

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD DE COMPONENTES DE ACEITES
ESENCIALES DE PLANTAS COLOMBIANAS FRENTE A *Trypanosoma cruzi*
Y *Leishmania spp***

LAURA VIVIANA HERRERA SANDOVAL

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2011

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD DE COMPONENTES DE ACEITES
ESENCIALES DE PLANTAS COLOMBIANAS FRENTE A *Trypanosoma cruzi*
Y *Leishmania spp***

LAURA VIVIANA HERRERA SANDOVAL

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
MAGISTER EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS

Directora

PATRICIA ESCOBAR,
Bacterióloga, M.Sc., Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2011

DEDICATORIA

“Si tu oído inclinas hacia la sabiduría y de corazón te entregas a la inteligencia; si llamas a la inteligencia y pides discernimiento; si la buscas como a la plata, como a un tesoro escondido, entonces comprenderas el temor del señor y hallaras el conocimiento de Dios. Porque el señor da la sabiduría; conocimiento y ciencia brotan de sus labios”

Proverbios 2:2-6

A Dios, que todo lo puede.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Patricia Escobar por su inmensa colaboración, orientación, apoyo y sobretodo paciencia en todo mi proceso de formación y desarrollo de este trabajo.

A la Dra Elena Stashenko y a su grupo de trabajo de CENIVAM: Camilo, Deyanira y William por la información y el soporte técnico brindado.

A COLCIENCIAS por la financiación de este trabajo a través del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM (CO No 432-Colciencias).

A los compañeros del laboratorio de Quimioterapia especialmente a Sandra Leal por su apoyo técnico y científico.

A todas las personas: familiares, amigos, compañeros y docentes que de una u otra forma han contribuido en la ejecución de este trabajo.

RESUMEN

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD DE COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS COLOMBIANAS FRENTE A *Trypanosoma cruzi* Y *Leishmania spp*

AUTORES: HERRERA SANDOVAL, Laura Viviana*; ESCOBAR RIVERO, Patricia**

PALABRAS CLAVE: *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, componentes, aceites esenciales.

La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis constituyen un problema de salud pública en los países endémicos. Los tratamientos disponibles son reducidos por tanto la búsqueda de nuevos medicamentos es perentoria. Los aceites esenciales (AE) y/o sus componentes podrían constituir una opción interesante de tratamiento.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antiparasitaria y citotóxica *In vitro* de componentes de AE obtenidos de plantas colombianas frente a *T. cruzi* y especies de *Leishmania*. Los componentes fueron seleccionados a partir de AE activos contra parásitos. Se evaluó la actividad en células de mamífero y antiparasitaria y los resultados fueron expresados en concentraciones inhibitorias (CI₅₀ y CI₉₀) y citotóxicas (CC₅₀ y CC₉₀). En las células Vero los componentes α -pineno, linalool, citral, R-carvona, carvacrol y timol mostraron toxicidad con CC₅₀ entre 2,22 y 37,22 μ g/mL. El *trans*- β -cariofileno mostró toxicidad con actividad de CC₅₀: 17,77 y CC₉₀: 26,11 μ g/mL. Mientras que en células THP-1, citral y eugenol fueron tóxicos con CC₅₀ de 2,94 y 49,97 μ g/mL.

En *T. cruzi*, el α -pineno, carvacrol, timol y *trans*- β -cariofileno mostraron actividades de CI₅₀ entre 0,34 y 2,90 μ g/mL. El α -pineno, S-carvona, y timol presentaron actividades selectivas entre 1,92 y 3,16 μ g/mL en amastigotes intracelulares. El *trans*- β -cariofileno fue el más activo en amastigotes (CI₅₀: 25,13 y CI₉₀: 71,07 μ g/mL).

En *Leishmania*, geranial, carvacrol, *trans*- β -cariofileno y eugenol mostraron actividades selectivas entre 12,74 a 38,5 μ g/mL en promastigotes y el *trans*- β -cariofileno fue parcialmente activo en amastigotes intracelulares de *L. chagasi* y *L. panamensis*.

Los resultados encontrados mostraron la actividad de algunos componentes de AE. Esta actividad estuvo relacionada con la del AE principalmente en α -pineno, carvacrol, timol y *trans*- β -cariofileno. Por las características de actividad en las formas parasitarias de los compuestos anteriores (exceptuando el timol), estos podrían continuar hacia nuevas etapas del descubrimiento de medicamentos contra estas parasitosis.

* Tesis de grado. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

** Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. PhD Director de tesis

ABSTRACT

ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS OBTAINED FROM COLOMBIAN PLANTAS AGAINST *Trypanosoma cruzi* AND *Leishmania* spp.

Authors: HERRERA SANDOVAL, Laura Viviana*; ESCOBAR RIVERO, Patricia**

KEYWORDS: *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, components, essential oils.

The Chagas diseases and the leishmaniasis are problem of public health in the endemic countries. The treatments available are reduced and the research of new medicines is fixed. The essential oils (EO) and/or their components could be an interesting option of treatment.

The aim of this work was to determine *in vitro* antiparasitic and cytotoxic activity of components of EO obtained from Colombian plants in *T. cruzi* and species of *Leishmania*. The components were selected from active EO against parasites. The activity in cells of mammal was evaluated and antiparasitic and the results were expressed in inhibitory concentrations (IC₅₀ and ₉₀) and cytotoxic (CC₅₀ and ₉₀).

In Vero cells the components α -pinene, linalool, citral, R- carvone, carvacrol and thymol showed CC₅₀ between 2.22 and 37, 22 μ g/mL. *trans*- β -caryophyllene showed toxicity with CC₅₀: 17,77 and CC₉₀: 26,11 μ g/mL. In THP-1 cells, citral and eugenol was toxicity with CC₅₀ between 2, 94 and 49,97 μ g/mL

In *T. cruzi*, α -pinene, carvacrol thymol and *trans*- β -cariofileno showed activities of CI₅₀ between 0.34 and 2.90 μ g/mL. The α -pinene, s-carvone and thymol presented intracellular partial and selective activities between 1.92 and 3.16 μ g/mL in amastigotes. *trans*- β -caryophyllene was most active in amastigotes (CI₅₀: 25,13 and CI₉₀: 71,07 μ g/mL) nevertheless this activity was not selective

In *Leishmania*, geranial, carvacrol *trans*- β -caryophyllene and eugenol showed partial activities between 12.74 to 38.5 μ g/mL in promastigotes and *trans*- β - caryophyllene was partially active in amastigotes intracellular of *L. chagasi* and *L. panamensis* with IS de 3, 44 and 4.54 respectively.

The found results demonstrated that the activity of the AE not always directly was related to its majority component and that the minority component even showed better effect than the active AE that contained them. By the characteristics of activity in the parasitic forms of *T. cruzi* and low citotoxicidad of the α -pineno, carvacrol and *trans*- β -cariofileno, one becomes necessary to continue the related studies.

* Thesis of grade of Master in Basic Biomedical Science

** Faculty of Health, Master in Basic Biomedical Science, Thesis director.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
2 JUSTIFICACIÓN.....	22
3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
4. MARCO TEÓRICO	25
4.1 Enfermedad de Chagas.....	25
4.1.1 Generalidades.....	25
4.1.2 El Parásito	27
4.1.3 El Tratamiento	27
4.2 LEISHMANIASIS	30
4.2.1 Generalidades.....	30
4.2.2 El parásito	32
4.2.3 Tratamiento.....	33
4.3 ACEITES ESENCIALES (AE) Y SUS COMPONENTES	38
4.3.1 Generalidades.....	38
4.3.2 Composición química.....	38
4.3.3 Actividad biológica	42
5. ESTADO DEL ARTE	44
6. OBJETIVOS.....	47
6.1 Objetivo General	47
6.2 Objetivos Específicos	47
7. METODOLOGÍA.....	48

7.1	Diseño metodológico	48
7.2	Aceites esenciales (AE).....	48
7.2.1	Obtención, caracterización y composición	48
7.2.2	Selección de los AE	49
7.3	Componentes principales de los AE utilizados	55
7.4	Medicamentos de referencia.....	59
7.5	Preparación de soluciones stock y de trabajo.....	59
7.6	Parásitos y células de mamífero	59
7.7	Ensayo de toxicidad en células de mamífero.....	60
7.8	Ensayos de actividad en <i>T. cruzi</i>	60
7.8.1	Actividad en formas extracelulares	60
7.8.2	Actividad en amastigotes intracelulares.....	61
7.9	Ensayos de actividad en <i>Leishmania</i>	61
7.9.1	Actividad en formas extracelulares	61
7.9.2	Actividad en amastigotes intracelulares.....	61
7.10	Análisis de resultados	62
8.	RESULTADOS	72
8.1	Resultados en la selección de componentes y AE	72
8.2	Actividad de los componentes en células de mamífero	74
8.3	Actividad en <i>T. cruzi</i>	76
8.3.1	Actividad de los componentes	76
8.3.2	Actividad de los componentes con respecto al Nifurtimox	76
8.3.3	Actividad de los componentes en <i>T. cruzi</i> versus células Vero.....	77
8.4	Actividad en <i>Leishmania</i>	79

8.4.1	Actividad de los componentes	79
8.4.2	Actividad del medicamento de referencia	79
8.4.3	Relación de la actividad en <i>Leishmania</i> versus células THP-1	80
8.5	Comparación de actividad de componentes en <i>T. cruzi</i> y <i>L. chagasi</i>	83
8.6	Relación de la actividad del componente versus el AE que lo contienen: Índice de actividad (IA)	83
8.7	Análisis quimio-informático de los componentes activos	89
9.	DISCUSIÓN	91
10.	CONCLUSIONES	98
11.	BIBLIOGRAFÍA	101

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Formas parasitarias del género <i>Trypanosoma</i>	28
Figura 2. Ciclo de vida del <i>Trypanosoma Cruzi</i>	30
Figura 3. Ciclo de vida del género <i>Leishmania</i>	35
Figura 4. Ejemplos de estructuras químicas de componentes aromáticos de aceites esenciales	40
Figura 5. Ejemplos de estructuras químicas de terpenos de AE	41
Figura 6: Ejemplos de estructuras químicas de sesquiterpenos de AE	41
Figura 7. Diseño metodológico aplicado en la primera fase del estudio	50
Figura 8. Diseño metodológico aplicado en la segunda fase del estudio	51
Figura 9. Cantidad relativa de los componentes seleccionados de aceites esenciales del género <i>Lippia</i>	73
Figura 10. Cantidad relativa de los componentes seleccionados de aceites esenciales del género <i>Piper</i>	74

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Clasificación taxonómica del genero <i>Leishmania</i>	34
Tabla 2. Estudios de actividad de AE y sus componentes mayoritarios frente a especies de <i>Leishmania</i> y <i>T. cruzi</i>	46
Tabla 3. Número de AE según su actividad antiparasitaria	49
Tabla 4. Familias más frecuentes de AE activos en <i>T. cruzi</i> y <i>L. chagasi</i>	52
Tabla 5. Géneros de aceites esenciales activos en <i>T. cruzi</i> y <i>L. chagasi</i>	52
Tabla 6. Identificación de AE de plantas aromáticas seleccionados en el estudio y activos en <i>T. cruzi</i> y <i>L. chagasi</i>	54
Tabla 7. Características químicas de componentes de aceites esenciales activos seleccionados	56
Tabla 8. Criterios de clasificación de la actividad <i>In vitro</i> de los compuestos	63
Tabla 9. Composición Química de AE del Género Lippia	64
Tabla 10. Composición Química de AE del Género Tagetes	66
Tabla 11. Composición Química de AE del Género Piper	68
Tabla 12. Actividad de componentes en Células de Mamífero	75
Tabla 13. Actividad de Componentes en T. Cruzi	78

Tabla 14. Actividad de Componentes en <i>L. chagasi</i>	81
Tabla 15. Actividad de Componentes en <i>L. Panamensis</i>	82
Tabla 16. Índices de Actividad de Apineno	85
Tabla 17. Índices de Actividad de Carvacrol	86
Tabla 18. Índices de Actividad de Timol	87
Tabla 19. Índices de actividad de Trans- β -cariofileno	88
Tabla 20. Predicción del riesgo de Toxicidad de Componentes Estudiados	90
Tabla 21. Análisis de actividad biológica de componentes de aceites esenciales evaluados en el presente estudio	100

LISTA DE ABREVIACIONES

AE	Aceites esenciales
AmB	Anfotericina B
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CC ₉₀	Concentración citotóxica 90
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CI ₉₀	Concentración inhibitoria 90
CENIVAM	Centro nacional de investigaciones para la agroindustrialización de especies vegetales aromáticas medicinales tropicales
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
IA	Índice de actividad
IS	Índice de selectividad
LC	Leishmaniasis cutánea
LV	Leishmaniasis visceral
MTT	(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-difeniltetrazolio)
NC	No calculado
ND	No determinado
NFX	Nifurtimox
NT	No tóxico
PBS	Buffer fosfato salino
PMA	Forbol miristato acetato

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis son enfermedades tropicales distribuidas en cerca de 91 países de América, África y Asia. Actualmente debido al aumento en la prevalencia, áreas endémicas y población en riesgo estas entidades son clasificadas como enfermedades emergentes constituyendo un problema de salud pública grave en los países que las padecen (Desjeux, 2004; OMS, 2006; CDC, 2010 (b); OMS, 2010; Schumnis et al, 2010; Urbina, 2010).

Es crítico el número reducido de medicamentos disponibles y su utilización está asociada a esquemas de tratamiento inadecuados con vías de administración invasivas, tiempos prolongados de terapia, efectos colaterales y variabilidad de la eficacia. Por otra parte los medicamentos propuestos como alternos son costosos, poco accesibles y también presentan toxicidad. El avance en la búsqueda de otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de estas enfermedades ha sido limitado entre otras causas por la falta de selectividad en el efecto tóxico de los compuestos hallados activos, sumado al desinterés de la industria farmacéutica por los altos costos que generan los procesos de descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos (Croft et al, 2006; Modabber et al, 2007). La búsqueda de sustancias con efecto selectivo frente a los parásitos de interés y que puedan avanzar en el desarrollo de medicamentos es prioritario.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer la actividad *in vitro* frente a *T. cruzi* y *L. chagasi* de algunos componentes presentes en AE activos, como una posible fuente de compuestos promisorios que continúen en los estudios posteriores en el descubrimiento de un fármaco.

La propuesta desarrollada en este trabajo de investigación tiene como antecedente un estudio previo realizado en el laboratorio de Quimioterapia del CINTROP-UIS bajo el marco del proyecto del CENIVAM en donde se evaluó la

actividad de más de 170 AE obtenidos de especies de plantas aromáticas colombianas y se encontró que varios de estos aceites fueron activos contra los parásitos.

Este trabajo muestra inicialmente una revisión teórica y crítica de la literatura donde se describen aspectos generales de las características de los parásitos, las formas clínicas de las enfermedades, los aspectos relevantes de los AE y concluye con la actividad biológica de los AE y su efecto en los parásitos de interés. Por ejemplo ha sido demostrado por diferentes autores que AE obtenidos de plantas como *Chenopodium ambrosioides*, *Origanum vulgare*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris*, *Croton cajucara*, *Copaifera reticulata*, *Achilleum millefolium* y *Lippia sidoides*, y algunos componentes tales como linalol, eugenol, timol, limoneno y α -bisabolol tienen efecto selectivo en *T. cruzi* y especies de *Leishmania* (Kiuchi et al, 2002; Rosa et al, 2003; Rocha et al, 2005; Ueda Nakamura et al, 2006; Monzote et al, 2006; Santoro et al, 2007; Santos et al, 2008; Arruda et al, 2009).

El diseño metodológico se dividió en dos fases. Inicialmente se analizaron los resultados previos de actividad y la composición química de los AE que fueron activos en los parásitos de interés. Se escogieron 12 componentes y a este grupo se adicionaron cinco componentes los cuales estaban disponibles y habían presentado según referencias bibliográficas actividad contra estos parásitos. En una segunda fase la actividad de los compuestos fue evaluada contra las formas libres e intracelulares de los parásitos y contra las líneas celulares Vero y THP-1. En el documento se muestran algunas características químicas de los componentes estudiados y en gráficas de dispersión las cantidades relativas de los componentes en los AE. La actividad biológica fue expresada en CC_{50} y CC_{90} y CI_{50} y CI_{90} para células y parásitos respectivamente. Como indicadores de actividad selectiva en los parásitos se calcularon los Índices de Selectividad (IS), definidos como el cociente entre la actividad del compuestos en las células y la

actividad en los parásitos. Con el fin de comparar la actividad del componente con la del AE que lo contiene, se calculó el Índice de Actividad (IA), definido como el cociente de la actividad del AE en los parásitos y la actividad del componente en las células. Se clasificaron los componentes según criterios de actividad y se realizaron pruebas estadísticas para establecer las diferencias significativas de actividad de los mismos respecto a: tipo de compuestos, tipo de parásitos y forma de vida (libre o intracelular), tipo de células y medicamento de referencia, los valores de $p < 0.05$ fueron determinados como significativos. Los resultados mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar obtenidas de dos ensayos independientes donde cada una de las concentraciones fue evaluada por triplicado ($n=6$).

Los resultados se presentaron en diferentes tablas teniendo en cuenta la actividad de cada componente y de los medicamentos de referencia. Se muestra la actividad en células Vero, en células THP-1, en *T. cruzi* (epimastigotes y amastigotes intracelulares), en *L. chagasi* (promastigotes y amastigotes intracelulares) y en *L. panamensis* (amastigotes intracelulares). Cada tabla muestra el IS de cada compuesto. Igualmente se presentan los IA de los componentes más activos con respecto a los AE que los contenían. Como dato adicional se presentan los resultados del análisis quimioinformático realizado a los componentes activos.

Los resultados encontrados en el presente estudio constituyen un importante aporte en la búsqueda de sustancias naturales activas frente a microorganismos asociados a enfermedades tropicales y podrá usarse como base de estudios complementarios.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis y la enfermedad de Chagas son enfermedades parasitarias consideradas como un problema grave de salud pública en los países afectados (OMS, 2006; OMS 2010; Schumis et al, 2010). En Colombia se encuentran distribuidas en todo el territorio y actualmente presentan aumento en la incidencia y situaciones de brotes (Diaz et al, 2007; INS 2010 (a); INS 2010 (b)). No existe una vacuna y las estrategias de prevención y control están enfocadas en la eliminación de la transmisión vectorial y transfusional, en el diagnóstico oportuno y el acceso y acompañamiento apropiado en el tratamiento, siendo este el punto más crítico por su costo-efectividad (Desjeux P, 2004; Ghul F, 2007; OMS, 2010).

Los medicamentos de primera línea para estas enfermedades están asociados a esquemas inadecuados. Las vías de administración son invasivas, los tiempos de terapia prolongados, los pacientes experimentan efectos secundarios y existe variabilidad en la eficacia de acuerdo a las formas clínicas y fases de la enfermedad (Jannin et al, 2007; Davies et al, 2010). Así mismo los medicamentos alternos son costosos, poco accesibles y presentan toxicidad. El avance en la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos ha sido limitado por el poco número de compuestos con actividad selectiva frente a estos parásitos que alcanzan los ensayos clínicos, sumado al desinterés de la industria farmacéutica por los altos costos que generan los procesos de descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos (Croft et al, 2005; Croft et al, 2006; OMS, 2006; Modabber et al, 2007; OMS 2010).

Las plantas y sus productos representan una amplia fuente de compuestos con actividad biológica. Desde hace siglos son usados empíricamente en el tratamiento de diversas patologías infecciosas y varias décadas atrás se estudia sobre bases científicas su amplio poder antimicrobiano. Las investigaciones han demostrado que productos naturales entre ellos algunos AE tienen efecto frente a

especies de *Leishmania* y *T. cruzi* (Rosa et al, 2003; Anthony et al, 2005; Ueda Nakamura 2006; Monzote et al, 2007; Santoro et al, 2007(a); Santoro et al 2007 (b); Santos et al, 2008, Medeiros et al, 2011; Escobar et al, 2009; Escobar et al ,2010). Sin embargo, por ser los AE mezclas complejas de un número variable de componentes químicos, la actividad de estos últimos no siempre ha sido determinada, aún cuando es un paso indispensable para avanzar exitosamente en el desarrollo de fármacos (Cos et al, 2006). Algunos estudios indican que determinados componentes de los AE, por ser sustancias puras, podrían presentar incluso mayor actividad que el AE y por ende ser compuestos líderes en la investigación farmacológica (Bakkali et al, 2008).

A pesar de la gran biodiversidad de plantas en nuestro país existen pocos estudios que demuestren la actividad antiparasitaria de AE (Escobar et al, 2009; Escobar et al, 2010). En el laboratorio de Quimioterapia del CINTROP-UIS se ha evaluado el efecto de 171 AE contra *Leishmania* y *T. cruzi* encontrándose que aproximadamente 35% fueron activos contra los parásitos y presentaban baja toxicidad en células de mamífero. Sin embargo, el efecto de los componentes presentes en los AE activos contra los parásitos de interés no había sido determinado.

2. JUSTIFICACION

Actualmente, la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas son consideradas enfermedades emergentes y reemergentes que cuentan con pocas opciones farmacológicas y con esquemas inadecuados de tratamiento. Lo anterior sumado a los fenómenos sociales y económicos afecta el acceso al diagnóstico y atención médica de la población infectada. Frente a este panorama es apremiante la búsqueda y descubrimiento de nuevos compuestos promisorios que puedan avanzar en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de estas parasitosis (Croft et al, 2005).

