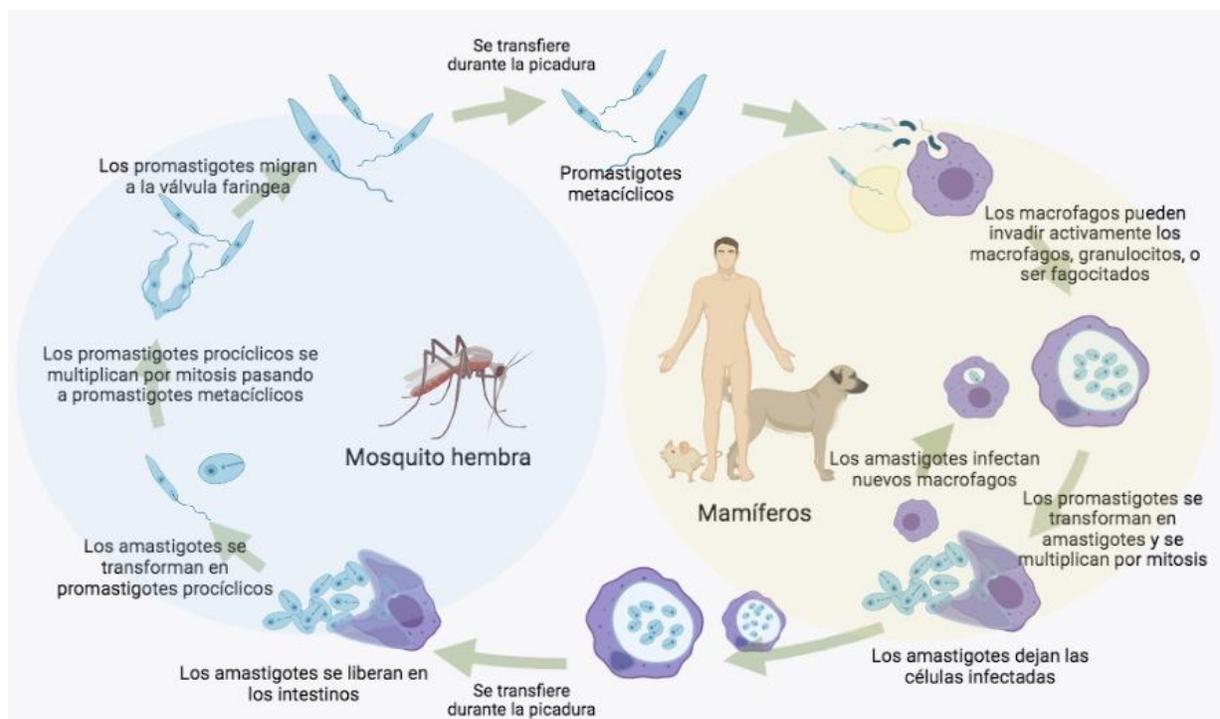
### 2.2.2 Ciclo biológico de *Leishmania*

El ciclo biológico de *Leishmania* (**Figura 2**) comienza con la infección del mosquito al ingerir sangre de un mamífero que contiene parásitos en forma de amastigotes. Durante 4-25 días, el parásito continúa su desarrollo y se transforma en promastigote, comenzando a dividirse por fisión binaria, aumentando su número, migrando hacia la faringe y probóscide, para ser transmitidas en la siguiente picadura (Grill et al., 2017) . Con la picadura del mosquito en un

mamífero vertebrado sano, este transmite las formas promastigote con capacidad infectiva (promastigotes metacíclicos) los cuales penetran en la piel del hospedero y entran en contacto con la circulación sanguínea del vertebrado. Posteriormente los promastigotes son fagocitados por células del sistema retículo endotelial (macrófagos) y en el interior de estas, tienden a transformarse en amastigotes que se reproducen o comienzan a multiplicarse por fisión binaria, hasta que rompen la célula, debido a que se alcanza un límite de protozoos intracelulares. Los amastigotes son liberados en la circulación siendo fagocitados de nuevo y colonizan células adyacentes, repitiendo el ciclo en el hospedador vertebrado hasta que son ingeridas por un nuevo mosquito (Grill et al., 2017)). El ciclo se cierra cuando un nuevo flebótomo ingiere sangre con macrófagos infectados.

## Figura 2

### *Ciclo de la Leishmania*



*Nota:* Se observa el ciclo de vida del parásito en el interior del mosquito y el mamífero. Tomado de (Montalvo et al., 2012) y modificada en BioRender.

### 2.3 Tratamientos actuales en leishmaniasis

La selección de opciones de tratamiento para las leishmaniasis en las Américas se basa en las manifestaciones clínicas, número y ubicación de las lesiones, especies de *Leishmania*, estado general del paciente y disponibilidad de fármacos (PHAO-WHO, 2015). Las recomendaciones actualizadas de la OMS para el tratamiento de la LC en las Américas consisten en tratamientos locales como la termoterapia, antimoniales intralesionales, tratamientos tópicos (fármacos aplicados directamente sobre la piel) y tratamientos sistemáticos, los cuales se toman por vía oral o se administran mediante inyección y se distribuyen por todo el organismo, como los antimonios pentavalentes, miltefosina, isetionato de pentamidina, ketoconazol, anfotericina B-liposomal y anfotericina B-desoxicolato (PHAO-WHO, 2015). En la (Tabla 2) se enumeran las recomendaciones actualizadas de la OMS para el tratamiento de la leishmaniasis en las Américas (PHAO-WHO, 2015).

**Tabla 2.**

*Tratamientos para leishmaniasis en las Américas, recomendaciones de la OMS*

Tratamiento	Vía de administración	Régimen	Eficacia	Referencia
<b>Tratamientos locales</b>				
Termoterapia	Calor localizado con dispositivo electromagnético o generador de ondas de alta frecuencia	Después de anestesia local, el electrodo es aplicado a 50°C por periodos de 30 segundos, hasta que el área total de la lesión este cubierto. 1 a 3 sesiones a la semana.	70% en ( <i>L. trópica</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> )	(López et al., 2012)
Antimoniales intralesionales	Inyección intradérmica	1-5 infiltraciones de 1-5 ml por sesión, dependiendo del	LC: > 90% ( <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> ) LM:	(L. F. Oliveira et al., 2011)

		tamaño de la lesión, cada 3 a 7 días.	30–90% basado en la ubicación geográfica y la dosificación	
Pomada de paromomicina	Tópica	Aplicado dos veces al día hasta 4 semanas.	LC: 30–90%, <i>L.</i> <i>major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L.</i> <i>(V.) panamensis</i> , <i>L. (V.)</i> <i>braziliensis</i> , <i>L.</i> <i>(L.) amazonensis</i> )	(Vakil et al., 2015)
<b>Tratamientos sistémicos</b>				
Antimonios pentavalentes	Intravenoso o intramuscular	10-20 mg Sb+5/kg/día en dosis únicas diarias durante 20 días.	LC: > 90% ( <i>L.</i> <i>(V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.)</i> <i>panamensis</i> ) LM: 30–90%	(Vélez et al., 2010)
Miltefosina	Oral	1,5-2,5 mg/kg/día, con dosis máxima de 150 mg/día, durante 28 días.	LC: > 80% ( <i>L.</i> <i>(V.) panamensis</i> , <i>L. (L.) major</i> ) LM: 58–83% ( <i>L.</i> <i>(V.) braziliensis</i> ) LV: > 90% (South Asia) LV: 94–97% ( <i>L.</i> <i>donovani</i> )	(P. R. Machado et al., 2010)
Isetionato de pentamidina	Intramuscular	3-4 mg/kg/día en 3-4 dosis en días alternos.	LC: > 90% ( <i>L.</i> <i>(V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.)</i> <i>guyanensis</i> , <i>L.</i>	(Neves et al., 2011)

			<i>(L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) shawi</i>	
Ketoconazol	Oral	600 mg/día por 28 días	LC: 70–89% ( <i>L. (V.) mexicana</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> , <i>L. (L.) major</i> )	(Saenz et al., 1990)
Anfotericina B liposomal	Intravenosa	2–3 mg/kg/día hasta 20–40 mg/kg dosis total	LM: 83% (Brazil, n=6) LV: 96% (India, n=51) LV: 95% (Sur de Asia; dosis de 10 mg/kg) y 90% (otras regiones, dosis total de 20–30 mg/kg)	(Motta & Sampaio, 2012)
Anfotericina B desoxicolato	Intravenosa	0,7 a 1 mg/kg/día hasta 25-30 dosis totales	LM: 51–88% LV: 96% (India, n=51)	(Morrison et al., 2010)

*Nota:* LC: leishmaniasis cutánea, LV: leishmaniasis visceral, LM: leishmaniasis mucosa/mucocutánea. Tomado de: (PHAO-WHO, 2015) (Vakil et al., 2015).

En la actualidad existen más de 25 fármacos que han demostrado efecto leishmanicidas, pero solo unos pocos de ellos se encuentran clasificados como sustancias válidas para su uso en humanos (Melissa et al., 2021). Algunas de estas sustancias son los antimonios pentavalentes los cuales existen en dos presentaciones: el antimoniato de meglumina y el estibogluconato de sodio, ambas presentaciones comerciales son igualmente efectivas para el tratamiento de las leishmaniasis, aunque tengan distintas concentraciones de Sb+5. Se encuentra con el nombre comercial de Glucantime (OPS, 2018). El tratamiento intralesional de la LC con antimoniales pentavalentes puede ser un tratamiento efectivo, con mínimas complicaciones y muchas ventajas, ya que se alcanza una alta concentración de fármaco en el lugar de la infección, posee escasa toxicidad sistémica y disminución importante del costo del tratamiento (OPS, 2018). La

miltefosina por su lado es un análogo de la alquilfosfocolina con efectos antitumorales. Fue el primer medicamento oral disponible para el tratamiento de las tres formas de leishmaniasis (Vakil et al., 2015). Se ha utilizado durante la última década en 14 países para el tratamiento de LV y LC. La FDA aprobó recientemente la miltefosina para el tratamiento de la LV, la LC y la LM en pacientes de al menos 12 años en los Estados Unidos (Vakil et al., 2015).

El isetionato de pentamidina es un anti protozario que interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos, inhibiendo la fosforilación oxidativa o impidiendo la incorporación de nucleótidos y ácidos nucleicos al ADN/ARN de los protozoos, por lo tanto, es usado en el tratamiento antileishmania (AEP, 2021). Presenta actividad frente a *Pneumocystis jiroveci* (*P. carinii*), *Trypanosoma gambiense* y *Leishmania spp* (AEP, 2021). El ketoconazol es un fármaco antimicótico imidazólico relacionado estructuralmente con los compuestos como el miconazol y el econazol. Sin embargo, aunque conserva un espectro igualmente amplio de actividad antimicótica, se diferencia de los miembros de este grupo en que puede administrarse por vía oral para tratar una amplia variedad de infecciones fúngicas superficiales o "profundas" (Heeres et al., 2010). Por otro lado, anfotericina se ha usado en tratamientos eficaces, existe en dos presentaciones una como desoxicolato de anfotericina B y la otra unida a liposomas o "liposomal". La anfotericina B liposomal es una presentación que posee una mayor eficacia, ya que se incorpora con mayor facilidad a las células del sistema macrofágico-monocítico, en donde ejerce su acción antileishmánica en forma directa, por lo que tiene menos efectos adversos que la presentación como desoxicolato (OPS, 2018).

Los efectos adversos y contraindicaciones de cada tratamiento (Vakil et al., 2015) se muestran en la (Tabla 3).

**Tabla 3.**

*Efectos adversos de los tratamientos antileishmania*

<b>Tratamiento</b>	<b>Efectos adversos</b>	<b>Contraindicaciones</b>
Termoterapia	Dolor local generalmente bien tolerado	No recomendable en pacientes con lesiones y regiones periarticulares

Antimoniales pentavalentes	<p>Frecuentes: dolor muscular, rigidez articular, náuseas, vómitos</p> <p>Graves: erupción cutánea, toxicidad, cardíaca o hepática, nefrotoxicidad, pancreatitis aguda, leucopenia, trombocitopenia.</p>	<p>Contraindicado en mujeres embarazadas o que amamantan, formas graves de leishmaniasis, antecedentes de reacción, con trastornos cardíacos, renales o hepáticos graves.</p>
Pomada de paromomicina	<p>Diarrea, calambres abdominales, náuseas, vómitos, acidez estomacal, dermatitis, prurito.</p>	-
Miltefosina	<p>Dolor de cabeza, náuseas, vómitos, diarrea, elevación del nivel de enzimas hepáticas, creatinina sérica, elevación de la concentración, trombocitopenia, dolor escrotal, eyaculación disminuida, síndrome Stevens-Johnson, teratogenicidad</p>	<p>Contraindicación absoluta en embarazadas</p>
Isetionato de pentamidina	<p>Frecuentes: fatiga, fiebre, mareos, pérdida de apetito, tos, disnea.</p> <p>Graves: nefrotoxicidad, paro cardíaco, arritmias, hipotensión, pancreatitis, inducción de diabetes mellitus y anomalías electrolíticas.</p>	<p>Pacientes con alteraciones hepáticas, pancreáticas o renales.</p>

Ketoconazol	Dolor de cabeza, náuseas, dolor abdominal, vómitos, diarrea.	Insuficiencia hepática
Anfotericina B liposomal	Frecuentes: fiebre, escalofríos, insuficiencia renal, hipopotasemia, disminución del nivel de hemoglobina.	Contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a alguno de sus componentes
Anfotericina B desoxicolato	Graves: nefrotoxicidad, insuficiencia renal y reacciones relacionadas con la perfusión.	Contraindicada en pacientes con insuficiencia renal, hipersensibilidad conocida a alguno de sus componentes

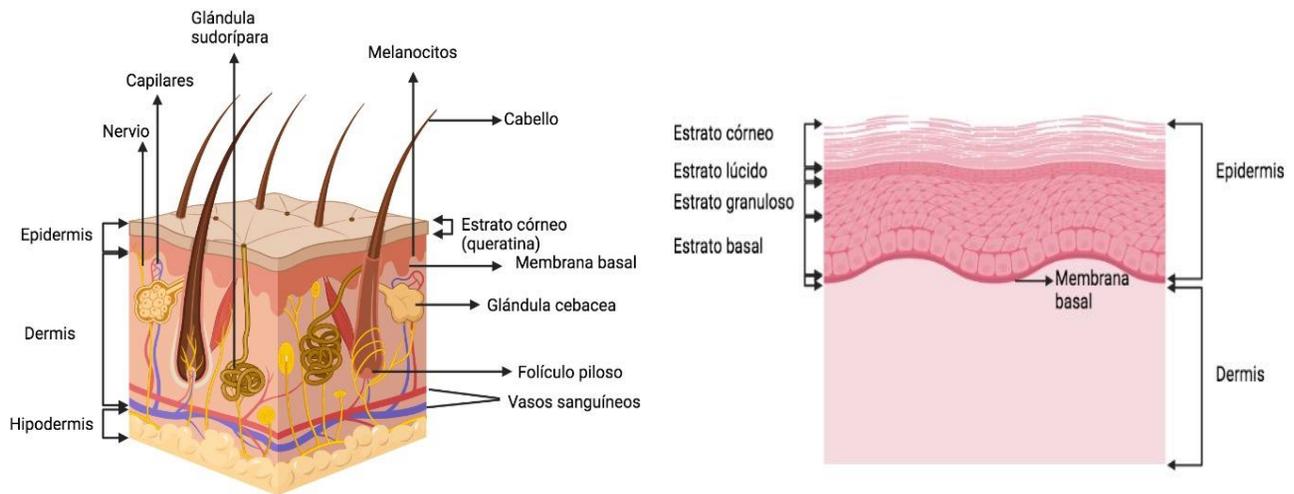
*Nota:* Tomado de (Vakil et al., 2015)

## 2.4 Piel y sus estudios en LC

La LC como su nombre lo indica, afecta la piel de quien la padece, en la cual se pueden presentar diferentes tipos de lesiones (OPS, 2013). La piel es el órgano más grande del cuerpo y representa aproximadamente el 15% del peso corporal total de un adulto. Realiza muchas funciones vitales, incluida la protección contra agresores físicos, químicos y biológicos externos, así como la prevención de la pérdida excesiva de agua del cuerpo y un papel en la termorregulación (Sandra Lawton, 2019). La piel está conformada por varias capas tal como se muestra en la **(Figura 3)**, donde se observa la epidermis (compuesta principalmente de queratinocitos), debajo se encuentra la membrana basal (conocida como dermoepidérmica) estructura estrecha de varias capas que actúa como puente de unión entre la epidermis y la dermis, y debajo de esta se encuentra la dermis y la hipodermis, que se compone principalmente de grasa (Sandra Lawton, 2019).

### Figura 3.

#### *Estructura, partes y capas de la piel*



*Nota:* Se muestran las diferentes partes de la piel y sus capas, así como las capas de la epidermis. Tomado de (Sandra Lawton, 2019) y editado en BioRender.

La epidermis es la capa externa de la piel, definida como un epitelio escamoso estratificado, compuesto principalmente por queratinocitos en etapas progresivas de diferenciación (Sandra Lawton, 2019), la cual depende completamente de la dermis para el suministro de nutrientes y la eliminación de desechos mediante la membrana basal (estructura estrecha, ondulada y de varias capas que se encuentra entre la epidermis y la dermis, la cual proporciona cohesión entre las dos capas) (Sandra Lawton, 2019)(Sandra Lawton, 2019). La función principal de la epidermis es actuar como barrera física y biológica para el ambiente externo, previniendo penetración de irritantes y alérgenos. Al mismo tiempo, evita la pérdida de agua y mantiene la homeostasis interna. La epidermis está compuesta por cuatro (4) capas (**Figura 3**): estrato corneo (capa cornea), estrato lúcido (solo en piel gruesa, palma de manos, plantas de los pies, dedos), estrato granuloso (capa granular), estrato espinoso (capa de células espinosas) y estrato basal (capa germinativa). Por otro lado, la dermis forma la capa interna de la piel y es mucho más gruesa que la epidermis (1-5 mm). Situada entre la zona de la membrana basal y la capa subcutánea, la función principal de la dermis es sostener y dar soporte a la epidermis. Las principales funciones de la dermis son: protección, amortiguando las estructuras más profundas de lesión mecánica, proporcionar alimento a la epidermis, jugar un papel importante en la herida y curación (Sandra Lawton, 2019).

En el estudio de la piel existen procedimientos que pueden ser realizados directamente en el sujeto o también aquellos que permiten analizar material obtenido, como muestras de piel, secreciones, sangre entre otros (Chaparro, 2015).

El diagnóstico de LC por lo general depende de la forma clínica de presentación y de las posibilidades tecnológicas existentes en el servicio médico que recibe al paciente. Las pruebas de laboratorio básicamente se dividen en directas (donde se observa el agente etiológico o parásito) e indirectas, las cuales miden la respuesta inmunitaria del paciente con respecto a la leishmaniasis (PHAO-WHO, 2015). Los métodos de diagnóstico directos disponibles son: frotis o examen directo, cultivo, anatomía patológica y reacción en cadena de polimerasa; por otro lado, los métodos indirectos disponibles son: inmunofluorescencia indirecta, o ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (PHAO-WHO, 2015). Las lesiones de LC se caracterizan por atrofia o hiperplasia de la epidermis, infiltrado inflamatorio consistente de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas con áreas de necrosis focal (Vera et al., 2006). En las fases tempranas de la infección se pueden detectar macrófagos infectados, que se traducen como escasos histiocitos vacuolados que contienen el parásito (cuerpos de Leishman), así como infiltrados intensos de neutrófilos. Sin embargo, en fases tardías disminuyen los macrófagos infectados, por lo que en estos casos es difícil observar el parásito y predominan los infiltrados linfocíticos (Vera et al., 2006). Existe tendencia a formar granulomas tuberculoides (con presencia de células gigantes, macrófagos fusionados debido a la persistencia de componentes antigénicos del parásito) rodeados de un manguillo de linfocitos. Las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada presentan macrófagos altamente parasitados y pocos linfocitos en toda la dermis (Vera et al., 2006).

## **2.5 Formulaciones farmacéuticas**

### ***2.5.1 Formas farmacéuticas tópicas***

En una preparación tópica, el principio activo, o fármaco, se mezcla con un principio inactivo llamado vehículo. La consistencia del producto resultante depende del vehículo (por ejemplo, espesa y aceitosa o ligera y acuosa) y determina si el principio activo permanece sobre la superficie o penetra en la piel (Jonette, 2021). El diseño, la composición y la elaboración de los medicamentos es crucial para lograr el cumplimiento de las metas farmacoterapéuticas. Uno de los factores más relevantes en la biodisponibilidad de un medicamento es la forma en que se dispone

de un fármaco, considerando la forma farmacéutica en la que está formulado y la vía de administración (**Tabla 4**) (Chávez, 2014). Una biodisponibilidad óptima se logra a partir del diseño de una molécula farmacológica, así como del conocimiento de sus características fisicoquímicas, estas son determinantes para que el fármaco sea absorbido de manera adecuada. Las características fisicoquímicas más relevantes para elegir una forma farmacéutica idónea son: solubilidad, estado sólido (forma cristalina o amorfa), polimorfismo del fármaco, isomería y quiralidad, forma y tamaño de partícula y grados de disociación y estabilidad del fármaco en estado sólido o líquido (Chávez, 2014) .

**Tabla 4.**

*Formas farmacéuticas*

<b>Forma farmacéutica</b>	<b>Características</b>	<b>Aplicación</b>
Pasta	Acuosa con acción superficial o grasa con baja absorción	Lesiones exudativas, idóneo para los pliegues
Polvos	No atraviesan la capa córnea. Acción superficial	Secantes, refrescante y antiinflamatorio superficial
Gel	Absorción baja/media Deposita el fármaco superficialmente	Lesiones agudas, heridas exudativas. Áreas pilosas y cara, pieles grasas
Crema	Absorción media, poca capacidad oclusiva, acción refrescante	Lesiones agudas, subagudas o húmedas, áreas de piel fina (axilas, cara, escroto), pieles normales.
Pomada	Absorción alta, capacidad oclusiva media. Acción emoliente y lubricante	Lesiones crónicas, secas o escamosas. Áreas de piel gruesa (palmas, plantas). Piel seca o hiperqueratósicas
Ungüento	Absorción muy alta, capacidad oclusiva importante y emoliente	Lesiones crónicas, dermatosis localizadas. Áreas de piel gruesa (palmas, plantas), pieles

hiperqueratósicas y liquenificadas. Ideal para ablandar escamas y costras

Nota: tomado de Chávez, 2014

### 2.5.2 Clasificación de las formas farmacéuticas

Las formas farmacéuticas se pueden clasificar según su: esterilidad, estado de la materia y vía de administración, como se muestra en la (Tabla 5).

**Tabla 5.**

*Clasificación de formas farmacéuticas*

Clasificación	División	Definición / subdivisión
Esterilidad	Estériles	Sin microbiana de ninguna clase.
	No estériles	Permiten un máximo de carga microbiana (especificidad como unidades formadoras de colonias) ausencia total de patógenos.
Estado de la materia	Sólidos	Uno o más principios activos sólidos están dispersos en una mezcla de sólidos (conocida como excipiente) ejemplo: polvo estéril para inyección, liofilizados
	Líquidos	Mezclas homogéneas donde un sólido o un líquido está disuelto en otro líquido. Pueden ser soluciones acuosas o no acuosas (oleosas, etc.).
		Homogéneos: soluciones parenterales y oftálmicas Heterogéneos: emulsiones y suspensiones intramusculares
	Semisólidos	Más oclusiva ya que forman una capa impermeable sobre la piel que evita la evaporación del agua. Ej. Cremas, ungüentos, pomadas, supositorios y geles
Formas especiales	Las que se utilizan con mayor frecuencia son: Cartuchos presurizados, dispositivos de polvo seco, jeringas precargadas, parches, nebulizadores, implantes o pellet	

Vía de administración	Directas o mediatas		Oral, rectal, sublingual, respiratoria
		Tópicas	cutánea o dermatológica, oftálmica, ótica nasal, bucal, vaginal transdérmica.
	Indirectas		Intravenosa, intramuscular, subcutánea o hipodérmica
		Otras vías parentales	intradérmica Intraarterial, intracardiaca, intratecal, epidural, intraarticular, intraperitoneal intraamniótica.

*Nota:* tomado de (López G et al., 2001)

### 2.5.3 Criterios de selección de formas farmacéuticas

La indicación preferente de cada forma o presentación farmacéutica para un tipo de lesiones específicas se hace en función del grado de absorción que se desea, de la localización de las lesiones, del estado de la piel y del grado de inflamación de la patología a tratar (García et al., 2015) (González, 2015). La elección del vehículo depende del lugar donde se aplicará el medicamento, qué aspecto tendrá y si conviene aplicarlo y dejarlo actuar. En la **(Tabla 6)** se muestra los criterios establecidos para la selección de las formas farmacéuticas.

**Tabla 6.**

*Criterios de selección de formas farmacéuticas*

Criterio	Descripción
Grado de absorción	Se refiere a igualdad de principio activo, dosis y concentración, la potencia o grado de absorción disminuye en el siguiente orden: ungüento > pomada > crema > gel > loción > polvo.
Localización de la lesión	Se debe elegir vehículo más adecuado dependiendo del grosor de la capa córnea y el grado de vascularización de la zona a tratar.
Estado de la piel	Se tiene en cuenta el estado del estrato córneo, si está ausente, dañado o engrosado o si la lesión es seca o con exudado.

Grado de inflamación de la piel	Procesos agudos (lesiones húmedas, inflamación y vesiculación)	Se escogen los preparados acuosos no oclusivos (leche, cremas) pues ejercen una acción de secado de la piel y las heridas.
	Lesiones crónicas (costras y fisuras, formación de escamas y purito)	Requieren tratamientos oclusivos para favorecer la rehidratación de la zona afectada, por lo que se usan excipientes más grasos, como pomadas y ungüentos.

*Nota:* tomado de (García et al., 2015) (González, 2015).

## 2.6 Tratamientos tópicos en LC

Históricamente el uso de tratamientos tópicos para la leishmaniasis ha sido controversial, sin embargo, en el comité de expertos de la OMS en leishmaniasis de 2010 se recomendó estudiar el uso de tratamientos tópicos para los casos de LC no complicada (Jaramillo & Alexander, 2021). Sin embargo, aún no se ha desarrollado ningún producto que cumpla con todos los requisitos para conseguir ser una terapia de primera línea. Una de las principales líneas de investigación en este campo se basa en la eficacia antiparasitaria de los aminoglucósidos como la paromomicina. En la (Tabla 7) se menciona un recuento de algunos de los ensayos clínicos usando tratamientos tópicos para LC en las Américas (Jaramillo & Alexander, 2021).

**Tabla 7.**

*Ensayos clínicos de tratamiento tópicos en pacientes con leishmaniasis cutánea*

Autor	País, año	Población	Diseño del estudio	Tipo de tratamiento	Principal resultado
(López et al., 2018)	Colombia, 2018	80 pacientes con diagnóstico parasitológicos (dos grupos de	Estudio Fase I/II aleatorio, abierto y no comparativo.	Anfotericina B; formulación tópica al 3%	Anfoleish mostro ser una intervención segura y bien

		tratamiento 2 o 3 veces por día)		llamada Anfoleish	tolerada. Sin embargo, su eficacia no llego al 40%.
(P. R. L. Machado et al., 2018)	Brasil, 2018	38 pacientes (dos grupos de tratamiento)	Un ensayo clínico piloto controlado aleatorio	Tamoxifeno y antimoniato de meglimina	La administración de tamoxifeno oral y Sb <sup>V</sup> resultó en tasas de curación más altas en comparación con el tratamiento estándar, sin diferencia estadística
(Sosa et al., 2019)	Panamá, 2019	399 pacientes con LC	Ensayo clínico fase III aleatorio, doble ciego	Paromomicina- gentamicina, aplicado una vez al día por 20 días	Tasas de curación cercanas al 80%, similar a los antimoniales.

*Nota:* Tomado de: (Jaramillo & Alexander, 2021).

Los modelos murinos de LC usando diferentes especies de parásitos de *Leishmania* han permitido una mejor comprensión de la enfermedad, ya que reproducen las características clínicas, parasitológicas, histopatológicas e inmunológicas de la leishmaniasis cutánea en humanos (Scorza et al., 2017). Esto ha facilitado la evaluación de potenciales fármacos por vía oral o tópicos y el estudio de candidatos a vacunas (Scorza et al., 2017). En ese sentido, como se observa en la (**Tabla 8**), varios reportes registran diferentes tratamientos tópicos para la LC en modelos animales, donde sobresalen principalmente cepas del nuevo mundo (Scorza et al., 2017).

**Tabla 8.***Ensayos murinos de tratamiento tópico para lesiones cutáneas*

<b>Autor</b>	<b>País, Año</b>	<b>Cepa de ratón</b>	<b>Cepa de <i>Leishmania</i></b>	<b>Tipo de tratamiento</b>	<b>Principal resultado</b>
(Neira et al., 2019).	Colombia, 2019	Ratones BALB/c	<i>L. (V.) panamensis L. braziliensis</i>	Miltefosina en gel (0.5%)	Reducción del tamaño de lesiones, sin efectos adversos.
(Vera et al., 2018)	Colombia, 2018	Ratones BALB/c	<i>L. (V.) panamensis L. braziliensis</i>	Ketoconazol preparación en gel, crema y lipogel	No efectiva para el tratamiento de la LC
(Muñoz et al., 2019)	Colombia, 2019	Ratones BALB/c	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Pentamidina	El 3-PACK tópico fue efectivo con reducción total de lesiones.
(Parihar et al., 2016)	Estados Unidos, 2016	Ratones BALB/c	<i>L. major</i>	Simvastatina	Suprime la formación de biopelículas bacterianas, y síntesis de proteínas y toxinas MRSA.
(Lezama-Dávila et al., 2016)	2016, Brasil	Ratones C57BL	<i>L. (L.) mexicana</i>	Solamargina (45,1%) y Solasonina (44,4%) planta	Destrucción e in vivo de parásitos de <i>L. mexicana</i> .
(C. De Oliveira, 2012)	2019, Estados Unidos	Ratones BALB/c	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Oxidantes de peróxido de	Disminución en el porcentaje de células infectadas

				hidrógeno, menadiona,	y la carga de parásitos.
(Montoya et al., 2015).	2015, Estados Unidos	Hamsters	<i>L. (V)</i> <i>panamensis</i>	Hipericina 0.5 %	Reducción de la infección intracelular (carga de parásitos).
(Rueda Paez et al., 2018)	2018	Ratas Winstar	<i>L. (L.)</i> <i>infantum L.</i> <i>(V)</i> <i>panamensis L.</i> <i>(V.)</i> <i>braziliensis</i>	Transferosomas compuestos por una bicapa lipídica de fosfatidilcolina	Los estudios fueron negativos
(Vera et al., 2018)	2018, Colombia	Ratones BALB/C	<i>L. (V.)</i> <i>panamensis</i>	Ketoconazol.	Los sistemas farmacéuticos de ketoconazol (SF- KTZ) administrados tópicamente no fueron eficaces.

Nota. Tomado de (Scorza et al., 2017).

## 2.7 *Chenopodium ambrosioides* (paico, epazote)

### 2.7.1 Generalidades: que es, nombres, distribución geográfica, taxonomía

El *C. ambrosioides* o paico es una planta aromática y medicinal que se ha utilizado por siglos como condimento y contra parásitos intestinales (Aros et al., 2019). Es una planta perenne, más o menos pubescente, con el tallo usualmente postrado, olor fuerte, de aproximadamente 40 cm de altura; las hojas son oblongo-lanceoladas y serradas, de entre 4 cm de longitud y 1 cm de ancho, con pequeñas flores verdes en panículos terminales densos, cada uno con cinco sépalos; el cáliz persistente circunda al fruto, y las semillas son negras, brillantes y lisas, no mayores a 0,8 mm de longitud (Monge et., al 2013). El paico, es propio del continente americano y naturalizado en las regiones templadas de casi todo el mundo. Las flores contienen una gran cantidad de un

aceite esencial, causa del fuerte olor característico de la planta (**Figura 4**). Esta planta es ampliamente distribuida como maleza, encontrándose también en huertos. (Lude, 2019). La descripción taxonómica de la planta de *C. ambrosioides* se muestra en la (**Tabla 9**).

**Figura 4.**

*Fotografía de la planta C. ambrosioides*



*Nota.* Se muestra las características de la planta de *C. ambrosioides* (Zhu et al., 2012).

**Tabla 9.**

*Descripción taxonómica de C. ambrosioides*

<b>Dominio</b>	Eukarya
<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	Tracheobionta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Caryophyllales
<b>Familia</b>	Chenopodiaceae
<b>Sub-familia</b>	Chenopodioideae
<b>Genero</b>	<i>Chenopodium</i>
<b>Especie</b>	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
<b>Nombre Vulgar</b>	Paico / Epazote

*Nota:* Tomado de (Puma, 2019).

El *C. ambrosioides* se ha encontrado en municipios del departamento de Bolívar, como Mahates y comunidades indígenas como Coreguaje del alto Caquetá en la Amazonía colombiana (Trujillo et., al 2010). La Universidad Nacional de Colombia reporta la presencia de la planta en el Amazonas, Antioquia, Atlántico, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Santander, Valle (Bernal et al., 2014). De igual manera se ha reportado el uso de la planta por nativos en provincias como Loreto-Perú, para el tratamiento de la LC y la malaria. Por su parte en zonas costeras de Brasil uno de los principales productos naturales usados por la población rural son las infusiones de las hojas y el polvo de la planta de *C. ambrosioides*; Los nativos afirman que esta planta la usan para tratar afecciones cutáneas causadas por *L. (V.) braziliensis* directamente en las lesiones (Franca et al., 1996).

### **2.7.2 Usos de la planta en medicina**

La planta de *C. ambrosioides* hace parte de las plantas medicinales más utilizadas en Colombia (Bernal et al., 2011). En la medicina popular de muchos países de América Latina y el Caribe se utiliza en decocciones e infusiones de la planta de *C. ambrosioides*, (así como su AE) por sus propiedades antihelmínticas (fármacos utilizados en el tratamiento de las helmintiasis, es decir las infestaciones por vermes, helmintos o, usando un término menos técnico lombrices), vermífugas (que mata o expulsa las lombrices intestinales), emenagogas (referirse a los principios activos, medicamentos o remedios a base de hierbas, que pueden estimular el flujo sanguíneo en el área de la pelvis y el útero, y en algunos casos, fomentar la menstruación) y abortifacientes (sustancias químicas que interrumpen el embarazo después de la implantación). La planta se encuentra comúnmente en los hogares como remedio a un gran número de enfermedades, así como ingrediente culinario. En la **(Tabla 10)** se enumeran los usos etnobotánicos de la planta de *C. ambrosioides* alrededor del mundo. La manera tradicional de preparar la planta de *C. ambrosioides* es a partir de las hojas secas, con un aroma característico, preparadas como una infusión, resultando en una preparación de color amarillo intenso al agua. Esta infusión da un sabor medio si no está muy concentrado la cual se toma en cuanto está al tiempo (Gómez, 2008). La infusión de hojas y flores en el Caribe y Centro América se emplea como tónico estomacal, carminativo y antihelmíntico por su acción paralizante y narcótica sobre ascárides, oxiuros y anquilostomas. Se ha comprobado que su extracto acuoso inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*; las hojas

tienen actividad antiamebiana, antifúngica, antimalárica (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax in vitro* y *P. berghei*) en ratones.

**Tabla 10.**

*Usos de la planta de C. ambrosioides*

USO	LOCALIDAD
Amebicida	Trinidad
Analgésico	China
Anemia	Colombia
Artritis	China
Asma	República Dominicana, Panamá, Trinidad y Turquía
Mordeduras de insectos	China
Disentería	Panamá y Trinidad
Fungicida	Trinidad
Narcótico	Estados Unidos de América
Nervios	México, Turquía y Estados Unidos de América
Estimulante	Trinidad y Turquía.
Cólicos	Brasil, Chile, China, República Dominicana, Guatemala, Haití, México, Panamá, España, Trinidad, Turquía, Estados Unidos de América y Venezuela.

*Nota:* Tomado de (Gómez, 2008)

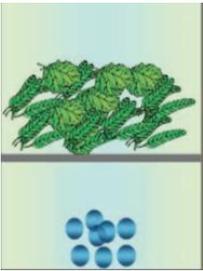
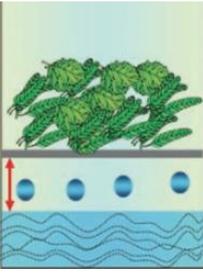
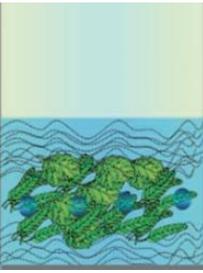
### 2.7.3 Aceite esencial (AE) de la planta de *C. ambrosioides*

El material vegetal (planta aromática), al ser sometido al vapor de agua, libera una mezcla odorífera líquida (AE) de una gran variedad de sustancias volátiles, que recuerdan el olor, en forma muy concentrada, de la misma planta. Esta mezcla puede tener desde 50 hasta más de 300 sustancias químicas y está compuesta por hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como por éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros derivados. Los aceites esenciales o volátiles se producen en cantidades

apreciables (0.5–6%) (Stachenko, 2009). En la (Tabla 11) se muestra los métodos comunes de extracción de aceites esenciales.

**Tabla 11.**

*Métodos de extracción de aceites esenciales*

Método	Definición
<p data-bbox="245 527 488 562">Arrastre por vapor</p> 	<p data-bbox="529 562 1377 814">Se lleva a cabo con un vapor seco sobrecalentado, que penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, la corriente de vapor rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante.</p>
<p data-bbox="264 863 469 957">Destilación con agua-vapor</p> 	<p data-bbox="566 1010 1338 1104">Se emplea un vapor de agua que traspasa el material vegetal suspendido encima y apoyado sobre una malla.</p>
<p data-bbox="256 1262 474 1297">Hidrodestilación</p> 	<p data-bbox="545 1350 1360 1497">El material vegetal se sumerge directamente al agua, que se calienta a hervor. Se usa para la destilación del material vegetal delicado, por ejemplo, flores (ylang-ylang, rosas).</p>

*Nota:* tomado de (Stachenko, 2009)

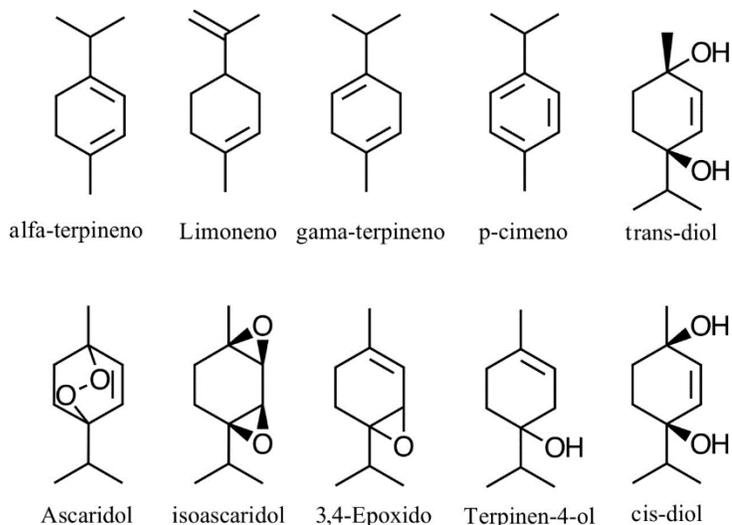
El AE de *C. ambrosioides* es extraído usando diferentes partes de la planta, las partes más utilizadas son las hojas y ramas y se extrae comúnmente usando el método de destilación de arrastre. El extracto vegetal principal del paico es un AE que se forma en los pelos glandulares que

existen en hojas, flores y frutos. Este AE es el componente activo de mayor responsabilidad de las propiedades de la planta, el cual está compuesto por el ascaridol, en un 60-80%, y otros compuestos hidrocarbonados como el *p*-cimeno, limoneno, carvacrol, y cineol (Monzote et al., 2006). Además, existen en la planta de *C. ambrosioides* distintos aminoácidos, como el ácido oxálico y el ácido succínico. También se encuentran concentraciones variables de glucosa y ácido málico (Lude, 2019). El AE se aplica en el tratamiento de trastornos digestivos, respiratorios, urogenitales, diabetes e hipercolesterolemia (Kuetze, 2014) así como para el tratamiento de menstruaciones irregulares, dismenorrea y como hemostático (Ososki et al., 2002). Este AE también se conoce como aceite de lombriz americano o aceite de Baltimore. Con base científica, se ha descubierto y reportado que este aceite posee potenciales en algunos trastornos de la piel que involucran dermatofitos (Kuetze, 2014) así como la erradicación de parásitos intestinales, disentería amebiana y gusanos redondo (Horace, 1927). Posee una actividad citotóxica significativa contra la línea celular HT29 tumoral humana (Conway et., al 1979).

Los componentes principales del AE de *C. ambrosioides* son de naturaleza monoterpénica (C10) y sesquiterpénica (C15). Se destaca principalmente el ascaridol que es un peróxido terpénico, así en menor medida se encuentran compuestos como limoneno, transpinocarveol, aritasona,  $\beta$ -pineno, mirceno, felandreno, alcanfor y  $\alpha$ -terpineol (Gómez, 2008). En la (**Figura 5**) se muestran las estructuras de los principales componentes (Gómez Castellanos, 2008). Los componentes principales del AE de *C. ambrosioides* dependen del tiempo de cosecha, hora de recolección, temperatura y otros factores (Stachenko, 2009). En la (**Tabla 12**) se muestran los componentes principales identificados del AE de *C. ambrosioides* por diversos autores.

**Figura 5.**

*Componentes principales del AE de C. ambrosioides*



*Nota:* Estructura de los principales terpenos y terpenos oxigenados presentes en el AE de *C. ambrosioides*. Tomado de (Gómez, 2008).

**Tabla 12.**

*Componentes del AE de C. ambrosioides*

AUTORES	COMPONENTES MAYORITARIOS
(Jaramillo et al., 2012) El AE se obtuvo mediante hidrodestilación de las hojas.	$\alpha$ -terpineno (60,29 %), <i>p</i> -cimeno (20,49 %), 4-careno (7,96 %), <i>trans</i> -ascaridol (1,91 %), carvacrol (1,64 %), limoneno (1,10%), timol (1,02%) y otros.
(Monzote et al., 2006) El aceite fue obtenido por destilación de las hojas	carvacrol (62.36%) y ascaridol (22.54%)
(Moses, 2009) El AE se obtuvo por hidrodestilación de las partes aéreas de la planta.	$\alpha$ -terpineno (63.1%), <i>p</i> -cimeno (26.4%) y ascaridol (3.9%).
(Zhu et al., 2012)	( <i>Z</i> )-ascaridol (29.7%), isoascaridol (13.0%), and <i>p</i> -cimeno (12.7%) seguido por

El polvo molido de las partes aéreas de la planta se sometió a hidrodestilación. piperitona (5.0%), isotimol (4.9%), y 3, 4-epoxi-*p*-menta-2-ona (4.1%).

*Nota:* Tomado de (Puma, 2019).

En cuanto a los componentes del AE, se sabe que el ascaridol es el primer peróxido natural aislado del AE de las hojas de *Dysphania ambrosioides* (L.). Este es un compuesto orgánico natural, clasificado como un monoterpeno bicíclico (Estrada et al., 2012). El ascaridol tiene efectos antihelmínticos y es uno de los componentes más importantes al cual se le atribuyen las propiedades antiparasitarias, antimaláricas, antifúngicas, hipotensoras, relajantes musculares, estimulantes respiratorias, depresoras cardiacas, antibacterianas entre otras del AE de *C. ambrosioides* (Estrada et al., 2012). Existe discrepancia en cuanto al uso del ascaridol purificado. En un estudio se encontró que el ascaridol es más activo que el AE de *C. ambrosioides* en el control de parásitos, y que su toxicidad es baja. Estableciendo que la toxicidad se debe a la presencia de otros compuestos en el aceite esencial. Aportando también que el ascaridol es convertido a glicol anhídrido, debido a sobrecalentamiento, se pierde las propiedades antihelmínticas y la toxicidad aumenta (Lude, 2019). Se han evaluado varias actividades biológicas para el ascaridol mostradas en la (Tabla 13).

**Tabla 13.**

*Actividades biológicas de ascaridol*

<b>Actividad Biológica</b>	<b>Valores</b>	<b>Referencias</b>
Actividad tripanocida	CML <i>contra Trypanosoma cruzi</i> de 23 $\mu$ M Control positivo: violeta de genciana con un valor de CML de 6,3 $\mu$ M	(Kiuchi et al., 2002)
Actividad larvicida	CL <sub>50</sub> <i>contra Aedes aegypti</i> : 57,06 $\mu$ M CL <sub>50</sub> <i>contra Artemia sp.</i> : 56,23 $\mu$ M Control positivo: $\beta$ -asarone, LC <sub>100</sub> : 76,83 $\mu$ M	(Torres et al., 2008)
Actividad nematocida	CE <sub>50</sub> <i>contra Meloidogine incognita</i> de 519,29 $\mu$ M	(Torres et al., 2008)

	Valores de IC <sub>50</sub> frente a líneas celulares:	
Actividad antitumoral <i>in vitro</i>	HL-60: 37,45 μM	(Bezerra et al., 2009)
	HCT-8: 109,37 μM	
	MDA-MB-435: 62,41 μM	
	Control positivo: 5 -fluorouracilo CI <sub>50</sub> de 96,87, 3,07, 3,07, 10,76 μM, respectivamente	
	Tasa de inhibición del sarcoma 180 en un	
Actividad antitumoral <i>in vivo</i>	modelo murino de 33,9% a dosis de 10 mg / kg y 33,3% a dosis de 20 mg / kg Control positivo:	(Bezerra et al., 2009)
	inhibición del 5-fluorouracilo del 69,5% a 25 mg / kg	
	CL <sub>50</sub> (fumigación) contra <i>Sitophilus zeamais</i> de	
Actividad insecticida	0,84 mg / L aire	(Chu et al., 2011)
	CL <sub>50</sub> (toxicidad por contacto) frente a <i>Sitophilus zeamais</i> de 0,86 μg / g de peso corporal	

*Nota:* CML: Concentración mínima letal. CL<sub>50</sub>: Concentración media letal. CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva media. HL-60: línea celular de cáncer promielocítico agudo. HCT-8: adenocarcinoma colorrectal ileocecal. MDA-MB-435: célula de adenocarcinoma mamario humano. Tomado de (Tamez et al., 2020).

