

Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae

Activity of Colombian plant extracts derived from the Euphorbiaceae family

Laura Fernanda Neira¹, Elena Stashenko², Patricia Escobar¹

Forma de citar: Neira LF, Stashenko E, Escobar P. Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. rev.univ.ind.santander.salud 2104; 46 (1): 15-22

RESUMEN

Introducción: La familia Euphorbiaceae es un grupo heterogéneo de plantas distribuidas en el territorio colombiano utilizadas algunas de ellas, como plantas medicinales. **Objetivo:** Determinar la actividad tóxica de aceites esenciales (AE) y extractos de plantas obtenidos de la familia Euphorbiaceae contra tripanosomátidos. **Materiales y métodos:** Los AE de *Croton pedicellatus* Kunth (AE1) y *C.leptostachyus* Kunth (AE2) y el extracto de *Phyllanthus acuminatus* Vahl fueron obtenidos por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y maceración con metanol; se caracterizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Fueron evaluados contra las formas extracelulares e intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* y células Vero y THP-1. La actividad antiparasitaria fue determinada por recuento microscópico y el efecto tóxico en células por la prueba colorimétrica de MTT. Los resultados fueron expresados como la concentración que inhibe (CI₅₀) o destruye (CC₅₀) el 50% de parásitos o células. **Resultados:** Los componentes mayoritarios de los AE fueron borneol, γ -terpineno, germacreno D y trans- β -cariofileno. Los AE1 y AE2 inhibieron el crecimiento de epimastigotes de *T.cruzi* y de promastigotes de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* con CI₅₀ entre 7,14-8,78 μ g/mL y fueron activos contra amastigotes intracelulares de *L. (V.) braziliensis* (AE1:CI₅₀ 36,74 y AE2:19,77 μ g/mL). El extracto 1 mostró baja actividad contra los parásitos. Los AE y extractos mostraron toxicidad en células THP-1(CC₅₀ 9,29-64,12 μ g/mL) y células Vero (CC₅₀ 24,86-3,52 μ g/mL). **Conclusión:** Los AE obtenidos de plantas de la familia de Euphorbiaceae mostraron actividad antiparasitaria con toxicidad moderada en células de mamífero.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, plantas colombianas, aceites esenciales, Euphorbiaceae

1. Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP), Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

2. Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: Patricia Escobar. **Dirección:** Km2 vía Refugio Piedecuesta sede UIS Guatiguará. **Correo electrónico:** pescobarwww@yahoo.co.uk. **Teléfono:** 6344000 extensión 3565.

Recibido: septiembre 5 de 2013

Aprobado: marzo 5 de 2014

ABSTRACT

Introduction: The Euphorbiaceae family is a heterogeneous group of plants distributed in the Colombian territory used for medicinal purposes. **Objective:** To determine the toxic activity of Euphorbiaceae family essential oils and plant extract against tripanosomatids. **Materials and methods:** Essential oil from *Croton pedicellatus* Kunth (EO1) and *C.leptostachyus* Kunth(EO 2) and plant extract from *Phyllanthus acuminatus* Vahl (Ext1) were obtained by microwave-assisted hidrodistillation and characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry and methanol maceration. They were assessed against extracellular and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania(Viannia) panamensis*, *L.(Viannia)braziliensis* and Vero and THP-1 cells. The parasite activity was determined by microscopic counting and cell toxicity by MTT colorimetric test. The results were expressed as the inhibitory (IC₅₀) or citotoxic (CC₅₀) concentration for 50% of parasites or cells. **Results:** The EO-major components were borneol, γ -terpinene and *trans*- β -caryophyllene. The EO1 and EO2 inhibited both *T.cruzi*-epimastigotes and *L.(V.) panamensis* and *L.(V.) brazilienses* promastigotes growth with IC₅₀ between 7.14 to 8.78 μ g/mL They were active against intracellular amastigotes of *L. (V.) braziliensis* (EO1:IC₅₀:36.74 and EO2:19.77 μ g/mL). The Ext 1 showed low activity against both parasites. The EOs and extracts were partially toxic to THP-1 (CC₅₀ 9.29 to 64.12 μ g/mL) and Vero cells (CC₅₀ 24.86 to 63.52 μ g/mL). **Conclusions:** The EO obtained from plants of the Euphorbiaceae family showed antiparasitic activity with some toxicity against mammalian cells.

