

**POTENCIAL TÓXICO, GENOTÓXICO Y ANTI-*Leishmania* DE UNA FORMULACIÓN  
TOPICA CONTENIENDO *trans*- $\beta$ -cariofileno Y ACEITE ESENCIAL DE *Lippia*  
*origanoides***

**LAURA FERNANDA NEIRA FUENTES**

Tesis de Grado para optar al título de  
**MAGISTER EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS**

**Directora:**

**PATRICIA ESCOBAR RIVERO**  
**BACTERIOLOGA, M.Sc., Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**  
**FACULTAD DE SALUD**  
**ESCUELA DE MEDICINA**  
**BUCARAMANGA**  
**2017**

### **AGRADECIMIENTOS**

*A mi tutora la Dra Patricia Escobar por su esfuerzo y dedicación durante todos estos años. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su constancia, paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigadora. Para mí ha sido todo un placer trabajar a su lado.*

*A mi familia por su amor, apoyo, comprensión y respaldo.*

*A mis amigos de la maestría, amigos del laboratorio y amigos de la vida por estar ahí con la palabra y consejo adecuado.*

*Al CINTROP y sus integrantes por proporcionar el espacio y materiales para el desarrollo de este proyecto.*

*La Dra Raquel Ocazonez y Dra Elena Stachenko por la vinculación al proyecto No. 4 “Evaluación de actividades citotóxicas, alérgica, antimicrobiana, inmunomoduladora y antitumoral de aceites esenciales y extractos SFE de plantas tropicales Colombianas, ingredientes potenciales para las industrias cosmética, farmacéutica y aseo.*

*Dr. Julio Cesar Mantilla y departamento de patología por el procesamiento de biopsias y análisis histológico.*

*Proyecto Colciencias Código 687 -2014 Diseño de nanosistemas de aplicación tópica conteniendo dos medicamentos en el mantenimiento de los animales de experimentación.*

*VIE Movilidad en la participación en congreso de la Sociedad Italo latinoamericana de Etnomedicina -SILAE XXV*

*Departamento de Ciencias Básicas por el apoyo económico para la participación a congresos SILAE XXV y XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical y la compra por importación del medicamento miltefosina.*

**TABLA DE CONTENIDO**

Introducción .....	16
1. Objetivos.....	19
1.1. General.....	19
1.2. Específicos .....	19
2. Marco teorico y estado del arte .....	20
2.1. Leishmaniasis tegumentaria.....	20
2.1.1. Generalidades.....	20
2.1.2. Tratamientos de la leishmaniasis: sistémicos y tópicos.....	23
2.2. Aceites esenciales (AE) y trans- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ C) .....	28
2.3. Formulaciones tópicas .....	32
2.3.1. Generalidades.....	32
2.3.2. Formas farmacéuticas semisólidas.....	34
2.4. Toxicidad y genotoxicidad de los materiales.....	36
2.4.1. Toxicidad de los tratamientos tópicos.....	38
2.4.2. Toxicidad de los AE y sus componentes mayoritarios .....	39
2.5. Geles, $\beta$ C y AE en leishmaniasis .....	39
3. Metodología .....	42
3.1. Geles. ....	44
3.1.1. Compuestos.....	44
3.1.2. Preparación de las formulaciones tipo gel. ....	46
3.2. Caracterización geles .....	46

POTENCIAL TÓXICO, GENOTÓXICO Y ANTI-LEISHMANIA	6
3.2.1. Características organolépticas.....	47
3.2.2. Determinación del pH de los geles.....	47
3.2.3. Extensibilidad de los geles.....	47
3.2.4. Homogeneidad de los geles.....	49
3.2.5. Estabilidad de los geles.....	49
3.2.6. Capacidad antioxidante de los geles.....	49
3.3. Ensayos de toxicidad de los geles.....	50
3.3.1. Ensayos <i>in vitro</i> . Prueba de toxicidad en células de mamífero.....	51
3.3.2. Ensayos <i>in vivo</i> .....	52
3.3.3. Ensayos de genotoxicidad.....	57
3.3.4. Ensayos antiparasitarios.....	60
4. Resultados.....	64
4.1. Características físico químicas de los componentes y geles utilizados.....	64
4.1.1. Espectro y pureza del trans- $\beta$ -cariofileno $\beta$ C.....	64
4.1.2. Características organolépticas y de pH de los geles.....	66
4.1.3. Extensibilidad.....	68
4.1.4. Estabilidad de los geles.....	68
4.1.5. Capacidad antioxidante de los geles y componentes.....	68
4.2. Ensayos de toxicidad de los componentes y geles en células y ratones.....	70
4.2.1. Toxicidad celular.....	70
4.2.2. Ensayos de irritación.....	70

POTENCIAL TÓXICO, GENOTÓXICO Y ANTI-LEISHMANIA	7
4.2.3. Hipersensibilidad de contacto (HC).....	75
4.3. Ensayos de genotoxicidad.....	77
4.3.1. Ensayo cometa .....	77
4.3.2. Ensayo micronúcleos (MN) en medula ósea .....	79
4.3.3. Alteraciones físicas, de comportamiento, bioquímicas e histopatológicas.....	80
4.3.4. Alteraciones en el perfil bioquímico.....	81
4.3.5. Estudios histopatológicos en hígado, bazo y riñón.....	82
4.4. Ensayos antiparasitarios.....	83
4.4.1. Ensayos <i>in vitro</i> .....	83
4.4.2. Ensayos <i>in vivo</i> .....	86
5. Discusión.....	88
6. Conclusiones y recomendaciones .....	96
7. Referencia bibliografica .....	99

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Especies de <i>Leishmania</i> que afectan a humanos. ....	21
Tabla 2. Medicamentos en uso para el tratamiento de la leishmaniasis. ....	28
Tabla 3. Actividad biológica del sesquiterpeno <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno en diferentes modelos experimentales. ....	31
Tabla 4. Composición química del aceite esencial de <i>L. origanoides</i> quimiotipo felandreno. ....	44
Tabla 5. Características químicas de los componentes principales de los geles. ....	45
Tabla 6. Composición de formulaciones tipo gel. ....	46
Tabla 7. Grupos experimentales utilizados ensayos de irritación dérmica. ....	53
Tabla 8. Grupos experimentales utilizados en el ensayo de hipersensibilidad de contacto. ....	55
Tabla 9. Grupos experimentales utilizados en el ensayo cometa y micronúcleos. ....	57
Tabla 10. Grupos experimentales utilizados en los ensayos de infección y tratamiento anti- <i>Leishmania in vivo</i> . ....	62
Tabla 11. Características organolépticas y pH de los geles. ....	67
Tabla 12. Calificación de reacción de piel de ratón balb/c expuesta a los geles y componentes. ....	70
Tabla 13. Características histológicas de piel de ratón BALB/c. ....	73
Tabla 14. Características histológicas de orejas de ratón BALB/c. ....	75
Tabla 15. Porcentajes del daño en el ADN e índice de daño (ID). ....	77
Tabla 16. Perfil bioquímico de ratones tratados con los componentes y los geles. ....	81
Tabla 17. Actividad tóxica en células y antiparasitaria <i>in vitro</i> . ....	84

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 Ciclo de vida del parásito .....	22
Figura 2. Diseño metodológico.....	43
Figura 3. Prueba de extensibilidad cuantitativa. ....	48
Figura 4. Evaluación de toxicidad en células de mamífero. ....	51
Figura 5. Ensayos de toxicidad en ratones BALB/c. ....	52
Figura 6. Medición del engrosamiento de las orejas.....	56
Figura 7. Metodología <i>in vitro</i> utilizada para determinar actividad antiparasitaria.....	61
Figura 8. Esquema modelo de infección y tratamiento en ratones BALB/c con leishmaniasis cutánea.....	63
Figura 9. Espectro de masas del componente <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno.....	65
Figura 10. Perfil cromatógrafo del <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno.....	66
Figura 11. Capacidad antioxidante de los componentes y geles.....	69
Figura 12. Visualización y seguimiento de los efectos del $\beta$ C, AE y gel4( $\beta$ C+AE+MIL) sobre la piel de los ratones BALB/c.....	72
Figura 13. Cortes histológicos de piel de ratón BALB/c.....	74
Figura 14. Hipersensibilidad de contacto en el modelo murino BALB/c.....	76
Figura 15. Porcentaje de daño del ADN de células sanguíneas.....	78
Figura 16. Ensayo cometa alcalino en células individuales.....	78
Figura 17. Formación de micronúcleos en médula ósea.....	79
Figura 18. Extendidos de médula ósea coloreados con Giemsa.....	79
Figura 19. Peso corporal de los ratones BALB/c.....	80
Figura 20. Histopatología de órganos de ratones BALB/c.....	82

POTENCIAL TÓXICO, GENOTÓXICO Y ANTI-LEISHMANIA	10
Figura 21. Actividad anti- <i>Leishmania</i> de componentes y geles. ....	85
Figura 22. Eficacia de geles en ratones BALB/c infectados con <i>L. (V.) braziliensis</i> ..	87

**ABREVIATURAS**

AC	Acantosis
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo Felandreno
AE-Timol	Aceite esencial quimiotipo Timol
ALT/AST	Amino alanina transferasa
AmB	Anfotericina B
BUN	Nitrógeno ureico
c.m	Campo microscópico
CC <sub>50</sub>	Concentración citotóxica 50
CC <sub>90</sub>	Concentración citotóxica 90
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CI <sub>90</sub>	Concentración inhibitoria 90
CPA	Ciclofosfamida
DC	Dilatación capilares
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNFB	Dinitrofluorobenceno
DO	Densidad óptica
DPPH	1,1-difeneil-2-picril-hidrazilo
DS	Desviación estándar
EMS	Etil metano sulfonato

EPC	Eritrocito policromáticos
ES	Espongiosis
EX	Exocitosis
FA	Fosfatasa alcalina
GC-MS	Espectrometría de masas acoplado a un cromatografo de gases
GOT/AST	Amino aspartato transferasa
HC	Hipersensibilidad de contacto
ID	Índice de daño
IM	Impétigo
IP	Intraperitoneal
IS	Índice de selectividad
LC	Leishmaniasis cutánea
LTA	Leishmaniasis tegumentaria americana
LV	Leishmaniasis visceral
MBC	Metil bencetonium clorido
MH	Hidrocarburo monoterpénico
MIL	Miltefosina
MN	Micronúcleos
MO	Monoterpeno oxigenado
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeníl-tetrazolio bromuro
MWHD	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas
p/v	Peso /volumen

PBS	Buffer fosfato salino
PQ	Paraqueratosis
pt	Post tratamiento
SH	Hidrocarburo sesquiterpenico
SO	Sesquiterpeno oxigenado
STT	Sistemas terapéuticos transdérmico
TEA	Trietanolamina
X/K	Xilacina/ketamina
$\beta$ C	<i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno

## RESUMEN

**TITULO:** POTENCIAL TÓXICO, GENOTÓXICO Y ANTI-*Leishmania* DE UNA FORMULACIÓN TÓPICA CONTENIENDO *trans-β*-Cariofileno Y ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides*

**AUTORES:** NEIRA FUENTES Laura F.; ESCOBAR RIVERO, Patricia

**PALABRAS CLAVES:** Leishmaniasis, *trans-β*-cariofileno, aceites esenciales, tratamiento tópico, geles, plantas colombianas

### DESCRIPCION

Los compuestos naturales extraídos de plantas colombianas han mostrado actividad anti-*Leishmania* y podrían ser utilizados como componentes de formulaciones tópicas en leishmaniasis cutánea (LC). El objetivo de este trabajo fue preparar, caracterizar y evaluar una formulación tópica conteniendo *trans-β*-cariofileno ( $\beta$ C) y aceite esencial (AE) solos o combinados con miltefosina (MIL) en modelos experimentales de LC.

Se prepararon formulaciones tipo gel con  $\beta$ C y AE con o sin MIL. La toxicidad fue evaluada en células de mamífero y en ratones BALB/c. Se determinó la actividad antioxidante y se realizaron pruebas bioquímicas, irritación dérmica, hipersensibilidad de contacto (HC), genotoxicidad (ensayo cometa y micronúcleos MN). Biopsias de piel y órganos fueron recolectadas para estudio histopatológicos. Se determinó la actividad anti-*Leishmania* en cepas de *L.(V) braziliensis* y *L.(V) panamensis*. *In vivo*, ratones infectados con LC fueron tratados con los geles tópicamente durante 20 días. Se hizo seguimiento de las lesiones y se determinó la presencia de parásitos en improntas de piel, bazo e hígado.

Se obtuvieron geles físico-químicamente estables con capacidad antioxidante. No se observó alteración en el peso ni en los niveles sanguíneos de urea y enzimas hepáticas. Los geles fueron no irritantes y ningún gel incrementó el grosor de las orejas (HC). El daño del ADN fue <27% y la formación de MN <3 (control 179,5±18,8). No se observaron alteraciones histopatológicas. En *L.(V) braziliensis* y *L.(V) panamensis* la actividad (CI<sub>50</sub>) del AE fue de 12,35 y >100 y del  $\beta$ C fue de 3,94 y 74,01  $\mu$ g/mL respectivamente. En ratones, el tratamiento con el gel conteniendo AE y  $\beta$ C no fue eficaz sin embargo con el gel contenido AE,  $\beta$ C y MIL se observó una disminución completa de las lesiones.

La formulación conteniendo  $\beta$ C y AE es segura y apropiada para uso en el tratamiento de la LC como vehículo de otros medicamentos contra *Leishmania*.

\*Tesis de grado. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

\*\* Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de tesis: PATRICIA ESCOBAR Bact, M.Sc, Ph.D.

### ABSTRACT

**TITLE:** TOXIC, GENOTOXIC AND ANTI-*Leishmania* POTENTIAL OF A TOPICAL FORMULATION CONTAINING *trans*- $\beta$ -Caryophyllene AND *Lippia origanoides* ESSENTIAL OIL

**AUTHORS:** NEIRA FUENTES, Laura Fernanda; ESCOBAR RIVERO, Patricia

**KEYWORDS:** Leishmaniasis, *trans*- $\beta$ -caryophyllene, essential oil, topical treatment, gels, Colombian plants

### DESCRIPTION

Natural compounds extracted from Colombian plants have shown anti-*Leishmania* activity and could be used as components of topical formulations in cutaneous leishmaniasis (CL). The objective of this work was to prepare, characterize and evaluate a topical formulation containing *trans*- $\beta$ -caryophyllene ( $\beta$ C) and essential oil (EO) alone or combined with miltefosine (MIL) in experimental LC models.

Gels formulations were prepared with  $\beta$ C and EO with or without MIL. Toxicity was assessed in mammalian cells and in BALB/c mice. Antioxidant activity was determined and biochemical tests, dermal irritation, contact hypersensitivity (CH), genotoxicity (comet assay and MN micronuclei) were performed. Biopsies of skin and organs were collected for histopathological study. Anti-*Leishmania* activity was determined in *L. (V) braziliensis* and *L. (V.) panamensis* strains. *In vivo*, mice infected were treated topically with gels per 20 days. The lesions were monitored and the presence of parasites in skin, spleen and liver imprints was determined.

Physicochemical stable gels with antioxidant capacity were obtained. No alteration was observed in weight or blood levels of urea and liver enzymes. The gels were non-irritating and a no increase of ear thickness (CH) after challenge was observed. DNA damage was <27% and formation of MN <3 (control 179.5  $\pm$  18.8). No histopathological changes were observed. In *L.(V) braziliensis* and *L.(V.) panamensis* activity (CI<sub>50</sub>) of EO was 12.35 and >100 and for  $\beta$ C was 3.94 and 74.01  $\mu$ g/mL, respectively. EO and  $\beta$ C -gel was not effective in mice, however EO and  $\beta$ C gel combined with MIL induced a complete decrease of CL lesions.

The formulation containing  $\beta$ C and EO is safe and appropriate for use in the treatment of LC as a vehicle of antileishmanial drugs.

---

\*Thesis of grade of Master in Basic Biomedical Science

\*\* Faculty of Health, Master in Basic Biomedical Science, Thesis director. PATRICIA ESCOBAR RIVERO Bact, M.SC., Ph.D.

## INTRODUCCION

La leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) es considerada como una "enfermedad huérfana" o desatendida afectando principalmente a personas que habitan en condiciones de pobreza. En Colombia, se estima que existen alrededor de 11 millones de personas en riesgo de adquirir la enfermedad, notificándose en 2011 cerca de 9241 casos (De La Hoz *et al.*, 2014). No existe una vacuna ni un tratamiento ideal para su cura. Los tratamientos son pocos y presentan contraindicaciones, efectos tóxicos, eficacia variable, y generalmente son aplicados en protocolos largos y dolorosos (Croft *et al.*, 2005; Ezzine Sebai *et al.*, 2010; Saldanha *et al.*, 2000). En busca de alternativas terapéuticas contra esta enfermedad, se han estudiado extractos, aceites esenciales (AE) y sus componentes mayoritarios, obtenidos de plantas medicinales y/o aromáticas los cuales han mostrado actividad antiparasitaria en modelos *in vitro* (Neira *et al.*, 2014). Son escasos los estudios pre-clínicos que evalúen en modelos animales la eficacia y seguridad de alternativas terapéuticas específicamente la de los AE y sus derivados.

La utilización de tratamientos tópicos en forma de geles, ungüentos, emulsiones y cremas en LTA conteniendo medicamentos anti-*Leishmania* tales como paromomicina y la anfotericina B (AmB) combinadas con antibióticos y/o aditamentos han mostrado resultados interesantes (Minodier y Parola, 2007; Zvulunov *et al.*, 2003). Sin embargo, su efectividad está condicionada en algunos casos a la especie de *Leishmania* y a los efectos adversos locales tales como irritación en piel (Lee y Hasbun, 2003; Minodier y Parola, 2007). Una formulación tópica ideal para el tratamiento de la LTA debe considerar en su diseño tanto la utilización de un compuesto capaz de destruir el parásito como la inclusión de agentes que mejoren la capacidad del compuesto de atravesar el estrato córneo de la piel y favorezcan su retención en el sitio donde va a ejercer su

efecto (en este caso en la dermis). Igualmente, sus componentes no deben ser irritantes, ni alergénicos y deben ser estéticamente aceptables y fáciles de usar (Lorenzo *et al.*, 2008).

El propósito principal de esta tesis fue la de diseñar y preparar una formulación tópica óptima para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (LC) conteniendo un AE un componente mayoritario llamado *trans*- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ C). Se definió como óptima aquella formulación fisicoquímicamente estable, con capacidad antioxidante, no tóxica, no genotóxica y con actividad anti-*Leishmania* en modelos experimentales de LC; utilizada sola o combinada con un medicamento utilizado sistémicamente en LC, en este caso la miltefosina (MIL).

El AE utilizado fue obtenido a partir de plantas de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno. Este AE fue obtenido y caracterizado en el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL-UIS) en el contexto del proyecto Unión Temporal-Bio-Red-Co-Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (UT-Bio-Red-CENIVAM). Para la preparación de las formulaciones se partió de la experiencia previa del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP-UIS) en la preparación, caracterización y evaluación de formulaciones tópicas de diversas formas farmacéuticas (e.g. geles, nanoemulsiones y transferosomas) en modelos experimentales de LC (Hernández *et al.*, 2012; Ospina *et al.*, 2014; Rico *et al.*, 2013). En este trabajo, dada las características fisicoquímicas del  $\beta$ C y AE se decidió por la preparación de una formulación semisólida tipo gel. En la primera parte de este trabajo se muestra el método de preparación de los geles y la caracterización de las propiedades fisicoquímicas tales como consistencia, extensibilidad, pH, color y estabilidad. Igualmente se muestra la capacidad antioxidante de los geles de  $\beta$ C y AE solos o adicionando la MIL.

Para garantizar la seguridad del uso de los geles se evaluaron aspectos toxicológicos, y genotóxicos tales como citotoxicidad en células de mamífero, irritación cutánea, hipersensibilidad de contacto, fragmentación del ADN y alteraciones en la función hepática y renal en modelos experimentales. Estos ensayos fueron realizados en ratones BALB/c siguiendo las directrices internacionales de bienestar animal y buenas prácticas de laboratorio, contando con aval del Comité de Ética para Investigación Científica (CEINCI) de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Igualmente, los protocolos utilizados se basaron en las directrices emitidas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) para estudios preclínicos. Se encontraron resultados interesantes los cuales se muestran en la segunda parte de este trabajo.

En la tercera y última parte de este trabajo, para cumplir el propósito de encontrar un tratamiento alternativo para la LC en un área de poca inversión económica, se evaluó la actividad anti-*Leishmania* de los geles de  $\beta$ C y AE solos o combinados con MIL en cultivos celulares de *L. (V) braziliensis* y *L.(V.) panamensis* y en ratones BALB/c infectados con *L.(V.) braziliensis*, esta última es una de las cepas de *Leishmania* más agresiva. Los resultados obtenidos constituyen una motivación para continuar en las fases del descubrimiento de nuevos tratamientos como son la de completar con los ensayos preclínicos sobre los mecanismos de acción de los geles activos y así poder continuar a los ensayos clínicos los cuales en caso de ser eficaces darían valor agregado a los AE para ser utilizados y comercializados en la industria cosmética y farmacéutica.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 General

Diseñar una formulación tópica que contenga el  $\beta$ C y un AE y evaluar sus efectos tóxicos, genotóxicos y anti-*Leishmania* en modelos experimentales

### 1.2 Específicos

1. Preparar formulaciones de  $\beta$ C y AE fisicoquímicamente estables.
2. Determinar el posible efecto tóxico y genotóxico de la formulación tópica en modelos experimentales.
3. Evaluar la actividad anti-*Leishmania* de la formulación tópica en diferentes estadios del parásito y en ratones con LC.

## 2 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

### 2.1 Leishmaniasis tegumentaria

**2.1.1 Generalidades.** La leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) comprende las formas clínicas de leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis mucocutánea (LMC). Son manifestaciones clínicas de un grupo de enfermedades causadas por el protozooario dimórfico del género *Leishmania*, que se transmite a los seres humanos a través de mosquitos hematófagos del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Parásitos del género *Leishmania* mantienen su ciclo de vida a través de la transmisión entre insectos (mosquito hematófago) y un hospedero mamífero (Figura 1). Las formas flageladas (móviles) se denominan promastigotes, los cuales se encuentran dentro de los mosquitos llevando un proceso de transformación o diferenciación a promastigotes metacíclicos infectivos que no se replican. Esta es la forma infectiva la cual es transmitido por la hembra del flebótomo. Los amastigotes no tienen un flagelo exteriorizado y viven como parásitos intracelulares en las células fagocíticas de los mamíferos tales como los macrófagos de la piel produciendo lesiones ulcerativas y/o inflamación destructiva de la mucosa (Kaye y Scott, 2011). Cerca de 1,5 millones de nuevos casos de LC son reportados globalmente por año, presentando una epidemiología compleja que depende de la variación intra e inter especie (Davies *et al.*, 1997).

La LC es causada por *Leishmania (Leishmania) tropica*, *L. (L.) major*, y *L. (L.) infantum* en el Viejo Mundo y por *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, y *L. (L.) venezuelensis* en el Nuevo Mundo (Ver Tabla 1). La incidencia de la LC es heterogénea, incluyendo zonas endémicas y diseminación de áreas las cuales se encuentran en constante cambio debido a las emigraciones, el turismo, la urbanización y la expansión de los ecosistemas para el vector debido a los cambios climáticos. Un

marcado aumento de los casos en Europa y América se han registrado en las últimas décadas, y

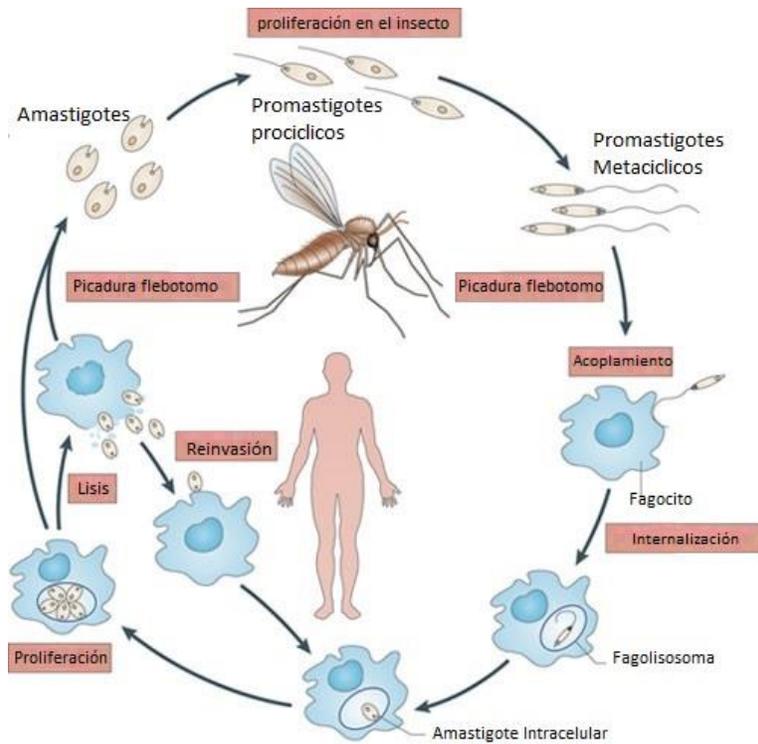
los nuevos focos epidémicos importantes han surgido (Pavli y Maltezou, 2010).