Siendo los productos naturales una opción en las investigaciones farmacológicas, resulta importante profundizar en la actividad de los AE y sus componentes. Entre otras razones por la biodiversidad de plantas de las que se pueden obtener con cerca de 25 mil especies a nivel mundial, por la inagotable fuente de compuestos químicos que representan conteniendo cada AE un sin número de componentes incluyendo sustancias no caracterizadas y exclusivas de un género o especie y por las funciones que cumplen en la naturaleza en la protección de las plantas como antivirales, antifúngicos, insecticidas entre otros (Anthony et al, 2005; Bakali et al, 2008). Las investigaciones previas realizadas en el laboratorio del Quimioterapia del CINTROP-UIS han demostrado el efecto contra parásitos de AE de plantas cultivadas en territorio colombiano. Estos antecedentes hacen necesario establecer la actividad de los componentes frente a los parásitos de interés, la toxicidad en las células de mamífero y su posible relación con la acción del AE total.

Con estos estudios será posible progresar en la búsqueda de sustancias líderes y contribuir en la consolidación de las investigaciones del grupo en el área de compuestos naturales. Así mismo el descubrimiento de este tipo de sustancias con actividad selectiva solventaría en parte el desinterés de la industria

farmacéutica por encontrar alternativas para la quimioterapia y tendría un impacto a largo plazo en las estrategias para controlar la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas (Croft et al, 2005; Urbina J, 2005; Modabber et al 2007; Janin et al, 2007).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACION

La pregunta que se quiso responder en el presente trabajo fue ¿Cuál es la actividad frente a especies de *Leishmania* y *T. cruzi* de componentes de AE activos contra los parásitos?

4. MARCO TEORICO

4.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS

4.1.1 Generalidades. La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una parasitosis enzoótica crónica causada por el *T. cruzi*, un protozoo flagelado perteneciente a la familia Trypanosomatidae (Tabla 1). El agente etiológico y su vector fueron descritos por primera vez por Carlos Chagas en 1909 en Minas Gerais, Brasil. Es una enfermedad transmitida por vectores adquirida por contacto con las heces fecales del triatomino infectado principalmente cuando este se alimenta del humano o de reservorios. Los vectores son insectos hematófagos (Hemiptera: Reduviidae) de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* principalmente. Existen rutas alternas de transmisión tales como la vía oral, la transfusional, a través de trasplantes de órganos y congénitamente. Igualmente por las migraciones internacionales donde la enfermedad ha sido transportada principalmente a Estados Unidos y Europa. Tan sólo en Estados Unidos han sido reportados 300.000 inmigrantes seropositivos (Diaz et al, 2007; Schumis et al, 2010; Coura et al, 2010).

Sus reservorios lo constituyen cerca de 24 familias de animales domésticos y silvestres. Existen tres ciclos de transmisión: i. El doméstico que se presenta en áreas rurales o periurbanas y principalmente donde los reservorios son los humanos, perros y otros animales peridomésticos y los principales vectores son *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*; ii. El peridoméstico que se presenta por el ingreso ocasional de vectores selváticos que son atraídos por la luz y el alimento a las viviendas y por la presencia de mamíferos como roedores, marsupiales y perros que son reservorios; y iii. El selvático que implica la infección natural de las casi 180 especies de mamíferos terrestres y arbóreos a

través de especies de triatomíneos selváticos que transmiten el *T. cruzi* a estos huéspedes vertebrado (Díaz et al, 2007).

Se estima que existen en el mundo entre 8 a 11 millones de personas infectadas y está presente en 22 países. Sin embargo por la presencia de especies del vector se considera que la enfermedad de Chagas es autóctona y endémica en América desde México hasta Argentina. Es considerada en nuestro continente la enfermedad olvidada más prevalente asociada con la pobreza (CDC, 2010 (b); Schumnis et al, 2010; Urbina, 2010). Avances significativos en el control vectorial y transfusional como resultado de la iniciativa de los Países Andinos y del Cono Sur, han llevado a disminución en la prevalencia desde 18 hasta 10 millones de personas entre 1990 y el 2006, así como la población en riesgo de 100 a 40 millones (Schofield et al, 2006). Al año se presentan cerca de 500.000 casos nuevos de infección (CDC, 2010 (b); Schumnis et al, 2010; Urbina, 2010).

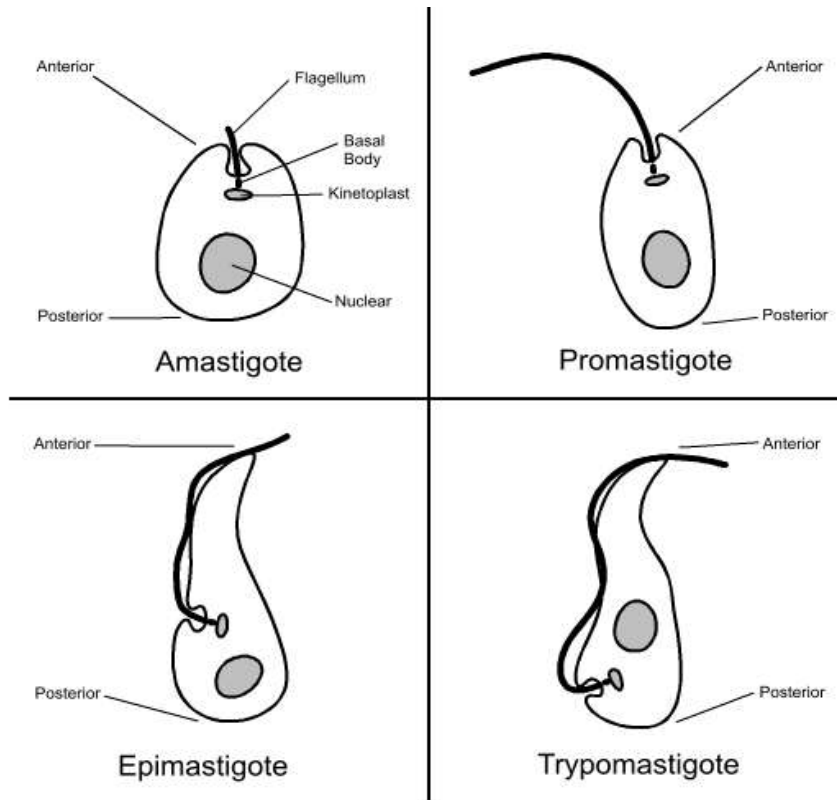
En Colombia representa un problema de salud pública, se estima que su prevalencia es del 5% de la población y que cerca de 3,5 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad por transmisión vectorial (Guhl et al, 2005). Las zonas de mayor riesgo de transmisión en nuestro país han sido identificadas en los departamentos de Arauca, Casanare, Norte de Santander, Santander y Boyacá en orden de importancia. En Colombia el curso de la enfermedad de Chagas ha cambiado su comportamiento epidemiológico pues además de los casos en las zonas endémicas durante los dos últimos años cerca de cinco situaciones de brotes han sido reportadas en departamentos como Antioquia, Santander y Cesar (INS, 2010 (b)).

La patogénesis se desarrolla en dos fases consecutivas: aguda y crónica. La primera fase dura de seis a ocho semanas es de resolución rápida y posterior a ella no hay afecciones orgánicas detectables. Generalmente ocurre en niños y en jóvenes. En algunos casos se presenta el chagoma en el sitio de la infección pero

algunas cepas pueden ser agresivas produciendo la muerte principalmente por cardiomiopatías (Díaz et al, 2007; Texeira et al, 2007; Develoux et al, 2009). La fase crónica presenta una fase indeterminada donde no se presentan síntomas y puede durar muchos años. Sin embargo 10 a 40% de los infectados padecen manifestaciones clínicas relacionadas con lesiones en el corazón (cardiopatía chagásica crónica) así como en el aparato digestivo (megaesófago y megacolon). En quienes desarrollan esta forma crónica el pronóstico depende de la sintomatología, el compromiso orgánico y la edad del paciente. Si es tratada a tiempo puede evolucionar favorablemente (Díaz et al, 2007; Develoux et al, 2009; Coura et al, 2010; Schumis et al, 2010).

4.1.2 El parásito. El parásito presenta diversas formas durante su ciclo de vida (Figura 1). *i.* El amastigote forma aflagelada que mide entre 2-4 μm . Se divide por fisión binaria e infecta las células de los vertebrados y se obtiene de cultivos en líneas celulares o en los tejidos del huésped; *ii.* El epimastigote que es alargado con longitud de 20 a 40 μm . Tiene un kinetoplasto anterior al núcleo y obtiene en cultivos axénicos y en el intestino del vector; *iii.* El tripomastigote que es una forma móvil y alargada, mide 25 μm de largo y 2 μm de diámetro y tiene el kinetoplasto posterior al núcleo. Se obtiene en las células infectadas de los tejidos y sangre de los mamíferos infectados, en el intestino posterior, heces y orina del vector y en cultivos axénicos (De Souza, 2002; Texeira et al, 2006; Develoux et al, 2009).

Figura 1. Formas parasitarias del género *Trypanosoma*



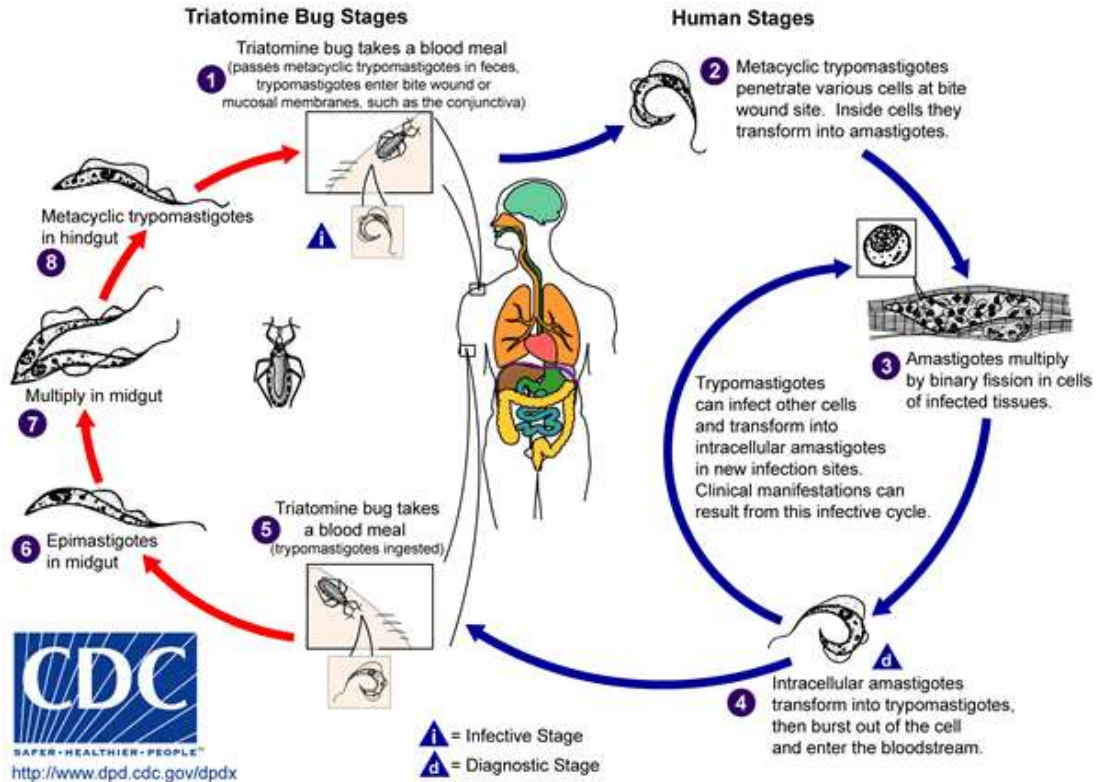
Se observan las formas parasitarias del género *Trypanosoma*: Amastigote, promastigote, epimastigote, tripomastigote. Fuente: Miles, Michael W.; Ian, Maudlin; Holmes, Peter (2004). *The Trypanosomiasis*. Wallingford, UK: CABI Publishing. ISBN 0-85199-475-X

El ciclo de vida del parásito inicia cuando el vector se alimenta de la sangre de un huésped vertebrado infectado e ingiere los tripomastigotes del parásito presentes en la sangre. En el estómago del insecto los parásitos se transforman en epimastigotes y algunas formas esféricas no específicas que se dividen sucesivamente por fisión binaria y se anclan a las células intestinales por hemidesmosomas. En el recto del vector los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos que son las formas infectantes para el vertebrado (De Souza et al, 2002; Texeira et al, 2006; Develoux et al, 2009). Cuando el vector infectado se alimenta de un nuevo huésped los tripomastigotes salen a través de las heces o la orina y pueden penetrar a los tejidos del huésped por el mismo

orificio de la picadura, por escoriaciones en la piel o incluso por mucosas intactas como la conjuntiva. Cuando invaden las células, se transforman en amastigotes inmóviles, que se dividen por fisión binaria hasta que se transforman en tripomastigotes que son liberados al espacio extracelular para alcanzar circulación e invadir tejidos y órganos como corazón, sistema retículo endotelial y plexos del sistema nervioso autónomo (De Souza et al, 2002; Develoux et al, 2009).

4.1.3 Tratamiento. A pesar del gran avance en el conocimiento de la biología de *T. cruzi*, los medicamentos actualmente usados y disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son dos: el Nifurtimox (4[(5-Nitrofurfurilideno) amino]-3-metiltioformaline-1,1-dioxide) derivado del nitrofurano y el benznidazol (*N*-Benzil-2-Nitromidazol-1-acetamida) derivado del nitromidazol. Estos medicamentos han sido desarrollados e introducidos en el mercado desde hace más de 21 años. Son efectivos en la fase aguda de la enfermedad con tasas de curación superiores al 80% pero con eficacia limitada en estados crónicos de la misma; aunque actualmente el benznidazol ha mostrado efectividad en fases crónicas tempranas (Croft et al, 2005). Los esquemas de tratamiento existentes son prolongados, de 10 días para la profilaxis, 60 y 90 días para la fase aguda y hasta cinco meses para las reactivaciones de la fase crónica. Están asociados con efectos adversos severos y toxicidad sistémica que llevan en numerosos casos a la interrupción y abandono del tratamiento. El benznidazol constituye casi siempre la primera opción de tratamiento con relación al Nifurtimox, por ser el mejor tolerado, aunque puede variar de un individuo a otro, constituyéndose un medicamento en la alternativa del otro. En la actualidad existen algunos compuestos como los derivados de triazoles que avanzan hacia los ensayos clínicos y otros como los inhibidores de la cruzipaina que se encuentran en fase de estudios preclínicos (Croft et al, 2005; Maya et al, 2007; Janin et al, 2007).

Figura 2. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* en el humano



1. El triatomino deja en las heces los tripomastigotes metacíclicos, que ingresan a través de las membranas mucosas del humano. 2. Los tripomastigotes penetran las células, en las que se transforman en amastigotes. 3. Los parásitos intracelulares se multiplican por fisión binaria en diversos tejidos. 4. Los amastigotes intracelulares se transforman nuevamente en tripomastigotes que finalmente ingresan a la circulación sanguínea. 5. Estas formas son ingeridas por un nuevo triatomino que se alimenta de sangre del humano infectado. 6, 7 y 8. Los tripomastigotes sufren una serie de transformaciones en el vector hasta llegar nuevamente a tripomastigotes metacíclicos. Fuente: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

4.2 LEISHMANIASIS

4.2.1 Generalidades. La leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania* y transmitidas a los mamíferos por insectos dípteros hematófagos pertenecientes a los géneros *Lutzomyia* (Lu) en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. Tienen

como reservorio animales vertebrados domésticos y silvestres incluidos el hombre. Es considerada como una de las principales enfermedades olvidadas por las limitaciones y pocos avances investigativos en el diagnóstico, tratamiento y control, además por estar asociada con la pobreza. Es transmitida al humano a través de ciclos selváticos, peridomésticos y domésticos (Diaz et al, 2007; CDC, 2010).

La leishmaniasis está ampliamente distribuida en 91 países de áreas tropicales y subtropicales en el mundo, 72 de ellos en vía de desarrollo en América, África y Asia. La forma más frecuente es la leishmaniasis cutánea (LC) que se presenta en 65 países, siendo Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria los que aportan el 90% de los casos. La leishmaniasis visceral (LV) es menos frecuente y cerca del 90% de los casos ocurren en Bangladesh, Nepal, India, Sudan y Brasil (Desjeux, 2004; OMS, 2010). La incidencia mundial se considera de 2 millones de casos nuevos al año, sin embargo este pudiera ser un valor estimativo dado que en 50 de los 91 países afectados aún no es una enfermedad de notificación obligatoria. Actualmente existen 14 millones de personas infectadas y en riesgo de adquirirla cerca de 350 millones, por lo que es considerada un problema de salud pública (Desjeux, 2004; OMS, 2006; OMS, 2010;). En América Latina, el panorama es similar, a partir de los década de los 90 se presenta un aumento en el número de casos por lo que son consideradas enfermedades de impacto (Davies et al, 2010). La incidencia para el año 2006 fue de 62.000 casos para LC (OPS, 2007). En Colombia es una enfermedad endémica en casi todos los departamentos exceptuando San Andrés Islas, Atlántico y Bogotá DC. Se presentan las tres formas clínicas con predominio (95%) de la LC. Se estima que cerca de 10 millones de personas están en riesgo de adquirirla. Durante los últimos años se ha presentado un aumento progresivo en el número de casos, la incidencia se estima entre 10.000 a 12.000 casos por año (INS 2009; INS, 2010).

De acuerdo a la especie de *Leishmania* involucrada, al huésped y la respuesta inmune del mismo las infecciones causadas por este género tienen diversas formas clínicas (Croft et al, 2002; De Souza et al 2002; Díaz et al, 2007;). La LC en el Nuevo Mundo es causada por especies de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*. Las lesiones se inician como nódulos pequeños indoloros que crecen de tamaño y se ulceran por la necrosis, presentando costras, bordes levantados pero de fondo limpio, sin presencia de dolor. Los parásitos pueden causar linfadenopatías regionales y en ocasiones las lesiones pueden sobre infectarse con bacterias. La evolución es crónica y en algunas ocasiones las úlceras curan espontáneamente; sin embargo, para todos los casos es común la cicatriz en bulbo de cebolla (Desjeux, 2004; Diaz et al, 2007; Sharlow et al, 2010). La leishmaniasis mucocutánea (LMC) es causada por especies del subgénero *Viannia*, siendo las de mayor prevalencia *L. panamensis* y *L. braziliensis*. Las lesiones inician en piel y después de varios años hacen metástasis a las mucosas tales como el tabique nasal, cavidad oral, principalmente paladar blando y úvula, laringe y faringe. Las lesiones inicialmente se presentan con enrojecimiento y congestión de la mucosa y posteriormente se forman lesiones granulosa que confluyen y se ulceran (Díaz et al, 2007; Sharlow et al, 2010). La LV es la forma más severa y a diferencia de las anteriores su curso es fatal si no se trata. Las especies que la causan son *L. infantum* y *L. donovani*. Los parásitos se diseminan afectando los órganos hematopoyéticos tales como hígado, bazo y médula ósea. Se caracteriza por fiebres intermitentes, malestar general, pérdida de peso, hepato y esplenomegalia y en algunos casos linfadenopatías y palidez de las mucosas (Desjeux, 2004; Diaz et al, 2007; Sharlow et al, 2010).

4.2.2 El parásito. La infección es causada por cerca de 21 especies de *Leishmania* (familia Trypanosomatidae). Según los patrones de migración electroforética el género ha sido clasificado en dos subgéneros cada uno de ellos en complejos y estos a su vez incluyen las especies (Tabla 1).

Durante su ciclo de vida tienen dos formas de desarrollo. Los amastigotes tienen forma ovoide, miden entre 3 a 5 μm de diámetro y tienen el kinetoplasto adyacente al núcleo. Se reproducen por fisión binaria en el interior de los macrófagos del hospedero vertebrado. Los promastigotes son fusiformes de hasta 20 μm de longitud, poseen un flagelo que emerge de la parte anterior de su cuerpo, son extracelulares y se multiplican por fisión binaria (Diaz et al, 2007; CDC, 2010).

El ciclo de vida del parásito inicia cuando los mosquitos se alimentan de sangre de humanos o reservorios e inyectan a través de la proboscis la forma infectante (promastigotes) en la microcirculación del huésped. Estas formas son fagocitadas por células fagocíticas mononucleares, macrófagos y linfocitos presentes en la dermis del huésped. En el interior de las células los promastigotes se convierten en formas amastigotes intracelulares y se dividen por fisión binaria en el fagolisosoma hasta lisarlo. Los amastigotes libres invaden otros macrófagos y se diseminan por vía linfática y sanguínea. Cuando un vector pica a un reservorio infectado e ingiere la sangre con los amastigotes, algunos de ellos se transforman en promastigotes y se dividen en el intestino del vector. Después de 4 a 5 días migran al intestino medio del mosquito y se convierten en promastigotes metacíclicos que son las formas infectivas para los mamíferos. Finalmente después de siete días se desplazan a la proboscis del insecto transformándose en promastigotes esféricos y cortos, que son inoculados en un nuevo huésped cuando el mosquito se alimenta de nuevo (Figura 3).