Keywords: *Trypanosomacruzi*, *Leishmania*, Colombian plants, essential oils, Euphorbiaceae

INTRODUCCIÓN

Las plantas, sus extractos y AE han sido utilizados en la medicina tradicional por muchos años, constituyéndose en una fuente de moléculas potencialmente activas contra parásitos patógenos ¹. Algunas moléculas obtenidas de plantas como la artemisa, la quinina y la emetina, entre otras, han sido utilizadas en el tratamiento de la malaria y la amebiasis ¹. Estos resultados han motivado los estudios, cada vez más numerosos, de la actividad antiparasitaria de componentes de plantas especialmente aromáticas y medicinales en modelos experimentales.

La leishmaniasis y la enfermedad de Chagas son enfermedades parasitarias producidas por protozoarios de la familia Tripanosomatidae; consideradas “enfermedades huérfanas u olvidadas”, afectando principalmente a personas que habitan en condiciones de pobreza o miseria ². La leishmaniasis se encuentra distribuida en más de 60 países en el mundo estando en riesgo más de 200 millones de personas con 500.000 casos nuevos por año en países endémicos ³. La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países del continente Americano donde están en riesgo más de 100 millones de personas con 56.000 casos nuevos por año ^{4,5}. No existe una vacuna ni un tratamiento ideal para su cura. El tratamiento de la leishmaniasis consiste en la administración de antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam) y en caso de falla se utiliza la anfotericina B (AmB), la pentamidina y la miltefosina. Para la enfermedad de Chagas el tratamiento de basa en

el uso de benznidazol y nifurtimox. Estos tratamientos presentan contraindicaciones, efectos tóxicos, eficacia variable, y generalmente son aplicados en protocolos largos y dolorosos ^{6,7}.

La familia Euphorbiaceae está constituida por cerca de 8000 especies agrupadas en 317 géneros; aunque recientemente ha sido dividida en aproximadamente 14 familias ⁸. Se caracterizan por presentar un látex o exudado coloreado, estípulas y están distribuidas en zonas tropicales, subtropicales y templadas. En Colombia se han encontrado 78 géneros con más de 390 especies distribuidas en todas las regiones del país principalmente en la región andina y la región amazónica siendo *Euphorbia* el género más cultivado⁸. Esta familia heterogénea de plantas tiene importancia en diferentes áreas como en la obtención de productos industriales (i.e. *Hevea brasilienses* se obtiene el caucho), alimentos (i.e. *Manihotesculentase* obtiene la yuca o mandioca), en medicina (i.e. *Ricinuscommunis* de donde se obtienen el aceite de ricino) y ornamentación⁸. Experimentalmente numerosos trabajos resaltan la actividad de esta familia de plantas en medicina. *R. communis* ha mostrado actividad insecticida y actividad contra promastigotes de *L. major* cuando es utilizado como parte de la dieta del vector *Phlebotomuspapatasi*. Extractos o componentes del látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (*E. milli*) han presentado actividad contra los moluscos hospederos intermediarios de los esquistosomas; siendo según sus autores uno de los más

potentes y específicos molusquicidas descubiertos hasta la fecha⁹. Extractos de *Euphorbia prostrata* Ait han mostrado actividad antiinflamatoria, antiglicemiante, insecticida y antihelmíntica¹⁰. Especies de género *Croton* han presentado propiedades antiinflamatorias, antitumorales, leishmanicidas y antimalárica¹¹⁻¹³.