Tabla 1

*Especies de Leishmania que afectan los humanos.*

	Manifestación clínica	Ciclo de transmisión	Distribución geográfica
<i>Leishmania spp</i> Nuevo Mundo			
<i>L.(V.) braziliensis</i>	LC, LMC	Zoonótico	Suramérica, parte de Centro América, México
<i>L. (V.) panamensis</i>	LC, LMC	Zoonótico	Norte de Suramérica y sur de Centro América
<i>L. (V.) peruviana</i>	LC	Zoonótico	Perú
<i>L.(V.) guyanensis</i>	LC	Zoonótico	Suramérica
<i>L. (V.) lainsoni</i>	LC	Zoonótico	Suramérica
<i>L. (V.) colombiensis</i>	LC	Zoonótico	Norte de Suramérica
<i>L.(Leishmania) amazonensis</i>	LC, LMC	Zoonótico	Suramérica
<i>L.(L.) mexicana</i>	LC, LMC	Zoonótico	Centroamérica , México , USA
<i>L.(L.) pifanoi</i>	LC	Zoonótico	Suramérica
<i>L.(L.) venezulensis</i>	LC	Zoonótico	Norte de Suramérica
<i>L.(L.) garnhami</i>	LC	Zoonótico	Suramérica
<i>Leishmania spp</i> Viejo Mundo			
<i>L.(L.) aethiopica</i>	LC, LCD	Zoonótico	Etiopia, Kenia
<i>L.(L.) killicki</i>	LC	Zoonótico	Norte de África
<i>L.(L.) major</i>	LC	Zoonótico	Asia, Medio Oriente, África
<i>L. (L.) tropica</i>	LC	Antroponótica	Asia Central, Medio Oriente, Africa
<i>L.(L.) donovani</i>	LC, LV	Antroponótica	África, Asia Central sudeste de Asia
<i>Leishmania spp</i> Viejo y Nuevo Mundo			
<i>L.(L.) infantum</i>	LV	Zoonótico	Europa, Norte África, Centroamérica, Suramérica

Nota: LC, Leishmaniasis cutánea; LCM, Leishmaniasis mucocutánea; LV, Leishmaniasis visceral. Adaptada de Reithinger *et al.* 2007



*Figura 1* Ciclo de vida del parásito. Promastigotes procíclicos de *Leishmania* se replican en el intestino del mosquito flebotomo migrando hasta la proboscis donde se diferencian a promastigotes metacíclicos infectivos no replicativos. Durante la picadura, el insecto regurgita promastigotes metacíclicos junto con proteofosfoglicanos inmunomoduladores derivados del parásito y varios componentes salivales. Los promastigotes metacíclicos son fagocitados por macrófagos de la piel. Después de estabilizarse como residente intracelular, promastigotes metacíclicos se transforman en amastigotes. Los amastigotes se replican dentro de las células hospederas, que se rompen cuando demasiados amastigotes están presentes, lo que permite la reinfección a otros macrófagos locales. El ciclo de transmisión se completa cuando macrófagos infectados son tomados por otro mosquito al alimentarse de sangre del mamífero y amastigotes se convierten en promastigotes en el mosquito. Adaptado de Kaye y Scott 2011.

**2.1.2 Tratamientos de la leishmaniasis: sistémicos y tópicos.** Los tratamientos de primera línea se basan en el uso de antimoniales pentavalentes ( $Sb^V$ ) como el antimonio de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®). En caso de falla terapéutica se utiliza la anfotericina B (AmB, **Fungizone®**), isotianato de pentamidina, miltefosina (Impavido®) y paromomicina (Ver Tabla 2).

Los tratamientos sistémicos han sido utilizados en la terapia de todos los tipos de leishmaniasis encontrándose disponible el Pentostam® para la administración intravenosa y el Glucantime® para la administración intramuscular. Estos  $Sb^V$  actúan como prodrogas que se convierten a su estado trivalente  $Sb^{III}$  en el interior de la célula siendo este más activo y tóxico. El mecanismo de acción no está bien definido sin embargo se ha propuesto la inhibición del sistema glutatión/tripanonion reductasa (Cunningham y Fairlamb, 1995) y se cree que inhibe la síntesis de ATP y promueven el aumento de citoquinas (Pathak y Yi, 2001). Sin embargo, el uso de estos medicamentos está limitado por sus efectos tóxicos tales como mialgia y cardiotoxicidad. (Frézard *et al.*, 2009). Se ha reportado variabilidad de la eficacia al tratamiento según la especie de *Leishmania*, encontrando cura del 51% de infecciones con *L.(V.) braziliensis* y sólo un 26% en infecciones con *L: (V.) guyaniensis* (Romero *et al.*, 2001). En las ultimas década se ha reportado la aparición de cepas resistentes a los  $Sb^V$  como en la India donde la falla terapéutica ocurre en el 50-65% de los pacientes (Sundar, 2001).

El isotianato de pentamidina es una diamina aromática usada como terapia alternativa a las cepas resistentes a  $Sb^V$ . Se administra vía parenteral produciendo efectos adversos como hipoglicemia, hipotensión y dolor en el sitio de inyección (Ameen, 2007). La pentamidina actúa sobre el genoma del parásito al obstaculizar la replicación y transcripción a nivel mitocondrial (Mishra *et al.*, 2007). La falla del tratamiento depende en parte del tiempo de inicio de la terapia

reportándose una falla del 5% si la pentamidina se da en el primer mes de evolución vs 25% si se da después (Minodier y Parola, 2007).

La AmB (Fungizona®) es un antibiótico macrólido antifúngico producido por la bacteria *Streptomyces nodusus*. La actividad de la AmB es atribuible a la selectividad por los esteroides de la membrana celular del parásito llevando a la formación de poros acuosos resultando en lisis. (Ramos *et al.*, 1996). Se han reportado reacciones adversas como fiebre, tromboflebitis, miocarditis, severa hipocalcemia, disfunción renal, requiriendo hospitalización y monitoreo. (Balaña *et al.*, 1998). Sin embargo, su efecto tóxico ha sido reducido debido al desarrollo de formulaciones liposomales (AmBiosome), complejos lipídicos (Abelcet) y dispersiones coloidales (Amphocil) cuyo alto costo de fabricación ha sido limitante para su uso (Monzote, 2009).

Tratamientos orales a base de azoles han sido probados, como el ketoconazol (600 mg/d en adultos y 10mg/kg/d en niños por un mes). Su eficacia podría variar según la especie de *Leishmania* involucrada. Sin embargo, no es utilizada comúnmente (Saenz *et al.*, 1990; Salmanpour *et al.*, 2001). El Itraconazol (100-400 mg/d) ha sido utilizado con eficacia variable en India, Brasil, Argentina, Italia y Reino Unido (Minodier y Parola, 2007). Sin embargo, en Irán en casos de LC producida por *L. (L.) major* han encontrado bajas tasas de respuesta. En el Ecuador pacientes con LMC producida por *L. (V.) braziliensis*, el tratamiento itraconazol mostró una cura de solo el 23% en 13 pacientes tratados (Calvopina *et al.*, 2004).

La azitromicina es un antibiótico azálico de la familia de los macrólidos. Es un compuesto utilizado vía oral y su seguridad en niños tiene ventaja para el tratamiento. Es capaz de inhibir promastigotes y amastigotes en cultivos celulares y en modelos murinos de *L. (L.) major* (Krolewiecki *et al.*, 2002). Pacientes infectados con *L. (V.) braziliensis* fueron tratados con

azitromicina (500-1000 mg/d por 4 meses de tratamiento) mostrando una cura del 85% de ellos (Silva *et al.*, 2004).

La miltefosina (Impavido®) fue originalmente desarrollada como un agente antineoplásico. Este medicamento de uso oral ha demostrado ser activa en modelos experimentales y en diferentes formas clínicas de leishmaniasis (Garnier y Croft, 2002). Es un inhibidor de la proteína quinasa B, proteína implicada en la vía de señalización del ciclo celular y su mecanismo de acción ha sido relacionado con su capacidad de alterar el contenido de lípidos de la membrana celular y como modulador de la respuesta inmune (Ruiter *et al.*, 2003). En la India, la miltefosina (2,5mg/kd/d por 28 días) es dado para el tratamiento de la LV producida por *L. (L.) donovani* con resultados de cura del 94 y 97% en niños y adultos (Sundar *et al.*, 2002). En Suramérica, este medicamento ha sido utilizado en el tratamiento de LC siendo eficaz en cepas de *L.(V.) panamensis* en un 91% variando en cepas de *L. (L.) mexicana* con un 60% de eficacia o *L. (V.) braziliensis* con un 33% (Soto *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar del gran espectro de actividades que tiene su efectividad es variable y su uso ha sido asociado con molestias gastrointestinales, efectos teratógenos (por lo que es poco recomendado en mujeres en edad fértil) y toxicidad en hígado y riñones requiriendo monitoreo a los pacientes (Croft *et al.*, 2005).

En LC se han desarrollado tratamientos tópicos conteniendo medicamentos los cuales son preferibles a los de uso sistémico debido a la reducción de los efectos adversos, a su fácil administración y bajo costo. Sin embargo, tiene limitaciones dado que podrían sea activos solo en lesiones únicas y presentan algunas veces irritación o alergias en la piel.

Un antibiótico utilizado como tratamiento tópico en LC hace aprox 40 años es el sulfato de paramomicina (Mishra *et al.*, 2007). Es un aminoglucosido y su actividad antiparasitaria es conocida además en amibiasis, helmintiasis intestinal y leishmaniasis. En LC ha sido utilizada en

forma de ungüento (15% de paromomicina asociada con 12% de metil-bencetonium clorido, MBC) mostrando efectividad en pacientes infectados con *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) panamensis*. Sin embargo se han observado efectos secundarios locales debido a la utilización del MBC (Minodier y Parola, 2007).

La AmB también se ha formulado para uso tópico (Amphocil® en 5% etanol) mostrados resultados satisfactorios en pacientes infectados con *L. (L.) major* en Israel. Sin embargo, debido a los altos costos del Amphocil, se restringe su uso (Minodier y Parola, 2007; Ruiz *et al.*, 2002). Se han producido algunas formulaciones tópicas de miltefosina al 6% como el Miltex® utilizado en casos de metástasis de cáncer en piel (Garnier y Croft, 2002). En modelos experimentales murinos infectados con *L.(L.) mexicana* y *L.(L.) major* el tratamiento con Miltex® mostró reducción de las lesiones, sin embargo, se observó reactivación después de dos meses de tratamiento (Schmidt-Ott *et al.*, 1999).

El Imiquimod (Aldara®) es una molécula sintética con actividad inmunomoduladora utilizado al 5% en crema para enfermedades cutáneas inducidas por el virus del papiloma humano (VPH). Esta imidazoquinolina es un modificador de la respuesta inmune de monocitos y macrófagos, e induce una liberación creciente de interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleuquinas IL-1b, IL - 6 o IL - 8. En un ensayo de infección *in vitro* y en ratones, el imiquimod demostró una actividad anti-*Leishmania* induciendo la expresión y la liberación de óxido nítrico (Buates y Matlashewski, 1999). El Imiquimod se utilizó en combinación con Sb<sup>V</sup> en el tratamiento de la LC inducida por *L. (V.) peruviana* disminuyendo el tiempo de curación (Miranda *et al.*, 2005).

Actualmente en ensayos clínicos se encuentran en fase 2 y 3 varios tratamientos tópicos de leishmaniasis. En uno de ellos se combina el uso de la termoterapia aplicando calor local producido por las ondas de radiofrecuencias (Themo-Med®) y el tratamiento oral con miltefosina por 20 días-

(ClinicalTrials.gov:NCT02687971)(Lopez, 2013). Otro tratamiento combina el tratamiento del Imiquimod con el de SbV partiendo de la hipótesis de que las lesiones en los pacientes que reciben el tratamiento combinado resuelve más rápidamente y sin producir cicatrices como el tratamiento con Sb<sup>V</sup> solo (ClinicalTrials.gov :NCT00257530). Otro estudio clínico en ejecución es la evaluación de seguridad y eficacia de la crema tópica de AmB al 3% (Anfoleish), aplicada 2-3 veces al día durante 4 semanas en individuos con LC no complicada (ClinicalTrials.gov NCT01845727).

**Tabla 2**  
**Medicamentos en uso para el tratamiento de la leishmaniasis.**

Medicamento	Dosis	Propiedades y administración	Comentario
Sb <sup>v</sup>	20 mg/Kg/día por 20 días en LC y 28 días en LMC y LV.	Pentostam contiene cerca de 33% y Glucantime cerca de 28% antimonio pentavalente, intravenoso o intramuscular.	Para LC o LV. Respuesta variable en diferentes especies que causan LC. Tratamiento más económico.
Anfotericina B (Fungizone)	0,5 – 1,0 mg/Kg por 20 a 40 días según respuesta clínica (LMC y LV)	Antibiótico polieno, producto de fermentación de <i>Streptomyces nodus</i> , intravenoso.	Para todas las formas clínicas de la enfermedad.
Miltefosina (Impavido®)	2,2 mg/Kg/día por 32 días LC	Hexadecilfosfolina, oral	Primer medicamento de uso oral en LV. También efectiva en algunas especies que causan LC. Contraindicado en mujeres embarazadas debido a efectos teratógenos en ratas.
Paromomicina	Aplicación dos veces al día por 20 a 30 días.	Aminoglicosido, producto de la fermentación de <i>Streptomyces rimosus</i> . Se suministra en forma de sulfato. En LC se suministra vía tópica y en LV intramuscular.	Formulación tópica (12%) con cloruro de metilbencetonio avalado para LC. Vía tópica con gentamicina se encuentra en ensayos clínicos fase III. Medicamento registrado para LV en India.
Isotianato de pentamidina	3 mg/Kg/día 8 días LC 22 días LMC	Diamidina, como sal de isetionato, intramuscular	Para formas específicas de LC en Suramérica únicamente.

Nota: LC: Leishmaniasis cutánea, LMC: Leishmaniasis mucocutánea, LV: Leishmaniasis visceral. Tomada y modificada de Croft Y Olliaro 2011.

## 2.2 Aceites esenciales (AE) y *trans*- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ C)

Los AEs son mezclas volátiles originadas de componentes orgánicos de una fuente botánica simple, los cuales contribuyen al sabor y fragancia de las plantas. La palabra "esencial" es usada

para reflejar la naturaleza intrínseca de la planta y "aceite" es usado para indicar un líquido que es insoluble e inmiscible con el agua. Las plantas que producen AE pertenecen a diferentes especies botánicas y están distribuidas en todo el mundo. Pueden contener cerca de 20 a 60 componentes de los cuales dos a tres son los de mayor concentración (20-70%). Generalmente estos componentes principales determinan las propiedades biológicas del AE (Bakkali *et al.*, 2008; Tisserand y Young, 2014).

Se componen principalmente de terpenos, terpenoides, aromáticos y constituyentes alifáticos, todos caracterizados por ~~un~~ bajo peso molecular. Los terpenos constituyen el 90% de los AE y forman diferentes clases estructurales y funcionales. Los compuestos aromáticos se producen con menor frecuencia que los terpenos y se derivan del fenilpropano. Los compuestos azufrados o componentes nitrogenados como glucosinolatos o derivados, también son característicos de los metabolitos secundarios de diversas plantas (Bakkali *et al.*, 2008; García y Carril, 2011).

Los AE presentan diversos tipos de efectos benéficos para el ser humano, pueden tener actividad fungicida (Hernandes *et al.*, 2014; Lozada, 2012), antibacterial (Freires *et al.*, 2015), insecticida, repelente (Vera *et al.*, 2014), antiparasitaria (Escobar *et al.*, 2010; Leal *et al.* 2013), antiinflamatoria (Silva *et al.*, 2004), además se han utilizado como antioxidantes en la industria de alimentos como aditivos en la elaboración de alimentos funcionales (Esquivel *et al.*, 2007).

Entre los terpenos aromáticos volátiles se encuentra el sesquiterpeno  $\beta$ C, el cual se encuentra abundantemente en AE de plantas como orégano (*Origanum vulgare L.*), canela (*Cinnamomum spp*) y la pimienta negra (*Piper nigrum L.*). En la naturaleza, el  $\beta$ C se encuentra junto con su isómero iso-cariofileno y  $\alpha$ -humuleno. El  $\beta$ C es comercialmente usado como aditivo de alimentos y en la industria cosmética (Sköld *et al.*, 2006; Gertsch *et al.*, 2008). En diversos modelos experimentales se ha evaluado su actividad antigenotóxica (Álvarez *et al.*, 2013), antiinflamatoria

(Rg Gertsch *et al.*, 2001), anestésica (Ghelardini *et al.*, 2001) y anti-*Leishmania* (Leal *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2013).

**Tabla 3.**  
*Actividad biológica del sesquiterpeno trans-β-cariofileno en diferentes modelos experimentales.*

Actividad Biológica	Modelo experimental	Concentración/ Administración	Resultado	Referencia
Antigenotóxica	Ratón Swiss	20, 200, 2000 mg/Kg - oral	Disminución del 80% del efecto del benzopireno	(Álvarez- <i>et al.</i> , 2013)
	E. coli WP2uvrA	9.0–2.3 mg/placa	Actividad a 6.40 mg/placa contra 2-nitrofluoreno	(Di Sotto <i>et al.</i> , 2008)
Genotóxica	TA 98 y TA 100	9.0–2.3 mg/placa	Negativo	(Di Sotto <i>et al.</i> , 2008)
	Ratón NIH	20, 200, 2000 mg/Kg oral	Negativo clastogenicidad	(Molina <i>et al.</i> , 2009)
Anti inflamatoria	Sangre periférica humana	500 nM	Inhibición de citosinas pro inflamatoria.	(Gertsch <i>et al.</i> , 2008)
	Ratones C57BL/6J	5 and 10 mg/Kg - Oral	Inhibición edema producido por carragenina	
Anestésico	Reflejo conjuntival conejo	en 10–1000 g/ml	5 a 15 minutos el efecto	(Ghelardini <i>et al.</i> , 2001)
Alergénica	Conejillo de india	6.8% (3.3x10 <sup>4</sup> mol/g) Inyección intradérmica	Negativo sensibilización	(Sköld <i>et al.</i> , 2006)
Antiparasitaria	Cultivos celulares parasitarios “ <i>in vitro</i> ”	<i>Trypanosoma cruzi</i>	CI <sub>50</sub> 2.89 – 24.54 µg/mL.	(Leal <i>et al.</i> , 2013)
		<i>L. (V.) braziliensis</i>	Inhibición 100% a 50 µg/mL	(Leite <i>et al.</i> , 2013)
		<i>L. (L.) infantum</i>	CI <sub>50</sub> : 24,02- 53,39 µg/mL	
		<i>L. (L.) amazonensis</i>	CI <sub>50</sub> : 1.3 µg/mL (6.4 µM)	(Soares <i>et al.</i> , 2013)

Nota: CI<sub>50</sub>, Concentración inhibitoria 50

## 2.3 Formulaciones tópicas

**2.3.1 Generalidades.** El tratamiento tópico se refiere a la aplicación de formulaciones terapéuticas directamente sobre la piel, el cual va a tener una acción local y sistémica del compuesto activo (Porras, 2007). Las formulaciones pueden atravesar la piel por la ruta intercelular, transcelular, transfolicular, vía glándula sebácea, vía glándula sudorípara y mixta (Villarino y Landoni, 2006).

La piel es el órgano más extenso en los mamíferos y sirve como una barrera protectora en la interfaz entre el cuerpo humano y el medio ambiente circundante. Protege los órganos contra los patógenos y microorganismos (Groeber *et al.*, 2011). La piel se divide en dos regiones distintas llamadas epidermis y dermis. La epidermis derivada del ectodermo, es una capa epitelial compuesta de queratinocitos, que proveen la integridad de la piel, células de Langerhans y células dendríticas. La dermis es un tejido derivado del mesodermo que forma una capa estromal debajo de la epidermis poblada por fibroblastos que secretan componentes de matriz extracelular, además de células inmunes incluyendo células T, mastocitos y células dendríticas dérmicas (Bensouilah y Buck, 2006; Kaplan *et al.*, 2012).

Para que un tratamiento tópico sea eficiente se tiene en cuenta la estabilidad, solubilidad y absorción del medicamento o formulación en la piel, ya que son características que influyen en la biodisponibilidad y la orientación del compuesto administrado sobre el tejido diana (Santini *et al.*, 2015). Con el fin de optimizar la liberación localizada del tratamiento, la vía tópica ha sido una de las opciones de terapia no invasivas, el cual mejora ~~el cumplimiento del tratamiento por el paciente,~~ la farmacocinética de los compuestos degradables ~~y~~ la reducción de los efectos secundarios y el cumplimiento del tratamiento por el paciente (Santini *et al.*, 2015).

Sin embargo, la administración tópica presenta dificultades en la permeación de la epidermis especialmente por la capa externa (estrato córneo) y para determinar la cantidad exacta de fármaco que llega a las capas de la piel en el sitio deseado (Santini *et al.*, 2015).

En el tratamiento tópico intervienen tres elementos: El compuesto activo, el vehículo y la técnica de aplicación. El compuesto activo es la molécula empleada para el tratamiento, el cual se clasifica en función a su aplicación clínica como antimicrobiano, antiinflamatorios, inmunomoduladores. El vehículo o excipiente son sustancias que proporcionan las características físico-químicas al producto. La duración de la acción y la absorción del compuesto activo son mayores cuanto más graso es el excipiente. Según su naturaleza los excipientes se clasifican como polvos, líquidos y grasas, los cuales se emplean en forma de emulsiones, soluciones, geles, cremas, entre otros. En cuanto a la técnica de aplicación, se encuentra la hidratación cutánea y la oclusión las cuales favorecen la penetración y aumentan la eficacia del compuesto activo (Lazaro y Moreno, 2010).

Las formulaciones aplicadas en la piel, permite al compuesto activo difundir desde el estrato corneo hasta la hipodermis e ingresar al torrente sanguíneo produciendo un efecto sistémico. La colocación de pomadas, lociones o cremas sobre la piel tiene variaciones en la magnitud y duración del efecto farmacológico, así como niveles sanguíneos muy variables, debido a las diferencias en la permeabilidad intrínseca de la piel y sus condiciones, y la naturaleza del vehículo. Una de las primeras modalidades de terapéutica transdérmica, el unguento como vehículo, ha sido reemplazada por dispositivos que permiten controlar la dosificación. Los sistemas terapéuticos transdérmicos (STT) son sistemas de liberación sostenida cuyo objetivo es el de suministrar el medicamento a la velocidad necesaria para conseguir y mantener una concentración plasmática constante (Villarino y Landoni, 2006).

Como potenciadores de la permeación en tratamiento tópicos, los AE pueden incrementar la liberación de medicamentos de tamaño pequeño dentro de la piel debido a la interacción con los lípidos intracelulares a través de procesos físicos incluyendo extracción, fluidización y separación de fases. Mientras los AE y sus componentes pueden penetrar fácilmente a través de la piel hasta la sangre, lo cual los hace fácilmente excretados por el cuerpo en la orina y las heces. Por lo tanto, los AE cada vez son más utilizados como potenciadores de la permeación debido a su perfil de seguridad comparado con otras sustancias o sistemas. Se ha encontrado que capacidad de permeación del AE completo es significativamente mayor que la capacidad de sus componentes principales al ser evaluados solos (Chen *et al.*, 2015).

**2.3.2 Formas farmacéuticas semisólidas.** Las formas de dosificación semisólidas de uso tópico se presentan normalmente en formas de cremas, geles, ungüentos o pastas. Contienen uno o más ingredientes activos disueltos o uniformemente dispersos en una base adecuada y excipientes como emulsionantes, agentes de aumento de la viscosidad, agentes antimicrobianos, antioxidantes y estabilizantes. La elección de una base para formas de dosificación depende de factores como, el efecto terapéutico, naturaleza del ingrediente activo a incorporar, la disponibilidad del ingrediente activo en el sitio de acción, condiciones ambientales en las que se pretende administrar el producto (Gupta y Garg, 2002).

Las cremas son preparaciones semisólidas homogéneas que consisten en sistemas de emulsión opacos. Su consistencia y sus propiedades reológicas dependen del tipo de emulsión, ya sea agua en aceite o aceite en agua y la naturaleza del principio activo en la fase interna. Las cremas están destinadas a la aplicación en la piel o ciertas membranas mucosas para propósitos terapéuticos, especialmente cuando no sea necesario un efecto oclusivo (Gupta y Garg, 2002).