4.2.3 Tratamiento. A pesar de la gran diversidad de especies de la *Leishmania*, la susceptibilidad del hospedero y las variadas formas clínicas de la enfermedad, los medicamentos para tratar la leishmaniasis son los mismos en todos los casos. Estos tratamientos buscan la curación clínica de las lesiones y la eliminación de los parásitos en los tejidos del huésped (Desjeux, 2004; Goto et al, 2010). La primera línea de tratamiento para todas las formas clínicas son los antimoniales

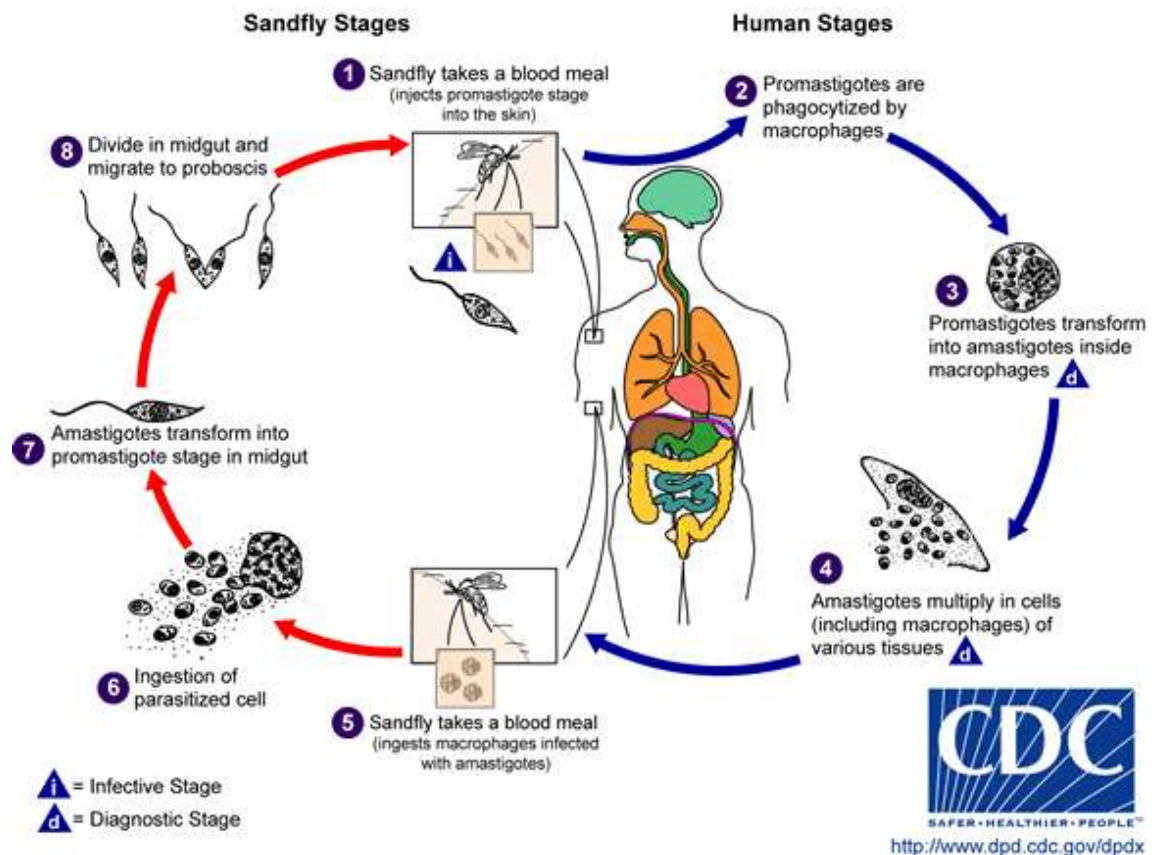
pentavalentes (Sb^V) tales como el antimoniato de meglumina (Glucantime ®) para administración intramuscular, que se comercializa en países de habla hispana o francesa y el estibogluconato de sodio (Pentostam ®) para administración endovenosa e intramuscular, que se comercializa en países de influencia inglesa. El mecanismo de acción de estas sustancias aún no ha sido esclarecido totalmente, se conoce que afecta la síntesis de ATP, probablemente bloqueando la oxidación de la glucosa y los ácidos grasos (Croft, 2006 et al; Palumbo, 2009;). La efectividad varía según la región geográfica y la forma clínica. Sin embargo para estos medicamentos se aceptan tasas de curación superiores al 80% en el caso de la LC (Diaz et al, 2007).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Leishmania*

Reino:	Protista	(Haeckel,1866)		
Subreino:	Protozoa	(Goldfuss, 1817)		
Tipo:	Sarcomastigophora	(Honigberg, Balamuth,1963)		
Subtipo:	Mastigophora	(Deising,1886)		
Clase:	Zoomastigophora	(Calkins, 1909)		
Orden:	Kinetoplastida	(Honigberg,1963)		
Suborden:	Trypanosomatina	(Kent, 1880)		
Familia:	Trypanosomatidae	(Doflein, 1901)		
Género:	<i>Leishmania</i>	(Ross, 1903)		
Subgéneros:	<i>Leishmania</i>	<i>Viannia</i>		
Complejos/especies: (nuevo mundo):	Complejo <i>donovani</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> (<i>chagasi</i>)	Complejo <i>braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. peruviana</i>
	Complejo <i>mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i>	Complejo <i>guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i>
Complejos/especies: (Viejo mundo)	<i>L. tropica, L. major, L. aethiopica.</i>			

Fuente: Tabla modificada de Diaz et al, 2007

Figura 3. Ciclo de vida del género *Leishmania*



1. El vector inocula los promastigotes al huésped humano. 2. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos. 3. Los promastigotes se transforman amastigotes intracelulares. 4. Los amastigotes se multiplican en las células y les causan lisis. 5. Un nuevo vector toma sangre de un huésped infectado. 6. Los vectores ingieren los amastigotes. 7. Los amastigotes se transforman en promastigotes en el vector. 8. Los promastigotes se dividen y migran a la probosis para ser inoculados en un nuevo huésped.

Fuente: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

Como segunda opción de tratamiento en casos de efectos tóxicos graves o de resistencia a los Sb^V se encuentra la pentamidina, análogo derivado aromático de diamidina. Su mecanismo de acción no es claro aún, sin embargo, los estudios han demostrado que altera la síntesis del ADN del parásito, afecta el kinetoplasto, promueve la fragmentación de la membrana mitocondrial causando la muerte al parásito (Tuón et al, 2008). Algunos estudios realizados en Colombia han demostrado tasas de curación mayores al 96% con bajas dosis, cursos cortos de

administración y efectos adversos similares a los Sb^V (Palumbo, 2009; Mitropoulos et al, 2010).

La Anfotericina B (AmB) libre o liposomal ha sido utilizada en el tratamiento de LC y LV. Actúa sobre el ergosterol presente en la membrana de los parásitos (Ellis et al, 2005). Está indicada principalmente en casos refractarios a los Sb^V. Sin embargo por su nefrotoxicidad debe ser administrado lentamente y con precaución. Existen disponibles varias formulaciones tales como: deoxicolato de AmB, AmB liposomal, AmB en colesterol. Sustancias con actividades farmacológicas conocidas para otros microorganismos son evaluadas frente a *Leishmania* con resultados contradictorios que dependen algunas veces de la especie de *Leishmania* involucrada (Palumbo, 2009; Mitropoulos et al, 2010).

La paramomicina (PM) o aminosidine es un medicamento usado como antiparasitario oral y como agente tópico en LC. Actualmente es usada para tratar tópicamente la LC en el Viejo Mundo y la LV causada por *L. donovani*. En América ha sido evaluada en formulaciones tópicas de PM al 15% mezclada con 12% de metilbenzetonio. A pesar de los hallazgos contradictorios, ensayos clínicos Fase II están en curso (Mitropoulos et al, 2010).

La miltefosina es un análogo de la fosfocolina y es utilizada en cáncer. Es activa contra especies de *Leishmania* afectando probablemente la señalización celular y la síntesis de la membrana (Croft et al, 1987; Kuhlencord et al, 1992). Estudios han demostrado su utilidad en el tratamiento de LV, principalmente en India, siendo administrada por vía oral y mostrando tasas de curación superiores al 95% (Sundar et al, 2006). En Bolivia y Colombia han presentado tasas de curación hasta el 88% en LC producida por *L. braziliensis* y *L. panamensis* (Soto et al, 2004). Se han reportado efectos adversos tales como cefalea, malestar intestinal y aumento de las enzimas hepáticas y teratogenicidad (Palumbo et al, 2009; Gotto et al, 2010; Mitropoulos et al, 2010).

Los imidazoles y triazoles: tales como el ketoconazol, fluconazol e itraconazol han demostrado efectividad. La ventaja es su administración oral y que sus efectos adversos son menores que el Sb^V. La desventaja es que su actividad depende de la especie de *Leishmania* involucrada. El ketoconazol ha mostrado tasas de curación de 30% en pacientes infectados con *L. braziliensis*, 89% con *L. mexicana* y 76% con *L. panamensis* (Saenz et al, 1990; Navin et al, 1992). El fluconazol ha presentado tasas de curación hasta el 59% en pacientes infectados *L. major* con efectos secundarios similares a los Sb^V (Palumbo, 2009).

El allopurinol es un medicamento utilizado para el tratamiento de la gota. Es capaz de inhibir el crecimiento de *Leishmania*. Actúa inhibiendo la síntesis de *de novo* de las pirimidinas afectando la síntesis de proteínas (Mitropoulos et al, 2010). Combinaciones del allopurinol con Sb^V es más efectiva para el tratamiento de la LC que el Sb^V solo, por eso se recomienda su utilización en terapias combinadas en LC en el Nuevo Mundo

Sustancias como la imiquidona, rifampicina, isoniacida, dapsona, cloroquina, ciclosporina, interferon recombinante y Nifurtimox han sido evaluados frente a especies de *Leishmania*, sin embargo, los estudios aún no han sido concluyentes (Velez et al, 1997; Palumbo, 2009).

Las terapias tópicas no farmacológicas constituyen una alternativa para el tratamiento de la LC. Como principales opciones se incluye la cauterización, escisión quirúrgica, crioterapia o el tratamiento local con calor y terapia fotodinámica. Tienen la desventaja de requerir equipos muy especializados pero se convierten en la primera línea de tratamiento para aquellas personas que tiene contraindicado el uso de los Sb^V, tales como pacientes con enfermedades cardiovasculares, renales o mujeres en estado de embarazo (Palumbo, 2009; Goto et al, 2010; Mitropoulos et al, 2010).

4.3 ACEITES ESENCIALES (AE) Y SUS COMPONENTES

4.3.1 Generalidades. Los AE son mezclas naturales y complejas de metabolitos secundarios de plantas aromáticas que se caracterizan por ser volátiles, líquidos, raramente coloreados, con olor intenso y liposolubles. Son sintetizados por diversas partes de la plantas incluyendo las hojas, flores, frutos, tallos, semillas y raíces. Son obtenidos de plantas aromáticas principalmente en países cálidos y tropicales, ubicadas en las familias de las labiadas, lamiaceas y las umbelíferas (Bakkali et al, 2008; Schelz et al, 2010). Su composición puede incluir entre 20 a 100 componentes, algunos se encuentran en altas concentraciones y están fuertemente relacionados con las propiedades biológicas. En las plantas los AE cumplen diversas funciones biológicas, tales como: protección del ataque de microorganismos como bacterias, hongos y virus, repelentes de herbívoros y por su fuerte aroma pueden atraer algunos insectos para favorecer la polinización cruzada (Bakkali et al 2008; Schelz et al, 2010).

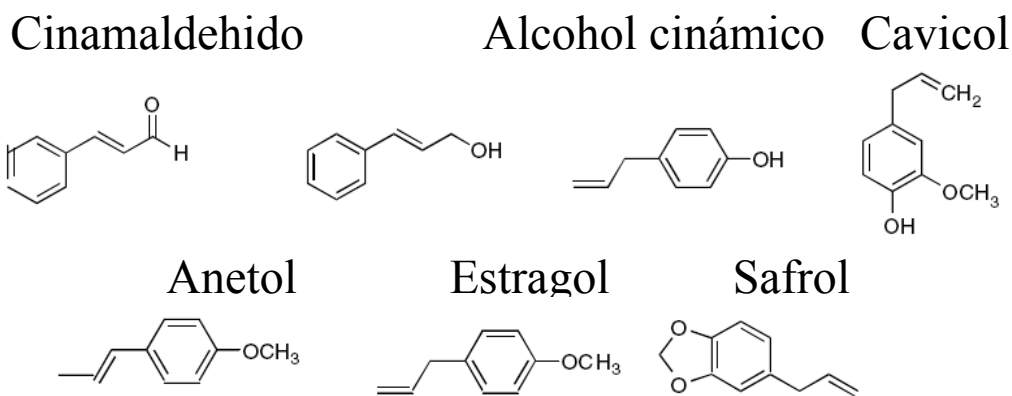
El contenido de AE en una planta es generalmente bajo, incluso inferior al 1% del contenido de líquido total. Existen diversas metodologías para su obtención a nivel industrial. Los métodos más frecuentes son la hidrodestilación y la extracción con fluido supercrítico. Para la hidrodestilación por arrastre de vapor se usan tanques llamados alambiques y cribas en las que se deposita el material vegetal. Se genera un calentamiento con vapor de agua que fluye a baja presión y penetra el material vegetal. Los componentes se volatilizan y luego se condensan para ser separados de la fase acuosa por diferencias de densidad. Para la extracción con gases en condiciones supercríticas se usan gases como el CO_2 en condiciones superiores a su punto crítico que atraviesa el material vegetal y arrastra los componentes volátiles (Bakkali et al, 2008; Schelz et al, 2010)

4.3.2 Composición química. La composición de los AE puede variar en relación con el clima, el suelo, el órgano de la planta del que se extrae y la edad, el

momento de recolección, así como también por el método usado para la extracción. Los componentes de los AE se caracterizan por su bajo peso molecular, incluyen varios grupos de compuestos químicos: los alifáticos de cadena corta, sustancias con azufre y nitrogenadas, aromáticos, y terpenos y terpenoides, siendo estos tres últimos los más importantes.

Los componentes aromáticos son derivados del fenilpropano y su frecuencia en los AE es baja. Pueden coproducirse junto con los terpenos y obtenerse en un mismo aceite. Comprenden diversos grupos funcionales tales como aldehídos (cinamaldehído), alcoholes (alcohol cinámico), fenoles (eugenol), metoxiderivados (anetol, estragol, metileugenol), dioximetilenos (apiol y safrol) (ver Figura 4). Pueden encontrarse como componentes mayoritarios de AE de plantas conocidas como anís, canela, clavo, hinojo, perejil, estragón, entre otros y en familias como Apiacea, Lamiacea, Myrtacea, y Rutacea (Anthony, 2005; Santoro et al; 2007 (B); Bakkali et al, 2008).

Figura 4. Ejemplos de estructuras químicas de componentes aromáticos de AE



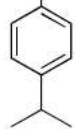
Fuente: Bakkali et al, 2008

Los terpenos y terpenoides constituyen el 90% de la composición de los AE. Se derivan de unidades del isopreno (C_5) y se sintetizan en las plantas a partir del isopentildifosfato (IPP) cuyas uniones repetitivas forman el prenildifosfato que sufre modificaciones químicas enzimáticas primarias y secundarias generando la diversidad química de estos compuestos. De acuerdo a la cantidad de carbonos se clasifican en monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), entre otros.

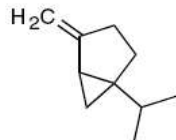
Los terpenoides son terpenos que contienen átomos de oxígeno (ver figura 5 y 6). Según los grupos funcionales se clasifican en: *i.* Hidrocarburos: mircenol, ocimeno, terpineno, *p*-cimeno, felandreno, pineno, β -cariofileno, curcumeno, farneseno; *ii.* Alcoholes: geraniol, linalool, citronelol, lavandulol, nerol, mentol, borneol, bisabol, β -nerolidol; *iii.* Aldehidos: geranial, neral, citronelal; *iv.* Cetonas: carvona, piperitona, alcanfor, germacreno; *v.* Ésteres: acetato de linalilo, acetato de isobornil.; *vi.* Eteres: 1-8 cineol; *vii.* Peroxidos: ascaridol; *viii.* Fenoles: timol y carvacrol; *ix.* Epóxidos: óxido de cariofileno, epóxido de humuleno (Bakkali et al, 2008).

Figura 5. Ejemplos de estructuras químicas de terpenos de AE

P-cimeno



sabineno



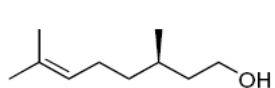
α -pineno



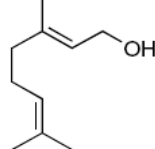
β -



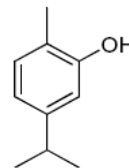
Citronelol



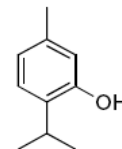
geraniol



carvacrol



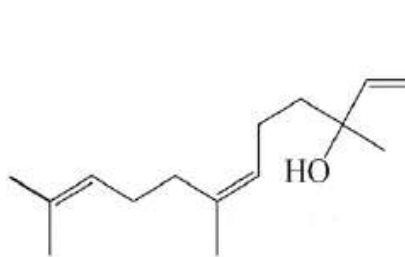
timol



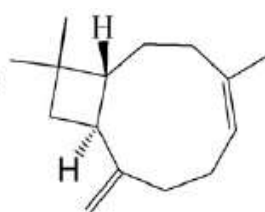
Fuente: Bakkali et al, 2008

Figura 6. Ejemplos de estructuras químicas de sesquiterpenos de AE

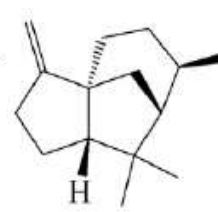
Nerolidol



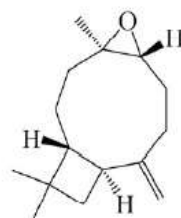
β -cariofileno



cedreno



Oxido de cariofileno



Fuente: Nibret et al, 2010

4.3.3 Actividad biológica. Actualmente los AE y algunos de sus componentes tienen amplio uso en la industria cosmética, productos de higiene oral, la industria alimenticia y medicina natural por las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas que les son atribuidas (Anthony JP, 2005; Santoro 2007 B; Bakkali et al, 2008). La explicación de la actividad biológica de los AE en muchas ocasiones pareciera estar definida por un componente mayoritario, sin embargo, los estudios han establecido que el efecto de un AE es el resultado de la actividad de sus componentes.

La actividad antimicrobiana de los AE y algunos de sus componentes ha sido establecida (Bakkali et al, 2008). Los estudios proponen que la actividad biológica en procariotas está relacionada con su capacidad de atravesar la membrana celular, causar permeabilización y despolarización, así como producir coagulación de lípidos y proteínas en el ambiente intracelular; estos mecanismos están asociados con la presencia de componentes que contienen grupos fenoles, aldehídos y alcoholes (Burt, 2004; Di Pasqua et al, 2006; Turina et al, 2006; Oussalah et al, 2006). Así mismo en patógenos eucariotas tales como hongos y parásitos se cree que actúan despolarizando la membrana mitocondrial y afectando el ciclo del calcio intracelular, causando así la muerte por apoptosis o necrosis. Este ha sido denominado el efecto prooxidante. Los AE han mostrado actividad frente a patógenos humanos, de plantas y animales; tales como bacterias, virus, hongos, protozoos, parásitos, ácaros, larvas, nematodos, insectos y moluscos (Bakali et al, 2008)

El efecto antiinflamatorio de los AE y sus componentes ha sido previamente demostrado en estudios *In vivo*. Algunos AE como el de *Cordia verbenaceae* disminuyeron la producción de sustancias proinflamatorias como las citoquinas (IL-1; TNF- α), las prostaglandinas y las enzimas involucradas en la producción del óxido nítrico en tejidos de modelos animales (Fernandes et al, 2007).

Las propiedades antioxidantes de los aceites han sido documentadas y relacionadas con excelentes beneficios para la salud humana dado que diversas alteraciones sistémicas e incluso fisiológicas como el envejecimiento son consecuencia del estrés oxidativo que sufren las células. Esta propiedad se explica por la capacidad de los AE o sus componentes de evitar la oxidación molecular de lípidos y azúcares, así como por la remoción y neutralización de radicales libres de oxígeno que generan productos nocivos para las células. Este efecto evidente en numerosas investigaciones previas se traduce en la antimutagenicidad y anticarcinogenicidad también atribuida a estos compuestos (Ames et al, 1999; Birt et al, 2001; Clark, 2002; Surh, 2002).

Sin embargo, también se ha referido el efecto contrario de los AE y sus componentes. Los mecanismos por los que los aceites se tornan citotóxicos han sido de gran interés en la búsqueda y descubrimiento de nuevas sustancias con actividad antitumoral (Maya et al, 2007). Es así como se ha logrado elucidar que si bien estos componentes tienen efecto antioxidante, por la interacción con especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula pueden generar radicales fenoxil, hidroxil, superóxido y peróxidos que son potentes oxidantes de lípidos, proteínas y ADN. De esta manera las células podrían presentar alteraciones en su funcionamiento o entrar en apoptosis o necrosis, lo que se traduce en efectos citotóxicos (Bakkali et al, 2005).

5. ESTADO DEL ARTE

A pesar del impacto de estas enfermedades, las quimioterapias disponibles son limitadas y no existe aún vacuna. Los medicamentos están disponibles desde el siglo 20 y muy pocos han sido desarrollados. Con respecto a la actividad antiparasitaria de los AE, diversos estudios establecen el efecto tóxico frente a especies de *Plasmodium*, Coccidias, helmintos y también tripanosomatidos. Aceites de plantas de las familias Alliaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae y Rutaceae han presentado un potente efecto antiparasitario (Anthony et al, 2005).