El AE de *C. ambrosioides* ha sido utilizado para estudios antiparasitarios antifúngico y como insecticida (C. B., et al., 2012). Por otro lado, los compuestos del AE también han sido estudiados.

El carvacrol también conocido como 5-isopropil-2-metilfenol está constituido por un anillo fenólico con sustituciones de metilo e isopropilo. El grupo funcional hidroxilo libre es el principal factor que contribuye a su excelente capacidad antimicrobiana (Rajput et al., 2017). Recientemente, ha sido clasificado como un aditivo alimentario reconocido como seguro de acuerdo con el Reglamento de Ejecución (UE) 2020/160 de la Comisión de 5 de febrero de 2020 relativo a la autorización de un preparado de aceite de orégano, aceite de alcaravea, carvacrol, salicilato de metilo y L-mentol como aditivo en piensos para lechones destetados (titular de la

autorización: Biomin GmbH) (UE, 2020). El carvacrol ha demostrado actividades antitusivas, antioxidantes, antiinflamatorias, expectorantes y antiespasmódicas en conejillos de indias Dunkin-Hartley de ambos sexos (Boskabady et al., 2005). Además de ser un buen conservante en dulces y bebidas, también se conoce como un agente antiséptico eficaz contra cepas de diversas bacterias, hongos y virus (Davidson et al., 2000). Como se observó en 1996 en el estudio realizado por Kim y colaboradores la cepa de *Salmonella typhimurium* parece ser la cepa bacteriana más susceptible al carvacrol presentando un actividad de 0,25 µg/ml. *Epidermophyton floccosum* mostró actividades de 0,08 µg/mL (Kim, 1996).

El  $\alpha$ -terpineno (1-isopropil-4-metilciclohexa-1,3-dieno) es un monoterpeneo cíclico natural producido en el metabolismo secundario de las plantas. Se ha identificado en numerosos extractos de plantas como cardamomo y mejorana y está presente en varios AEs de uso común, especialmente en el aceite del árbol del té (TTO). El  $\alpha$ -terpineno a veces está presente en las fragancias en niveles bajos como parte de los aceites de nota aromática alta (p. Ej., aceite de menta, árbol de té) que se utilizan en las fragancias comerciales. Los estudios han demostrado que el  $\alpha$ -terpineno tiene actividad antioxidante y que es uno de los constituyentes más importantes responsables de la actividad antioxidante de la TTO (Rudbäck et al., 2012).

El cariofileno, es un sesquiterpenoide bicíclico que incluye tres isómeros de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -, se conoció por primera vez en 1834. Wallach y Walker obtuvieron nitrosita cristalina (derivado 1,2-nitro-nitroso) de cariofileno y caracterizaron el  $\beta$ -cariofileno en 1892. El  $\beta$ -cariofileno juega un papel importante en la química de los sesquiterpenoides. Por ejemplo, es el principal componente hidrocarburo de los aceites de clavo (*Eugenia caryophyllata*) y copaiba (Copaifera). Se sabe que los compuestos naturales de cariofileno poseen bioactividad, por ejemplo, el extracto de copaiba se ha utilizado en la medicina popular, que ocupa un lugar importante en las exportaciones farmacéuticas de Brasil (Yang et al., 2012).

## **2.8 Usos en *Leishmania* de los metabolitos y extractos de *C. ambrosioides***

Extractos de *C. ambrosioides* han sido ampliamente usados en el tratamiento de la leishmaniasis para la especie de *L. (L.) amazonensis*, tanto para pruebas *in vitro* como *in vivo* (Monzote et al., 2006). Se han realizado pruebas *in vitro*, donde se obtuvieron resultados para células, promastigotes y amastigotes, disolviendo 1µL de AE disuelto DMSO. La CE<sub>50</sub> del AE

para las células huésped fue aproximadamente 15 veces mayor que para los parásitos (tanto para los amastigotes como para los promastigotes), así mismo el crecimiento de las formas promastigote y amastigote del parásito se inhibió en un 100% a las concentraciones de 28 y 16 g/ml, respectivamente, además no se causaron ningún efecto tóxico en las células del huésped (Monzote et al., 2006). Por otro lado, en el tratamiento *in vivo* se tomaron 8 grupos de ratones BALB/c infectados con *L. (L.) amazonensis* en las almohadillas de la pata trasera, los cuales recibieron el AE disuelto en Miglyol a una dosis de 30 mg/kg. El tratamiento consistió en una inyección intraperitoneal diaria a dosis de 15, 30 o 60 mg/kg durante 15 días. Se observó una reducción significativa en el tamaño de las lesiones en los animales tratados con el AE, de igual manera se observó que el aceite esencial produjo una supresión significativa del número de parásitos en las almohadillas infectadas, en comparación con la carga en las almohadillas de los otros ratones tratados (Monzote et al., 2006).

También se han realizado estudios *in vitro* para LC no solo con el AE sino con sus componentes mayoritarios. El ascaridol, carvacrol y oxido de carofileno fueron activos contra las formas promastigotes y amastigote de *L. (L.) amazonensis*; sin embargo, el ascaridol exhibió la mejor actividad antileishmanial con un IC<sub>50</sub> de 3.7 (µg/mL) en promastigotes y un IC<sub>50</sub> de 4.6 (µg/mL) en amastigotes. El AE de *C. ambrosioides* tuvo el índice de selectividad más alto de 13 en comparación con el ascaridol, carvacrol, oxido de cariofileno que fue 4, 2, 1 respectivamente según estudio realizado por Monzote en el 2014. (Monzote et al., 2014b).

## **2.9 Toxicidad del AE de *C. ambrosioides*.**

En el estudio de la toxicidad del AE de *C. ambrosioides* Ruffa y colaboradores (Ruffa et al., 2002), estudiaron el efecto del AE contra líneas celulares cancerígenas en células hepáticas, pero sus resultados no mostraron actividad alguna. Gadano y colaboradores (A. Gadano et al., 2002), estudiaron la genotoxicidad de las infusiones de *C. ambrosioides*; sus estudios revelaron que existe una interacción entre el DNA y los principios activos. Los datos indican que la fracción cloruro de metileno de las particiones realizadas es la de mayor actividad, relacionada a al daño celular en la línea celular de carcinoma hepatocelular Hep G2 (Ruffa et al., 2002). Estos resultados explican parcialmente el alto grado de toxicidad del AE de *C. ambrosioides*, y porque su uso ha disminuido en los últimos años. Un estudio posterior por el mismo equipo (Gadano et al., 2006) demostró que

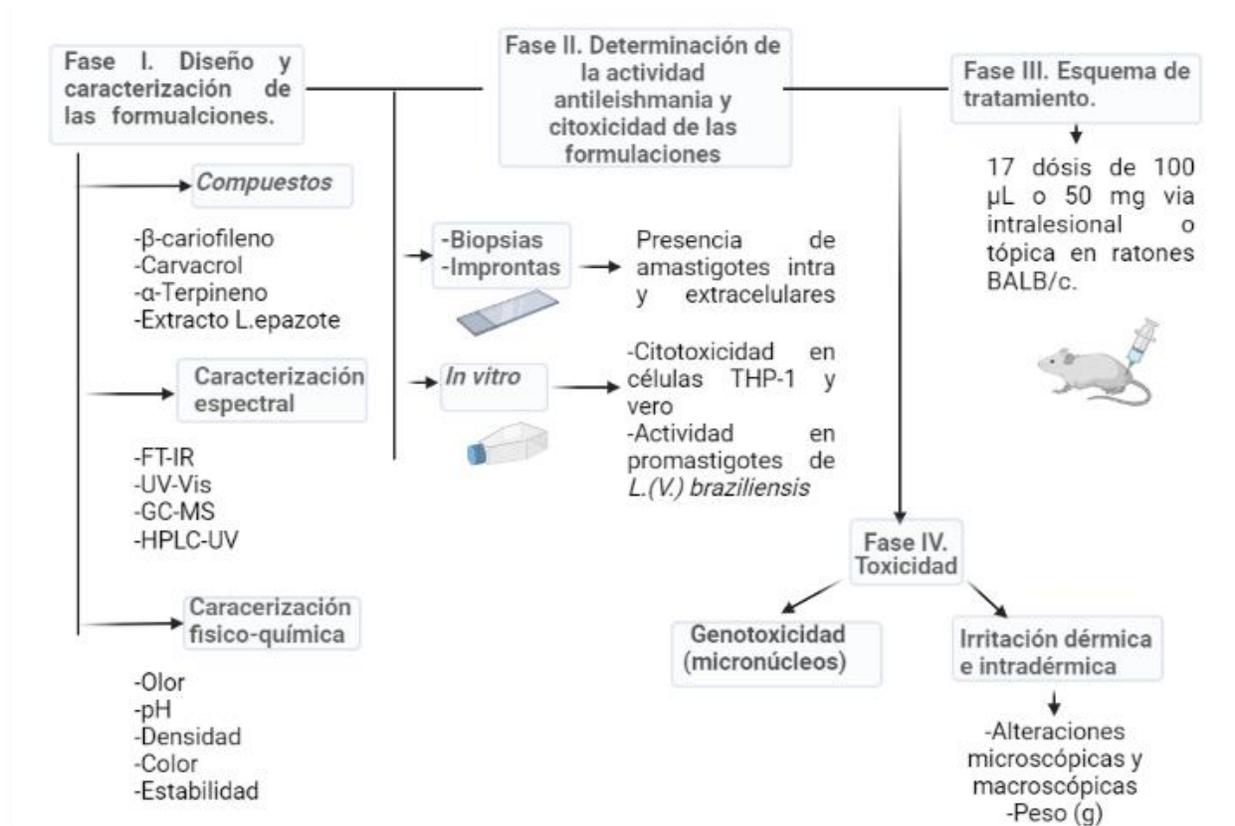
de las dos fracciones estudiadas (acuosa y cloruro metilénica), los principios activos responsables de la actividad citotóxica se encontrarían presentes en la fracción orgánica, y que el ascaridol no se encuentra en la fracción acuosa). Posterior a este estudio, Sowemimo y colaboradores (Sowemimo et al., 2007) comprobaron que los extractos de *C. ambrosioides* son capaces de inhibir la telomerasa en el ensayo de poder de captación de radicales totales, sin exhibir actividad mutagénica o tóxica *in vivo* (Gómez, 2008).

### 3. Método

El presente trabajo de investigación se realizó en cuatro fases (**Figura 6**): 1°. Preparación y caracterización de las formulaciones a base de *trans*- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -C) (F1, F2, F3), carvacrol (U1) y epazote (G1), 2°. Determinación de la actividad antileishmania de las formulaciones, 3°. Protocolo de tratamiento con las formulaciones en ratones BALB/c 4°. Determinación de la toxicidad y actividad *in vitro* de las formulaciones en parásitos y células. Las fases fueron realizadas en el laboratorio de quimioterapia del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander (UIS); el  $\beta$ -C, fue caracterizado en colaboración con el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de masas de la UIS (CROM-MASS), el Laboratorio de Espectroscopia Parque Tecnológico, Guatiguará (PTG- UIS) y el grupo de investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) de la UIS; adicionalmente en colaboración con el Laboratorio Químico de Análisis Instrumental de la UIS se caracterizaron el carvacrol, epazote y sus formulaciones. El procesamiento y análisis de las biopsias de las lesiones de LC, se realizó en el Laboratorio del Departamento de Patología, Escuela de Medicina, con el apoyo y asesoría del profesor Julio Cesar Mantilla.

**Figura 6.**

*Fases metodológicas del trabajo*

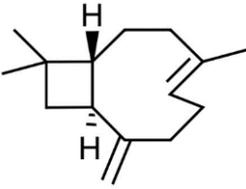
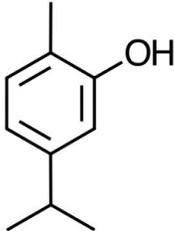
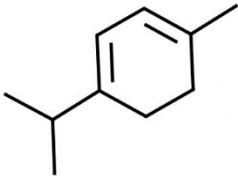


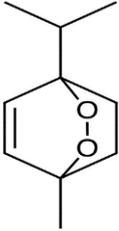
*Nota:* Se muestra un esquema de las fases metodológicas empleadas en el proyecto. Esquema realizado por los autores en BioRender.

### 3.1 Compuestos (metabolitos secundarios y epazote)

Los compuestos utilizados se obtuvieron comercialmente, estos se describen en la (Tabla 14). El ascaridol fue sintetizado con base en la metodología descrita en el artículo de Monzote et al., 2009. La síntesis se realizó en colaboración con el profesor Dr. Arnold Romero, docente de la Escuela de Química de la UIS, director del grupo CODEIM.

**Tabla 14.***Metabolitos secundarios de C. ambrosioides a utilizar en el proyecto*

Metabolito secundario	Estructuras	Propiedades fisicoquímicas	Obtención
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno (B-C)		PM: 204,35 g/mol Densidad: 0,90 g/cm <sup>3</sup> Punto de fusión: Punto de ebullición: 129-130°C	Sigma Aldrich
Carvacrol (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O)		PM: 150,22 g/mol Densidad: 0,98 g /cm <sup>3</sup> a 20 °C Punto de fusión: 3-4 °C Punto de ebullición: 236-237 °C	Sigma Aldrich
$\alpha$ -Terpineno (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )		PM: 136,23 g/mol Densidad: 0,84 g /cm <sup>3</sup> a 25 °C Punto de fusión: Punto de ebullición: 173-175 °C	Sigma Aldrich
Extracto líquido herbal de <i>C. ambrosioides</i>	-----	Composición glicerina vegetal, alcohol, agua, relación material vegetal seco/disolventes 1:3	Hawaii Pharm

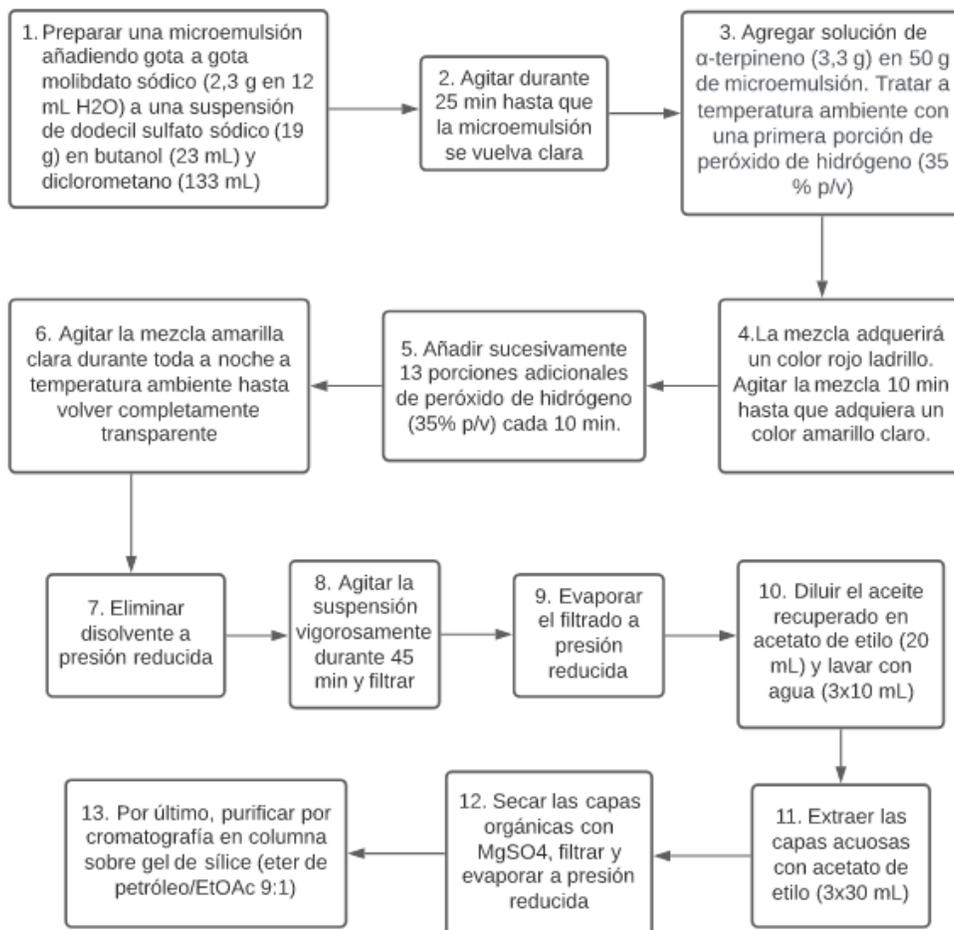
Ascaridol (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )		<b>PM:</b> 168,23 Densidad: 1,01 g/cm <sup>3</sup> Punto de fusión: 3,3 °C Punto de ebullición: 39-40 °C a 0,2 mm Hg	Síntesis en el laboratorio CODEIM
--	---	---	--------------------------------------

### 3.2 Síntesis del ascaridol

Se siguió el protocolo descrito por (Sahli F. et., 2019), tal como se muestra en el siguiente esquema (**Figura 7**) con algunos cambios realizados durante el desarrollo de la síntesis (pasos 5 y 13). En el paso 3 se realizaron 16 adiciones de solución peróxido de hidrógeno al 30 % concentración. En el paso 13 se utilizaron 2 relaciones diferentes para la fase móvil en la purificación en columna (2:1 y 1:1 éter de petróleo/EtOAc) con el fin de agilizar la separación. El resto de los pasos se siguieron como indica el protocolo. El producto obtenido se denominó PSA (producto de la síntesis de ascaridol). Posterior a la purificación en columna, se realizó una cromatografía en capa fina usando los productos comparados con el control. El control fue el producto obtenido de los pasos previos a la purificación en columna. En la capa fina se usó como fase móvil la relación 9:1 éter de petróleo/EtOAc.

**Figura 7.**

*Esquema de seguimiento para síntesis de ascaridol*



*Nota:* Tomado de (Sahli F. et., 2019)

### **3.3 Caracterizaciones organolépticas, fisicoquímicas y espectrales de metabolitos secundarios y excipientes formulaciones**

Se determinaron las propiedades organolépticas (color, olor, aspecto físico) de los metabolitos secundarios, el extracto de epazote y los excipientes de las respectivas formulaciones (F, G, U). Para ello se agregaron alícuotas (1 mL) en viales y mediante observación directa se determinaron sus propiedades de manera cualitativa. Las propiedades físico químicas determinadas de los metabolitos secundarios, extracto y excipientes fueron densidad y pH. Para la densidad se llenó a totalidad con el líquido de interés el picnómetro usado (10 mL), procurando la no existencia de burbujas, este se pesó y se restó al valor del peso del picnómetro vacío. El pH se

determinó con tirilla de pH y/o pHmetro. Para la medición con tirilla se agregaron alícuotas (1 mL) del metabolito, extracto o excipiente en viales. Se sumergió la tirilla por 1 min y se leyó el resultado con base a la escala dada por el fabricante de las tirillas. Para el pHmetro se agregaron alícuotas de 5 mL del metabolito, extracto o excipiente en tubos de ensayo y se sumergió el electrodo del pHmetro, se tomó lectura por triplicado. El pH de sólidos se midió con tirilla de pH, preparando una solución de este en agua destilada en proporción 1:10.

Se realizaron pruebas de caracterización espectral para los metabolitos secundarios y el extracto de epazote utilizando las técnicas: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) en modo de transmitancia, cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV) y espectroscopia de ultravioleta visible (UV-VIS). Las pruebas realizadas a cada metabolito secundario se muestran en la (Tabla 15). La identidad del ascaridol se comprobó mediante FT-IR.

**Tabla 15.**

*Pruebas espectroscópicas realizadas para los componentes activos*

<b>Metabolito secundario</b>	<b>FT-IR</b>	<b>GC-MS</b>	<b>HPLC-UV</b>	<b>UV-VIS</b>
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	X	X	-	X
Carvacrol	X	X	-	X
$\alpha$ -Terpineno	X	X	-	X
Epazote	X	-	X	X
PSA	X	-	-	-

*Nota:* La X denota las pruebas que se realizaron para el epazote y los metabolitos, el guion (-) denota la no realización de la prueba.

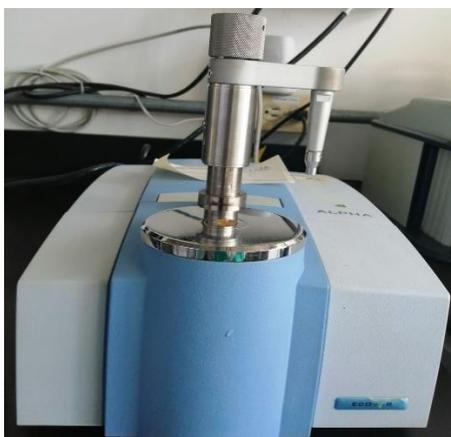
### **3.3.1 Caracterización por FT-IR**

Con base a la (Tabla 15), para la toma del espectro FT-IR, se colocaron alícuotas de 300  $\mu$ L de cada uno de los metabolitos sin diluir, el extracto de epazote y las formulaciones en el porta muestras del equipo Bruker Alpha ECO-FTIR (Bruker, Karlsruhe, Alemania) equipado con ATR (reflectancia total atenuada). Se realizó previamente la eliminación de fondo (*Background*). Los

espectros se obtuvieron en modo de transmitancia y los datos brutos en formato (. dx) fueron graficados en el software OriginPro 8 (OriginLab), sin aplicar herramientas de preprocesamiento espectral como: suavizado, elección de pico automático y línea base (*smoothing, baseline correction and peak picking*). Los números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) de cada pico se identificaron manualmente. Lo anterior fue realizado en el grupo de investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM).

### **Figura 8.**

*Equipo FT-IR*



### **3.3.2 Caracterización por GC-MS**

Para la toma del cromatograma GC-MS, se utilizó el cromatógrafo serie 63442B (EVOQ GC-TQ) (Agilent, California, EE. UU) acoplado con un detector de triple eje Serie II con dínodo de alta energía y multiplicador de electrones (EM) de larga duración. Para ello se realizó inyección manual (0,5  $\mu\text{L}$ ) de las soluciones de concentración 5 ppm y 100 ppm en tolueno de los metabolitos secundarios (carvacrol,  $\alpha$ -terpineno) y formulaciones (U1, VU1) respectivamente. En las formulaciones y metabolitos se utilizó como gas portador Helio, a una tasa de flujo de 3,3 mL/min, con una temperatura de inyección de 250 °C, con relación Split: 20:1. Por otra parte, la rampa de calentamiento usada fue: 100°C subiendo 20 °C/min hasta 200 °C y posteriormente 1 °C/min hasta 230°C, temperatura la cual se mantuvo por 6 min. La corrida cromatográfica total fue de 41 min. La identificación de los picos cromatográficos utilizó la base de datos de masas del equipo serie 5977B, generando de esta forma los espectros correspondientes. El análisis de los espectros de masas se realizó usando el programa Nist MS search 2.3. El cromatograma obtenido en formato

(.CVS) se graficó en OriginPro 8, sin aplicar herramientas de preprocesamiento espectral. Lo anterior fue llevado a cabo en el Laboratorio Químico de Análisis Instrumental de la UIS.

En el caso de la muestra de  $\beta$ -C Sigma Aldrich, pureza  $\geq 80\%$ ) se realizó análisis por GC-MS en el laboratorio (CENIVAM) usando el cromatógrafo de *Agilent Technologies 6890* acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, AT5973N) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*) usando una columna DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.) de 5%-Ph-PDMS, 60 m x 0,25  $\mu$ m. Se cuantificaron los picos presentes en la muestra evaluada y se determinaron la composición y cantidad del  $\beta$ -C y de cada uno de los componentes encontrados.

### Figura 9.

*Equipo de GC-MS*



### 3.3.3 Caracterización por HPLC-UV

Para la toma del cromatograma se utilizó el equipo HPLC (Agilent Technologies 1100 Series) (Agilent, California, EE. UU). El extracto líquido herbal diluido en metanol a una concentración 100 ppm al igual que las formulaciones (G1, VG1) fueron filtrados con un filtro de membrana de 25  $\mu$ m. La fase móvil utilizada fue metanol: agua destilada en relación (95:5), la cual se aplicó a una tasa de flujo de 1,0 mL/min. La temperatura de la columna (Eclipse SDB-C

18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm) fue de 25 °C, con un volumen de inyección de la solución muestra de 20  $\mu\text{L}$ . La identificación de los componentes del epazote y VG1 se realizó a una longitud de onda de 222 nm, la formulación G1 a una longitud de onda 228 nm. El tiempo de separación de la corrida cromatográfica fue de 30 min. por su parte, el cromatograma obtenido en formato (CVS) se graficó en OriginPro 8, sin aplicar herramientas de preprocesamiento espectral. Lo anterior fue llevado a cabo en el Laboratorio Químico de Análisis Instrumental de la UIS.

### **Figura 10.**

*Equipo de HPLC-UV*



#### **3.3.4 Caracterización por UV-Vis**

Para la toma del espectro se utilizó el equipo Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer de Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Para ello, los metabolitos y el extracto se disolvieron en DMSO a una concentración final de 0,1 %V/V. Se eliminó la señal del blanco utilizando el rango de análisis de 200-600 nm. Los espectros obtenidos en formato .XLS se graficaron en OriginPro8, sin aplicar herramientas de preprocesamiento espectral. Lo anterior fue llevado a cabo en el laboratorio de quimioterapia del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP).

**Figura 11.**

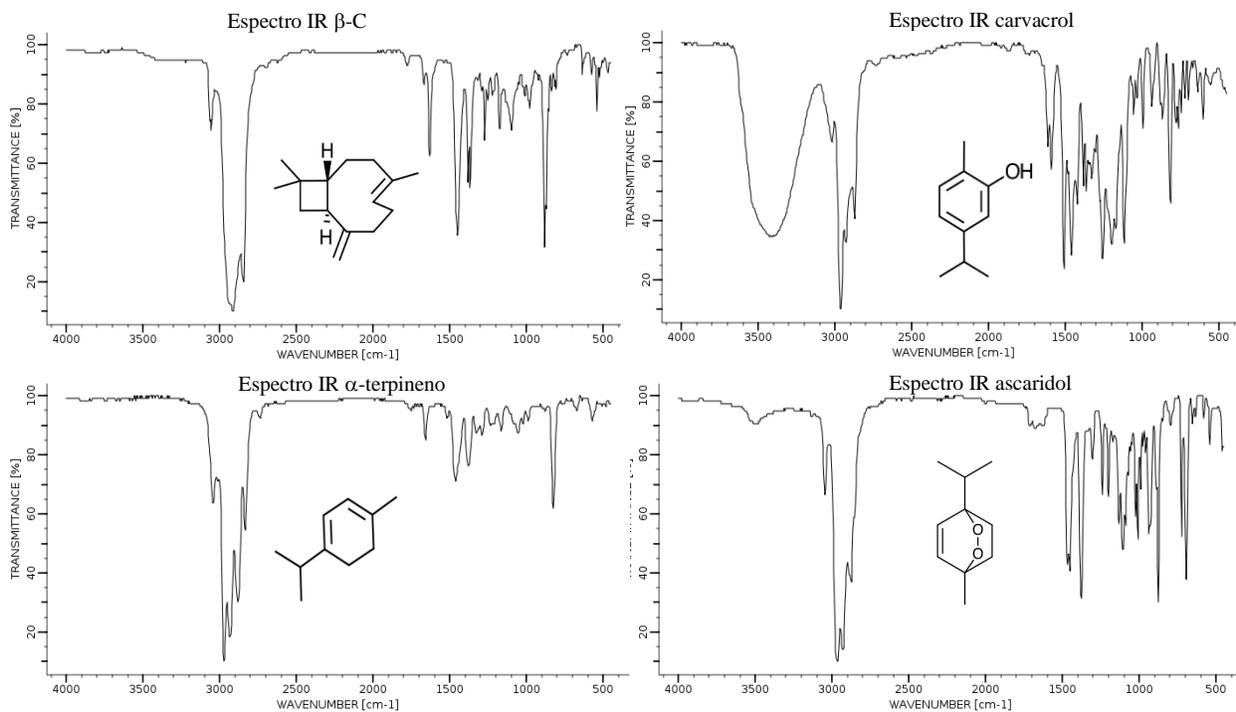
*Equipo UV-Vis*



En las **Figuras 12, 13 y 14** se observan los espectros infrarrojos, UV-Vis y GC-MS respectivamente encontrados en la literatura, para los metabolitos secundarios.

**Figura 12.**

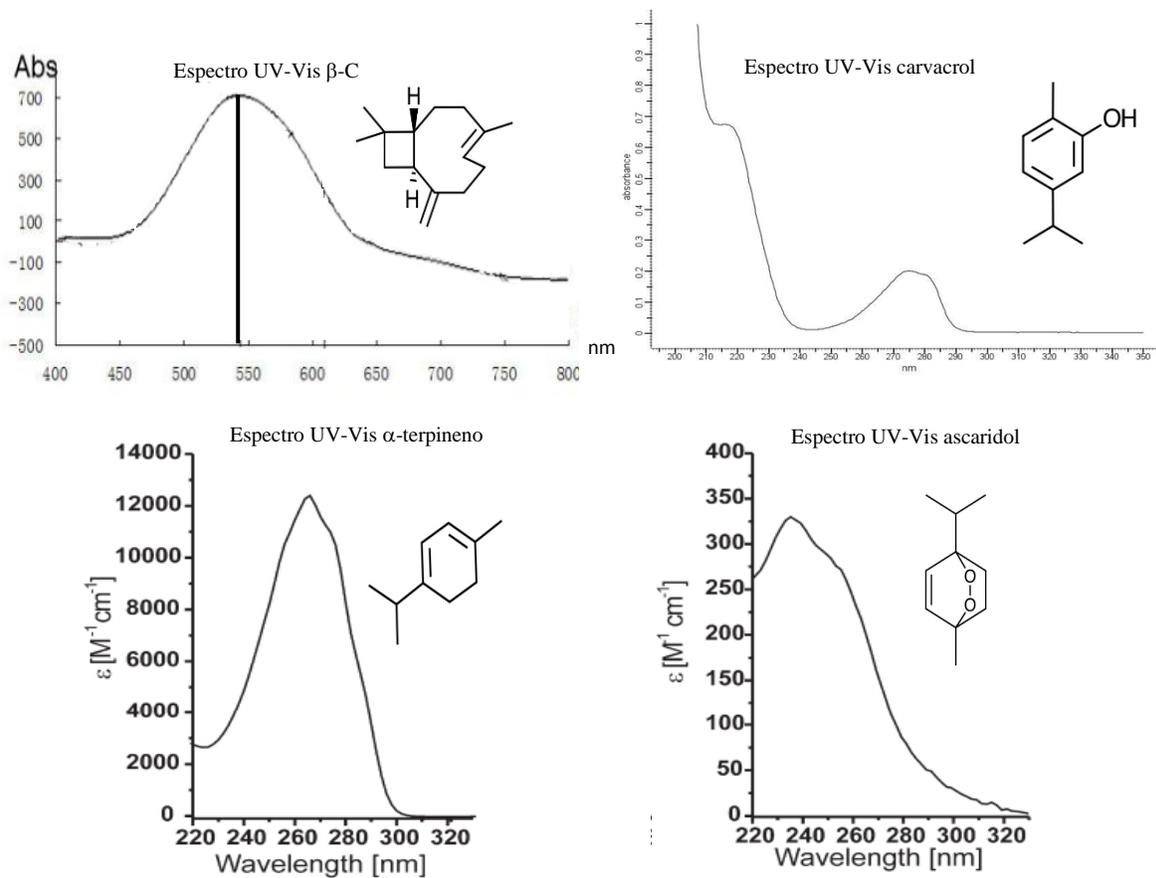
*Espectros IR de los metabolitos secundarios obtenidos de la literatura*



*Nota:* Espectros IR encontrados en literatura para el β-cariofileno, carvacrol, α-terpineno y ascaridol. Tomado de: (Bio-Rad/Sadtler, 2022).

### Figura 13.

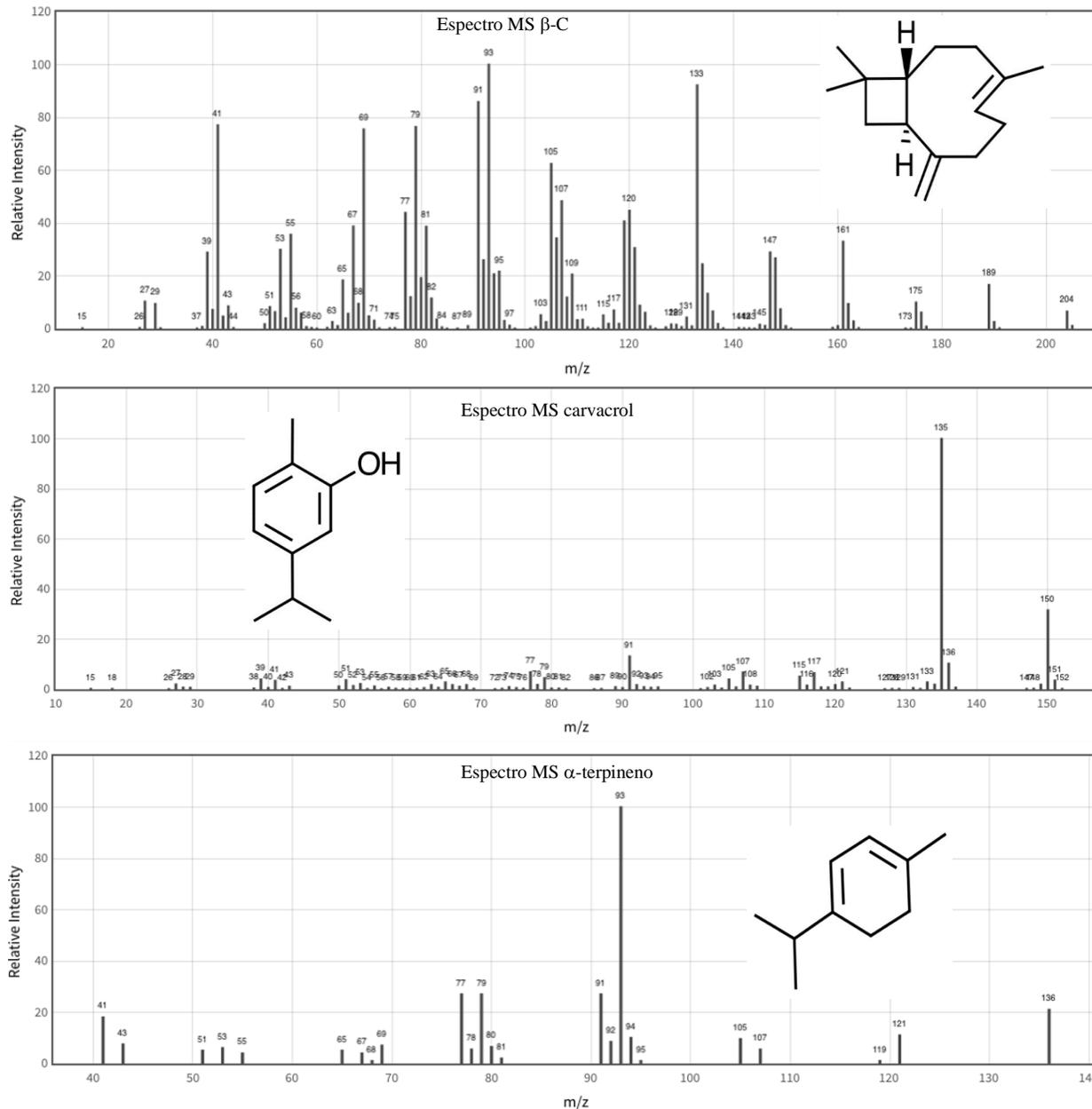
*Espectros UV-Vis de los metabolitos secundarios obtenidos de la literatura*



*Nota:* Espectros UV-Vis encontrados en la literatura para:  $\beta$ -cariofileno (Zhou et al., 2012), carvacrol (Bio-Rad/Sadtler, 2022),  $\alpha$ -terpineno y ascaridol (Monzote et al., 2009).

**Figura 14.**

*Espectros de masas de los metabolitos secundarios obtenidos de la literatura*



*Nota:* Espectros de masas, encontrados en la literatura para:  $\beta$ -cariofileno, carvacrol,  $\alpha$ -terpineno. Todos los espectros de masas fueron obtenidos de la base de datos NIST. (NIST, 2022).

### 3.3.5 Pruebas de solubilidad

Se pesaron 50 mg de cada metabolito secundario y del extracto liquido de epazote los cuales fueron disueltos en diferentes solventes (aceite de ricino, tolueno, etanol, n-pentano, DMSO, agua,

aceite de coco, metanol). Se agitaron por 10 minutos en vortex y se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente. La solubilidad fue determinada de manera visual usando términos de soluble (S), parcialmente soluble (PS) e insoluble (I).

### 3.4 Formulaciones

Se realizaron tres tipos de formulaciones. El primer tipo fueron soluciones líquidas o aceitosas (F), utilizadas como soluciones stock de los experimentos *in vitro* y/o formulaciones de uso intralesional. El segundo tipo fueron formulaciones tipo gel (G), usando como componente activo soluciones de carácter polar o hidrofílico, y el tercero fueron formulaciones tópicas tipo ungüento (U) con compuestos de carácter orgánico o apolar.

Se prepararon tres formulaciones F y sus respectivos vehículos (V) sin componente activo. La F1 y F3 contenía  $\beta$ -C (3% v/v), Kollyphor (20% v/v, 10% v/v) y buffer fosfato salino (PBS) (77% v/v, 87% v/v) respectivamente y la F2 contenía  $\beta$ -C (3% v/v), DMSO (15% v/v), solución salina (SS) (82% v/v). La SS se preparó al 1% v/v de NaCl en agua destilada, el PBS, pH=7,4 usando  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,1M),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,1M); NaCl (0,039% v/v) y agua tipo I.

Las formulaciones tipo gel (G1, VG1) fueron preparadas usando como componente activo el extracto líquido herbal de epazote al 10%, se usaron excipientes como: glicerina 1,5% p/p, carboximetil celulosa (CMC) 0,5% p/p, benzoato de sodio 0,1% p/p, propilenglicol 3% p/p y agua destilada 82,4% p/p. El agente gelificante utilizado fue la CMS la cual fue disuelta en agua destilada a una temperatura de 60 °C; alcanzada la temperatura, se retiró del calor y se agregaron los demás excipientes en frío, mezclando constantemente; por último, se dejó enfriar para su posterior almacenamiento y uso. En el caso del vehículo (VG1) se preparó sin el principio activo, conservando las mismas proporciones de los excipientes a excepción del agua destilada que aumentó a 92,4% p/p. Todos los componentes de las formulaciones se obtuvieron de mercados locales.

La formulación semisólida tipo ungüento (U1) se utilizó para el carvacrol. Este se usó al 3% p/p, usando como base cera de abejas (BW) 20% p/p, crema de cacao 36% p/p, aceite de coco 40% p/p como aceite portador y vitamina E 1% p/p. El aceite portador y la base se calentaron hasta formar una pasta homogénea a 60 °C, alcanza la temperatura se retiró la mezcla y se añadió posteriormente el carvacrol mediante agitación con ayuda de una varilla de agitación y se dejó

enfriar para su posterior uso. Las formulaciones se guardaron evitando la exposición a humedad, luz y oxígeno. En el caso del vehículo (VU1) se preparó sin el principio activo, conservando las mismas proporciones de los excipientes a excepción del aceite de coco que aumentó a 43% p/p. Todos los componentes de las formulaciones se obtuvieron de mercados locales, excepto el carvacrol que fue obtenido de Sigma Aldrich.

### 3.5 Caracterización de las formulaciones

En la (Tabla 16) se muestra el tipo de formulaciones usadas para cada metabolito con base a su solubilidad, así como también las pruebas de caracterización espectroscópicas usadas para las mismas.

**Tabla 16.**

*Caracterización espectroscópica y espectrométrica para cada formulación*

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Formulación</b>	<b>GC-MS</b>	<b>HPLC-UV</b>	<b>FT-IR</b>
<i>trans</i> - $\beta$ Cariofileno ( $\beta$ -C)	Solución (F1, F2, F3)	-	-	X
	Vehículo (V1, V2, V3)	-	-	X
Carvacrol	Ungüento (U1)	X	-	X
	Vehículo (VU1)	X	-	X
$\alpha$ -Terpineno	Ninguna	-	-	-
Extracto líquido herbal	Gel (G1)	-	X	X
	Vehículo (VG1)	-	X	X
PSA	Ninguna	-	-	-

*Nota:* La X denota las pruebas que se realizaron para cada formulación y el guion (-) denota la no realización de la prueba.

### 3.6 Estabilidad de las formulaciones

Se determinaron las propiedades organolépticas y físico químicas de las formulaciones como se mencionó anteriormente (ver ítem 3.3). La prueba de crema y coalescencia (formulaciones G y U) se realizó pesando 2,5 g de U1 y G1 y sus vehículos en tubos de ensayos estériles y cerrados, almacenados a 27 °C durante 8 semanas. La homogeneidad, olor, textura y color de la formulación almacenada se revisó cada semana junto con la toma de un espectro IR (Gemedá et al., 2018).

Se realizaron pruebas de ciclo térmico, cambiando cada 48 horas las formulaciones en un ciclo de temperaturas en orden descendente (37 °C, 32 °C, 27 °C y 4 °C), se tomaron espectros infrarrojos cada que las formulaciones salieron del ciclo durante 2 semanas (Gemedá et al., 2018). Se realizaron pruebas de estrés mecánico (centrifugación) a 2000 rpm durante 5, 15, 20, 30 y 60 minutos, manteniendo las formulaciones a 25 °C, para determinar separación de fases (Gemedá et al., 2018). Se analizaron las formulaciones (1 mL o 1 g), almacenadas a diferentes temperaturas (4 °C, 27 °C, 32°C, 37°C) mediante FT-IR con el fin de determinar su estabilidad térmica. Se observaron posibles cambios en los espectros en cuanto forma, intensidad y amplitud de los picos para los diferentes tiempos, 14, 30 y 60 días. En la (**Tabla 17**) se muestran las pruebas de estabilidad usadas para cada formulación y sus respectivos vehículos.

**Tabla 17.**

*Pruebas de estabilidad realizadas para cada formulación*

<b>Formulación</b>	<b>Pruebas organolépticas</b>	<b>Pruebas fisicoquímicas</b>	<b>Crema y coalescencia</b>	<b>Ciclo térmico</b>	<b>Estrés mecánico</b>	<b>Estabilidad térmica.</b>
F1-V1	X	X	-	X	X	X
F2-V2	X	X	-	X	X	X
F3-V3	X	X	-	-	-	-
G1-VU1	X	X	X	X	X	X
U1-VU1	X	X	X	X	X	X

*Nota:* La X denota las pruebas que se realizaron para cada formulación y el guion (-) denota la no realización de la prueba.

### **3.7 Ensayos *in vitro***

#### **3.7.1 Parásitos y células**

Los promastigotes de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) fueron cultivados en medio de cultivo insectos *Schneider* suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SBFi) y 1% penicilina-estreptomicina a 26°C,  $\geq 1$  CO<sub>2</sub> y 70% de humedad.

Las células de monocitos leucémicos humanos THP-1 (ATCCTIB-202) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Las células epiteliales de riñón de mono verde africano, Vero (CCL1-81 ATCC) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

#### **3.7.2 Ensayo antileishmania**

*Los promastigotes* en fase de crecimiento exponencial y *los amastigotes axénicos de L. (V.) braziliensis* se diluyeron a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL y se trataron con diluciones seriadas 1:3 de las formulaciones y sus vehículos (F, U y G) así como de los metabolitos secundarios y el extracto de epazote, en medio *Schneider* más 10 % de suero fetal bovino inactivado (SBFi) a 26 °C (Neira et al., 2019). Los parásitos de control se incubaron en medio de cultivo sin fármaco. Después de 72 h, se añadió solución de sal sódica de resazurina (0,001% a cada pocillo), y después de 4 h, los valores de absorbancia se midieron espectrofotométricamente (lector de microplacas Synergy H1) a 570 y 600 nm. El porcentaje de inhibición se calculó en comparación con el de los pocillos de control no tratados.

Las concentraciones inhibitorias al 50% (IC<sub>50</sub>) se determinaron mediante los ajustes de regresión no lineal de las curvas de dosis-respuesta utilizando el software Msxlf<sup>TM</sup> (ID Business solution, Reino Unido). Todas las mediciones se realizaron por triplicado de forma independiente.

#### **3.7.3 Ensayo citotóxico**

Las células de mamífero Vero ( $1 \times 10^5$  células/mL) y THP-1 ( $6 \times 10^6$  células/mL) se trataron con diluciones seriadas 1:3 de las formulaciones y sus vehículos (F, U y G) en medio de cultivo RPMI 1640 o en medio sin fármaco, así como, de los metabolitos secundarios y del extracto de epazote durante 72 h. La toxicidad celular se evaluó mediante prueba MTT colorimétrica y el

porcentaje de toxicidad celular se calculó con la siguiente ecuación:  $\text{citotoxicidad} = [(\text{grupo de control de OD} - \text{grupo de tratamiento de OD}) / \text{grupo de control de OD}] \times 100$ . La toxicidad de las formulaciones y de los metabolitos secundarios en células fue expresada como la concentración citotóxica para el 50% de las células ( $CC_{50}$ ). Los valores fueron calculados por regresión sigmoideal utilizando el software Mxslfit™ (ID Business Solution, UK). El índice de selectividad (IS) fue determinado dividiendo la  $CC_{50}/CE_{50}$  (células/parásitos). La actividad de las formulaciones y de los metabolitos secundarios con un IS de tres o superior fue considerada selectiva contra los parásitos. La absorbancia del MTT fue leída a 580 nm y células no tratadas se emplearon como control.