Dado que la leishmaniasis y enfermedad de Chagas constituyen un problema grave de salud pública en los países que las padecen y la problemática de los tratamientos actuales, la búsqueda de alternativas terapéuticas es un tema prioritario de investigación. Como parte del programa realizado en Colombia orientado a la evaluación de la actividad biológica de AE y extractos de plantas aromáticas obtenidas de diferentes regiones del país, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad de AE obtenidos de *C. leptostachyus* y *C. pedicellatus* y extractos metanólicos de *P. acuminatus* contra *T. cruzi*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis* y sus células hospederas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceites esenciales (AE), extractos de plantas y medicamentos de referencia

Los AE de *C. pedicellatus* y *C. leptostachyus* fueron obtenidos de hojas frescas de las plantas por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWH) y caracterizados por espectrofotometría de masas acoplado a un cromatógrafo de gases (GC-MS)¹⁴. El extracto de *Phyllanthus acuminatus* fue obtenido a partir de hojas secas por extracción por maceración en metanol¹⁵. Muestras de las especies fueron identificadas por el Dr. J. Murillo y los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. La composición química de los AE está formada principalmente por el borneol, γ -terpineno, germacreno D y *trans*- β -cariofileno y el extracto contiene 4,30 mg fenoles/100 g. Como medicamento de referencia se utilizó la AmB (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y el nifurtimox (Bayer, Germany).

Se prepararon soluciones patrón de los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO, Carlo Erba, Rodano, MI, Italy) y soluciones de trabajo en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) antes de cada experimento. El porcentaje de DMSO en las soluciones de trabajo fue menor al 0,5%. Esta concentración no fue tóxica para las células ni parásitos.

Parásitos y células de mamífero

Los promastigotes de *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) y *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) fueron cultivados en medio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (SFBi, Gibco) a 28°C. Los epimastigotes de *T. cruzi* (Silvio-X10, ATCC® 50823) fueron cultivados en medio infusión de hígado triptosa (LIT) suplementado con 10% de SBFi a 28°C. Las células de monocitos leucémicos humanos, THP-1 (ATCCTIB-202) y células epiteliales de riñón de mono verde africano, Vero (CCL1-81 ATCC) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Ensayos de actividad en parásitos

Los promastigotes de *Leishmania* o epimastigotes de *T. cruzi* fueron tratados con diluciones seriadas 1:3 de los compuestos (3,7-100 μ g/mL), por 72 horas a 28°C. Parásitos control fueron mantenidos sin compuesto. La inhibición del crecimiento fue determinada microscópicamente por conteo directo de parásitos vivos en cámara de Neubauer¹⁶.

Los amastigotes intracelulares de *Leishmania spp* fueron obtenidos infectando las células hospederas THP-1 diferenciadas con forbolmiristato acetato (PMA, siglas en inglés, Sigma-Aldrich) con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, en una proporción parásito:célula de 5:1 por 48 horas. Los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* se obtuvieron infectando las células Vero con tripomastigotes, en una proporción parásito:célula de 10:1 por 24 horas. Los amastigotes intracelulares fueron tratados con los AEs y el extracto (3,7-100 μ g/mL), durante 120 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células infectadas control fueron mantenidos sin compuesto. Los porcentajes de infección fueron determinados por conteo microscópico de células infectadas y no infectadas en preparaciones fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa.

Ensayo de toxicidad en células

Las células Vero y THP-1 fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos (3,7-100 μ g/mL). Células control fueron mantenidas sin compuesto. La toxicidad fue determinada por el método de colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro)¹⁷. La densidad óptica se determinó por espectrofotometría a 580 nm usando

un lector de microplacas (Anthos2020). El porcentaje de citotoxicidad fue calculado mediante la fórmula: Porcentaje de citotoxicidad = $100 * (DO \text{ grupo control} - DO \text{ grupo tratado}) / DO \text{ grupo control}$.