Los ungüentos son preparaciones semisólidas, homogéneas, formadas por dos grasas destinadas a una aplicación externa a la piel o membranas mucosas. Estos son utilizados como emolientes o para aplicación de ingredientes activos a la piel con fines protectores o terapéuticos que se desea un grado de oclusión (Revoredo *et al.*, 1998).

Por otro lado las pastas son preparaciones semisólidas homogéneas que contienen altas concentraciones de sustancias en polvo insolubles (normalmente no menor del 20%) dispersos en una base adecuada liposoluble. Son generalmente menos grasosas, más absorbentes y rígidas en consistencia que los ungüentos debido a la gran cantidad de ingredientes en polvo presentes. Algunas pastas consisten en una sola fase, como pectina hidratada, y otras consisten en un material grueso y rígido que no fluye a temperatura corporal. Las pastas deben adherirse bien a la piel. En muchos casos forman una película protectora que controla la evaporación del agua (Gupta, P y Garg 2002).

Los geles son sistemas coloidales que envuelven y atrapan el agua en una red tridimensional compuestos por agua y sustancias gelificantes y concentradoras, humectantes, emolientes, conservantes, aromas y colorantes que mejoran la apariencia del producto. Dependiendo de su comportamiento frente al agua se clasifican en geles hidrófilos o hidrogeles y geles hidrófobos o lipogeles. Los primeros están constituidos por agua, glicerina, propilenglicol u otros líquidos hidrofílicos y por sustancias gelificantes como polímeros carboxílicos. Los lipogeles están constituidos por parafina líquida adicionada de polietileno, por aceites grasos gelificados o por jabones de alumnio y zinc. Son vehículos oleosos oclusivos de diversa consistencia que por su acción emoliente-lubricante son aptos para el tratamiento de las dermatitis crónicas ([Ibrahim \*et al.\*, 2013](#); Ahmed, 2015).

Los geles han atraído un interés notable por su uso en la administración de fármacos debido a sus propiedades físicas. La alta porosidad que caracteriza a los hidrogeles puede ajustarse fácilmente mediante el control de la densidad de enlaces cruzados en su matriz y la afinidad al agua. Su estructura porosa también permite que medicamentos sean cargados y luego liberados. Las ventajas ofrecidas por hidrogeles para la aplicación de administración de fármacos incluyen la posibilidad de una liberación sostenida del fármaco, lo que resulta en el mantenimiento de una alta concentración local de un principio activo durante largos periodos. El fármaco se puede cargar en un gel y liberarse a través de los mecanismos de difusión controlada, que existen en la piel (Caló y Khutoryanskiy, 2015).

#### **2.4 Toxicidad y genotoxicidad de los materiales**

La toxicología es la ciencia que estudia los efectos tóxicos de compuestos en seres vivos y en los ecosistemas. Tiene como objetivo determinar los efectos adversos de los materiales artificiales incluyendo la prevención y la mejora de dichos efectos y la identificación de los peligros potenciales de sus productos (Oberdörster, 2010). La creciente fabricación y uso de formulaciones para diversas aplicaciones industriales y biomédicas, así como de productos de consumo, ha generado serias preocupaciones acerca de la seguridad de estos para la salud humana y del medio ambiente (Oberdörster, 2010).

La toxicidad es la medida de daño no deseado e inespecífico sobre células, órganos o individuos causados por la exposición a un compuesto cuyas propiedades intrínsecas son modificadas por las vías de administración (oral, cutánea, inhalatoria, sistémica), la dosis y la distribución en el tiempo. Todo compuesto puede ser potencialmente tóxico ya que puede causar daños e incluso la muerte después de una exposición excesiva. La mayoría pueden ser usados de forma segura si se toman las precauciones para que la exposición esté siempre por

debajo de unos límites tolerables y apropiados (Oberdörster, 2005). Un compuesto ejerce acción tóxica al alterar las funciones del organismo a nivel celular, bioquímico y molecular teniendo como consecuencia una manifestación observable de un efecto el cual puede ser reversible (desaparece al corto tiempo) e irreversible (no desaparece). Además, es posible estimar el riesgo o peligro potencial que un agente químico puede ocasionar sobre un organismo ~~vivo~~ cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas. Existen modelos experimentales que se exponen a dosis únicas (toxicidad aguda) o repetidas (subagudas, subcrónicas y crónica) del compuesto por la vía de administración que se piensa emplear (Mendoza, 2008).

La genotoxicidad se refiere a la capacidad que tienen los agentes químicos o físicos de alterar la estructura, el contenido de la información o la segregación del ADN, ~~originando daños en el ADN, los cuales que~~ pueden interferir en los procesos normales de replicación o funcionamiento celular. Por lo tanto, las pruebas de genotoxicidad incluyen pruebas que proporcionan ~~información una indicación del~~ daño inducido al ADN (pero no pruebas directas de mutación) a través de efectos tales como roturas de cadenas de ADN, ~~la~~ síntesis de ADN no programada, intercambio de cromátidas ~~es~~ hermanas, ~~la~~ formación de aductos de ADN o recombinación mitótica. Los resultados de los ensayos de genotoxicidad se suelen tomar como indicadores de efectos mutagénicos los cuales se transmiten en la división celular ocasionando enfermedades, como el cáncer e induciendo muerte celular (Tisserand *et al.*, 2014).

**2.4.1 Toxicidad de los tratamientos tópicos.** El vehículo o los compuestos activos de un tratamiento tópico cutáneo (glucocorticoides, retinoides, antibióticos, antifúngicos) puede producir efectos locales adversos, donde los de mayor importancia son: irritación, sensibilización alérgica, atrofia, comedogenicidad, formación de telangiectasias, prurito y dolor. En el caso de los glucocorticoides los efectos adversos son la formación de estrías distensa, atrofia cutánea y la rosácea esteroidea. Suelen formarse papulas, pústulas y granulomas (Chambergó y Valdivia, 2003; Lorenzo-Velázquez y Lorenzo Fernández, 2008). En LC se han desarrollado ungüentos conteniendo medicamentos como la paromomicina de baja toxicidad o algunos preparados con dimetilsulfóxido (DMSO) los cuales fueron irritantes y con baja efectividad (Lee y Hasbun, 2003).

Existen organizaciones internacionales interesadas en la aplicación de políticas nacionales que garanticen el desarrollo responsable de biotecnologías como la OCDE la cual ha se ha centrado en la evaluación y valoración de formulaciones que aseguren la salud humana y la seguridad ambiental (Kearns *et al.*, 2009). Se han desarrollado protocolos que evalúan la toxicidad y genotoxicidad de los compuestos químicos libres o formulados en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* determinando la irritación de las formulaciones en dosis únicas o múltiples mediante la producción de edema e eritema y cambios histológicos (de Oliveira *et al.*, 2014). Igualmente se ha determinado la fototoxicidad en líneas celulares de fibroblastos murinos (Ceridono *et al.*, 2012; Kejlová *et al.*, 2007), la hipersensibilidad de contacto (Ceridono *et al.*, 2012), las alteraciones en la función hepática y renal (Liu *et al.*, 2004), la fragmentación del ADN por el ensayo cometa alcalino (LLana *et al.*, 2014) y la formación de micronúcleos (OCDE, 2014).

**2.4.2 Toxicidad de los AE y sus componentes mayoritarios.** Los AE han estado involucrados como causantes de reacciones en la piel incluyendo dermatitis de contacto alérgica, dermatitis de contacto irritante, reacciones fototóxicas y urticarias de contacto debido a exposiciones únicas o múltiples de los AE (Bleasel *et al.*, 2002; Kanerva, 2000). También se han asociado a casos de intoxicaciones por la ingestión oral de aceites sin diluir, en concentraciones más altas que las dosis terapéuticas, que llevan a sintomatología de vómitos, convulsiones, fiebre, entre otros, dependiendo de la toxicidad inherente del AE (Tisserand y Young, 2014a). La fototoxicidad de los AE se debe al tipo de molécula presente y a su capacidad de producción de diferentes radicales con o sin exposición a la luz. Moléculas como las furocumarinas fotoactivas, presentes en el AE de *Citrus aurantium*, contienen psoralenos que se unen al ADN bajo exposición ~~de~~a la luz ultravioleta produciendo aductos en el ADN (Bakkali *et al.*, 2008). Los AE pueden ingresar a la célula sin dañar las membranas, proteínas y/o el ADN. Sin embargo, podríann producirse radicales cuando las células se encuentran expuestas a la activación de la luz (Averbeck *et al.*, 1990).

La citotoxicidad de los AE se debe en parte a la cantidad de sus diversos componentes tales como fenoles, aldehídos y alcoholes (Bruni *et al.*, 2004). Su naturaleza lipofílica permite el paso a través de las membranas celulares, alterando su estructura u organización dinámica de la bicapa lipídica, aumentando la permeabilidad, la pérdida de iones, la reducción del potencial de membrana mitocondrial, el colapso de la bomba de protones y la depleción del ATP (Turina *et al.*, 2006).

## 2.5 Geles, $\beta$ C y AE en leishmaniasis

A pesar del impacto de esta enfermedad, los tratamientos disponibles son limitados y no existe vacuna. Por esto la búsqueda de alternativas terapéuticas contra la LC es apremiante.

Con respecto a la actividad anti-*Leishmania* del  $\beta$ C, diversos estudios establecen su efecto toxico frente al parásito en modelos *in vitro* o como componente mayoritario de determinados AE (Leal *et al.*, 2013; Neira *et al.*, 2014).

Estudios realizados han demostrado el efecto anti-*Leishmania* del AE de *Chenopodium amobrosioides* donde muestran una mejor eficacia en el tratamiento intralesional en ratones BALB/c infectados con *L.(L.) amazonensis* en comparación con sus componentes mayoritarios (carvacrol, ascaridol y oxido de cariofileno) a concentraciones de 30 mg/kg. Además, este AE mostró mejores resultados que el Glucantime al ser administrado cada 4 días por 14 días. ~~Se realizó m~~Mezclas de los componentes mayoritarios ~~fue realizada~~, sin embargo, no ~~fue seguro debido a que~~ los ratones murieron a la tercera dosis del tratamiento.(Monzote *et al.*, 2014). La búsqueda de efectividad contra el parásito y la no toxicidad ha llevado a un estudio más meticoloso del AE y sus componentes; Se han realizaron ensayos de sinergismos entre los componentes mayoritarios del AE encontrando efecto sinérgico entre la combinación de ascaridol-carvacrol con un índice de concentración inhibitoria fraccional (CIF) de 0,171, mientras una actividad indiferente entre las combinaciones de ascaridol- oxido de cariofileno (Índice CIF: 3,613) y carvacrol -oxido de cariofileno (Índice CIF: 2,356). La proporción utilizada que mostró mejores resultados anti-*Leishmania* tanto *in vitro* como *in vivo* con baja toxicidad fue un radio de 1:4 ascaridol - carvacrol (Pastor *et al.*, 2015).

Otros AE como el de *Artemisia absinthium* administrando intralesionalmente cinco dosis de 30mg/kg demostró control en el tamaño de las lesiones y carga parasitaria en comparación con los animales tratados con Glucantime y sin tratamiento- (Monzote *et al.*, 2014). En otro estudio el AE de *Tetradenia riparia* redujo la carga parasitaria de *L.(L.) amazonensis* en el

bazo de ratones BALB/c al ser aplicarlo tópicamente a concentraciones de 0,5 y 1% (Cardoso *et al.*, 2015).

Algunas formulaciones tópicas semisólidas tipo gel han sido estudiadas utilizando el AE como excipientes o vehículos. Se ha utilizado un AE en la preparación de una nanoemulsión (NE) con el fotosensibilizador ftalocianina de zinc (PcZn, compuesto utilizado en la terapia fotodinámica) utilizando el AE de *Eugenia caryophyllata*, ~~Se encontr~~andose que la NE con el AE ~~mostraban una~~poseía ~~mayorejor~~ estabilidad y ~~un mayor~~ efecto contra *L.(L.) amazonensis* y *L.(L.) infantum* que sin el AE (de Oliveira *et al.*, 2017).

Los AE han sido utilizados como potenciadores de la permeación (PPs) llamado la atención de los investigadores (Chen *et al.*, 2015). Ellos podrían reemplazar compuestos químicos con estructura similar. Un ejemplo es la utilización del ácido oleico el cual ha sido utilizado en la preparación de emulgeles en LC sirviendo como vehículo de la AmB, mejorando el tratamiento tópico por infecciones por *L.(L.) major* (Pinheiro *et al.*, 2016).

Igualmente se han preparados hidrogeles conteniendo paramomicina (30mg/mL) y chitosan el cual es un biomaterial excipiente utilizado en el cuidado de heridas. Este hidrogel ~~han~~ reducido el tamaño de la lesión y carga parasitaria en ratones BALB/c infectados con *L.(L.) major* (Schwartz *et al.*, 2014). Geles de paramomicina al 10% fueron evaluados en hámsteres infectados con *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* encontrándose una mayor efectividad comparada con el tratamiento parenteral del Sb<sup>V</sup> en *L. (L.) amazonensis*, mientras que el efecto frente *L.(V.) braziliensis* fue similar (Gonçalves *et al.*, 2005).

Por lo anterior, el uso de los compuestos mayoritarios como el  $\beta$ C y un AE podrían constituir una excelente opción en las formulaciones de uso tópico en LC actuando como vehículos, mejorando los efectos en piel y actuando posiblemente como PPs.

### 3 METODOLOGIA

El presente trabajo fue un estudio experimental *in vitro* e *in vivo* en el que se diseñó, preparó, caracterizó y evaluó el efecto toxico y anti-*Leishmania* de formulaciones tópicas tipo gel que contenían aceites esenciales (AE), trans- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ C) solos o combinados con miltefosina (MIL), extraídos de plantas colombianas, ~~trans- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ C) solos o combinados con miltefosina (MIL)~~. Los AE fueron obtenidos por hidrodestilación asistida por radiación de microondas en la planta piloto del CENIVAM dirigido por la Dra. Elena Stachenko.

La preparación y evaluación *in vitro* fue realizada en el laboratorio de quimioterapia del CINTROP-UIS. Para las pruebas de toxicidad se realizó un entrenamiento en el modelo murino en el Laboratorio de Genética ~~y Toxicológica~~, Departamento de Genética y Morfología de la ~~Fundação~~ Universidade de Brasília; posteriormente los ensayos fueron realizados en la Unidad Experimental en Animales /UIS-~~Guatiguará~~. ~~En el trabajo con~~ En los ensayos *in vivo* utilizando ratones BALB/c se ~~recolectaron~~ biopsias de órganos los cuales fueron procesados y analizados en el Laboratorio del Departamento de Patología, Escuela de Medicina de la UIS, con el apoyo y asesoría del profesor Julio Cesar Mantilla. Todos los experimentos realizados fueron avalados por el Comité de Ética de la UIS. En la Figura 2 se muestra el diseño metodológico desarrollado en este trabajo.

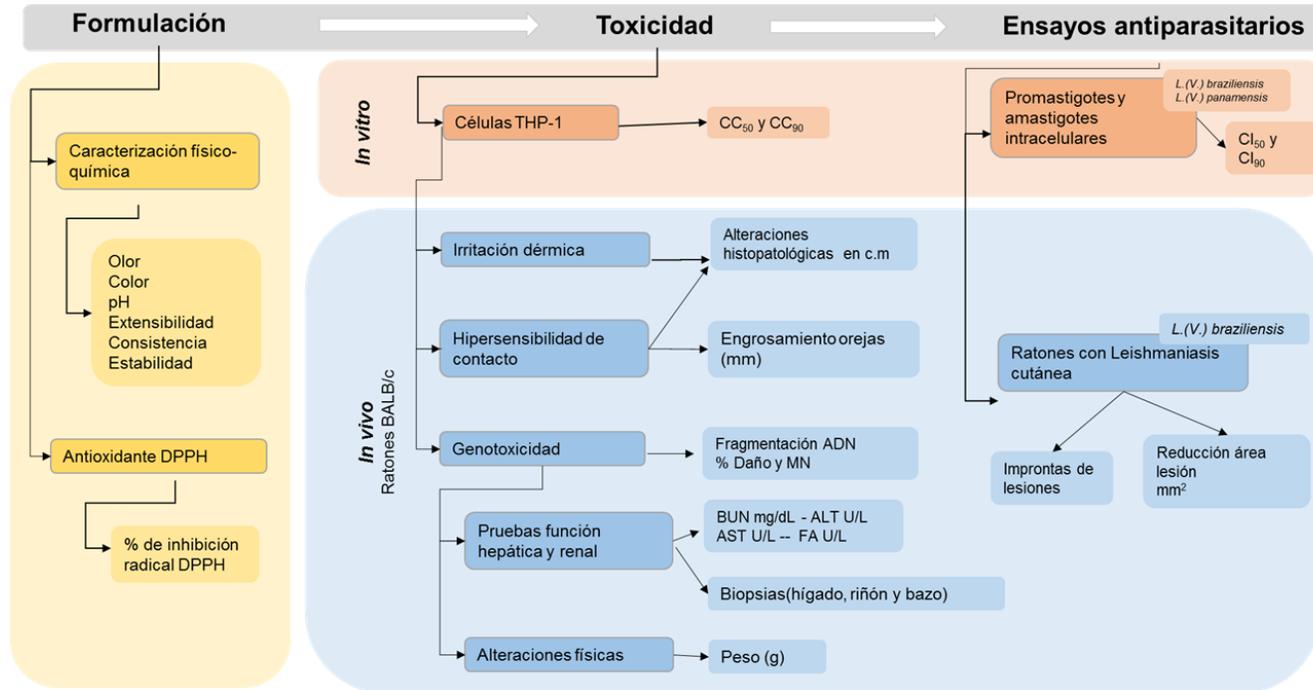


Figura 2. Diseño metodológico utilizado en el presente trabajo. CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica 50, CC<sub>90</sub>: concentración citotóxica 90, CI<sub>50</sub>: concentración inhibitoria 50, CI<sub>90</sub>: concentración inhibitoria 90, c.m: campo microscópico, FA: fosfatasa alcalina, GOT/AST: Amino aspartato transferasa, BUN: Nitrógeno ureico, ALT/AST: amino alanina transferasa, MN: micronúcleos, DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

### 3.1 Geles.

**3.1.1 Compuestos.** Los componentes utilizados fueron: el *trans*- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ C, reactivo referencia W225207  $\beta$ -cariofileno marca Sigma Aldrich® St.Louis, USA.), miltefosina (MIL, Cayman, Michigan, USA) y el AE. Este último fue obtenido de *Lippia origanoides* quimiotipo felandreno (AE) a partir de hojas frescas.

El AE de *L. origanoides* quimiotipo felandreno fue obtenido a partir de las plantas del orégano de monte recolectadas en la localidad de Los Santos, departamento de Santander, Colombia con número de registro 516294 del Herbario Nacional Colombiano. Fue extraído por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y caracterizado por espectrofotometría de masas acoplado a un cromatógrafo de gases (GC-MS). Presentó un rendimiento de extracción del 1,5% p/p y con base en el análisis cromatográfico detallado de sus componentes mayoritarios fue clasificado como quimiotipo felandreno. Esta información se obtuvo de Stashenko *et al.*, 2014. Ver Tabla 4.

**Tabla 4.**  
*Composición química del aceite esencial de L. origanoides quimiotipo felandreno.*

Compuestos mayoritarios	Tipo <sup>a</sup>	$\alpha$ <sup>b</sup> DB-5MS	Cantidad relativa %
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	SH	1420	11,3
<i>p</i> -Cimeno	MH	1029	11,2
$\alpha$ -Felandreno	MH	1006	9,9
Limoneno	MH	1034	7,2
$\beta$ -Felandreno	MH	1036	6,5
$\alpha$ -Humuleno	SH	1452	6
Borneol	MO	1182	3,1
Canfeno	MH	946	2,6
$\alpha$ -Pino	MH	933	2,3
Óxido de cariofileno	SO	1584	2,2
$\delta$ -Cadineno	SH	1530	1,6
$\beta$ -Mirceno	MH	988	1,5

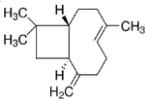
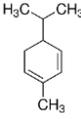
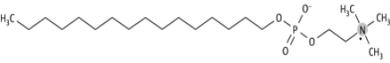
*Nota:*a. Tipo de compuesto: hidrocarburo monoterpénico (MH), monoterpeno oxigenado (MO), hidrocarburo sesquiterpénico (SH), sesquiterpeno oxigenado (SO). b. Índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-5MS (60 m).

La pureza del  $\beta$ C fue determinada comparando los patrones de fragmentación (área e Índices de Retención, IR) mostrados por el  $\beta$ C en GC-MS con los suministrados en las bases de datos (NIST, Adams, Wiley), administrados por el software *Data Analysis Chemstation* de Agilent Technologies del laboratorio CIBIMOL de la UIS.

La tabla 5 muestra las estructuras químicas de los componentes de los geles.

**Tabla 5.**

*Características químicas de los componentes principales de los geles utilizadas en este trabajo.*

Componentes/ química	Formula	Estructura química	Peso molecular g/mol
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno ( $\beta$ C) C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>			204,35
<i>Lippia origanoides</i> quimiotipo Felandreno (AE) C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> <sup>a</sup>			136,23
Miltefosina (MIL) C <sub>21</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>4</sub> P			407,57

*Nota:* <sup>a</sup>Cantidad relativa del componente mayoritario  $\alpha$  y  $\beta$ - felandreno 16,4%.

**3.1.2 Preparación de las formulaciones tipo gel.** Se prepararon cuatro formulaciones semisólidas tipo gel basado en los protocolos descritos de Ibrahim *et al.*, 2013 y Singh *et al.*, 2014. De una manera general los geles fueron preparados utilizando una fase acuosa donde se mezclaron polímeros gelificantes y compuestos hidrofílicos y una fase orgánica donde se disolvieron los compuestos no solubles. Las dos fases fueron mezcladas formando un sistema coloidal semisólido.

Los cuatro geles fueron identificados como Gel1(Vehículo), Gel2(MIL), Gel3( $\beta$ C+AE) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) los cuales se prepararon utilizando dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac, Darmstadt, Alemania), el polímero gelificante Carbopol 940, benzoato de sodio, y trietanolamina (TEA) obtenidos de Químicos Suquim. Los códigos y la composición de los geles se observan en la tabla 6. Los geles fueron mantenidos a 4°C protegidos de la luz.

**Tabla 6.**  
Composición de formulaciones tipo gel.

Código CINTROP	Formulación	Componentes principales (%p/v)		
		$\beta$ C	AE	MIL
001	Gel1 (Vehículo)	0	0	0
002	Gel2(MIL)	0	0	0,5
003	Gel3( $\beta$ C+AE)	0,5	0,3	0
004	Gel4( $\beta$ C+AE+MIL)	0,5	0,3	0,5

Nota:  $\beta$ C: *trans*- $\beta$ -cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina

### 3.2 Caracterización geles

Los geles Gel1(Vehículo), Gel2(MIL), Gel3( $\beta$ C+AE) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) fueron caracterizadas siguiendo los protocolos descritos en Fernández-Montes *et al* 2003.

**3.2.1 Características organolépticas.** Las características de color y olor fueron registradas macroscópicamente. La consistencia aparente se estableció subjetivamente observando la fluidez (definida como la habilidad de deformación que puede adquirir un fluido sin necesidad de ejercer una tensión mecánica) y la resistencia (definida como la capacidad de una dispersión coloidal para desarrollar y mantener una forma). Para ello fueron colocados 10 g del gel en un vaso de precipitado y sometidos a agitación constante por 1 min mediante una varilla de vidrio. Los geles fueron clasificados como: geles semilíquidos, cuya consistencia fue semifluida y con agitación apenas sin resistencia; geles semisólidos de consistencia media, agitación con resistencia moderada; y geles semisólidos de alta consistencia, agitación con resistencia alta.

**3.2.2 Determinación del pH de los geles.** Se pesaron 50 mg de las formulaciones y se aplicaron sobre tiras indicadoras de pH (Merck, Darmstadt, Germany) por 1 min. Los resultados fueron determinados comparando con la guía suministrada por la casa comercial. El pH de las formulaciones fue clasificado en ácido (0 a 6), neutro (7) o alcalino (8 a 14) según la escala universal.

**3.2.3 Extensibilidad de los geles.** Esta característica fue determinada cualitativa y cuantitativamente. La extensibilidad aparente se calculó colocando aprox 0,5-1,0 g de Gel1(Vehículo) y Gel4( $\beta$ C+AE) sobre el dorso de la muñeca extendiéndolo hacia el antebrazo suavemente mediante la yema de los dedos, estableciendo la distancia recorrida en cm. Los geles fueron clasificados como: geles de baja (hasta 5 cm), media (hasta 10 cm) y alta (mayor de 15 cm) extensibilidad.