La actividad contra *Leishmania* y *T. cruzi* de AE obtenidos de plantas como *Chenopodium ambrosioides*, *Origanum vulgare*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris*, *Croton cajucara*, *Copaifera reticulata*, *Achilleum millefolium* y *Lippia sidoides* ha sido revelada en estudios *in vitro* (Kiuchi et al, 2002; Rosa et al, 2003; Rocha et al, 2005; Ueda Nakamura et al, 2006; Monzote et al, 2006; Santoro et al, 2007; Santos et al, 2008; Medeiros et al, 2011) (Ver tabla 2). El efecto de los AE en las formas de los parásitos ha sido probablemente relacionados con la capacidad para atravesar la membrana citoplasmática y permeabilizarla así como las organelas intracelulares (Santoro et al, 2007 (B)).

Dada la compleja composición química de los AE tan solo la actividad del aceite obtenido de *Chenopodium ambrosoides* ha sido evaluada en modelos de experimentación frente a *L. amazonensis*. Los resultados establecieron que la administración intraperitoneal de 30 mg/kg día previene el desarrollo de lesiones y la carga parasitaria, sin muestra de desarrollo de resistencia. Sin embargo, fue evidente la toxicidad de este tratamiento, por lo que actualmente los estudios buscan establecer el potencial tóxico y mutagénico de este AE con el fin de avanzar en los estudios preclínicos (Monzote et al, 2006).

Así mismo y con el ánimo de continuar la búsqueda de productos naturales como verdaderas alternativas de medicamentos para el tratamiento de estas parasitosis, los estudios están orientados a establecer la actividad de componentes de AE, que por ser sustancias químicas puras podrían resultar promisorios. El linalool, eugenol, timol y α -bisabolol han sido evaluados *in vitro* frente a los parásitos de interés mostrando alguna actividad. Por otra parte el componente que actualmente avanza en los estudios es el limoneno cuyo efecto *In vitro* e *In vivo* mostró resultados promisorios (Kiuchi et al, 2002; Rosa et al, 2003; Rocha et al, 2005, Ueda Nakamura et al,2006; Monzote et al, 2006;Santoro et al ,2007 (A y B); Arruda et al, 2009; Morales et al, 2010; Medeiros et al, 2011) (Ver tabla 2).

Tabla 2. Estudios de actividad de AE y sus componentes mayoritarios frente a especies de *Leishmania* y *T. cruzi*

AE	CM	Parásito	Resultado	Referencia
<i>Croton cajucara</i>	Linalool	<i>L. amazonensis</i>	LD ₅₀ (ng/mL) promastigotes: 8,3 amastigotes: 22,0	Rosa et al, 2003
			LD ₅₀ (ng/mL) promastigotes: 4,3 amastigotes: 15,5	
<i>Ocimum gratissimum</i>	Eugenol	<i>L. amazonensis</i>	CI ₅₀ (µg/mL) promastigotes: 135 amastigotes: 100 promastigotes: 80	Ueda Nakamura et al, 2006
<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	<i>T. cruzi</i>	CI ₅₀ (µg/mL) epimastigotes: 99,5 tripomastigotes: 7,5	Santoro et al, 2007(A)
<i>Ocimum basillicum</i>	Linalool		CI ₅₀ (µg/mL) epimastigotes: 246 CI ₅₀ (µg/mL) epimastigotes: 102 tripomastigotes: 467,5	
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol	<i>T. cruzi</i>	CI ₅₀ (µg/mL) epimastigotes: 77 tripomastigotes: 38 CI ₅₀ (µg/mL) epimastigotes: 62 tripomastigotes: 53	Santoro et al 2007 (B)
<i>Copaifera reticulata</i>	NA	<i>L. amazonensis</i>	CI ₅₀ (µg/mL) promastigotes: 5 amastigotes axénicos: 10 Amastigotes intracelulares: 15	Santos et al, 2008
NA	Limoneno	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i> , <i>L. braziliensis</i> <i>L. chagasi</i> .	CI ₅₀ (µM) promastigotes: 252.0 +/- 49.0. amastigotes: 147+/- 46	Arruda et al, 2009
NA	α-Bisabolol	<i>L. infantum</i>	promastigotes: 150	Morales et al, 2010
<i>Lippia sidoides</i>	Timol	<i>L. amazonensis</i>	promastigotes: 44,38 amastigotes : 34,4 promastigotes: 22,63	Medeiros et al, 2011

CM: Componentes mayoritarios. Los resultados de actividad del aceite completo y su componente respectivo son expresados en concentraciones inhibitorias50 (CI₅₀) o dosis letal 50 (LD₅₀); NA: No aplica.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antiparasitaria y citotóxica *in vitro* de componentes de AE obtenidos de plantas colombianas frente a *T. cruzi* y especies de *Leishmania*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la actividad anti-*T. cruzi* y anti-*Leishmania* de componentes de AE en formas extra e intracelulares.

Evaluar la toxicidad de componentes de los AE en células de mamífero.

Relacionar la actividad biológica de los componentes con respecto a los AE que los contienen.

7. METODOLOGIA

7.1 Diseño metodológico. Este trabajo fue un estudio experimental *in vitro* en el que se evaluó la actividad biológica de diecisiete (17) componentes químicos de AE contra *T. cruzi* y *L. chagasi* y células de mamífero. Estos AE fueron obtenidos de plantas aromáticas distribuidas en territorio colombiano y en un estudio previo se demostró que tenían actividad contra los parásitos.

El estudio se realizó en dos fases: La primera que consistió en la revisión de la base de datos del laboratorio de Quimioterapia del CINTROP-UIS y selección de los posibles componentes de AE a estudiar de acuerdo a criterios de inclusión (Figura 7). La segunda que consistió en realizar la evaluación de la actividad biológica de los componentes seleccionados frente a células de mamífero y formas de los parásitos de interés (Figura 8).

7.2 ACEITES ESENCIALES (AE).

7.2.1 Obtención, caracterización y composición. Los AE fueron obtenidos por hidrodestilación asistida por radiación de microondas en la planta piloto del CENIVAM. Los pliegos testigos de cada planta fueron depositados en el Herbario Nacional de Colombia (Stashenko et al. 2004).

La composición de los AE se determinó por cromatografía de gas acoplada a espectroscopia de masas (GC-MS) (Agilent Technologies 6890 Plus, detector 5973, Palo Alto, CA, USA). Los componentes de los AE fueron identificados por Índices de Retención (IR) y posterior comparación de los espectros de masas con bases de datos, en el laboratorio del Centro de Investigaciones en Biomoléculas (CIBIMOL).

7.2.2 Selección de los AE. Los AE fueron seleccionados a partir de los resultados de actividad biológica de la base de datos del Laboratorio de Quimioterapia-CINTROP-UIS. Como criterios de selección se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros en el orden mencionado: *i.* la actividad de los AE en las formas extracelulares; *ii.* Las familias, géneros y especies de plantas más frecuentes y *iii.* Los avances en los estudios de actividad biológica.

Según la actividad antiparasitaria, los AE fueron clasificados como activos, parcialmente activos y no activos (Tabla 3). De 343 AE evaluados, se seleccionaron los activos en las formas libres. Se encontró que 118 aceites esenciales fueron activos en epimastigotes de *T. cruzi* y 60 en promastigotes de *L. chagasi* siendo 49 activos para ambos parásitos.

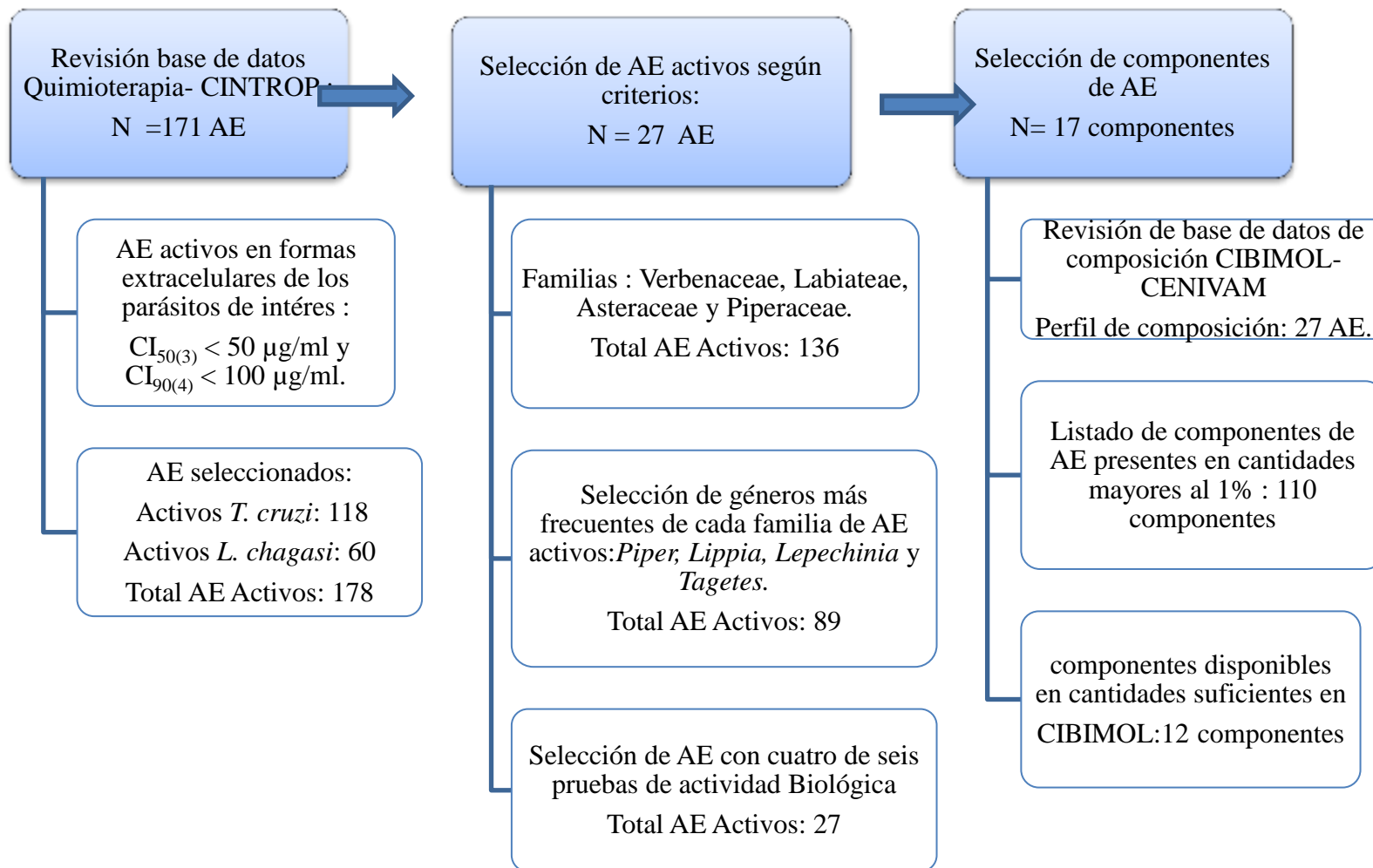
Tabla 3. Número de ae según su actividad antiparasitaria

Parásito (forma parasitaria)	N (%)*		
	Activos	Parcialmente activos	No activos
<i>T. cruzi</i> (epimastigotes)	118 (68,2)	4 (2,3)	51 (29,4)
<i>L. chagasi</i> (promastigotes)	60 (35,3)	1(0,5)	109 (64,1)

Fuente: *Tomado de base de datos Laboratorio de Quimioterapia, CINTROP-UIS

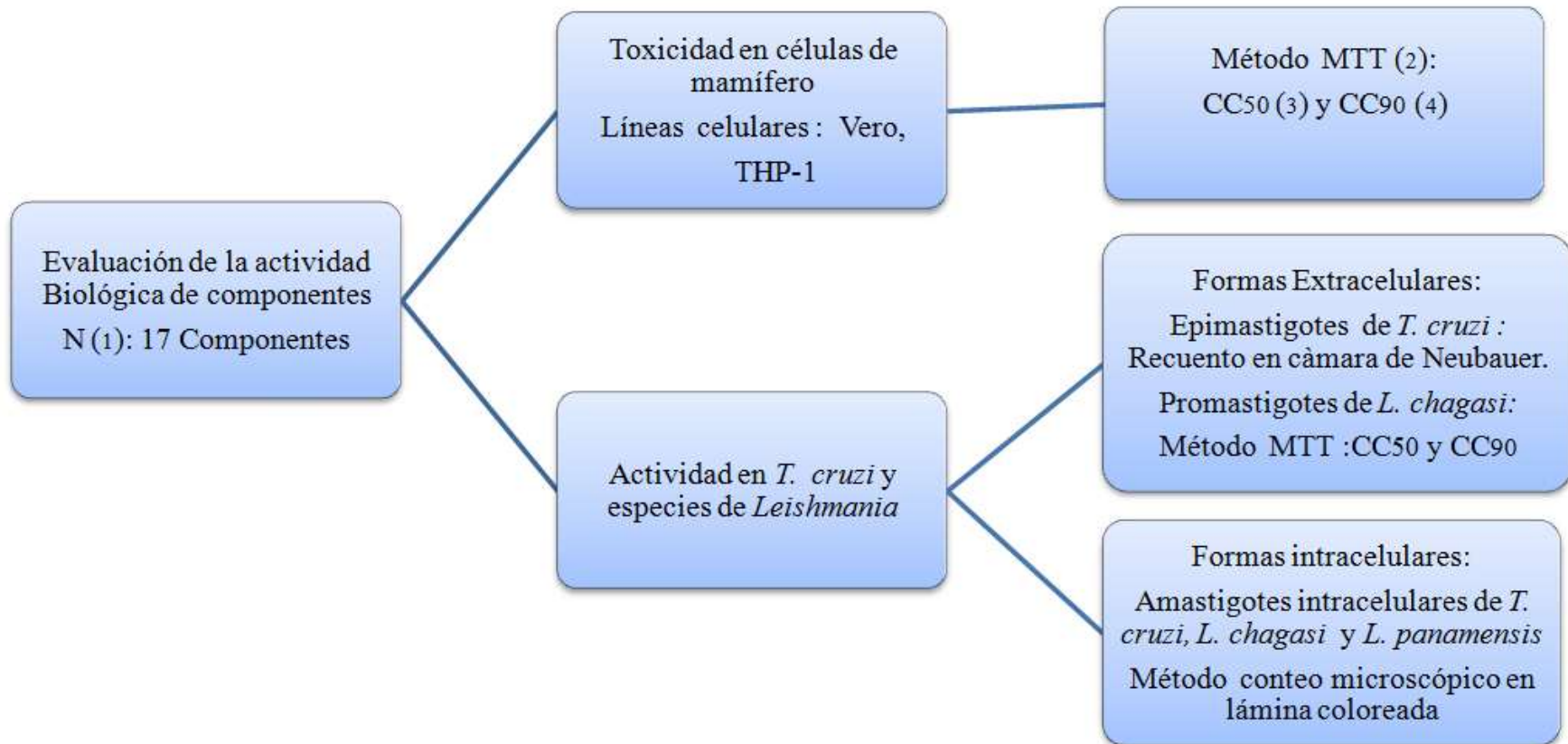
Las familias más frecuentes de los AE activos para los dos parásitos fueron: Verbenaceae, Labiateae, Asteraceae y Piperaceae. Con este segundo criterio se seleccionaron 136 aceites esenciales activos (Tabla 4). Los AE que pertenecían a otras familias fueron excluidos.

Figura 7. Diseño metodológico aplicado en la primera fase del estudio



1. N: población inicial; 2. AE: Aceites Esenciales; 3. CI_{50} : Concentración Inhibitoria 50; 4. CI_{90} : Concentración Inhibitoria 90.

Figura 8. Diseño metodológico aplicado en la segunda fase del estudio



1. N: población inicial; 2. MTT: Método de Citotoxicidad 3. CI_{50} : Concentración Inhibitoria 50; 4. CI_{90} : Concentración Inhibitoria 90

Tabla 4. Familias más frecuentes de AE activos en *T. cruzi* y *L. chagasi*

Familia	Aceites esenciales activos, N (%)	
	<i>T. cruzi</i>	<i>L. chagasi</i>
Verbenaceae	33 (38,3)	20 (40,0)
Asteraceae	19 (22,0)	8 (16,0)
Piperaceae	13 (25,0)	9 (18,0)
Labiatae	21 (24,4)	13 (26,0)
Total	86 (100)	50 (100)

De estas familias los géneros más frecuentes fueron *Piper*, *Lippia*, *Lepechinia* y *Tagetes*, con este tercer criterio se seleccionaron 89 AE. Los demás géneros fueron excluidos (Tabla 5).

Tabla 5. Géneros de AE activos en *T. cruzi* y *L. chagasi*

Familia	Género	Aceites esenciales activos, N (%)	
		<i>T. cruzi</i>	<i>L. chagasi</i>
Verbenaceae	<i>Lippia</i>	28 (84,8)	16 (80)
	<i>Verbesina</i>	2 (6,0)	2 (10,0)
	<i>Lantana</i>	2 (6,0)	2 (10,0)
	<i>Aloysa</i>	1 (3,0)	0
Total		33 (100)	20 (100)
Asteraceae	<i>Tagetes</i>	6 (31,5)	4 (50,0)
	<i>Ageratina</i>	2 (10,5)	1 (12,5)
	<i>Baccharis</i>	3 (15,7)	1 (12,5)

Continuación...(Tabla 5)

	<i>Stevia</i>	2 (10,5)	0
	<i>Montanoa</i>	1 (5,2)	2 (25,0)
	<i>Ambrosia</i>	1 (5,2)	0
	<i>Coryza</i>	1 (5,2)	0
	<i>Achyrocline</i>	1 (5,2)	0
	<i>Sin clasificar</i>	2 (10,5)	0
Total		19 (100)	8 (100)
	<i>Lepechinia</i>	8 (38,1)	5 (38,5)
	<i>Hyptis</i>	5 (23,8)	4 (30,1)
Labiatae	<i>Salvia</i>	4 (19,0)	3 (23,0)
	<i>Minthostachys</i>	3 (14,3)	1 (7,6)
	<i>Satureja</i>	1 (4,7)	0
Total		21 (100)	13 (100)
Piperaceae	<i>Piper</i>	13 (100)	9 (100)

De acuerdo a la disponibilidad de los análisis de actividad biológica, de los cuatro géneros más comunes fueron seleccionados aquellos AE que según la base de datos del Laboratorio de Quimioterapia, CINTROP-UIS, tenían evaluada su actividad en las formas extracelulares (epimastigotes y promastigotes) de los parásitos de interés y en las dos líneas celulares (Vero y THP-1). Los demás AE fueron excluidos. Con este criterio se incluyeron 27 AE activos, distribuidos por género así: 13 del género *Lippia*, 6 del género *Tagetes* y 8 del género *Piper* (Tabla 6). De estos aceites 15 fueron activos en las formas extracelulares de los dos parásitos y 12 activos solamente en epimastigotes de *T. cruzi*.

Tabla 6. Identificación de AE de plantas aromáticas seleccionados en el estudio y activos en *T. cruzi* y *L. chagasi*.

N	Nombre científico	N° Colecta	Lugar de recolección
1		512272	Bolívar, Colorado
2	<i>L. alba</i>	512077	Santander, Bucaramanga
3		516929	Bolívar, Turbaco
4		484334	Antioquia, Rionegro
5	<i>L. citriodora</i>	480749	Quindío, Armenia
6		516924	Cesar, Manaure
7		516290	Santander, Piedecuesta
8		512271	Santander, Jordán Sube
9	<i>L. origanoides</i>	512270	Santander, Jordán Sube
10		512087	Cauca, Mercaderes
11		512075	Santander, Bucaramanga
12		516294	Santander, Los Santos
13	<i>L. dulcis</i>	512079	Santander, Bucaramanga
14	<i>Tagetes heterocarpa</i>	519603	Nariño, Ipiales
15	<i>T. lucida</i>	512074	Santander, Bolívar
16	<i>T. zipaquirensis</i>	521096	Boyacá, Chíquiza,
17	<i>T.s zipaquirensis</i>	521028	Boyacá, Sogamoso
18	<i>T.s zipaquirensis</i>	521087	Boyacá, Toca,
19	<i>T. caracasana</i>	521072	Boyacá, Samacá,
20	<i>Pipper bogotense</i>	519590	Nariño, No establecido
21	<i>P.marginatum</i>	519600	Tolima, No establecido
22	<i>P.divaricatum</i>	519593	Tolima, No establecido
23	<i>P. brachypodium</i>	520011	Chocó, Samurindó
24	<i>P.septuplinervium</i>	520006	Chocó, Pandó
25	<i>P.lanceifolium</i>	519993	Chocó, Bagadó
26	<i>P. brachypodom</i>	520000	Chocó, Tutunendo
27	<i>P. brachypodom</i>	520011	Chocó, Salero

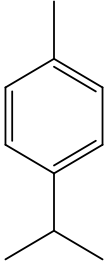
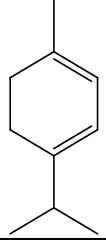
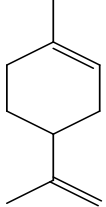
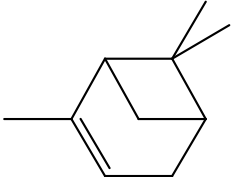
7.3 COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS AE UTILIZADOS

Los componentes fueron seleccionados a partir de los resultados de composición química de los 27 AE activos (Tablas 7-9). Se eligieron 12 componentes que cumplían con los siguientes criterios de inclusión: *i.* Estar presentes en porcentajes mayores al 1% en los AE y *ii.* Estar disponibles en cantidades suficientes en el laboratorio CIBIMOL. Se incluyeron 5 compuestos químicos que si bien no eran componentes de los AE seleccionados estaban disponibles en cantidades suficientes y su actividad antimicrobiana ha sido referida. Estos componentes fueron: citral, R-carvona, S-carvona, alcanfor y eugenol.