Análisis de resultados:

La actividad fue expresada como la concentración del AE o extracto metanólico capaz de inhibir el 50% y el 90% de los parásitos (CI_{50} , CI_{90}) o la concentración tóxica para el 50% y 90% de las células (CC_{50} , CC_{90}) calculados por regresión sigmoideal utilizando el software Mxflit™ (ID Business Solution, UK). Los resultados mostrados corresponden al promedio de dos experimentos. Se calculó el índice de selectividad (IS) dividiendo la CC_{50} / IC_{50} (células / parásitos); IS de tres o superior se consideró selectiva (más activa contra los parásitos que contra la célula de mamífero).

RESULTADOS

Actividad contra *Leishmania*

Los AE1 y AE2 derivados de *Croton* mostraron

actividad contra las formas extracelulares de las dos especies de *Leishmania* estudiadas. De igual manera, el AE2 fue activo contra amastigotes intracelulares de ambas especies de *Leishmania*, sin embargo, el AE1 solo fue activo contra amastigotes de *L. (V.) braziliensis* (Tabla 1). Los AEs también fueron tóxicos contra las células hospederas THP-1 mostrando IS menores de tres (Tabla 1). El extracto metanólico estudiado mostró baja actividad contra los parásitos y fue ligeramente tóxico para las células THP-1. La AmB presentó actividad contra *Leishmania* presentando IS mayores de 30. Los amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* fueron menos susceptibles a la AmB que los de *L. (V.) braziliensis* ($p=0,001$).

Actividad contra *T. cruzi*

Los AE1 y AE2 derivados de *Croton* mostraron actividad contra las formas extracelulares de *T. cruzi* (Tabla 2). El AE2 presentó actividad en amastigotes intracelulares, sin embargo, fue tóxico contra las células Vero mostrando IS de 0,85. El Ext1 fue poco activo contra el parásito. El nifurtimox fue activo contra el *T. cruzi* presentando IS mayores de 15 (Tabla 2).

Tabla 1. Actividad de los compuestos contra *Leishmania* y células THP-1

Especie	Vaucher	Lugar de Colecta	$\mu\text{g/mL} \pm \text{DS}^f$								Células THP-1
			<i>L. (V.) panamensis</i>				<i>L. (V.) braziliensis</i>				
			Promastigotes	Amastigotes intracelulares	Promastigotes	Amastigotes intracelulares	IS	IS	IS	IS	
			^b CI_{50}	^c IS	CI_{50}	IS	CI_{50}	IS	CI_{50}	IS	^d CC_{50}
<i>Croton leptostachyus</i>	519596	Alvarado, Tolima	7,39 ±1,71	2,24	84,59 ±1,6	0,2	22,74 ±0,26	0,73	36,74 ±18,1	0,45	16,57±0,66
AE1											
<i>Croton pedicellatus</i>	519598	Alvarado, Tolima	7,14 ±2,34	1,30	46,68 ± 8,38	0,83	19,65 ±11,64	0,47	19,77 ±6,86	0,47	9,29 ±0,53
AE2											
<i>Phyllanthus acuminatus</i>	512239	Puerto López, Meta	91,22 ±6,9	0,70	^e NA		55,61 ±27,4	1,15	57,8 ± 5,74	1,10	64,12±4,82
EXT1											
^a AmB			0,03 ±0,001	524	0,49 ±0,18	32	0,05 ±0,02	307	0,08 ±0,05	314	15,73 ±2,45

^a Anfotericina B ^b Concentración Inhibitoria 50, ^c índice de selectividad, ^d Concentración citotóxica 50, ^eNo Activo a la máxima concentración evaluada de 100 $\mu\text{g/mL}$, ^fDesviación estándar