La extensibilidad cuantitativa fue determinada calculando el área de extensibilidad según lo descrito por Pavón Pérez *et al* 2011. Se colocaron láminas de vidrio sobre papel milimetrado para determinar el punto de aplicación del gel (Ver Figura 3). Se colocaron 25

mg de los geles y se cubrió con otra lámina de vidrio de 5 g. Después de 1 min se registraron los valores de los dos diámetros de la elipse en mm y se calcularon los radios longitudinales y transversales. A partir de estos valores se determinó el área de la elipse expresada en  $\text{mm}^2$  utilizando la fórmula  $A = r^1 * r^2 * \pi$ . Este procedimiento fue repetido utilizando láminas con diferentes pesos (7, 9 y 11g).

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.03 Prism. El ensayo fue realizado a  $25^\circ\text{C}$  por triplicado. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (DS) y las diferencias entre los grupos fueron analizadas por la Prueba t de Student. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

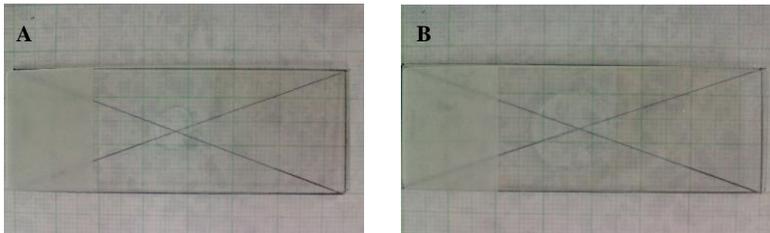


Figura 3. Prueba de extensibilidad cuantitativa. A. Gel1(Vehículo). B. Gel4(AE+βC+MIL).

**3.2.4 Homogeneidad de los geles.** La homogeneidad de los geles fue determinada considerando la transparencia y ausencia de agregados según lo descrito en Alía Fernández-Montes 2003]. En geles con material pulverulento, sustancias líquidas insolubles o parcialmente solubilizadas se determinó la uniformidad por visualización directa de una fina capa de gel. Para esto se realizó un extendido de 50 mg del Gel1(Vehículo), Gel2(MIL), Gel3( $\beta$ C+AE) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) sobre láminas de vidrio; seguidamente se situó la lámina encima de una superficie negra, procediendo a su visualización mediante una lupa.

**3.2.5 Estabilidad de los geles.** Los geles fueron incubados a diferentes grados de temperaturas (4, 25 y 37°C) por un periodo de tres meses. Posteriormente se determinaron las características de consistencia, pH y extensibilidad según lo descrito anteriormente.

**3.2.6 Capacidad antioxidante de los geles.** La capacidad antioxidante fue evaluada utilizando el método del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH, PM: 394,32, Sigma-Aldrich®) descrito en Brand-Williams *et al.*, 1995 y Atmani *et al.*, 2009 con modificaciones. Se mezclaron 500 mg del  $\beta$ C, AE Gel1(Vehículo), Gel2(MIL), Gel3( $\beta$ C+AE) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) en 1 mL de DPPH diluido en metanol en tubos de ensayo. ~~De El control utilizado fue antioxidante se utilizó~~ la vitamina C (2 mg/mL, Sigma-Aldrich®). Se incubó por 20 min y se determinaron las absorbancias mediante un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a una longitud de onda de 517 nm. Se determinaron los porcentajes de inhibición del radical DPPH (% inhibición) a través de la fórmula: Porcentaje de inhibición =  $100 * (DO \text{ grupo control} - DO \text{ grupo tratado}) / DO \text{ grupo control}$ .

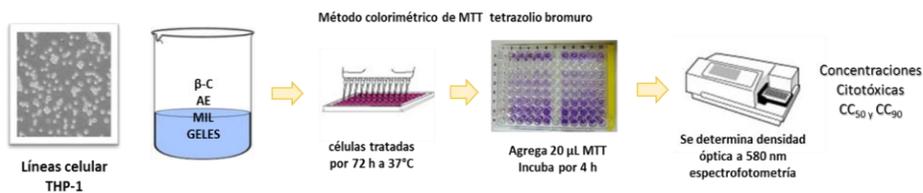
A partir del porcentaje de inhibición de los radicales de DPPH se determinó la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) por regresión sigmoideal utilizando el software Mxlfifit™(ID Business Solution,UK). Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por

la prueba ANOVA de una sola vía seguida de la prueba Bonferroni. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### **3.3 Ensayos de toxicidad de los geles**

La toxicidad de las formulaciones Gel1(Vehículo), Gel2(MIL), Gel3( $\beta$ C+AE) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) fueron determinadas en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos fueron realizados con la aprobación del Comité de Ética para Investigación Científica CEINCI de la Universidad Industrial de Santander, código p11.02 y cumpliendo las guías y directrices internacionales de bienestar animal y buenas prácticas de laboratorio establecidas OCDE (<http://www.oecd-ilibrary.org/>), provocando el mínimo sufrimiento en los animales.

**3.3.1 Ensayos *in vitro*.** Prueba de toxicidad en células de mamífero. Se utilizaron células de monocitos leucémicos humanos, THP-1 (ATCCTIB-202) los cuales fueron mantenidos en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Las células fueron diferenciadas a su fenotipo adherente utilizando 10 ng/mL de forbol miristato acetato (PMA) por 72 h. La citotoxicidad fue determinada utilizando la metodología descrita en Neira *et al.*, 2014. Las células THP-1 diferenciadas fueron tratadas con diferentes concentraciones de los geles y componentes (Ver Figura 4). Células control fueron mantenidas sin compuesto. La toxicidad fue determinada por el método de colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difetil-tetrazolio bromuro) (Mosmann, 1983). La densidad óptica fue determinada por espectrofotometría a 580 nm usando un lector de microplacas (Ver Figura 4). El porcentaje de citotoxicidad fue calculado mediante la fórmula: Porcentaje de citotoxicidad =  $100 * (DO \text{ grupo control} - DO \text{ grupo tratado}) / DO \text{ grupo control}$ . Para analizar los resultados se determinó la concentración tóxica de la formulación y sus componentes para el 50% y 90% de las células (CC<sub>50</sub>, CC<sub>90</sub>)



calculados por regresión sigmoideal utilizando el software Mxslfit™). Las diferencias entre *Figura 4*. Evaluación de toxicidad en células de mamífero. Método colorimétrico de MTT utilizado *in vitro* para determinar viabilidad celular.

los grupos fueron analizadas por la prueba ANOVA. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

**3.3.2 Ensayos *in vivo*.** El efecto tóxico de los geles fue determinado teniendo en cuenta las siguientes características: Irritación dérmica, hipersensibilidad de contacto (HC) y genotoxicidad. Paralelamente se evaluaron las alteraciones físicas, perfil bioquímico y se analizaron las alteraciones histopatológicas de hígado, riñón y bazo. En la Figura 5 se muestra un diagrama de los experimentos realizados.

**3.3.2.1 Ratones utilizados.** Se utilizaron ratones hembras del linaje BALB/c, procedentes del Instituto Nacional de Salud, con 10 a 12 semanas de edad y masa corporal de 22 g. Los animales fueron mantenidos en la Unidad Experimental en Animales /UIS\_ Guatiguará a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) con agua y comida ad libitum y ciclo luz oscuridad.

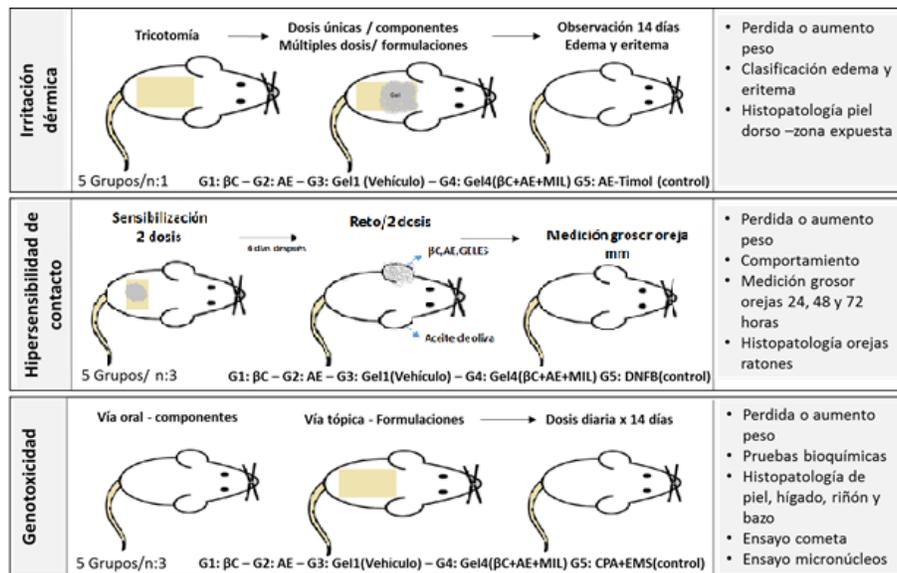


Figura 5. Ensayos de toxicidad en ratones BALB/c. en la Figura se muestra la metodología empleada ~~en este trabajo~~ para estos ensayos.

**3.3.2.2 Ensayos de irritación.** Los ensayos de irritación/corrosión dérmica realizados (ver Figura 4) se basaron en la guía 404 de la OECD (Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion, 2015). Se realizó tricotomía de la zona dorsal de los ratones 24 h antes de iniciar con la prueba. Los geles fueron aplicados en una y múltiples dosis vía tópica sobre el dorso del animal según el compuesto (Ver tabla 7). Los signos de eritema y/o edema fueron registrados durante 14 días. El sacrificio de los animales se realizó utilizando anestésicos (Xilacina 12,5 mg/kg y Ketamina 87,5 mg/kg, X/K). Se obtuvieron muestras de piel del sitio de aplicación para estudios histopatológicos.

**Tabla 7.**  
Grupos experimentales utilizados ensayos de irritación dérmica.

Grupo	Componentes/ Geles	n	Dosis	Concentración (%)
1	βC	1	1	100%
2	AE	1	1	100%
3	Gel1	1	14	0
4	Gel 4(βC-AE-MIL)	1	14	0,5:0,3:0,5%
5	AE -Timol* (Control)	1	1	100%

*Nota:* βC: *trans*-β-cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: Miltefosina, AE-Timol\*: Aceite esencial quimiotipo timol (Control positivo de irritación).

Las reacciones dérmicas de irritación (edema y/o eritema) fueron evaluadas por visualización macroscópica diaria. Los signos de irritación en el sitio de aplicación fueron clasificados como: 0- ausencia, 1- ligero, 2- leve, 3- moderada, 4- grave irritación. Los animales fueron sacrificados a los 14 días post tratamiento (pt).

El procesamiento de las biopsias se realizó de acuerdo al manual de procesos y procedimientos del Laboratorio de Patología de la UIS. Se extrajeron aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> de la piel tratada con los compuestos y geles utilizando tijeras quirúrgicas. La piel fue fragmentada en cuatro partes con un bisturí quirúrgico e inmediatamente, fueron depositadas

en formol tamponado al 10% (formaldehído al 37%: agua destilada: fosfato de sodio monobásico: fosfato de sodio di básico). Después de 24 h, las biopsias fueron sometidas a un proceso de deshidratación utilizando una serie de soluciones acuosas de menor a mayor ~~de~~ concentración de alcohol etílico. Posteriormente las muestras fueron embebidas en bloques de parafina (Leica Microsystems®). Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor utilizando un micrótopo RM2135 (Leica Microsystems®) y se colocaron en láminas portaobjetos. Finalmente, fueron coloreadas con hematoxilina y eosina para ser observadas por microscopía de luz. Para el procedimiento, lectura e interpretación de las láminas histológicas se contó con la colaboración del personal del Laboratorio de Patología, UIS. Los parámetros histopatológicos de la piel evaluados fueron: hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo), paraqueratosis, espongirosis, exocitosis e infiltración dérmica asignado según Shen *et al.*, 2008 la siguiente clasificación según: (-) ausencia, (±) equivoca, (+) leve, (++) moderado y (+++) severo. Se compararon tanto las alteraciones macroscópicas en la piel de los ratones como las características histopatológicas entre los ratones tratados con el gel Gel1 (Vehículo) con los tratados con los componentes y geles. Igualmente se ~~tuvieron en~~ cuenta consideraron los resultados obtenidos con un control positivo (AE quimiotipo Timol) el cual fue previamente analizado en el laboratorio.

**3.3.2.3 Hipersensibilidad de contacto (HC).** La HC fue determinada utilizando la prueba de inflamación de la oreja inducido por un agente sensibilizante (modelo utilizado en dermatitis de contacto en humanos) basados en Man MQ *et al.*, 2012. Los ratones BALB/c fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos experimentales (n= 3 por grupo). Cada grupo fue tratado tópicamente en el dorso de los ratones con el  $\beta$ C, AE, Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) y un control hipersensibilizante de dinitrofluorobenceno DNFB utilizando 1 dosis diaria por 2 días (Ver Figura 5). Una semana después se aplicó una dosis de reto en una de las orejas de los animales ~~y e.~~ En la otra oreja se aplicó el vehículo dependiendo del compuesto o gel utilizado (Ver tabla 8). Se midió el diámetro de cada una de las orejas (mm) utilizando un calibre digital (VWR®, Pennsylvania, USA) a las 24 y 48 h (Ver Figura 6). Los ratones fueron sacrificados 24 h después de la última medición con una mezcla X/K. Las muestras de orejas fueron cortadas con tijeras quirúrgicas y dejadas en un frasco con formalina 10%. Los parámetros histopatológicos evaluados fueron los ~~mismo a los~~ descritos anteriormente en los ensayos de irritación (Ver Ensayos de irritación numeral 4.3.2.2),<sub>2</sub> adicionando la determinación de eosinófilos. Se compararon los patrones histopatológicos encontrados al tratamiento con geles y compuestos con los producidos por el control de DNFB.

Los resultados fueron expresados con la media  $\pm$  desviación estándar (DS) y los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Las diferencias entre los grupos analizados fueron analizadas por la prueba de ANOVA seguida de la prueba Bonferroni.

**Tabla 8.**

Grupos experimentales utilizados en el ensayo de hipersensibilidad de contacto.

Grupo	Componentes/ Formulaciones	n	Dosis		Vehículo
			Concentración		
			Sensibilizante	Reto	
1	$\beta$ C	3	100%	10%	Aceite de oliva
2	AE	3	100%	10%	Aceite de oliva
3	Gel1(Vehículo)	3	-	-	-
4	Gel4( $\beta$ C+AE+MIL)	3	0,3;0,5;0,5%	0,3;0,5;0,5%	-
5	DNFB	3	0,5%	0,2%	Aceite de oliva: acetona 4:1

Nota:  $\beta$ C: *trans*- $\beta$ -cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina DNFB: dinitrofluorobenceno (Control hipersensibilidad de contacto).



Figura 6. Medición del engrosamiento de las orejas de los animales utilizando un calibre digital.

**3.3.3 Ensayos de genotoxicidad.** El potencial genotóxico de las formulaciones y sus componentes fueron determinados mediante el ensayo cometa, la formación de micronúcleos en medula ósea. Paralelamente se realizaron estudios histopatológicos en órganos.

**3.3.3.1 Tratamiento y sacrificio de los ratones.** Los ratones BALB/c fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos experimentales (n= 3 por grupo). La dosis, la vía de aplicación y la concentración de los componentes se muestran en la tabla 9. Como control positivo en las pruebas se utilizó la ciclofosfamida (CPA) y el etil metano sulfonato (EMS) los cuales fueron aplicados vía intraperitoneal (IP) antes del sacrificio.

Los ratones fueron sacrificados con una mezcla X/K según lo descrito anteriormente. Se realizó punción cardiaca para la obtención de sangre total para el ensayo cometa. Parte de la sangre fue centrifugada para obtener el suero y realizar las pruebas bioquímicas (Ver Pruebas bioquímicas numeral 4.3.3.5). Los fémures fueron removidos para la obtención de medula ósea para la prueba de micronúcleos y los órganos hígado, riñón y bazo fueron recolectados para estudios histopatológicos.

**Tabla 9.**  
Grupos experimentales utilizados en el ensayo cometa y micronúcleos.

Grupo	Componente / Formulación	Dosis	Vía de aplicación	Concentración componentes
1	βC	1	Oral	100 mg/Kg
2	AE	1	Oral	100 mg/Kg
3	Gel1(Vehículo)	14	Tópica	0
4	Gel4(βC+AE+MIL)	14	Tópica	0,5:0,3:0.5%
5	CPA + EMS	1	IP	50 mg/Kg + 300 mg/Kg

*Nota:* βC: *trans-β*-cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina, CPA: ciclofosfamida, EMS: etil metano sulfonato, IP: intraperitoneal.

**3.3.3.2 Ensayo cometa alcalino en células sanguíneas.** Se realizó teniendo en cuenta el protocolo descrito por Tice *et al.*, 2000 con algunas modificaciones (Neira *et al.*, 2016). Una muestra de sangre (30 µL) fue mezclada con agarosa de bajo punto de fusión 0,5 % (p/v) PBS, pH 7,4 a 37°C y adicionada sobre una lámina portaobjeto previamente cubierta con agarosa normal al 1,5% (Mo Bio Laboratories Ltda, USA) en PBS pH 7,2 por 20 min a 4°C. Posteriormente las láminas se colocaron en solución de lisis por 24 h y fueron sumergidas en la solución tampón alcalina pH >13 a 4°C durante 30 min. Después de este periodo, se inició la electroforesis a 25 V/ 300 mA durante 30 min. Las láminas fueron inmersas en la solución tampón de neutralización (pH 7,5). Las láminas fueron analizadas en el microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse E400, filtro UV2A, Ex:330-380, DM: 400, BA:420) utilizando como colorante de ADN, 10 µg/mL de Hoesch 33342 (Sigma-Aldrich®). Se tomaron registros utilizando una cámara fotográfica (Nikon Coolpix P600, Japan).

Los resultados fueron expresados como la fragmentación de ADN por medio del análisis visual de los ~~núcleos~~ nucleoides (recuento de 100 nucleoides~~núcleos~~/por cada animal), basándose en la clasificación de 0 a 4 de acuerdo con la intensidad de fragmentación (Collins, 2004), donde 0 (sin daño) y 4 (daño severo). El índice de daño (ID) fue calculado de acuerdo a lo propuesto por Jałoszyński *et al.*, 1997), a partir de la fórmula:

$$ID = \frac{(\text{clase } 1 \times 1) + (\text{clase } 2 \times 2) + (\text{clase } 3 \times 3) + (\text{clase } 4 \times 4)}{\text{Total de células analizadas}} \times 100$$

A partir del ID se calculó el porcentaje de daño total de ADN.

**3.3.3.3 Ensayo de micronúcleos en médula ósea.** Después del sacrificio de los ratones se obtuvieron los fémures. Las epífisis fueron cortadas y se realizaron lavados con una jeringa con 1 mL conteniendo suero bovino fetal (SBF) en tubos cónicos plásticos. La suspensión fue homogenizada y centrifugada a 1000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue removido y el sedimento fue re suspendido en 50  $\mu$ L de SBF. Se realizaron extendidos en láminas portaobjetos las cuales fueron fijadas con metanol durante 10 min y coloreadas con Giemsa durante 15 min. Las láminas coloreadas fueron analizadas al microscopio de luz con aumento de 1000x. Para cada animal, se contaron 1000 células. La frecuencia de micronúcleos fue evaluada en 1000 eritrocitos policromáticos EPC, de acuerdo con la directriz 474 de la OECD (1997) con modificaciones.

Para el análisis estadístico de la prueba cometa y la de MN, se utilizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni. Los datos fueron expresados como la media de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

**3.3.3.4 Alteraciones físicas y de comportamiento.** La pérdida o ganancia de peso (g) de los animales se determinó pesándolos en una balanza (OHAUS, México DF, México) al inicio y final del tratamiento. Los cambios en el comportamiento, disminución en la ingesta de alimento fueron registrados.

Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA de una vía de medidas repetidas, Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos

**3.3.3.5 Pruebas bioquímicas.** Se determinó la concentración de urea (BUN, mg/dL), fosfatasa alcalina (FA, U/L), aspartato aminotransferasa (AST/GOT, U/L) y alanina aminotransferasa (ALT/GPT, U/L) en suero utilizando pruebas comerciales. Los ensayos fueron validados utilizando sueros control de bioquímica (Biosystems, Barcelona, España). Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

**3.3.3.6 Estudios histopatológicos en hígado, bazo y riñón.** Después del sacrificio de los ratones se recolectaron biopsias de hígado, riñón y bazo las cuales fueron fijadas en formalina 10% y procesadas según lo descrito anteriormente (Ver Ensayos de irritación numeral 4.3.2.2). Las muestras fueron analizadas microscópicamente por dos observadores independientes. Los parámetros a determinar en las biopsias de hígado fueron la presencia o ausencia de aglomeraciones capilares, fibrosis y necrosis; en el bazo las alteraciones en la arquitectura de las pulpas esplénicas y en riñón la formación de granulomas.

**3.3.4 Ensayos antiparasitarios.** La actividad anti-*Leishmania* de la formulaciones y componentes fueron determinadas *in vitro* e *in vivo*. En los ensayos *in vitro* se evaluó la actividad de las muestras en los diferentes estadios parasitarios (promastigotes y amastigotes intracelulares) de *L. (Viannia) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*. En los ensayos *in vivo* se evaluó la actividad de los geles en ratones BALB/c infectados con *L. (V.) braziliensis*.

**3.3.4.1 Ensayos *in vitro*.** Los promastigotes de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) fueron cultivados en medio insect Schneider's (Sigma-Aldrich®) suplementado con 10% de SFBi a 28°C.

Los promastigotes fueron tratados con diluciones seriadas del  $\beta$ C, AE, MIL, Gel1(Vehículo), Gel3( $\beta$ C+AE), Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) por 72 h a 28°C. Parásitos control

fueron mantenidos sin compuesto. La inhibición del crecimiento parasitario fue determinada microscópicamente por conteo directo de parásitos vivos en hemocitómetro (ver Figura 7). Los amastigotes intracelulares se obtuvieron infectando las células hospederas THP-1 con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, en una proporción parásito: célula de 10:1 por 48 h. Los amastigotes intracelulares fueron tratados con AE,  $\beta$ C, MIL, Gel1(Vehículo), Gel3( $\beta$ C+AE), y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL), durante 72 h a 32°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Las células infectadas control fueron mantenidas sin compuesto. Los porcentajes de infección fueron determinados por conteo microscópico de células infectadas y no infectadas en preparaciones fijadas con metanol y ~~coloreadas~~ teñida con Giemsa. (Neira *et al.*, 2014).

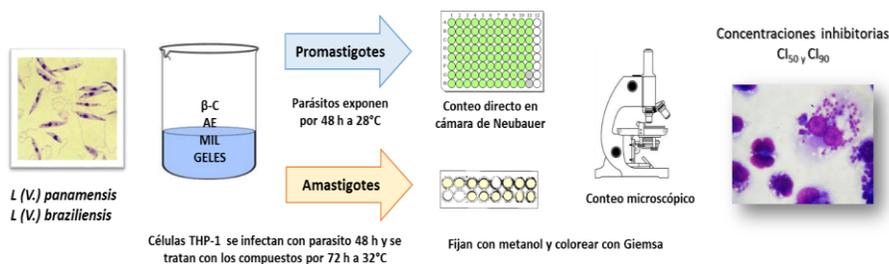


Figura 7. Metodología *in vitro* utilizada para determinar actividad antiparasitaria

Los resultados fueron expresados como la concentración de compuestos y capaz de inhibir el 50% y el 90% de los parásitos ( $CI_{50}$ ,  $CI_{90}$ ) calculados por regresión sigmoïdal utilizando el software Mxslfit™ (ID Business Solution, UK).

Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Times New Roman

**3.3.4.2 Ensayos *in vivo*.** La actividad anti-Leishmania se realizó utilizando el modelo murino BALB/c teniendo en cuenta los principios de las 3R enunciados por Russel y Burch en 1959 “Reemplazar, reducir, refinar”.

3.3.4.2.1 *Infección en ratones BALB/c.* Los ratones BALB/c fueron infectados en la parte dorsal con  $2 \times 10^6$  promastigotes en fase estacionaria de crecimiento de *L. (V.) braziliensis*. Se midió semanalmente la evolución del tamaño de la lesión utilizando un medidor digital.

3.3.4.2.2 *Tratamiento.* Los ratones fueron divididos en cuatro grupos experimentales ( $n=3$  por grupo). Los animales fueron tratados tópicamente con los geles Gel1(Vehículo), Gel2(MIL), Gel3( $\beta C+AE$ ), Gel4( $\beta C+AE+MIL$ ), tópicamente aplicándolos directamente en las lesiones durante 20 días (Ver tabla 10 y Figura 8).