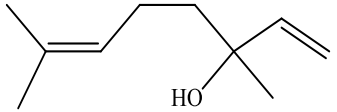
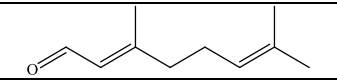
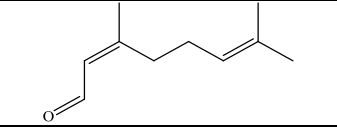
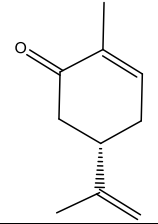
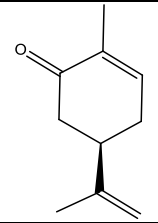
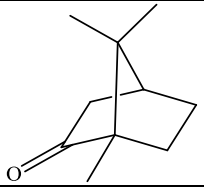
Todos los componentes fueron obtenidos comercialmente (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA), con porcentajes de pureza superiores a 98%. En la Tabla 10 se muestran los compuestos seleccionados.

Como dato adicional a algunos de los componentes se les realizó análisis quimioinformático utilizando el software Osiris Property Chemistry (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). La estructura química de los componentes α -pineno, carvacrol, timol, S-carvona y *trans*- β -cariofileno se ingresó al software y se tomaron los resultados de mutagenicidad, tumorigenicidad, efectos irritantes y efectos reproductivos.

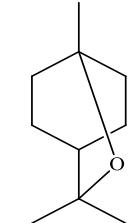
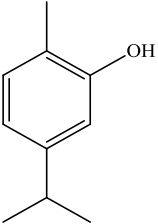
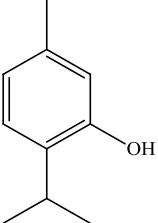
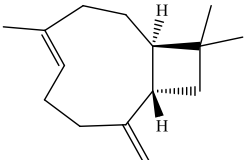
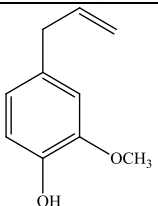
Tabla 7. Características químicas de componentes de aceites esenciales activos seleccionados

Grupo	N°	Componente	Peso molecular g/mol	Estructura química
Monoterpeno	1	ρ -Cimeno	134,21	
	2 3	Terpineno: α -Terpineno γ -Terpineno	136,23	
	4 5	Limoneno R(+) S(+)	136,21	
	6	α -Pineno	136,24	

Continuación .. (Tabla 7)

Alcohol acíclico	7	Linalool	154,25	
Aldehído	8	Geranial	152,24	
	9	Citral	152,24	
Cetona	10	R-Carvona	150,22	
	11	S-Carvona	150,22	
	12	Alcanfor	152,23	

Continuación ... (Tabla 7)

	Éter	13	1-8 Cineol	154,24	
Monoterpeno	Fenol	14	Carvacrol	150,22	
		15	Timol	150,22	
Sesquiterpeno	Carburo	16	<i>trans</i> - β -Cariofileno	204,36	
Aromático	Fenol	17	Eugenol	164,21	

7.4 MEDICAMENTOS DE REFERENCIA

Se utilizó AmB obtenida de Sigma-Aldrich para los ensayos con especies de *Leishmania* y Nifurtimox (Bayer, Germany) donado por el profesor Simon Croft de la Universidad de Londres para los ensayos con *T. cruzi*

7.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK Y DE TRABAJO

Para preparar las soluciones stock se pesaron en balanza analítica entre 1 a 10 mg y se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO, Carlo Erba). Todas las soluciones stock fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio RPMI 1640 (Gibco). Para los experimentos se realizaron diluciones seriadas a partir de 300 hasta 0,3 µg/mL, con diversos factores de dilución de acuerdo a la forma parasitaria o línea celular. La concentración final de DMSO en los experimentos fue menor o igual a 1%, a la cual no se afecta el crecimiento de los parásitos o las células de mamífero.

7.6 PARÁSITOS Y CÉLULAS DE MAMÍFERO

Los epimastigotes de *T. cruzi* -cepa 215 (obtenida y caracterizada por K.P Luna del CINTROP-UIS) (Luna et al, 2003; Luna et al 2009) fueron mantenidos a 28°C, en medio Liver Infusion Triptosa (LIT) suplementado con hemina y 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (SBFi, Gibco)

Los promastigotes de *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) y *L. panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) fueron mantenidos a 28°C en medios RPMI 1640 suplementado con hemina y en el medio de Schneider's *Drosophila* (Gibco) suplementado con 10 % de SBFi.

Las líneas de células epiteliales de riñón de mono verde Africano-Vero (ATCC, CCL-81TM) y de leucemia monocitica aguda humana-THP-1 (ATCC-TIB-202TM) fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10%

de SBFi a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células THP-1 fueron diferenciadas usando PMA (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 80 ng/mL por 72 horas (Kohro et al, 2004).

7.7 ENSAYO DE TOXICIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Las células Vero (5×10^5 células/mL) y las células THP-1 diferenciadas fueron colocadas en placas de 96 pozos y tratadas con los componentes de los AE y medicamentos de referencia. Las concentraciones evaluadas fueron 300, 30, 3 y 0,3 µg/mL. Células controles se mantuvieron sin tratamiento. La citotoxicidad fue evaluada después de 72 horas utilizando el método colorimétrico de reducción de 3-[4-dimetilthiazol-2-yl]-2-5-di-fenyl-tetrazolium bromuro (MTT). Se adicionaron 20 µL de MTT a una concentración de 5µg/mL y se incubaron por 4 horas a 37°C para permitir la formación de los cristales de formazán. Los cristales fueron disueltos con DMSO y la lectura en términos de densidad óptica fue determinada espectrofotométricamente usando un lector de microplacas (Anthos 2020) a una longitud de onda de 580 nm.

Los resultados de toxicidad fueron calculados usando la fórmula de Porcentaje de citotoxicidad (%) = $100 \times (\text{DO grupo control} - \text{DO grupo tratado}) / \text{DO grupo control}$.

7.8 ENSAYOS DE ACTIVIDAD EN *T. cruzi*

7.8.1 Actividad en formas extracelulares. Los epimastigotes de *T. cruzi* en fase de crecimiento exponencial fueron colocados en placas de 96 pozos a una concentración de 5×10^5 epimastigotes/mL en medio LIT con 10% SBFi. Los parásitos fueron tratados con concentraciones de 300, 30, 3 y 0,3 µg/mL para los componentes y 100, 10, 1 y 0,1 µg/mL para el medicamento de referencia a 28°C por 72 horas. Como controles se usaron parásitos en el medio de cultivo.

La inhibición del crecimiento se determinó microscópicamente por conteo directo en cámara de Neubauer.

7.8.2 Actividad en amastigotes intracelulares. Para los ensayos en las formas intracelulares inicialmente se obtuvieron tripomastigotes derivados de células (TDC) infectando monocapas de células Vero con epimastigotes. Después de 72 horas de infección se realizaron lavados con buffer fosfato salino (PBS, pH 7,2) y las células se dejaron aproximadamente por 6 días hasta observar en el sobrenadante del cultivo los TDC.

Para los ensayos, las células Vero a una concentración de 3×10^5 /mL en medio RPMI 5% SBFi fueron colocadas en pozos de láminas Labtek por 24 horas e infectadas con TDC en un radio de infección 1:10, durante 48 horas. Las células infectadas se trataron por 120 horas con las diferentes concentraciones de los compuestos. Las láminas fueron lavadas con PBS, fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. El porcentaje de células infectadas fue determinado por conteo microscópico en las láminas coloreadas.

7.9 ENSAYOS DE ACTIVIDAD EN *LEISHMANIA*:

7.9.1 Actividad en formas extracelulares. Los promastigotes de *L. chagasi* en fase logarítmica (1×10^6 parásitos/mL) fueron colocados en placas de 96 pozos y tratados con concentraciones seriadas de cada uno de los componentes y medicamentos de referencia (se utilizaron las mismas que para epimastigotes de *T. cruzi*) a 28°C durante 72 horas. Parásitos controles fueron mantenidos en medio de cultivo. La actividad se determinó utilizando el método colorimétrico MTT como se mencionó anteriormente.

7.9.2 Actividad en amastigotes intracelulares. Las células THP-1 fueron colocadas en pozos de láminas Labtek a una concentración de 8×10^5 células/mL transformadas e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente fueron infectadas con promastigotes de *Leishmania* en fase estacionaria, en un radio de infección parásitos: célula de 10:1. Las láminas

fueron incubadas durante 48 horas. Luego de este tiempo los promastigotes libres fueron removidos por lavado con PBS. Las células infectadas fueron tratadas por 120 horas con los componentes y medicamentos de referencia. Las láminas fueron luego lavadas con PBS, fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. El porcentaje de células infectadas fue determinado por conteo microscópico en láminas coloreadas

7.10 Análisis de resultados. Se elaboró una base de datos en hojas de cálculo usando el programa Excel (Windows- Microsoft) con los resultados obtenidos para los componentes de los AE y medicamentos de referencia.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado en ensayos independientes y cada concentración de los componentes se evaluó por triplicado en el mismo experimento.

La actividad en células de mamífero fue expresada como la concentración que disminuye la viabilidad del 50 y 90% de las células; es decir la concentración citotóxica (CC_{50} y CC_{90}). La actividad en *Leishmania* y *T. cruzi* fue expresada como la concentración que inhibe el 50 y 90% (CI_{50} y CI_{90}) del crecimiento de los parásitos o la infección de los mismos a las células. Las actividades fueron determinadas por regresión sigmoideal usando el software Mxlfite™ (ID Business Solution, Guildford, UK).

La actividad selectiva de cada uno de los compuestos se calculó como el Índice de Selectividad (IS), que consiste en el cociente de la CC_{50} en células de mamífero sobre la CI_{50} en las formas de los parásitos. De acuerdo a criterios del laboratorio de Quimioterapia del CINTROP-UIS se consideraron como selectivos compuestos con valores de $IS \geq 3$.

Los componentes de los AE fueron clasificados según su actividad antiparasitaria y citotóxica en activos, parcialmente activos y no activos. Los

criterios de actividad fueron establecidos por el laboratorio de Quimioterapia del CINTROP-UIS como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 8. Criterios de clasificación de la actividad *in vitro* de los compuestos

Grupo	Concentraciones inhibitorias/citotóxicas (µg/mL)	
	CI ₅₀ / CC ₅₀	CI ₉₀ / CC ₉₀
Activo/ Tóxico	≤ 50	≤ 100
Parcialmente Activo/ Parcialmente Tóxico	> 50	≤ 100
No activo/ No tóxico	> 50	>100

CC₅₀: Concentración inhibitoria o citotóxica 50; CC₉₀: Concentración inhibitoria o citotóxica 90

Para el caso de actividad en formas intracelulares se consideraron como parcialmente activos aquellos compuestos cuya CI₅₀ fue ≤ 50 µg/mL.

Para relacionar la actividad de los componentes activos y los AE que los contienen, se calculó el Índice de Actividad (IA). Este consiste en el cociente de la CI₅₀ o CC₅₀ del AE (según la base de datos CINTROP-UIS) sobre la CI₅₀ o CC₅₀ de los componentes. De acuerdo a criterios del laboratorio de Quimioterapia del CINTROP valores de IA >1 mostraban que el componente evaluado era más activo que el AE que lo contiene.

En algunos casos el IA no pudo ser calculado por que los valores de CI₅₀ o CC₅₀ del AE o del componente eran ≥ 300 µg/mL (que era la máxima concentración utilizada en los ensayos)

El análisis estadístico de las variables se realizó usando el paquete estadístico PASW 18 (IBM, 2009) para establecer las diferencias estadísticamente significativa en la actividad de los componentes y el medicamento de referencia. Se aplicó una prueba t-Student para grupos independientes, se estableció la significancia estadística con valores de p < 0,05.

Tabla 9. Composición química de AE del género *Lippia*

Componente	Cantidad relativa (%)												
	<i>L. alba</i>			<i>L. citriodora</i>		<i>L. micromera</i>	<i>L. origanoides</i>				<i>L. dulcis</i>		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
α -Pino				0,5	0,7	1,0			3,1	0,7	0,5	2,3	
6-Metil-5-hepten-2-ona	4,1	2,6	5,2	2,8	1,5								4,0
β -Mirreno						3,1	2,5	3,2	2,0	4,5	3,0	1,5	
ρ -Cimeno						13,1	12,0	13,9	15,7	11,5	11,5	11,2	
α -Felandreno						0,5		0,7	8,7			9,9	
α -Terpineno						4,0	2,7	3,7	0,5	2,3	3,4	0,6	
Limoneno	3,2	2,9	3,2	8,4	10,7	1,1		0,6	6,9	0,7		7,2	
1,8-Cineol				3,6	5,0								
β -Felandreno						5,0	0,8	1,7	6,7	0,7	0,5	6,5	
<i>trans</i> - β -Ocimeno				3,0	1,8			0,6	1,2			0,6	
3-Metil-2-ciclohexen-2-ona													3,4
γ -Terpineno						12,5	9,5	13,2	1,9	6,3	12,6	1,5	
Linalool	2,0	1,4	1,8	0,8	0,7				2,9	0,5		0,9	1,0
Borneol		1,8	0,8						1,9			3,1	
Nerol	1,8	2,1	2,3	5,1	2,0								
Metilthimileter						14,9	1,0	2,8		1,9	1,3		
Neral	21,5	19,5	20,7	15,0	15,6								
Geraniol	3,9	11,9	5,5	4,4	2,7								
Geranial	28,9	23,3	26,7	17,5	18,9								

Continuación .. (Tabla 9)

Timol						29,1		9,2	2,2	53,6	15,1	0,5		
Carvacrol						1,0	46,2	36,5	0,5	0,7	38,8			
α -Copaeno				0,6	0,5							0,9	8,4	
β -Bourboneno				0,7	0,8									2,0
<i>trans</i> - β -Cariofileno	7,3	6,6	5,5	2,6	2,3	1,9		2,0	1,6	9,4	3,2	2,6	11,3	10,4
α -Humuleno	1,8	1,9	1,6					1,2	1,0	5,7	1,9	1,5	6,0	0,8
α -Curcumeno				2,8	3,9									
Bicyclosesquifelandreno	1,9	3,0	1,5											
Bicyclogermacreno	0,7					1,3								7,9
δ -Cadineno												1,6	8,8	
Espatulenol				4,2	4,7									2,4
Oxido de cariofileno	2,3	1,3	2,2	1,8	5,0	0,5				3,7			2,2	2,5
α -Eudesmol										3,2			1,4	
α -Bisabolol														8,2

Los valores en negrilla señalan los componentes mayoritarios de cada AE seleccionado.

Tabla 10. Composición química de AE del género *Tagetes*

Componente	Cantidad relativa (%)					
	<i>T. heterocarpa</i>	<i>T. lucida</i>	<i>T. zipaquirensis</i>		<i>T. caracasana</i>	
	14	15	16	17	18	19
<i>cis</i> - β -Ocimeno	3,0			6,1	20	11,7
<i>trans</i> - β -Ocimeno		2,19	12,1			0,3
allo-Ocimeno			2,0		2,8	1,8
<i>cis</i> -Ocimenona	6,3					
<i>trans</i> -Ocimenona	12,3					1,8
β -bisaboleno	3,0					
Espatuleno	5,4					
Estragol	1,9	91,4				
β -Mirceno		4,0	5,3	10,9	5,8	

Continuación .. (Tabla 10)

Dihidrotagetona	13,3		42,0	24,4	35,7	15,6
<i>cis</i> -Tagetona	16		3,3	3,6	5,8	58,4
<i>trans</i> -Tagetona	1,7		3,0	4,6	4,3	
6,7-epoxi-Mirceno	1,0		13,0	31	10,7	
Linalool	1,0	1,0	1,3	1,6	1,4	
Timol	1,0					
Biciclogermacreno	1,3					
Canfeno			1,0			
Limoneno			1,0	1,0		
ρ -Cimeno			1,0			

Los valores en negrilla señalan los componentes mayoritarios de cada AE seleccionado.

Tabla 11. Composición química de AE del género *Piper*

Componente	Cantidad relativa (%)							
	<i>P. bogotense</i>	<i>P. marginatum</i>	<i>P. divaricatum</i>	<i>P. brachypodom</i>	<i>P. septuplinervium</i>	<i>Piper lanceifolium</i>	<i>P. brachypodom</i>	<i>P. brachypodom</i>
	20	21	22	23	24	25	26	27
α -Pineno	8,7	2,5	11,4		2,1	3,6		
β -Pineno		1,4	5,1			5,4		
α -Felandreno	13,7	11,2	6,1					
β -Felandreno	3,4	2,2						
Linalool	4,7		15,0	15,8				
ρ -Cimeno	4,4		1,1			1,9		
Limoneno	5,3	7,6		1,3				
α -Copaeno	1,1		4,2	1,0	4,5	3,8	4,0	4,0
<i>trans</i> - β Cariofileno	3,1	11,1	8,2	4,0	5,0	11,6	20,2	20,2
<i>trans</i> - β Farneseno	1,6							
Biciclogermacreno	1,5	4,0					8,1	8,1
β - Curcumeno	1,7							
δ -Cadineno	3,4						3,1	3,1

Continuación .. (Tabla 11)

<i>trans</i> - hidrato de Sesquisabineno	14,2							
α -Bisabolol	2,4							
<i>cis</i> -Anetol		3,4						
β - Elemeno		4,1		7,6				
α -Humuleno		1,7		6,4	2,0	2,6	3,0	3,0
<i>trans</i> -Isoelemecina		2,0						
Espatulenol		1,5		1,0		2,4	5,7	5,7
Oxido de cariofileno		3,0	2,6	1,8	3,8	5,9	10,8	10,8
Sesquiterpeno oxigenado I, C ₁₅ H ₂₄ O		18,4						
Sesquiterpeno oxigenado II, C ₁₅ H ₂₄ O		9,3						
Canfeno			1,0					
β -Mirceno			1,2					
1,8-Cineol			18,3					
<i>cis</i> -Oxido de linalol			2,4					
Terpinoleno			2,2					

Continuación .. (Tabla 11)

Germacreno D	2,7	4,2	10,7	5,9	5,9
α -Cubebeno		1,9	4,3	1,0	1,0
β -Cubebeno		4,0		3,1	3,1
9- <i>epi-trans</i> -Cariofileno		2,2		5,8	5,8
γ -Muuroleno	2,8	4,2	4,0	1,5	1,5
<i>epi</i> -Cubebol		9,0			
γ -cadineno	2,5	2,1		1,1	1,1
δ -Cadineno	3,5	10,9	6,1		
<i>trans</i> -Calameneno	1,6	2,1		1,5	1,5
<i>trans</i> -Nerolidol	5,8	4,3	1,7		
Germacren-4-ol		5,6			
Viridiflorol		7,9			
β -Elemeno			2,5		
β -Selineno	2,8		7,8		
Elemicin			2,5		
Aromadendreno				2,1	2,1
Valenceno				1,5	1,5
Guaiol				1,2	1,2

Continuación .. (Tabla 11)

α -Terpienol	3,0	1,2
Acetato de linalilo		3,5
Acetato de nerilo		1,3
<i>trans</i> - β -Guaieno		3,1
α -Selineno		2,0
Germacren-4-ol		2,4
<i>epi</i> - α -Cadinol		1,9
α -Cadinol		3,1
α -Muurolol		1,7
<i>cis</i> -Calamenen-10-ol		1,5

Los valores en negrita señalan los componentes mayoritarios de cada AE seleccionado.

8. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados encontrados de la actividad de los componentes de AE. Inicialmente se presentan los resultados de toxicidad en células de mamífero y luego los de actividad en los parásitos de interés, con el fin de comprender el origen de los valores de IS. Finalmente se muestran los resultados de actividad biológica de los AE que contenían los componentes más activos y los valores calculados de Índice de Actividad (IA). Los resultados de actividad se presentaron en tablas y figuras que contienen las concentraciones inhibitorias (CI) y citotóxicas (CC). Se utilizaron en las tablas los términos: No Activo (NA) o No tóxico (NT) refiriéndose a aquellos compuestos que a la máxima concentración evaluada no mostraron actividad.

8.1 Resultados en la selección de componentes y AE. Los componentes más frecuentes en los 27 AE fueron *trans*- β -cariofileno en 77,7%; limoneno y linalool en 44,4% y *p*-cimeno en 40,74%. Las figuras 6 y 7 muestran los componentes seleccionados con mayor frecuencia en los AE del género *Lippia* y *Piper* y las cantidades relativas en las que se encontraban. Por la difícil disponibilidad comercial de los componentes de los AE de *Tagetes* seleccionados en el presente estudio y siendo este un criterio de inclusión, no quedaron incluidos componentes mayoritarios importantes de este género.

Los componentes mayoritarios de los AE seleccionados fueron linalool de *P. brachydopom*-23 (15,8%), geranial de *L. alba* 1-5 (17,5 a 28,9%), 1-8 cineol de *P. divaricatum*-22 (18,3%), carvacrol de *L. organoides*-7, 8 y 11 (46,2; 36,5 y 38,8% respectivamente), timol de *L. micromera*-6 (29,1%) y *L. organoides*-10 (53,6%) y *trans*- β -cariofileno de *L. organoides*-12 (11,3%), *L. dulcis*-13 (10,4%), *P. marginatum*-21 (11,1%), *P. lancefolium*-25 (11,6%), *P. brachypodom*-26, 27 (20,2%), ver tablas 7, 8 y 9. Otros componentes evaluados tales como *p*-cimeno α -terpineno, γ -terpineno, limoneno y α -pineno no fueron mayoritarios de los AE seleccionados pero cumplieron los criterios de inclusión.