Tabla 2. Actividad de los extractos contra *T. cruzi* y células Vero

Extracto	µg/mL± DS				
	<i>T. cruzi</i>		Células Vero		
	Epimastigotes	Amastigotes intracelulares			
	^d CI ₅₀	^e IS	CI ₅₀	IS	^f CC ₅₀
^a AE1	8,78 ±0,67	5,31	gNA		46,67 ±12,02
^b AE2	8,64 ±0,33	2,88	28,95 ±2,50	0,85	24,86±1,56
^c Ext1	76,26 ±4,76	0,83	^g NA		63,52±5,29
Nifurtimox	0,98±0,09	33,90	1,89±0,01	17,57	33,21± 0,22

^a*Croton pedicellatus*, ^b*Croton leptostachyus*, ^c*Phyllanthus acuminatus*, ^dConcentración Inhibitoria 50, ^e índice de selectividad, ^f Concentración citotóxica 50, ^gNo Activo a la máxima concentración evaluada de 30 µg/mL.

Actividad en células Vero y THP-1

Los AE de *C. pedicellatus* y *C. leptostachyus* mostraron actividad tanto en las células THP-1 (CC₅₀ 16,57 y 9,29 µg/mL) como en las células Vero (CC₅₀ de 46,67 y 24,86 µg/mL) respectivamente (**Tabla 1 y 2**). El extracto metanólico de *P. acuminatus* fue menos tóxico para estas células de mamífero.

DISCUSIÓN

Los extractos obtenidos de plantas de la familia Euphorbiaceae presentan una gran variedad en su composición química, por su alto contenido de terpenos, flavonoides, ácidos grasos y alcaloides^{18,19}. Una de las motivaciones para probar estos compuestos en tripanosomatidos fueron los resultados encontrados en la literatura principalmente en especies de los géneros *Croton* y *Phyllanthus* spp.

En el género *Phyllanthus* especies como *P. amarus*, *P. embirica*, *P. urinaria* y *P. nenuri* han sido utilizadas ampliamente en la medicina tradicional y en la ayurvédica²⁰. *Phyllanthus amarus* ha mostrado propiedades hepatoprotectivas, radioprotectivas, antitripanosoma, antibacteriana, antiviral y antimalárica^{21,22}. *Phyllanthus emblica* actividad hepatoprotectiva, antioxidante, antiviral, antibacteriana y anticancerígena^{20,23,24}; *P. urinaria* ha mostrado actividad contra el cáncer²⁵ y *P. niruri* antibacteriana y antitumoral²⁶. La actividad de *P. acuminatus* o grosella de Jamaica ha sido menos estudiada; estudios realizados en 1990 encontraron una sustancia llamada filantostatina⁶ en las raíces de esta planta que inhibía el crecimiento de líneas tumorales²⁷, sin embargo no existen reportes de estudios recientes con

esta molécula. En este trabajo la actividad del extracto de *P. acuminatus* en células de mamífero tumorales y en parásitos fue similar presentando valores por encima de 50 µg/mL. Aunque la actividad presentada en amastigotes intracelulares de *L. (V.) braziliensis* no deja de ser interesante, la baja selectividad en esta respuesta nos indica que el efecto de inhibición del parásito se debe posiblemente a los efectos que tienen los componentes de los extractos sobre la célula hospedera.

El género *Croton* es el segundo género más numeroso y diverso de las Euphorbiaceae, (con cerca de 800 especies de distribución pantropical) ocupando en Colombia principalmente las regiones Andina y Caribe⁷. En este trabajo AE obtenidos de *C. pedicellatus* y *C. leptostachyus* fueron activos contra las formas extracelulares de los parásitos y mostraron alguna toxicidad en las células hospederas. Sin embargo los resultados obtenidos especialmente en las formas intracelulares de *L. (V.) braziliensis* son bastante interesantes.