**Tabla 10.**

Grupos experimentales utilizados en los ensayos de infección y tratamiento antileishmania *in vivo*.

Grupo	Formulaciones	n	Dosis	Vía de aplicación	Concentración componente
1	Gel1(Vehículo)	1	20	Tópica	0
2	Gel2(MIL)	3	20	Tópica	0,5%
3	Gel3( $\beta C+AE$ )	2	20	Tópica	0,5;0,3%
4	Gel 4( $\beta C+AE+MIL$ )	3	20	Tópica	0,5:0,3:0.5%

#### 3.3.4.2.3 Evaluación del tratamiento

Los ratones fueron pesados y observados para determinar cambios en el comportamiento y signos del estrés. Durante el tratamiento se midieron las lesiones, en su eje longitudinal y

transversal con un calibre digital. El área (mm<sup>2</sup>) de las lesiones fue calculada utilizando la

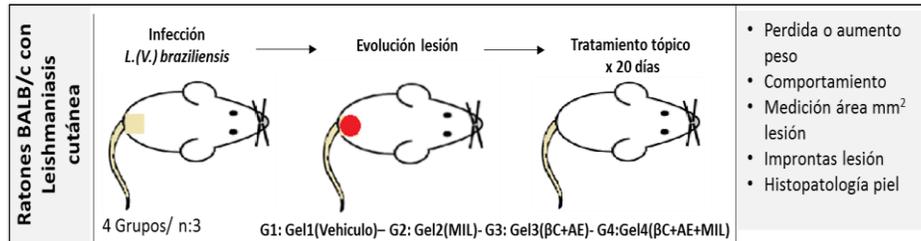


Figura 8. Esquema modelo de infección y tratamiento en ratones BALB/c con Leishmaniasis cutánea

formula  $A = r^1 * r^2 * \pi$ .

3.3.4.2.4 *Efectividad del tratamiento.* La efectividad de la formulación fue evaluada determinando los cambios en el tamaño de la lesión y la presencia de parásitos al final del experimento. Se ~~Hevó-realizó~~ registro fotográfico del aumento o disminución en el tamaño ~~las cuales fueron almacenadael cual fue almacenado~~ en las bases de datos del Laboratorio de Quimioterapia. La presencia de parásitos fue determinada en las improntas coloreadas con Giemsa contando microscópicamente el número de amastigotes en 10 campos microscópicos.

Para la eficacia parasitológica los resultados fueron expresados como la media de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar. Para la comparación de los diferentes grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo muestran en primer lugar las características físico-químicas de los 4 geles preparados, su estabilidad ~~en el~~ lo largo del tiempo (3 meses) y la pureza del compuesto *trans*- $\beta$ -cariofileno ( $\beta$ C). Posteriormente, se muestran los resultados de los ensayos de toxicidad *in vitro* en células de mamífero y en ratones al igual que los resultados del efecto del tratamiento en el peso, alteraciones en el perfil bioquímico y alteraciones histopatológicas en piel, hígado, riñón y bazo. Finalmente, se muestran los resultados de la actividad antiparasitaria de los geles y componentes *in vitro* en los diferentes estadios parasitarios ~~e-e~~ in vivo en ratones infectados con LC.

### 4.1 Características físico químicas de los componentes y geles utilizados

**4.1.1 Espectro y pureza del *trans*- $\beta$ -cariofileno  $\beta$ C.** El espectro del  $\beta$ C encontrado en la muestra utilizada ( $\beta$ C, Sigma Aldrich®) se observa a continuación. Mostró una abundante fragmentación, el ion molecular o peso molecular correspondió en relación masa carga (m/z) al pico 204,2. Se dio una primera fragmentación por pérdida de un radical propilo ( $C_3H_7$ ) obteniendo el catión 161,2 m/z; el pico base (mayor abundancia) 133,1 m/z se obtuvo por pérdida del radical  $C_5H_{11}$  el cual perdió tres moléculas no ionizadas o neutras.  $C_2H_4$  que correspondió al fragmento 107,1 m/z, el fragmento  $C_4H_6$  fue 79,1 m/z y el fragmento  $C_3H_4$  fue 93,1 m/z (Ver Figura 9).

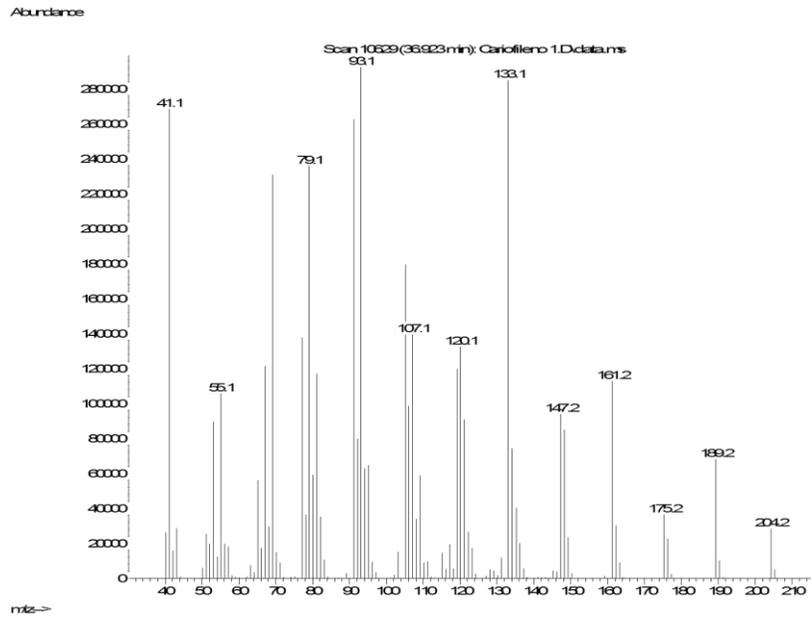


Figura 9. Espectro de masas del componente *trans*-β-cariofileno βC. En la ~~grafica~~ Figura se observa los diferentes picos que se forman de la relación masa carga de los diferentes fragmentos que conforman la estructura molecular del βC.

La pureza del βC utilizado en este trabajo de investigación fue del 91,01%. En el cromatograma se detectaron dos sustancias adicionales: el α-humuleno con un 7,3% y el α-copaeno en un 1,7%. (Ver Figura 10).

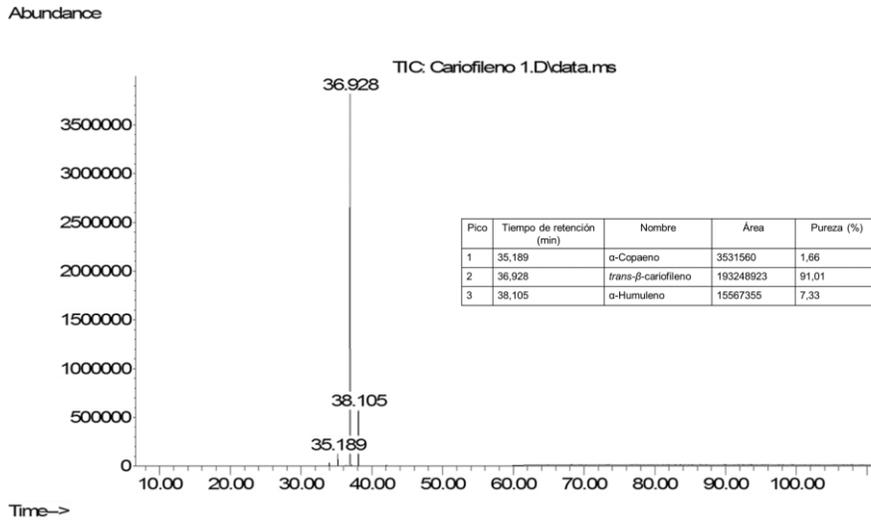


Figura 10. Perfil cromatógrafo del *trans*- $\beta$ -cariofileno. Los picos muestran los tiempos de retención de los tres compuestos identificados

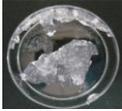
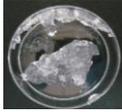
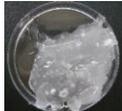
**4.1.2 Características organolépticas y de pH de los geles.** El análisis sensorial de las características físicas (color, olor, aspecto y consistencia aparente) y el pH de los cuatro geles utilizados Gel1(Vehículo), Gel2(MIL), Gel3( $\beta$ C+AE) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) utilizados 24 h después de preparados se muestran en la tabla 11.

Los geles Gel3( $\beta$ C+AE) y el Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) mostraron características similares en cuanto a las características organolépticas y la extensibilidad, en el producto final el color de los geles fue blanco debido a la emulsificación de los compuestos lipofílicos con el agua. El olor a clavos fue estable durante todos los ensayos.

Los geles Gel1(Vehículo) y Gel2(MIL) tuvieron las mismas características organolépticas y de extensibilidad, fueron inodoros e incoloros.

**Tabla 11.**

*Características organolépticas y pH de los geles. La tabla muestra el análisis sensorial y el pH de los geles 24 h después de preparados y almacenados a 4°C.*

Geles	Color	Olor	Aspecto	CA	pH	Ex	Producto Final
Gel1(vehículo)	incoloro	incoloro	traslucido	semisólido medio	5-6	baja	
Gel2(MIL)	incoloro	incoloro	traslucido	semisólido medio	7	baja	
Gel3( $\beta$ C-AE)	blanco	clavos	traslucido	semisólido medio	5-6	media	
Gel4( $\beta$ C-AE-MIL)	blanco	clavos	traslucido	semisólido medio	7	media	

*Nota:* CA: consistencia aparente, Ex: extensibilidad cualitativa,  $\beta$ C: *trans*- $\beta$ -cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina

**4.1.3 Extensibilidad.** Los geles mostraron un rango de extensibilidad entre  $213,6 \pm 2,6$  y  $124,3 \pm 1,5$  mm<sup>2</sup>, siendo el Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) el de mayor extensibilidad y el Gel1(Vehículo) de menor encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**4.1.4 Estabilidad de los geles.** Los geles fueron estables en sus características de color, olor, aspecto y pH a diferentes temperaturas a través del tiempo. Sin embargo, las características iniciales de consistencia y extensibilidad a 32 y 37°C se perdieron 8 días después de preparados. Los geles almacenados a 25°C perdieron la extensibilidad 30 días después de preparados. Los geles que se almacenaron a una temperatura de 4°C mantuvieron todas las características organolépticas y pH por tres meses.

**4.1.5 Capacidad antioxidante de los geles y componentes.** Los resultados de la prueba de DPPH con el  $\beta$ C y el AE mostraron una alta actividad antioxidante obteniendo valores de CE<sub>50</sub> de 69,31 mg/mL y 77,89 mg/mL respectivamente. Por otro lado, los geles Gel3( $\beta$ C+AE) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) mostraron una actividad reductora media con porcentajes de inhibición del 47,43% y 52,13% a la máxima concentración evaluada. El Gel1(Vehículo) mostró una baja actividad reductora con valores de 8,7% (Ver Figura 11). La vitamina C utilizada a una concentración de 2 mg/mL mostró una reducción del 91,6 % y un valor de CE<sub>50</sub> de 0,65 mg/mL.

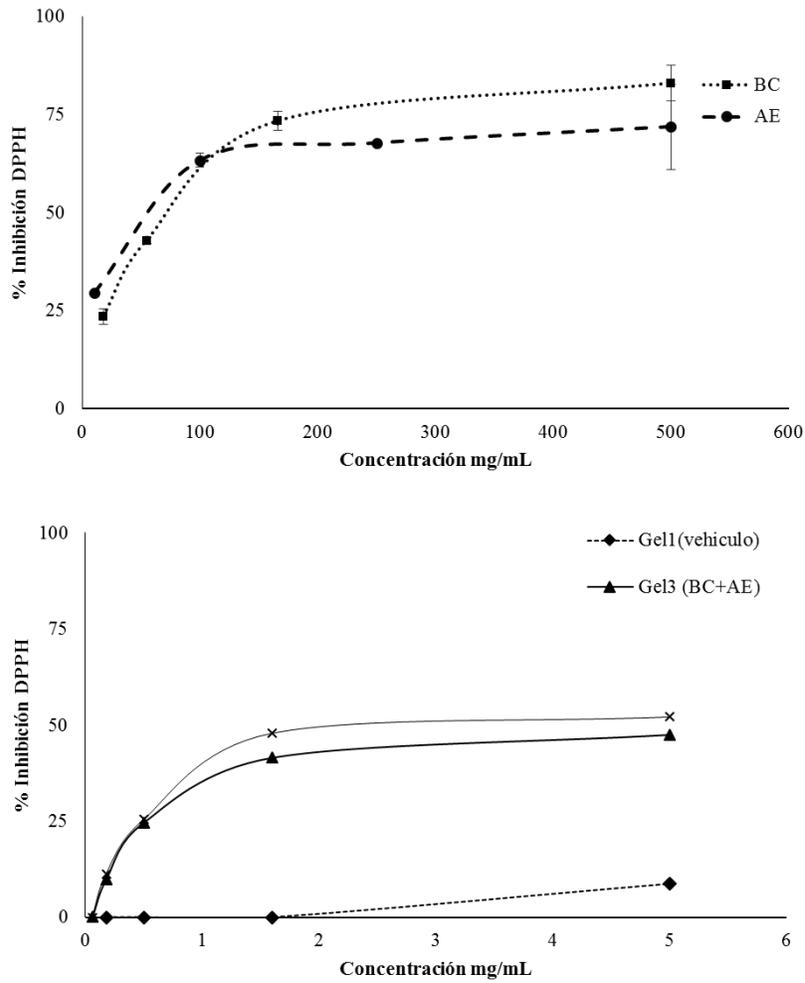


Figura 11. Capacidad antioxidante de los componentes y geles, utilizando el ensayo DPPH. La Figura muestra los porcentajes de inhibición del radical DPPH por los componentes y geles. Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) fueron encontradas entre el grupo Gel1 (Vehículo) con respecto a los otros grupos. Los mostrados corresponden al promedio de tres experimentos realizados ( $n = 3$ ).

**4.1.6 Ensayos de toxicidad de los componentes y geles en células y ratones.** En este ítem se muestran los resultados de la toxicidad en *cultivo celular in vitro* e *in vivo* en el modelo murino las pruebas de irritación dérmica, hipersensibilidad de contacto HC, genotoxicidad. Paralelamente se registraron las alteraciones físicas y bioquímicas e histopatológicas inducidas por componentes y geles.

**4.1.7 Toxicidad celular.** Las células de mamífero THP-1 tratadas los componentes MIL y AE mostraron valores de  $CC_{50}$  de 14,45 y 76,30  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. El Gel4( $\beta\text{C}+\text{AE}+\text{MIL}$ ) mostró valores de  $CC_{50}$  de 9,89 mg/ml y los otros geles Gel1(Vehículo), Gel3( $\beta\text{C}+\text{AE}$ ) no mostraron toxicidad a la concentración máxima evaluada de 13,2 mg/mL (Ver Tabla 17).

**4.1.8 Ensayos de irritación.** Teniendo en cuenta el grado de severidad de los signos de irritación (edema y eritema), las reacciones en la piel tratada de los ratones (macro y microscópicas) inducidas por los componentes y geles se muestran en la Figura 12. Como control irritante se utilizó el AE-Timol el cual fue evaluado en estudios anteriores.

**Tabla 12.**

*Calificación de reacción de piel de ratón BALB/c expuesta a los geles y componentes. En la tabla se muestra la puntuación asignada a la formación de edema y eritema observada en la piel de los animales post-tratamiento (pt).*

Componentes y geles	N. Dosis	Signo de irritación	Irritación (Puntaje)						
			Post-tratamiento (pt)						
			horas			días			
			24	48	72	5	7	10	14
$\beta\text{C}$	1	Edema	0	0	0	0	0	0	0
		Eritema	2	2	1	1	1	1	1
AE	1	Edema	1	0	0	0	0	0	0
		Eritema	1	0	0	0	0	0	0
Gel1(Vehículo)	14	Edema	0	0	0	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0	0	0	0
Gel4( $\beta\text{C}+\text{AE}+\text{MIL}$ )	14	Edema	0	0	0	0	0	0	0
		Eritema	0	0	0	0	0	0	0
AE-Timol	1	Edema	4	4	3	2	2	1	1
		Eritema	4	4	4	4	3	3	2

*Nota:* Puntuación de edema y eritema: 0-ausencia, 1-ligero, 2-leve, 3-moderado, 4-grave.  $\beta$ C: *trans*- $\beta$ -cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina

Con respecto a los componentes ( $\beta$ C y AE), el tratamiento con  $\beta$ C en una única dosis y a una concentración del 100% (puro) mostró una leve formación de eritema a las 4 h pt. Este signo de irritación fue perceptible hasta las 24 h pt. Posteriormente no se observó ningún signo de irritación indicando reversibilidad de los efectos. El tratamiento con AE no mostró signos de edema y eritema en la zona de aplicación, solo mostró resequedad en esta zona hasta las 72 h pt, el crecimiento del pelo en todo el dorso fue homogéneo, lo que indica que el AE puro es un componente no-irritante. Los geles no indujeron formación de eritema ni de edema sobre la piel de los animales en ninguna de las dosis administradas por 14 d, lo cual lo hace una formulación de uso tópico segura ~~de uso tópico~~. El AE-Timol mostró la formación de edema grave y eritema de severo a grave en la piel del animal. Estos signos fueron perceptibles hasta las 72 h pt, sin embargo, la formación de la costra se evidenció al día 7, la costra desaparece al día 13 debido al crecimiento de pelo en la zona de aplicación lo cual indicó reversibilidad de los efectos.

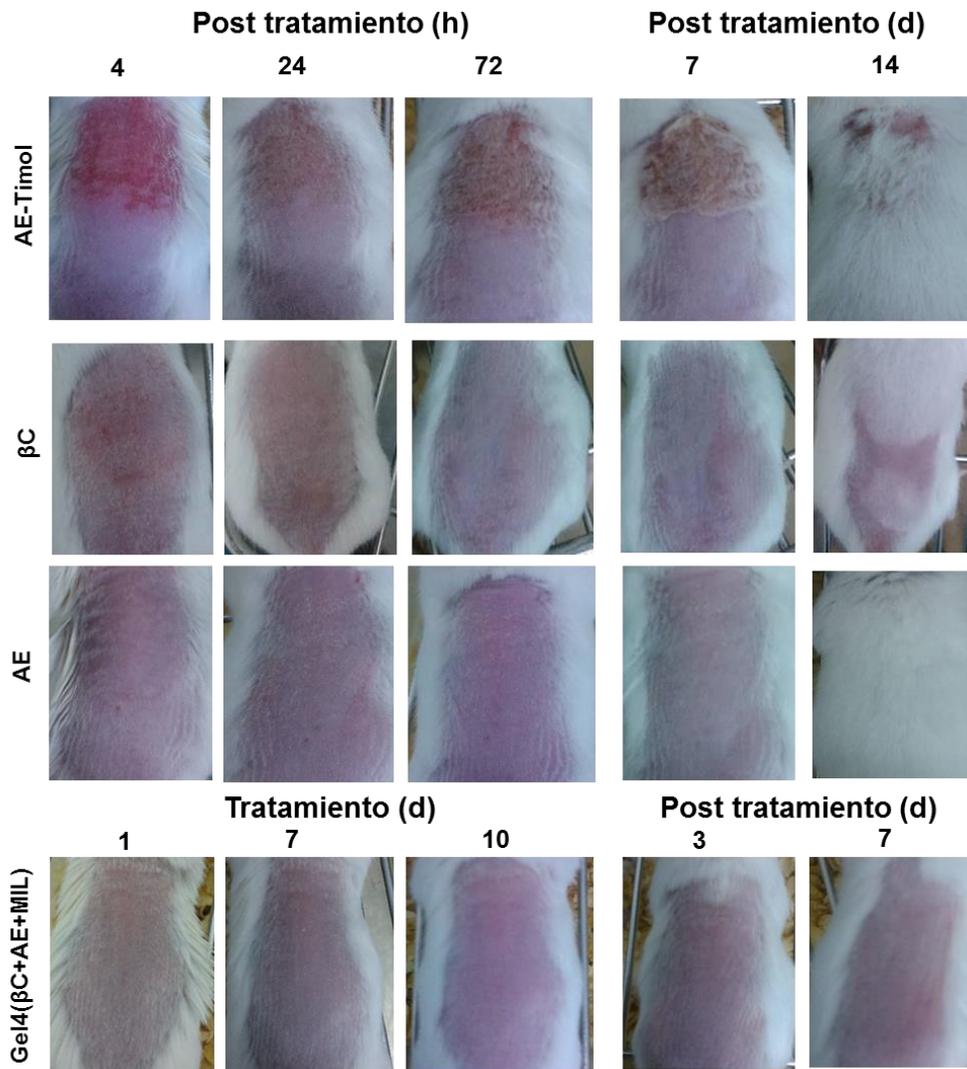


Figura 12. Visualización y seguimiento de los efectos del  $\beta$ C, AE y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) sobre la piel de los ratones BALB/c. En la primera fila se observa la irritación producida por el AE-Timol utilizado como control irritante administrado puro en una sola dosis. En las siguientes filas se observa los componentes administrados puros en una sola dosis y el Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) en múltiples dosis.  $\beta$ C: *trans*- $\beta$ -cariofileno, AE: Aceite esencial, MIL: miltefosina, AE-Timol: aceite esencial quimiotipo Timol (control irritación).

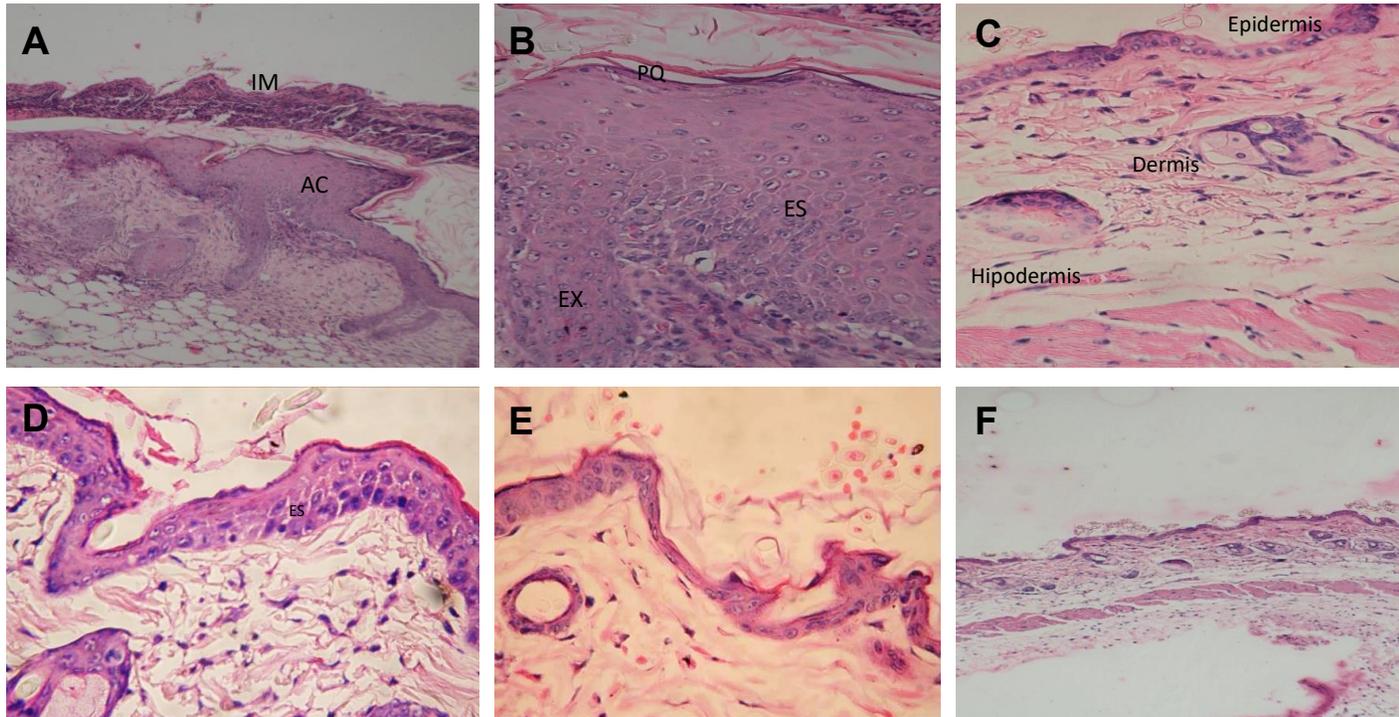
Por otro lado, teniendo en cuenta las características histopatológicas en piel (epidermis y dermis), ninguna de las biopsias analizadas de los ratones tratados mostraron alteraciones indicando que los compuestos y geles evaluados fueron considerados como no-irritantes (Ver tabla 13 y Figura 13). Por el contrario, el tratamiento con el AE-Timol fue irritante (Ver Figura 13, estudio previo) observándose severas alteraciones en las capas de la piel como la acumulación de fibrina y leucocitos (impétigo), visualización de los desmosomas (espongiosis), aumento en la proliferación celular (acantosis), núcleos en las células del extracto corneo (paraqueratosis) e invasión de leucocitos (exocitosis) en la epidermis. En la dermis se observó la dilatación de los capilares sanguíneos y alteraciones en las fibras dérmicas.