Figura 9. Cantidad relativa de los componentes seleccionados de aceites esenciales del género *Lippia*

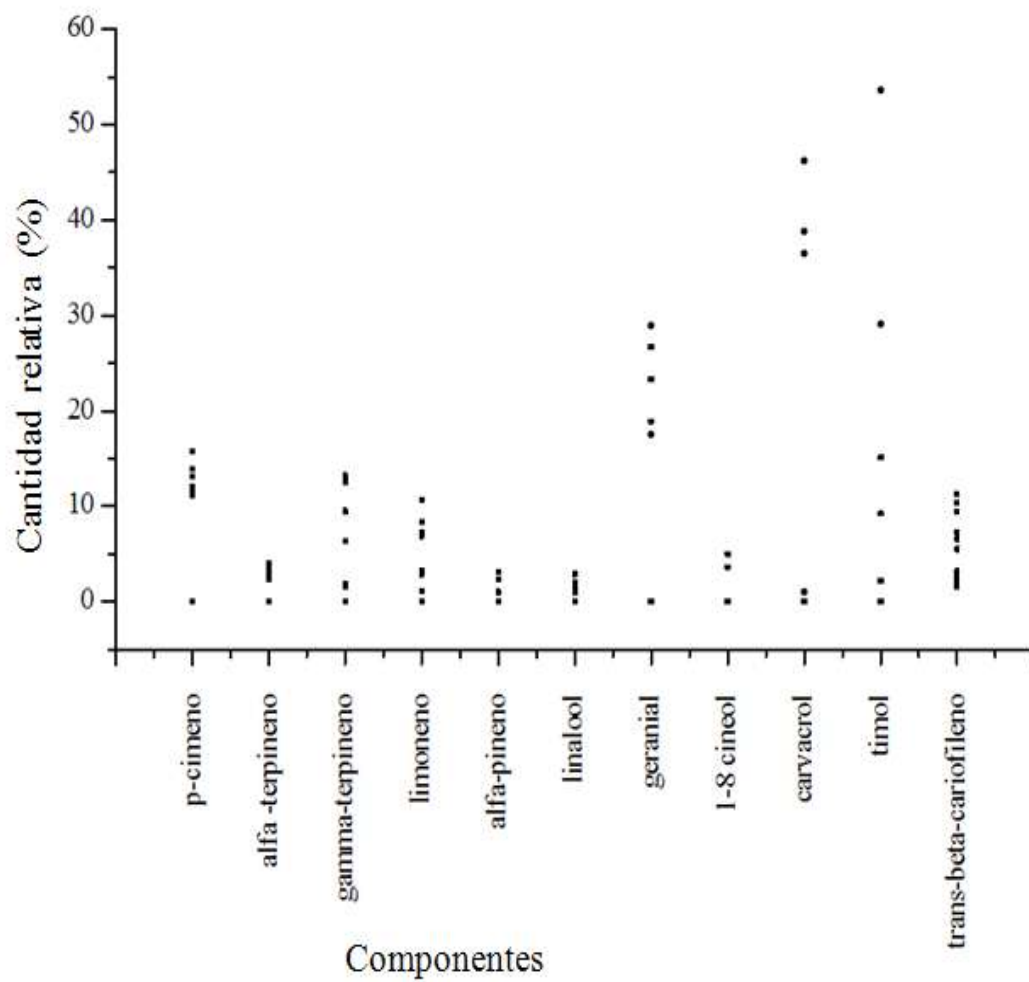
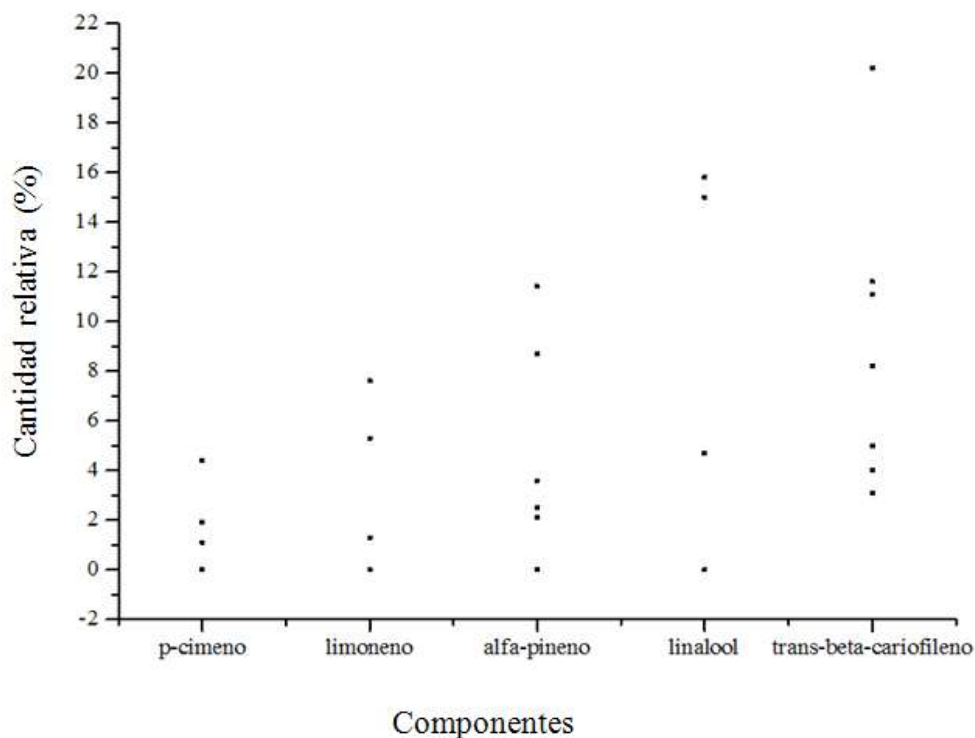


Figura 10. Cantidad relativa de los componentes seleccionados de aceites esenciales del género *Piper*



8.2 Actividad de los componentes en células de mamífero. Algunos componentes mostraron valores de CC_{50} menores que $50 \mu\text{g/mL}$; sin embargo debido a los criterios de toxicidad tenidos en cuenta en este trabajo no fueron clasificados como tóxicos dado que las CC_{90} fueron mayores a $300 \mu\text{g/mL}$. Para efectos de estos resultados se proponen como componentes con toxicidad.

En las células Vero, seis (35,29%) componentes mostraron toxicidad, entre ellos se encontró α -pineno, linalool, citral, R-carvona, carvacrol y timol, con CC_{50} entre 2,22 y $37,22 \mu\text{g/mL}$. El *trans*- β -cariofileno mostró toxicidad con valores de actividad de CC_{50} : 17,77 y CC_{90} : $26,11 \mu\text{g/mL}$.

En células THP-1, dos (11,76%) de los compuestos, citral y eugenol fueron parcialmente tóxicos para las células, con CC_{50} de 2,94 y $49,97 \mu\text{g/mL}$.

El medicamento de referencia Nifurtimox presentó alguna toxicidad en células Vero con IC₅₀ de 17,63 µg/mL, se compararon la toxicidad de *trans*-β-cariofileno y Nifurtimox, en términos de la CC₅₀ y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p: 0,98). Anfotericina no mostró toxicidad en células THP-1

Tabla 12. Actividad de componentes en células de mamífero

Componente	µg/mL (±DE)			
	Vero		THP-1	
	CC ₅₀	CC ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀
1 ρ-Cimeno	115,40±57,65	252,79±33,78	157,27±66,55	NT
2 α-Terpineno	133,17±20,83	NT	158,83±65,96	NT
3 γ-Terpineno	95,85±3,45	NT	181,66±66,18	NT
4 R-(+)Limoneno	105,40±15,20	NT	178,87±74,23	NT
5 S-(+)Limoneno	113,54±61,48	252,08±24,07	215,23±27,04	NT
6 α-Pineno	11,57±5,02	NT	57,25±14,36	NT
7 Linalool	26,33±0,43	NT	121,86±24,61	NT
8 Geranial	91,67±10,62	NT	237,53±24,13	NT
9 Citral	2,22±0,58	NT	2,94±2,13	NT
10 R-Carvona	17,22±16,17	NT	171,57±29,84	NT
11 S- Carvona	255,47±12,16	NT	NT	NT
12 Alcanfor	64,00±35,37	NT	280,77±3,54	NT
13 1-8 Cineol	63,49±8,39	NT	187,20±81,29	NT
14 Carvacrol	28,29±1,26	NT	255,44±15,68	NT
15 Timol	37,22±4,43	NT	214,33±13,26	NT
16 <i>trans</i> -β-Cariofileno	17,77±7,03	26,11±3,07	192,52±39,99	NT
17 Eugenol	55,65±6,29	268,62±40,28	47,97±16,17	NT
NFX	17,63±3,22	NT	ND	ND
AmB	ND	ND	65,66±14,94	NT

CC: Concentración; NT: No tóxico a la máxima concentración evaluada; ND: No determinado; NFX: Nifurtimox; AmB: Anfotericina B.

8.3 ACTIVIDAD EN *T. Cruzi*

8.3.1 Actividad de los componentes. De los componentes evaluados 64,70% fueron activos en epimastigotes de *T. cruzi* (Tabla 13). Los compuestos ρ -cimeno (IS: 4,11), S-(+)limoneno (IS: 3,85), α -pineno (IS: 4,22), geranial (IS: 29,87), citral (IS: 4,62), alcanfor (IS:10,90), 1-8 cineol (IS: 37,09), carvacrol (IS: 9,50), timol (IS: 111,03), *trans*- β -cariofileno (IS: 6,13) y eugenol (IS: 13,60) mostraron IS mayores que 3, indicando la actividad selectiva de estos componentes en las formas extracelulares de *T. cruzi* (Tabla 13).

En las formas intracelulares 29,41 % de los compuestos evaluados mostraron alguna actividad. Los componentes α -pineno (CI_{50} :1,92 μ g/mL), S- carvona (CI_{50} :6,05 μ g/mL), carvacrol (CI_{50} :27,26 μ g/mL) y timol (CI_{50} : 3,16 μ g/mL) presentaron actividad. Algunos componentes mostraron selectividad en su efecto tales como α -pineno, S-carvona y timol con IS de 6,01, 42,24 y 11,79 respectivamente (Tabla 13).

El *trans*- β -cariofileno fue activo en amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (CI_{50} :25,13; CI_{90} :71,07 μ g/mL), sin embargo, esta actividad no fue selectiva (IS: 0,71).

La mayoría de los componentes con actividad en amastigotes intracelulares mostraron también ser activos en formas extracelulares. Interesantemente el componente S-carvona mostró actividad parcial y selectiva únicamente en los amastigotes intracelulares de este parásito (CI_{50} :27,26 μ g/mL, IS: 42,24).

8.3.2 Actividad de los componentes con respecto al Nifurtimox. Los componentes timol y citral mostraron valores de CC_{50} en epimastigotes menores al medicamento de referencia; sin embargo, la CC_{90} fue hasta 9 veces mayor que la del Nifurtimox (Tabla 13). El 1-8 cineol mostró actividad similar al Nifurtimox ($p= 0.2$).

Los componentes geranial, 1-8 cineol y timol mostraron una mayor selectividad para los epimastigotes que el medicamento de referencia, presentando IS entre 29,87 y 111,03. La actividad del Nifurtimox en las formas intracelulares fue hasta 40 veces mayor con respecto a los componentes parcialmente activos, tales como α -pineno, S- carvona, carvacrol y timol y que el *trans*- β -cariofileno, componente que mostró actividad en las dos formas parasitarias. La selectividad de la S-carvona fue mayor que la del Nifurtimox.

8.3.3 Actividad de los componentes en *T. cruzi* versus células Vero. Los componentes que no mostraron actividad en parásitos tampoco fueron tóxicos en células Vero. Los componentes que fueron activos como el α -terpineno, γ -terpineno, R-carvona y S-carvona en las formas extracelulares o el p-cimeno, R (+) limoneno y carvacrol en las formas intracelulares, mostraron actividades similares en las células Vero todas reflejadas en $IS \leq 1$ (Tabla 12 y 13).

El *trans*- β -cariofileno mostró mayor actividad en las formas extracelulares del parásito que en células Vero ($IS=6,13$) pero no en amastigotes intracelulares donde su actividad fue similar ($p=0,18$) presentando $IS=0,61$.

Tabla 13. Actividad de componentes en *T. cruzi*

Componente	µg/mL (±DE)						
	Epimastigotes			Amastigotes intracelulares			
	CI ₅₀	CI ₉₀	IS	CI ₅₀	CI ₉₀	IS	
1	ρ-Cimeno	28,10±0,07	37,67±1,38	4,11	190,45±50,44	NA ⁴	0,61
2	α-Terpineno	219,71±1,91	250,44±1,77	0,61	NA	NA	NC ⁵
3	γ-Terpineno	162,91±38,24	195,62±30,20	0,59	NA	NA	NC
4	R-(+)Limoneno	38,71±4,14	73,03±26,03	2,72	145,94±51,96	NA	0,72
5	S-(+)Limoneno	29,49±0,37	38,24±3,67	3,85	NA	NA	NC
6	α-Pineno	2,74±0,38	3,15±1,68	4,22	1,92±1,86	NA	6,01
7	Linalool	30,16±0,24	39,02±7,44	0,87	NA	NA	NC
8	Geranial	3,07±0,24	68,79±4,23	29,87	NA	NA	NC
9	Citral	0,48±0,08	4,92±0,02	4,62	NA	NA	NC
10	R-Carvona	223,18±61,33	NA	0,08	NA	NA	NC
11	S- Carvona	186,43±27,37	NA	1,37	6,05±4,16	NA	42,24
12	Alcanfor	5,87±0,71	110,90±47,81	10,90	NA	NA	NC
13	1-8 Cineol	0,63±0,13	1,71±0,01	37,09	NA	NA	NC
14	Carvacrol	2,98±0,03	3,85±0,04	9,50	27,26±0,83	NA	1,04
15	Timol	0,34	10,77±0,07	111,03	3,16±0,37	NA	11,79
16	<i>trans</i> -β-Cariofileno	2,90±0,37	41,55±2,82	6,13	25,13±0,86	71,07±3,63	0,71
17	Eugenol	4,09±0,50	123,33±34,95	13,60	NA	NA	NC
	NFX	0,91±0,03	1,25±0,01	19,38	0,68±0,16	1,47±0,51	25,98

CI: Concentración inhibitoria; ND: No determinado; IS: Índice de Selectividad; NA: No activo a la máxima concentración evaluada; NC: Índice de selectividad no calculado porque no se contaba con CI₅₀ o CC₅₀; NFX: Nifurtimox

8.4 ACTIVIDAD EN LEISHMANIA

8.4.1 Actividad de los componentes. Se encontró que siete (35,29%) de los componentes evaluados presentaron alguna actividad en promastigotes de *L. chagasi* con CI_{50} entre 2,72 y 45,94 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 14). De ellos los componentes: geranial (CI_{50} : 38,15 $\mu\text{g/mL}$; IS: 6,23), carvacrol (CI_{50} : 33,49 $\mu\text{g/mL}$; IS: 7,63), *trans*- β -cariofileno (CI_{50} : 24,03 $\mu\text{g/mL}$; IS: 8,01) y eugenol (CI_{50} : 12,74 $\mu\text{g/mL}$; IS: 3,77) mostraron efecto selectivo con $IS > 3$ (Tabla 14). En las formas intracelulares de *L. chagasi*, el *trans*- β -cariofileno fue parcialmente activo presentado valores de CI_{50} 56,01 $\mu\text{g/mL}$ y un IS de 3,44. Los componentes eugenol, linalool y limoneno, que habían referido según la literatura efecto sobre algunas especies de *Leishmania*, no mostraron actividad en las formas intracelulares de *L. chagasi* (Tabla 14).

En las formas intracelulares de *L. panamensis* se encontró que el *trans*- β -cariofileno fue activo (CI_{50} : 42,35 $\mu\text{g/mL}$, CI_{90} : 64,90 $\mu\text{g/mL}$) y el carvacrol fue parcialmente activo (CI_{50} : 38,53 $\mu\text{g/mL}$) (Tabla 15).

Los componentes mostraron mejor actividad en amastigotes de *L. panamensis* que en *L. chagasi*. Es así como dos (11,76 %) compuestos revelaron alguna actividad en *L. chagasi* mientras que cuatro (23,52 %) en *L. panamensis*. El *trans*- β -cariofileno mostró actividad en las dos especies de *Leishmania* sin presentar diferencias significativas en sus actividades ($p=0.37$).

8.4.2 Actividad del medicamento de referencia. La actividad de la AmB en *L. chagasi* y *L. panamensis* (CI_{50} entre 0,01 y 6,71 $\mu\text{g/mL}$, IS entre 281 y 6566) fue mayor que la de los componentes evaluados (Tabla 14 y 15). No se encontraron diferencias significativas en su actividad entre las formas extracelulares e intracelulares ($p=0,84$), ni en su actividad entre *L. chagasi* y *L. panamensis* ($p=0,60$).

8.4.3 Relación de la actividad en *Leishmania* versus células THP-1. En *L. chagasi*, cinco compuestos (41,66%) fueron más activos en promastigotes que en las células THP-1 presentando IS mayores de 3. Estos componentes fueron: geranial, carvacrol, timol, eugenol y *trans*- β -cariofileno (Tabla 14). En amastigotes el *trans*- β -cariofileno mostró además un IS mayor que tres. En contraste, dos componentes fueron más activos en células THP-1 que en promastigotes: el R-(+) limoneno y el 1-8 cineol con IS menores que uno y el citral, fue más activo en células THP-1 que en amastigotes intracelulares (Tabla 14).

En *L. panamensis*, tres componentes (17,64%) fueron más activos en amastigotes intracelulares de *L. panamensis* que en células THP-1, tales como: γ -terpineno, carvacrol y *trans*- β -cariofileno (Tabla 15). El carvacrol mostró el mayor IS siendo este de 6,62. En contraste el α -pineno mostró mayor efecto en THP-1 que en amastigotes de *L. panamensis* revelado por IS de 0,55 (Tabla 15).

Tabla 14. Actividad de componentes en *L. chagasi*

Componente	µg/mL (±DE)						
	Promastigotes			Amastigotes intracelulares			
	CI ₅₀	CI ₉₀	IS	CI ₅₀	CI ₉₀	IS	
1	ρ-Cimeno	131,98±42,48	NA ⁴	1,19	NA	NA	NC
2	α-Terpineno	120,81±23,14	NA	1,31	NA	NA	NC
3	γ-Terpineno	149,40±17,16	NA	1,22	NA	NA	NC
4	R-(+)Limoneno	263,71±5,20	NA	0,68	NA	NA	NC
5	S-(+)Limoneno	133,69±8,75	NA	1,61	NA	NA	NC
6	α-Pineno	45,94±1,76	NA	1,25	NA	NA	NC
7	Linalool	59,92±3,18	NA	2,03	NA	NA	NC
8	Geranial	38,15±21,72	NA	6,23	NA	NA	NC
9	Citral	2,72 ±0,85	NA	1,08	215,01±9,23	NA	0,01
10	R-Carvona	157,31±56,50	NA	1,09	NA	NA	NC
11	S- Carvona	NA	NA	NC	NA	NA	NC
12	Alcanfor	218,13±2,21	NA	1,29	NA	NA	NC
13	1-8 Cineol	199,37±36,49	NA	0,94	NA	NA	NC
14	Carvacrol	33,49±10,07	NA	7,63	NA	NA	NC
15	Timol	66,90±8,07	NA	3,20	NA	NA	NC
16	<i>trans</i> -β-Cariofileno	24,03±2,64	NA	8,01	56,01±26,24	NA	3,44
17	Eugenol	12,74±10,28	NA	3,77	NA	NA	NC
	AmB	0,01±0,001	6.71±0.019	6566	0,03±0,001	0.52±0.05	281,33

CI: Concentración inhibitoria; ND: No determinado; IS: Índice de Selectividad; NA: No activo a la máxima concentración evaluada; NC: Índice de selectividad no calculado porque no se contaba con CI₅₀ o CC₅₀; AmB: anfotericina B

Tabla 15. Actividad de componentes en *L. panamensis*

		μg/mL (±DE)		
Componente		Amastigotes <i>L. panamensis</i>		
		CI ₅₀	CI ₉₀	IS
1	ρ-Cimeno	NA	NA	NC
2	α-Terpineno	NA	NA	NC
3	γ-Terpineno	87,13±15,19	NA	2,08
4	R-(+)Limoneno	NA	NA	NC
5	S-(+)Limoneno	NA	NA	NC
6	α-Pineno	103,36±17,73	NA	0,55
7	Linalool	NA	NA	NC
8	Geranial	NA	NA	NC
9	Citral	NA	NA	NC
10	R-Carvona	NA	NA	NC
11	S- Carvona	NA	NA	NC
12	Alcanfor	NA	NA	NC
13	1-8 Cineol	NA	NA	NC
14	Carvacrol	38,53±5,92	NA	6,62
15	Timol	NA	NA	NC
16	<i>trans</i> -β-Cariofileno	42,35±0,11	64,90±2,51	4,54
17	Eugenol	NA	NA	NC
AmB		0,04	0,09	1641,54

CI: Concentración inhibitoria; ND: No determinado; IS: Índice de Selectividad; NA: No activo a la máxima concentración evaluada; NC: Índice de selectividad no calculado porque no se contaba con CI₅₀ o CC₅₀; AmB: anfotericina B

8.5 COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD DE COMPONENTES EN *T. Cruzi* y *L. Chagasi*:

En términos generales los componentes fueron más activos en *T. cruzi* que en las especies de *Leishmania* evaluadas. Mientras que cinco componentes mostraron actividad en epimastigotes y amastigotes intracelulares de *Trypanosoma* (α -pineno, s- carvona, carvacrol, timol y *trans*- β -cariofileno) solo dos (carvacrol y *trans*- β -cariofileno) fueron activos en amastigotes de *L. panamensis* y uno (*trans*- β -cariofileno) en amastigotes de *L. chagasi*.