La actividad de AE obtenidos de la especie de *Croton* (*C. cajucara*) obtenida en la región de la Amazonia brasileña contra las diferentes formas parasitarias de *L. amazonensis* fue demostrada previamente¹¹. Valores de actividad extremadamente bajos (LD₅₀ 0,0083 µg/mL contra promastigotes y LD₅₀ 0,0220 µg/mL contra amastigotes intracelulares) fueron encontrados¹¹. Los valores de actividad de los AE1 y AE2 hallados en este trabajo fueron aproximadamente 1000 veces mayores indicando que estos fueron menos activos. Estas diferencias podrían deberse a varios aspectos tales como las diferencias en la composición de los AE utilizados, a la especie de *Leishmania* estudiada y a diferencias en las metodologías empleadas. En otro estudio realizado con el AE obtenido de *C. macrostachyus*

especie de *Croton* recolectada en Etiopia, se registraron actividades contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. donovani* y *L. aethiopica*²⁸. Los IS calculados (IS de 0,5 para *L. donovani* 1,5 para *L. aethiopica*), fueron similares a los encontrados por nosotros indicando la baja selectividad de los AE por los parásitos. Por otro lado, algunos componentes de los AE de *Croton* han sido evaluados²⁹. Un derivado alcaloide llamado “julocrotine”, molécula extraída de la especie *C. pullei* obtenida en el territorio brasileño ha mostrado actividad contra *L. amazonensis* con valores de IC₅₀ 67,0 μM en promastigotes y IC₅₀ 19,8 μM en amastigotes intracelulares²⁹.

En un estudio reciente, el extracto metanólico de *C. cajuara* obtenido también en la Amazonía Brasileira, mostró actividad en diferentes aislados de *T. cruzi*³⁰. El extracto de *C. cajuara* mostró actividad en tripomastigotes (IC₅₀ 10,7-49,4 μg/mL), epimastigotes (IC₅₀ 103-166 μg/mL) y en amastigotes intracelulares (IC₅₀ 19,5-69,7 μg/mL) sin presentar toxicidad en macrófagos peritoneales de ratón a la máxima concentración evaluada de 100 μg/mL. Con respecto a esto, nuestros resultados de actividad con los AE1 y AE2 mostraron ser hasta 12 veces más activos que el extracto de *C. cajuara* en los epimastigotes. En relación a la actividad en amastigotes intracelulares y dada las diferencias en la actividad en relación al aislado de *T. cruzi*, podemos decir que el AE2 mostró una actividad similar al extracto de *C. cajuara*.

La toxicidad presentada por los AE en el presente estudio puede deberse en parte a que las líneas utilizadas como hospederas de los parásitos son líneas tumorales o diferenciadas. La actividad de estos tipos de compuestos han sido demostradas en diferentes líneas celulares. Extractos metanólicos de *C. lechleri* han mostrado actividad contra células HeLa con IC₅₀ de 17 μg/mL relacionada con la expresión de annexina³¹. Un compuesto derivado de *C. malambo* (ent-16beta-17alpha-dihidroxikaurano), ha mostrado actividad contra células MCF-7 de carcinoma mamario con actividades de IC₅₀ de 2,5 μg/mL dosis que es 2,6 veces menor al valor correspondiente a las células no malignas³².

La actividad de los componentes mayoritarios de los AE han sido reportados en la literatura científica como el caso del borneol el metabolito que se encontró en mayor proporción en los AE. Este se caracteriza por su baja toxicidad y ha mostrado acción analgésica, antiinflamatoria en estudios *in vivo* a concentraciones de