**Tabla 13.**

*Características histológicas de piel de ratón BALB/c tratados vía tópica con componentes y geles. La tabla muestra las alteraciones histopatológicas observadas en las capas de la dermis y la epidermis.*

Tratamiento	IM	ES	PQ	EX	AC	DC	Otros
βC (100%)	-	+/-	+/-	-	-	-	Ninguno
AE (100%)	-	-	-	+/-	-	-	Infiltrado intersticial
Gel1(Vehículo)	-	-	-	-	-	-	Ninguno
Gel4(βC+AE+MIL)	-	-	-	-	-	-	Ninguno
Sin tratamiento	-	-	-	-	-	-	Ninguno
AE-Timol	+++	++	++	++	+++	+++	Formación de costra.

*Nota:* IM: impétigo, ES: espongiosis, PQ: paraqueratosis, EX: exocitosis, AC: acantosis, DC: dilatación de capilares. Parámetros histológicos evaluados semi-cuantitativo (-, ausencia; +/-, inequívoco; +, leve; ++, moderado; +++ severo). Los valores fueron obtenidos de las áreas histológicas más dominantes. Pt: post tratamiento.



IM: impétigo, AC: acantosis, PQ: paraqueratosis, ES: espongiosis, EX: exocitosis.

*Figura 13.* Cortes histológicas de piel de ratón BALB/c tratados con los geles y componentes. A y B, muestran las alteraciones histopatológicas de las capas de la piel (epidermis y dermis) producidas por el AE-Timol (Control irritación) en una sola dosis al 100% con aumento de 10x y 40x. C. Se observa la estructura de la piel normal (Sin tratamiento) aumento de 40x. D. Piel tratada con una sola dosis de  $\beta$ C al 100%, se observó en un solo campo microscópico separación en las células epidérmicas, aumento de 40x. E. Piel tratada con AE en una sola dosis 100%, aumento 40x. F. Tratamiento múltiples dosis del Gel4( $\beta$ C+AE+MIL), las capas de la piel se observaron sin alteraciones

**4.1.9 Hipersensibilidad de contacto (HC).** Ninguno de los geles o compuestos mostró signos de engrosamiento de las orejas después de la dosis reto (Ver Figura 14). Contrariamente, el reto con el control positivo (DNFB) indujo engrosamiento de  $0,85 \pm 0,1$  mm vs  $0,13 \pm 0,02$  mm, formación de eritema, costra y una exacerbación de la respuesta inflamatoria. Después de 48 a 72 h, la actividad de inflamación disminuyó (Ver Figura 14, A y B)

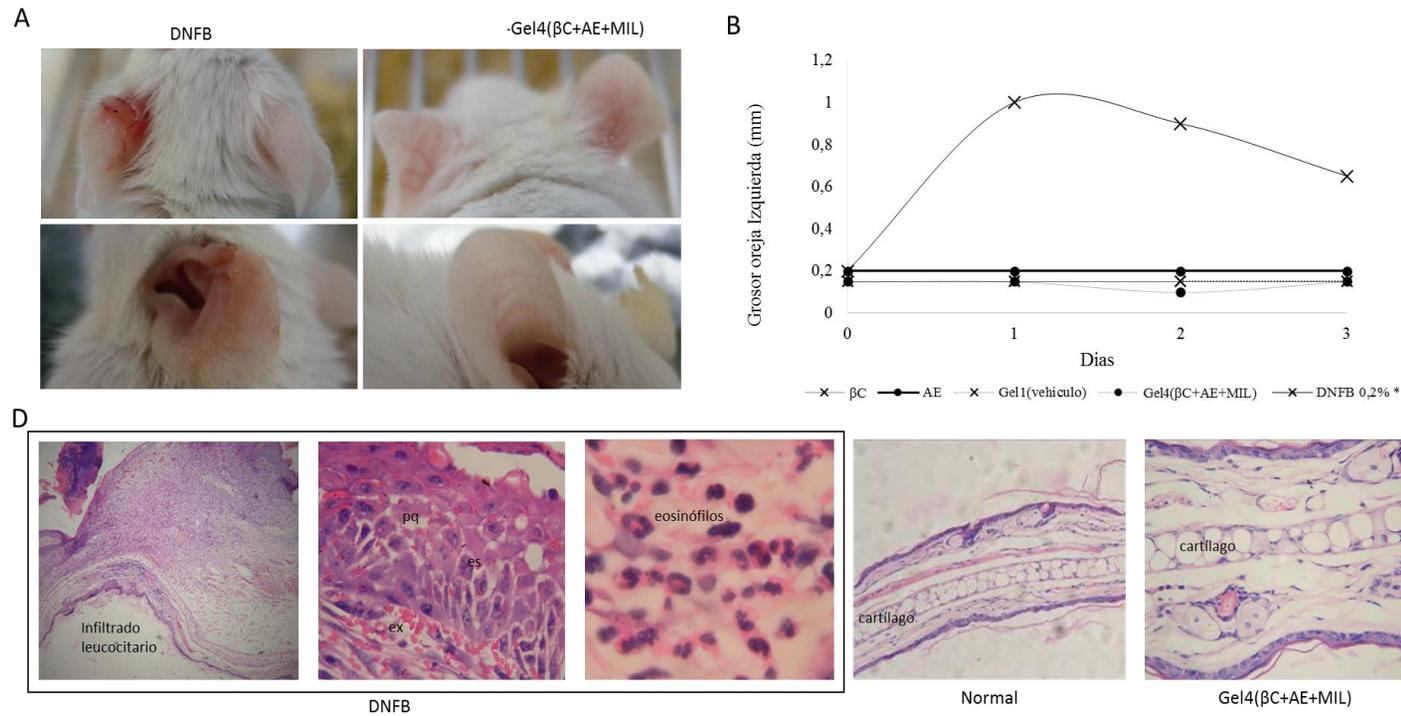
En el análisis de las biopsias de las orejas tratadas con el DNFB se observó infiltrado leucocitario en la dermis como epidermis y espongiosis de la lámina basal. Los eosinófilos fueron encontrados en dermis y epidermis indicando la existencia de HC. También se observó incremento de la permeabilidad vascular resultando en extravasación de eritrocitos y edema papilar dérmico, como deposición de fibrina en la dermis reticular (Ver tabla 14 y Figura 14 C).

**Tabla 14.**

*Características histológicas de orejas de ratón BALB/c después de la dosis reto previa sensibilización con el control de hipersensibilidad dinitrofluorobenceno DNFB.*

Compuesto	IM	ES	PQ	EX	AC	Otros
DNFB 0,2%	++	+++	+	+++	+++	Presencia de eosinófilos y PMN. (20 células/campo 40X) Inflamación crónica.

IM: impétigo, ES: espongiosis, PQ: paraqueratosis, EX: exocitosis, AC: acantosis, DC: dilatación de capilares. Parámetros histológicos evaluados semi-cuantitativo (-, ausencia; +/-, inequívoco; +, leve; ++, moderado; +++ severo). Los valores fueron obtenidos de las áreas histológicas más dominantes. Pt: post tratamiento



DNFB: Dinitrofluorobenceno,  $\beta$ C: *trans*- $\beta$ -cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina, ES: espongiosis, EX: exocitosis

**Figura 14.** Hipersensibilidad de contacto en el modelo murino BALB/c. **A.** En la primera columna se observa alteraciones macroscópicas en la oreja (formación de costra y enrojecimiento) producidas por el control de hipersensibilidad DNFB después de la dosis de reto, en la siguiente columna la morfología normal de las orejas de los ratones tratados con los geles y componentes. **B.** La Figura muestra las mediciones del grosor de las orejas los días 1, 2 y 3 post dosis reto de geles y componentes. Diferencias significativas  $p < 0,05$  fueron encontradas entre el grupo control DNFB con respecto a los demás grupos tratados. **C.** Cortes histológicos de orejas de ratones tratados con DNFB y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL), en el recuadro se observa alteraciones histopatológicas como infiltrado leucocitario, formación de espongiosis y presencia de eosinófilos  $> 15$  cel/c.m. las otras dos imágenes muestran la estructura normal microscópica de orejas sin tratamiento y tratadas con el Gel4( $\beta$ C+AE+MIL).

## 4.2 Ensayos de genotoxicidad

**4.2.1 Ensayo cometa.** El tratamiento oral con  $\beta$ C y AE (14 dosis) y tópico (14 dosis) con Gel1(Vehículo) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) presentaron ~~leve~~ daño leve en el ADN con valores menores al 26,75 % (Ver tabla 15 y Figura 15, 16). Por el contrario, el control positivo genotóxico CPA + EMS produjo un porcentaje de daño de ADN total cuatro veces mayor al producido por los geles y componentes con valores de  $74,9 \pm 3,2$  %, lo cual se relaciona con el índice de daño (ID) que se incrementa a  $291,6 \pm 13,0$  vs  $75,0 \pm 11$  en comparación al tratamiento de componentes y geles. Entre el grupo control (CPA + EMS) se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) con respecto a los otros grupos evaluados (componentes y geles).

**Tabla 15.**

*Porcentajes del daño en el ADN e índice de daño (ID) producido por el tratamiento de geles y componentes en sangre.*

Compuesto	Vía adm	Clase de daño ADN					ID $\pm$ DS	% Daño Total $\pm$ DS
		0	1	2	3	4		
$\beta$ C	Oral	13	72	17	0,33	0	107 $\pm$ 12,8	26,75 $\pm$ 3,19
AE	Oral	31,3	63,6	3,6	1,3	0	75 $\pm$ 11	18,75 $\pm$ 2,8
Gel1(Vehículo)	Tópica	30	63	5,3	1,6	0	78,6 $\pm$ 6,7	19,5 $\pm$ 1,7
Gel4( $\beta$ C+AE+MIL)	Tópica	28,6	57,6	9,3	3,3	1	90,3 $\pm$ 9,0	22,6 $\pm$ 2,2
CPA+EMS	Ip	0	6	26,6	37	30,3	291,6 $\pm$ 13,0	74,9 $\pm$ 3,2***

*Nota:*  $\beta$ C, *trans*- $\beta$ -cariofileno; AE: aceite esencial; MIL: miltefosina, ID, índice de daño; DS, desviación estándar, Vía adm: vía de administración; ip: intraperitoneal; CPA + EMS: ciclofosfamida mas etil metano sulfonato.

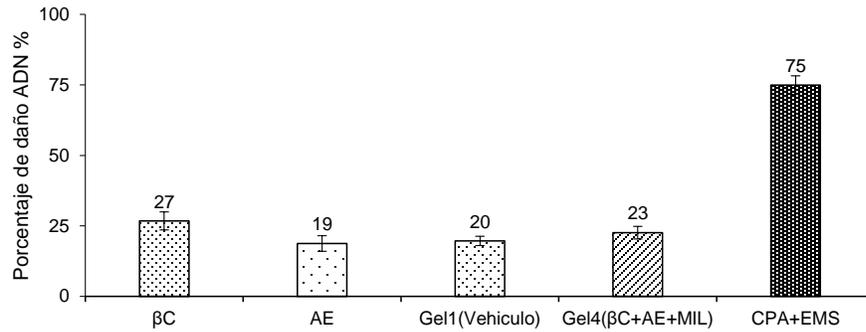


Figura 15. Porcentaje de daño del ADN de células sanguíneas. En la Figura se visualiza el daño ~~en el~~ ADN producido por del control ~~genotóxico positivo ciclofosfamida mas etil metano sulfonato (CPA + EMS)~~ en comparación con el daño producido por los gels y ~~sus~~ componentes. (\*\*p<0,001). βC: trans-β-cariofileno; AE: aceite esencial, MIL: miltefosina, CPA + EMS: ciclofosfamida mas etil metano sulfonato.

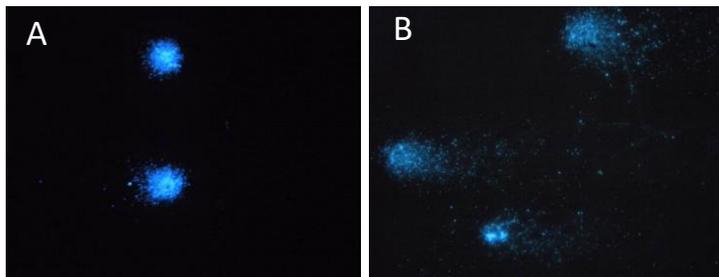


Figura 16. Ensayo cometa alcalino en células individuales. A. Nucleoides de células sanguíneas de ratones tratados con Gel1(Vehículo). B. fragmentación del núcleo (formación de cometas) de las células sanguíneas de ratones tratados con el control positivo de genotoxicidad ciclofosfamida mas etil metano sulfonato (CPA+EMS). Se puede indicar en esta figura los diferentes tipos de daño.

**4.2.2 Ensayo micronúcleos (MN) en medula ósea.** Los geles y compuestos no mostraron formación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de medula ósea. En contraste, el control positivo de genotoxicidad CPA+EMS mostró una frecuencia de aparición de  $179,5 \pm 18,8$  MN en 1000 eritrocitos policromáticos EPC- (Ver Figura 17 y 18).

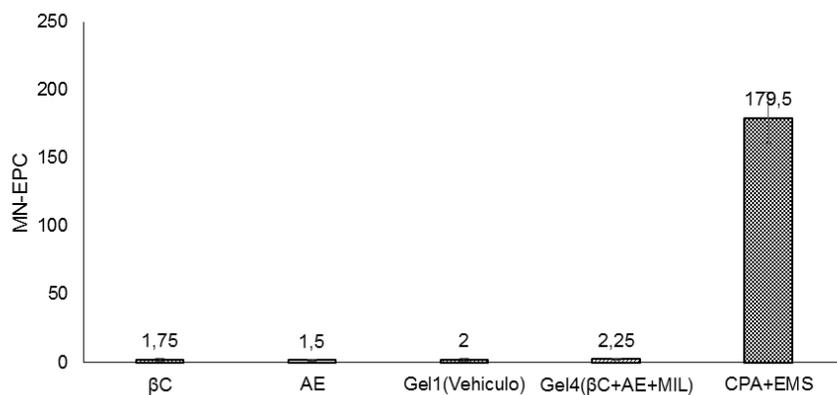


Figura 17. Formación-Frecuencia de MN en medula ósea. La Figura muestra el número de micronúcleos observados en 1000 EPC de ratones BALB/c tratados con geles y componentes. Diferencias significativas \*\*\* $p < 0,001$ . βC: trans-β-cariofileno; AE: aceite esencial, MIL: miltefosina, CPA + EMS: ciclofosfamida mas etil metano sulfonato.

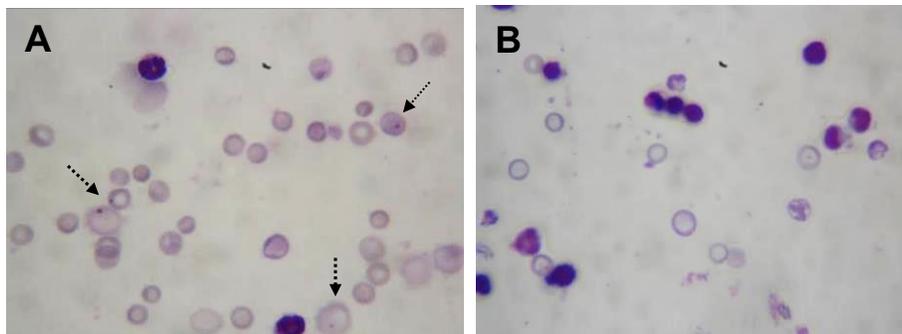


Figura 18. Extendidos de medula ósea coloreados con Giemsa. A. las flechas indican la presencia de micronúcleos MN en eritrocitos policromáticos de ratones BALB/c tratados con el control positivo de genotoxicidad CPA + EMS. B. Células de medula ósea de ratones tratados con el Gel4(βC+AE+MIL), donde no se observa aparición-la presencia de MN.

### 4.2.3 Alteraciones físicas, de comportamiento, bioquímicas e histopatológicas.

Paralelamente a los ensayos de genotoxicidad descritos anteriormente (ensayo cometa y micronúcleos) se hizo seguimiento del peso y comportamiento de los animales durante del tratamiento (14 dosis), así como fue realizada la ~~se~~ determinación de las alteraciones hepáticas y renales mediante pruebas bioquímicas y se analizaron biopsias de hígado, riñón y bazo.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales antes y después del tratamiento componentes y geles ( $p=0,07$ ). El peso de los animales antes del tratamiento fue de  $22,47 \pm 0,9$  g y después  $22,74 \pm 1,0$  g (Ver Figura 18). No se observaron signos de dolor ni alteraciones en el comportamiento durante los días de tratamiento.

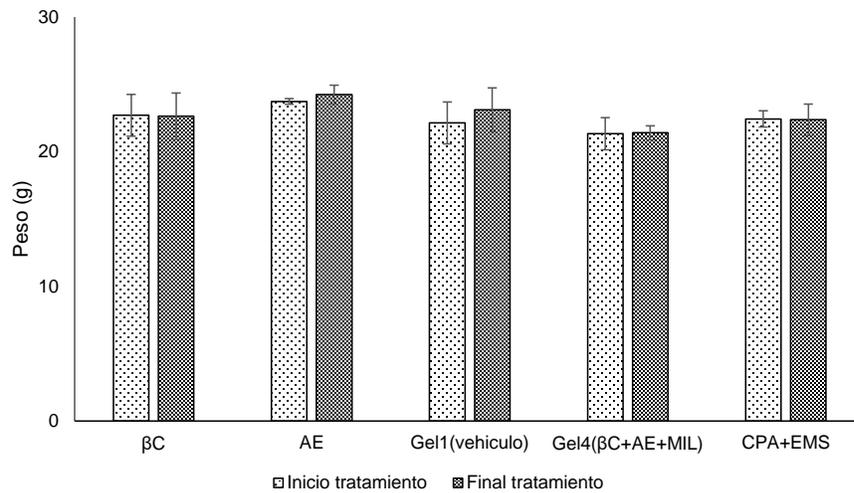


Figura 19. Peso corporal de los ratones BALB/c antes y después del tratamiento 14 dosis con los componentes y geles.  $\beta$ C: trans- $\beta$ -cariofileno; AE: aceite esencial, MIL: miltefosina, CPA + EMS: ciclofosfamida mas etil metano sulfonato.

**4.2.4 Alteraciones en el perfil bioquímico.** Inicialmente se estandarizaron valores normales en suero de ratones BALB/c sanos de concentraciones de BUN (mg/dL), ALT, AST y FA (U/L) los cuales se muestran en la tabla 16. se encontró que los resultados obtenidos de los sueros de los ratones tratados con los compuestos y geles ~~entraron~~ están dentro del rango de los valores normales.

Teniendo en cuenta los valores obtenidos por el grupo tratado con el Gel1(Vehículo) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) con los otros grupos tratados con los componentes y geles. Estos resultados mostraron que durante el tratamiento de durante 14 dosis las concentraciones del metabolito y enzimas indicadores de hepato y nefrotoxicidad fueron normales.

Los valores obtenidos en los ratones tratados con el control positivo de genotoxicidad CPA + EMS no mostraron alteración, lo que indica que este compuesto no indujo citotoxicidad en células hepática y renales.

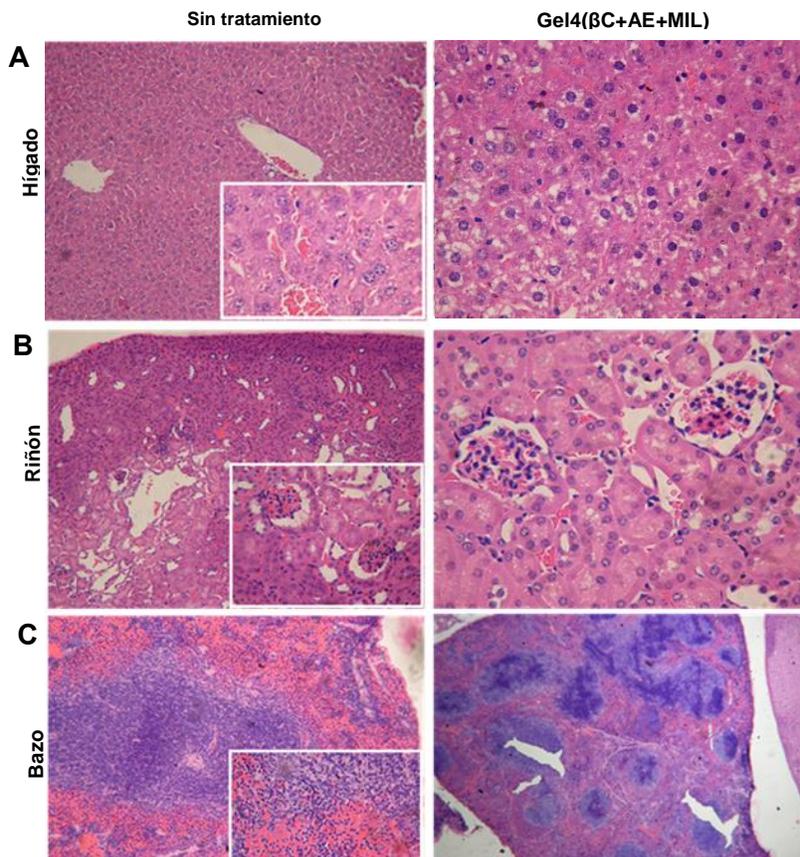
**Tabla 16.**

*Perfil bioquímico de ratones tratados con los componentes y los geles (14 dosis). La tabla muestra las concentraciones del metabolito y enzimas indicadoras de daño hepático y renal.*

Tratamiento	mg/dL		U/L	
	BUN	AST	ALA	FA
βC	63,32±4,2	33,40±7,1	20,44±1,5	46,50±4,9
AE	49,67±10,1	73,62±9,8	20,71±3,1	64,33±18,1
Gel1(Vehículo)	60,32±1,6	75,51±16,5	24,44±4,5	34,03±10,6
Gel4(βC+AE+MIL)	46,46±3,2	62,77±11,6	22,29±4,5	42,50±11,2
CPA + EMS	51,1±7,9	61,99±7,7	29,96±7,9	44,72±1,7
Valores de Referencia	40,60 – 72,39	70,0 – 90,0	21,0 – 31,0	33,13 -77,41

*Nota:* βC, *trans*-β-cariofileno; AE: aceite esencial; MIL: miltefosina, BUN: nitrógeno ureico – urea, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa, FA: fosfatasa alcalina.

**4.2.5 Estudios histopatológicos en hígado, bazo y riñón.** En las biopsias evaluadas no se observaron alteraciones en la morfología, e-infiltrados celulares o daños en las células hepáticas, renales y la pulpa esplénica que indicaran apoptosis o necrosis de estos órganos después de un tratamiento por 14 días con los geles y componentes (Ver figura 20)



*Figura 20. Histopatología* Imágenes de cortes histológicos de órganos hígado, riñón y bazo de ratones BALB/c tratados con geles y compuestos. En la primera columna se observan cortes histológicos de hígado, riñón y bazo de ratones pertenecientes al grupo control (sin tratamiento) y la segunda columna a de ratones organismos con tratamiento con geles y componentes.

### 4.3 Ensayos antiparasitarios

**4.3.1 Ensayos *in vitro*.** Los resultados obtenidos de la evaluación antiparasitaria de los geles y componentes se muestran en la Tabla 17. El  $\beta$ C y el AE mostraron actividad en promastigotes de *L (V.) braziliensis* y *L (V.) panamensis* con valores de CI entre  $12,35 \pm 0,6$  y  $43,72 \pm 2,3$   $\mu\text{g/mL}$ . El  $\beta$ C presentó actividad en amastigotes intracelulares de *L.(V.) braziliensis*  $\text{CI}_{50}$   $74,01 \pm 0,1$   $\mu\text{g/mL}$ . La MIL fue 17 veces más activa contra los parásitos con respecto al  $\beta$ C y AE. El componente  $\beta$ C presentó un índice de selectividad (IS)  $>4$  y la MIL de 3 indicando ser selectivo contra los parásitos.

**Tabla 17.**

Actividad toxica en células de mamífero y antiparasitaria in vitro de geles y componentes. La tabla muestra la CI50 y CI90 de los geles y compuestos contra las formas parasitarias de *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*. Además, se muestra la actividad citotóxica en células de mamífero.