**Tabla 18.**

*Pruebas in vitro antileishmania y citotóxicas realizadas para los metabolitos y formulaciones*

Metabolitos/ formulaciones	Ensayo antileishmania	Ensayo citotóxico	
	Promastigotes	VERO	THP-1
F1	X	X	X
F	V1	X	X
	F2	X	X
	V2	X	X
G	G1	X	X
	VG1	X	X
U	U1	X	X
	VU1	X	X
<i>trans</i> -β- Cariofileno	X	X	X
Carvacrol	X	X	X
α-Terpineno	X	X	X
Extracto líquido herbal	X	X	X

*Nota* La X denota las pruebas que se realizaron para los metabolitos secundario, epazote y cada formulación.

### 3.8 Ensayos actividad antileishmania *in vivo*

#### 3.8.1 Ratones

Se utilizaron ratones BALB/c obtenidos del Instituto Nacional de Salud (INS). Los ratones fueron mantenidos en la unidad de experimentación en animales especializada del CINTROP de sede UIS-Guatiguará a una temperatura del ambiente de 18 - 22°C, humedad relativa del 50-70%, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad con agua estéril y alimento especializado *ad libitum*, regido bajo el código de ética UIS Acta N° 8 del día 22 de mayo de 2020

#### 3.8.2 Infección, tratamiento, seguimiento y sacrificio

Los ratones fueron infectados en la zona lumbosacro (base de la cola) con promastigotes de una cepa *L. (V) braziliensis* a una concentración de  $2 \times 10^6$  parásitos/100µL de PBS pH 7,4. Se esperó entre seis a ocho semanas hasta observar la presencia de las lesiones (nódulo y úlcera) de un tamaño adecuado y posteriormente se inició el tratamiento. Los grupos experimentales fueron los expresados según se observa en la (Tabla 19).

**Tabla 19.**

*Grupos experimentales antileishmania*

Grupo	Tratamiento	N de ratones
1	F1	3
2	V1	3
3	F2	1
4	G1	2
5	VG1	1
6	U1	2
7	VU1	1
8	Sin tratamiento	1

*Nota:* F) formulación tipo solución, G) formulación tipo gel, U) formulación tipo ungüento, V) vehículos formulaciones.

Los animales fueron tricotomizados 24 horas antes del tratamiento. Posteriormente se trataron con una dosis diaria de 100  $\mu$ L (F) o 50 mg (G y U) o su vehículo sobre la lesión de LC. En total se aplicaron 17 dosis. Semanalmente se midió el tamaño de las lesiones (nódulo y úlcera) utilizando un medidor digital y se tomó registro. La efectividad del tratamiento en las lesiones se determinó teniendo en cuenta los cambios en el tamaño de la lesión ( $\text{mm}^2$ ) y la presencia de parásitos en las mismas. Con respecto al efecto en las lesiones se determinó el porcentaje de reducción en el área de las lesiones ( $\text{mm}^2$ ) tanto en nódulo como en úlcera por grupo y comparados con el control (no tratados).

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical 3 días después de terminar el tratamiento, se anestesiaron con 200  $\mu$ L de una mezcla de ketamina/xilacina aplicada intraperitonealmente.

Se recolectaron las lesiones, se realizaron improntas en láminas de vidrio y se almacenaron cada una en 10 mL de paraformaldehído al 4% v/v y/o formalina 10%. Adicionalmente se recolectaron los fémures para estudios de micronúcleos.

### ***3.8.3 Presencia de parásitos en improntas***

Las improntas realizadas fueron utilizadas para determinar la presencia del parásito. Las láminas se fijaron inmediatamente con metanol durante un minuto, se dejaron secar y pasados 10 min se procedió al proceso de tinción, usando colorante Giemsa (6 gotas) en 2 mL de buffer Giemsa (1g de mezcla de relación 4:5 de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1L de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) para cada lámina, estas se mantuvieron en contacto con la coloración por 15 min; posteriormente se hizo un lavado con el mismo buffer, se dejaron secar y se almacenaron en el laminario para su posterior lectura, detección y cálculo de los parásitos por microscopía óptica. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia del parásito.

### ***3.8.4 Presencia del parásito en biopsias***

Las muestras fijadas con paraformaldehído al 4% v/v, se mantuvieron en agitación 24 horas en un agitador orbital (120 rpm). Posteriormente fueron inmersas en soluciones de concentraciones ascendentes de sacarosa preparadas en PBS (10 mL por muestra) del 5%p/v, 10%p/v, 20%p/v por 1 hora y por 24 horas (o hasta su precipitación) para 30%p/v, con agitación constante. El tejido se extrajo, se cubrió con papel vinipel y aluminio, se rotuló debidamente y se criopreservó a  $-20^\circ\text{C}$ .

Las muestras almacenadas en formalina 10%, se dejaron a temperatura ambiente sin el proceso de criopreservación. Todas las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Patología de la UIS (ver ítem 3.9.2) y coloreadas con H&E. La presencia de parásitos se puntuó semicuantitativamente con base al número de amastigotes por campo microscópico (400×) [Sin parásitos = 0, escasos = 1-5 (+), moderados = 6-10 (++) , abundantes > 11 (+++) parásitos).

### **3.9 Ensayos de toxicidad *in vivo***

#### ***3.9.1 Ensayo de irritación inducida por aplicación tópica e intradérmica***

Se realizó el ensayo de corrosión e irritación utilizando el manual de irritación/corrosión OECD 404:2015 en ratones BALB/c sanos. Para el ensayo dérmico los ratones fueron tricotomizados en el área dorsal del tronco 24 horas antes de la prueba. Posteriormente, se procedió a aplicar durante 14 días las formulaciones y sus vehículos (35µL de F o 35 mg de G y U) en el área de la piel donde fue previamente cortado el pelo, luego de la aplicación se realizó una buena distribución de la formulación y los ratones se mantuvieron vigilados durante 15 min, asegurándose de que el animal no tuviera contacto con la formulación. Los grupos experimentales se muestran en la (**Tabla 20**). Se realizó seguimiento fotográfico a las 0, 1, 4, 24, 72 horas, 8, 14 días y toma de peso semanalmente.

Para el ensayo intradérmico se eliminó el pelaje del área superior de la cola del ratón 24 horas antes de la prueba. Posteriormente, se procedió a inyectar 1 dosis diaria de la formulación a tratar (100µL) en el área de la piel donde fue previamente cortado el pelo. En total fueron aplicadas 17 dosis o hasta interrumpir el tratamiento. Se realizó seguimiento fotográfico y toma de peso a los ratones semanalmente. Los animales fueron examinados para detectar signos de eritema, edema, necrosis. Se consideró irritante cuando se observaron respuesta como: alopecia (área limitada), hiperqueratosis, hiperplasia y descamación persistente hasta el final del período de observación. Los resultados fueron expresados como: (-) ausencia, 1 = ligero, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = grave irritación.

**Tabla 20.**

*Grupos experimentales para tratamiento de irritación por aplicación tópica e intradérmica en ratones BALB/c sanos*

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento tópico</b>	<b>N</b>	<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento intradérmico</b>	<b>N</b>
9	Formulación F1	1	15	Formulación F1	2
10	Vehículo F1	2	16	Vehículo F1	2
11	Formulación G1	1	17	Formulación de F3	1
12	Vehículo G1	1	18	Vehículo V3	1
13	Formulación U1	1			
14	Vehículo U1	1			

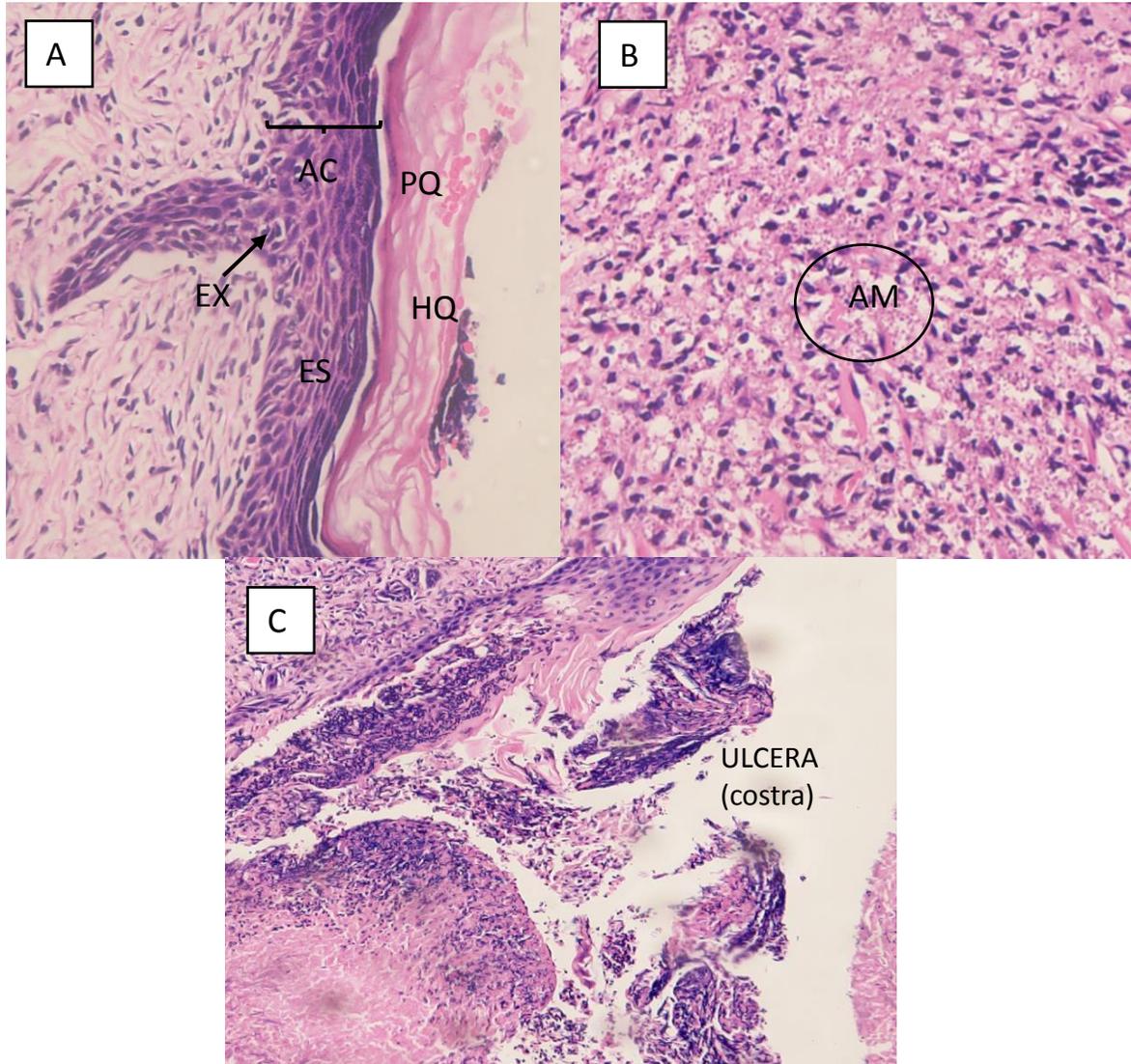
*Nota:* En la tabla se observan los grupos experimentales para las pruebas de irritación inducidas por aplicación dérmica e intradérmica.

### **3.9.2 Análisis histopatológico**

El análisis histopatológico se realizó de acuerdo con el manual de procesos y procedimientos del Laboratorio de Patología de la UIS. Las biopsias fueron sometidas a un proceso de deshidratación utilizando una serie de soluciones acuosas de menor a mayor concentración de alcohol etílico (Neira et al., 2018). Posteriormente las muestras se embebieron en bloques de parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor utilizando un micrótopo RM2135 (Leica Microsystems®) los cuales se colocaron en láminas portaobjetos y fueron coloreadas con hematoxilina y eosina (H&E). Los parámetros histopatológicos analizados microscópicamente fueron: acantosis, paraqueratosis, espongirosis, exocitosis, infiltración dérmica y presencia de eosinófilos, clasificados en: (-) ausencia, (±) equívoca, (+) leve, (++) moderado y (+++) severo según sea el caso (Shen et al., 2008). En la **(Figura 15)** se muestran imágenes histológicas de secciones de piel infectada con *L. (V.) braziliensis*.

**Figura 15.**

*Patrones histopatológicos de piel infectada con L. (V.) braziliensis*



*Nota:* En la figura se observan algunos patrones histopatológicos observados en las biopsias de piel obtenidas. La figura A muestra la epidermis, donde AC se refiere a la acantosis (aumento en la proliferación celular), HQ a hiperqueratosis (engrosamiento del estrato corneo y aumento de queratina), PQ a paraqueratosis (núcleos en las células del estrato corneo), ES a espongiosis (visualización de los desmosomas) y EX a exocitosis (invasión de leucocitos en la epidermis). En la figura B se muestra una imagen ampliada de la dermis donde se observa presencia de amastigotes (AM) de *Leishmania*. En la figura C se observa un patrón propio de ulcera y presencia de costra en la dermis.

### 3.9.3 Prueba de micronúcleos

Se extrajeron los fémures del ratón, se cortaron las epífisis y se realizaron lavados con jeringa conteniendo 1 mL de suero fetal bovino. Esto fue centrifugado a 3200 rpm por 10 min, se descartó parte del sobrenadante y con el restante se hizo resuspensión, se tomaron 10  $\mu$ L y se realizó extendido sobre lámina de vidrio. Pasadas 24 horas se realizó fijación con metanol durante 10 min, las láminas se secaron durante 5 minutos y se realizó coloración usando colorante Giemsa (6 gotas) en 2 mL de buffer Sorensen (8,59g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,81g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta aforo de 500 mL) por cada lámina. Se mantuvieron en contacto con la coloración por 15 min, se realizó lavado con buffer Sorensen y por último se dejaron secar y se almacenaron en el laminario para su posterior lectura en el microscopio óptico de luz. Para cada lámina, se contaron 1000 células. La frecuencia de micronúcleos fue evaluada en 1000 eritrocitos policromáticos EPC.

### 3.10 Análisis estadístico

Se realizó análisis estadístico a los ensayos *in vivo* usando el programa Graphad Prims en su versión 8 para Windows, con los datos brutos del tamaño de las lesiones para cada grupo experimental con un  $n \geq 2$  ratones. Se realizó test de normalidad según test de Shapiro-Wilk. Se realizó una prueba de ANOVA de 2 vías y como test post Hoc comparación múltiple de Duunnett de las áreas de las lesiones al inicio, a las 10 dosis y final de tratamiento Vs las áreas en estos tiempos del grupo control. Por otra parte, en los ensayos *in vitro* las concentraciones inhibitorias al 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) y la concentración citotóxica para el 50% de las células ( $\text{CC}_{50}$ ) se determinaron mediante los ajustes de regresión no lineal de las curvas de dosis-respuesta y por regresión sigmoideal utilizando respectivamente utilizando el software Mxslfit™ (ID Business solution, Reino Unido). En la (**Tabla 21**) se muestran las variables y las unidades usadas para la expresión de resultados.

**Tabla 21.**

*Variables experimentales.*

Variable	Tipo de variable	Unidades / Forma de medición
Temperatura	Cuantitativa	$^{\circ}\text{C}$

Humedad relativa	Cuantitativa	% humedad
Nivel acidez/alcalinidad	Cuantitativa	1-14 pH
Concentración parásitos	Cuantitativa	Nº parasito/100 microlitro
Concentración formulación	Cuantitativa	% P/P
Tamaño de la lesión	Cuantitativa	mm <sup>2</sup>
Parámetros histopatológicos	Cualitativa	(-) ausencia, (±) equivoca, (+) leve, (++) moderado y (+++) severo
Cortes histológicos	Cuantitativa	µm
Solubilidad	Cualitativa / cuantitativa	Cualitativa: S (soluble), PS (Parcialmente soluble), I (Insoluble) Cuantitativa: g/L
Densidad	Cuantitativa	g/mL
Rendimiento	Cuantitativa	% Rendimiento
Pureza	Cuantitativa	% Pureza

#### 4. Resultados

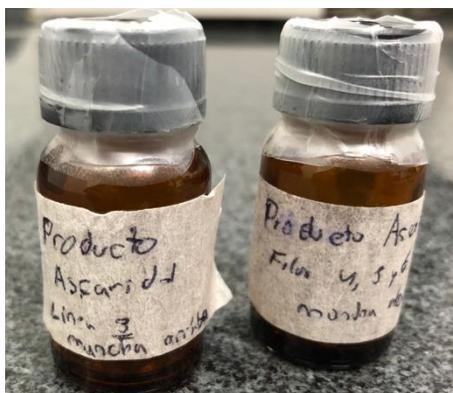
En una primera parte se muestran resultados de la síntesis de ascaridol, datos sobre la solubilidad de los metabolitos secundarios, del epazote, las formulaciones y excipientes y sus características organolépticas, fisicoquímicas y espectrales. De igual manera, las pruebas de estabilidad con respecto al tiempo y temperatura, para las formulaciones y vehículos. Igualmente, los resultados de la citotoxicidad, actividad antileishmania en promastigotes y en amastigotes de *L. (V.) braziliensis* de las formulaciones, vehículos y metabolitos secundarios y de los efectos clínicos, parasitológicos y toxicológicos del tratamiento en ratones BALB/c sanos e infectados con *L. (V.) braziliensis*.

#### 4.1 Síntesis de ascaridol

Se muestran los productos recolectados de la síntesis de ascaridol, a partir de las relaciones de fase móvil (9:1, 2:1, 1:1 éter de petróleo/EtOAc). La cantidad sintetizada obtenida fue muy poca (< 1 mL), lo cual indicó que el rendimiento de la reacción fue bajo (**Figura 16**).

#### **Figura 16.**

*Productos de síntesis de ascaridol obtenidos luego de purificación en columna*

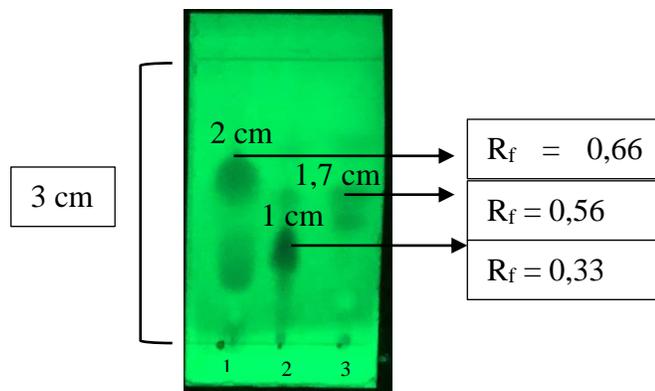


*Nota:* Productos obtenidos de la síntesis de ascaridol obtenidos de la purificación en columna con fase móvil de la relación 2:1 y 1:1 de éter de petróleo/EtOAc, respectivamente.

En la (**Figura 14**) se muestra la lámina usada en la cromatografía de capa fina donde el control se marcó como 1. La marca correspondiente al  $R_f$  de 0,66 cm pudo corresponder al ascaridol puesto que se conoce que su  $R_f$  es de 0,61 cm (Sahli F. et., 2019). Los productos recolectados de la cromatografía en columna (**Figura 16**) con relaciones 2:1 y 1:1 de éter de petróleo/EtOAc fueron marcados como 2 y 3 respectivamente. Con base a que el  $R_f$  para el ascaridol es de 0,61 cm, se tomaron los tubos con relación 1:1 de éter de petróleo/EtOAc. Esto debido a que la mancha con valor de  $R_f$  más cercano al de la literatura, fue observada en este carril (3),  $R_f = 0,57$  cm. Sin embargo, se observaron impurezas en el producto escogido (manchas observadas a lo largo del carril 3 en la capa fina) (**Figura 17**).

### Figura 17.

Fotografía de cromatografía de capa fina para extractos de la síntesis de ascaridol obtenido experimentalmente



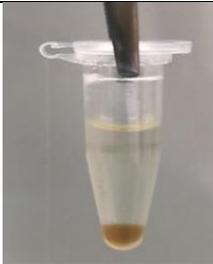
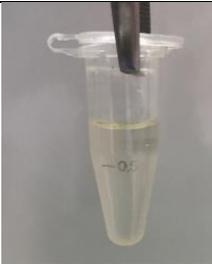
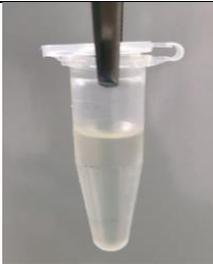
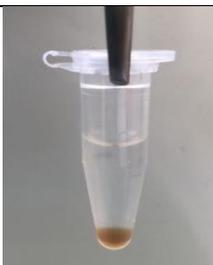
*Nota:* En la figura se muestra la capa fina obtenida experimentalmente y visualizada por fluorescencia, con los  $R_f$  obtenidos para los diferentes PSA evaluados y el control. El carril 1 corresponde al control (producto obtenido previo a la purificación), el carril 2 al PSA obtenido de purificación en columna con fase móvil de la relación 2:1 de éter de petróleo/EtOAc y el carril 3 a la relación 1:1 de éter de petróleo/EtOAc.  $R_f$ : relación entre las distancias recorridas entre el soluto y el eluyente desde el origen de la placa.

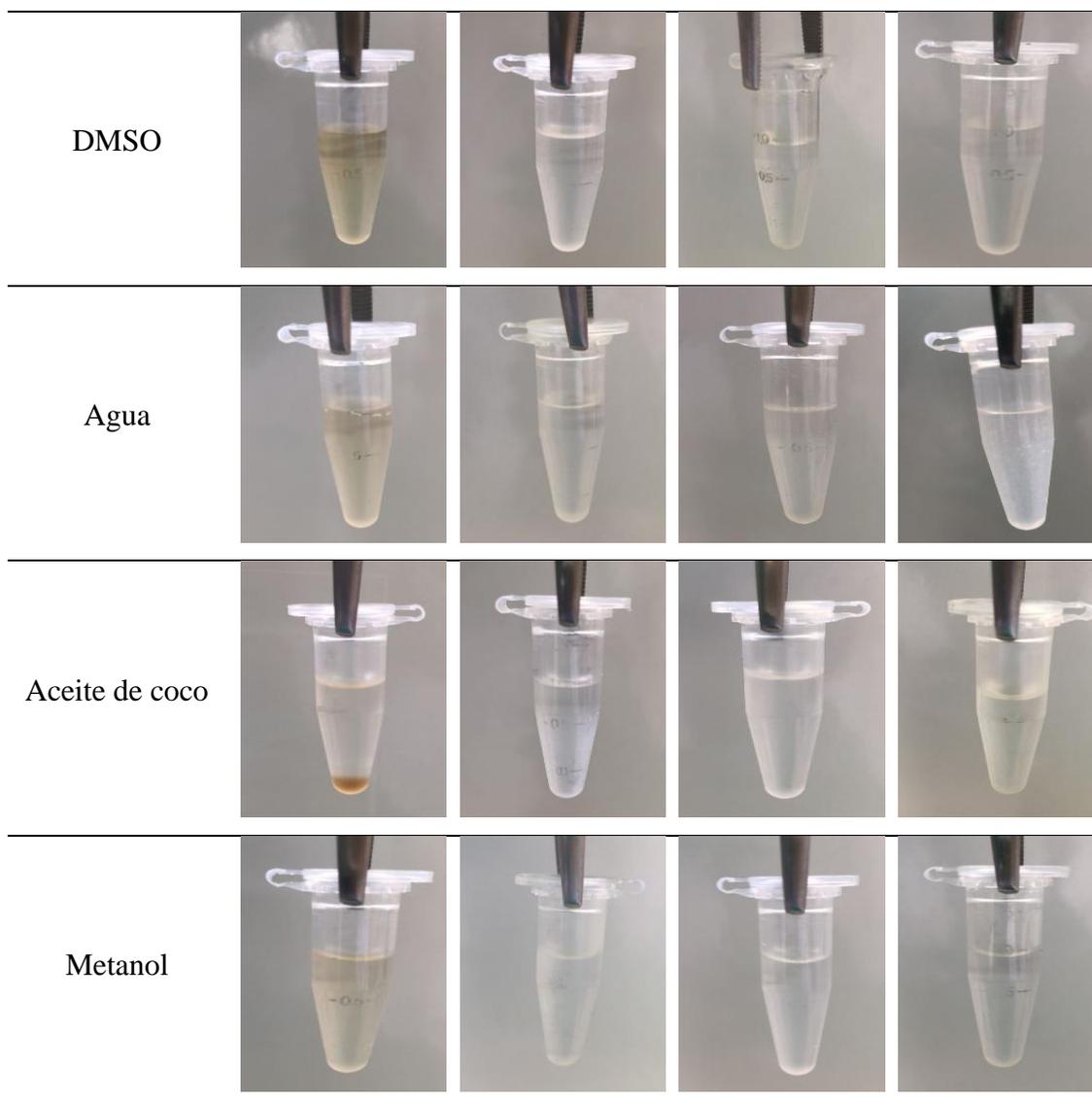
## 4.2 Solubilidad de los metabolitos secundarios y del epazote

Los resultados de la solubilidad de los metabolitos secundarios estudiados y del epazote en los solventes: aceite de ricino, tolueno, etanol, n-pentano, DMSO, agua, aceite de coco, metanol se muestran en la **Tabla 22**.

**Tabla 22.**

*Resultados fotográficos pruebas de solubilidad*

Compuestos puros →	Epazote	$\alpha$ -Terpineno	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	Carvacrol
Solventes ↓				
Aceite de ricino				
Tolueno				
Etanol				
n-Pentano				



El  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -cariofileno y carvacrol fueron solubles en todos los solventes utilizados a excepción del agua donde estos fueron parcialmente solubles (PS) debido a su naturaleza apolar (la de los metabolitos secundarios) que no permite su completa disolución en compuestos muy polares como el agua. El epazote fue insoluble (I) en los solventes de carácter apolar (aceite de ricino, tolueno, n-pentano y aceite de coco) probados, esto debido a que en su composición está presente el agua, lo que le otorga un carácter polar (**Tabla 23**).

**Tabla 23.***Descripción de la solubilidad de metabolitos secundarios y epazote en diferentes solventes*

Compuestos	Solventes							
	Aceite de ricino	Tolueno	Etanol	n-Pentano	DMSO	Agua	Aceite de coco	Metanol
Epazote	I	I	S	I	S	S	I	S
$\alpha$ -Terpineno	S	S	S	S	S	S	S	S
trans- $\beta$ -Cariofileno	S	S	S	S	S	PS	S	S
Carvacrol	S	S	S	S	S	PS	S	S

*Nota:* I: insoluble, PS: Parcialmente soluble, S: soluble. DMSO: dimetilsulfóxido.

### 4.3 Caracterizaciones espectrales de los metabolitos secundarios, del epazote y del producto de síntesis del ascaridol (PSA)

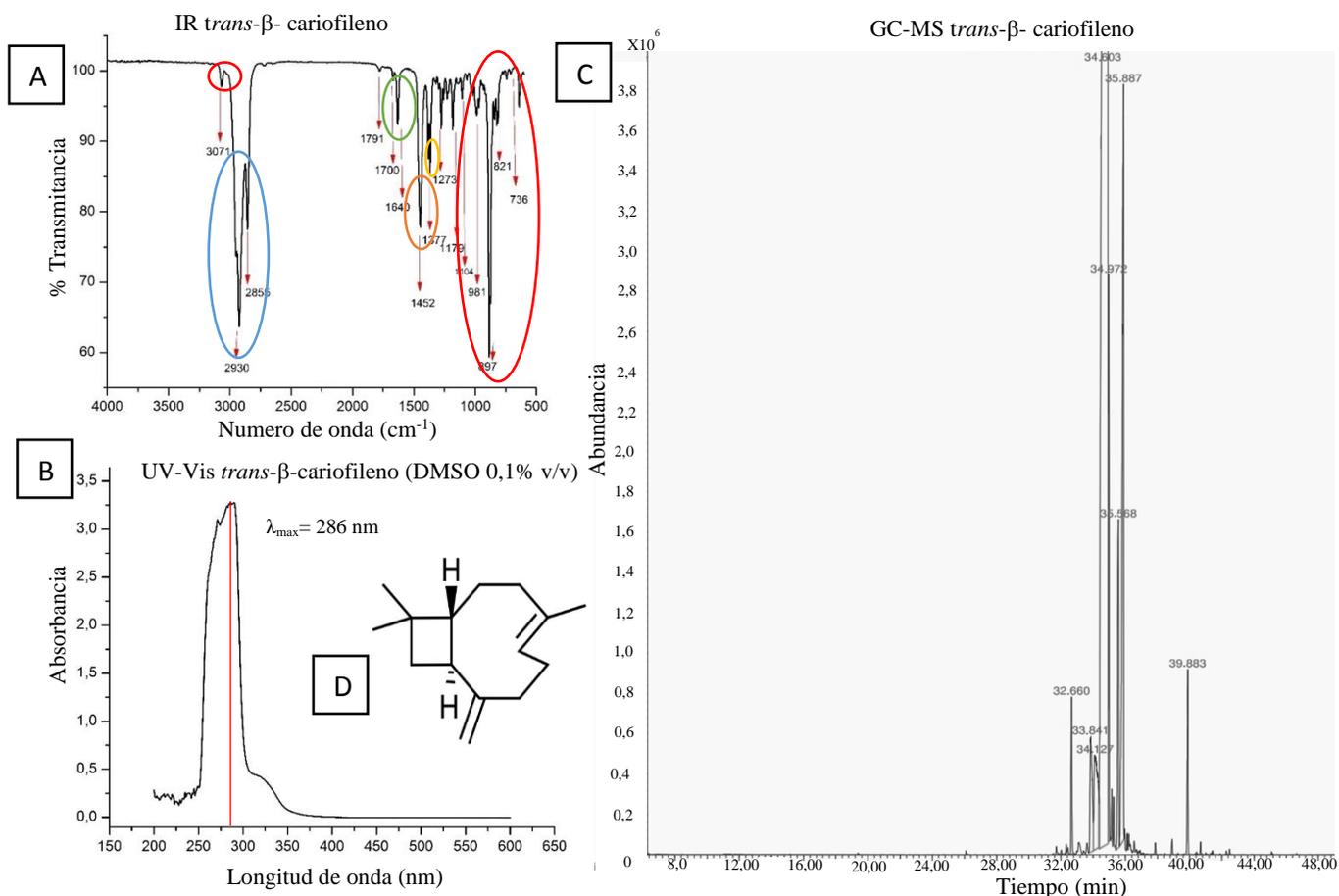
#### 4.3.1 trans- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -C)

En la **Figura 18** se muestran los espectros y cromatogramas correspondientes al  $\beta$ -C. En el espectro IR (**Figura 18A**), se evidenciaron 2 bandas ubicadas en  $2855\text{ cm}^{-1}$  y  $2930\text{ cm}^{-1}$  características de hidrocarburos con hibridación  $\text{C sp}^3$  de enlaces (-CH) (marcado en azul). La señal de absorción a los  $1377\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del metilo  $\text{CH}_3$  (marcado de amarillo). Por otra parte, la banda a  $3071\text{ cm}^{-1}$  así como las señales entre  $650\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  (señales a  $736\text{ cm}^{-1}$ ,  $821\text{ cm}^{-1}$ ,  $897\text{ cm}^{-1}$ ,  $981\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde a la vibración del enlace =C-H del alqueno presente en el ciclo como se evidencia en la estructura del  $\beta$ -C (marcado en rojo). También se observa una banda en  $1640\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del enlace C=C (marcado en verde). El metileno de  $\text{CH}_2$  presente en la estructura se correlaciona con la señal a  $1452\text{ cm}^{-1}$  (marcado en naranja). El espectro infrarrojo para el  $\beta$ -C tomado de la base de datos de Bio-Rad/Sadtler muestra señales que coinciden muy bien con las posiciones y forma del espectro obtenido experimentalmente (**Figura 12**). Las bandas observadas en la región de  $600\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la huella dactilar del  $\beta$ -C. En el espectro UV-Vis (**Figura 18B**), se observó que el  $\beta$ -C diluido en DMSO a una concentración de 0,1 % v/v, presenta una banda ancha de absorción en la región de 250 nm-350 nm con una longitud de máxima absorción en 286 nm, este

compuesto es incoloro debido a su absorción fuera del espectro visible. de igual forma se evidencia un hombro en la región de 300 nm-350 nm. La banda ancha puede presentarse por solapamiento de las transiciones electrónicas y vibracionales de la molécula, así como por efectos del disolvente. La absorción UV de la molécula puede ocurrir por transiciones de orbitales  $\pi$  a  $\pi^*$ . El espectro UV-Vis obtenido experimentalmente no coincide con el de la literatura (**Figura 13**). En el cromatograma del  $\beta$ -C (**Figura 18C**) se evidenciaron varios picos (8) de componentes con tiempos de elución en la región de 32-40 min (32,66 min, 33,84 min, 34,13 min, 34,60 min, 34,97 min, 35,57 min, 35,89 min, 39,88 min) así como su cantidad relativa y su identificación tentativa (**Tabla 24**).

**Figura 18.**

*Espectros IR, UV-Vis y cromatograma de  $\beta$ -C*



*Nota:* En la figura se observan los espectros y cromatograma obtenidos para el  $\beta$ -C. A) espectro infrarrojo (sin diluir), B) espectro UV-Vis (diluido en DMSO a una concentración 0,1 % v/v) y C) cromatograma GC para  $\beta$ -C (dilución en inyección directa) D) Estructura molecular del  $\beta$ -C (realizada en ChemDoodle).

**Tabla 24.**

*Identificación tentativa y tiempos de retención del trans- $\beta$ -cariofileno por GC-MS*

<b>T<sub>Rf</sub> min</b>	<b>Identificación tentativa</b>	<b>Cantidad relativa, %</b>
		<b>991224-BV</b>
		<b>Compuesto: <math>\beta</math>-cariofileno, marca: Sigma- Aldrich, cantidad: 2 mL</b>
32,66	$\alpha$ -Copaeno	1,6
33,84	cis- $\beta$ -Cariofileno	2,9
34,13	7-Metilen-2,4,4-trimetil-2-vinil- biciclo(4,3,0)nonano	4,2
34,60	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	68,7
34,97	10,10-Dimetil-2,6- dimetilenobiciclo(7,2,0)undecano	4,1
35,57	4,11,11-Trimetil-8- metilenobiciclo(2,7,0)undec-3- eno	4,1
35,89	$\alpha$ -Humuleno	12,7
39,88	Óxido de cariofileno	1,7

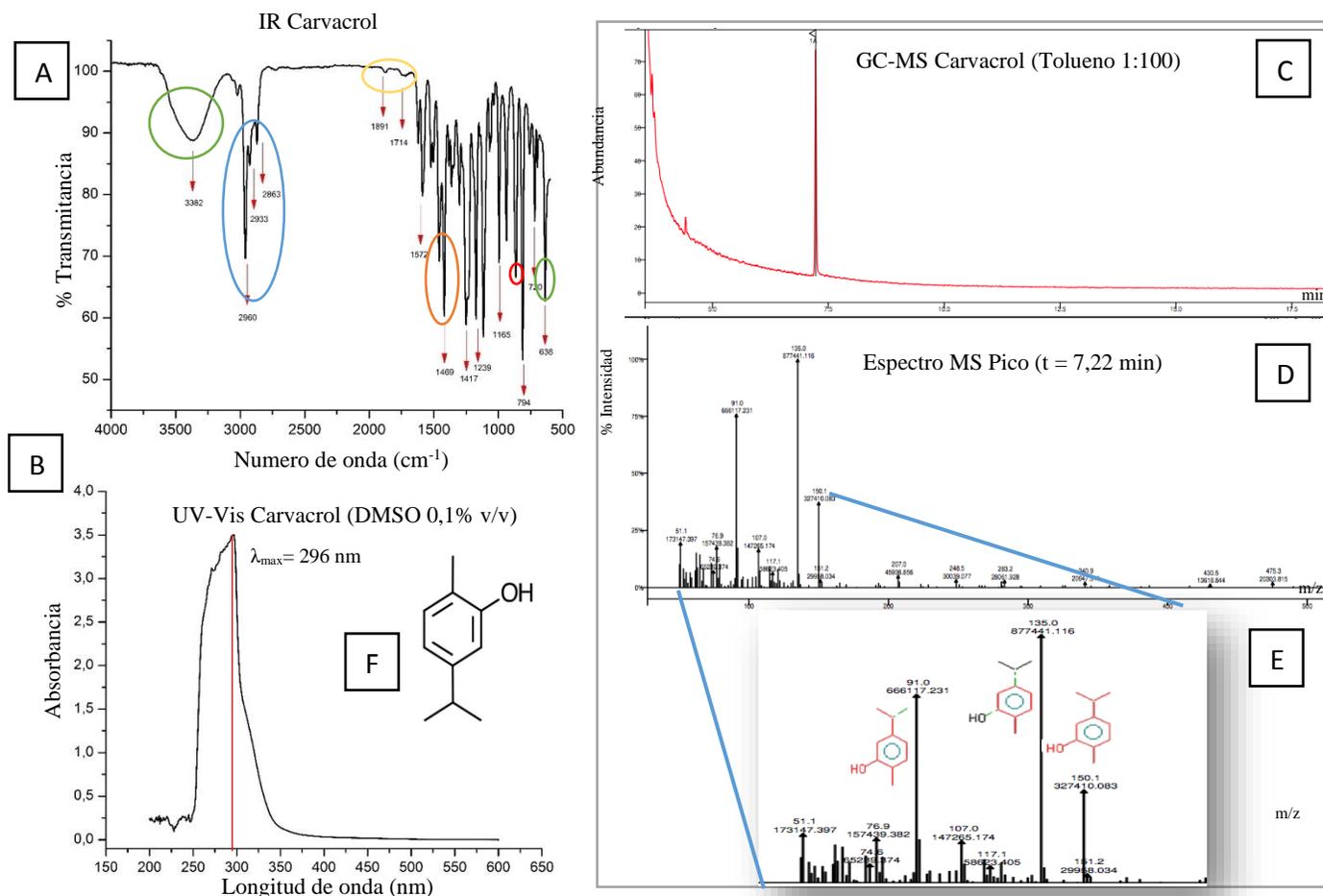
#### 4.3.2 Carvacrol.

Los espectros y cromatogramas correspondientes al carvacrol se muestran en la **Figura 19**. En el espectro IR (**Figura 19A**) se evidenciaron bandas ubicadas en  $2863\text{ cm}^{-1}$ ,  $2933\text{ cm}^{-1}$ ,  $2960\text{ cm}^{-1}$  características para el estiramiento del enlace  $=\text{C-H}$  del aromático (marcado en azul). Las señales de absorción en el rango de  $805\text{ cm}^{-1}$  y  $885\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo de flexión fuera del plano del enlace C-H (marcado en rojo). De igual forma se presentan señales en pares en la longitud de onda sobre los  $1469\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del enlace C=C (marcado en naranja). La tri sustitución del aromático en las posiciones 1,2,4 se puede evidenciar en las dos bandas mostradas en  $1891\text{ cm}^{-1}$  y  $1714\text{ cm}^{-1}$  (marcado en amarillo). Las señales en  $636\text{ cm}^{-1}$  y  $3382\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la flexión fuera del plano y vibración de estiramiento del enlace OH respectivamente (marcadas en verde). El espectro infrarrojo para el carvacrol tomado de la base

de datos de Bio-Rad/Sadtler muestra señales que coinciden muy bien con las posiciones y forma del espectro obtenido experimentalmente (**Figura 12**). En el espectro UV-Vis (**Figura 19B**), el carvacrol diluido en DMSO a una concentración de 0,1 % v/v, presenta una banda ancha de absorción en la región de 250 nm-350 nm con una longitud de onda máxima absorción en 296 nm. Este compuesto es incoloro debido a su absorción fuera del espectro visible. La banda ancha puede presentarse por solapamiento de las transiciones electrónicas y vibracionales de la molécula, así como por efectos del disolvente. La absorción UV de la molécula puede ocurrir por transiciones de orbitales  $n$  o  $\pi$  a  $\pi^*$ . El espectro UV-Vis obtenido experimentalmente no coincide con el de la literatura (**Figura 13**) posiblemente debido al solvente usado para la dilución. En el cromatograma obtenido por GC (**Figura 19C**) y sus espectros de masas (**Figura 19D**) se evidencia un pico de elución pronunciado en el tiempo 7,229 min, el espectro de masas obtenido de esta señal indicaría que es el carvacrol según base de datos de la NIST MS Search 2.3 (mainlib). Se evidencia en el espectro la señal del ion molecular a una relación  $m/z$  de 150, así como otros picos intensos a relaciones  $m/z$  de 135, 117, 107, 91. Las fragmentaciones moleculares de estas señales se presentan sobre el espectro de masas y se resumen en la **Tabla 25**. El espectro de masas obtenido experimentalmente se correlaciona muy bien con la base de datos de NIST para el carvacrol, ya que las señales obtenidas se encuentran en el espectro de literatura (**Figura 14**).

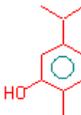
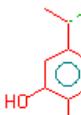
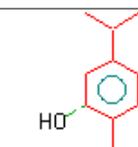
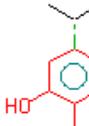
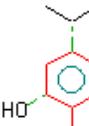
**Figura 19.**

*Espectros IR, UV-Vis y cromatograma de carvacrol*



*Nota:* En la figura se observan los espectros y cromatograma obtenidos de manera experimental para el carvacrol. A) espectro infrarrojo (sin diluir), B) espectro UV-Vis (diluido en DMSO a una concentración de 0,1% v/v), C) cromatograma GC-MS (diluido en tolueno relación 1:1000), D) Espectro de masas para el pico con tiempo de elución 7,229 min, E) Espectro de masas para el pico con tiempo de elución 7,229 min (ampliado), F) Estructura molecular del carvacrol (realizada en ChemDoodle).

**Tabla 25.***Fraccionamiento molecular del carvacrol*

m/z	Formula	Pérdida	Tipo	Fraccionamiento molecular
150	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	e <sup>-</sup>	Parental	
135	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O	CH <sub>3</sub>	Disociación	
117	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub>	H <sub>2</sub> O + CH <sub>3</sub>	Disociación	
107	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Disociación	
91	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O	-	

*Nota:* Datos obtenidos por el software NIST MS Search 2.3 (mainlib).