El carvacrol fue activo en amastigotes intracelulares de ambos parásitos siendo significativamente ($p= 0.02$) más activo en *T. cruzi* (CI_{50} : 27,26 $\mu\text{g/mL}$) que en *L. panamensis* (CI_{50} : 38,53 $\mu\text{g/mL}$)

El *trans*- β -cariofileno fue el componente activo en los tres parásitos evaluados presentado actividades de: CI_{50} :2,90 $\mu\text{g/mL}$ en las formas extracelulares de *T. cruzi*, CI_{50} : 25,13 $\mu\text{g/mL}$ en las formas intracelulares de *T. cruzi* y CI_{50} : 42,35 $\mu\text{g/mL}$ en los amastigotes de *L. panamensis* y CI_{50} : 56,01 $\mu\text{g/mL}$ en amastigotes de *L. chagasi*.

8.6 RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPONENTE VERSUS EL AE QUE LO CONTIENEN: ÌNDICE DE ACTIVIDAD (IA)

El IA se calculó para los componentes los cuales fueron componentes con actividad en los dos géneros de interés.

El α -pineno fue más activo en las formas extracelulares de *T. cruzi* que los AE que lo contienen. En las formas intracelulares los IA mostraron que este componente fue hasta 49,14 veces más activo que el AE de *L. origanoides* (No. 12), y 25,21 veces para el de *P. divaricatum* (No 22). Sin embargo, se estableció que el α -pineno es menos activo en promastigotes de *L. chagasi* que los AE que lo contienen (ver tabla 6 y 16).

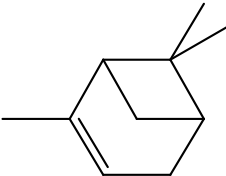
El carvacrol fue más activo en *T. cruzi* que los AE. En epimastigotes fue hasta 10,79 veces más activo que *L. origanoides* (No.11). En amastigotes fue hasta 2,84 veces más activo que el AE de *L. origanoides* (No. 8). Para *L. chagasi* fue 1.88 veces más activo en promastigotes que el AE de *L. origanoides* (No. 8) (ver tabla 6).

El timol fue más activo que los AE en *T. cruzi* hasta 94,61 veces en epimastigotes y 19,20 veces en amastigotes. Para *L. chagasi* no mostró IA ≥ 1 (Ver Tabla 18).

El *trans*- β -cariofileno resultó ser más activo en las formas extra e intracelulares de *T. cruzi* que los aceites de *L. origanoides* (No. 12) y *L. dulcis* (No. 13), que lo contienen (ver tabla 6). Pero fue menos activo tanto en *T. cruzi* como en *L. chagasi* que los aceites de *P. brachypodium* en los que es el mayoritario (Tabla 19).

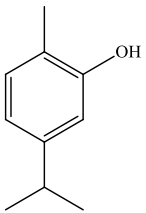
Por la baja actividad de los componentes en *L. chagasi* solo algunos IA pudieron calcularse. Por otra parte como no se contaba con resultados de actividad de los AE en *L. panamensis*, estos IA no pudieron ser calculados.

Tabla 16. Índices de actividad de α -pineno

Componente	Aceite ²	Cantidad relativa (%)	Índice de actividad ¹			
			<i>T. cruzi</i>		<i>L. chagasi</i>	
			Extra celular	Intra celular	Extra celular	Intra celular
	<i>L. origanoides</i> (9*)	3,1	14,62	NC ³	NC	NC
	<i>L. origanoides</i> (12)	2,3	2,84	49,14	NC	NC ⁴
	<i>P. bogotense</i> (20)	8,7	1,92	NC	NC	NC
	<i>P. marginatum</i> (21)	2,5	3,78	NC	0,51	NC
	<i>P. divaricatum</i> (22)	11,4	4,76	25,21	1,59	NC
	<i>P. septuplinervium</i> (24)	2,1	5,05	NC	0,65	NC ⁴
	<i>P. lanceifolium</i> (25)	3,6	2,72	NC	0,82	NC

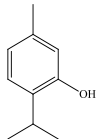
Índice de Actividad¹: Cociente de la $CI_{50}CC_{50}$ del aceite (según la base de datos CINTROP-UIS) sobre la IC_{50} o CC_{50} de los componentes; Aceite²: aceites con α -pineno > 1% en cantidad relativa. NC³: Índice de actividad no calculado porque no se contaba con CI_{50} , NC⁴: Índice no calculado, pero con actividad en el aceite. *: Numeración del aceite según tabla 6.

Tabla 17. Índices de actividad de carvacrol

Componente	Aceite ²	Cantidad relativa (%)	Índice de actividad ¹			
			<i>T. cruzi</i>		<i>L. chagasi</i>	
			Extra celular	Intra celular	Extra celular	Intra celular
<p>Carvacrol</p> 	<i>L. origanoides</i> (7*)	46,2	3,32	1,85	0,40	NC ³
	<i>L. origanoides</i> (8)	36,5	6,60	2,84	1,88	NC
	<i>L. origanoides</i> (11)	38,8	10,79	1,94	0,47	NC

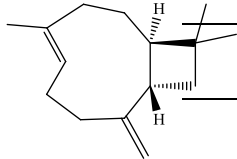
Índice de Actividad ¹: Cociente de la CI₅₀oCC₅₀ del aceite (según la base de datos CINTROP-UIS) sobre la IC₅₀ o CC₅₀ de los componentes; Aceite ²: aceites con α -pineno > 1% en cantidad relativa. NC³: Índice de actividad no calculado porque no se contaba con CI₅₀, *: Numeración del aceite según tabla 6.

Tabla 18. Índices de actividad de timol

Componente	Aceite ²	Cantidad relativa (%)	Índice de actividad ¹			
			<i>T. cruzi</i>		<i>L. chagasi</i>	
			Extra celular	Intra celular	Extra celular	Intra celular
<p>Timol</p> 	<i>L. micromera</i> (6*)	29,1	148,67	19,20	0,77	NC ⁴
	<i>L. origanoides</i> (10)	53,6	31,44	NC ³	0,06	NC ⁴
	<i>L. origanoides</i> (11)	15,1	94,61	16,75	0,23	NC ⁴

Índice de Actividad ¹: Cociente de la CI₅₀oCC₅₀ del aceite (según la base de datos CINTROP-UIS) sobre la IC₅₀ o CC₅₀ de los componentes; Aceite ²: aceites con α -pineno > 1% en cantidad relativa. NC³: Índice de actividad no calculado porque no se contaba con CI₅₀, NC⁴: Índice no calculado, pero con actividad en el aceite. *: Numeración del aceite según tabla 6.

Tabla 19. Índices de actividad de *trans*- β -cariofileno

Componente	Aceite ²	Cantidad relativa (%)	Índice de actividad ¹			
			<i>T. cruzi</i>		<i>L. chagasi</i>	
			Extra celular	Intra celular	Extra celular	Intra celular
 <p><i>trans</i>-β-Cariofileno</p>	<i>L. origanoides</i> (12*)	11,3	2,68	3,75	NC ³	1,04
	<i>L. dulcis</i> (13)	10,4	11,09	2,05	1,54	NC
	<i>P. marginatum</i> (21)	11,1	5,57	NC	3,64	NC
	<i>P. lancefolium</i> (25)	11,6	2,57	NC	1,57	NC
	<i>P. brachypodium</i> (26)	20,2	0,11	NC	0,73	NC
	<i>P. brachypodium</i> (27)	20,2	0,6	NC	0,98	NC

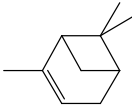
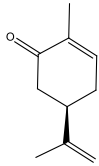
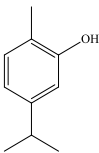
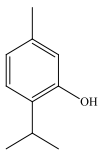
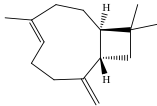
Índice de Actividad¹: Cociente de la CI_{50} o CC_{50} del aceite (según la base de datos CINTROP-UIS) sobre la IC_{50} o CC_{50} de los componentes; Aceite²: aceites con α -pineno > 1% en cantidad relativa. NC³: Índice de actividad no calculado porque no se contaba con CI_{50} , *: Numeración del aceite según tabla 6.

8.7 ANÁLISIS QUIMIO-INFORMÁTICO DE LOS COMPONENTES ACTIVOS

Con el fin de complementar los resultados de actividad obtenidos en este trabajo se realizó este análisis químico informático. Los resultados obtenidos utilizando el software Osiris mostraron la capacidad que tienen los compuestos de causar efectos tóxicos en las células y organismos pluricelulares.

Los componentes α -pineno, carvacrol y *trans*- β -cariofileno no mostraron en su estructura fragmentos que estuvieran relacionadas con efectos tóxicos o mutagénicos. Sin embargo, mostraron riesgo medio y alto para efectos irritantes. El componente S-carvona mostró riesgo alto y medio para todos los parámetros de toxicidad. El timol presentó riesgo alto de causar mutagenicidad y efectos reproductivos y riesgo bajo de tumorigenicidad y efectos irritantes (Ver Tabla 20).

Tabla 20. Predicción del riesgo de toxicidad de componentes estudiados

Componente	Nivel de riesgo			
	Mutagenicidad	Tumorigenicidad	Efectos irritantes	Efectos reproductivos
<p>α-Pinoeno</p> 	bajo	bajo	alto	bajo
<p>S- Carvona</p> 	alto	alto	alto	medio
<p>Carvacrol</p> 	bajo	bajo	alto	bajo
<p>Timol</p> 	alto	bajo	bajo	alto
<p><i>trans</i>-β-Cariofileno</p> 	bajo	bajo	medio	bajo

9. DISCUSION

Los AE han sido utilizados desde épocas milenarias por la medicina tradicional principalmente como analgésicos, antiinflamatorios, antirreumáticos y en el tratamiento de procesos infecciosos de diversa índole. La actividad de los AE frente a microorganismos patógenos ha sido demostrada en varios estudios y algunos han establecido su efecto frente a especies de *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma* (Rosa et al, 2003; Ueda Nakamura 2006; Santoro et al, 2007 (A); Santoro et al 2007 (B); Bakkali et al, 2008; Santos et al, 2008; Nibret et al, 2010). El presente trabajo tiene como antecedente un estudio realizado en Colombia, en donde se obtuvieron AE de plantas distribuidas en varios departamentos del territorio colombiano y se evaluaron contra parásitos y células. Un porcentaje considerable de los AE fueron activos frente a formas extracelulares de *T. cruzi* y *L. chagasi* y una menor proporción mostró efecto en las formas intracelulares. Dado que cada uno de los AE evaluados tenía su respectivo cromatograma fue posible conocer sus constituyentes químicos. A partir de esta información se diseñó un proceso de selección de acuerdo a criterios de actividad y disponibilidad que fue aplicado y cuyo resultado permitió evaluar 17 componentes de los AE.

De los componentes evaluados, el que presentó una mejor actividad en los parásitos fue el *trans*- β -cariofileno. Los estudios de actividad biológica de este componente son escasos, sin embargo, se conocen algunas características y usos importantes. Es un terpeno bicíclico, que se encuentra abundantemente en AE de diversos géneros de plantas. Estudios anteriores han reportado el alto contenido de este compuesto en AE obtenidos de *Eugenia caryophyllata*, *Piper nigrum*, *Zingiber mimmonii*, *Copaifera reticulata* y *Cordia verbenácea* (Sabulal et al, 2006; Fernandes et al, 2007; Di Sotto et al, 2008). En este estudio esta sustancia estuvo presente como componente mayoritario en AE obtenidos de *L. organoides*, *L. dulcis*, *P. marginatum*, *P. lancefolium* y *P. brachypodom*. Reportes previos de actividad biológica han revelado que el *trans*- β -cariofileno tiene potente capacidad

antiinflamatoria, antigenotóxica, anticarcinogénica y antiproliferativa en células tumorales así como efecto citotóxico a altas concentraciones, es así como se ha establecido su uso seguro como agente olorzante y saborizante en productos comerciales (Zhneg et al, 1992; Fernandes et al, 2007; Legault et al, 2007; Passos et al, 2007; Di sotto et al, 2008, Loizzo et al, 2008). En el presente estudio el *trans*- β -cariofileno fue tóxico en las células Vero pero no en células THP-1, sugiriendo cierta especificidad en su actividad. Se hacen necesarios estudios posteriores para determinar las toxicidades de este compuesto en otras líneas celulares tumorales y no tumorales. Existen pocos reportes de actividad antimicrobiana de este compuesto, su actividad en *T. brucei* con baja selectividad ha sido establecida (Nibret et al, 2010), siendo concordante con los efectos mostrados por este compuesto. Las investigaciones proponen que la alta lipofilicidad y la fuerte interacción de sus grupos metileno terminales con los grupos SH de las proteínas podría explicar su actividad tripanocida y citotóxica (Wink , 2008). Los resultados encontrados en este estudio sobre la actividad en *T. cruzi* y *Leishmania* de *trans*- β -cariofileno constituyen un hallazgo muy interesante dado que no existen reportes previos. Es así como se hace necesario continuar y complementar los estudios *In vitro* con este componente.

El carvacrol mostró actividades selectivas en formas de *T. cruzi* y amastigotes intracelulares de *L. panamensis*. Respecto a esta compuesto se conoce que es un terpeno fenólico presente en AE de especies de plantas, entre ellas el *Chenopodium ambrosoides* y *Origanum vulgare*, actualmente es usado en la industria alimenticia y cosmética. Posee una amplia actividad antibacterial principalmente en enterobacterias y bacilos Gram positivos (Ultee et al, 2002; Burt et al, 2004). No existen reportes previos de actividad en *T. cruzi*, sin embargo, estudios previos *In vitro* e *In vivo* en *T. brucei* establecieron su potente efecto inhibitorio (Nibret et al, 2010). Por otra parte, la posible actividad parcial en formas de *L. chagasi* y *L. panamensis* del carvacrol hallada en el presente trabajo, es concordante con la literatura. Estudios previos han establecido el efecto de AE

ricos en carvacrol en promastigotes de *L. chagasi* y *L. amazonensis* traducido en acumulaciones lipídicas en el citoplasma y lesiones extensivas en la integridad de la membrana de los parásitos tratados con este componente. Los efectos antimicrobianos parecen ser atribuidos a la alteración de la biosíntesis del ergosterol como consecuencia de la incorporación e impermeabilización a las membranas celulares por su alta hidrofobicidad (Ueda-Nakamura et al, 2006; Monzote et al, 2009; Oliveira et al, 2009; Santin et al, 2009; Ahmad et al, 2011). Este componente mostró toxicidad en células Vero, estudios previos soportan los anteriores hallazgos demostrando la actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales (Monzote et al, 2009). Contradictoriamente, potentes efectos antigenotóxicos y antimutagénicos de este compuesto también han sido documentados por lo que actualmente junto con otros terpenos como timol son fuertes candidatos como agentes quimiopreventivos (Vicuña et al, 2010). El perfil de actividad de este componente y los hallazgos del presente estudio proponen al carvacrol como un compuesto con actividad promisorio en los parásitos de interés.

En este estudio el timol un fenol, mostró efecto selectivo en formas de *T. cruzi*. Su actividad frente a este parásito ha sido ampliamente documentada y atribuida a su hidrofobicidad y al grupo hidroxilo que actúa como atrayente de electrones (Ultee et al. 2002, Burt, 2004, Robledo et al, 2005; Santoro et al, 2007; Medeiros et al, 2011). A pesar de sus efectos selectivos y de no mostrar citotoxicidad en las líneas celulares evaluadas, los análisis quimioinformáticos establecieron al alto riesgo de esta sustancia de causar efectos mutagénicos y teratogénicos. Las investigaciones previas han establecido sus efectos tóxicos en linfocitos humanos y la genotoxicidad revelada por su potente capacidad para causar aberraciones cromosómicas y alterar el índice mitótico de las células al parecer por su capacidad de interactuar fuertemente con el ADN (Bakkali et al, 2008; Buyucleyla et al, 2009). Por los hallazgos del presente estudio y los reportes previos se propone al timol como una molécula fuente, susceptible de mejoramiento químico para

potenciar su actividad en los parásitos de interés y disminuir sus efectos tóxicos como ha sido demostrado en estudios anteriores (Robledo et al, 2005).

Este estudio también mostró la selectividad de la S- carvona en el efecto inhibitorio sobre amastigotes de *T. cruzi*. Este terpeno tipo cetona está presente en AE de *Carum carvi*, *Anethum graveolens*, *Menta spicata* entre otros; posee un amplio rango de actividades biológicas (Carvalho et al, 2006). La actividad en los parásitos de interés no ha sido establecida, sin embargo, ha mostrado efecto inhibitorio en *T. brucei* (Nibret et al, 2010). Por otra parte, los hallazgos encontrados en el presente trabajo sobre la toxicidad de este compuesto fueron contradictorios dado que no se encontraron efectos tóxicos en las líneas celulares evaluadas, pero según el análisis quimioinformático la S-carvona muestra riesgo alto de efectos mutagénicos, tumorigénicos e irritantes. Sin embargo, las investigaciones *In vitro* sobre la genotoxicidad y mutagenicidad establecen que este componente si bien tiene efectos tóxicos en células HepG-2 a muy bajas concentraciones, no es genotóxico y que por el contrario presenta actividad anticarcinogénica (Carvalho et al, 2006; Bakkali et al, 2008). Con estos hallazgos se hace necesario continuar y mejorar los estudios sobre la actividad biológica de la S-carvona como un fuerte agente antiprotozoal.

Similarmente el α -pineno mostró efecto selectivo en *T. cruzi*. Respecto a este compuesto su actividad antimicrobiana y específicamente protozoal no se conoce, sin embargo, ha sido establecido que no posee efectos tóxicos o mutágenicos que en este trabajo fueron concordantes con la carencia de efectos citotóxicos y una selectividad alta (Gomes- Carneiro et al, 2005). Estos hallazgos plantean la necesidad de realizar mayores estudios sobre su efecto en los parásitos de interés y proponen a α -pineno como un candidato para continuar en la fase de descubrimiento de medicamentos para estas parasitosis.

Componentes tales como linalool, limoneno y eugenol no mostraron actividad en las formas extracelulares de los parásitos, estos resultados son concordantes con estudios previos en *T. cruzi* y *Leishmania* (Rosa et al, 2003; Ueda-Nakamura et al, 2006; Santoro et al, 2007; Arruda et al; 2009). Sin embargo el linalool y eugenol fueron tóxicos para las células Vero y THP-1 respectivamente. Estos hallazgos son contradictorios con la actividad previa referida y con los usos industriales de estos compuestos. Por una parte, el linalool un alcohol monoterpenico es de amplio uso en la industria cosmética y su citotoxicidad en células Hep-G2 ha sido establecida (Di sotto et al, 2008; Usta et al, 2009,) así como su efecto antigenotóxico y antitumoral (Di Sotto et al, 2008; Mitić-Ćulafić et al, 2009). Del mismo modo el eugenol es un componente con amplio uso en la industria cosmética y de productos odontológicos y ha sido considerado por la FDA como una sustancia segura. Está presente en AE de diversos géneros de plantas como *Syzygium aromaticum*, *Dicypelium cariophyllatum*, *Pimenta dioica*, *Croton zehntneri* var. *eugenoliferum*, *C. zehntneri* entre otras (De Vincenzi et al, 2000). Posee efectos antibacteriales, antigenotoxicos y antitumorales (Nakamura et al, 1999; Burkey et al, 2000; Fujisawa et al, 2002). Los hallazgos de la citotoxicidad de estos compuestos podrían sugerir mayores estudios en otros campos de actividad biológica.

Hallazgos previos establecen que compuestos como el p-cimeno y timol tienen actividad *In vitro* frente a *Leishmania* (Mikus et al, 2000; Rosa et al, 2003, Robledo et al, 2005; Ueda Nakamura 2006; Graebin et al, 2010; Medeiros et al, 2011). Sin embargo en esta investigación dicha actividad no fue revelada en las formas de *L. chagasi* o *L. panamensis*. La diferencia en la susceptibilidad entre especies de *Leishmania* reflejada por las variaciones en las concentraciones inhibitorias *In vitro* de medicamentos de referencia, así como en la eficacia clínica de los tratamientos podría explicar este hecho.

En este trabajo se encontró que los componentes más activos en los parásitos de interés tales como timol, carvacrol y *trans*- β -cariofileno correspondían a mayoritarios de algunos AE del género *Lippia* y *Piper*; sin embargo, otros como α -pineno que también presentó actividad, eran componentes trazas de otros AE. La literatura plantea que los componentes mayoritarios definen la fragancia, la densidad, la textura, el color, la penetración celular de un AE. Así como también reflejan actividad biológica similar a la del AE cuando son evaluados solos y que la magnitud del efecto depende de las concentraciones usadas y las cantidades relativas contenidas en el AE (Ipek et al, 2005; Bakkali et al, 2008). Sin embargo, al encontrar estos resultados podría pensarse que la actividad en los AE seleccionados pudiera ser en algunos casos fuertemente atribuida al potencial de sus constituyentes mayoritarios, pero en otros resultar la sumatoria de las actividades de todos y cada uno de sus componentes, aún de aquellos en cantidades trazas. Es así como los estudios de comparación de actividad de los AE y sus constituyentes proponen a los sinergismos entre componentes y a la actividad de los mayoritarios modulada por los minoritarios, como los mecanismos que explicarían la magnitud de los efectos biológicos de un AE (Bakkali et al, 2008; Santoro et al, 2007 (a); Santoro et al, 2007(b); Graebin et al, 2011; Nibret et al, 2010; Medeiros et al, 2011).