Concentración (µg/ml del componente) ± DS								
	<i>L.(V.) braziliensis</i>				<i>L.(V.) panamensis</i>		Células de mamífero	
	Promastigotes		Amastigotes		Promastigotes		THP-1	
	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>	CC <sub>50</sub>	CC <sub>90</sub>
βC	33,94±0,3	51,25±4,3	74,01±3,6	>100	43,72±2,3	57,40±3,9	>300	>300
AE	12,35±0,6	23,84±1,6	>100	>100	ND	ND	76,30±7,5	>300
MIL	1,57 ± 0,1	1,89±0,1	4,2± 0,8	>5,5	2,64 ±0,1	3,47± 0,2	14,45±0,5	>50
Concentración (mg/mL del gel) ± DS								
Gel1(Vehículo)	>3,5	>3,5	>25	>25	>3,5	>3,5	>36	>36
Gel3(AE+βC)	>13,2	>13,2	ND	ND	>13,2	>13,2	>13,2	>13,2
Gel4(βC+AE+MIL)	1,22 ± 0,1	2,5±0,4	2,13±0,3	2,9±0,0	2,78± 0,1	3,05± 0,1	9,89±1,5	> 36

Nota: βC: *trans*-β-cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina, DS: desviación estándar, CI<sub>50</sub> y 90: Concentración inhibitoria 50 y 90, CC<sub>50</sub> y 90: concentración citotóxica 50 y 90. ND: no determinado.

El Gel1(Vehículo) y el Gel3(AE+βC) no mostraron actividad antiparasitaria a la máxima

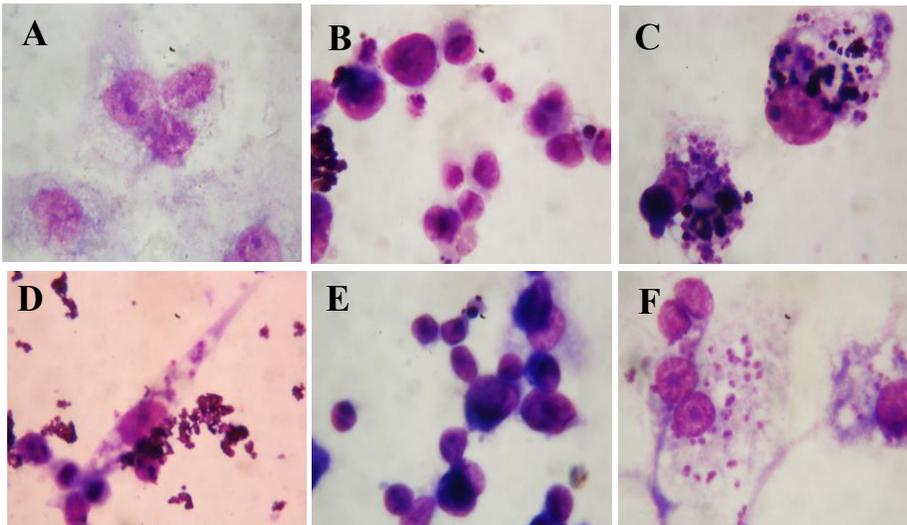
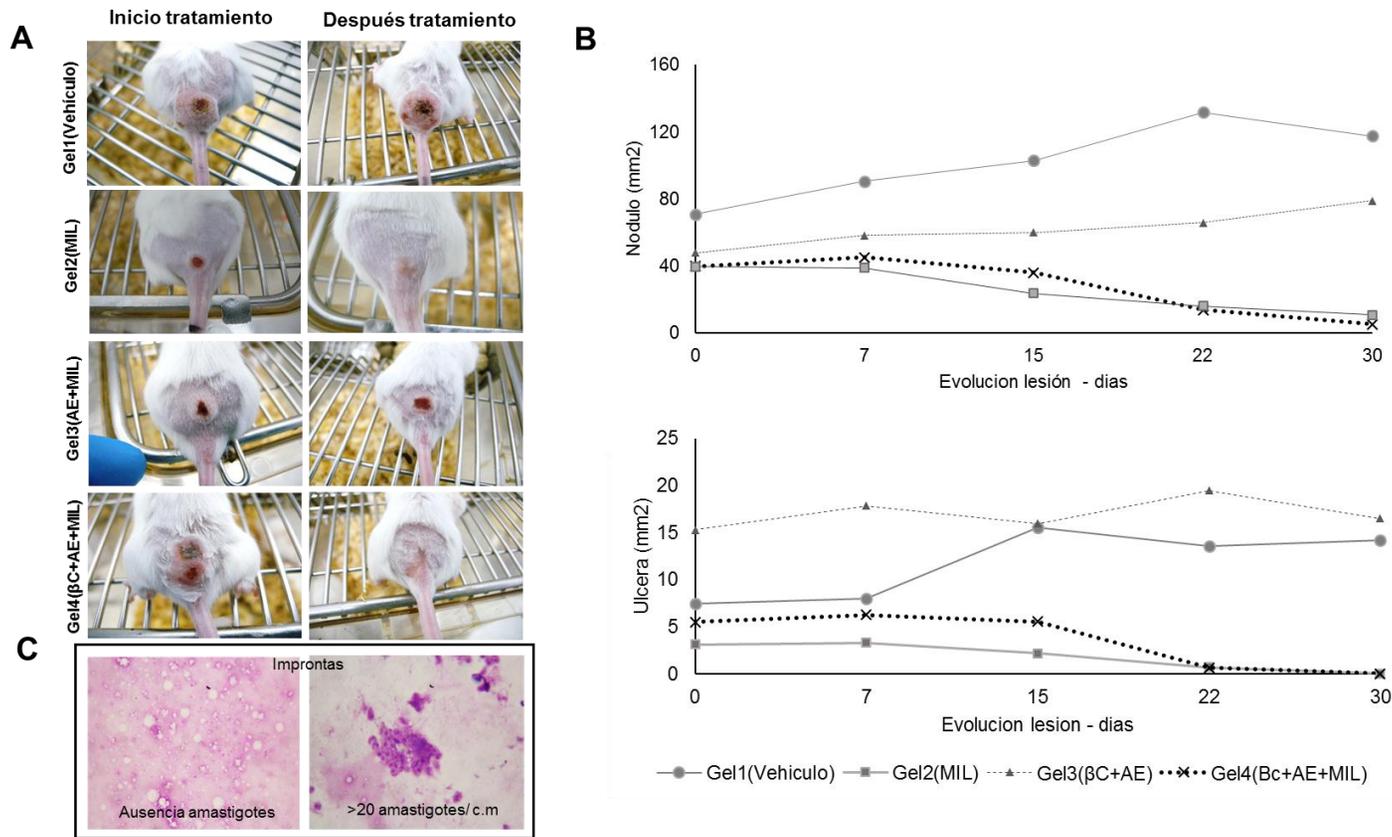


Figura 21. Actividad anti-*Leishmania* de componentes y geles contra *L.(V.) braziliensis*. Celulas tratadas con A. βC. B Gel4(βC+AE+MIL). C. Gel3(βC+AE).D. Gel1(Vehículo). E. miltefosina F. control de infección. EL color negro que se observa en las celulas tratadas con los geles (indicar con flechas), son agregados formados por los geles base (Carbopol). βC: *trans*-β-cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina

concentraciones evaluadas de 3,5 y 13,2 mg/mL respectivamente. Por el contrario, el Gel4(βC+AE+MIL) mostr<sup>ó</sup> valores de  $CI_{50}$  de  $1,22 \pm 0,1$  y  $2,78 \pm 0,1$ mg/mL en promastigotes de ambas especies de *Leishmania*; además, en amastigotes intracelulares de *L.(V.) braziliensis* se obtuvo  $CI_{50}$   $2,13 \pm 0,3$  mg/ml y  $CI_{90}$   $2,9 \pm 0,0$  mg/ml y un IS de 8 indicando selectividad contra el parasito (Ver tabla 17 y Figura 21).

**4.3.2 Ensayos *in vivo*.** Al inicio del tratamiento, todas las lesiones de LC fueron nodulares con formación de úlceras (ver Figura 22, A y B). El tratamiento con los geles Gel2(MIL) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) fueron efectivos contra la LC mostrando una disminución estadísticamente significativa en el área de las lesiones. Los ratones tratados con el Gel2(MIL) mostraron un área de 39,59 mm<sup>2</sup> al inicio~~ó~~ y un área de 10,76 mm<sup>2</sup> al final ~~mientras que y~~ los tratados con el Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) mostraron un área de 39,89 mm<sup>2</sup> a al final del tratamiento una de 5,38 mm<sup>2</sup>. ~~Contrariamente~~En contraste, los geles Gel1(Vehículo) y Gel3( $\beta$ C+AE) mostraron aumento en el área de las lesiones. El tratamiento con los geles no indujo ningún signo de irritación ni pérdida de peso durante y después del tratamiento. En las improntas realizadas a las cicatrices 10 días después de finalizado el tratamiento, ~~a las cicatrices de en~~ los ratones tratados con Gel2(MIL) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) no se observaron amastigotes de *Leishmania* (Ver Figura 22,C).



$\beta$ C: *trans*- $\beta$ -cariofileno, AE: aceite esencial, MIL: miltefosina,

Figura 22. Eficacia de geles en ratones BALB/c infectados con *L. (V.) braziliensis*. Los geles fueron aplicados tópicamente en una dosis diaria durante 20 días. A. la imagen muestra las lesiones de leishmaniasis cutánea antes y después de 20 días de tratamiento. B. las Figuras muestra la evolución en el tamaño de las lesiones (nódulos y úlceras) durante 30 días. C. improntas del sitio de la lesión coloreados-tenidos con Giemsa obtenidas después del sacrificio de ratones tratados con Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) y Gel1(Vehículo). Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) fueron encontradas entre grupos Gel1(vehículo) frente Gel2(MIL) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) y Gel3( $\beta$ C+AE) frente Gel2(MIL) y Gel4( $\beta$ C+AE+MIL).

## 5 DISCUSION

Los tratamientos tópicos en leishmaniasis cutánea (LC) constituyen una alternativa y ventaja sobre los tratamientos convencionales o terapia sistémica, debido a la facilidad de la administración, disminución de los efectos adversos y el costo-efectividad. En este trabajo se diseñó y evaluó la toxicidad y capacidad anti-*Leishmania* de una formulación tipo semisólida conteniendo aceite esencial AE de *L. organoides* quimiotipo felandreno y  $\beta$ C con el fin de lograr una formulación estable y apta para ser utilizadas en el tratamiento de LC ya sea como vehículo de otros medicamentos o como tratamiento único.

~~Se preparó y caracterizó una formulación tipo gel conteniendo AE y  $\beta$ C~~ Los geles preparados mostraron características fisicoquímicas óptimas logrando la disolución completa de sus componentes, estables en el tiempo (durante 3 meses, 4°C y protegido de la luz) y con un pH por encima de 5,5 (pH medio piel) condición que aumenta la permeabilidad de la piel facilitando la absorción de los componentes contenidos en el gel (Patente 2012). El AE y el  $\beta$ C mejoraron la extensibilidad del gel, lo cual permite una amplia distribución de la formulación al aplicarla en la epidermis. Debido a la naturaleza lipofílica del AE y  $\beta$ C al momento de mezclar con el gel base hidrofílico el color del gel se tornó blanquecino, debido a la emulsificación del aceite en agua, característica similar observada en la preparación de otros geles con compuestos lipofílicos (Ibrahim *et al.*, 2013).

El AE y  $\beta$ C libre o contenidos en los geles no mostraron efectos tóxicos, hipersensibilizantes o genotóxicos en los diferentes modelos experimentales. Lo anterior hace al gel conteniendo  $\beta$ C+AE seguro para uso humano, además dado que las características fisicoquímicas del gel fueron mejores que las de Gel1 (Vehículo) se garantizan una mayor seguridad y estabilidad ~~en~~ en la lo largo del tiempo. Los AE han sido utilizados en la

preparación de diversos tipos de geles a bajas concentraciones (0,4 hasta 5% p/v) y algunos de ellos mostraron concentraciones relativas de  $\beta$ C (de 1,2 a 28%). Aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* y *Piper nigrum* fueron utilizados mostrando efectos antiinflamatorios en humanos (Patente, 2013). Aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y de *Thymus vulgaris* mostraron actividad contra cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (Shukr y Metwally, 2013) y como conservantes en cosmética (Manou *et al.*, 1998). En este trabajo los geles fueron igualmente preparados con concentraciones bajas de AE y  $\beta$ C. Las bajas concentraciones utilizadas del AE en los geles se justifican además por el rendimiento de obtención del AE a partir de plantas de *L. origanoides* quimiotipo felandereno (del 1,2%) y la compleja mezcla de terpenos (>50 compuestos) que lo constituyen (Stashenko *et al.*, 2014). Se han encontrado AE extraídos de *Camellia sinensis* y *Eucalyptus globulus* con cantidades relativas bajas (de 5 y 10%) del componente  $\alpha$ -pineno (la cantidad de este componente en el AE utilizado en este trabajo fue 2,3%) el cual mostró actividad tóxica en piel (Dharmagunawardena *et al.*, 2002). La concentración de  $\beta$ C utilizada en los geles fue del 0,5%. El  $\beta$ C además de estar presente en el AE también fue obtenido comercialmente en donde por análisis cromatográfico se detectó una alta pureza (del 91,07%). Otros geles han utilizado concentraciones similares de  $\beta$ C siendo su fuente sólo el AE (Patente 2013).

De las plantas de *L. origanoides* se han encontrado tres quimiotipos debido a sus componentes mayoritarios “Timol”, “Carvacrol” y “Felandreno”. Para este trabajo se utilizó el quimiotipo felandreno AE debido a la cantidad mayor de  $\beta$ C que contiene con respecto a los otros quimiotipos (11,3 vs 2,4%) (Stashenko *et al.*, 2013). Además, se ha reportado la presencia de flavonoides, particularmente, la pinocembrina que posee una alta actividad antioxidante (Stashenko *et al.* 2014). La actividad antioxidante del AE y del BC en este trabajo fue similar con actividades de  $CE_{50}$ : 69,31 y 77,89 mg/ml respectivamente. En los

geles que contenían ambos compuestos (Gel3(AE+βC) se observó una inhibición de 47,13% del radical DPPH la cual comparada con el gel sin los componentes fue siete veces más inhibitoria (más antioxidante) mostrando que su capacidad antioxidante era preservada en la formulación. Utilizando técnicas diferentes (capacidad de absorción de los radicales de oxígeno en lugar de DPPH), otros autores reportan la actividad antioxidante del AE quimiotipo felandreno y del βC con valores de 1820 y 2800 μmol Trolox/g mostrando una mayor actividad antioxidante que controles positivos) tales como el butilhidroxitolueno (457 μmol Trolox/g sustancia) y el α-tocoferol (550 μmol Trolox/g sustancia). Estas metodologías son similares debido a que muestran la capacidad de reducir o neutralizar un radical libre, sin embargo del DPPH emplea como radical libre moléculas que difiere de cualquier radical libre o especie reactiva generada por un sistema biológico (Thaipong *et al.*,2006). El control antioxidante utilizado en este trabajo fue el ácido ascórbico el cual redujo significativamente ( $p<0,05$ ) más ( $p,0,05$ ) el radical DPPH en comparación con el AE y βC (Villanueva *et al.*, 2009). La capacidad antioxidante que se registró en este estudio, convierte al AE y el βC en compuestos alternativos para sustituir antioxidantes sintéticos.

En los estudios toxicológicos realizados en este trabajo se encontró que el AE y βC fueron no-irritantes al aplicarlos puros en una sola dosis sobre la piel de los animales sugiriendo que no se produjo ninguna respuesta inmunológica de irritación. Esto puede ser consecuencia de los efectos antiinflamatorios que han sido reportados con respecto al βC que puede actuar como ligando a receptores canabinoides inhibiendo la expresión de citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoralTNF-α e interleuquina IL-1β en sangre atenuando mecanismos de fosforilación en monocitos. Se demostró que ratones que expresaban receptores canabinoides Cnr2<sup>+/+</sup> tratados con βC (5 mg/Kg) mostraron una disminución de la respuesta inflamatoria inducida por el compuesto carregenano (induce

inflamación), mientras que ratones  $Cnr2^{-/-}$  carentes de receptores CB2 no mostraron ~~este~~ efecto antiinflamatorio (Rg Gertsch *et al.* 2001).

En el ensayo de hipersensibilidad de contacto (HC), los ratones expuestos a dosis sensibilizantes del AE y el  $\beta$ C no indujeron HC después del reto. En otro estudio el  $\beta$ C utilizados en dosis menores e intradérmicamente demostró igualmente ser un compuesto no sensibilizante, a menos que se degrade o se oxide por exposición al aire o luz por tiempos prolongados de aproximadamente 10 semanas (Sköld *et al.*, 2006). ~~El control~~ Los organismos del grupo control de HC utilizado en el presente estudio (DNFB) mostraron irritación con las dosis sensibilizantes (0,5%) e inflamación con las dosis de reto (0,2%). Se sabe que el DNFB induce una reacción de hipersensibilidad tipo IV mediada por células T (Röse *et al.*, 2012). Histológicamente se observó dermatitis espongíotica con severo grado de edema intra y ~~e~~ intercelular epidérmico, debido a la potente respuesta inmune que indujo el DNFB a las 72 h post dosis reto (Cho y Hough, 1986; Taylor, 1986). Es importante destacar que ~~El~~ modelo murino utilizado en este trabajo es considerado un modelo confiable para evaluar la dermatitis de contacto alérgica el cual ha servido como marco para el entendimiento de este tipo de alergia en los humanos (Kaplan *et al.*, 2012; Röse *et al.*, 2012).

El potencial genotóxico del AE y el  $\beta$ C (daño total de ADN del 26,75 y 18,75% respectivamente) demostró que los componentes no fueron no-genotóxicos para los animales. Esta técnica también detecta daños basales y daños causados por el metabolismo que pueden ser reparados. Esta técnica también detecta daños basales y daños causados por el metabolismo que pueden ser reparados (Neira *et al.*, 2016). Los compuestos utilizados como controles (CPA y EMS) fueron los establecidos en las guías internacionales de evaluación de sustancias químicas (*Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, 2014, *Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*, 2016), en donde se garantiza que las

concentraciones de uso inducen daño del ADN más no producen efectos tóxicos sistémicos ni citotóxicos que interfieran en la lectura (Vasquez, 2010). Estudios de genotoxicidad han sido realizados en AE, donde reportan que el AE de *Lippia alba* no es genotóxico utilizando el método de SOS cromotest, sin embargo al evaluar algunos de los componentes mayoritarios (limoneno) se ~~demostró observó la~~ genotoxicidad de éste componentes en dosis entre 97 y 1549 mM (López *et al.*, 2011). En ratones Swiss fue evaluado el AE de *Copaifera* donde ~~no se observó ningún incremento de daño en el ADN, a través del~~ ensayo cometa y ~~el de~~ micronúcleos, ~~no reportaron ningún incremento de daño en el ADN~~, ni alteraciones en la incidencia de micronúcleos en EPC a las concentraciones evaluadas (500, 1000 y 2000 mg/Kg)(Almeida *et al.*, 2012). Para el  $\beta$ C se ha reportado que es un compuesto no mutagénico en el ensayo de mutación génica reversa en *Salmonella typhimurium* cepas TA 98 y TA 100 (Di Sotto *et al.*, 2008) ni clastogénico en el modelo murino NIH a concentraciones de 20, 200 y 2000 mg/Kg (Molina *et al.*, 2009).

El  $\beta$ C ha sido considerado como candidato promisorio para uso de formulaciones tópicas para el tratamiento de la leishmaniasis, debido a su baja toxicidad y actividad anti-*Leishmania* en modelos *in vitro* como los encontrados en este estudio en contra *L. (V.) panamensis* y *L.(V.) braziliensis* (Tabla 17 y Figura 21) demostraron la selectividad del  $\beta$ C siendo >4 veces más toxico en los parásitos que en las células. El AE también ha mostrado actividad inhibitoria en amastigotes intracelulares del 19,64% en *L.(V.) panamensis* y 34,09% en *L.(V.) braziliensis* a concentraciones de 100  $\mu$ g/mL (Salud 2015). Estudios han reportado la actividad anti-*Leishmania* del  $\beta$ C con  $CI_{50}$  de 24,02  $\mu$ g/mL en promastigotes y 53,39  $\mu$ g/mL en amastigotes de *L. (L.) infantum*; ~~a~~ Además de  $CC_{50}$  de 143,85  $\mu$ g/mL en células THP-1(Leal *et al.* 2013). En *L.(V.) amazonensis* se ha reportado  $CI_{50}$  de 1,3  $\mu$ g/mL y

toxicidad en macrófagos peritoneales murinos  $CC_{50}$  de 63,6  $\mu\text{g/mL}$ , indicando al  $\beta\text{C}$  como un compuesto selectivo contra el parásito (Soares *et al.*, 2013).

A pesar de las ventajas encontradas de preparar una formulación tipo gel con AE y  $\beta\text{C}$  por las diversas propiedades biológicas de estos componentes y características ~~fisico-~~químicas ~~aportadas a~~ la formulación, no se logró que tuviese un efecto anti-*Leishmania*. Por el cual paralelamente, se utilizó el gel conteniendo AE y  $\beta\text{C}$  como vehículo para potenciar u optimizar el efecto de un medicamento anti-*Leishmania*, realizándole algunas de las pruebas toxicológicas y anti-*Leishmania* en los modelos experimentales.

Varias fueron las motivaciones para usar la miltefosina en una formulación tópica debido a que es un medicamento utilizado en el tratamiento de la leishmaniasis visceral como la LC (Monge y López, 2015). La miltefosina cumple con los requisitos necesarios para la permeación del estrato corneo de la piel, la principal barrera de los tratamientos tópicos, debido a que tiene un bajo peso molecular ( $<500$  g/mol), posee menos de tres donantes de enlaces de hidrogeno, buena solubilidad en el vehículo y un coeficiente de partición entre 1 y 3. Sin embargo, la miltefosina es una molécula anfifílica y zwitterionica en la piel a pH 5,5 conteniendo cargas negativas y positivas (pKa 2) actuando como un surfactante (Bos y Meinardi, 2000; Pugh, 1996). En este trabajo confirmamos el efecto *anti-Leishmania in vitro* de la miltefosina libre ~~in vitro anti-Leishmania~~ en las formas parasitarias de *L.(V.) panamensis* y *L.(V.) braziliensis*, siendo hasta tres veces más tóxico en el parásito que en las células (Tabla 17). Otros estudios han demostrado su actividad contra especies de *Leishmania* con  $CE_{50}$  en amastigotes intracelulares de *L. tropica* (0,07-0,08  $\mu\text{M}$ ), *L. major* (0,12-0,05  $\mu\text{M}$ ), *L. aethiopia* (0,11-0,12  $\mu\text{M}$ ), *L. mexicana* (0,43-0,69  $\mu\text{M}$ ) y *L. panamensis* (0,14-0,12  $\mu\text{M}$ ) (Van Bocxlaer *et al.*, 2016).

Al gel preparado con AE y  $\beta$ C, se le adicionó miltefosina Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) en una escasa proporción debido a la poca disponibilidad y costo de este medicamento. Se realizaron paralelamente los ensayos de toxicidad con los componentes y ensayos anti-*Leishmania in vitro* e *in vivo* en ratones infectados con *L. (V.) braziliensis*. Anidado al ensayo *in vivo*, se preparó un gel conteniendo solo miltefosina (Gel2(MIL)). Estas formulaciones fueron estables, efectivas y segura en el tiempo (20 días) de tratamiento de los ratones con LC, sin embargo, las propiedades físico químicas del gel Gel2(MIL) no fueron iguales al gel Gel4( $\beta$ C+AE+MIL) a pesar del efecto anti-*Leishmania* que fue igual de efectivo en ambos geles. Contrariamente, a los resultados obtenidos de formulaciones tópicas de miltefosina al 6% para el tratamiento de la LC por 5 días en ratones BALB/c infectados con *L. major*, donde se usó como solventes agua, ~~et~~-propilenglicol, dimetil isosorbida ~~y~~- salicilato octilo, obtuvieron formulaciones estables, sin embargo poco efectivas e irritantes (Van Bocxlaer *et al.*, 2016). Se han producido algunas formulaciones tópicas de miltefosina como el Miltex® (6% de miltefosina) utilizado en casos de metástasis de cáncer en piel (Garnier y Croft, 2002). En modelos experimentales murinos infectados con *L.(L.) mexicana* y *L.(L.) major*  ~~fueron~~ tratados con Miltex ~~se observó~~ ~~mostró~~ reducción de las lesiones, ~~sin embargo, se observó~~ ~~aunque fueron~~-reactiva ~~reacción~~ después de dos meses de tratamiento (Schmidt-Ott *et al.*, 1999). Otra suspensión con miltefosina utilizada a concentraciones de 50 mg-150 mg/Kg ha sido probada en algunos ensayos clínicos en LC con resultados variables (Soto *et al.*, 2001). Tratamientos tópicos a partir de formulaciones hidrofílicas (gel de paramomicina 10%) han mostrado mayor permeación que los ungüentos (Tiuman *et al.*, 2011). Además, esta formulación en gel con paramomicina presenta, en comparación con las cremas ventajas en la estabilidad, bajo costo y fácil preparación, además del efecto anti-*Leishmania* donde se reduce el tamaño de la lesión causada por *L.(L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis*,

presentando una actividad superior o equivalente al tratamiento con antimoniales (Gonçalves *et al.*, 2005). Estas formulaciones tópicas al ser optimizadas y agregando compuestos como el  $\beta$ C y AE podrían potencializar la permeación (Herman y Herman, 2015), ~~proporcionándole~~ propiedades antioxidantes, conservantes y características organolépticas agradables para la posible evaluación en ensayos clínicos.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se ~~pudo obtener~~ obtuvo una formulación que contiene bajas proporciones de  $\beta$ C y AE la cual fue fisicoquímicamente estable, con características organolépticas optima, con capacidad antioxidante, no irritante en piel, no hipersensibilizante, no genotóxica, haciéndola lo cual es confiable para un uso en humanos como vehículos en tratamientos tópicos con efecto anti-*Leishmania* como la miltefosina. Este estudio ~~además también~~ demostró la posibilidad de reformular un medicamento de uso oral como la miltefosina.