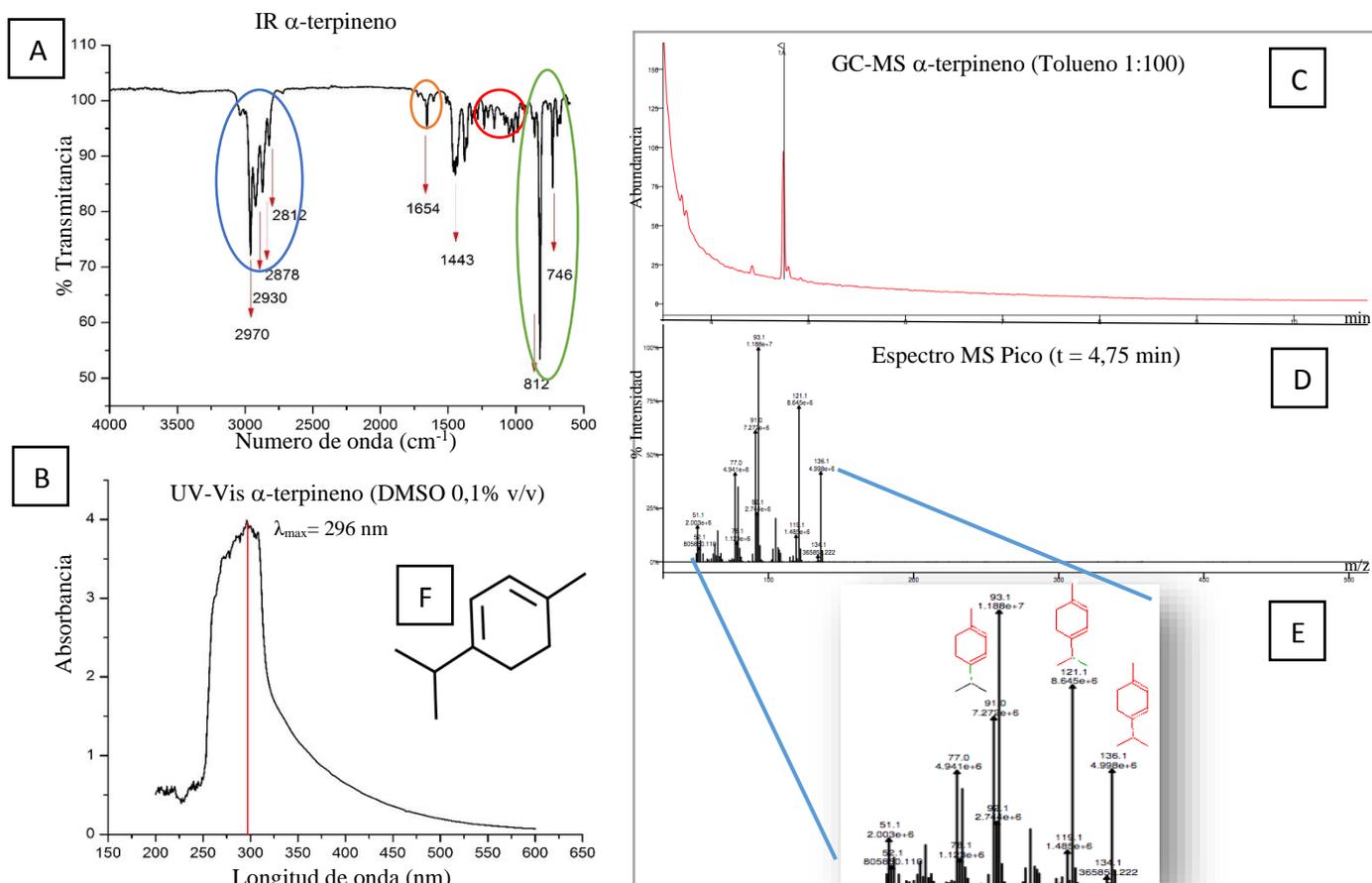
### 4.3.3 $\alpha$ -Terpineno

Los espectros y cromatogramas correspondientes al  $\alpha$ -terpineno se muestra en la **Figura 20**. En el espectro IR (**Figura 20A**), se evidenciaron bandas ubicadas en 2812 cm<sup>-1</sup>, 2878 cm<sup>-1</sup>, 2930 cm<sup>-1</sup> y 2970 cm<sup>-1</sup> características para el estiramiento del enlace =C-H del alqueno (marcado en azul). Las señales de absorción en el rango de 1375 cm<sup>-1</sup> a 1380 cm<sup>-1</sup> y 1145 cm<sup>-1</sup> a 1170 cm<sup>-1</sup> corresponde a las vibraciones del metilo e isopropilo respectivamente presente en la molécula (marcado en rojo). De igual forma se presenta una señal sobre los 1654 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del enlace C=C (marcado en naranja). Las señales en 560 cm<sup>-1</sup> a 1000 cm<sup>-1</sup> corresponden a la flexión fuera del plano de =C-H (marcadas en verde). El espectro infrarrojo para el  $\alpha$ -terpineno

tomado de la base de datos de Bio-Rad/Sadtler muestra señales que coinciden muy bien con las posiciones y forma del espectro obtenido experimentalmente (**Figura 12**) En el espectro UV-Vis (**Figura 20B**), se observó que el  $\alpha$ -terpineno diluido en DMSO a una concentración de 0,1 % v/v, presenta una banda ancha de absorción en la región de 250 nm hasta casi 600 nm, pero con una longitud de onda máxima absorción en 296 nm. Este compuesto puede presentar algún tipo de coloración amarilla leve ya que presenta absorbancias en el espectro visible en la región de 400 nm a 430 nm. La banda ancha puede presentarse por solapamiento de las transiciones electrónicas y vibracionales de la molécula, así como por efectos del disolvente. La absorción UV de la molécula puede ocurrir por transiciones de orbitales  $\pi$  a  $\pi^*$ . El espectro UV-Vis obtenido experimentalmente no coincide con el de la literatura (**Figura 13**) esto puede deberse al solvente usado para la dilución. En el cromatograma de  $\alpha$ -terpineno (**Figura 20C**) se evidencia un pico de elución pronunciado en el tiempo 4,751 min. El espectro de masas (**Figura 20D**) obtenido de esta señal indicaría que es el  $\alpha$ -terpineno según base de datos de la NIST MS Search 2.3 (mainlib). Se evidencia en el espectro la señal del ion molecular a una relación m/z de 136, así como otros picos intensos a relaciones m/z de 121, 105, 93, 92 79, 77. Las fragmentaciones moleculares de estas señales se presentan sobre el espectro de masas y se resumen en la **Tabla 26**. El espectro de masas obtenido experimentalmente se correlaciona muy bien con el de base de datos de NIST para el  $\alpha$ -terpineno, ya que las señales obtenidas se encuentran en el espectro de literatura (**Figura 14**).

**Figura 20.**

*Espectros IR, UV-Vis y cromatograma de  $\alpha$ -terpineno*



*Nota:* En la figura se observan los espectros y cromatograma obtenidos de manera experimental para el  $\alpha$ -terpineno. A) espectro infrarrojo (sin diluir), B) espectro UV-Vis (diluido en DMSO a una concentración de 0,1% v/v), C) cromatograma GC-MS (diluido en tolueno relación 1:1000), D) Espectro de masas para el pico con tiempo de elución 4,751 min, E) Espectro de masas para el pico con tiempo de elución 4,751 min (ampliado), F) Estructura molecular del  $\alpha$ -terpineno (realizada en ChemDoodle).

**Tabla 26.***Fraccionamiento molecular  $\alpha$ -terpineno*

m/z	Fórmula	Pérdida	Tipo	Fraccionamiento molecular
136	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	e <sup>-</sup>	Parental	
121	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub>	CH <sub>3</sub>	Disociación	
105	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub>	CH <sub>4</sub> + CH <sub>3</sub>	Disociación	-CH <sub>3</sub> 
93	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Disociación	
92	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> + CH <sub>3</sub>	Transferencia H <sup>+</sup> en el anillo	-CH <sub>3</sub> 
79	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-	
77	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> + CH <sub>3</sub>	Disociación	-CH <sub>3</sub> 

*Nota:* Datos obtenidos por el software NIST MS Search 2.3 (mainlib).

#### 4.3.4. Epazote

Los espectros y cromatogramas correspondientes al epazote se muestran en la **Figura 21**. En el espectro IR (**Figura 21A**), se evidenció una banda ancha sobre los 3273 cm<sup>-1</sup> posiblemente

causado por las vibraciones de enlaces O-H del agua o glicerina presente en la muestra (marcado en azul), además, se observan 2 bandas en  $2930\text{ cm}^{-1}$  y  $2851\text{ cm}^{-1}$  posiblemente debidas a vibraciones de enlace C-H de compuestos orgánicos (marcada en verde), así como la señal en  $1640$  podría indicar la presencia de enlaces C=C (marcada en rojo). En el espectro UV-Vis (**Figura 21B**), se observó que el extracto de epazote diluido en DMSO a una concentración de  $0,1\%$  v/v, presenta una banda ancha de absorción en la región de  $250\text{ nm}$  hasta casi  $500\text{ nm}$ , pero con una longitud de onda máxima absorción en  $295\text{ nm}$ . Este compuesto puede presentar algún tipo de coloración amarilla leve ya que presenta absorbancias en el espectro visible en la región de  $400\text{ nm}$  a  $430\text{ nm}$ . La banda ancha puede presentarse por solapamiento de las transiciones electrónicas y vibracionales de la molécula, así como por efectos del disolvente. La absorción UV de la molécula puede ocurrir por transiciones de orbitales  $n, \pi$  a  $\pi^*$ . En el cromatograma (**Figura 21C**) se evidenciaron 10 picos de componentes con tiempos de elución en la región de  $1-4\text{ min}$ , el pico con mayor intensidad corresponde al tiempo de elución de  $1,249\text{ min}$ . En la **Tabla 27** se muestra los picos, tiempos de retención, anchura, área y altura de cada pico.

**Tabla 27.**

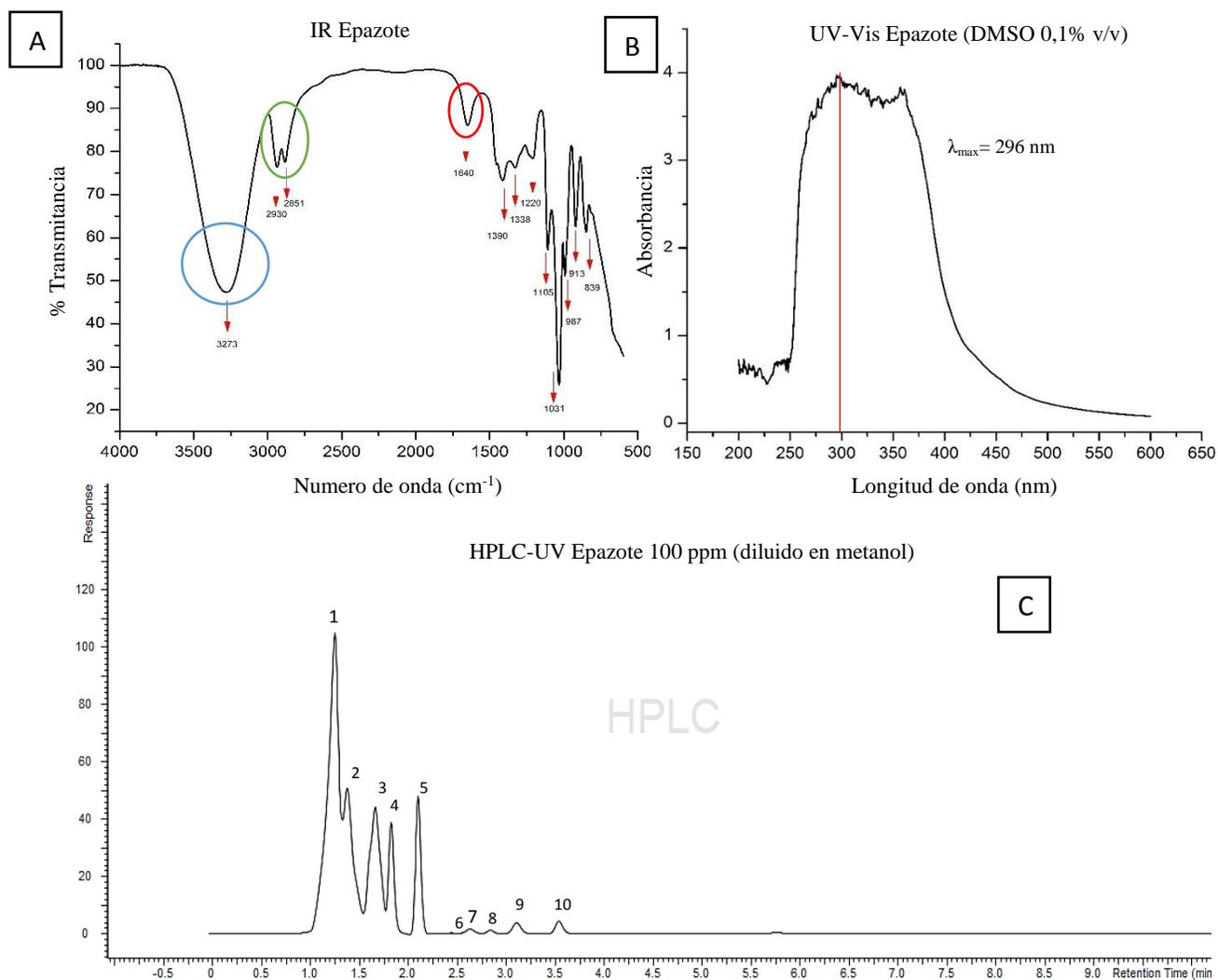
*Tiempos de retención HPLC-UV epazote*

# Pico	Tiempo de retención	Anchura (min)	Área (mAU*s)	Altura (mAU)	Área %
1	1,25	0,12	877,47	105,42	42,14
2	1,37	0,10	376,71	51,44	18,09
3	1,66	0,11	362,12	45,21	17,39
4	1,82	0,07	177,52	40,11	8,52
5	2,10	0,06	201,25	49,47	9,66
6	2,25	0,09	12,11	2,00	0,58
7	2,63	0,13	17,83	1,93	0,86
8	2,84	0,09	8,74	1,44	0,42
9	3,10	0,10	24,65	3,95	1,18
10	3,54	0,09	24,05	4,41	1,16

*Nota:* mAU: Absorbancia

**Figura 21.**

*Espectros IR, UV-Vis y HPLC-UV de epazote*



*Nota:* En la figura se observan los espectros y cromatograma obtenidos de manera experimental para el epazote A) espectro infrarrojo (sin diluir), B) espectro UV-Vis (diluido en DMSO a una concentración del 0,1% v/v), C) cromatograma HPLC-UV (diluido en metanol concentración 100 ppm).

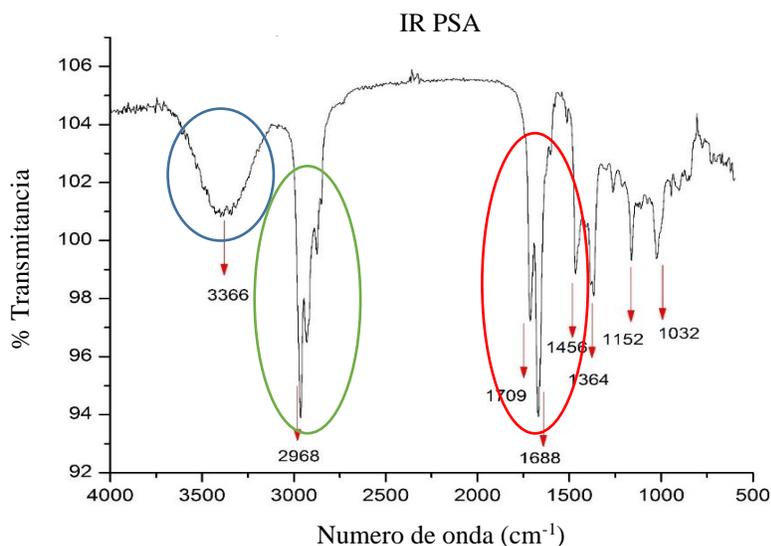
#### 4.3.5 Producto de la síntesis del ascaridol (PSA)

Se tomó el espectro infrarrojo únicamente al producto obtenido con  $R_f$  más cercano al del ascaridol encontrado en la literatura (0,61), el cual fue el producto obtenido de la purificación con fase móvil 1:1. Se evidenció una banda ancha sobre la región de  $3366\text{ cm}^{-1}$  no observada en la base

de datos de Bio-Rad/Sadtler indicativo que la molécula obtenida no es la esperada (marcada en azul), las bandas observadas en  $2950\text{ cm}^{-1}$  a  $2990\text{ cm}^{-1}$  (marcadas en verde) coinciden en forma con las esperadas. Las bandas en la región  $1500\text{-}1710$  no coinciden con las esperadas (marcadas en rojo) (**Figura 22**).

### Figura 22.

*Espectros IR del PSA obtenido*



*Nota:* Espectro IR obtenido para el PSA, marcando en color las señales principales de los grupos funcionales observados en el espectro.

#### 4.4 Características fisicoquímicas y organolépticas de formulaciones y sus componentes (adicionalmente las de $\alpha$ -terpineno y PSA).

Las características organolépticas y fisicoquímicas de formulaciones tipo solución (F1/F3, F2), tipo gel (G1), tipo ungüento (U1), y la de sus vehículos (VF, VG, VU), junto con sus componentes se encuentran en las (**Tablas 28, 29, 30, 31**) respectivamente.

#### 4.4.1 Formulaciones tipo solución (F) de *trans*- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ -C)

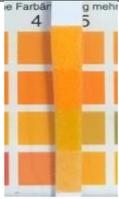
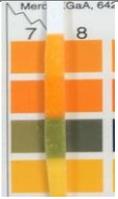
Se prepararon formulaciones F conteniendo  $\beta$ -C codificadas como F1/F3 y F2 con sus respectivos vehículos según lo descrito en el ítem 3.4.

En general las F fueron translucidas, líquidas, homogéneas con un pH neutro o ligeramente ácido de 6,5 a 7,0 y una densidad de aproximadamente de 1,020. Con respecto a los componentes, el PBS, DMSO y SS mostraron características organolépticas similares, con diferencias en el pH (de pH 4 a pH 9) y densidad (de 1,01 a 1,1 g/mL). Por otro lado, el Kolliphor (aceite de ricino polietoxilado) fue de color amarillo intenso, aceitoso, de olor característico, densidad similar al DMSO, de 1,07 g/mL. El compuesto activo  $\beta$ -C (alícuota del reactivo  $\beta$ -cariofileno, 80% de pureza), mostró características organolépticas similares al Kolliphor, pero mostrando una densidad menor con valores de 0,90 g/mL (**Tabla 28**).

**Tabla 28.**

*Características organolépticas y fisicoquímicas de formulaciones tipo solución (F) y sus componentes*

Propiedad	F1/F3	F2	$\beta$ -C	Kolliphor	PBS	DMSO	SS
Foto							
Color	Traslucido.		Amarillo poco intenso translucido.	Amarillo intenso translucido	Transparente		
Olor	Herbal, característico $\beta$ -C		Herbal, característico $\beta$ -C	Característico Aceite ricino	Inodoro		
Aspecto físico	Líquido, denso, homogéneo		Aceitoso, líquido, denso, homogéneo		Líquido, poco denso, homogéneo		

pH	Tira							
	pHmetro (promedio $\pm$ DE)	6,942 +/-0,017	6,551 +/-0,009			ND		
Densidad (g/mL)	1,015	1,023	0,901	1,066	1,043	1,097	1,013	

*Nota:* La tabla muestra los resultados de las formulaciones (F1/F3 y F2) y sus componentes  $\beta$ -C:  $\beta$ -cariofileno, K: Kolliphor, PBS: buffer fosfato salino, DMSO: dimetilsulfóxido, SS: solución salina. El pH utilizando pHmetro se determinó únicamente para F1/F3 y F2, se realizó un promedio de las mediciones y se sacó la desviación estándar (DE). Las formulaciones F1 y F3 se agruparon debido a su composición similar.

#### 4.4.2 Formulaciones tipo gel (G)

Se preparó una formulación tipo G conteniendo Epazote codificada como G1 y su respectivo vehículo según lo descrito en el ítem 3.4. En la **(Tabla 29)** se muestran las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la formulación (G1) y sus componentes. Se observó que la formulación G1 mantuvo el color amarillento y olor derivado del componente activo (extracto líquido de epazote). La densidad de G1 disminuyó respecto al componente activo 1,023 g/mL. Por otra parte, el pH de G1 aumentó de 4 a 6 en la escala de pH con respecto al epazote. El benzoato de sodio y el CMC fueron de color blanco y de aspecto sólido, estuvo en el rango de pH (de pH 5 a pH 7). La glicerina y el propilenglicol fueron líquidos transparentes e inodoros, su pH estuvo en el rango (de pH 4 a pH 6) **(Tabla 29)**.

**Tabla 29.**

*Características organolépticas y fisicoquímicas de los componentes para formulaciones tipo gel (G1) de epazote*

Propiedad	G1	Extracto líquido de epazote	Benzoato de sodio	CMC	Glicerina	PPG
Foto						
Color	Amarillo quemado	Amarillo oscuro	Blanco		Transparente	
Olor	Herbal	Dulce herbal	Agrio	Inodoro	Inodoro	Inodoro
Aspecto físico	Viscoso denso, homogéneo	Líquido	Polvo, sólido		Líquido	
pH	Tira: ND	 4-5	 6-7	 5-6	 5-6	 4-5
pHmetro (promedio ±DE)	6,163 +/- 0,238			ND		
Densidad (g/mL)	1,023	1,217		ND		1,031

*Nota:* La tabla muestra los resultados de la formulación G1 y sus componentes epazote, benzoato de sodio, CMC: carboximetilcelulosa. PPG: propilenglicol. El pH utilizando pHmetro se determinó únicamente para G1 se realizó un promedio de las mediciones y se sacó la desviación estándar (DE). La densidad no pudo ser tomada con picnómetro para algunos componentes.

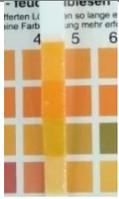
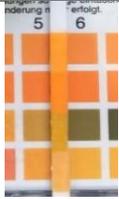
#### 4.4.3 Formulaciones tipo ungüento (U) de epazote

Se preparó una formulación tipo U conteniendo epazote codificada como U1 y su respectivo vehículo según lo descrito en el ítem 3.4. Las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la formulación (U1), del carvacrol (uno de los posibles componentes del epazote) y de sus otros componentes se muestran en la **Tabla 30**. Se observó que la formulación U1 fue amarilla y de olor típico a carvacrol, estuvo en el rango de pH (de pH 4 a pH 5) al igual que el carvacrol. La cera de abejas y manteca de cacao fueron de color amarillento, con olores diferenciados y de aspectos diferentes, la manteca de cacao fue un sólido moldeable. La cera de abejas fue ligeramente menos ácida que la manteca de cacao. El aceite de coco y vitamina E tuvieron tonalidades incoloras y amarillentas respectivamente, sus aspectos fueron líquidos, viscosos y densos y el pH en rangos de 4 a 6 (**Tabla 30**).

**Tabla 30.**

*Características organolépticas y fisicoquímicas de los componentes para formulaciones tipo ungüento (U) conteniendo epazote*

Propiedad	U1	Carvacrol	Cera de abejas	Manteca de cacao	Aceite de coco	Vitamina E
Foto						
Color	Amarillo pastel	Amarillo	Amarillo Quemado	Amarillo pastel	Incoloro Traslucido	Amarillo Traslucido
Olor	Típico a carvacrol	Típica cera de abejas	Cacao	Coco	Dulce, leve	
Aspecto físico	Sólido moldeable, homogéneo, oleoso	Líquido	Sólido	Sólido moldeable	Líquido, viscoso, denso	

pH						
	4-5	4-5	5-6	4-5	4-5	5-6
Densidad (g/mL)	ND		0,882		ND	

*Nota:* La tabla muestra los resultados de la formulación U1 conteniendo epazote, del carvacrol (uno de sus posibles componentes), cera de abejas, mantea de cacao, aceite de coco y vitamina E. La densidad fue medida únicamente para el aceite de coco.

#### 4.4.4 Vehículos de las formulaciones: V1/V3, V2, VG1, VU1.

En la (Tabla 31) se observan las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los vehículos de las formulaciones (F, G y U). Se observó que los vehículos de las formulaciones tipo solución (F) fueron de color translucido, con aspecto líquido, denso y homogéneo. Los pH de estas fueron ácidos en el rango de pH 5,7 a pH 6,6 y la densidad con valores promedios a 1,026 g/mL. El vehículo VG1 fue de color translúcido, inodoros, de aspecto físico viscoso y denso, mientras el VU1 fue de color amarillo, olor típico a cera de abejas y aspecto físico sólido, oleoso. El pH de VG1 fue ligeramente menos ácido pH:6,9 respecto al vehículo VU1 (Tabla 31).

**Tabla 31.**

*Características organolépticas y fisicoquímicas de los vehículos de las formulaciones*

Propiedad	V1/V3	V2	VG1	VU1
Foto				
Color	Traslucido		Amarillo pastel	
Olor	Característico Kolliphor		Inodoro Típico a cera de abejas	

Aspecto físico	Líquido, denso, homogéneo	Viscoso denso, homogéneo	Sólido moldeable, homogéneo, oleoso	
pH	 6-7	 4-5	 4-5	
pHmetro (promedio ± DE)	6,551 +/-0,009	5,677 +/-0,005	6,897 +/- 0,030	ND
Densidad (g/mL)	1,021	1,031	1,014	ND

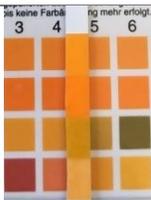
*Nota:* La tabla muestra los resultados de los vehículos de las formulaciones (F, G, U). El pH utilizando pHmetro se determinó únicamente para V1/V2, V3 y VG1, se realizó un promedio de las mediciones y se sacó la desviación estándar (DE). La densidad no pudo ser tomada con picnómetro para VU1.

#### 4.4.5 $\alpha$ -Terpineno y PSA

En la (Tabla 32) se observan las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del  $\alpha$ -terpineno y el producto obtenido de la síntesis del ascaridol. El  $\alpha$ -terpineno y el producto obtenido de la síntesis de ascaridol fueron de color transparente y aspecto físico líquido y denso. El  $\alpha$ -terpineno estuvo en el rango de pH (de pH 4 a pH 5).

**Tabla 32.**

*Características organolépticas y fisicoquímicas  $\alpha$ -terpineno y el PSA*

Propiedad	$\alpha$ -Terpineno	PSA
Foto		
Color	Transparente	Transparente / amarillo translucido
Olor	Dulce, típico	Herbal, similar al paico
Aspecto físico	Líquido, translucido denso	Líquido, aceitoso, denso
pH	 4-5	ND
Densidad (g/mL)	0,84187	

*Nota:* La tabla muestra los resultados del  $\alpha$ -terpineno y el producto obtenido de la síntesis de ascaridol. La densidad fue tomada para el  $\alpha$ -terpineno. PSA: Producto síntesis de ascaridol

#### 4.5 Caracterizaciones espectrales de las formulaciones

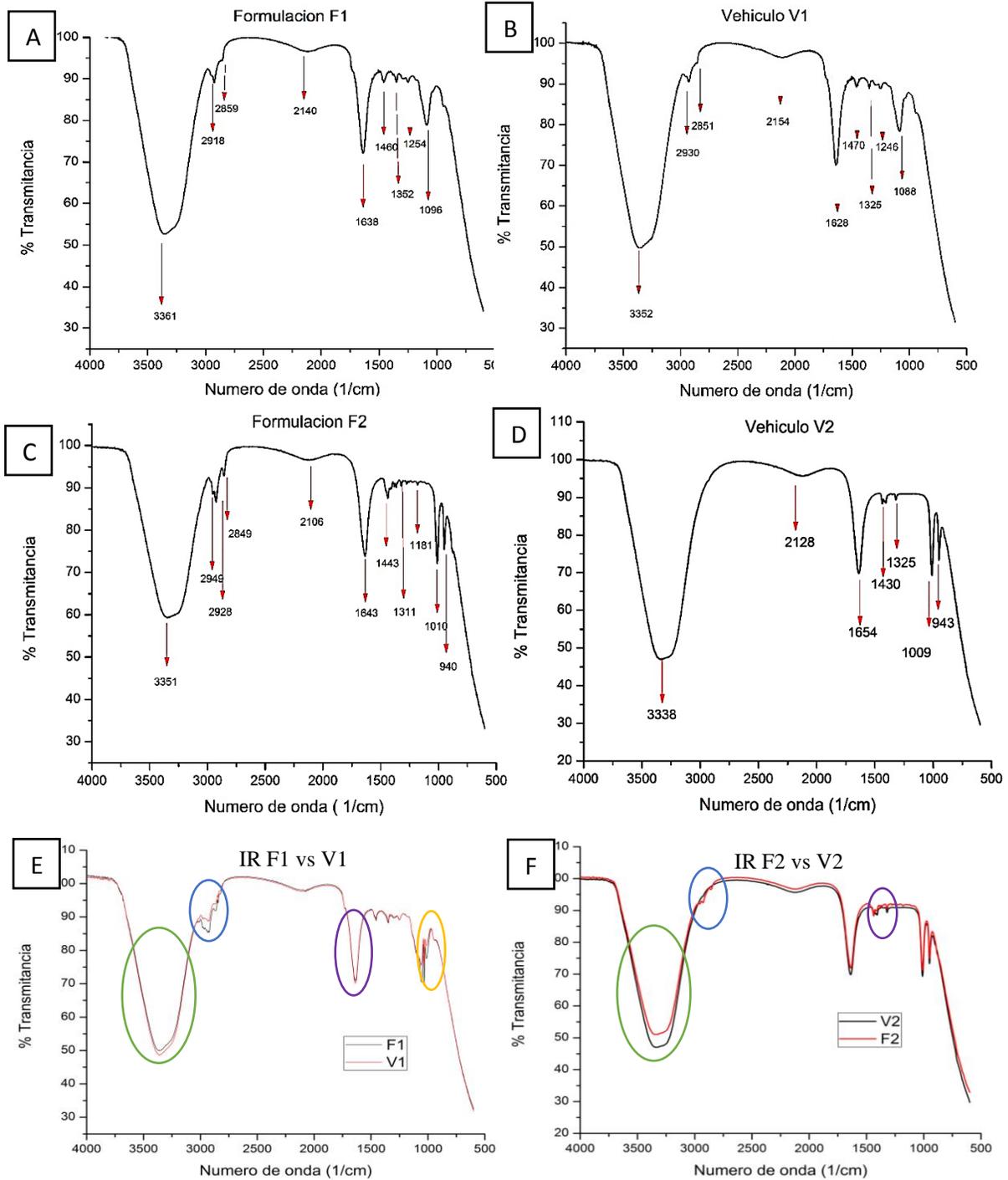
##### 4.5.1 Caracterización espectral de las formulaciones tipo solución (F) y vehículos.

Se muestran cada uno de los espectros infrarrojos obtenidos para las formulaciones (F) y sus vehículos (**Figura 23**). En todos los espectros se observa una banda ancha de vibración en la región  $3200\text{ cm}^{-1}$ - $3500\text{ cm}^{-1}$ , una banda ancha de poca intensidad en la región  $2100\text{ cm}^{-1}$ - $2200\text{ cm}^{-1}$ , así como una banda intensa en la región de  $1600\text{ cm}^{-1}$ - $1700\text{ cm}^{-1}$ . Al comparar F1 con V1 (**Figura 23E**) se puede evidenciar que la banda ancha en  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $3300\text{ cm}^{-1}$  se diferencia en el % de

transmitancia (menor transmitancia mayor concentración), donde V1 tiene un valor inferior a F1, esto podría deberse a la diferencia de concentración de grupos hidroxilo (-OH) provenientes del PBS y Kolliphor que se encuentran en mayor proporción en el vehículo que en la formulación (marcada en verde). Las bandas en  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $2950\text{ cm}^{-1}$  pueden deberse a hidrocarburos con hibridación C  $\text{sp}^3$  de enlaces (-CH) donde F1 presenta menor transmitancia que V1, esta menor transmitancia podría corresponder a la presencia del  $\beta$ -C en F1 ausente en V1 (marcada en azul). Las señales entre  $650\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del enlace =C-H del alqueno presente en la estructura del  $\beta$ -C (marcado en amarillo) estas señales en F1 y V1 difieren en el % transmitancia, siendo menor para F1 por la presencia de  $\beta$ -C (**Figura 23E**). El metileno  $\text{CH}_2$  presente en las estructuras de Kolliphor y  $\beta$ -C se correlacionan con la señal a  $1452\text{ cm}^{-1}$  (marcado en morado) y se pueden observar en ambos espectros infrarrojos F1 y V1. Al comparar F2 con V2 (**Figura 23F**) se puede evidenciar que la banda ancha en  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $3300\text{ cm}^{-1}$  se diferencia en el % de transmitancia (menor transmitancia mayor concentración), donde V2 tiene un valor inferior a F2, esto podría deberse a la diferencia de concentración de grupos hidroxilo (-OH) provenientes del DMSO y SS que se encuentran en mayor proporción en el vehículo que en la formulación (marcada en verde). Las bandas en  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $2950\text{ cm}^{-1}$  pueden deberse a hidrocarburos con hibridación C  $\text{sp}^3$  de enlaces (-CH) donde F2 presenta menor transmitancia que V1, esta menor transmitancia podría corresponder a la presencia del  $\beta$ -C en F2 ausente en V1 (marcada en azul). Las señales en  $1000\text{ cm}^{-1}$  a  $1050\text{ cm}^{-1}$  podrían corresponder a la vibración del enlace S=O del sulfóxido perteneciente al DMSO (marcado en morado) estas señales en F2 y V2 difieren en el % transmitancia, siendo menor para V2. Algunas de las señales propias del  $\beta$ -C se ven solapadas por los componentes de las formulaciones.

**Figura 23.**

*Espectros infrarrojos formulaciones tipo F (conteniendo  $\beta$ -C) y vehiculos*



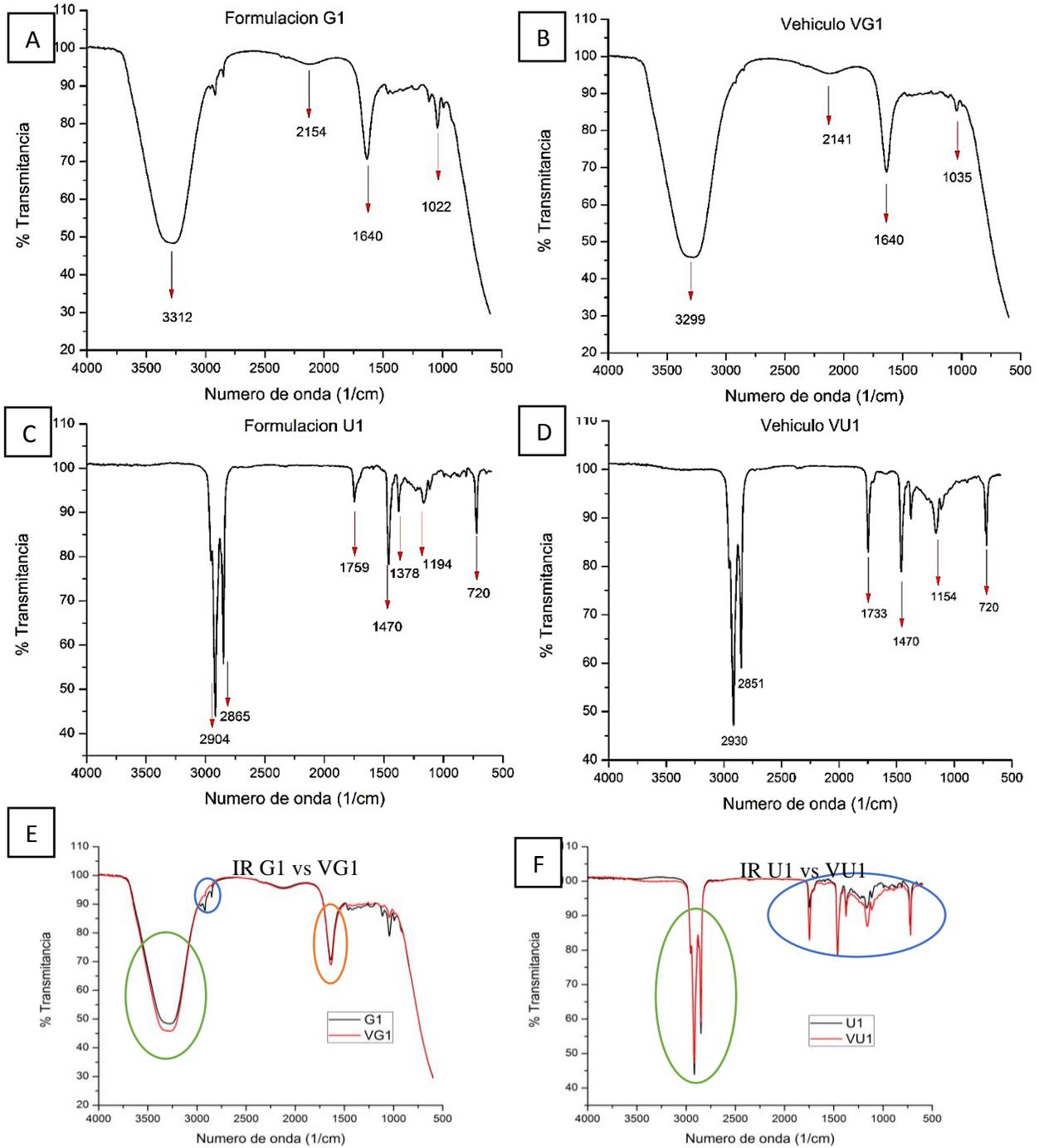
*Nota:* Espectros infrarrojo de formulaciones tipo solución (F) y sus vehículos. A) Espectro de F1, B) Espectro V1, C) Espectro de F2, D) Espectro de V2, E) Espectro F1 Vs V1, F) Espectro F2 Vs V2.

#### **4.5.2 Caracterización espectral de las formulaciones tipo gel (G) y ungüento (U) y sus vehículos.**

Se muestran cada uno de los espectros infrarrojos obtenidos para las formulaciones (G y U) y sus vehículos (**Figura 24**). En los espectros de G1 y VG1 se observa una banda ancha de vibración en la región  $3200\text{ cm}^{-1}$  a  $3400\text{ cm}^{-1}$ , una banda ancha de poca intensidad en la región  $2100\text{ cm}^{-1}$  a  $2200\text{ cm}^{-1}$ , así como una banda intensa en la región de  $2500\text{ cm}^{-1}$  a  $1800\text{ cm}^{-1}$  y una banda alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Al comparar G1 con VG1 (**Figura 24E**) se puede evidenciar que la banda ancha en  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $3300\text{ cm}^{-1}$  se diferencia en el % de transmitancia (menor transmitancia mayor concentración), donde VG1 tiene un valor inferior a G1, esto podría deberse a la diferencia de concentración de grupos hidroxilo (-OH) provenientes del agua, propilenglicol, glicerina que se encuentran en mayor proporción en el vehículo que en la formulación (marcada en verde). Las bandas en  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $2950\text{ cm}^{-1}$  pueden deberse a hidrocarburos con hibridación  $C\text{ sp}^3$  de enlaces (-CH) donde G1 presenta menor transmitancia que VG1, esta menor transmitancia podría corresponder a la presencia del epazote (marcada en azul). La señal entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$  podría corresponder a la vibración del enlace  $C=C$  o  $C=O$  presente en el benzoato de sodio (marcado en naranja). Al comparar U1 con VU1 (**Figura 24F**) se puede evidenciar que la banda intensa entre  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $3000\text{ cm}^{-1}$  podría deberse a enlaces -CH presentes en los excipientes de las formulaciones (marcada en verde) al igual que las bandas en  $700\text{ cm}^{-1}$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$  podrían deberse a la estructura de los hidrocarburos presente en los excipientes (marcada en azul). Las señales en el rango anterior presentan menor transmitancia para VU1 que U1. Algunas de las señales propias del carvacrol se ven solapadas por los componentes de las formulaciones.

**Figura 24.**

*Espectros infrarrojos formulaciones tipo G, U y sus vehículos*



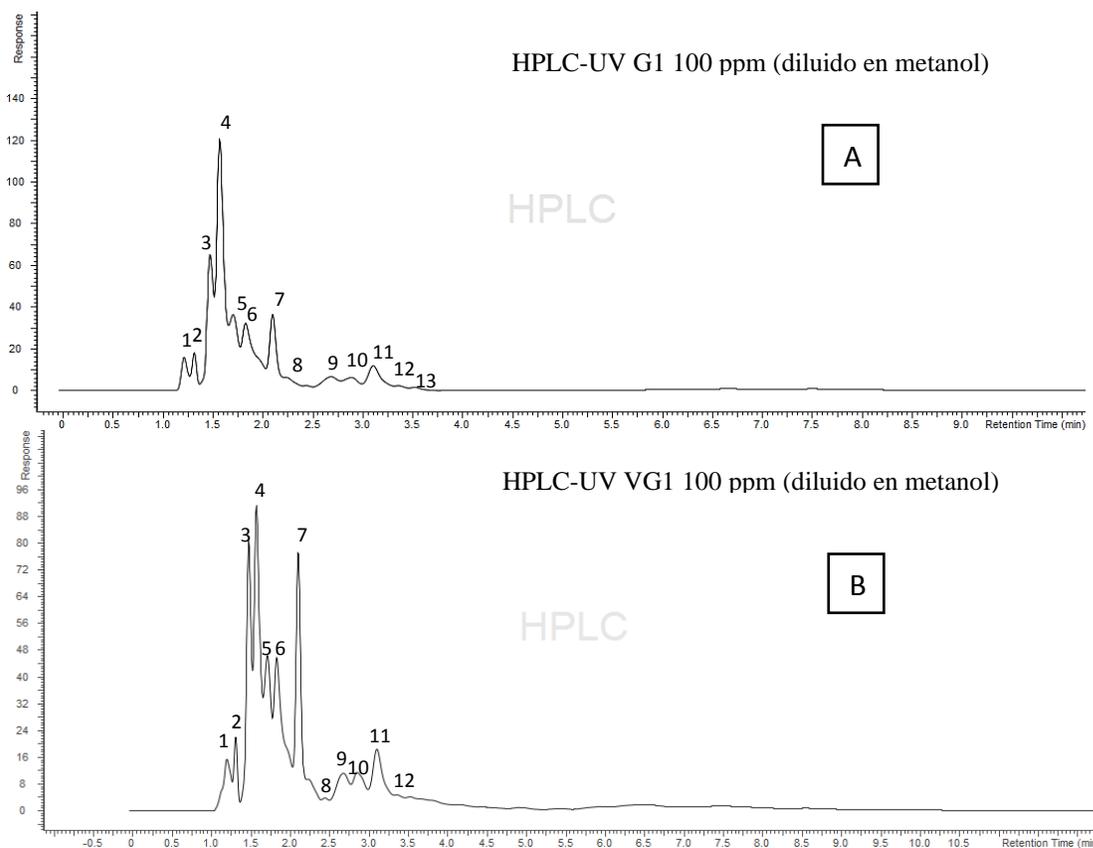
*Nota:* Espectros IR de formulaciones tipo solución gel y ungüento (G y U) y sus vehículos. A)

Espectro de G1, B) Espectro de VG1, C) Espectro de U1, D) Espectro de VU1, E) Espectro G1 Vs VG1, F) Espectro U1 Vs VU1.

En la (**Figura 25**) se pueden observar los cromatogramas obtenidos usando HPLC-UV para las formulaciones G1 y VG1. Los compuestos eluyeron en un rango de tiempo de 0 a 5 min en ambos casos. Para el G1, se determinaron en total 13 componentes, de los cuales el componente con la señal de absorbancia máxima eluyó a un tiempo de retención de 1,566 min. En el caso de VG1 el componente con señal de absorbancia máxima eluyó a un tiempo de retención de 1,571 min de los 12 componentes en total. En la (**Tabla 33, 34**) se muestra los picos, tiempos de retención, anchura, área y altura de cada pico de los cromatogramas obtenidos para G1 y VG1 respectivamente.

**Figura 25.**

*Cromatograma de HPLC-UV de G1 y VG1*



*Nota:* En la figura se observan A) cromatograma G1 HPLC-UV (diluido en metanol concentración 100 ppm) tomado a 228 nm, y B) cromatograma VG1 HPLC-UV (diluido en metanol concentración 100 ppm) tomado a 222 nm.

**Tabla 33.**

*Tiempos de retención HPLC-UV / G1*

# Pico	Tiempo de retención	Anchura (min)	Área (mAU*s)	Altura (mAU)	Área %
1	1,03	0,07	68,35	16,09	3,14
2	1311,00	0,05	64,41	18,23	2,96
3	1,47	0,07	280,13	65,62	12,85
4	1,57	0,08	628,40	120,88	28,83
5	1,70	0,09	215,93	36,61	9,91
6	1,83	0,13	317,69	32,57	14,58
7	2,10	0,10	256,90	36,84	11,79
8	2,44	0,08	15,54	2,73	0,71
9	2,68	0,18	85,11	7,08	3,91
10	2,89	0,16	70,38	6,69	3,23
11	3,10	0,15	130,28	12,42	5,98
12	3,36	0,11	22,15	2,89	1,02
13	3,52	0,15	24,27	2,15	1,11

*Nota:* mAU: Absorbancia

**Tabla 34.**

*Tiempos de retención HPLC-UV / VG1*

# Pico	Tiempo de retención	Anchura (min)	Área (mAU*s)	Altura (mAU)	Área %
1	1,19	0,10	108,11	15,57	4,30
2	1,31	0,05	75,54	22,07	3,01
3	1,47	0,07	349,40	80,80	13,91

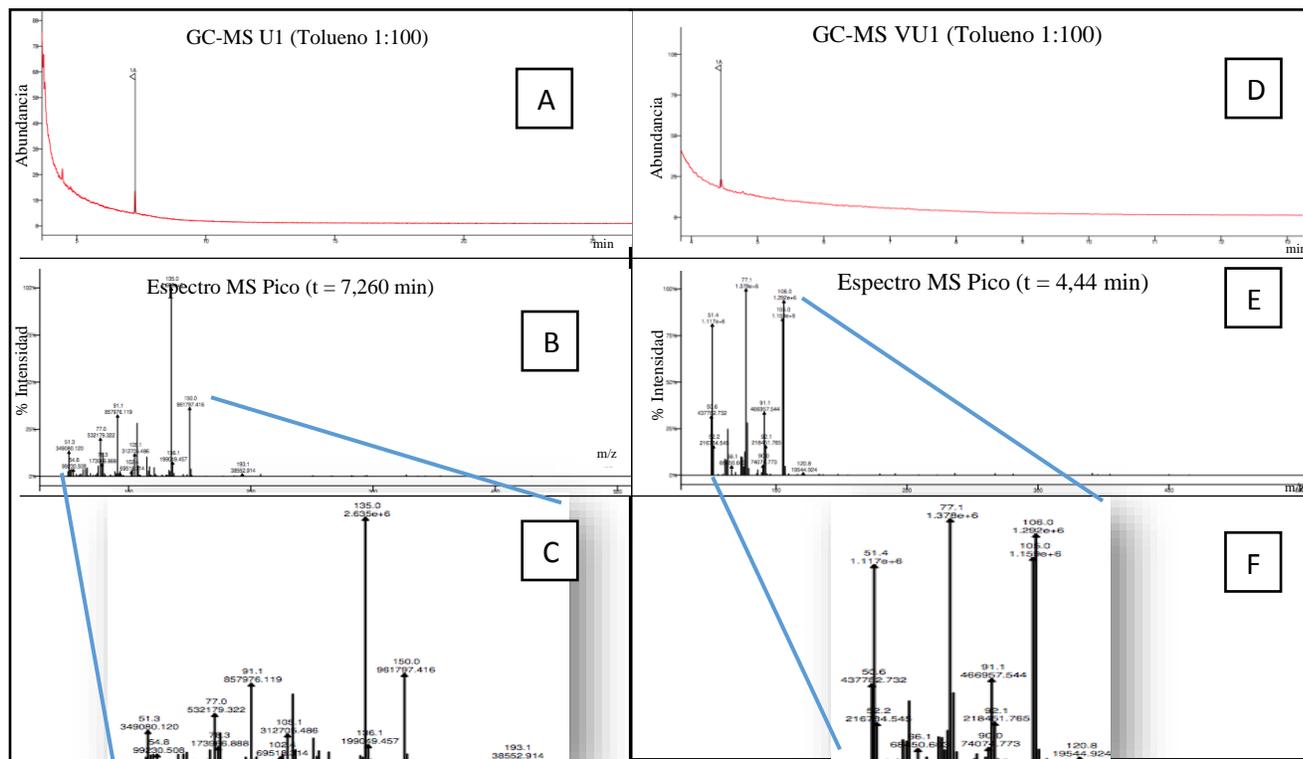
4	1,57	0,08	476,22	90,99	18,96
5	1,71	0,09	278,79	45,97	11,10
6	1,83	0,12	399, 83530	45,21	15,92
7	2,10	0,08	422,29	76,50	16,81
8	2,44	0,08	13,36	2,40	0,53
9	2,67	0,17	105,51	9,48	4,20
10	2,85	0,16	95,82	9,53	3,82
11	3,10	0,15	173,14	16,19	6,89
12	3,52	0,14	13,67	1,40	0,54

*Nota:* mAU: Absorbancia

En la **(Figura 26)** se pueden observar los cromatogramas y espectros de masas obtenidos por GC-MS para las formulaciones U1 y VU1. Se evidenciaron en el cromatograma de U1 dos picos de elución a los tiempos 4,44 min y 7,260, siendo este último el pico con mayor abundancia; por su parte en el cromatograma de VU1 se evidencia un único pico al tiempo 4,44 min. Realizando una búsqueda en la base de datos NIST MS Search 2.3 (mainlib) de los picos con mayor % intensidad (150 m/z, 135 m/z, 105 m/z) para el espectro de masas correspondiente a la formulación U1 (tiempo 7,260 min), se encontraron 4 compuestos que se correlacionaron con los criterios de búsqueda, estas moléculas fueron: carvacrol, timol, fenol, 2-(1,1-dimetiletil)-, O-acetiltimol, todas estas moléculas se caracterizan por poseer un anillo bencénico. Basándonos en la composición de U1 se puede concluir que efectivamente el carvacrol este contenido en la formulación. El espectro de masas de VU1 se correlaciona con el espectro de benzaldehído (según la base de datos NIST MS Search 2.3 (mainlib), el cual es un compuesto aromático que podría provenir de la cera de abejas o de la manteca de cacao y presenta el ion molecular a una relación m/z de 106, así como señales características en las relaciones m/z 105, 77,51. Este compuesto también se encuentra en U1 al poseer este mismo pico de elución al tiempo 4,44 min, lo cual es congruente con base a que la formulación y su vehículo contiene los mismos componentes a excepción del carvacrol.