5, 25 y 50 mg/kg³³, además de actividad contra nematodos como *Meloidogyne incognita* a concentraciones de 500 mg/L³⁴. Otros componentes mayoritarios de los AE estudiados han reportado actividad antiparasitaria contra formas libres de *T. cruzi* y *L. chagasi* como el caso del γ-terpineno (IC₅₀ de 145.1 a 162.9 μg/mL) y *p*-cimeno (IC₅₀ de 28.1 a 149.1 μg/mL)³⁵ y de actividad antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* MIC 250 μg/mL en ambos monoterpenos³⁶. Los sesquiterpenos *trans*-β-cariofileno y germacreno D se encuentran comúnmente en la naturaleza, hacen parte importante de la composición química de muchos AE de plantas aromáticas y es desconocido el efecto sinérgico en mezclas complejas; sin embargo los resultados obtenidos del estudio del *trans*-β-cariofileno han sido interesantes por su acción leishmanicida y selectiva en *L. infantum* (IC₅₀ 2,89 a 24,54 μg/mL)³⁷ y *L. amazonensis* (IC₅₀ 1,3 μg/mL) con un IS de 48,9 en macrófagos peritoneales murinos³⁸, lo que orienta al estudio particular de este compuesto con el fin de desarrollar nuevas formulaciones que puedan ser evaluada en modelos *in vitro* e *in vivo* contra la leishmaniasis.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró la capacidad de AE obtenidos de *C. pedicellatus* y *C. leptostachyus* y en menor proporción del extracto de *Phyllanthus acuminatus*, de inhibir las formas extracelulares e intracelulares de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* *T. cruzi*. Se encontraron IS < 2, indicando el efecto de los compuestos contra la célula hospedera. Dada la actividad que este tipo de compuestos han presentados en células tumorales se sugiere realizar experimentos utilizando células no tumorales. Igualmente se sugiere evaluar la actividad de los componentes mayoritarios de los AE y determinar cuáles están implicados en la muerte del parásito y cuales en las células de mamífero.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de interés en la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Colciencias (Contrato RC-245-2011), Patrimonio Autónomo del Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas) y por la Universidad Industrial de Santander.

REFERENCIAS

1. Anthony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components a resource for antiparasitic agents?. *Trends Parasitol.* 2005; 21:562-68.
2. Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezdek S, Edwards MS et al. Chagas Disease: "The New HIV/AIDS of the Americas". *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(5): 498.
3. Shakya N, Sane SA, Vishwakarma P, Bajpai P, Gupta S. Improved treatment of visceral Leishmaniasis (Kala-azar) by using combination of ketoconazole, Miltefosine with an immunomodulator-Picroliv. *Acta Trop.* 2011; 119: 188-93.
4. Rodrigues J, Pinto JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104: 31-40.
5. Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas (Documento OPS/HDM/CD/425.06.). OPS; 2006.
6. Sota S, Arment A, Araujo G, Viotti R, Lococo B, Vera B, et al. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con Benznidazol y Acido Tioctico. *Medicina (B. Aires)* 2004; 64: 1-6.
7. Kirchhoff LV. American trypanosomiasis (Chagas' disease)-a tropical disease now in the United States. *N Engl J Med.* 1993; 329:639-44.
8. Murillo J. Las Euphorbiaceae de Colombia. *Biota Colombiana.* 2004; 5: 183-99
9. Schall VT, de Vasconcellos MC, de Souza CP, Baptista DF. The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:7-10.
10. Xavier JR, Gnanam R, Murugan MP, Pappachan A. Clonal propagation of *Phyllanthus amarus*: A hepatoprotector. *Pharmacogn Mag.* 2012;8:78-82.
11. Rosa MS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, Rodrigues IA, Soares RM, Souto-Pradón T, et al. Antileishmanial activity of a linalol-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1895-901.
12. Block S, Gerkens P, Peulen O, Jolois O, Mingeot-Leclercq MP, De Pauw-Gillet MC, et al. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobanederpene. *Anticancer Res.* 2005; 25:363-68.
13. Garavito G, Rincon J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Gimenez A, et al. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2006; 107: 460-62.
14. Stashenko E, Jaramillo BE, Martínez JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J Chromatogr A.* 2004; 1025(1): 93-103.
15. Vásquez A, Cala M, Miranda I, Tafurt G, Martínez J, Stashenko E. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia Et Technica.* 2007; 13: 205-07.
16. Escobar P, Herrera LV, Leal SM, Duran C, Stashenko E. Composición química y actividad antitripanosomal de aceites esenciales obtenidos de *Tagetes* (Fam. Asteraceae), recolectados en Colombia. *Salud UIS.* 2009; 41: 280-86
17. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983;65:55-63.
18. Cateni F, Falsone G, Zilic J. Terpenoids and Glycolipids from Euphorbiaceae. *Rev Med Chem.* 2003;3:425-37.
19. Bittner M, Alarcón J, Aqueveque P, Becerra V, Hoeneisen M, Silva M. Estudio Químico de la familia Euphorbiaceae en Chile. *Bol Soc Chil Quím.* 2001; 46:4.
20. Srirama R, Deepak HB, Senthilkumar U, Ravikanth G, Gurumurthy BR, Shivanna MB, et al. Hepatoprotective activity of Indian *Phyllanthus*. *Pharm Biol.* 2012; 50:948-53.
21. Appiah-Opong R, Nyarko AK, Dodoo D, Gyang FN, Koram KA, Ayisi NK. Antiplasmodial activity of extracts of *Tridax procumbens* and *Phyllanthus amarus* in *in vitro Plasmodium falciparum* culture systems. *Ghana Med J.* 2011;45:143-50.
22. Patel JR, Tripathi P, Sharma V, Chauhan NS, Dixit VK. *Phyllanthus amarus*: ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol.* 2011; 18:286-313.
23. Baliga MS, Dsouza JJ. Amla (*Embllica officinalis* Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2011; 20:225-39.