Los modelos experimentales utilizados en este trabajo son apropiados para el entendimiento del efecto toxicológico producido por los componentes y los geles, teniendo como punto de comparación controles positivos de irritación (AE-Timol), hipersensibilidad (DNFB) y genotoxicidad (CPA+EMS) cuyos resultados fueron reproducibles con los estándares o pruebas de toxicidad reportados en la literatura, aprobadas por entes internacionales.

El  $\beta$ C y el AE fueron activos en modelos experimentales *in vitro*, sin embargo, al ser formulados no tuvieron ningún efecto anti-*Leishmania*, esto puede ocurrir debido a la baja concentración de los componentes. Es recomendable el aumento de las concentraciones el  $\beta$ C y AE en las formulaciones hasta encontrar una dosis no toxica capaz de reducir las lesiones provocadas por parásitos de *Leishmania* en el modelo murino. Un hallazgo importante fue la propiedad antioxidante del  $\beta$ C y AE aportando estabilidad de las formulaciones, lo cual se puede proponer estos compuestos como candidatos para reemplazar antioxidantes sintéticos comerciales

Ensayos de permeación de los geles conteniendo  $\beta$ C y AE deben ser realizados para determinar con precisión el efecto potenciador y la acumulación de estos compuestos en las capas de la piel.

	Consistencia estabilidad	Antioxidante	Irritación	Hipersensibilidad	Potencial genotóxico	Alteraciones físicas	Alteraciones histopatológicas	Alteraciones perfil bioquímico	Anti- <i>Leishmania</i> <i>in vitro</i>	Anti- <i>Leishmania</i> <i>in vivo</i>
βC	-	Alto	Bajo	Nulo	Bajo	Nulo	Nulo	Nulo	Alto	-
AE	-	Alto	Bajo	Nulo	Bajo	Nulo	Nulo	Nulo	Bajo	-
MIL	-	-	-	-	-	-	-	-	Alto	-
Gel1 (Vehículo)	Bajo	Bajo	Nulo	Nulo	Bajo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Bajo
Gel3 (βC+AE)	Alto	Alto	Bajo	Nulo	Bajo	Nulo	Nulo	Nulo	Nulo	Bajo
Gel4 (βC+AE+MIL)	Alto	Alto	Bajo	Nulo	Bajo	Nulo	Nulo	Nulo	Alto	Alto
Vit C	-	Alto	-	-	-	-	-	-	-	-
AE-Timol	-	-	Alto	-	-	Bajo	-	-	-	-
CPA+EMS	-	-	-	-	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	-	-
DNFB	-	-	-	Alto	-	Bajo	-	-	-	-

Alto	Alto
Medio	Medio
Bajo	Bajo
Nulo	Nulo
-	No determinado

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121. <http://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- Alfía Fernández-Montes, e. (2003). Control de calidad. *Farmacia Profesional*, 70–75.
- Almeida, M. R., Darin, J. D. C., Hernandes, L. C., de Souza Ramos, M. F., Antunes, L. M. G., y de Freitas, O. (2012). Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. *Genetics and Molecular Biology*, 35(3), 664–72. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000052>
- Ameen, M. (2007). Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(16), 2689–2699. <http://doi.org/10.1517/14656566.8.16.2689>
- Averbeck, D., Averbeck, S., Dubertret, L., Young, A. R., y Morlière, P. (1990). Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 7(2–4), 209–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2128325>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Cubría, J. C., y Ordóñez, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, 30(4), 435–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9580315>
- Bensouilah, J., y Buck, P. (2006). *Aromadermatology: aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions*. Radcliffe Pub.
- Bleasel, N., Tate, B., y Rademaker, M. (2002). Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. *The Australasian Journal of Dermatology*, 43(3), 211–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121401>
- Bos, J. D., y Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology*, 9(3), 165–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839713>
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., ... Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85(3), 415–421. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.019>
- Buates, S., y Matlashewski, G. (1999). Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(6), 1485–94. <http://doi.org/10.1086/314782>

- Caló, E., y Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252–267. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>
- Calvopina, M., Guevara, A. G., Armijos, R. X., Hashiguchi, Y., Davidson, R. N., y Cooper, P. J. (2004). Itraconazole in the treatment of New World mucocutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, 43(9), 659–663. <http://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02183.x>
- Cardoso, B. M., Mello, T. F. P. de, Lopes, S. N., Demarchi, I. G., Lera, D. S. L., Pedroso, R. B., ... Lonardoní, M. V. C. (2015). Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different seasons. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(8), 1024–1034. <http://doi.org/10.1590/0074-02760150290>
- Ceridono, M., Tellner, P., Bauer, D., Barroso, J., Alépée, N., Corvi, R., ... Wilcox, P. (2012). The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: Practical experience and implications for phototoxicity testing – The report of an ECVAM–EFPIA workshop. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(3), 480–488. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.06.001>
- Chambergo, R. B., y Valdivia, C. B. (2003). Educación médica continua corticoides tópicos en pediatría: una puesta al día, 13(3).
- Chen, J., Jiang, Q.-D., Wu, Y.-M., Liu, P., Yao, J.-H., Lu, Q., ... Duan, J.-A. (2015). Potential of Essential Oils as Penetration Enhancers for Transdermal Administration of Ibuprofen to Treat Dysmenorrhoea. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(10), 18219–36. <http://doi.org/10.3390/molecules201018219>
- Cho, G. Y., y Hough, W. (1986). Time course of contact hypersensitivity to DNFB and histologic findings in mice. *Journal of Korean Medical Science*, 1(1), 31. <http://doi.org/10.3346/jkms.1986.1.1.31>
- CROFT, S., BARRETT, M., y URBINA, J. (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 21(11), 508–512. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.026>
- Croft, S. L., y Olliaro, P. (2011). Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(10), 1478–1483. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x>
- Cunningham, M. L., y Fairlamb, A. H. (1995). Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *European Journal of Biochemistry*, 230(2), 460–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7607216>
- Davies, C. R., Llanos-Cuentas, E. A., Sharp, S. J., Canales, J., Leon, E., Alvarez, E., ... Dye, C. (1997). Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms, response to treatment, and parasite isolation rate. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 25(2), 302–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9332529>

- De La Hoz, F., Enrique, M., Duran, M., Vigilancia, D., Del Riesgo En, A., Pública, S., ... Reyes, M. (2014). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública LEISHMANIASIS Hernán Quijada Bonilla.
- de Oliveira de Siqueira, L. B., da Silva Cardoso, V., Rodrigues, I. A., Vazquez-Villa, A. L., Dos Santos, E. P., da Costa Leal Ribeiro Guimarães, B., ... Junior, E. R. (2017). Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. *Nanotechnology*, 28(6), 65101. <http://doi.org/10.1088/1361-6528/28/6/065101>
- Dharmagunawardena, B., Takwale, A., Sanders, K. J., Cannan, S., Rodger, A., y Ilchyshyn, A. (2002). Gas chromatography: an investigative tool in multiple allergies to essential oils. *Contact Dermatitis*, 47(5), 288–292. <http://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2002.470506.x>
- Di Sotto, A., Evandri, M. G., y Mazzanti, G. (2008). Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 653(1), 130–133. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.04.004>
- Edson Villanueva-Tiburcio, J., Condezo-Hoyos, L. A., y Asquiere, E. R. (2009). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, (7003469).
- Escobar, P., Milena Leal, S., Herrera, L. V., Martinez, J. R., y Stashenko, E. (2010). Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 184–190. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762010000200013>
- Esquivel-F., A., Esquivel-F., A., y Vargas-Aguilar, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Revista Tecnología En Marcha*, 20(4). Retrieved from [http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/450](http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/450)
- Ezzine Sebai, N., Mrabet, N., Khaled, A., Zeglouli, F., Kharfi, M., Fazaa, B., y Kamoun, M. R. (2010). [Side effects of meglumine antimoniate in cutaneous leishmaniasis: 15 cases]. *La Tunisie Medicale*, 88(1), 9–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20415206>
- Freires, I., Denny, C., Benso, B., de Alencar, S., y Rosalen, P. (2015). Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. *Molecules*, 20(4), 7329–7358. <http://doi.org/10.3390/molecules20047329>
- Frézard, F., Demicheli, C., y Ribeiro, R. R. (2009). Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*, 14(7), 2317–2336. <http://doi.org/10.3390/molecules14072317>
- García, A. Á., y Carril, E. P.-U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)*, 2(3).
- Garnier, T., y Croft, S. L. (2002). Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Current*

- Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, 3(4), 538–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12090720>
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., y Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. *Il Farmaco*, 56(5–7), 387–389. [http://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01092-8](http://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01092-8)
- Gonçalves, G. S., Fernandes, A. P., Souza, R. C. C., Cardoso, J. E., de Oliveira-Silva, F., Maciel, F. C., ... Ferreira, L. A. M. (2005). Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica*, 93(2), 161–167. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.10.007>
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., y Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4–5), 352–366. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.005>
- Gupta, P., y Garg, S. (2002). Semisolid dosage forms for dermatological application. Pharmaceutical technology. *Pharmaceutical Technology*.
- Herman, A., y Herman, A. P. (2015). Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(4), 473–485. <http://doi.org/10.1111/jphp.12334>
- Hernandes, C., Taleb-Contini, S. H., Bartolomeu, A. C. D., Bertoni, B. W., França, S. C., y Pereira, A. M. S. (2014). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Schinus weinmannifolius* collected in the spring and winter. *Natural Product Communications*, 9(9), 1383–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25918817>
- Hernández, I. P., Montanari, J., Valdivieso, W., Morilla, M. J., Romero, E. L., y Escobar, P. (2012). In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World *Leishmania* species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 157–163. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.09.018>
- Ibrahim, M. M., Hafez, S. A., y Mahdy, M. M. (2013a). Organogels, hydrogels and bigels as transdermal delivery systems for diltiazem HCL. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 46–54. <http://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.006>
- Ibrahim, M. M., Hafez, S. A., y Mahdy, M. M. (2013b). Organogels, hydrogels and bigels as transdermal delivery systems for diltiazem hydrochloride. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 48–57. <http://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.006>
- Jałozzyński, P., Kujawski, M., Czub-Swierczek, M., Markowska, J., y Szyfter, K. (1997). Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutation Research*, 385(3), 223–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9506891>
- Kanerva, L. (Lasse). (2000). *Handbook of occupational dermatology*. Springer.
- Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., y Gaspari, A. A. (2012). Early immune events in the induction

- of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 114–24. <http://doi.org/10.1038/nri3150>
- Kaye, P., y Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 604–615. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2608>
- Kearns, P., Gonzalez, M., OKI, N., Lee, K., y Rodriguez, F. (2009). The Safety of Nanotechnologies at the Oecd. In *Nanomaterials: Risks and Benefits* (pp. 351–358). Dordrecht: Springer Netherlands. [http://doi.org/10.1007/978-1-4020-9491-0\\_27](http://doi.org/10.1007/978-1-4020-9491-0_27)
- Kejlová, K., Jírová, D., Bendová, H., Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Kolářová, H., y Liebsch, M. (2007). Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Toxicology in Vitro*, 21(7), 1298–1303. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.05.016>
- Krolewiecki, A., Leon, S., Scott, P., y Abraham, D. (2002). Activity of azithromycin against *Leishmania* major in vitro and in vivo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(3), 273–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408666>
- Lazaro, A., y Moreno, F. (2010). Corticosteroides tópicos, 34(3).
- Leal, S. M., Pino, N., Stashenko, E. E., Martínez, J. R., y Escobar, P. (2013). Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper* spp. grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 25(6), 512–519. <http://doi.org/10.1080/10412905.2013.820669>
- Lee, S. A., y Hasbun, R. (2003). Therapy of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 7(2), 86–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12839708>
- Leite, N. F., Sobral-Souza, C. E., Albuquerque, R. S., Brito, D. I. V., Lavor, A. K. L. S., Alencar, L. B. B., ... Coutinho, H. D. M. (2013). Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 522–528.
- Liu, J.-W., DeMichele, S. J., Palombo, J., Chuang, L.-T., Hastilow, C., Bobik, E., y Huang, Y.-S. (2004). Effect of Long-Term Dietary Supplementation of High-Gamma-Linolenic Canola Oil versus Borage Oil on Growth, Hematology, Serum Biochemistry, and N-6 Fatty Acid Metabolism in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3960–3966. <http://doi.org/10.1021/jf0496651>
- LLana-Ruiz-Cabello, M., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A. I., Pichardo, S., Jos, Á., y Cameán, A. M. (2014). Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella test and alkaline, Endo III- and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 122–128. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.013>
- Lopez. (2013). Thermotherapy effective and safer than miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in colombia. *Med. Trop. Sao Paulo Liliana LÓPEZ Gonzalo GODOY*, 55(31221), 197–204. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652013000300011>

- López, M. A., Stashenko, E. E., y Fuentes, J. L. (2011). Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and Molecular Biology*, 34(3), 479–88. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572011005000030>
- Lorenzo-Velázquez, B. 1901-1985., y Lorenzo Fernández, P. de. (2008). *Farmacología básica y clínica*. Médica Panamericana.
- Lozada, B. S. V. H. L. P. J. A. S. E. E. P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.*, agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61(2).
- Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M. J., y Barel, A. O. (1998). Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3), 368–376. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00353.x>
- Mendoza Patiño, N. (2008). *Farmacología médica*. Médica Panamericana.
- Minodier, P., y Parola, P. (2007). Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(3), 150–158. <http://doi.org/10.1016/j.tmaid.2006.09.004>
- Miranda-Verástegui, C., Llanos-Cuentas, A., Arévalo, I., Ward, B. J., y Matlashewski, G. (2005). Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(10), 1395–403. <http://doi.org/10.1086/429238>
- Mishra, J., Saxena, A., y Singh, S. (2007). Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Current Medicinal Chemistry*, 14(10), 1153–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456028>
- Molina-Jasso, D., Alvarez-González, I., y Madrigal-Bujaidar, E. (2009). Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. *Biological y Pharmaceutical Bulletin*, 32(3), 520–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252309>
- Monge-Maillo, B., y López-Vélez, R. (2015). Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(9), 1398–404. <http://doi.org/10.1093/cid/civ004>
- Monzote, L. (2009). Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 1, 9–19.
- Monzote, L., Pastor, J., Scull, R., y Gille, L. (2014). Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Phytomedicine*, 21(8–9), 1048–1052. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.03.002>
- Monzote, L., Piñón, A., Sculli, R., y Setzer, W. N. (2014). Chemistry and leishmanicidal activity of the essential oil from *Artemisia absinthium* from Cuba. *Natural Product Communications*, 9(12), 1799–804. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632489>

- Neira, L. F. (2016). Genotoxicidad del nifurtimox en deferentes líneas celulares utilizando el ensayo cometa. *Revista Médica de Risaralda*, 22(1). <http://doi.org/10.22517/25395203.13601>
- Neira, L. F., Stashenko, E., y Escobar, P. (2014). Artículo de investigación e innovación Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae Activity of Colombian plant extracts derived from the Euphorbiaceae family, 46(1).
- Neira F, L. F., Vera A, A. M., y Escobar, P. (2016). Genotoxicidad del nifurtimox en diferentes líneas celulares utilizando el ensayo cometa. *Revista Médica de Risaralda*, 22(1), 3–8.
- Oberdörster, G. (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*, 267(1), 89–105. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., y Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002369>
- Ospina VE, V. E., Mantilla JC, J. C., Conde CA, C. A., y Escobar P, P. (2014). Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. *Ciencias de La Salud*, 12(2), 195–211. <http://doi.org/10.12804/revsalud12.2.2014.05>
- Pastor, J., García, M., Steinbauer, S., Setzer, W. N., Scull, R., Gille, L., y Monzote, L. (2015). Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against Leishmania. *Acta Tropica*, 145, 31–38. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.002>
- PATENTE. (2013). Gel for topical application of clove essential oil with broad spectrum anti-inflammatory action and method of preparing same.
- PATENTE. (2012). Composición farmacéutica para uso en inflamación y dolor.
- Pathak, M. K., y Yi, T. (2001). Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(6), 3391–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544330>
- Pavli, A., y Maltezou, H. C. (2010). Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14(12), e1032-9. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.06.019>
- Pavón Pérez, J., Valdés Comas, L., y Pérez Ramos,(2011). Diseño y desarrollo de dos mascarillas faciales para el acné con quitina como sustancia bioactiva. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(2), 251–263.
- Pinheiro, I. M., Carvalho, I. P., de Carvalho, C. E. S., Brito, L. M., da Silva, A. B. S., Conde Júnior, A. M., ... Carvalho, A. L. M. (2016). Evaluation of the in vivo leishmanicidal

- activity of amphotericin B emulgel: An alternative for the treatment of skin leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 164, 49–55. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.010>
- Pugh, W. (1996). Epidermal permeability — Penetrant structure relationships: 3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 138(2), 149–165. [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(96\)04533-4](http://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04533-4)
- Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., Dagger, F., y Cohen, B. E. (1996). Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *The Journal of Membrane Biology*, 152(1), 65–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660406>
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., y Brooker, S. (2007). Review Cutaneous leishmaniasis. *Infection.thelancet.com*. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Revoredo, O. B., Monagas, S. A. F., Nieto Acosta, O. M., y Henríques Rodríguez, R. D. (1998). utilización de quitina en formas farmacéuticas. I Unguento. *Rev Cubana Farm*, 32(3), 188–93.
- Rg Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.-Z., Xie, X.-Q., ... Zimmer, A. (2001). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid.
- Rico, C., Rodríguez, J., Conde, C., Mantilla, J., y Escobar, P. (2013). Permeación en piel y biodistribución de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) aplicada tópicamente en ratas Wistar. *Revista Argentina de Dermatología*, 94(2), 0–0.
- Romero, G. A., Guerra, M. V., Paes, M. G., y Macêdo, V. O. (2001). Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 456–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716098>
- Röse, L., Schneider, C., Stock, C., Zollner, T. M., y Döcke, W.-D. (2012). Extended DNFB-induced contact hypersensitivity models display characteristics of chronic inflammatory dermatoses. *Experimental Dermatology*, 21(1), 25–31. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01395.x>
- Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J., y Verheij, M. (2003). Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 14(2), 167–73. <http://doi.org/10.1097/01.cad.0000054974.31252.f7>
- Ruiz-Villaverde, R., Blasco Melguizo, J., Linares Solano, J., Burkhardt Pérez, M. P., y Naranjo Sintés, R. (2002). Leishmaniasis cutánea crónica: respuesta a n-metil glucamina intralesional tras fracaso con paramomicina tópica. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 93(4), 263–266.
- Saenz, R. E., Paz, H., y Berman, J. D. (1990). Efficacy of ketoconazole against *Leishmania*

- braziliensis panamensis cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Medicine*, 89(2), 147–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2166429>
- Saldanha, A. C. R., Romero, G. A. S., Guerra, C., Merchan-Hamann, E., y Macedo, V. de O. (2000). Estudo comparativo entre estibogluconato de sódio BP 88® e antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea II. Toxicidade bioquímica e cardíaca. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(4), 383–388. <http://doi.org/10.1590/S0037-86822000000400009>
- Salmanpour, R., Handjani, F., y Noupisheh, M. K. (2001). Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Dermatological Treatment*, 12(3), 159–62. <http://doi.org/10.1080/09546630152607899>
- Santini, B., Zanoni, I., Marzi, R., Cigni, C., Bedoni, M., Gramatica, F., Baroli, B. (2015). Cream Formulation Impact on Topical Administration of Engineered Colloidal Nanoparticles. *PLOS ONE*, 10(5), e0126366. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0126366>
- Schmidt-Ott, R., Klenner, T., Overath, P., y Aebischer, T. (1999). Topical treatment with hexadecylphosphocholine (Miltex) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 85–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10492799>
- Schwartz, J., Moreno, E., Fernández, C., Navarro-Blasco, I., Nguewa, P. A., Palop, J. A., ... Espuelas, S. (2014). Topical treatment of L. major infected BALB/c mice with a novel diselenide chitosan hydrogel formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 309–316. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.06.010>
- Shukr, M. H., y Metwally, G. F. (2013). Evaluation of Topical Gel Bases Formulated with Various Essential Oils for Antibacterial Activity against Methicillin- Resistant Staphylococcus Aureus. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research Journal Citation Reports Science Edition*, 12(126), 877–877. <http://doi.org/10.4314/tjpr.v12i6.3>
- Silva-Vergara, M. L., Silva, L. de A., Maneira, F. R. Z., da Silva, A. G., y Prata, A. (2004). Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 46(3), 175–7. <http://doi.org/S0036-46652004000300011>
- Singh, V. K., Anis, A., Banerjee, I., Pramanik, K., Bhattacharya, M. K., y Pal, K. (2014). Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis. *Materials Science and Engineering C*, 44, 151–158. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.026>
- Sköld, M., Karlberg, A.-T., Matura, M., y Börje, A. (2006). The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4), 538–545. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.028>
- Soares, D. C., Portella, N. A., Ramos, M. F. de S., Siani, A. C., y Saraiva, E. M. (2013). Trans-  $\beta$  -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in

- Commercial Copaiba Oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2013, 761323. <http://doi.org/10.1155/2013/761323>
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., ... Sindermann, H. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9), 1266–1272. <http://doi.org/10.1086/383321>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cala, M. P., Durán, D. C., y Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*, 36(1), 192–202. <http://doi.org/10.1002/jssc.201200877>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Durán, D. C., Córdoba, Y., y Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 38(0), 89. <http://doi.org/10.18257/raccefyn.156>
- Sundar, S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine y International Health : TM y IH*, 6(11), 849–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703838>
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., ... Berman, J. (2002). Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 347(22), 1739–1746. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa021556>
- Taylor, R. M. (1986). Histopathology of contact dermatitis. *Clinics in Dermatology*, 4(2), 18–22. [http://doi.org/10.1016/0738-081X\(86\)90059-3](http://doi.org/10.1016/0738-081X(86)90059-3)
- Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. (2015). OECD Publishing. <http://doi.org/10.1787/9789264242678-en>
- Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. (2014). OECD Publishing. <http://doi.org/10.1787/9789264224292-en>
- Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. (2016). OECD Publishing. <http://doi.org/10.1787/9789264264885-en>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., y Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737956>
- Tisserand, R., y Young, R. (2014a). Glossary. In *Essential Oil Safety* (pp. 667–670). <http://doi.org/10.1016/B978-0-443-06241-4.09997-5>
- Tisserand, R., y Young, R. (2014b). Resources. In *Essential Oil Safety*.

<http://doi.org/10.1016/B978-0-443-06241-4.09982-3>

- Tisserand, R., Young, R., y Williamson, E. M. (2014). Foreword. In *Essential Oil Safety*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-443-06241-4.09989-6>
- Tiuman, T. S., Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., y Nakamura, C. V. (2011). Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(8), e525–e532. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>
- Turina, A. de. V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A., y Perillo, M. A. (2006). Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*, 122(2), 101–113. <http://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.02.007>
- Van Bocxlaer, K., Yardley, V., Murdan, S., y Croft, S. L. (2016). Topical formulations of miltefosine for cutaneous leishmaniasis in a BALB/c mouse model. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(7), 862–72. <http://doi.org/10.1111/jphp.12548>
- Vasquez, M. Z. (2010). Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis*, 25(2), 187–199. <http://doi.org/10.1093/mutage/geb060>
- Vera, S. S., Zambrano, D. F., Méndez-Sánchez, S. C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E. E., y Duque Luna, J. E. (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(7), 2647–2654. <http://doi.org/10.1007/s00436-014-3917-6>
- Villarino, N. F., y Landoni, M. F. (2006). *Administración transdérmica de fármacos: Una alternativa terapéutica*.
- Zvulunov, A., Cagnano, E., Frankenburg, S., Barenholz, Y., y Vardy, D. (2003). Topical treatment of persistent cutaneous leishmaniasis with ethanolic lipid amphotericin B. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 22(6), 567–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12828157>