**Figura 26.**

*Cromatogramas GC y espectros de masas para U1 y VU1*



*Nota:* En la figura se observan A) cromatograma GC de U1 (diluido en tolueno concentración 100 ppm, B) Espectro de masas U1 pico tiempo: 7,260 min C) Espectro de masas U1 pico tiempo: 7,260 min (ampliado) D) Cromatograma GC de VU1 (diluido en tolueno concentración 100 ppm) E) Espectro de masas U1 pico tiempo: 4,44 min F) Espectro de masas U1 pico tiempo: 4,44 min (ampliado).

#### **4.6 Pruebas de estabilidad**

Fueron realizadas cuatro pruebas de estabilidad, donde se sometieron las formulaciones a diferentes condiciones para observar su respuesta. Las pruebas llevadas a cabo fueron: prueba de estabilidad térmica, prueba de crema y coalescencia, prueba de estrés mecánico y prueba de ciclo térmico.

#### ***4.6.1 Estabilidad térmica de las formulaciones y sus vehículos a diferentes tiempos.***

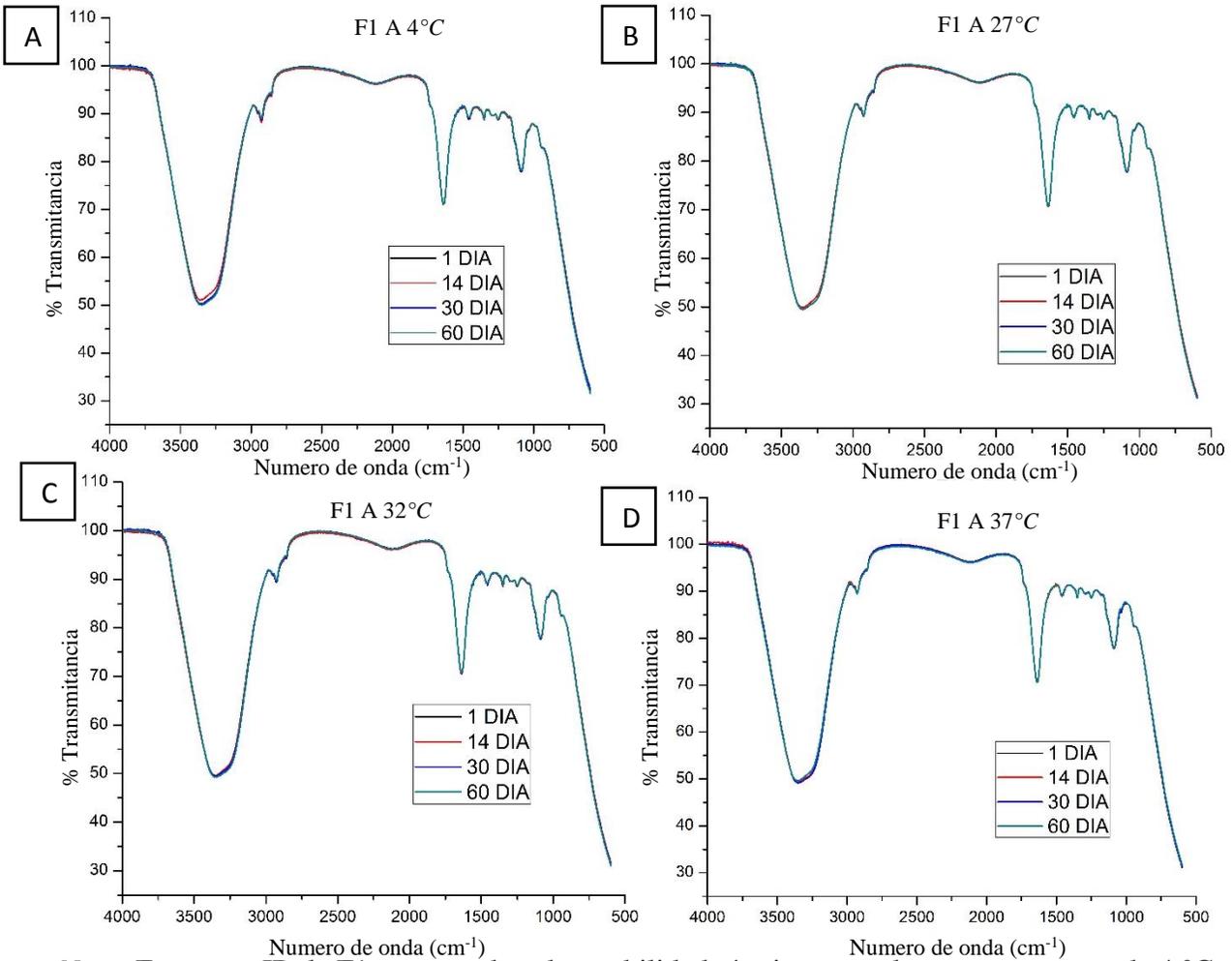
##### **4.6.1.1 Estabilidad formulaciones tipo solución (F)**

Los espectros de infrarrojo de la formulación F1 (**Figura 27**) y su vehículo V1 (**Figura 28**) no cambiaron en cuanto a forma, intensidad y posición de los picos respecto al tiempo (60 días) y temperatura de almacenamiento (entre 4 °C a 37 °C), por tanto, se concluye que son estables y ambos son viables para tratamientos largos, que no requieren condiciones de cuidado especiales. Se cree que la composición de F1 y V1 no es variable y se induce la no existencia de interacciones intramoleculares que pudieran perturbar los espectros obtenidos.

En la F2 (**Figura 29**) se encontraron cambios espectrales de forma, intensidad y posición de las señales respecto al tiempo de almacenamiento y temperatura, se observaron cambios espectrales cada vez más bruscos a medida aumentaba la temperatura (4 °C a 37 °C) en los rangos de (3000 cm<sup>-1</sup> a 3300 cm<sup>-1</sup>), (2800 cm<sup>-1</sup> a 2950 cm<sup>-1</sup>), (1000 cm<sup>-1</sup> a 1050 cm<sup>-1</sup>) correspondientes a la vibración de grupos hidroxilo (-OH) provenientes del DMSO, señales que pueden deberse a hidrocarburos con hibridación C sp<sup>3</sup> de enlaces (-CH) y las señales que podrían corresponder a la vibración del enlace S=O del sulfóxido perteneciente al DMSO respectivamente.

**Figura 27.**

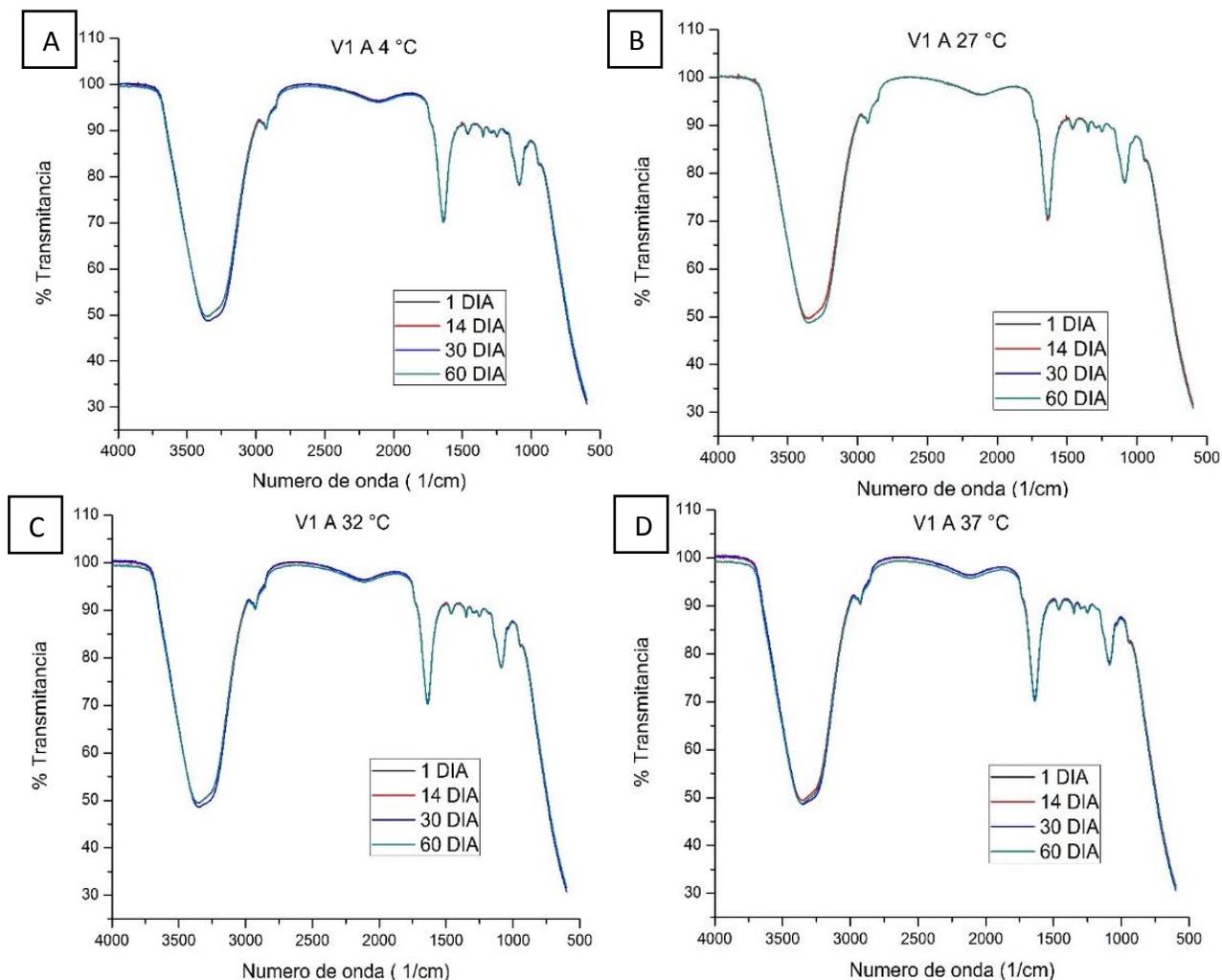
*Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para F1*



*Nota:* Espectros IR de F1 para pruebas de estabilidad térmica, tomados a temperaturas de 4 °C, 27 °C, 32 °C y 37 °C. A) Espectro de F1 a 4 °C, B) Espectro de F1 a 27 °C, C) Espectro de F1 a 32 °C, D) Espectro de F1 a 37 °C.

**Figura 28.**

*Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para V1*



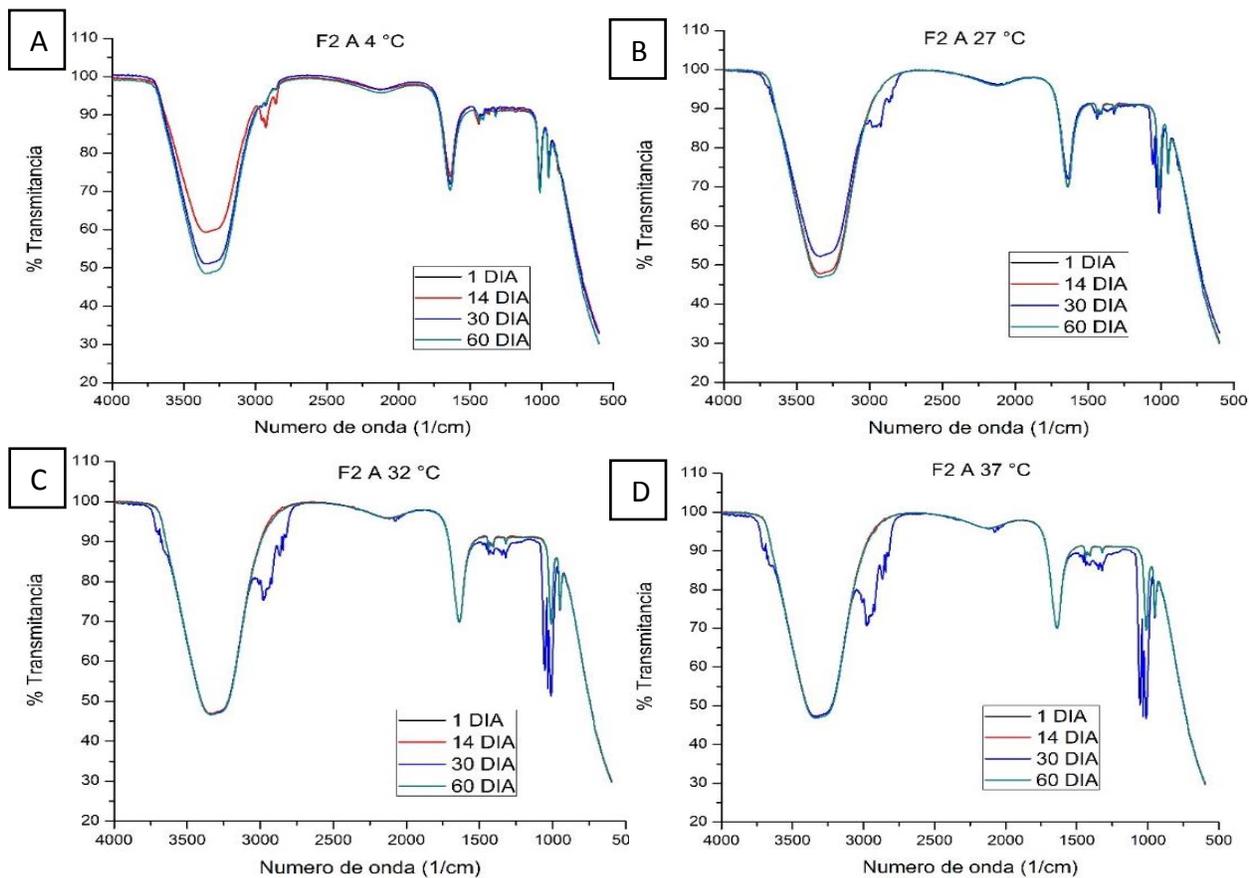
*Nota:* Espectros IR de V1 para pruebas de estabilidad térmica, tomados a temperaturas de 4 °C, 27 °C, 32 °C y 37 °C. A) Espectro de V1 a 4 °C, B) Espectro de V1 a 27 °C, C) Espectro de V1 a 32 °C, D) Espectro de V1 a 37 °C.

En el espectro de F2 (**Figura 29A**) se concluye que la formulación a temperatura de almacenamiento de 4°C no es estable después de 14 días, en la (**Figura 29 B, C, D**) se observó cambios muy marcados a un tiempo de 30 días a temperaturas altas (27 °C, 32 °C, 37 °C). Esta formulación no es estable con base a las condiciones evaluadas. En los espectros de V2 (**Figura 30**) se encontraron cambios espectrales de forma, intensidad y posición de las señales en todo el espectro respecto al tiempo de almacenamiento y temperatura. En el espectro de V2 (**Figura 30**

A, B, C, D) se concluyó que el vehículo no es estable después de 14 días a ninguna temperatura evaluada y los cambios son más bruscos a partir de los 30 días.

**Figura 29.**

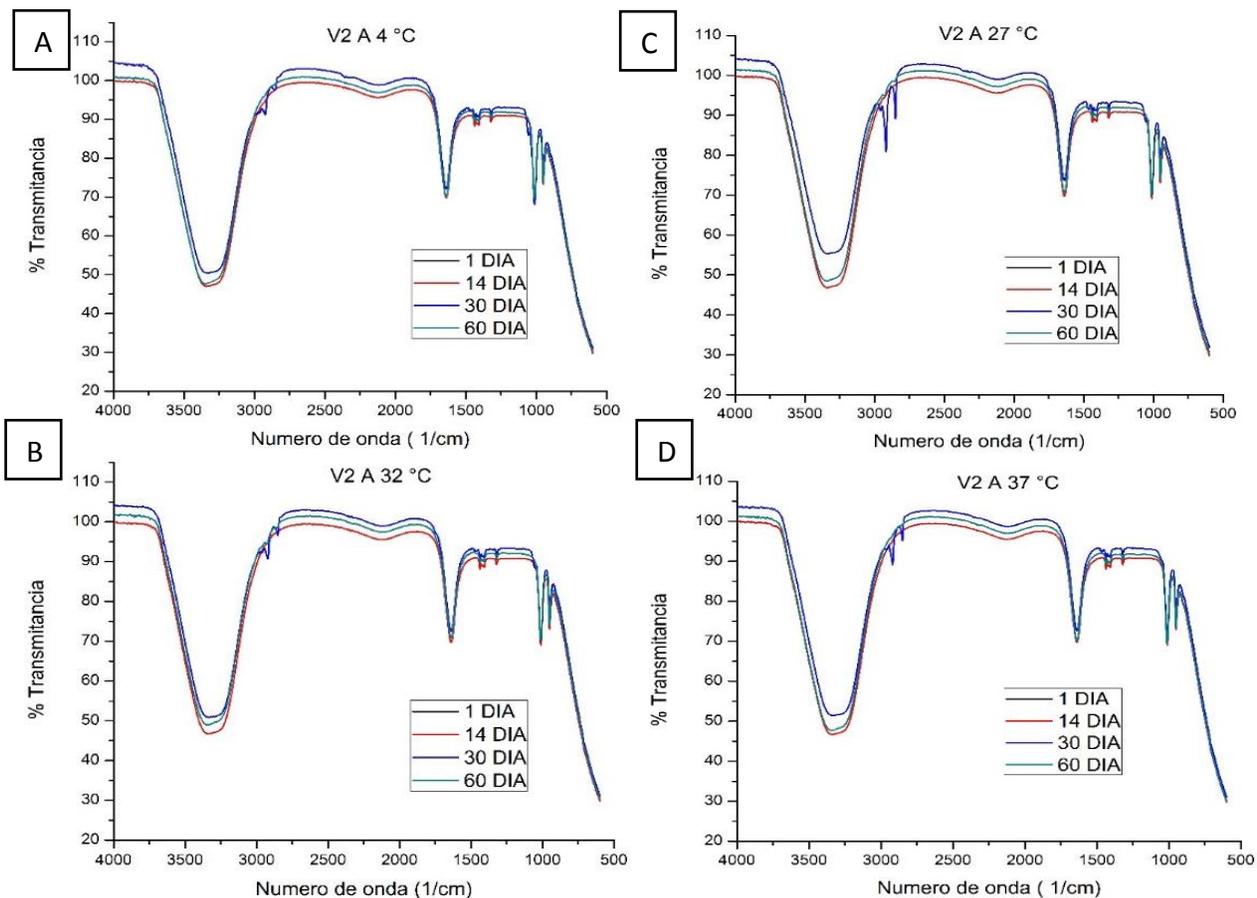
*Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para F2*



*Nota:* Espectros IR de F2 para pruebas de estabilidad térmica, tomados a temperaturas de 4 °C, 27 °C, 32 °C y 37 °C. A) Espectro de F2 a 4 °C, B) Espectro de F2 a 27 °C, C) Espectro de F2 a 32 °C, D) Espectro de F2 a 37 °C.

**Figura 30.**

*Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para V2*



*Nota:* Espectros IR de V2 para pruebas de estabilidad térmica, tomados a temperaturas de 4 °C, 27 °C, 32 °C y 37 °C. A) Espectro de V2 a 4 °C, B) Espectro de V2 a 27 °C, C) Espectro de V2 a 32 °C, D) Espectro de V2 a 37 °C.

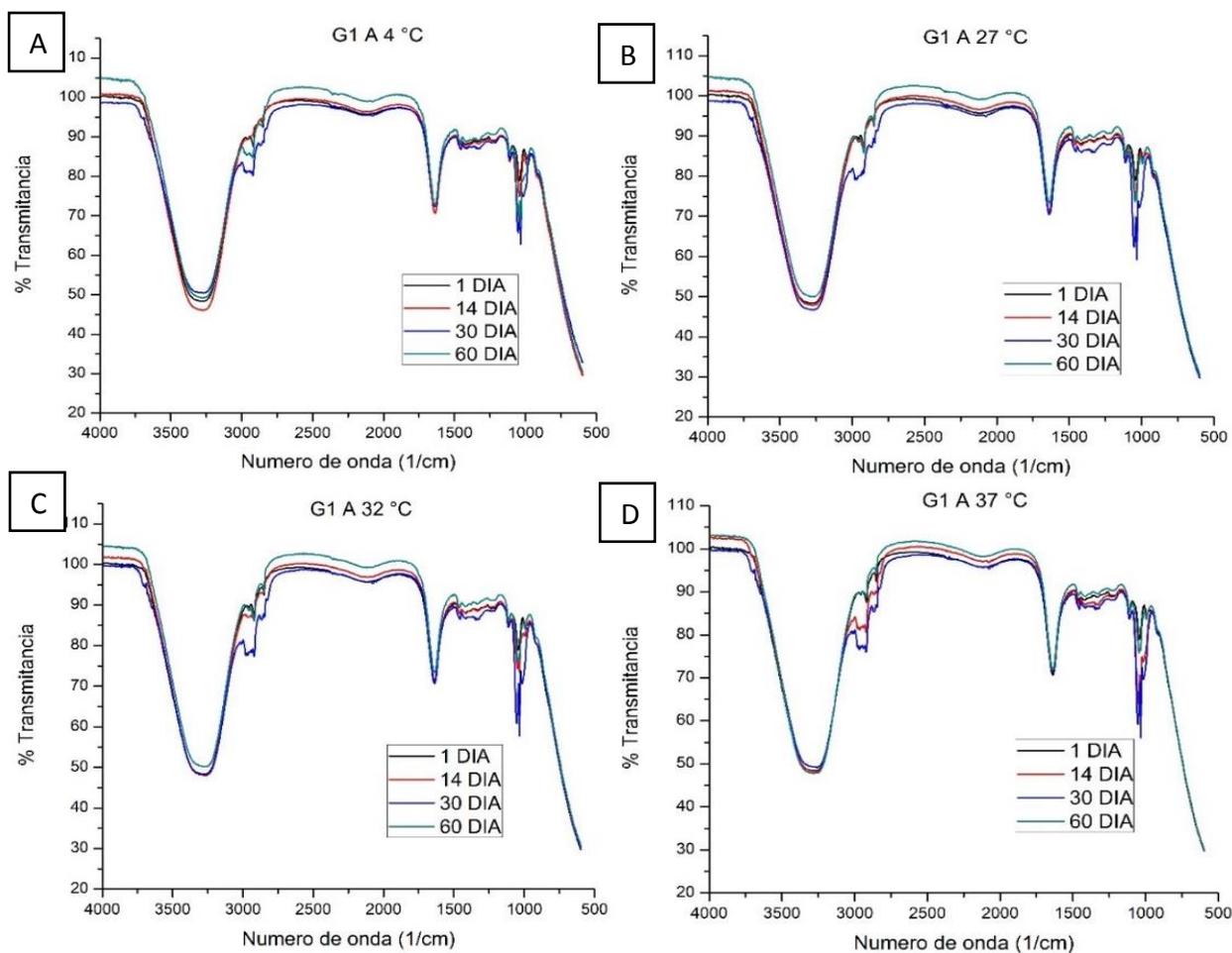
#### 4.6.1.2 Estabilidad formulaciones tipo (G, U) y sus vehículos

Para la formulación G1 y su vehículo se observan cambios significativos a partir de los 14 días. En G1 (**Figura 31**) se observan cambios significativos en todo el espectro en cuanto al % de transmitancia en las regiones de 3000 cm<sup>-1</sup> (grupos hidroxilo (-OH) provenientes del agua, propilenglicol, glicerina) a 1800 cm<sup>-1</sup> y 1500 cm<sup>-1</sup> a 800 cm<sup>-1</sup> (vibración del enlace C=C o C=O presente en el benzoato de sodio). En el caso de VG1 (**Figura 32**) se observan cambios en el % de transmitancia en la región de 1500 cm<sup>-1</sup> a 800 cm<sup>-1</sup> en todas las temperaturas, la diferencia de

cambios de entre G1 y VG1 se puede deber al compuesto activo presente en G1 (epazote) que se descompone o reacciona intermolecularmente al pasar el tiempo a diferentes temperaturas.

### Figura 31.

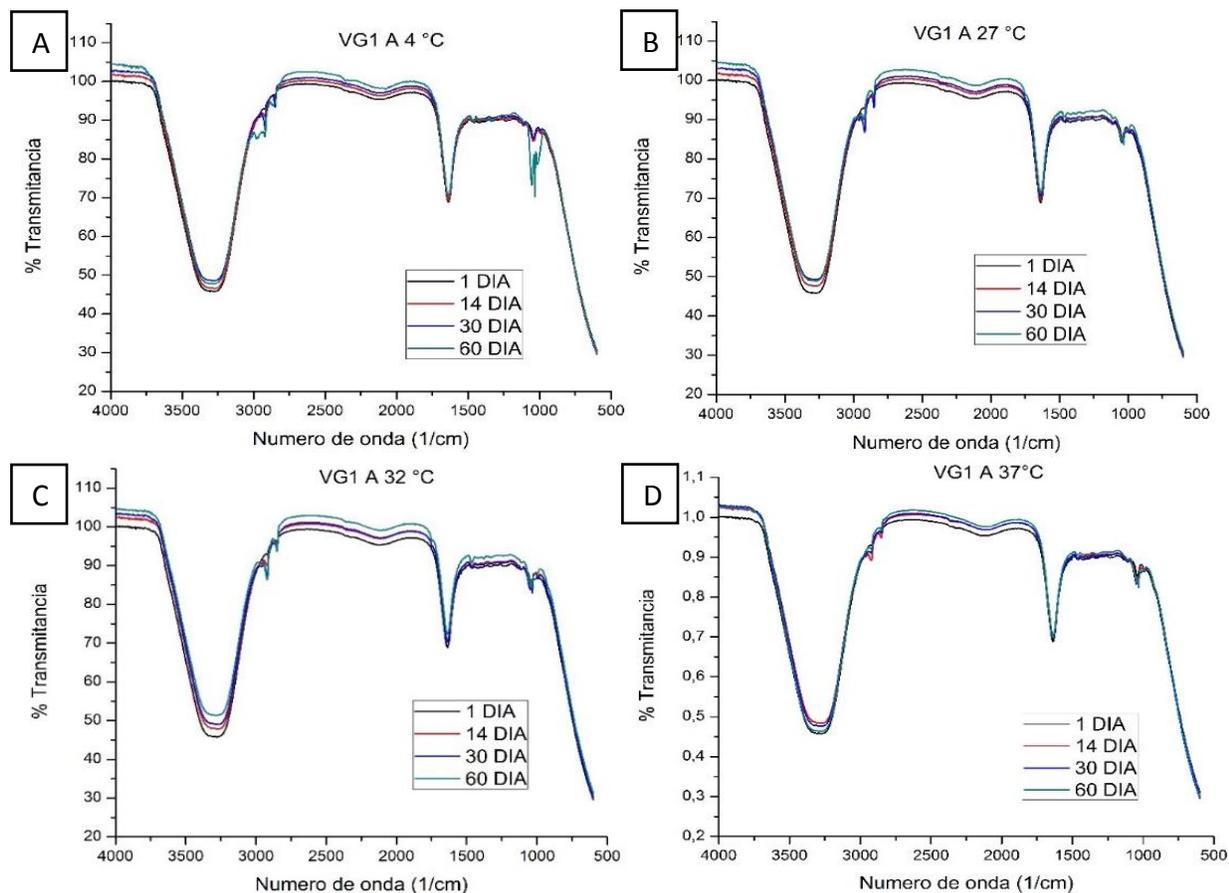
*Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para G1*



*Nota:* Espectros IR de G1 para pruebas de estabilidad térmica, tomados a temperaturas de 4 °C, 27 °C, 32 °C y 37 °C. A) Espectro de G1 a 4 °C, B) Espectro de G1 a 27 °C, C) Espectro de G1 a 32 °C, D) Espectro de G1 a 37 °C.

**Figura 32.**

*Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para VG1*



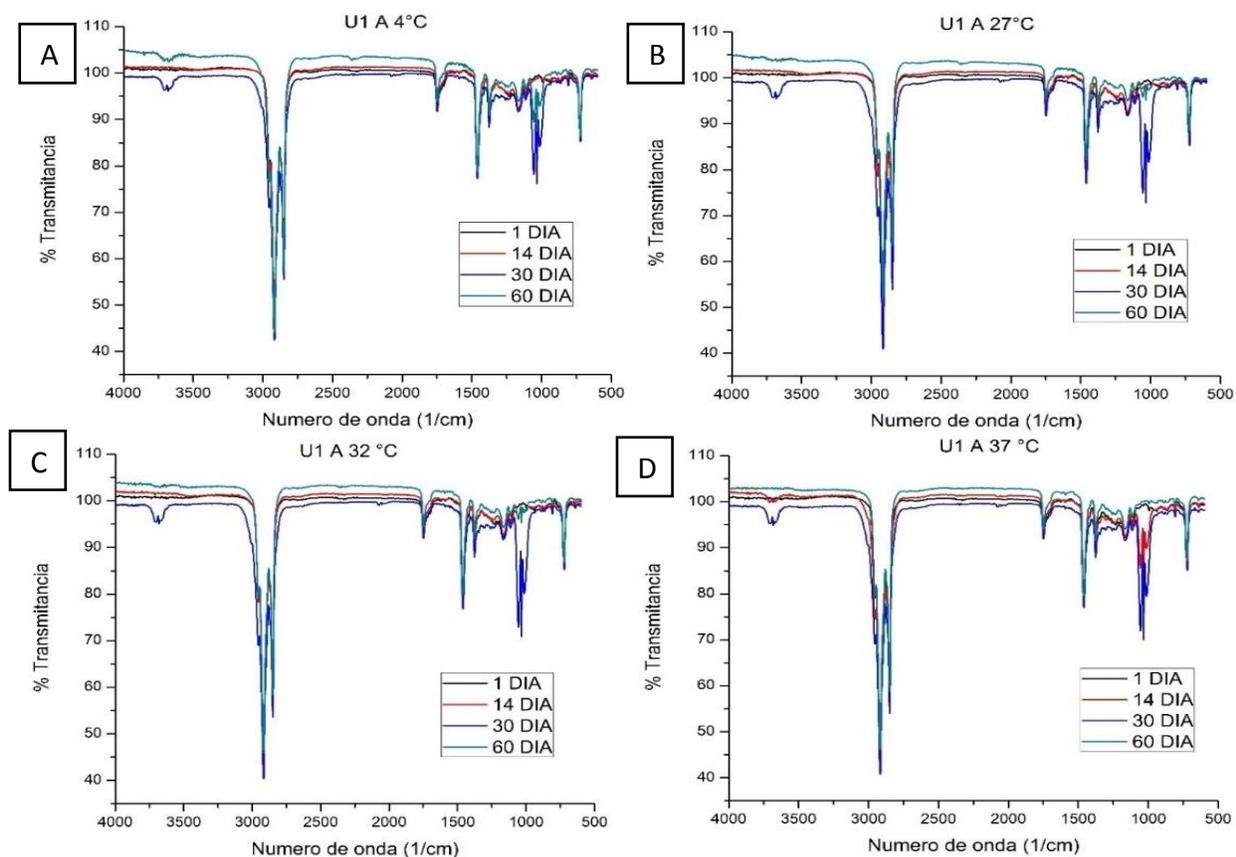
*Nota:* Espectros IR de VG1 para pruebas de estabilidad térmica, tomados a temperaturas de 4 °C, 27 °C, 32 °C y 37 °C. A) Espectro de VG1 a 4 °C, B) Espectro de VG1 a 27 °C, C) Espectro de VG1 a 32 °C, D) Espectro de VG1 a 37 °C.

Los espectros infrarrojos obtenidos para la prueba de estabilidad térmica para U1 (**Figura 33**) y VU1 (**Figura 34**) mostraron cambios en todas las regiones. Para U1 se observaron que los cambios persistían a todas las temperaturas y eran muy marcados al día 30 de almacenamiento especialmente en la región de  $700\text{ cm}^{-1}$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$  donde aparecen las señales que podrían deberse a la estructura de los hidrocarburos presente en los excipientes de la formulación (**Figura 33**). El vehículo VU1 mostro ser estable a la temperatura de 4 °C (**Figura 34 A**) y conforme aumento de la temperatura los cambios fueron más bruscos, esto tiene concordancia con el hecho de que componentes como la manteca de cacao y la cera de abejas presente en ambas formulaciones

cambiaban de aspecto físico a temperatura más alta, además en U1 la presencia del carvacrol pudo ser el causante de que esta no fuera estable a 4°C (**Figura 33 A**) ya que pudieron existir reacciones intermoleculares entre este y los demás excipientes.

**Figura 33.**

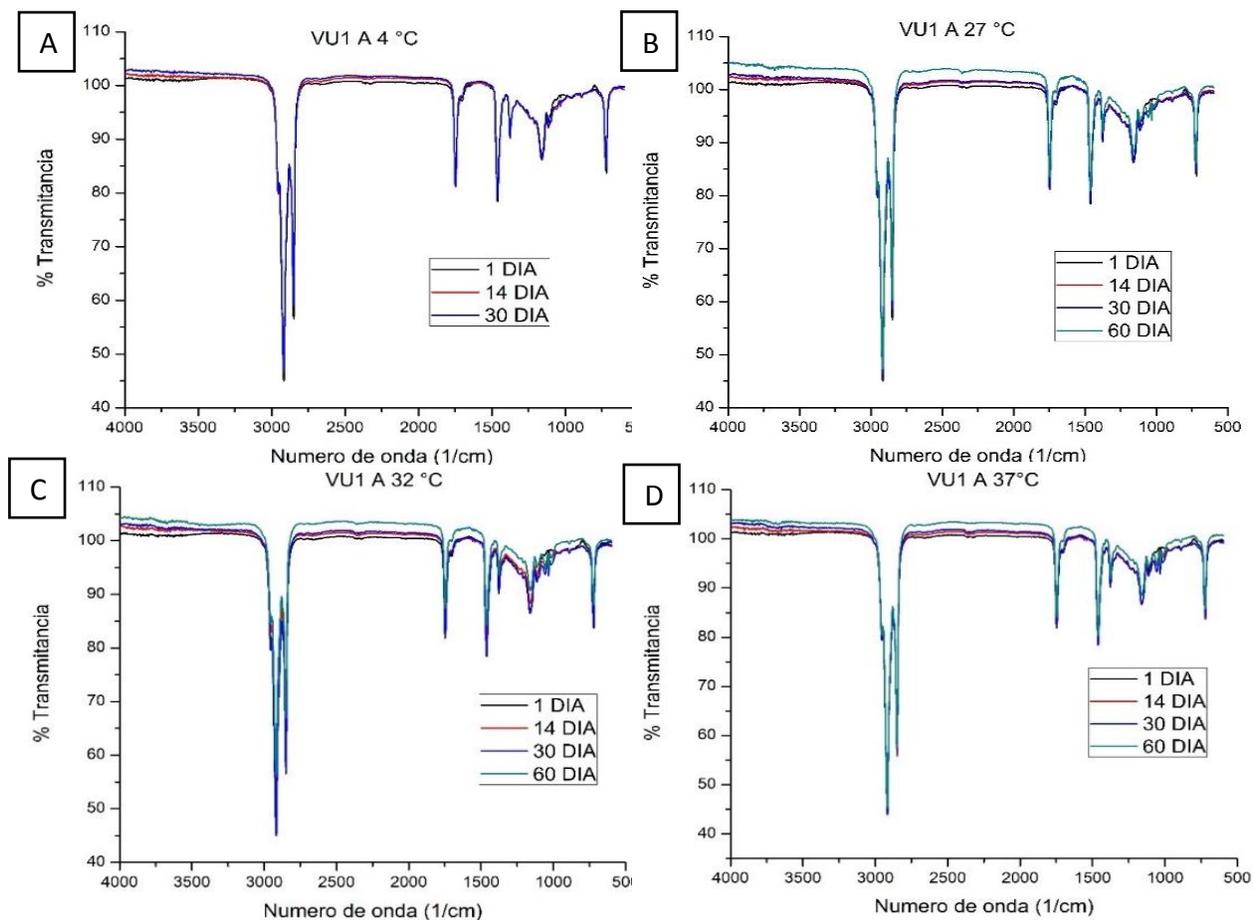
*Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para U1*



*Nota:* Espectros IR de U1 para pruebas de estabilidad térmica, tomados a temperaturas de 4 °C, 27 °C, 32 °C y 37 °C. A: Espectro de U1 a 4 °C, B: Espectro de U1 a 27 °C, C: Espectro de U1 a 32 °C, D: Espectro de U1 a 37 °C.

**Figura 34.**

*Espectros infrarrojos de estabilidad térmica para VU1*



*Nota:* Espectros IR de VU1 para pruebas de estabilidad térmica, tomados a temperaturas de 4 °C, 27 °C, 32 °C y 37 °C. A) Espectro de VU1 a 4 °C, B) Espectro de VU1 a 27 °C, C) Espectro de VU1 a 32 °C, D) Espectro de VU1 a 37 °C.

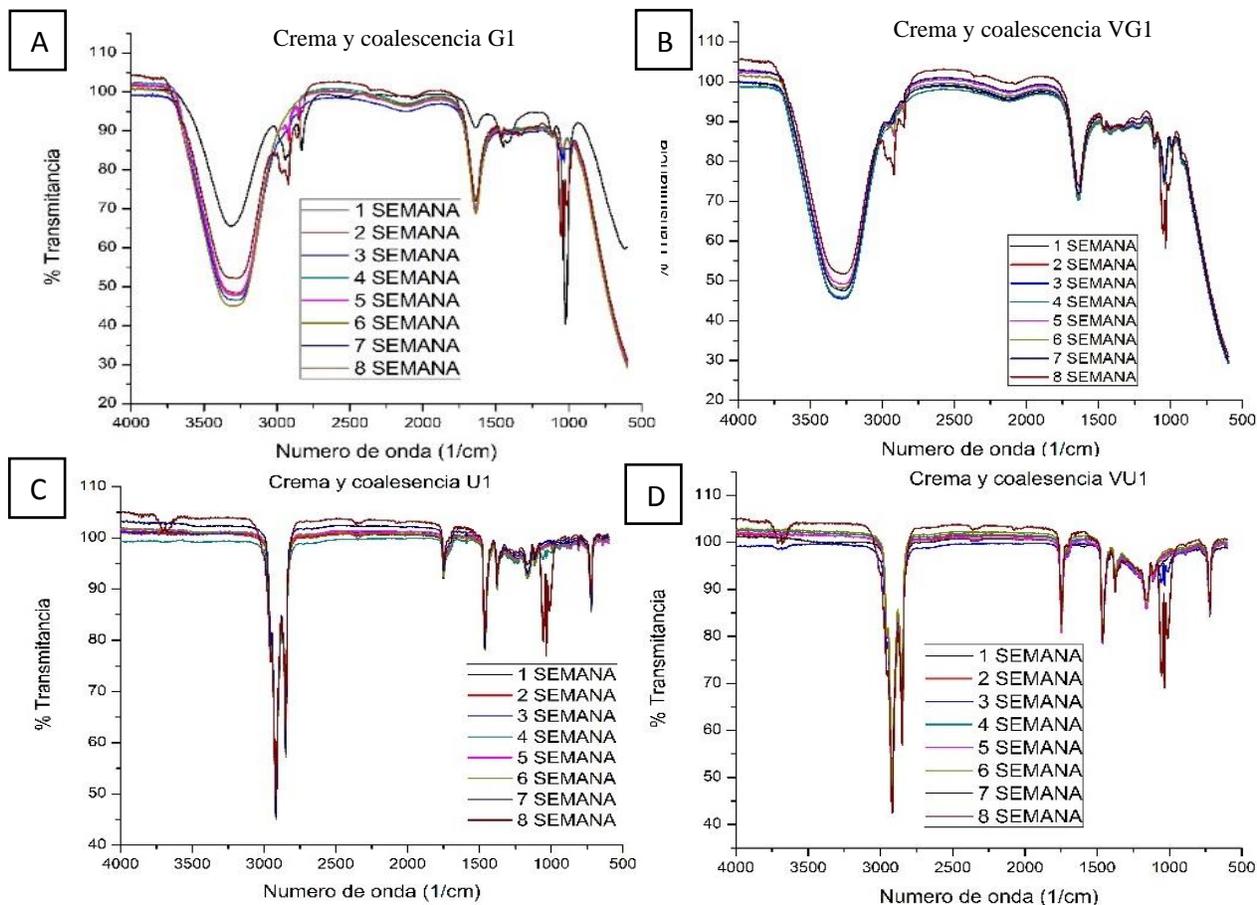
#### **4.6.2 Prueba de crema y coalescencia**

En la **Figura 35** se muestran los espectros infrarrojos correspondientes a las pruebas de crema y coalescencia de las formulaciones tipo (G, U) y sus vehículos. En los espectros correspondientes a G1 y VG1 se evidencian cambios espectrales bruscos a partir de la segunda y octava semana respectivamente, estos cambios en G1 podrían deberse a la presencia del epazote, por otra parte, en los espectros correspondientes a U1 y VU1 se evidencian cambios espectrales bruscos a partir de la 7-8 semana de almacenamiento. En la **Tabla 35** se complementa la prueba de crema y coalescencia mediante la descripción de características observables de las

formulaciones. G1, U1, VG1 no cambiaron su color, olor, textura durante la prueba, mientras que G1 mostro cambios a partir de la 4 semana, así como la aparición de un hongo en las paredes el recipiente donde se almacenaba, lo cual muestra que la formulación no fue estable.

**Figura 35.**

*Prueba de crema y coalescencia para para formulaciones tipo G y U y sus vehículos*



*Nota:* Espectros infrarrojo prueba crema y coalescencia para: A) Formulación G1, B) Vehículo VG1, C) Formulación U1, D) Vehículo VU1.

**Tabla 35.**

*Características observables formulaciones tipo G y U*

Formulación G1, VG1, U1, VU1	Descripción
Semana 1	Consistencia igual, color el mismo,

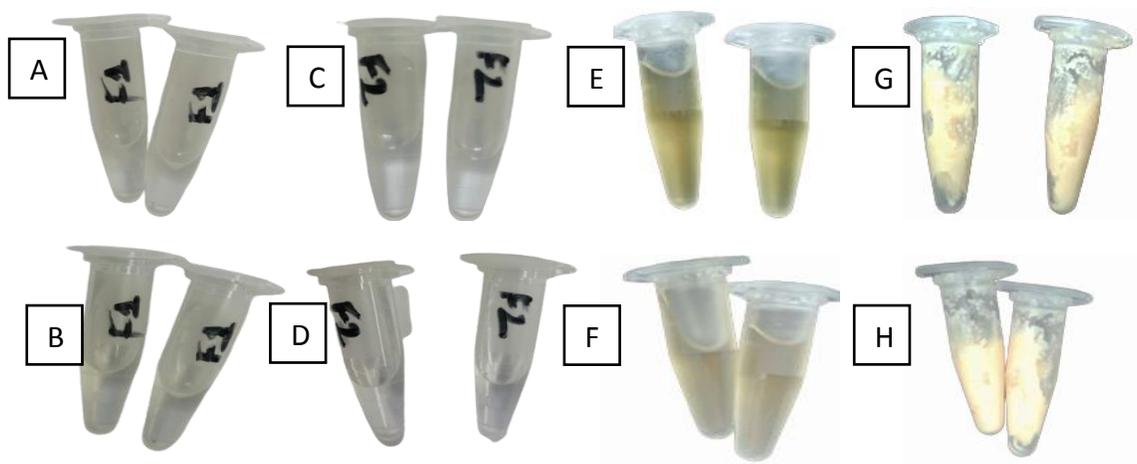
Semana 2	textura igual, no hubo cambios
Semana 3	significativos para G1, VG1, U1, VU1.
Semana 4	U1, VU1, VG1 consistencia igual, color
Semana 5	el mismo, textura igual. G1 cambio
Semana 6	mínimo de color (entre amarillo y
Semana 7	verde), olor amargo y textura menos
Semana 8	densa casi líquida, se empezó a observar turbidez.