24. Krishnaveni M, Mirunalini S. Therapeutic potential of *Phyllanthus emblica* (amla): the ayurvedic wonder. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2010; 21:93-105.
25. Huang ST, Pang JH, Yang RC. Anti-cancer effects of *Phyllanthus urinaria* and relevant mechanisms. *Chang Gung Med J*. 2010; 33:477-87.
26. Ranilla LG, Apostolidis E, Shetty K. Antimicrobial activity of an amazon medicinal plant (Chancapiedra) (*Phyllanthu sniruri* L.) against *Helicobacter pylori* and lactic acid bacteria. *Phytother Res*. 2012;26:791-99.
27. Pettit GR, Schaufelberger DE, Nieman RA, Dufresne C, Saenz-Renaud JA. Antineoplastic agents, 177. Isolation and structure of phyllanthostatin 6. *J Nat Prod*. 1990;53:1406-13.
28. Tariku Y, Hymete A, Hailu A, Rohloff J. Constituents, antileishmanial activity and toxicity profile of volatile oil from berries of *Croton macrostachyus*. *Nat Prod Commun*. 2010;5:975-80.
29. Leda R, Guimarães C, Rodriguez A, Marinho P, Muller A, Guilhon G, et al. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasitol Res*. 2010;107: 1075-81.
30. Campos MC, Salomão K, Castro-Pinto DB, Leon LL, Barbosa HS, Maciel MA, de Castro SL. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2010; 107(5):1193-204.
31. Alonso AJ, Ortiz E, Domínguez F, López G, Chávez M, Ortiz J, García A. Antitumor effect of *Croton lechleri*. Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2012; 27:438-42.
32. Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone R, Suarez AI, Arvelo F, et al. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16beta-17alpha-dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Lett*. 2005;218:109-16.
33. Almeida JR, Souza GR, Silva JC, Saraiva SR, Júnior RG, Quintans Jde S, Barreto Rde S, Bonjardim LR, et al. Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. *ScientificWorld Journal*. 2013; 2013: 808460.
34. Echeverrigaray S, Zacaria J, Beltrao R. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*. 2010;100:199-203.
35. Escobar P, Leal S, Herrera LV, Martínez JR, Stashenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105:184-90.
36. Bueno JG, Martínez J, Stashenko E. Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Salud UIS* 2009; 41:231-35.
37. Leal S, Pino N, Stashenko E, Martínez R, Escobar P. Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper* spp. grown in Colombia. *J Essential Oil Research* 2013; 25(6): 512-519.
38. Soares D, Portella N, Freiman M, Siani A, Saraiva E. *trans-β-Caryophyllene*: An Effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera* spp.). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 761323.