Analizando los efectos tóxicos controvertidos encontrados en las actividades de componentes como timol, linalool, eugenol, carvona y carvacrol es posible decir que esta dualidad en su toxicidad ya ha sido referida principalmente en compuestos naturales con grupos fenoles, aldehídos o alcoholes dado que pueden comportarse como potentes antioxidantes o prooxidantes de acuerdo a la concentración y el tipo de célula sobre el cual se encuentren (Fujisawa et al, 2002; Bruni et al, 2003; Sacchetti et al, 2005; Bakkali et al, 2008).

El presente estudio permitió establecer la actividad antiparasitaria y selectiva *In vitro* de 5 de 17 componentes de AE evaluados. Los modelos *In vitro* usados en

esta investigación han sido referidos por numerosos autores y considerados como la metodología ideal a realizarse en las fases iniciales de la búsqueda de medicamentos a partir de productos naturales. Las ventajas de la evaluación de la actividad en las formas extra e intracelulares de los parásitos incluyen el amplio set de compuestos blanco presentes en los microorganismos de interés y la representación de una situación biológica real, como es el encuentro entre el microorganismo con sus barreras biológicas y el compuesto candidato. Así mismo la simultaneidad de pruebas de toxicidad en las células hospederas indicando su posible efecto antimicrobiano discriminatorio *In vitro*, indispensable para avanzar en la evaluación en modelos *In vivo* (Buckner et al, 1996; Maes et al, 2004; Cos et al, 2006). Es así como el presente estudio permitió establecer la actividad antiparasitaria y selectiva *In vitro* de 5 de 17 componentes de AE evaluados.

10. CONCLUSIONES

Los componentes de los AE evaluados en el presente estudio pertenecen a diversos grupos químicos y mostraron varios tipos de actividad; por ello como parte de las conclusiones del presente estudio se elaboró y se propone un cuadro de análisis de actividad biológica que permitiera identificar claramente el perfil de actividad de los 17 componentes evaluados para sus posibles usos en investigaciones futuras. (Ver tabla 21)

Los hallazgos de este estudio representan un importante avance en la línea de productos naturales del grupo de Quimioterapia- CINTROP y del proyecto CENIVAM. De este modo se proponen tres componentes puros con actividad promisorio en *T. cruzi* y las especies de *Leishmania* evaluadas a partir de la composición química de 27 AE activos: *trans*- β -cariofileno, α -pineno y carvacrol

El componente *trans*- β -cariofileno presentó la mayor actividad en todas las formas de los parásitos evaluadas y a pesar de la citotoxicidad en la línea celular Vero, se considera que es un compuesto líder en la búsqueda de medicamentos para el tratamiento de la leishmaniasis y la enfermedad chagas.

El presente estudio propone a los componentes α -pineno y carvacrol como candidatos para continuar los estudios de desarrollo de medicamentos frente a *T. cruzi* y *Leishmania* por sus perfiles de actividad en formas extra e intracelulares y su bajo nivel de toxicidad.

El componente timol mostró actividad selectiva en *T. cruzi*. Dado que puede ser altamente mutagénico y tumorigénico constituye una molécula base para modificaciones químicas que mejoren su actividad selectiva en los parásitos de interés.

Se encontró que la S-carvona tiene actividad selectiva en formas intracelulares de *T. cruzi*, pero por sus posibles efectos tóxicos revelados por la quimioinformática, es necesario ampliar los estudios relacionados.

El presente estudio propone nueve componentes que no presentan actividad tóxica en células de mamífero y que son una fuente de moléculas cuya actividad biológica en otros campos puede ser evaluada tales como la antigenotoxicidad y antimutagenicidad.

Se encontró que los componentes linalool, citral y eugenol fueron tóxicos en las líneas celulares evaluadas, por lo que su actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales puede ser establecida.

La relación de la actividad biológica de los componentes con respecto a los AE que los contienen establecida en este estudio, reveló que al evaluar los componentes de una mezcla natural bioactiva como lo es un AE pueden presentarse: el aumento de la actividad biológica del componente dado que en el AE su efecto puede ser modulado por otros componentes y disminución o pérdida de la actividad por los efectos aditivos o sinérgicos con los otros constituyentes en la mezcla original.

Tabla 21. Análisis de actividad biológica de componentes de aceites esenciales evaluados en el presente estudio.

		células				<i>T. cruzi</i>				<i>L. chagasi</i>				<i>L. panamensis</i>	
		Vero		THP-1		epi		amas		prom		amas		amas	
		CC ₅₀	CC ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀
1	ρ-Cimeno														
2	α-Terpineno														
3	γ-Terpineno														
4	R-(+)Limoneno														
5	S-(+)Limoneno														
6	α-Pineno														
7	Linalool														
8	Geranial														
9	Citral														
10	R-Carvona														
11	S- Carvona														
12	Alcanfor														
13	1-8 Cineol														
14	Carvacrol														
15	Timol														
16	trans-β-Cariofileno														
17	Eugenol														
	NFX														
	AmB														

Epi: Epimastigotes; amas: Amastigotes; prom: Promastigotes; CC₅₀: Concentración Citotóxica 50; CC₉₀: Concentración citotóxica 90; CI₅₀: Concentración Inhibitoria 50, CC₉₀: Concentración Inhibitoria 90; celdas en azul: Representan componentes no activos; Celdas en verde claro: representan componentes activos solo por la CC o CI₅₀; Celdas en verde oscuro: representan componentes activos por concentraciones 50 y 90; Celdas en verde oscuro con líneas oblicuas: representan componentes activos con IS mayor a los medicamentos de referencia; Celdas en blanco: no aplica

BIBLIOGRAFIA

AHMAD A, Khan A. Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30:41–50.

AMES B, Shigenaga M, Hagen T. Oxidants-antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 390: 7915–7922.

ANTHONY J, Fyfe L. Smith H. Plant active components- a resource for antiparasitic agents?. *Trends Parasitol* 2005; 21(10):462-467

ARRUDA D, D'Alexandri F, Katzin A, Uliana S. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49: 1679-1687

ARRUDA D, Miguel D. Yokoyama-Yasunaka J, Katzin A. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomed Pharmacother* 2009; 63: 643-649

BAKKALI F, Averbeck S. AVERBECK D, Idaomar M. Biological effects of essential oil- A review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 446-475

BAKKALI F, Averbeck S. AVERBECK D, Zhiri A, Idaomar M. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 2005; 585: 1–13.

BIRT D, Hendrich S, WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Therap* 2001; 90: 157–177.

BRUNI R, Medici A. ANDREOTTI E, Fantin C. MUZZOLI M Dehesa M. Chemical composition and biological activities of *Isphingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) *Kosterm.* (Lauraceae) flower calices. *Food Chem* 2003; 85: 415–421

BUCKNER, F, Verlinde C, La Flamme A, Van Voorhis W. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2592–2597.

BURKEY J, Sauer J. McQueen C, Sipes I, 2000. Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutat Res* 2000; 453: 25–33

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223–253.

Burt SA, Reinders RD *In vitro*. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. 2003 *Lett Appl Microbiol* 36: 162–167.

BUYUKLEYLA M, Rencuzogullari E. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicol Environment* 2009; 72: 943-947.

CARVALHO C, Fonseca M. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry* 2006;95: 413–422.

CELIK TAS O, Kocabas E, Bedir, E, Sukan V, Ozek T, Baser K. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 2007; 100: 553–559.

Center for Diseases Control and Prevention. Parasites-Leishmaniasis. 2010. Consultado en: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>. Acceso: Enero 25 de 2011.

Center for Diseases Control and Prevention. Parasites-American tripanosomiasis (also know Chagas diseases), 2010 consultado en : <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>. Acceso: 20 de febrero de 2011.

Clark S. The biochemistry of antioxidants revisited. *Nutr. Clin. Pract.* 2002;17: 5–17.

COS P, Vlietinck A, VANDEN D, Maes L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. *J Ethnopharmacol* 2006; (106):290-302.

COURA J, Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systematic review. *Acta Tropica* 2010; 115:5-13.

CROFT S, Barret M, Urbina J. Chemotherapy of tripanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005; 21 (11):508-512.

CROFT S, Coombs G. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003;19 (11):502-506.

CROFT S, Neal R, Pendergast W, Chan J. The activity of alkylphosphocholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 1630-1634.

CROFT S, Seifert k. Yardley V. Current scenarie of drug development for leishmaniasis. Indian J. Med Res 2006; 123:399-410.

CROFT S, Sundar S. Fairlamb A. Drug resistance in leishmaniasis. Clin. Microbiol. Rev 2006; 19: 111–126.

DAVIES C, Reithninger R, Campbell D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. Cau de saú de pública 2010; 16(4):925-950.

DE SOUZA W. From the cell biology to development of new chemotherapeutic approaches against Tripanosomatids: dreams and reality .Kinetoplastid biology and Disease 2002; 1.

DE VINCENZI M. Silano M, Stacchini P, Scazzocchio B. Constituents of aromatic plants: I. Methyleugenol. Fitoterapia 2000; 71:216–221.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 2004; 27: 307-318

DEVELOUX M, Lescure F, Le loup G, Pialoux G. Chagas disease. La revue de medècine interne. 2009; 30: 686-695.

Di Pasqua R, Hoskins N, Betts G, Mauriello G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. J Agric Food Chem 2006; 54: 2745–2749.

DI SOTTO A, Evandri M. Mazzanti G. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. Mutat Res 2008;653:130–133.

DIAZ, F, Estrada. S, Franco L, Jaramillo J, Maestre A, Ospina S, et al. Microbiología de las Infecciones Humanas. 1ª edición, Medellín, Colombia: Corporación Para Investigaciones Biológicas (CIB) 2007.

ELLIS M, Bernsen R, Ali –Zadeh H. A safety and feastibility study comparing intermittent high dose with daily standard dose liposomal Amphotericine B for persistent neutropenic fever amphotericine B: spectrum and resistance. J Med Microbiol 2005: 49 (1):7-10.

ELOFF J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica 1998; 64: 711–713.

ESCOBAR P, Herrera L, Leal S, Duran C, Sasthenko E. Composición química y actividad antitripanosomal de aceites esenciales obtenidos de *Tagetes* (Fam: Asteraceae), recolectados en Colombia. Salud UIS 2009; 41: 280-286.

ESCOBAR P, Leal S, Herrera L, Martinez J, Sasthenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippias* spp essential oils and their major components. Mem inst Oswaldo Cruz 2010; 105 (2):184-190.

FERNANDES E, Pasos G, MEDEIROS R, Cunha F, Ferreira J, et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenaceae*. Eur J Pharmacol 2007; 569: 228-236.

FUJISAWA S, Atsumi T, Kadoma Y, Sakagami H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol related compounds and their cytotoxicity. Toxicology 2002; 177:39-54.

GHUL F, Restrepo M, ANGULO V, Antunez C, Campbell-Lendium D, Davies C. Lesson for a national survey for a Chagas disease transmission in Colombia. Trends Parasitol 2005; 21: 259-262.

GHUL, Felipe. Chagas diseases in Andean countries. Mem inst Oswaldo Cruz 2007; 102 (1): 29-37.

GOMES- Carneiro M, Viana M, Felzenszwalb I, Paumgarten F. Evaluation of β -myrcene, α -terpinene and (+) - and (-)-pinene in the Salmonella/microsome assay. Food Chem Toxicol 2005; 43: 247–252.

GOTO H, Lauletta J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther 2010;8(4); 419-433

GRAEBIN C, Madeira M, Yokoyama-Yasunaka J, Miguel D, Uliana S, Benitez D, et al. Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives against *Leishmania* and *Trypanosoma*. Euro J Med Chem 2010; 45: 1524–1528.

HUSSAIN R, Nouri A, Oliver R. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. J Immunol Meth 1993;160: 89 -96.

Instituto Nacional de Salud. Informe Epidemiológico Leishmaniasis: Periodo epidemiológico XIII, actualización de casos a marzo 31 de 2009. Comportamiento de los casos de *Leishmania* notificados al SIVIGILA hasta el año 2009.

Instituto Nacional de salud. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vectores. Sivigila (Semana epidemiológica 25) 2010.

Instituto Nacional de salud. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vectores. Sivigila (Semana epidemiológica 26)2010.

IPEK E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu B, Kurkcuoglu M, Husnu Can Baser, K.. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. Food Chem. 2005; 93: 551–556.

JANNIN J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. Mem InsOswaldo Cruz 2007;102 (1): 95-97.

KHORO T, Tanaka T. Murakami T, Wada Y, Aburatani H, et al. A comparison of differences in the gene expression profile of Phorbol 12-myristate-13 acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte- derived macrophage. J Atheroscler Thromb 2004; 11 (2): 88-97.

KIUCHI F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. J Natural Products 2002; 65(4):509-512.

KUHLENCORD A, Maniera T, Eibl H, Unger C.Hexadecyl phosphocholine; Oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. Antimicrob Agents Chemother 1992; 63:1630-1634.

LEGAULT J, Pichette A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel, J Pharm Pharmacol 2007; 5 :1643–1647.

LOIZZO M, Tundis R, Menichini F, Saab A, Statti G, Menichini F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. Cell Prolif 2008; 41: 1002–1012.

LUNA KP, Jaramillo CL, Gutierrez R, Esteban L, Angulo VM. Aislamiento de *T. cruzi* en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas por medio de hemocultivo y xenocultivo. Biomédica 2003; 23:119.

LUNA KP, Jaramillo CL, Hernández G, Gutiérrez R, Vallejo GA, Angulo VM. ITS–RFLP-and RAPD-based genetic variability of *Trypanosomacruzi*, human and vector strains in Santander (Colombia). Parasitol Res 2009; 105: 519-28.

MAES L, Vanden Berghe D, Germonprez N, Quirijnen L, Cos P, De Kimpe N, Van Puyvelde L. *In vitro* and *In vivo* activities of a triterpenoid saponin extract (PX-

6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 130–136.

MAYA J, Cassels B, Iturriaga P, Ferreira J, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with mammalian host. Comp Biochem Physiol 2007 Part A; 146:601-620.

MEDEIROS M, Silva A, Gracas A, Raposso A, Lima S et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Parasitology International 2011; article in press

MIKUS, J, M. Harkenthal. D. Steverding, J. Reichling. Effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. Planta Med. 2000; 66: 366–368.

MITIĆ-ĆULAFIĆ D, Žegura B, Nikolić B, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J, Filipič M. Protective effect of linalool, β -myrcene and eucalyptol against *t*-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. Food Chem Toxicol. 2009;74(1):260-266.

MITROPOULUS P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: Update review of current and future diagnosis and treatment. J Am. Acad Dermatol 2010; 63 (2): 308-322.

MODABBER F, Buffet P, Toreele E, Milon G, Croft S. Consultative meeting for develop a strategy of cutaneous leishmaniasis. Kinetoplastide biology and diseases 2007;6:3

MONZOTE L, Montalvo A, Almanonni A, Scull R. Et al. Activity of essential oil from *Chenopodium ambrosoides* growth in Cuba against *Leishmania amazonensis*. Chemotherapy 2006; 52:130-136.

MONZOTE L, Stamberg W, Staniek K, Gille L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 240: 337–347.

MORALES M, Morillas F, Martin J, Valero A, Navarro MC. Activity of (-)- α -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. Phytomedicine 2010; 17:279-281.

MULLER W, Lorber P, Haley B, Johnson K. Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla*: effect on oxygen uptake by mitochondrial preparations. Torrey Bot. Club 1969; 16: 89-95.

NAKAMURA, C, Ueda-Nakamura. T, Bando E, Melo A, Cortez D, Dias B. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1999; 94: 675–678.

NAVIN T, Arana B. Arana F, Berman J, Chacon J. Placebo controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus Ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. J Infect Dis 1992; 165:528-534.

NIBRET E, Wink M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. Phytomedicine 2010; 17(12):911-920.

OLIVEIRA V, Moura D. Lopes J, De Andrade P, Da Silva N, Figueiredo R. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham. and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. Parasitol Res 2009; 104:1053–9.

Organización Mundial de la Salud. Consejo ejecutivo 118º reunión: Control de la Leishmaniasis, 2006

Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva n° 340. La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), 2010

Organización Panamericana de la salud. Leishmaniasis: Actualización 2007. Consultado en: <http://www.ops-oms.org/Spanish/AD/DPC/CD/leish-2007.htm>. Acceso: 10 Diciembre de 2010.

OSORIO E, Robledo S. ARANGO G, Muskus C. *Leishmania*: papel de la glicoproteína P en la mediación de resistencia a medicamentos y estrategias de reversión. Biomedica 2005; 25:242-260.

OUSSALAH M, Caillet S. Lacroix M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 2006; 69: 1046–1055.

PALUMBO E. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: A Review. Am J Therapeutics 2009; 16: 178-182.

PASSOS G, Fernandes E. Cunha F, Ferreira J, Pianowski L, Campos M, Calixto J. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. J Ethnopharmacol 2007; 110: 323–333.

ROBLEDO S, Osorio E. MUÑOZ D, Jaramillo L. RESTREPO A, et al. *In Vitro* and *In Vivo* Cytotoxicities and Antileishmanial Activities of Thymol and Hemisynthetic Derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 94 (4):1652-1655.

ROCHA L, Almeida J. MACEDO R, Barbosa-Filho J. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005;12: 514-35.

ROSA M, Mendoca-Filho R. Bizzo H, Rodrigues I, et al. Antileishmanial Activity of a linalool-Rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47 (6):1895-1901.

SABULAL B, Dan M. Jhon A, Rajani K, Pradeep N, Valsamma R, George V. Caryophyllene-rich rizome oil of *Zingiber nimmoni* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry*. 2006; 67: 2469-2473.

SACCHETTI G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chem* 2005; 91: 621–632.

SAENZ R, Paz H, BERMAN J. Efficacy of ketoconazole against *L. panamensis* cutaneous Leishmaniasis. *Am J Med* 1990; 58:25-32.

SANTIN M, dos Santos A. Nakamura C, Dias Filho B, Ferreira I, Ueda- Nakamura T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* 2009; 105:1489–96.

SANTORO Y, Cardoso M. GUIMARAES L, Mendoca L, et al. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oil of *Achilleum millefolium*, *Syzygium aromaticum*, *Ocimum basilicum* on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2007; 116: 283-290.

SANTORO Y, Cardoso M. GUIMARAES S, Salgado A. et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris*) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (protozoa:Kinetoplastida) Growth and ultrastructure. *Mutation Research* 2007; 100:783-790.

Santos A, Ueda Nakamura T, Dias Filho B, Vega Junior V, et al. Effect of Brazilian *Copaiba* oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* 2008; 120:204-208.

SCHELZ Z, Hohmann J. MOLNAR J. Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. In: Chattopadhyay D, editor. *Ethnomedicine: a Source of Complementary Therapeutics*. Kerala, India: Research Signpost; 2010: 281–304.

SCHMUNIS G, Yadon Z. CHAGAS disease: A Latin American Health problema becoming a world health problem. *Acta Tropica* 2010; 15(1):14-21

SCHOFIELD C, Janin J. The future of chagas diseases control. *Trends Parasitol* 2006; 22: 583-588.

SHARLOW E, Grogl L. JHONSON J, Lazo J. Antileishmanial drug discovery: rising to the challenges of a highly neglected diseases. *Molecular Intervention* 2010; 10(2): 72-76.

SOTO J, Arana B. TOLEDO J, Rizzo N. VEGA J, Díaz A. et al. Miltefosine for new world cutaneous Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1266-1272.

SOTTO A, Mazzanti G. CARBONE F, Hrelia P. Maffei F. Inhibition by caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 2010; 699:23–28.

STASHENKO E, Jaramillo B. MARTÍNEZ J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J Chromatogr A* 2004; 1025 (1): 93-103.

SUNDAR S, Jha T. Thakur C, Bhattacharya S, Rai M. Oral miltefosine for the treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 26-33.

SURH Y. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol* 2002; 40; 1091–1097.

TEIXEIRA A, Nitz N. Guimaro M, Gomes C, et al. Chagas disease: a review. *Postgrad Med J* 2006; vol 82,788-98.

TUON F, Amato V. Graf M. Treatment of new world cutaneous leishmaniasis- a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol*,2008; 47: 109-124.

TURINA A, Nolan M. Zygadlo, J, Perillo M. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem* 2006; 122: 101–113.

UEDA-Nakamura T, Mendoca-Filho R, Morgado J, Korehisa P, et al. Antileishmanial activity of eugenol rich essential-oil from *Occimum gratissimum*. *Parasitol Internacional* 2006; 55: 99-105.

ULTEE A, Bennik M.Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:1561–156.

URBINA, Julio. Nuevos Avances en el Desarrollo del Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas. Reunión del Grupo Científico de Trabajo sobre Enfermedad de Chagas del Programa de Investigación y Docencia en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud/Oficina Panamericana de la Salud. Buenos Aires, Argentina.2005.

URBINA, Julio. Specific chemotherapy of chagas diseases: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* 2010;1 15: 55-68.

USTA J, Kreydiyyeh S. Knio K, Barnabe P, Bou-Moughlabay Y, Dagher S. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. *Chemico-Biological Interactions* 2009; 180 (1):39-46.

VELEZ I, Agudelo S, Hendrick E, Puerta J, Grogl M, Moddaber F, et al. Inefficacy of allopurinol as monotherapy for colombian cutaneous leishmaniasis: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1997; 126: 232-236.

VICUÑA G, Sasthenko E. Fuentes J. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oil and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 2010; 81: 343-349.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multicomponent mixtures used in phytomedicine. *Curr Drug Metab* 2008;9: 996–1009.

ZHENG G, Kenney P. Lam L. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *J Nat Prod* 1992; 55: 999–1003.