#### 4.6.3 Prueba de estrés mecánico

En la **Figura 36, 37** se muestra el resultado fotográfico de la centrifugación a 2000 rpm por 60 min para las formulaciones tipo (F, G, U) y sus vehículos, de la misma forma en la **Tabla 36** se presentan los resultados a los tiempos 5, 15, 30 y 60 minutos para todas las formulaciones y sus vehículos. Se observó que únicamente hubo separación de fases en la formulación F1 a partir de los 15 min, posiblemente por la presencia de Kolliphor y su alta densidad. En el resto de las formulaciones y vehículos no hubo separación de fases en ningún tiempo analizado.

**Figura 36.**

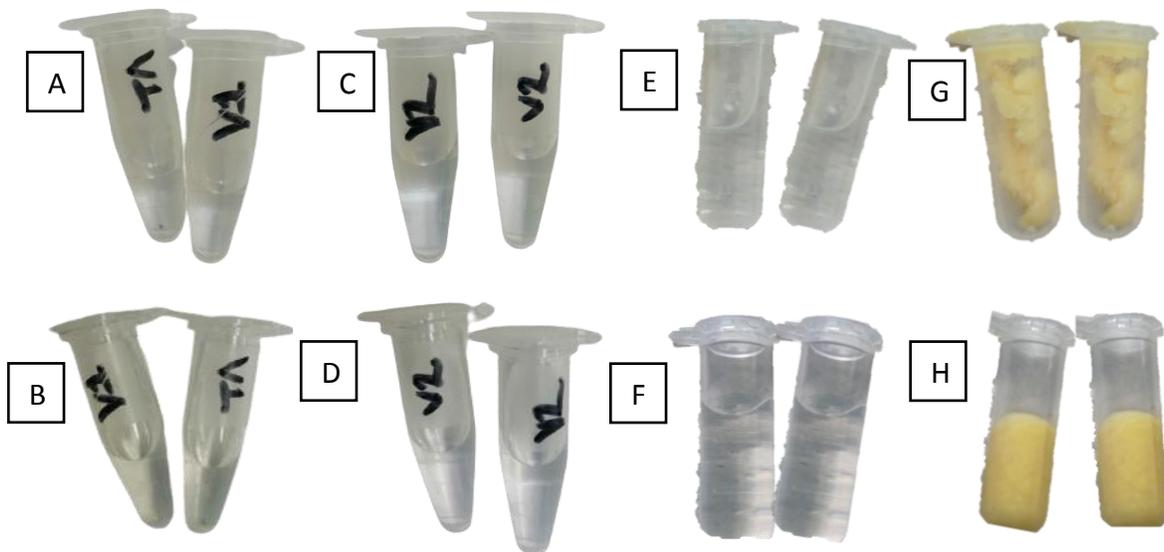
*Resultados de estrés mecánico de las formulaciones*



*Nota:* Prueba estrés mecánico para las formulaciones tipo (F, G, U) a 60 minutos, 2000 rpm. Antes (A) y después (B) Formulación F1, Antes (C) y después (D) Formulación F2, Antes (E) y después (F) Formulación G1, Antes (G) y después (H) Formulación U1.

**Figura 37.**

*Resultados de estrés mecánico de los vehículos de las formulaciones*



*Nota:* Prueba estrés mecánico para los vehículos de las formulaciones tipo (F, G, U) a 60 minutos, 2000 rpm. Antes (A) y después (B) vehículo V1, Antes (C) y después (D) vehículo V2, Antes (E) y después (F) vehículo VG1, Antes (G) y después (H) vehículo VU1.

**Tabla 36.**

*Resultados prueba estrés mecánico 5, 15, 30 minutos*

Formulación o vehículo	5 min	15 min	30 min	60 min
F1	Sin separación de fases, coloración igual.		Ocurrió separación de fases	
V1	Sin separación de fases, coloración igual.			

<b>F2</b>	Sin separación de fases, coloración igual.
<b>V2</b>	Sin separación de fases, coloración igual.
<b>G1</b>	Sin separación de fases, coloración igual.
<b>VG1</b>	Sin separación de fases, coloración igual.
<b>U1</b>	Sin separación de fases, coloración igual.
<b>VU1</b>	Sin separación de fases, coloración igual.

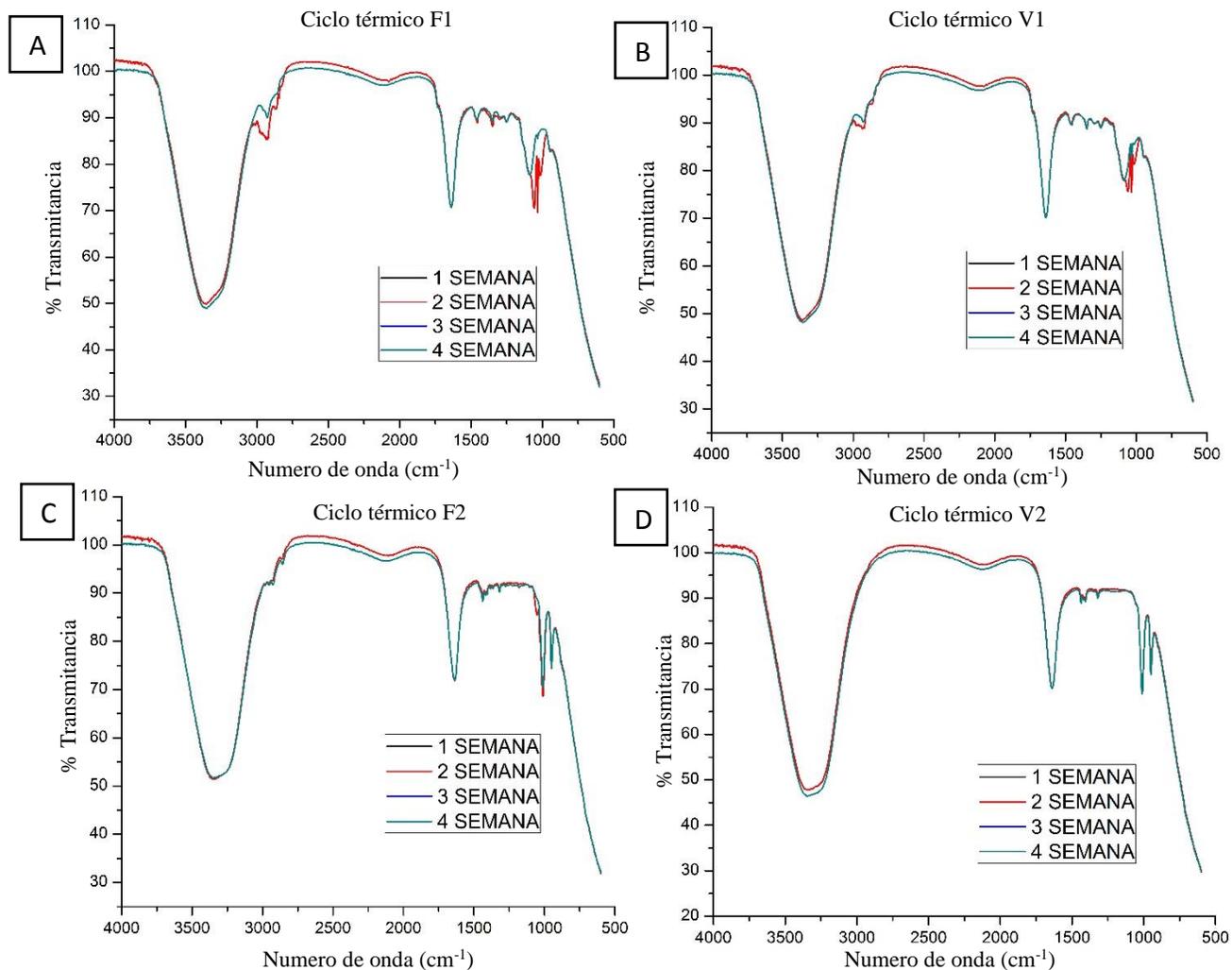
#### **4.6.4 Prueba de ciclo térmico**

##### **4.6.4.1 Formulaciones tipo (F) y vehículos**

En la **Figura 38** se muestra los espectros infrarrojos correspondientes a la prueba de ciclo térmico para las formulaciones tipo (F) y sus vehículos. Se pudo observar que para las formulaciones tipo solución y vehículos no se encontraron cambios bruscos de forma, intensidad y posición de las señales en los espectros, sin embargo, en la formulación F1 y su vehículo se pueden observar cambios mínimos en la región de  $2800\text{ cm}^{-1}$  a  $3000\text{ cm}^{-1}$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  a  $1000\text{ cm}^{-1}$  en comparación con F2 y su vehículo, lo cual muestra que F1 y V1 no son tan estables a cambios bruscos de temperatura en periodos cortos de tiempo en comparación con F2 y V2.

**Figura 38.**

*Prueba de ciclo térmico para para formulaciones tipo F y sus vehículos*



*Nota:* Espectros infrarrojo prueba ciclo térmico para: A) Formulación F1, B) Vehículo V1, C) Formulación F2, D) Vehículo V2.

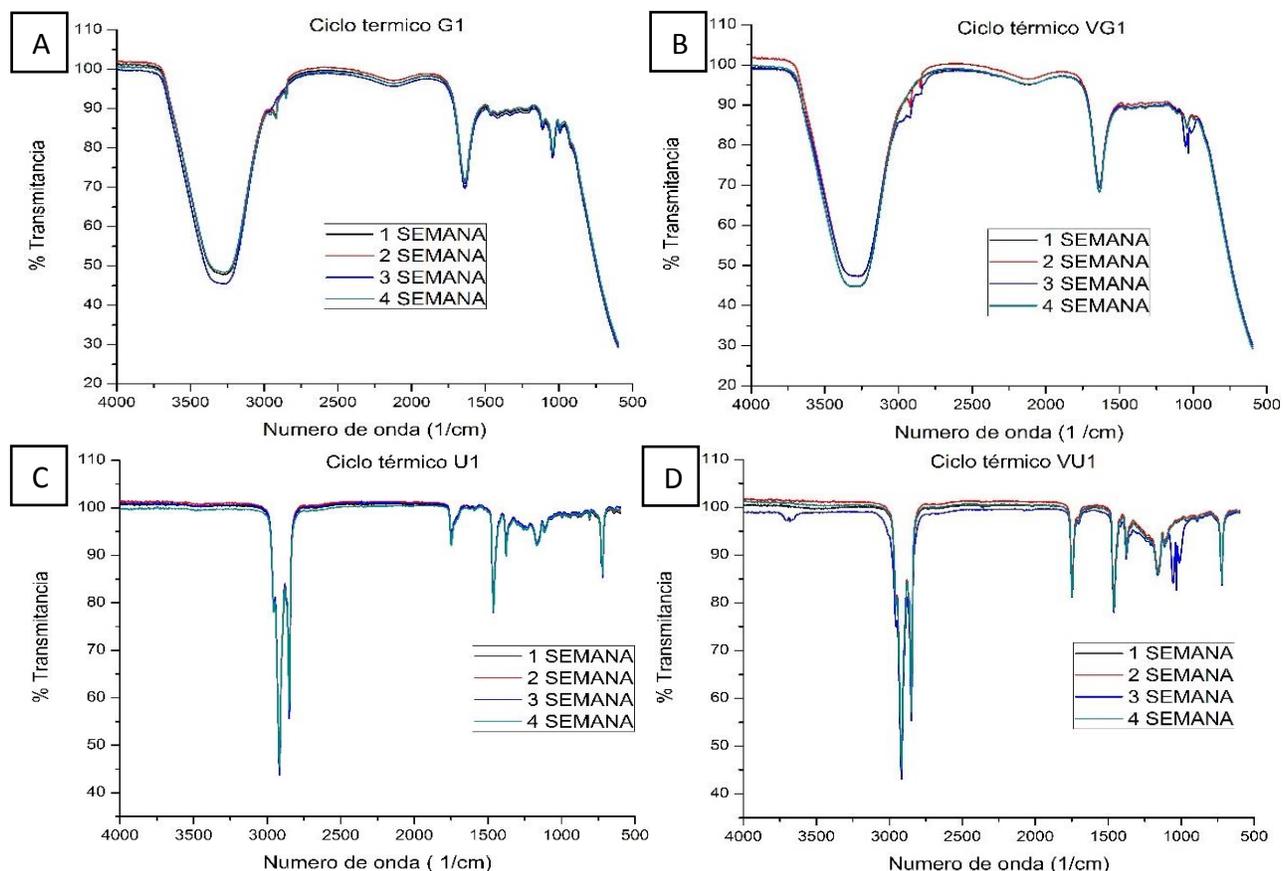
#### 4.6.4.2 Formulaciones tipo (G, U) y sus vehículos

En la **Figura 39** se muestra los espectros infrarrojos correspondientes a la prueba de ciclo térmico para las formulaciones tipo (G y U) y sus vehículos. Se pudo observar que para las formulaciones y vehículos no se encontraron cambios bruscos de forma, intensidad y posición de las señales en los espectros, sin embargo, en los espectros de los vehículos VG1 y VU1 se evidenciaron mínimos cambios en las regiones 2000 cm<sup>-1</sup> a 3000 cm<sup>-1</sup> para VG1 y 800 cm<sup>-1</sup> a 1000 cm<sup>-1</sup> para VG1, VU1

posiblemente por el aumento de los excipientes de las formulaciones, G1 y U1 son más estables a cambios bruscos de temperatura en periodos cortos de tiempo en comparación con sus vehículos.

### Figura 39.

*Prueba de ciclo térmico para para formulaciones tipo G y U y sus vehículos*



*Nota:* Espectros infrarrojo prueba ciclo térmico para: A) Formulación G1, B) Vehículo VG1, C) Formulación U1, D) Vehículo VU1.

## 4.7 Ensayos in vitro

### 4.7.1 Ensayos antileishmania

Los resultados de los ensayos antileishmania *in vitro* para los metabolitos secundarios, mostraron que el carvacrol, presento una mayor actividad contra promastigotes de *L. (V.) braziliensis* en comparación con  $\beta$ -C,  $\alpha$ -terpineno y epazote. Sus valores de CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub> fueron de

26 y 78  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, esto indica que se necesita poca concentración de este metabolito secundario para reducir la viabilidad de la población de parásitos de *L. (V.) braziliensis* en un 50% y 90%. El  $\beta$ -C, por su parte también mostró actividad contra promastigotes, este obtuvo un valor de  $\text{CI}_{50}$  alrededor de 42  $\mu\text{g/mL}$ , por otro lado, el  $\alpha$ -terpineno y epazote mostraron poca o nula actividad antileishmania contra la cepa de *L. (V.) braziliensis* al tener valores de  $\text{CI}_{50}$  y  $\text{CI}_{90}$  por encima de 300  $\mu\text{g/mL}$ . En cuanto a las formulaciones tipo F y sus vehículos, los menores valores de  $\text{CI}_{50}$  y  $\text{CI}_{90}$  en promastigotes de *L. (V.) braziliensis* se obtuvieron para F1, lo cual es indicativo de la mayor actividad de esta formulación contra la cepa de *Leishmania* probada. Se pudo identificar que el  $\beta$ -C presente en F1 fue 18 veces más activo que el Kolliphor presente en F1. En el caso de F2 y su vehículo, estos no mostraron actividades antileishmania relevantes contra *L. (V.) braziliensis*, ya que sus valores de  $\text{CI}_{50}$  y  $\text{CI}_{90}$  se encontraron por encima de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Lo mismo sucedió con las formulaciones tipo G, U y sus vehículos, estas tampoco mostraron actividades antileishmania relevantes contra *L. (V.) braziliensis*, sus valores de  $\text{CI}_{50}$  y  $\text{CI}_{90}$  se encontraron por encima de 300  $\mu\text{g/mL}$  para el caso de G1 y VG1 y por encima de 500  $\mu\text{g/mL}$  para U1 y VU1. Se pudo observar que los ensayos y replicas en la mayoría de los metabolitos y formulaciones probadas presentaron datos dispersos entre sí, esto pudo deberse a una inestabilidad de estos que causan diferentes actividades biológicas al momento de la prueba (Tabla 37).

**Tabla 37.**

*Actividad de los compuestos y formulaciones en promastigotes de L. (V.) braziliensis*

Compuesto/Formulación	$\mu\text{g/mL} \pm \text{DE}$			
	Ensayo		Réplica	
	$\text{CI}_{50}$	$\text{CI}_{90}$	$\text{CI}_{50}$	$\text{CI}_{90}$
$\beta$ -Cariofileno	41,59 $\pm$	228,4 $\pm$	158,5 $\pm$	> 300
	6,98	87,6	24,43	
$\alpha$ -Terpineno	> 300	>300	> 300	>300
Epazote	> 300	> 300	> 300	> 300
Carvacrol	26,28 $\pm$	78,09 $\pm$	35,61 $\pm$ 3,85	51,01 $\pm$
	4,67	9,12		5,66

F1	Formulación	2,58 ± 0,06	> 25	3,12 ± 0,11	> 25
	% β-Cariofileno en F1	0,08 ± 0,002	> 0,75	0,10 ± 0,004	> 0,75
V1	Formulación	7,19 ± 0,15	> 50	5,99 ± 0,27	> 50
	% Kolliphor en V1	1,44 ± 0,03	> 10	1,20 ± 0,05	> 10
F2	Formulación	> 500	> 500	> 500	> 500
	% β-Cariofileno en F2	> 30	> 30	> 30	> 30
V2	Formulación	> 500	> 500	> 500	> 500
	% de DMSO en V2	> 75	> 75	> 75	> 75
G1	Formulación	> 500	> 500	> 500	> 500
	% de epazote en G1	> 50	> 50	> 50	> 50
VG 1	Formulación	> 500	> 500	> 500	> 500
	% de PPG en VG1	> 2,5	> 2,5	> 2,5	> 2,5
U1	Formulación	> 300	> 300	> 300	> 300
	% de carvacrol en U1	> 9	> 9	> 9	> 9
VU 1	Formulación	> 300	> 300	> 300	> 300
	% de aceite de coco en VU1	> 129	> 129	> 129	> 129

*Nota:* Se muestran los resultados independientes de la actividad antileishmania de los metabolitos secundarios y epazote y sus formulaciones expresadas en CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub> definida como la concentración que inhibe el parásito en un 50% y en 90% en µg/mL con su desviación estándar (DE). F: formulación tipo solución (F1, F2), V: vehículo (V1, V2, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1).

#### 4.7.2 Ensayos citotoxicidad

Los resultados *in vitro* para los metabolitos secundarios mostraron que el carvacrol fue el tratamiento más tóxico en células THP-1 y en VERO, en comparación con β-C, α-terpineno y epazote. Esto se identificó al determinarse que este posee los menores valores de CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub>, inferiores a los demás compuestos activos. En el caso de células THP-1 se obtuvieron valores de CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub> por debajo de 50 µg/mL, los demás metabolitos presentaron toxicidad por encima de

los 200 µg/mL. En el caso de las células VERO, el carvacrol no presenta tanta toxicidad en comparación como en las células THP-1, sin embargo, sus valores de CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub> por debajo de 120 µg/mL en el primer ensayo, lo cual demuestra cierta toxicidad en esta línea celular. Los demás compuestos activos tuvieron valores de CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub> superiores a los obtenidos en el carvacrol tanto en el ensayo como en la réplica en células VERO. El epazote en ambas líneas celulares demostró nula actividad con valores de CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub> por encima de 300 µg/mL.

En cuanto a las formulaciones tipo F y sus vehículos, se evidenció que en células VERO la formulación F1 fue más toxica que el vehículo V1, esto puede deberse a la presencia de β-C en la misma. Se pudo identificar que el Kolliphor presente en V1 fue 11 veces más toxico que el β-C presente en F1. Por su parte en células THP-1 el vehículo V1 fue más toxico en el ensayo al presentar un menor valor de CC<sub>50</sub> respecto al F1. Para las formulaciones tipo G y U y sus vehículos se obtuvieron valores de CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub> por encima de 300 µg/mL para células THP-1, indicativos de poca toxicidad de estos. Las formulaciones F2, G1, U1 y sus respectivos vehículos demostraron poca o nula actividad citotóxica en ambas líneas celulares, esto se observa al tener valores de CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub> por encima de 300 µg/mL. Se pudo observar que los ensayos y replicas en la mayoría de los metabolitos y formulaciones probadas presentaron datos dispersos entre sí, esto puede deberse a una inestabilidad de estos que causan diferentes actividades biológicas al momento de la prueba (Tabla 38).

**Tabla 38.**

*Citotoxicidad de los compuestos y formulaciones en células VERO y THP-1*

Compuesto/Formulació n	Células VERO				Células THP-1			
	Ensayo		Réplica		Ensayo		Réplica	
	CC <sub>50</sub>	CC <sub>90</sub>						
<b>Metabolitos secundarios y extracto liquido herbal de epazote µg/mL.</b>								
β-Cariofileno	145,73 ±	297,92	184,4		214	>	268,1	>
	27,29	±1,068	7 ±	> 300	±	300	3 ±	300
			84,60		12,3		16,11	

	$\alpha$ -Terpineno	188,71 $\pm$ 43,65	>300	156,3 8 $\pm$ 5,037	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	Epazote	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	Carvacrol	117,51 $\pm$ 40,56	> 300	163,8 $\pm$ 39,9	> 300	32,2 1 $\pm$ 2,60	48,1 5 $\pm$ 2,96	39,71 $\pm$ 21,45	57,4 6 $\pm$ 23,2 8
<b>Formulaciones tipo F y sus vehculos <math>\mu</math>g/mL.</b>									
F1	Formulación	1,41 $\pm$ 0,09	2,64 $\pm$ 0,03	n.d	n.d	2,40 $\pm$ 0,03	2,87 $\pm$ 0,08	2,17 $\pm$ 0,01	5,72 $\pm$ 0,42
	% $\beta$ -Cariofileno en F1	0,04 $\pm$ 0,003	0,08 $\pm$ 0,001	n.d	n.d	0,07 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,000 3	0,16 $\pm$ 0,01 4
V1	Formulación	2,29 $\pm$ 0,56	5,14 $\pm$ 0,76	n.d	n.d	2,25 $\pm$ 0,54	5,22 $\pm$ 0,74	1,36 $\pm$ 0,04	2,86 $\pm$ 0,12
	% Kolliphor en V1	0,46 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 0,15	n.d	n.d	0,45 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,15	0,27 $\pm$ 0,008	0,57 $\pm$ 0,02 4
F2	Formulación	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	% $\beta$ -cariofileno en F2	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30
V2	Formulación	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

	% de DMSO en V2	> 75	> 75	> 75	> 75	> 75	> 75	> 75	> 75
<b>Formulaciones tipo G, U y sus vehículos µg/mL.</b>									
G1	Formulación	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	% de epazote en G1	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
VG1	Formulación	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	% de PPG en VG1	> 2,5	> 2,5	> 2,5	> 2,5	> 2,5	> 2,5	> 2,5	> 2,5
U1	Formulación	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	% de carvacrol en U1	> 9	> 9	> 9	> 9	> 9	> 9	> 9	> 9
VU1	Formulación	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
	% de aceite de coco en VU1	> 129	> 129	> 129	> 129	> 129	> 129	> 129	> 129

*Nota:* Se muestran los resultados independientes de la actividad en células Vero y THP-1 de los metabolitos secundarios y epazote y sus formulaciones expresadas en CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub> definida como la concentración que reduce la viabilidad celular en un 50% y en 90% en µg/mL con su desviación estándar (DE). F: formulación tipo solución (F1, F2), V: vehículo (V1, V2, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1), PPG: propilenglicol, DMSO: dimetilsulfóxido, nd: no determinado.

## 4.8 Ensayos *in vivo*

### 4.8.1 Ensayos actividad antileishmania

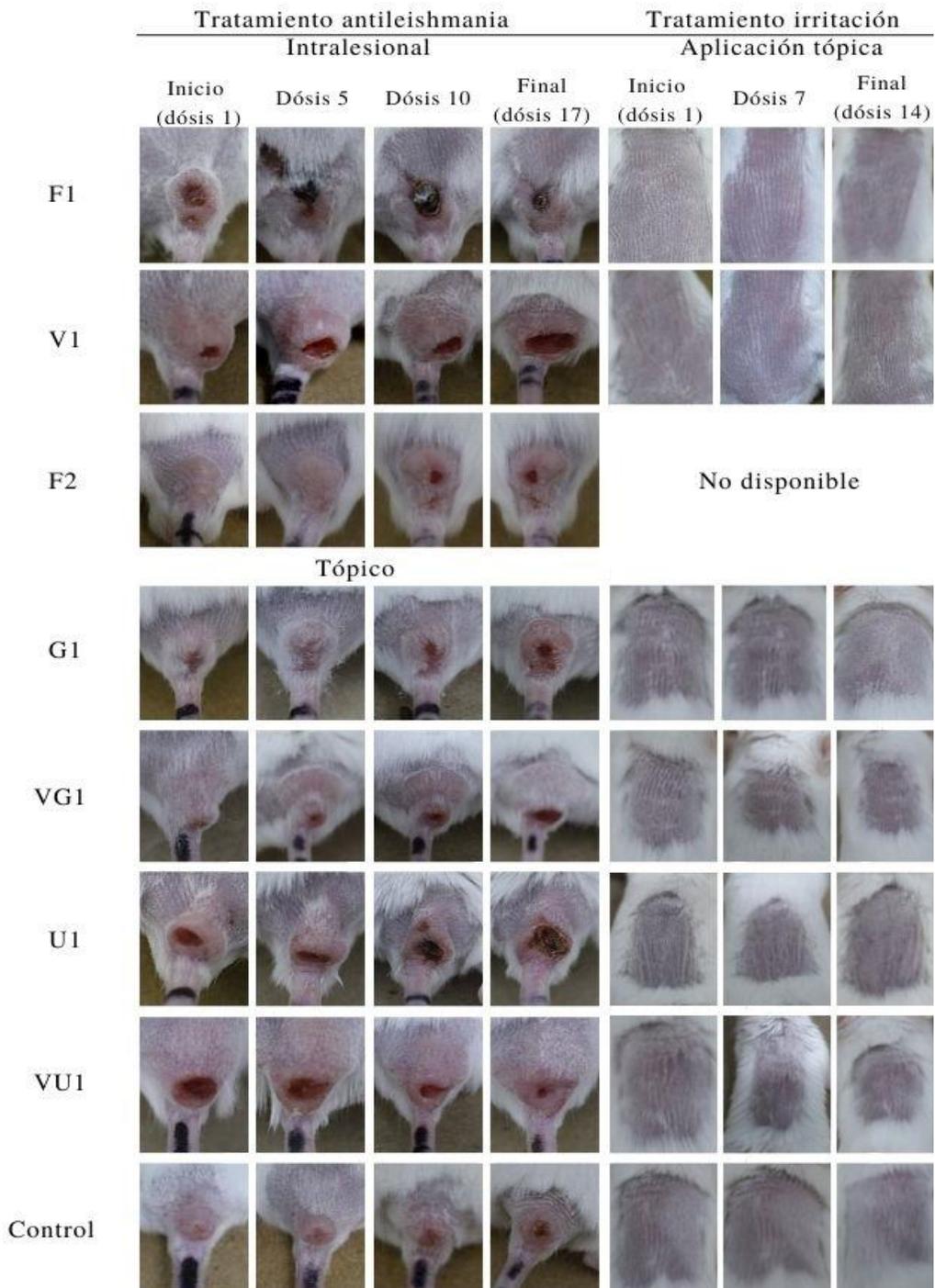
En la **Figura 40** (primeras 4 columnas) se muestran las fotografías de las lesiones características de leishmaniasis cutánea al inicio, a la 5 y 10 dosis y al final de los tratamientos con las formulaciones tipo solución (F1, F2 y vehículos) aplicadas intralesionalmente (IL) y tipo gel

(G1 y VG1) y tipo ungüento (U1 y VU1) aplicados tópicamente. Al inicio del tratamiento las lesiones estaban formadas por un nódulo redondeado y algunos ulcerados en el centro. El tamaño de las lesiones al inicio de los tratamientos fue heterogéneo, esto debido al amplio rango de tamaños de lesión tratados, entre 26 mm<sup>2</sup> a 116 mm<sup>2</sup> **Tabla 39**. El tratamiento IL con la solución F1 indujo una disminución del tamaño de las lesiones, aunque estas no se resolvieron completamente ya que al final del tratamiento se pudo observar presencia de una costra en la zona de la lesión. El F1 indujo un porcentaje de reducción del tamaño de lesión al final del tratamiento entre el 43% a 62% en 2 de 3 ratones tratados, por su parte los tratamientos con V1 y F2 mostraron que a mayor dosis se observaban mayores efectos negativos sobre las lesiones como aparición de lesiones abiertas, muy exudativas y dolorosas. En cuanto a los tratamientos tópicos, se pudo observar que con G1 indujo una ligera inhibición del tamaño de las lesiones estabilizando el crecimiento de estas, con un % R del 1,8% en uno de los ratones tratados (**Tabla 39**). La **Figura 40** para el tratamiento con G1 mostró que la lesión no se agravo con el aumento de las dosis, respecto a los tratamientos tópicos con VG1 y U1 estos agravaron las lesiones con el aumento de las dosis, se pudo observar por el aumento del tamaño de úlceras y nódulo, así como signos de dolor en los ratones. En el caso de VU1 se pudo observar que el tamaño de la úlcera disminuyó casi completamente en comparación con los demás tratamientos tópicos al final del tratamiento. Las formulaciones F1 y G1 mostraron un patrón de reincidencia en los ratones F1-R1 y G1-R1 respectivamente, debido a que el área de la lesión disminuyó mayormente a las 10 dosis del tratamiento, que incluso al final de este (17 dosis).

En las improntas realizadas para todos los tratamientos se observaron formas de amastigotes compatibles con *Leishmania* de manera moderada (++) (**Tabla 39**).

**Figura 40.**

*Actividad antileishmania e irritación de los tratamientos (vía tópica) por las formulaciones*



*Nota:* En las columnas de la izquierda de 1-4, se muestra el seguimiento fotográfico durante el tratamiento antileishmania intralesional (F1, V1 y F2) y tópico (G1, VG1, U1, VU1) y en las columnas derecha, columnas 5-7, del tratamiento aplicado vía tópica en piel sana para la

determinación de la irritación. F: formulación tipo solución (F1, F2), V: vehículo (V1, V2, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1)

**Tabla 39.**

*Resultados del tamaño de lesión en ratones infectados con L. (V.) braziliensis tratado con las formulaciones a 1, 5, 10 y 17 dosis*

Formulación	Ratón	Antes mm <sup>2</sup>	17 dosis (100 µL o 35 mg) en ratones infectados con <i>L. (V.) braziliensis</i>				
			10 dosis		Fin de tratamiento		Parásitos I
			mm <sup>2</sup>	%R	mm <sup>2</sup>	%R	
F1 (β-C)	R1	55,51	16,02	71,14	21,21	61,80	++
	R2	45,96	26,15	43,10	25,80	43,87	++
	R3	25,87	61,83	0	58,94	0	++
V1	R1	29,69	34,63	0	45,73	0	++
	R2	68,50	83,13	0	99,95	0	++
	R3	27,31	57,18	0	31,05	0	++
F2 (β-C)	R1	40,90	46,46	0	93,03	0	++
G1 (epazote)	R1	42,33	38,96	7,98	41,57	1,80	++
	R2	54,74	60,04	0	64,91	0	++
VG1	R1	34,14	73,83	0	76,98	0	++
U1 (carvacrol)	R1	41,26	52,02	0	86,48	0	++
	R2	115,77	117,7	0	178,13	0	++
VU1	R1	39,21	90,32	0	109,72	0	++
Control (sin tratar)	R1	36,85	37,93	0	38,41	0	++
	R2	35,4	45,49	0	45,75	0	++
	R3	38,69	48,36	0	43,88	0	++

*Nota:* Se muestran los resultados individuales de cada ratón (R), el tamaño (cm<sup>2</sup>) de lesiones y porcentaje de reducción (%R) de la lesión antes durante y después del tratamiento. Los valores

obtenidos del análisis de improntas (I) y biopsias (B) fueron puntuados como: - ausencia, + leve, ++ moderado, +++ severo. Los valores se obtuvieron de las áreas histopatológicas más dominantes. Observación en 50 campos microscópicos, aumento 1000X. F: formulación tipo solución (F1, F2), V: vehículo (V1, V2, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1).

Al analizar el área del nódulo vs tiempo (semanas) de tratamiento (**Figura 41A**), incluyendo al grupo control, se observó que el crecimiento de las lesiones para F1, V1 y G1 ocurren en un rango similar de 0 a 50 mm<sup>2</sup>. El grupo experimental tratado con U1 no siguió el mismo comportamiento del grupo anterior, debido a que el tamaño de lesión inicial fue incluso mayor que el resto de los grupos experimentales durante todas las etapas del tratamiento.

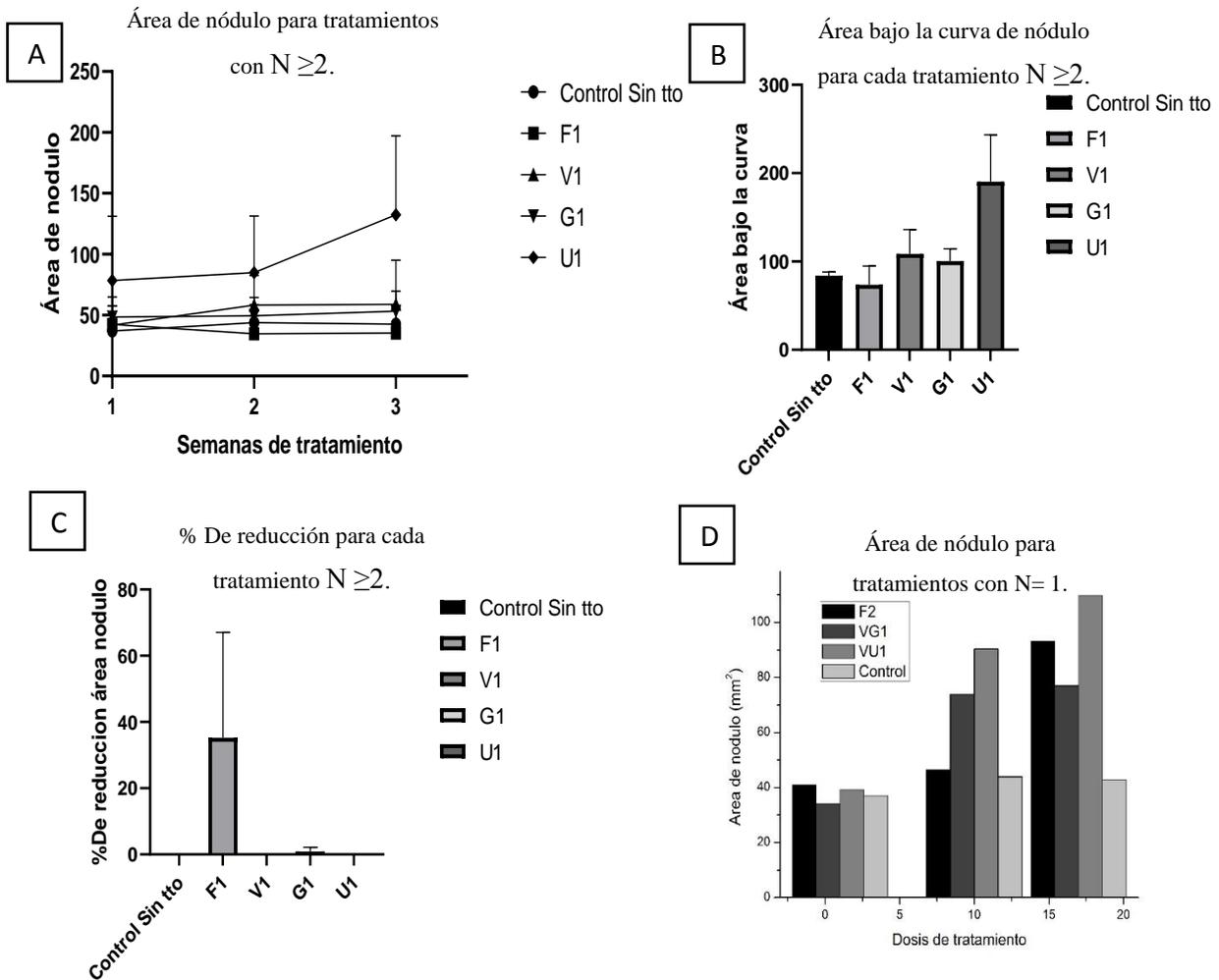
Con base al análisis estadístico de los grupos experimentales tratados con F1, V1, G1 y U1 ( $n \geq 2$  ratones) mediante la prueba de ANOVA de 2 vías se determinó de que el área de la lesión para el grupo tratado con la formulación U1 fue mayor que para el grupo control al final del tratamiento. En ninguno de los tratamientos con formulaciones y vehículos las diferencias de área al inicio, a las 10 dosis y al final del tratamiento en comparación con el grupo control fueron significativos ( $p \leq 0,05$ ). Las áreas bajo la curva para cada tratamiento se muestran en la **Figura 41B**, donde el grupo experimental con mayor área bajo la curva fue U1. No se observaron diferencias significativas entre las mismas  $p \leq 0,05$  respecto el área del grupo control.

En la (**Figura 41C**) se muestra el gráfico correspondiente a % de reducción de nódulo vs semanas de tratamiento donde se evidenció que F1 y G1 fueron los mejores tratamientos *in vivo* al presentar un mayor porcentaje de reducción de tamaño de la lesión (nódulo). Sin embargo, la desviación estándar para F1 fue grande debido a la dispersión de los datos (áreas de lesión) de los ratones usados para este grupo experimental. Se concluyó que F1 es un tratamiento promisorio.

En la (**Figura 41D**) se muestra el gráfico de barras de los tratamientos con un N=1 ratones (F2, VG1, VU1) donde se observa que todos estos tratamientos aumentan el área del nódulo de la lesión respecto al control a las 10 dosis y al final del tratamiento entre 30 a 60 unidades de área.

**Figura 41.**

*Análisis estadístico grupos experimentales in vivo*



*Nota:* La figura muestra las gráficas con el análisis estadístico para los diferentes tratamientos y control *in vivo*, y la comparación entre los mismo. A) Área de nódulo para tratamientos con  $N \geq 2$  ratones, B) Área bajo la curva tratamientos con  $N \geq 2$  ratones C) % De reducción para cada tratamiento  $N \geq 2$  ratones, D) Área de nódulo para tratamientos con  $N = 1$  ratones. F: formulación tipo solución (F1, F2), V: vehículo (V1, V2, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1).

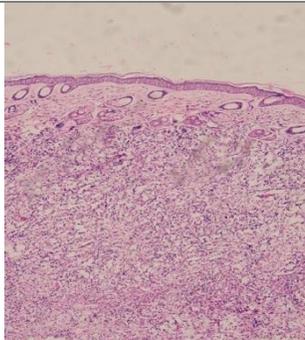
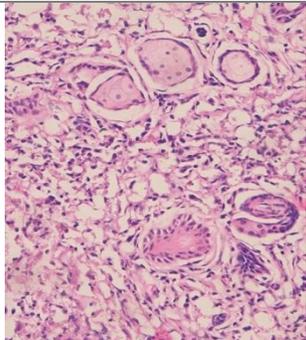
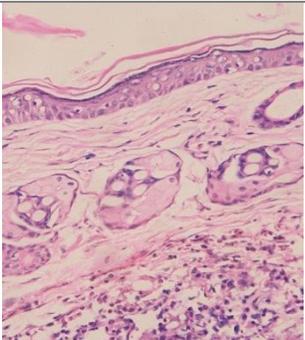
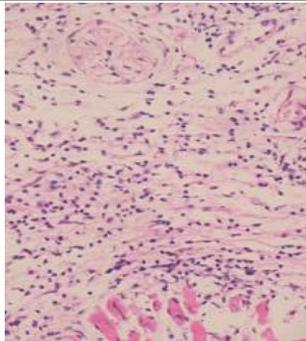
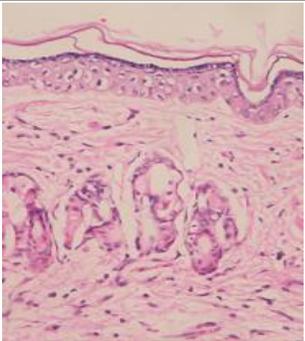
#### 4.8.1.1 Estudio histopatológico de las lesiones de LC después del tratamiento

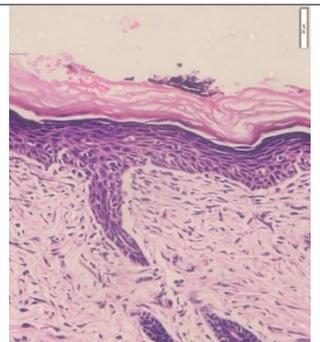
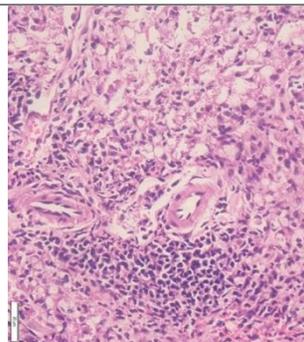
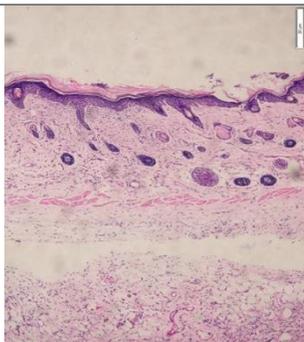
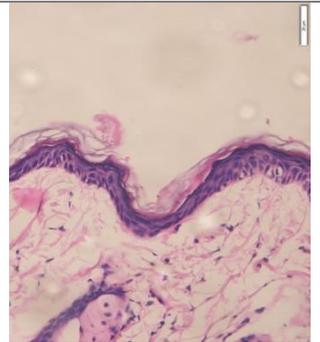
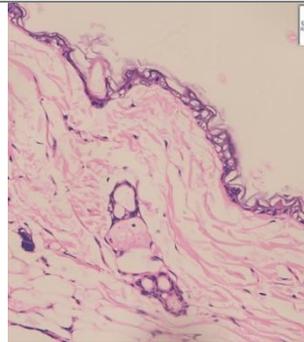
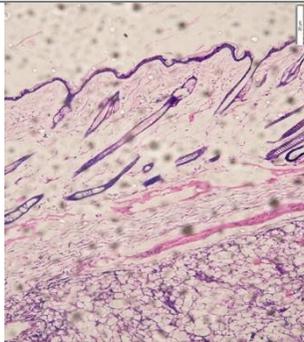
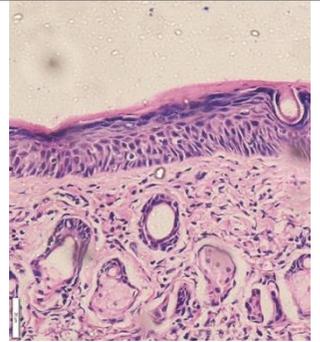
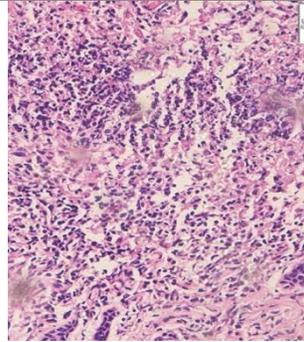
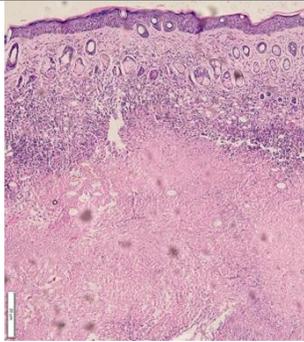
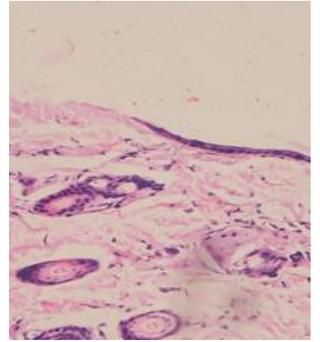
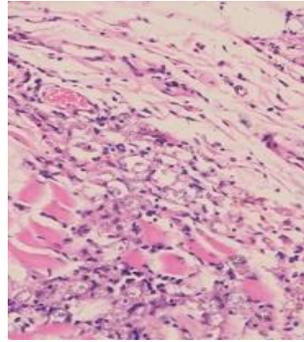
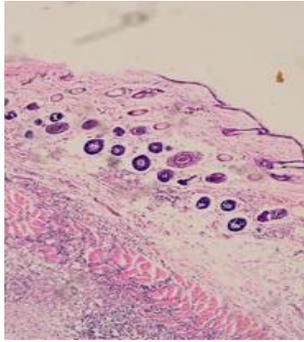
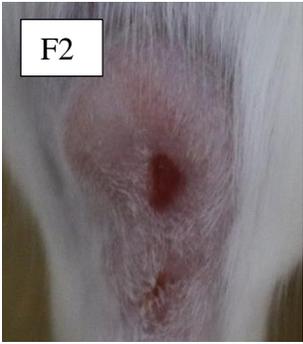
Se muestran las fotografías de los cortes histológicos después del sacrificio para las lesiones de LC después del tratamiento, donde se pudieron analizar los patrones histopatológicos presentes en la epidermis y la dermis, esto observado microscópicamente a 100X y 400X (**Figura**

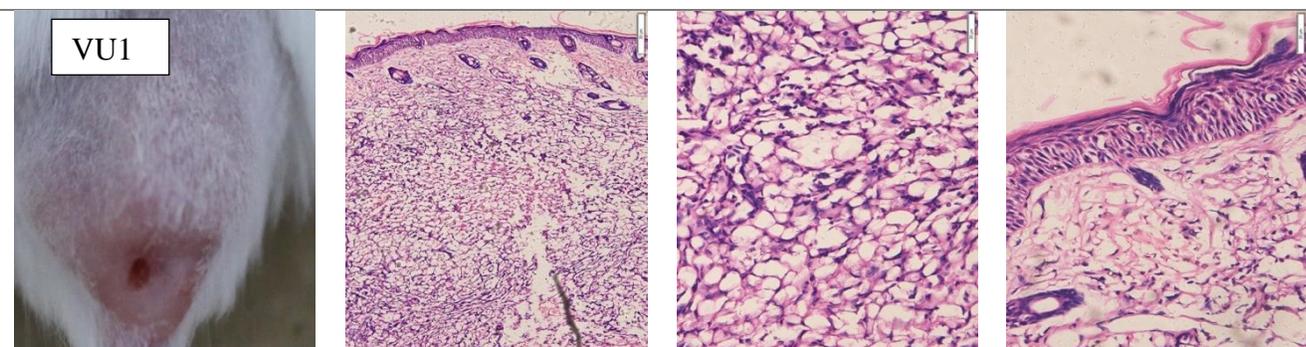
42). Los ratones presentaron similitudes en cuanto a las alteraciones histopatológicas presente en la epidermis, tales como acantosis, hiperqueratosis, paraqueratosis, espongirosis, exocitosis a excepción de F2 y VG1 que presentaron únicamente ulcera y acantosis- hiperqueratosis respectivamente (**Tabla 40**). Por su parte, en la dermis fue común la presencia severa de amastigotes en las biopsias para todos los tratamientos a excepción del tratamiento con VU1 que obtuvo una calificación de moderada. La intensidad del infiltrado inflamatorio fue severa en todos los casos a excepción de las biopsias del ratón tratado con VG1, calificado como moderado, además hubo ausencia de eosinófilos y necrosis en la mayoría de las biopsias a excepción de los ratones y tratamientos con R3-F1, R1-V1, R2-G1, R1-VG1. Hubo presencia de linfocitos y PMN en todas las biopsias analizadas (**Tabla 40**).

**Figura 42.**

*Cortes histológicos de las lesiones de LC después del tratamiento con las formulaciones usadas*

Lesión	Lesiones de LC por <i>L. (V.) braziliensis</i>		
	10X	40X	
		Dermis	Epidermis
F1			
V1			





*Nota:* En la primera columna se muestra las fotografías de la lesión al final del experimento, en la segunda las microfotografías se su respectivo corte histológico con un aumento de 100X y en la 3 y 4 las imágenes a 400X de la epidermis y dermis. F: formulación tipo solución (F1, F2), V: vehículo (V1, V2, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1).

**Tabla 40.**

*Características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c infectados con L. (V.) braziliensis después del tratamiento*

Características	Ratones BALB/c infectados con <i>L. (V.) braziliensis</i>													
	Formulación													
	F1			V1			F2		G1		VG1		U1	
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R1	R2	R1	R1	R2	R1	
<b>Epidermis</b>														
Úlcera	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	
Acantosis	++	++	++	+	++	++	-	+++	+++	+	+++	++	+++	
Hiperqueratosis	+	++	+	+	+	-	-	+++	++	+	+++	+	++	
Paraqueratosis	+	+	-	-	-	-	-	+++	++	-	++	+	+++	
Espongiosis	++	++	+	+	-	++	-	++	+++	-	++	++	+++	
Exocitosis	+	+	+	+	+++	++	-	++	++	-	++	++	++	
<b>Dermis (infiltrado inflamatorio)</b>														
Intensidad	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	
Distribución	D	F	D	D	D	D	D	M	M	M	M	M	M	
PMN	++	+	+++	++	+++	++	+	++	++	+	++	++	++	

Linfocitos	++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
Plasmocitos	-		+	++	+	++	++	+	+	+	++	++	+
Macrófagos	++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Eosinófilos	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
Amastigotes	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

*Nota:* Se muestran la evaluación semicuantitativa de cada una de las características histopatológicas encontradas clasificadas: - ausencia, + leve, ++ moderado, +++ severo. Observación en 50 campos microscópicos, aumento 1000X. PMN: polimorfo nuclear, D: difusa, F: focal, M: mixta. F: formulación tipo solución (F1, F2), V: vehículo (V1, V2, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1).

#### ***4.8.2 Estudios de irritación de las formulaciones tipo solución aplicadas intradérmicamente (ratones sanos)***

Los tratamientos aplicados intradérmicamente con F1, V1, F3 fueron irritantes. Estos se pueden observar en la (**Figura 43**) donde se muestra el seguimiento fotográfico de cada uno de los ratones usados para estas formulaciones. Se observó que el aumento de dosis con estos tratamientos conlleva a la aparición en las zonas de aplicación de nódulos que aumentan progresivamente de tamaño, con bordes redondeados y úlceras exudativas que con el tiempo se convierten en costra, así como presencia de necrosis. Los ratones con estos tratamientos mostraron signos de dolor al recibir dichas formulaciones como incomodidad y agresividad. Lo anterior condujo a la interrupción de la prueba de irritación con estos tratamientos a los 10 días para F1 y V1 y 5 días para F3, con lo cual se deduce que el tratamiento más agresivo fue con el F3 (grado de irritación 4). El grado de irritación presentado para los tratamientos con F1, V1 y F3 fue en el rango de 2 a 4 (**Tabla 41**). El vehículo V3 no mostró signos de irritación (**Figura 43**).

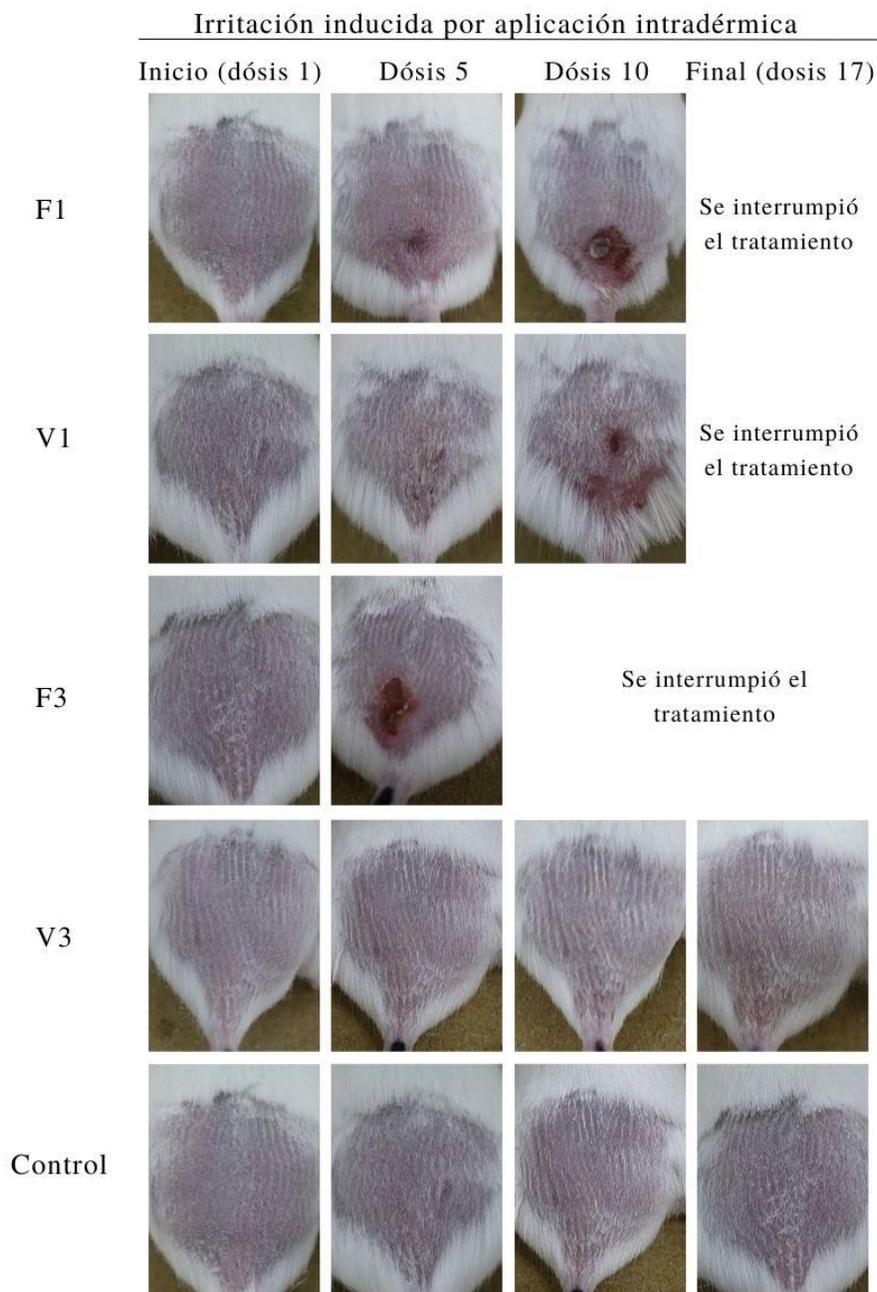
**Tabla 41.***Respuesta de los tratamientos de irritación aplicados intralesional y tópicamente*

Formulación	Aplicación intradérmica		Aplicación tópica	
	Ratón	Respuesta	Ratón	Respuesta
F1	R1	3	R1	-
	R2	4	R2	-
V1	R1	2	R1	-
	R2	2		
F3	R1	4	NA	NA
V3	R1	-	NA	NA
G1	NA	NA	R1	-
VG1	NA	NA	R1	-
U1	NA	NA	R1	-
VU1	NA	NA	R1	-

*Nota:* Individualmente se muestra el grado de irritación el cual fue clasificado como: - ausencia, 1 = ligero, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = grave irritación. NA: No analizado. F: formulación tipo solución (F1, F3), V: vehículo (V1, V3, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1).

**Figura 43.**

*Irritación inducida al tratamiento con las formulaciones tipo solución aplicadas intradérmicamente*



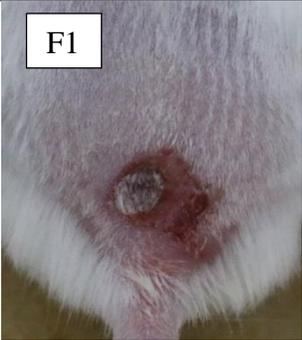
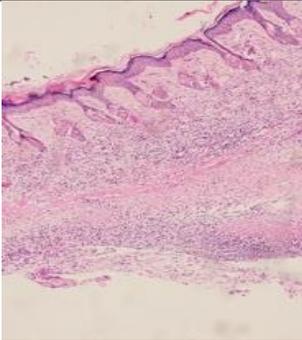
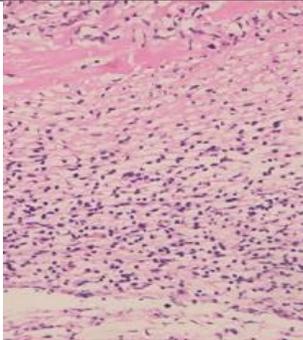
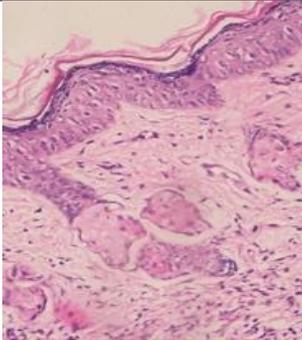
*Nota:* La figura muestra fotografías de los resultados de irritación para las formulaciones F1 y F3 conteniendo □-C y sus vehículos (sin □-C) aplicadas ID a las dosis 1, 5, 10 y 17, comparadas con un control el cual consistió en un ratón sin tratar. F: formulación tipo solución (F1, F3), V: vehículo (V1, V3).

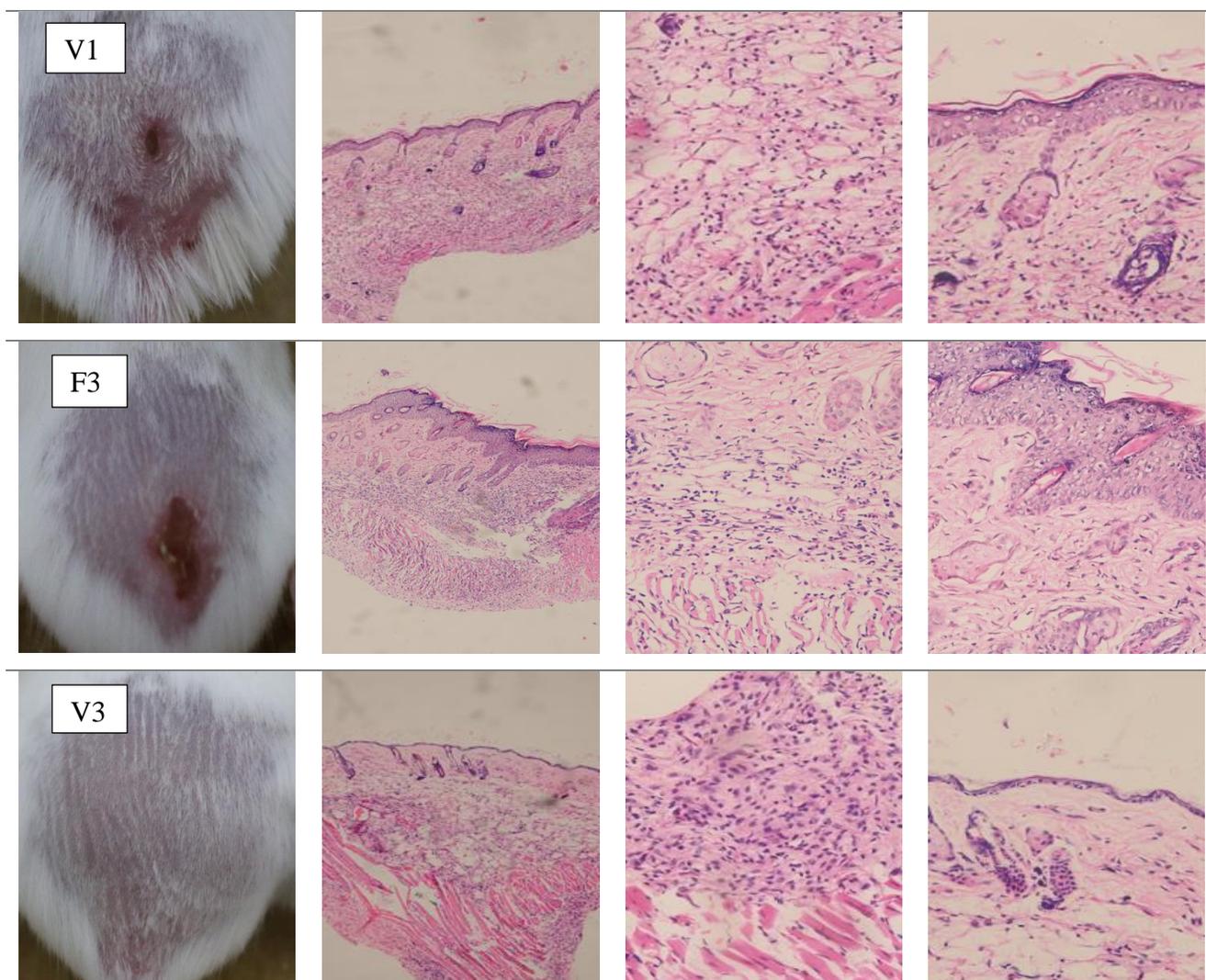
**4.8.2.1 Estudio histopatológico de las secciones de piel después del tratamiento de irritación inducido por aplicación intradérmica**

Se muestran las fotografías de los cortes histológicos después del sacrificio para las secciones de piel después del tratamiento ID, donde se pudieron analizar los patrones histopatológicos presentes en la epidermis y la dermis, esto observado microscópicamente a 100X y 400X (**Figura 44**). En la epidermis de los ratones, se observaron (microscópicamente) alteraciones histopatológicas como acantosis, hiperqueratosis, paraqueratosis, espongirosis y exocitosis a excepción de la V3 que no presentó ninguna alteración en la epidermis (**Tabla 42**). En cuanto al análisis de la dermis todos mostraron un infiltrado inflamatorio intenso, con una distribución difusa a excepción del V3 que fue focal. Se observó presencia de PMN, linfocitos, plasmocitos, macrófagos y eosinófilos en todas las biopsias analizadas de los tratamientos intradérmicos. Se evidenció únicamente presencia de necrosis en V1. No hubo presencia de amastigotes en ninguna biopsia al tratarse estas provenientes de ratones sano (**Tabla 42**).

**Figura 44.**

*Cortes histológicos de piel sana después de la prueba de irritación aplicada intradérmicamente con las formulaciones*

Sección de piel tratada	Irritación inducida por aplicación intradérmica		
	100X	400X	
		Dermis	Epidermis
			



*Nota:* En la primera columna se muestra las fotografías de la piel tratada al final del experimento, en la segunda las microfotografías de su respectivo corte histológico con un aumento de 100X y en la 3 y 4 las imágenes a 400X de la epidermis y dermis. F: formulación tipo solución (F1, F3), V: vehículo (V1, V3).

**Tabla 42.**

*Características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c sanos al final del tratamiento de irritación por medio de aplicación intradérmica*

Características	Ratones BALB/c sanos			
	Formulación (aplicación intradérmica)			
	F1	V1	F3	V3

	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>Epidermis</b>						
Ulcera	-	-	-	-	-	-
Acantosis	++	+++	++	++	+++	-
Hiperqueratosis	++	+++	+	+	++	-
Paraqueratosis	+	+++	-	-	+	-
Espongiosis	+	+	+	+	++	-
Exocitosis	+	+	+	+	+	-
Atrofia	-	-	-	-	-	-
Hiperplasia	-	-	-	-	-	-
<b>Dermis (infiltrado inflamatorio)</b>						
Intensidad	+++	+++	+++	+++	+++	++
Distribución	D	D	D	D	D	F
PMN	+	+	+	+	+	+
Linfocitos	+++	+++	+++	+++	+++	++
Plasmocitos	++	++	++	+	++	+
Macrófagos	+	+	+	+	+	+++
Eosinófilos	+	+	+	+	++	+
Necrosis	-	-	+	-	-	-
Amastigotes	-	-	-	-	-	-

*Nota:* Se muestran los valores obtenidos de las áreas histopatológicas más dominantes después del sacrificio para los ratones BALB/c sanos en el ensayo de irritación con las diferentes formulaciones tipo solución aplicadas intradérmicamente. Las áreas histopatológicas fueron puntuadas como: - ausencia, + leve, ++ moderado, +++ severo. Observación en 50 campos microscópicos, aumento 1000X. PMN: polimorfo nuclear, D: difusa, F: focal, M: mixta. F: formulación tipo solución (F1, F3), V: vehículo (V1, V3).

#### ***4.8.3 Estudios de irritación de los compuestos aplicados tópicamente***

Los tratamientos aplicados tópicamente, no mostraron signos de irritación tópica en ninguno de los ratones tratados con las diferentes formulaciones y vehículos, no se observaron respuesta como: alopecia (área limitada), hiperqueratosis, hiperplasia y descamación persistente

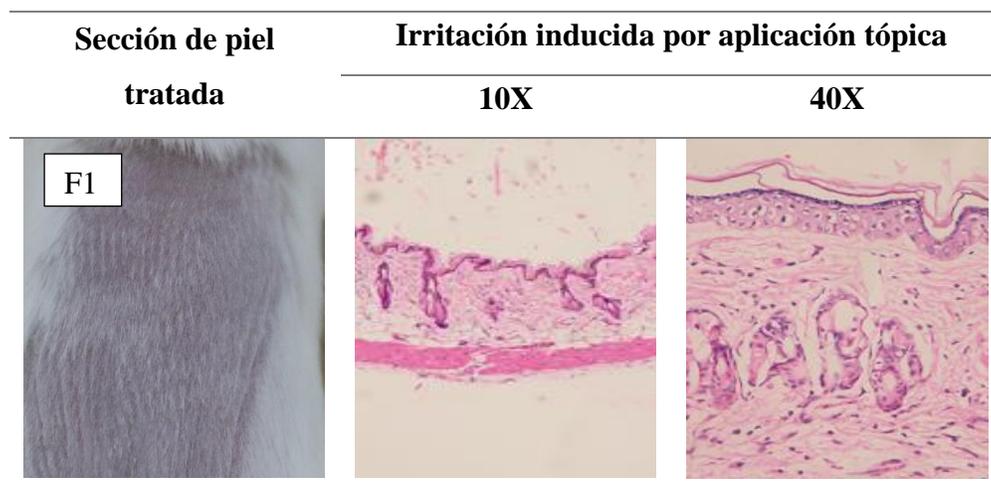
hasta el final del período de observación (**Figura 40, Tabla 43**). En la (**Figura 40**) se muestra el seguimiento fotográfico de cada uno de los ratones usados para estas formulaciones. Se observó que el aumento de dosis con estos tratamientos no conlleva a la aparición en las zonas de aplicación de úlceras ni presencia de necrosis. Los ratones con estos tratamientos no mostraron signos de dolor al recibir dichas formulaciones como incomodidad o agresividad

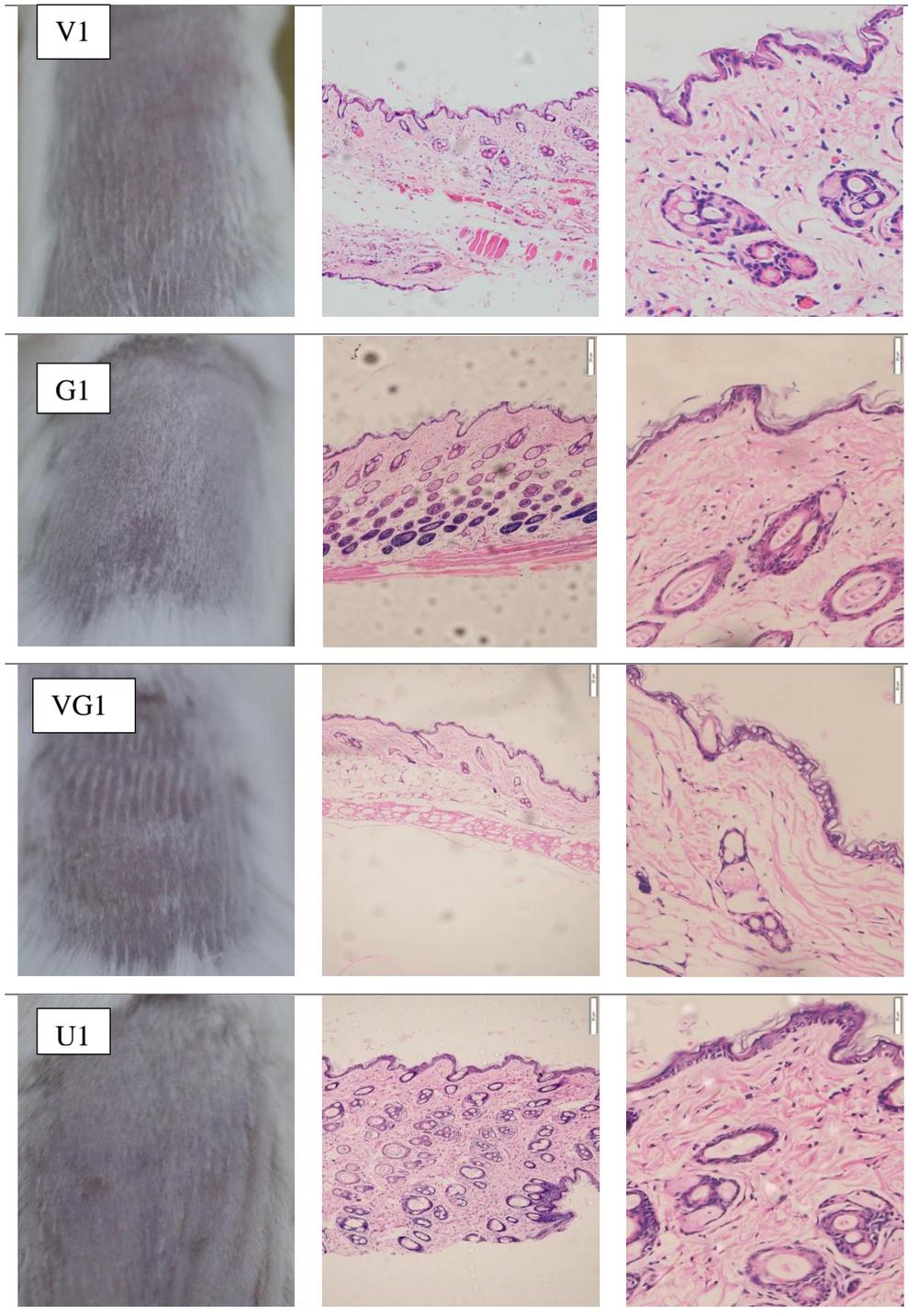
#### 4.8.2.1 Estudio histopatológico de las secciones de piel después del tratamiento de irritación inducido por aplicación intradérmica

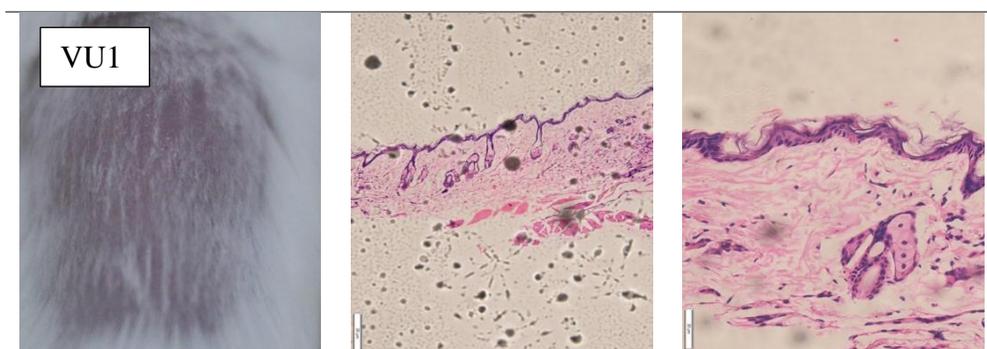
Histológicamente (microscópicamente), en la epidermis de los ratones tratados con los compuestos aplicados intradérmicamente, se observaron alteraciones histopatológicas como hiperqueratosis en (R1-F1, R1-VU1), espongiosis en (R1-F1), exocitosis en (R1-VU1) y atrofia en (R1-G1) (**Figura 45, Tabla 43**). En cuanto al análisis de la dermis todos mostraron un infiltrado inflamatorio leve para R1, R2-F1 y moderado para R1-V1 con distribución focal. Los ratones tratados con G1, VG1, U1 no mostraron ninguna alteración histopatológica en la dermis. Se observó presencia de PMN, linfocitos, macrófagos y únicamente en las biopsias analizadas de los tratamientos F1, V1 y U1. No hubo presencia de amastigotes en ninguna biopsia (**Tabla 43**).

#### Figura 45.

*Cortes histológicos de piel sana después de la prueba de irritación aplicada tópicamente con las formulaciones*







*Nota:* En la primera columna se muestra las fotografías de la piel tratada al final del experimento, en la segunda las microfotografías de su respectivo corte histológico con un aumento de 100X y en la 3 las imágenes a 400X de la epidermis y dermis. F: formulación tipo solución (F1), V: vehículo (V1, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1).

**Tabla 43.**

*Características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c sanos al final del tratamiento de irritación por medio de aplicación tópica*

Características	Ratones BALB/c sanos						
	Formulación (aplicación tópica)						
	F1		V1	G1	VG1	U1	VU1
	R1	R2	R1	R1	R1	R1	R1
<b>Epidermis</b>							
Ulcera	-	-	-	-	-	-	-
Acantosis	-	-	-	-	-	-	-
Hiperqueratosis	++	-	-	-	-	-	+
Paraqueratosis	-	-	-	-	-	-	-
Espongiosis	+	-	-	-	-	-	-
Exocitosis	-	-	-	-	-	+	-
Atrofia	-	-	-	+	-	-	-
Hiperplasia	-	-	-	-	-	-	-
<b>Dermis (infiltrado inflamatorio)</b>							
Intensidad	+	+	+	-	-	-	-
Distribución	F	F	F	-	-	-	-

PMN	+	+	+	-	-	-	-
Linfocitos	++	+	++	-	-	-	+
Plasmocitos	-	+	-	-	-	-	-
Macrófagos	+	+	++	-	-	-	++
Eosinofilos	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-
Amastigotes	-	-	-	-	-	-	-

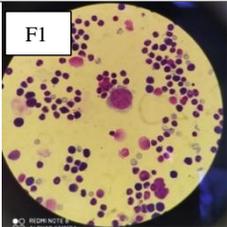
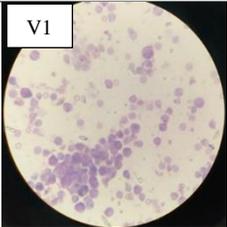
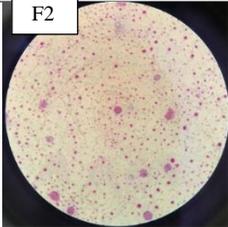
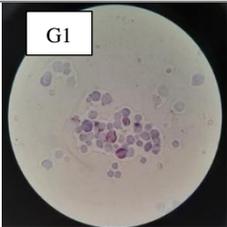
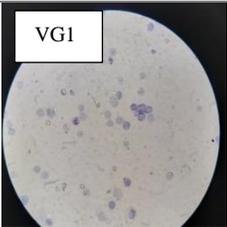
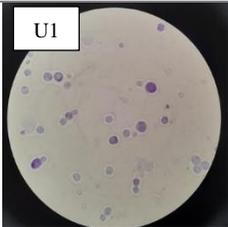
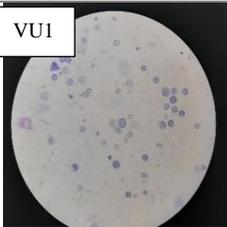
*Nota:* En la tabla se muestran los valores obtenidos de las áreas histopatológicas más dominantes después del sacrificio para los ratones BALB/c sanos en el ensayo de irritación con las diferentes formulaciones tipo solución aplicadas tópicamente. Las áreas histopatológicas fueron puntuadas como: - ausencia, + leve, ++ moderado, +++ severo. Observación en 50 campos microscópicos, aumento 1000X. PMN: polimorfo nuclear, D: difusa, F: focal, M: mixta. F: formulación tipo solución (F1), V: vehículo (V1, VG1, VU1). G: gel (G1), U: ungüento (U1).

#### **4.9 Prueba de genotoxicidad (prueba de micronúcleos)**

Se evidenció que ninguno de los esquemas de tratamientos tópicos utilizado mostró formación de micronúcleos (fragmentación del ADN o cromatina), es decir fragmentos circulares definidos y coloreados presentes en el citoplasma de células precursoras hematopoyéticas de médula ósea en 50 campos microscópicos de 1000X, mientras que en los tratamientos aplicados intralesionalmente se encontraron micronúcleos en el rango de 1-5 para F1 y F2. En la **Tabla 44**, se muestra la fotografía microscópica usada para el análisis de micronúcleos, así como el rango de micronúcleos obtenido para cada tratamiento.

**Tabla 44.**

*Genotoxicidad (micronúcleos) inducida al tratamiento con las formulaciones en ratones infectados con L. (V.) braziliensis*

<b>Micronúcleos</b>				
Formulaciones tipo solución (IL)				NC
No. micronucleos por campo 1000X	1-5	0	1-5	NC
Formulaciones tipo gel y unguento (tópicas)				
No. de micronucleos por campo 1000X	0	0	0	0

*Nota:* En la tabla se muestran las microfotografías de extendidos de médula ósea extraída del fémur de los ratones coloreadas con Giemsa (1000x) después del sacrificio. También se muestra el resultado del conteo de micronúcleos en células hematopoyéticas por campo. NC: No corresponde.

## 5. Discusión

En el presente trabajo se encontraron resultados interesantes relacionados no sólo con la actividad antileishmania y tóxica de los candidatos escogidos sino con aspectos importantes de los compuestos y formulaciones utilizados lo cual permitiría su uso en esta o en otras entidades clínicas.

Tal como se esperaba, se encontró que los metabolitos secundarios apolares como el  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -cariofileno y carvacrol fueron solubles en todos los solventes de su misma naturaleza. Estos metabolitos al ser de naturaleza apolar fueron parcialmente solubles (PS) en el agua que tiene un carácter polar. Por lo tanto, se comprueba que compuestos de diferente polaridad no son miscibles entre sí (Gong et al., 2007). Los solventes metanol y etanol solubilizaron los metabolitos secundarios apolares debido a la baja polaridad (en comparación con el agua) de los solventes y a la energía mecánica (agitación) aplicada a la disolución, lo cual permitió su disolución completa (Singh et al., 2021). Por otro lado, el epazote (extracto líquido herbal) fue insoluble en los solventes de carácter apolar (aceite de ricino, tolueno, n-pentano y aceite de coco) probados, incluso aplicando agitación. Esto concuerda con la incapacidad que tienen los compuestos para disolverse en compuestos de polaridad diferente (Gong et al., 2007). En los solventes polares el epazote solubilizó completamente debido a su capacidad de crear interacciones dipolo-dipolo (puentes de hidrógeno) con estos solventes ya que en su composición está presente el agua y glicerina, lo que le otorga un carácter polar (Gans et al., 1998).

Al analizar las formulaciones tipo F, se evidenció que se conservó la coloración y el olor de su compuesto activo ( $\beta$ -C), al ser este un sesquiterpeno oleoso y de carácter aromático con alta volatilidad (Francomano et al., 2019). La formulación F1 obtuvo un valor de pH de carácter neutro debido posiblemente al contenido de PBS (pH 7,2 a 7,4) tampón que se encuentra en mayor proporción (87% v/v) interactuando con el Kolliphor y el  $\beta$ -C (pH ligeramente ácido). Su vehículo (V1) tiene un carácter ligeramente ácido posiblemente por la falta del  $\beta$ -C y al menor contenido de PBS (80% v/v). Por otro lado, la formulación F2 mostró un pH de carácter ligeramente ácido, debido a que la solución salina utilizada en un 82% v/v mostró un pH de carácter ácido. El pH de V2 fue inferior a F2 debido posiblemente a la ausencia del  $\beta$ -C. En el caso de las formulaciones tipo G, se mantuvo el color y el olor del epazote, debido a que estas son características organolépticas propias del mismo y hace que se mantenga por encima de los otros compuestos que conforman la formulación, los cuales son inodoros e incoloros. El color y el olor se deben a la presencia de compuestos polares derivados del extracto acuoso de la planta como polisacáridos, amidas, otros (Santizo Rodas, 2004). La formulación G1 mostró un pH de 6,16, el cual en comparación con su componente epazote es menos ácido. Esto se da por la reacción del epazote con los demás compuestos de mayor pH, como el benzoato de sodio, el CMC y la glicerina. Se pudo observar que efectivamente el valor de pH del VG1 es menos ácido respecto al de la

formulación, ya que al tener ausencia del compuesto activo su pH es más alto. Para las formulaciones tipo U se mantuvo el color y consistencia de la cera de abejas y manteca de cacao, estos fueron la base de la formulación. Los anteriores están compuestos básicamente por ácidos grasos y alcoholes de alto peso molecular y tienen un punto de fusión alrededor de los 65°C (Bogdanov & Science, 2016). Por ende, a temperatura ambiente, pueden contener los demás compuestos apolares y mantener su estado sólido. Por otro lado, en U1 predomina el olor del carvacrol, ya que al ser un monoterpeno oleoso, de carácter aromático y alta volatilidad predomina respecto a los demás compuestos (Guimarães et al., 2015). El pH obtenido para U1 estuvo en el rango de 4-5, que concuerda con el valor de pH del carvacrol. En este caso el pH de todos los compuestos fue similar entre ellos, por lo tanto, no se vio afectado el pH final de la formulación, esto se puede confirmar observando el pH del vehículo (VU1). En cuanto a la caracterización del PSA, el olor fue diferente al de su precursor. Este fue similar al paico (olor conocido previamente) aunque levemente se desprendían olores de acetato de etilo usado en la purificación, esto indicó que la metodología de síntesis aplicada se realizó de manera adecuada, aunque la purificación fue deficiente, esto debido a la poca cantidad de producto obtenido. Otros factores que pudieron afectar la síntesis fueron la luz y las condiciones de laboratorio.

Sobre el análisis de espectral (FT-IR, UV-Vis, GC-MS, HPLC-UV) de cada compuesto al ser comparado con los de la literatura, se observó que la mayoría de los espectros correspondientes a los metabolitos secundarios coincidieron con las señales esperadas. En el caso del espectro de IR para el  $\beta$ -C se observaron las bandas pertenecientes a los hidrocarburos con hibridación  $C\ sp^3$  de enlaces (-CH), así como las bandas correspondientes a los enlaces dobles (alquenos) y los respectivos grupos metilo, metileno; todas estas bandas fueron coincidentes con el espectro obtenido por (Bio- Rad) lo cual permitió la identificación inequívoca del  $\beta$ -C. Por su parte el espectro UV-Vis del  $\beta$ -C obtenido experimentalmente ( $\lambda_{max}=286\text{ nm}$ ) no coincidió con el obtenido por Zhou y colaboradores (Zhou et al., 2012) ( $\lambda_{max}=545\text{ nm}$ ), esto posiblemente causado por los diferentes solventes (metanol y DMSO) en los que fueron diluidos para la toma del espectro. En cuanto al GC-MS del  $\beta$ -C se determinó que los componentes identificados experimentalmente ( $\alpha$ -copaeno, óxido de cariofileno,  $\beta$ -C) coincidieron con los expresados por (Geddo et al., 2019). El componente presente en mayor cantidad relativa es efectivamente el  $\beta$ -C en un 69% y 88% respectivamente. El extracto caracterizado mostró un alto contenido de hidrocarburos sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados como el  $\beta$ -C, este resultado es concluyente ya que al

aplicar las formulaciones preparadas con dicho componente activo, se aprovecharon las propiedades antileishmania del mismo, como mencionaron Soares y colaboradores (Soares et al., 2013). En el espectro IR para el carvacrol se observaron las bandas pertenecientes al anillo aromático ( $=C-H$ ,  $C=C$ ), así como la banda confirmatoria de la trisustitución en las posiciones 1,2,4 sobre los  $1891\text{ cm}^{-1}$  y  $1714\text{ cm}^{-1}$ . En cuanto al  $\alpha$ -terpineno se observaron las bandas de vibración correspondientes al alqueno presente en su estructura, así como la banda debida a la presencia del grupo metilo e isopropilo. Todas estas bandas fueron coincidentes con los espectros obtenidos por (Bio- Rad) lo cual permitió la identificación inequívoca de estos metabolitos secundarios. Por su parte el espectro UV-Vis del carvacrol obtenido experimentalmente ( $\lambda_{\text{max}}=296\text{ nm}$ ) no coincidió con el obtenido por laboratorios Bio-Rad ( $\lambda_{\text{max}}=220\text{ nm}$ ,  $270\text{ nm}$ ) al igual que el espectro UV-Vis del  $\alpha$ -terpineno obtenido experimentalmente ( $\lambda_{\text{max}}=296$ ) que no coincidió con el obtenido por Monzote y colaboradores (Monzote et al., 2009) ( $\lambda_{\text{max}}=270$ ). Lo anterior puede ser causado por los diferentes solventes (DMSO) en los que fueron diluidos para la toma del espectro. En cuanto al GC-MS del carvacrol y  $\alpha$ -terpineno se identificaron las señales correspondientes al ion molecular  $C_{10}H_{14}O$  ( $150\text{ m/z}$ ) y  $C_{10}H_{16}$  ( $136\text{ m/z}$ ) respectivamente, así como las demás fragmentaciones moleculares que fueron coincidentes con el espectro de masas del software de NIST MS Search 2.3 para cada uno de los metabolitos. Se induce que la corrida y condiciones cromatográficas fue efectiva y permitió la confirmación de la identidad del carvacrol y  $\alpha$ -terpineno. En el espectro de IR para el epazote se observaron las bandas de vibración posiblemente correspondientes a hidrocarburos y al enlace O-H, esto último es esperado debido que la composición del extracto contiene agua y glicerina (Hawaii Pharm, 2021). Por su parte el espectro UV-Vis del epazote obtenido experimentalmente ( $\lambda_{\text{max}}=296$ ), mostró una banda ancha entre  $250\text{ nm}$  y  $500\text{ nm}$ , esto es esperado debido a la diversidad de su composición (posiblemente aldehídos, alcoholes, cetonas), así como posiblemente por el solvente (DMSO) usado para la dilución de este. En cuanto al resultado obtenido por HPLC-UV se evidenció la elución de 10 componentes los cuales fueron dependientes de la corrida cromatográfica, el cromatograma mostró buena resolución y separación de las señales, sin embargo, el tiempo de elución de los componentes fue corto en el rango de  $0-5\text{ min}$ , esto debido a que la columna usada es idealmente usada para la separación de compuesto altamente polares (Agilent Technologies, 2006). Por último, en el caso del PSA, se determinó mediante espectroscopia IR que el compuesto realizado no fue el ascaridol, debido a que el espectro del PSA obtenido presentó bandas no propias del compuesto, como la

banda en  $3366\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a grupos hidroxilo (-OH), la aparición de esta banda pudo deberse por contaminación, deficiente extracción y/o purificación. La cantidad de PSA (mL) obtenido fue escasa, alrededor de  $100\ \mu\text{L}$ , esto es indicativo de la pérdida de este durante la síntesis, otras causales de lo anterior pudieron ser las condiciones en las que fue realizada la síntesis, tal como la luz, el entorno del laboratorio (humedad, contaminación cruzada) y/o la purificación.

Sobre el análisis de las formulaciones farmacéuticas preparadas, mediante espectroscopia IR se identificó que todas las formulaciones tipo F (F1/F3, F2), tipo G (G1) y U (U1) mostraron señales características respecto a su composición, así como diferencias espectrales mínimas (posición de señales y aparición de señales nuevas) respecto a sus vehículos (V1, V2, VG1, VU1). Estas diferencias se deben a la presencia del principio activo ( $\beta$ -C, carvacrol,  $\alpha$ -terpineno y epazote) en cada una de las formulaciones y su ausencia en los últimos. Se determinaron algunas señales que fueron coincidentes en los espectros de las formulaciones y vehículos, pero se diferenciaban en el % Transmitancia. Lo anterior fue relevante, debido a que esta última se relaciona indirectamente con la absorbancia y con la concentración de un grupo funcional en específico, según ley de Lambert-Beer (Parnis & Oldham, 2013). Por ende, de esta manera se pudo confirmar efectivamente que la concentración de los grupos funcionales causa diferencias en el aumento y disminución del % Transmitancia entre formulaciones y vehículos. Lo anterior se pudo evidenciar por ejemplo en la formulación F2 y su vehículo (V2) donde el % Transmitancia de la señal correspondiente a la vibración del enlace -OH sobre los  $3330\text{ cm}^{-1}$ , es mayor para F2 que V2, esto tiene sentido ya que el vehículo presenta un contenido adicional del 3% de SS (contiene agua) respecto a la formulación, con el fin de reemplazar el % de composición del  $\beta$ -C ausente en el mismo.

En cuanto a los cromatogramas generados para G1 y VG1 se identificaron los mismos picos de elución, sin embargo, hubo diferencias en la altura y anchura (área) de los mismos; esto es consecuente a la mayor presencia de agua en el vehículo en comparación con la formulación. No se pudo identificar señales características para el epazote en el cromatograma de G1, esto pudo ser causado por el solapamiento con otras señales y tiempos de elución similar entre los componentes que impidieron una buena separación. Debido a que el rango de tiempo en la separación para el epazote, G1, VG1, fue el mismo para todos (1 min a 3,5 min) las condiciones de corrida cromatográfica pudieron mejorarse con el fin de determinar señales únicamente relacionadas con el epazote en el respectivo cromatograma de la formulación G1.

Respecto a la formulación U1 se observaron dos picos de elución de los cuales uno se relaciona con el pico observado del vehículo VU1 en el tiempo 4,44 min. Con base a lo anterior se concluyó que esta señal podría corresponder o relacionarse con los componentes del vehículo y por ello se observó en ambos cromatogramas (U1, VU1). Se determinó mediante el análisis del espectro de masas correspondiente a este pico que podría corresponder al benzaldehído, un constituyente importante del aroma presente en la miel, cera de abejas (Kaškonienė et al., 2008) y manteca de cacao (Mohamadi Alasti et al., 2019) (base de la formulación y vehículo). Por otra parte, el espectro de masas del segundo pico de elución del cromatograma de U1 indicó la correspondencia del carvacrol, el cual fue el componente activo de la formulación, lo anterior indicaría que este componente efectivamente se encuentra en la formulación, sin degradarse o perderse en el proceso de la preparación de la formulación.

La estabilidad de las formulaciones fue evaluada en diferentes instancias como: en diferentes tiempos, temperaturas, crema y coalescencia, al estrés mecánico y a ciclos térmicos. Las pruebas de estabilidad son la principal herramienta para evaluar la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento para productos farmacéuticos. Los estudios de estabilidad están vinculados al establecimiento y garantía de la seguridad, calidad y eficacia del medicamento desde la temprana fase de desarrollo a través del ciclo de vida del medicamento. El diseño de este estudio se debe realizar con el fin de obtener información sobre el comportamiento de las características físicas, químicas, microbiológicas y biofarmacéuticas de un medicamento durante el periodo de validez propuesto y en las condiciones de almacenamiento y en el envase en que se propone circular, o con el que circula en el mercado. Sus resultados permiten confirmar o establecer el periodo de validez y las condiciones de almacenamiento (Roger et al., 2012).

Se observó inestabilidad térmica en todas las formulaciones durante el tiempo de análisis (60 días) a excepción de F1 y su vehículo V1. Esta inestabilidad se pudo dar debido a la presencia de algún componente de la formulación. En la formulación F2 y su vehículo, la presencia de DMSO pudo haber afectado la estabilidad del mismo, tal como se menciona en (Kozikowski et al., 2003) donde los efectos de almacenamientos largos en DMSO conllevan a pérdidas de los compuestos de interés. Por su parte en la formulación G1 y vehículo VG1, se observó inestabilidad, esto pudo ocurrir por ser estas formulaciones acuosas susceptibles de contaminación por microorganismos (Lemmel, 2008) que pueden causar cambios en las formulaciones. La presencia de epazote en G1 podría estar relacionado con la inestabilidad térmica del mismo, ya que sus

cambios espectrales fueron más bruscos a todas las temperaturas de análisis respecto al de su vehículo VG1. La formulación U1 y su vehículo VU1, fueron inestables debido a los cambios de aspecto de las formulaciones ocasionados por las temperaturas (la cera y manteca de cacao pierden consistencia a altas temperaturas y ganan dureza con la disminución de las mismas), así como por la presencia del aceite coco el cual pudo presentar reacciones de deterioro típicas de los aceites tales como la oxidación (Elodio-Policarpo et al., 2019).

En cuanto a la prueba de crema y coalescencia respecto a las formulaciones tópicas U1, VU1, VG1 se evidenció de manera visual que estas mantuvieron sus características organolépticas durante todo el tiempo de análisis, esto pudo deberse por las condiciones de almacenamiento (27 °C), poca manipulación y poca exposición a la luz, que pudo haber desestabilizado componentes como el aceite de coco presentes en U1 y VU1. A nivel espectral se observaron cambios a partir de la 6 semana para las formulaciones (U1, VU1, VG1), con cambios más relevantes a partir de la 8 semana, respecto al % de Transmitancia y posición de las señales, esto indicaría a nivel molecular cambios o posibles reacciones entre sus componentes a partir de los 45 días de almacenamiento a 27 °C. En la formulación G1, se determinó que sus propiedades organolépticas cambiaron a partir de la 4 semana, donde se pudo observar la pérdida de extensibilidad (un gel no debe ser ni poco extensible (muy viscoso), ni demasiado extensible (muy fluido))(Roger et al., 2012), olor y color de la formulación. Esta al ser una formulación acuosa se vio alterado el control de microorganismos como se evidencio por la aparición de un hongo en el recipiente que contenía la formulación (Lemmel, 2008), mostrando así ninguna actividad biológica del epazote para el control de posibles microorganismos En cuanto a la caracterización espectral de G1 se observaron cambios bruscos a partir de la 2 semana, esto pudo ser ocasionado por la presencia o degradación del epazote, la aparición del hongo en la formulación e interacciones entre sus componentes.

Las formulaciones mostraron ser estables ante condiciones de estrés mecánico, esto fue indicativo de que las mismas pueden ser transportadas, almacenadas sin riesgo a la pérdida de su consistencia o la separación de sus componentes. Lo anterior, se debió a una buena integración de los componentes y la buena la afinidad entre los mismos que permitieron crear interacciones intermoleculares que se mantuvieron vigentes durante todo el tiempo de análisis como la formación de enlaces de hidrogeno. La densidad de los componentes usados en las formulaciones fue similar entre si y por ello este no fue un factor relevante para la separación de fases. En cuanto a la formulación F1 la separación pudo ocurrir por diferencia entre las densidades de sus

componentes y una mala integración entre los mismos, el componente activo  $\beta$ -C (apolar) pudo sedimentarse debido a una mala actividad del surfactante utilizado (kolliphor) que no permitió una buena integración con los demás componentes polares de la formulación como el PBS.

Finalmente, sobre la estabilidad al ciclo térmico, bajo las condiciones del experimento, en las formulaciones tipo F, la formulación F1, así como su vehículo V1 mostraron cambios a nivel espectral. Esto podría indicar algún tipo de inestabilidad en sus componentes, así como interacciones intermoleculares o degradación de estos. Parte de esta inestabilidad en F1 puede deberse a la presencia de  $\beta$ -C, se sabe que, debido a su relación estructural dentro de un mismo grupo químico, los componentes de los aceites esenciales se convierten fácilmente entre sí mediante reacciones de oxidación, isomerización, ciclación o deshidrogenación, desencadenadas ya sea enzimática o químicamente por factores como la temperatura (Turek & Stintzing, 2013). En general, en el monitoreo de extractos de plantas volátiles y la composición de aceites esenciales se ha demostrado que la estabilidad se pierde con un tiempo de almacenamiento prolongado, así como con un aumento de temperatura de 0 a 28 °C, 4 a 25 °C y 23 a 38 °C como fue el caso del experimento (Turek & Stintzing, 2013). La formulación F2 y su vehículo mostraron ser estables bajo las condiciones del experimento, al parecer bajo condiciones cortas de almacenamiento y cambios bruscos de temperatura el conjunto de DMSO y SS (componentes en mayor cantidad) lograron estabilizar las mismas. En las formulaciones tóxicas los vehículos VG1 y VU1 mostraron ser inestables frente a sus formulaciones G1 y U1 bajo las condiciones del experimento; esto indicaría que la presencia de los principios activos epazote y carvacrol mejoraban en conjunto con los demás componentes la estabilidad de las formulaciones, por ende, su ausencia pudo influir en su inestabilidad.

Sobre la actividad antileishmania *in vitro*, de los metabolitos secundarios analizados el carvacrol y  $\beta$ -C, mostraron actividad contra promastigotes de *L. (V.) braziliensis*. El carvacrol fue el compuesto más potente del grupo de metabolitos ensayados, dando los menores valores de  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  obtenidos. Además, los datos de actividad antileishmania (ensayo y replica) para este metabolito no muestran demasiada dispersión entre sí como los datos de los demás metabolitos ensayados; lo anterior indica que los ensayos con el carvacrol son reproducibles, también esta propiedad podría estar derivada de la estabilidad química acuñada al carvacrol (Du et al., 2008). Lo anterior es esperado, ya que se han reportado diferentes estudios que expone la potente actividad antileishmania de compuestos derivados terpénicos, o fenoles como el carvacrol, *p* -

cimeno, timol, carvona, limoneno y terpineno (Ezatpour et al., 2015) . Se sabe que los monoterpenos como el carvacrol causan daño estructural y funcional de la membrana celular. Al ser altamente lipofílicos, pueden ser fácilmente absorbidos por la membrana celular, provocando así la desestabilización de la bicapa de fosfolípidos, además pueden alterar la permeabilidad de las membranas mitocondriales externas e internas de las células eucariotas, lo que lleva a efectos apoptóticos. También pueden inhibir las enzimas involucradas en el metabolismo de los protozoos, como la enzima ubicua dihidrofolato reductasa (DHFR), que cataliza la reducción dependiente de NADPH de dihidrofolato a tetrahidrofolato, un precursor de los cofactores necesarios para la biosíntesis de purinas, dTTP y varios aminoácidos (Youssefi et al., 2019). Por su parte el mecanismo de acción del  $\beta$ -C se desconoce actualmente (Soares et al., 2013). Por otro lado, el  $\alpha$ -terpineno no mostró actividad frente a promastigotes de *L. (V.) braziliensis*, esto concuerda con resultados anteriores realizados en el grupo por (Herrera Laura, 2011) donde este metabolito no mostró actividad frente a *L.(V.) panamensis* a la máxima concentración evaluada . El extracto líquido acuoso de epazote tampoco mostró actividad frente a promastigotes de *L. (V.) braziliensis*, esto podría deberse a su presentación comercial, como un extracto acuoso, diluido en agua, cuyos componentes presentes podrían derivarse de cetonas, alcoholes responsables del color y olor de la planta, pero no precisamente de los terpenos de interés a los que se les cuñe su actividad biológica, encontrados en el respectivo aceite esencial de *C. ambrosioides* (Tituaña, 2013).

En cuanto a las formulaciones tipo F y sus vehículos, la formulación más activa contra promastigotes de *L. (V.) braziliensis* fue F1. Esta actividad se pudo deber a la presencia del  $\beta$ -C (compuesto activo) y al vehículo, conjunto de factores que actuaron de manera eficiente. El vehículo V1 mostró actividad contra *L. (V.) braziliensis*, aunque esta fue menor con respecto a la formulación F1. Lo anterior puso en evidencia que a pesar de que V1 no contenía el principio activo ( $\beta$ -C) el conjunto de todos sus componentes fue el adecuado y de esta manera estaría potenciando el efecto de la formulación. La actividad del vehículo puede deberse a la presencia del Kolliphor el cual es un solubilizante excepcional con atributos adecuados para formulaciones parenteral y oral de moléculas poco solubles (Karl Kolter, 2019). En el caso de F2, la cual también tiene como componente activo  $\beta$ -C no se observó actividad antileishmania en promastigotes, en este caso los componentes del vehículo (DMSO y SS) pudieron dificultar o perturbar la actividad del  $\beta$ -C. Ninguna de las formulaciones tipo G y U, así como sus vehículos mostraron actividad contra las formas promastigotes de *L. (V.) braziliensis*. Lo anterior es esperado para la formulación

tipo G y su vehículo, ya que como se indicó el principio activo de estas (epazote) por sí solo no mostró ninguna actividad. Por otra parte, el resultado para U1 es inesperado puesto que el principio activo que contenía fue el carvacrol (metabolito más activo de los probados), se cree que la poca concentración del metabolito en la formulación (3%) fue el causante de este resultado, así como los demás excipientes contenidos en la formulación, que pudieron perturbar la actividad del carvacrol.

En las células VERO y THP-1 el carvacrol y  $\beta$ -C mostraron ser los metabolitos secundarios más tóxicos de los ensayados y el epazote, lo anterior coincide con estudios realizados anteriormente donde se evidencian sus toxicidad (Herrera Laura, 2011). EL  $\alpha$ -terpineno mostró toxicidad en células VERO ( $CC_{50} \leq 200 \mu\text{g/mL}$ ) a pesar de que en pruebas anteriores realizadas por (Herrera Laura, 2011) solo ha tenido toxicidad en células THP-1. El epazote no presentó toxicidad en ninguna línea celular ensayada (valores  $>300 \mu\text{g/mL}$ ). En células VERO la F1 fue la formulación más toxica seguramente por la presencia de  $\beta$ -C tal como se evidencia al comparar su toxicidad con la de su vehículo V1. Caso contrario sucede en la línea celular THP-1, donde se evidencia mayor toxicidad para el vehículo que para la F1, seguramente por la presencia de Kolliphor. En las formulaciones F2, G1, U1 y sus vehículos se determinó baja o nula toxicidad (valores de  $CC_{50}$  y  $CC_{90}$  por encima de  $300 \mu\text{g/mL}$ ). La nula toxicidad del F2 pudo deberse a una estabilidad presentada por los compuestos que componen su vehículo, haciendo que la actividad del  $\beta$ -C disminuyera. En el caso de G1 y su vehículo concuerda respecto a la poca toxicidad que presentó en epazote (compuesto activo), mientras que en el caso del U1, su compuesto activo (carvacrol) presentó alta toxicidad, lo cual no se observó en U1, por ende, se cree que esto se pudo deber a la baja concentración utilizada del compuesto. En algunos casos los datos de réplica se diferencian con los datos del ensayo, esta dispersión se pudo dar por una inestabilidad causada por diferentes actividades biológicas al momento de la prueba.

Sobre la actividad antileishmania *in vivo*, de todos los grupos experimentales, sólo se evidenció reducción de tamaño de lesión durante todo el tratamiento para 2/3 ratones correspondientes a los tratados con F1 y de 1/2 ratones para los tratados con G1. Lo anterior es esperado para la formulación F1, como se observó en los ensayos de actividad antileishmania *in vitro* esta fue la formulación más activa. Este resultado *in vivo* puede deberse a la forma de aplicación de la formulación, al ser esta intralesional el  $\beta$ -C se pudo acceder directamente la capa de interés (dermis) donde se encuentran las formas amastigotes del parásito, evitándole de esta

forma pasos adicionales a la formulación como su penetración en la piel; lo anterior también demuestra que el vehículo usado para transportar el  $\beta$ -C fue el adecuado ya que no imposibilitó la entrega del principio activo en la zona de interés. La reducción ocasionada por el tratamiento con el gel G1 (conteniendo epazote) pudo deberse a la forma en la que administró la formulación, al ser este un gel, de fácil absorción y bien tolerada por los animales, contrario con lo obtenido *in vitro* (donde el epazote fue inactivo). En este caso de G1 se pudo observar que no siempre hay congruencia entre modelos, el epazote mostró actividad antileishmania *in vivo*, pero no *in vitro*. El resto de las formulaciones (F2, U1) no mostraron actividad antileishmania *in vivo*, esto pudo deberse a que en ambas formulaciones el vehículo no fue el adecuado para entregar el principio activo, pudiendo afectar su disolución, absorción y biodisponibilidad (Kalasz & Antal, 2006), en el caso de F2 al ser esta una solución pudo ocurrir posibles descomposiciones química o pérdida de potencia tal como menciona (Kalasz & Antal, 2006). En el caso de U1 factores como la pérdida de uniformidad de contenido o cambios de fármaco entrega (Kalasz & Antal, 2006).

Sobre los vehículos, se pudo evidenciar que ninguno presentó actividad antileishmania *in vivo*, esto se debe a que los excipientes usados en los vehículos se usaron con el fin de disolver, transportar, emulsionar y conservar la formulación (Robles, 2011), sin embargo, la ausencia de su principio activo ocasionara que no mostraran actividad, tal como se puede constatar con los resultados *in vitro*. Interesante, con respecto al VU, se pudo observar en el seguimiento fotográfico que el vehículo disminuyó el tamaño de la ulcera (más no del nódulo), esto indica que posiblemente posee propiedades cicatrizantes al ser este ungüento oclusivo, permitiendo la humectación de la ulcera y su posterior curación. Esto coincide con el hecho de que los ungüentos son recomendados para lesiones crónicas, con dermatosis localizadas, hiperqueratósicas y liquenificadas, ideal para ablandar escamas y costras (García et al., 2015)

En cuanto al análisis estadístico de los datos obtenidos para el tamaño de lesiones tratados con las formulaciones a 1, 5, 10, 17 dosis se observó que el tratamiento con F1 fue el más promisorio por mostrar el mayor % R de todos los tratamientos probados con un  $N \geq 2$  ratones (F1, V1, G1, U1). En el caso de tratamientos con un  $N = 1$  ratones (F2, VG1, VU1), todas las formulaciones aumentaron el tamaño de las lesiones respecto al control posiblemente debido a la variabilidad del modelo de infección usado (Neira et al., 2019). Por ende, se intuye que el tratamiento con la formulación F1 puede tenerse en cuenta para estudios posteriores, que involucren su estudio para el mejoramiento de sus propiedades.

Respecto a las características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c infectados con *L. (V.) braziliensis* después del tratamiento para cada una de las formulaciones, se observó presencia de amastigotes en la dermis, así como respuestas inflamatorias, esto concuerda con los resultados *in vivo* debido al aumento del tamaño de las lesiones y la no curación, indicativo de la poca efectividad de las formulaciones contra *L. (V.) braziliensis*, Además los patrones histopatológicos obtenidos fueron propios de la lesiones de *Leishmania* (Neira et al., 2019).

Sobre la irritación, los tratamientos con F1, V1, F3 vía intradérmica fueron irritantes. En el caso de F1 y F3 la irritación pudo ser ocasionada a partir de la 5 dosis por la presencia de  $\beta$ -C y el Kolliphor a dosis de 100  $\mu$ L de las formulaciones. La vía de administración también pudo haber influido en la respuesta obtenida. Esto concuerda con los datos *in vitro* de citotoxicidad para F1 con un CC<sub>50</sub> inferior a 3,0  $\mu$ g/mL, dicha característica toxica también fue obtenida en estudios previos en el laboratorio CINTROP (Neira Laura et al., 2018). La toxicidad del Kolliphor (Armacell, 2010) se pudo evidenciar en el tratamiento con V1 (20% Kolliphor, 80%PBS), el cual demostró irritación a partir de la 5 dosis. La composición de las formulaciones también influyo en la respuesta de irritación en los ratones, esto se evidenció en el tratamiento con V3, el cual poseía los mismos excipientes de V1 pero en diferente cantidad (15% Kolliphor, 80% PBS), el cual pudo ser determinante en la no irritación. Respecto a las características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c sanos después del tratamiento para cada una de las formulaciones, se observó presencia de infiltrado inflamatorio intenso en la dermis con distribución difusa en todas las formulaciones a excepción de la formulación V3 (focal), esto concuerda con lo observado en los ratones.

Contrariamente, los tratamientos con las formulaciones F1, G1, U1 y sus vehículos no presentaron signos de irritación al aplicarlos tópicamente. Esto principalmente se pudo deber a la forma de aplicación, que pudo impedir que se presentara este tipo de irritación, al ser mejor tolerada por la piel, lo cual pudo impedir la inflamación directa de la zona donde fueron aplicadas. Lo anterior fue indicativo de que las formulaciones probadas no generan radicales libres aplicadas por vía tópica lo cual impide el ataque a los fosfolípidos de las membranas de las células de la epidermis, imposibilitando la degeneración y pérdida de funcionalidad (Benaiges, 2010). Respecto a las características histopatológicas inducidas en epidermis y dermis de ratones BALB/c sanos después del tratamiento para cada una de las formulaciones, se observó presencia de infiltrado

inflamatorio leve para F1 y V1 en la dermis con distribución focal, esto demuestra que las formulaciones podrían causar algún tipo de irritación cutánea, pero bajo estas condiciones no causan irritación.

Finalmente, ninguna de las formulaciones indujo la fragmentación del ADN ni la formación de micronúcleos encontrándose sólo valores mínimos los cuales son considerados como basales (Neira et al., 2016)

## 6. Conclusiones

- No se pudo obtener el ascaridol por problemas en el desarrollo de la síntesis, como luz y eficiencia en la purificación.
- Los metabolitos secundarios y extracto de epazote se disolvieron en solventes de su misma naturaleza química.
- Se caracterizaron exitosamente los metabolitos secundarios mediante IR, UV-Vis, GC-MS. Las formulaciones y sus respectivos vehículos mostraron diferencias espectrales mediante IR, provenientes por la ausencia del componente activo en los últimos.
- La formulación F1 y su vehículo fueron estables térmicamente, el resto de las formulaciones no lo fueron.
- La formulación F2 y su vehículo fueron estables a cambios bruscos de temperatura en cortos tiempos (prueba de ciclo térmico), contrario a la F1 que fue inestable bajo estas condiciones.
- El carvacrol y  $\beta$ -C fueron los metabolitos con mayor actividad frente a *L. (V.) braziliensis*. Sin embargo, mostraron ser los metabolitos secundarios más tóxicos de los ensayados en células VERO y THP-1.
- El extracto líquido herbal de epazote y su formulación no mostraron actividad antileishmania
- La formulación F1 fue la más activa contra promastigotes de *L. (V.) braziliensis*. Sin embargo, la formulación F1 y su vehículo presentaron toxicidad en células VERO y THP-

1, el resto formulaciones y vehículos no mostraron actividad citotóxica en estas líneas celulares bajo las concentraciones ensayadas.

- El tratamiento con F1 y G1. mostró reducción de tamaño de lesiones
- El tratamiento con F1 fue el más promisorio por mostrar el mayor % R de todos los tratamientos probados con un  $N \geq 2$  ratones.
- Los tratamientos con F1, V1, F3 vía intradérmica fueron irritantes, sin embargo, no presentaron signos de irritación al ser evaluados tópicamente.
- Ninguna de las formulaciones indujo la fragmentación del ADN ni la formación de micronúcleos.
- Como trabajo futuro se sugiere un mayor estudio a la formulación F1, la cual fue la más prometedora de las formulaciones desarrolladas, realizando variaciones porcentuales en su composición que puedan potenciar el efecto del  $\beta$ -C. De igual modo en los ensayos *in vivo* se sugiere un aumento en el número de ratones tratados con esta formulación, que permitan ver un mejor comportamiento en cuanto a la disminución de las lesiones. Se sugiere iniciar el tratamiento en ratones cuyas lesiones tengan tamaños cercanos entre sí, con poca dispersión. Se sugiere el desarrollo de formulaciones que contengan carvacrol vía intralesional que busquen aprovechar la actividad antileishmania determinada *in vitro* para este metabolito.

## Referencias

- AEP. (2021). *Pentamidina (Isetionato de pentamidina)*. <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/pentamidina-isetionato-pentamidina>
- Agilent Technologies. (2006). *Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Data Sheet*. 1–2.
- Amato, V. S., Tuon, F. F., Bacha, H. A., Neto, V. A., & Nicodemo, A. C. (2008). Mucosal leishmaniasis: Current scenario and prospects for treatment. *Acta Tropica*, *105*(1), 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.003>
- Armacell. (2010). Ficha de datos de seguridad, Kolliphor. *Carl Roth*, *2*(1907), 2–7. [https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/pdfs/h96/hc3/9673630253086/EN\\_ST-WB-MSDS-2601489-1-1-1.PDF](https://hybris-static-assets-production.s3-eu-west-1.amazonaws.com/sys-master/pdfs/h96/hc3/9673630253086/EN_ST-WB-MSDS-2601489-1-1-1.PDF)
- Aros, J., Silva-Aguayo, G., Fischer, S., Figueroa, I., Rodríguez-Maciél, J. C., Lagunes-Tejeda, A., Castañeda-Ramírez, G. S., Aguilar-Marcelino, L., Aros, J., Silva-Aguayo, G., Fischer, S., Figueroa, I., Rodríguez-Maciél, J. C., Lagunes-Tejeda, A., Castañeda-Ramírez, G. S., & Aguilar-Marcelino, L. (2019). ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DEL PAICO *Chenopodium ambrosioides* L. SOBRE *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, *35*(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000504>
- Benaiges, A. (2010). La irritación cutánea y los activos antiirritantes. *Ámbito Farmacéutico*, 75–78. [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=12004011&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=4v20n04a12004011pdf001.pdf&ty=153&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=12004011&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v20n04a12004011pdf001.pdf&ty=153&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es)
- Bernal, H. Y., Garc, H., & Quevedo, F. (2011). Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia. En *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*.
- Bernal Juan, L. A. (2014). Flora silvestre medicinal utilizada por los Kofan colombianos en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea Wild medicinal plants used by Colombian Kofan Indians to treat cutaneous leishmaniasis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *19*(1), 407–420. <http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu408>

- Bezerra, D. P., Marinho Filho, J. D. B., Alves, A. P. N. N., Pessoa, C., de Moraes, M. O., Pessoa, O. D. L., Torres, M. C. M., Silveira, E. R., Viana, F. A., & Costa-Lotufo, L. V. (2009). Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. *Chemistry & Biodiversity*, 6(8), 1224–1231. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800253>
- Bio-Rad/Sadtler. (2022). *Infrared spectral*. Bio-Rad Laboratories
- Bogdanov, S., & Science, B. P. (2016). *Beeswax: Production, Properties, Composition, Control*. June.
- Boskabady, M. H., Jandaghi, P., Kiani, S., & Hasanzadeh, L. (2005). Antitussive effect of *Carum copticum* in guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(1), 79–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.016>
- C, B., Duarte, E., & Delgado, W. (2012). Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17, 54–64.
- Chaparro, J. V. (2015). *Aspectos claves: cómo leer la piel* (Corporación para Investigaciones Biológicas (ed.); 1ª ed.).
- Chávez, A. H. (2014). *Farmacología general una guía de estudio*. (McGRAW-HILL (ed.)).
- Chu, S. S., Feng Hu, J., & Liu, Z. L. (2011). Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Management Science*, 67(6), 714–718. <https://doi.org/10.1002/ps.2112>
- Conway, G. A., & Slocumb, J. C. (1979). Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(3), 241–261. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(79\)80014-8](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(79)80014-8)
- Davidson and Naidu. (2000). *Phyto-phenols* (Patent N° 9780367398453).
- De Oliveira, C. (2012). The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in immunology*, 3, 145. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00145>
- Du, W.-X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E., & Friedman, M. (2008). Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3082–3088. <https://doi.org/10.1021/jf703629s>
- Elodio-Policarpo, F., Peñalosa-Herrera, B., Maldonado-Astudillo, Y. I., Jimenez-Hernandez, J., Flores-Casamayor, V., Arámbula-Villa, G., & Salazar, R. (2019). Estabilidad térmica

- de aceite virgen de coco obtenido de dos cultivares crecidos en guerrero, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 42, 101–109.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802019000200101&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802019000200101&nrm=iso)
- Estrada, G. E., Castaño-piamba, D. S., Ramírez, K. J., Mvz, E., Alejandra, J., Quintero, R., Alejandro, L., & Montilla, G. (2012). *Study of the effectiveness of paico ( Chenopodium ambrosioides ) as an of the Amazonia University*. 7(2), 31–36.
- Ezatpour, B., Saedi Dezaki, E., Mahmoudvand, H., Azadpour, M., & Ezzatkhah, F. (2015). *In Vitro and In Vivo Antileishmanial Effects of Pistacia khinjuk against Leishmania tropica and Leishmania major. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 149707. <https://doi.org/10.1155/2015/149707>
- Franca, F., Lago, E. L., & Marsden, P. D. (1996). Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29(3), 229–232. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821996000300002>
- Francomano, F., Caruso, A., Barbarossa, A., Fazio, A., La Torre, C., Ceramella, J., Mallamaci, R., Saturnino, C., Iacopetta, D., & Sinicropi, M. (2019).  $\beta$ -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9. <https://doi.org/10.3390/app9245420>
- Gadano, A. B., Gurni, A. A., & Carballo, M. A. (2006). Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.043>
- Gadano, A., Gurni, A., López, P., Ferraro, G., & Carballo, M. (2002). In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00418-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00418-4)
- García, B., Roig, S., & Rebollar, C. (2015). Ungüentos, pomadas, cremas, geles y pastas. *Formación activa en pediatría de atención primaria*, 8(4), 3. [http://archivos.fapap.es/files/639-1294-RUTA/FAPAP\\_4\\_2015\\_Unguentos\\_pomadas.pdf](http://archivos.fapap.es/files/639-1294-RUTA/FAPAP_4_2015_Unguentos_pomadas.pdf)
- Geddo, F., Scandiffio, R., Antoniotti, S., Cottone, E., Querio, G., Maffei, M., Bovolin, P., & Gallo, M. (2019). PipeNig®-FL, a Fluid Extract of Black Pepper (*Piper Nigrum* L.) with a High Standardized Content of Trans- $\beta$ -Caryophyllene, Reduces Lipid Accumulation in 3T3-L1

- Preadipocytes and Improves Glucose Uptake in C2C12 Myotubes. *Nutrients*, 11, 2788. <https://doi.org/10.3390/nu11112788>
- Gemeda, N., Tadele, A., Lemma, H., Girma, B., Addis, G., Tesfaye, B., Abebe, A., Gemechu, W., Yirsaw, K., Teka, F., Haile, C., Amano, A., Woldkidan, S., Geleta, B., & Debella, A. (2018). Development, Characterization, and Evaluation of Novel Broad-Spectrum Antimicrobial Topical Formulations from *Cymbopogon martini* (Roxb.) W. Watson Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 9812093. <https://doi.org/10.1155/2018/9812093>
- Gómez Castellanos, J. R. (2008a). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 7(1), 3–9.
- Gómez Castellanos, J. R. (2008b). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(1), 3–9. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85670103>
- González Enseñat, M. A. (2015). Terapéutica tópica. *Protocolos de Dermatología. Protocolos de la AEP*, 333. <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/ttopica.pdf>
- Grill, F., & Zurmendi, M. (2017). Leishmaniasis visceral en Uruguay. *Archivos de PediatrÃ-a del Uruguay*, 88, 32–38. [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-12492017000100007&nrm=iso](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-12492017000100007&nrm=iso)
- Guimarães, A. G., Oliveira, M. A., Alves, R. D. S., Menezes, P. D. P., Serafini, M. R., De Souza Araújo, A. A., Bezerra, D. P., & Quintans, L. J. (2015). Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions*, 227, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.020>
- Hawaii Pharm. (2021). *Epazote Liquid Extract, Epazote (Chenopodium Ambrosioides) Dried Herb Tincture*. <https://www.hawaiipharm.com/epazote-alc-extract>
- Heeres, J., Meerpoel, L., & Lewi, P. (2010). Conazoles. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(6), 4129–4188. <https://doi.org/10.3390/molecules15064129>
- Herrera Laura. (2011). *Evaluación de actividad de componentes de aceites esenciales de plantas*

- Colombianas frente a Trypanosoma Cruzy y Leishmania spp* (UIS (ed.); UIS).  
<http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/tesis/2011/142262.pdf>
- Horace Finmore. (1927). *The essential oils* (E. Benn Limited (ed.)).
- INS. (2010). *Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Leishmaniasis*.  
<https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud Pública/Ola invernol/Clinica Leishmaniasis.pdf>
- INS. (2016). *Informe del evento leishmaniasis, hasta el periodo epidemiológico xiii, colombia, 2016*.
- INS. (2018). *Leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral*. [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS\\_2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS_2018.pdf)
- INS. (2019). *Boletín epidemiológico semanal/ semana 41/ Leishmaniasis*.  
[https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019\\_Boletin\\_epidemiologico\\_semana\\_41.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_41.pdf)
- Isaza-Jaimes, A., Rodríguez, J. E., Chacón, G., Bravo, A., & Silva Sarabia, C. (2018). A vision about American leishmaniasis and its epidemiological behavior. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 37(3), 190–196.
- Jaramillo, & Alexander, pulgarin J. (2021). Tratamientos tópicos para la leishmaniasis cutánea : una revisión narrativa , con búsqueda sistemática de la bibliografía Topical Treatments for Cutaneous Leishmaniasis : A Narrative Review , with Systematic Literature Search. *Universidad de zulia*, 49(2), 1–9. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5090568>
- Jaramillo C, B. E., Duarte R, E., & Delgado, W. (2012). Bioactivity of essential oil from Colombian Chenopodium ambrosioides. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 54–64.
- Jonette E. Keri, M. (2021). *Tratamiento de los trastornos cutáneos*.  
<https://www.msdmanuals.com/es-co/hogar/trastornos-de-la-piel/tratamiento-de-los-trastornos-cutáneos/tratamiento-de-los-trastornos-cutáneos>
- Kalasz, H., & Antal, I. (2006). Drug Excipients. *Current Medicinal Chemistry*, 13(21), 2535–2563.  
<https://doi.org/10.2174/092986706778201648>
- Karl Kolter. (2019). *Kolliphor® HS 15 - An Enabler for Parenteral and Oral Formulations*.  
<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/358749-Kolliphor-HS-15-An-Enabler-for-Parenteral-and-Oral-Formulations/>

- Kaškonienė, V., Venskutonis, R., & Čeksteryte, V. (2008). Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania. *Food Chemistry*, *111*, 988–997. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.021>
- Kim, Y. D., & Morr, C. V. (1996). Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Spray-Dried Orange Oil Emulsion Particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(5), 1314–1320. <https://doi.org/10.1021/jf9503927>
- Kiuchi, F., Itano, Y., Uchiyama, N., Honda, G., Tsubouchi, A., Nakajima-Shimada, J., & Aoki, T. (2002). Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Natural Products*, *65*(4), 509–512. <https://doi.org/10.1021/np010445g>
- Kozikowski, B. A., Burt, T. M., Tirey, D. A., Williams, L. E., Kuzmak, B. R., Stanton, D. T., Morand, K. L., & Nelson, S. L. (2003). The effect of room-temperature storage on the stability of compounds in DMSO. *Journal of Biomolecular Screening*, *8*(2), 205–209. <https://doi.org/10.1177/1087057103252617>
- Kuete, V. (2014). *Physical, ematological, and Histopathological Signs of Toxicity Induced by African Medicinal Plants* (V. B. T.-T. S. of A. M. P. Kuete (ed.); pp. 635–657). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00022-4>
- Lemmel, J. (2008). Conservantes. Tipos y sistemas de conservación. *Offarm*, *27*(1), 58–64. [file:///0212047X/0000002700000001/v0\\_201305160954/13114932/v0\\_201305160955/es/main.assets ER](file:///0212047X/0000002700000001/v0_201305160954/13114932/v0_201305160955/es/main.assets ER)
- Lezama-Dávila, C. M., McChesney, J. D., Bastos, J. K., Miranda, M. A., Tiozzi, R. F., Da Costa, J. D. C., Bentley, M. V., Gaitan-Puch, S. E., & Isaac-Márquez, A. P. (2016). A new antileishmanial preparation of combined solamargine and solasonine heals cutaneous leishmaniasis through different immunochemical pathways. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(5), 2732–2738. <https://doi.org/10.1128/AAC.02804-15>
- López G., Díaz R., C. C. (2001). *Fundamentos de farmacología para enfermería*. Universidad Nacional de Colombia.
- López, L., Robayo, M., Vargas, M., & Vélez, I. D. (2012). Thermoherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trials*, *13*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-13-58>
- López, L., Vélez, I., Asela, C., Cruz, C., Alves, F., Robledo, S., & Arana, B. (2018). A phase II

- study to evaluate the safety and efficacy of topical 3% amphotericin B cream (Anfoleish) for the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in Colombia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), e0006653. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006653>
- Lude, A. (2019). *Efectividad antiparasitaria ( Chenopodium) gastrointestinal en ovinos ( Ovis aries ) PIURA – PERÚ. January 2017*, 2–45. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34005.27366>
- Machado, P. R., Ampuero, J., Guimarães, L. H., Villasboas, L., Rocha, A. T., Schriefer, A., Sousa, R. S., Talhari, A., Penna, G., & Carvalho, E. M. (2010). Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), e912. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000912>
- Machado, P. R. L., Ribeiro, C. S., França-Costa, J., Dourado, M. E. F., Trinconi, C. T., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Malta-Santos, H., Borges, V. M., Carvalho, E. M., & Uliana, S. R. B. (2018). Tamoxifen and meglumine antimoniate combined therapy in cutaneous leishmaniasis patients: a randomised trial. *Tropical Medicine & International Health*, 23(9), 936–942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tmi.13119>
- Mohamadi Alasti, F., Asefi, N., Maleki, R., & SeiedlouHeris, S. S. (2019). Investigating the flavor compounds in the cocoa powder production process. *Food Science & Nutrition*, 7(12), 3892–3901. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.1244>
- Monge-Maillo, B., & López-Vélez, R. (2013). Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*, 73(17), 1889–1920. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0132-1>
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., GarcÃ-a, M., & Fonseca, L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64, 108–131. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602012000200002&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602012000200002&nrm=iso)
- Montoya, A., Daza, A., Muñoz, D., Ríos, K., Taylor, V., Cedeño, D., Vélez, I. D., Echeverri, F., & Robledo, S. M. (2015). Development of a novel formulation with hypericin to treat cutaneous leishmaniasis based on photodynamic therapy in in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5804–5813. <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-15>

- Monzote, L., García, M., Pastor, J., Gil, L., Scull, R., Maes, L., Cos, P., & Gille, L. (2014). Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. *Experimental Parasitology*, *136*, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.10.007>
- Monzote, L., Montalvo, A. M., Almanonni, S., Scull, R., Miranda, M., & Abreu, J. (2006). Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*, *52*(3), 130–136. <https://doi.org/10.1159/000092858>
- Monzote, L., Stamberg, W., Staniek, K., & Gille, L. (2009). Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *240*(3), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.001>
- Morrison, B., Mendoza, I., Delgado, D., Reyes Jaimes, O., Aranzazu, N., & Paniz Mondolfi, A. E. (2010). Diffuse (anergic) cutaneous leishmaniasis responding to amphotericin B. *Clinical and Experimental Dermatology*, *35*(4), e116-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03737.x>
- Moses S Owolabi. (2009). *Natural Product Communications Volatile Constituents and Antibacterial Screening of the*. 6–9.
- Motta, J. O. C., & Sampaio, R. N. R. (2012). A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, *26*(3), 331–335. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04070.x>
- Muñoz, B., Mantilla, J., & Escobar, P. (2019). Therapeutic response and safety of the topical, sequential use of antiseptic, keratolytic, and pentamidine creams (3-PACK) on *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*-infected mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *114*. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180535>
- Neira, L. F., Peñalva, D. P., Vera, A. M., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2019). Leishmaniasis cutánea inducida por especies de leishmanial *Viannia* en ratones BALB/c y eficacia de un tratamiento tópico. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, *51*, 33–42. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-08072019000100033&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072019000100033&nrm=iso)
- Neira Laura, J. C., Stashenko, E., & Escobar, P. (2018). Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-

- Leishmania de aceites esenciales obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del género *Lippia*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 17(1), 68–83.
- Neves, L. O., Talhari, A. C., Gadelha, E. P. N., Silva Júnior, R. M. da, Guerra, J. A. de O., Ferreira, L. C. de L., & Talhari, S. (2011). A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(6), 1092–1101. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962011000600005>
- NIST. (2022). *NIST*. <https://webbook.nist.gov/>
- Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V, Marzochi, M. C., & Andrade, C. A. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118(2), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>
- OMS. (2022). *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- OPS. (2013). *Leishmaniasis en las americas, recomendaciones para el tratamiento*.
- OPS. (2018). *Manual de diagnostico y tratamiento de las Leishmaniasis*. [www.paho.org](http://www.paho.org)
- OPS. (2022). *Leishmaniasis*. <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
- Oryan, A. (2015). Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16(1), 1–19. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27175144>
- Ososki, A. L., Lohr, P., Reiff, M., Balick, M. J., Kronenberg, F., Fugh-Berman, A., & O'Connor, B. (2002). Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 285–298. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00376-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00376-2)
- Parihar, S. P., Hartley, M.-A., Hurdayal, R., Guler, R., & Brombacher, F. (2016). Topical Simvastatin as Host-Directed Therapy against Severity of Cutaneous Leishmaniasis in Mice. *Scientific Reports*, 6(1), 33458. <https://doi.org/10.1038/srep33458>
- Parnis, J. M., & Oldham, K. (2013). Beyond the Beer–Lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 267, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2013.06.006>
- PHAO-WHO. (2015). *Leishmaniasis in the Americas: Treatment Recommendations*. [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/7704/9789275117521\\_eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/7704/9789275117521_eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y)

- Puma, R. Y. (2019). Extracción y Caracterización de Aceite Esencial de Paico (chenopodium ambrosioides) Mediante Arrastre de Vapor. *Tesis*, 94.
- Rajput, J. D., Bagul, S. D., & Bendre, R. S. (2017). Synthesis, biological activities and molecular docking simulation of hydrazone scaffolds of carvacrol, thymol and eugenol. *Research on Chemical Intermediates*, 43(11), 6601–6616. <https://doi.org/10.1007/s11164-017-3007-3>
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 7(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Robles, L. V. (2011). Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 42(1), 18–36.
- Roger, D. M. S., Perdomo, Y. R., Bueno, T. P., Alemán, Y. R., & Lacarrere, I. G. M. (2012). Estabilidad en anaquel de un gel de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) para heridas y quemaduras. *Revista Cubana de Farmacia*, 46(4), 446–456.
- Rudbäck, J., Bergström, M. A., Börje, A., Nilsson, U., & Karlberg, A.-T. (2012).  $\alpha$ -Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure. *Chemical Research in Toxicology*, 25(3), 713–721. <https://doi.org/10.1021/tx200486f>
- Rueda Paez, Y., Santos Chacon, M., Mantilla Ojeda, D., Pinilla Plata, A., Díaz Peñuela, M. A., Vera Arias, A. M., Carreño Garcia, H., Mantilla Hernández, J. C., & Escobar Rivero, P. (2018). Transferosomas conteniendo ftalocianina de aluminio clorada como alternativa terapéutica en leishmaniasis cutánea: permeabilidad y biodistribución en ratas Wistar TT - Transferosomes loaded with chloroaluminum phthalocyanine as cutaneous leishmaniasis th. *Salud UNINORTE*, 34(2), 363–373. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&amp%0Apid=S0120-55522018000200363](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&amp%0Apid=S0120-55522018000200363)
- Ruffa, M. J., Ferraro, G., Wagner, M. L., Calcagno, M. L., Campos, R. H., & Cavallaro, L. (2002). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 335–339. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00400-7](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00400-7)
- Saenz, R. E., Paz, H., & Berman, J. D. (1990). Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Medicine*, 89(2), 147–155. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(90\)90292-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(90)90292-1)

- Salgado-Almario, J., Hernández, C. A., & Ovalle, C. E. (2019). Distribución geográfica de las especies de Leishmania en Colombia, 1985-2017. *Biomédica*, 39(2), 278–290. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312>
- Sandra Lawton. (2019). Structure and Functions of the Skin. *The American Journal of the Medical Sciences*, 115(12). <https://doi.org/10.1097/00000441-183411000-00032>
- Santizo Rodas, I. M. (2004). *Identificación de familias de metabolitos secundarios en Myrica cerifera*. 12.
- Scorza, B. M., Carvalho, E. M., & Wilson, M. E. (2017). Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>
- Shen, T., Zhu, Q.-X., Yang, S., Wu, C.-H., Zhang, H.-F., Zhou, C.-F., & Zhang, X.-J. (2008). Trichloroethylene induced cutaneous irritation in BALB/c hairless mice: histopathological changes and oxidative damage. *Toxicology*, 248(2–3), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.03.016>
- Soares, D. C., Portella, N. A., Ramos, M. F. de S., Siani, A. C., & Saraiva, E. M. (2013). Trans- $\beta$ -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2013, 761323. <https://doi.org/10.1155/2013/761323>
- Sosa, N., Pascale, J. M., Jiménez, A. I., Norwood, J. A., Kreishman-Detrick, M., Weina, P. J., Lawrence, K., McCarthy, W. F., Adams, R. C., Scott, C., Ransom, J., Tang, D., & Grogil, M. (2019). Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007253. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007253>
- Sowemimo, A. A., Fakoya, F. A., Awopetu, I., Omobuwajo, O. R., & Adesanya, S. A. (2007). Toxicity and mutagenic activity of some selected Nigerian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.024>
- Spickler, A. R. (2017). Leishmaniasis (Cutaneous and Visceral). *Iowa State University*, 1–11. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf>
- Stachenko, E. (2009). *Aceites esenciales*.
- Tamez-Fernández, J. F., Melchor-Martínez, E. M., Ibarra-Rivera, T. R., & Rivas-Galindo, V. M. (2020). Plant-derived endoperoxides: structure, occurrence, and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), 827–864. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09687-4>

- Tituaña, G. (2013). Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la asociación flor de campo en la estancia y mushukwiñary en Tambalo de Pasa para promover su desarrollo. *Universidad tecnica de Ambato*, 15–17.
- Torres, M. C. M., Assunção, J. C., Santiago, G. M. P., Andrade-Neto, M., Silveira, E. R., Costa-Lotufo, L. V., Bezerra, D. P., Marinho Filho, J. D. B., Viana, F. A., & Pessoa, O. D. L. (2008). Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. *Chemistry & Biodiversity*, 5(12), 2724–2728. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890227>
- Trujillo-C., W., & Correa-Múnera, M. (2010). Plants used by a Coreguaje indigenous community in the Colombian Amazon. *Plantas Usadas Por Una Comunidad Indígena Coreguaje En La Amazonía Colombiana*, 32(1), 1–20.
- Turek, C., & Stintzing, F. (2013). Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- UE. (2020). *Reglamento de Ejecución (UE) 2020/160 de la Comisión de 5 de febrero de 2020 relativo a la autorización de un preparado de aceite de orégano, aceite de alcaravea, carvacrol, salicilato de metilo y L-mentol como aditivo en piensos para lechones destetados*. <https://op.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/fd3446af1-4955-11ea-b81b-01aa75ed71a1>
- Vakil, N. H., Fujinami, N., & Shah, P. J. (2015). Pharmacotherapy for leishmaniasis in the United States: Focus on miltefosine. *Pharmacotherapy*, 35(5), 536–545. <https://doi.org/10.1002/phar.1585>
- Vélez, I., López, L., Sánchez, X., Mestra, L., Rojas, C., & Rodríguez, E. (2010). Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 351–356. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0060>
- Vera-Izaguirre, D. S., Vega-Memije, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Arenas, R. (2006). Leishmaniasis. Revisión. *Dermatologia Cosmetica, Medica y Quirurgica*, 4(4), 252–260.
- Vera, A. M., Casadiego, O. A., Mantilla, J. C., & Escobar, P. (2018). Evaluación de formulaciones de ketoconazol para uso tópico en leishmaniasis cutánea por *Leishmania* (Viannia). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(3), 476. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3531>
- Yang, G., Wu, P., Zhou, Z., He, X., Meng, W., & Zhang, Z.-B. (2012). Direct Hydration of  $\beta$ -

- Caryophyllene. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51, 15864–15871.  
<https://doi.org/10.1021/ie301294f>
- Youssefi, M. R., Moghaddas, E., Tabari, M. A., Moghadamnia, A. A., Hosseini, S. M., Farash, B. R. H., Ebrahimi, M. A., Mousavi, N. N., Fata, A., Maggi, F., Petrelli, R., Dall'Acqua, S., Benelli, G., & Sut, S. (2019). In Vitro and In Vivo Effectiveness of Carvacrol, Thymol and Linalool against *Leishmania infantum*. *Molecules*, 24(11).  
<https://doi.org/10.3390/molecules24112072>
- Zavala, R., Herrera, J., Lara, A. S., & Garzón, D. L. (2017). Evaluación de la toxicidad aguda de un extracto alcohólico de hojas de epazote (*Chenopodium ambrosioides*). *Spei Domus*, 12(24). <https://doi.org/10.16925/sp.v12i24.1890>
- Zhou, B., Tan, M., Lu, J.-F., Zhao, J., Xie, A.-F., & Li, S.-P. (2012). Simultaneous determination of five active compounds in *chimonanthus nitens* by double-development HPTLC and scanning densitometry. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-46>
- Zhu, W. X., Zhao, K., Chu, S. S., & Liu, Z. L. (2012). Evaluation of essential oil and its three main active ingredients of Chinese *chenopodium ambrosioides* (family: *Chenopodiaceae*) against *blattella germanica*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 6(2), 90–97.