

2021

## **Caracterización fitoquímica preliminar del extracto etanólico de Lippia dulcis T. y su actividad antileishmania in vitro sobre promastigotes de Leishmania V guyanensis**

Emilio Alejandro Bocanegra Dueñas  
*Universidad de La Salle, Bogotá, ebocanegra27@unisalle.edu.co*

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>

---

### **Citación recomendada**

Bocanegra Dueñas, E. A. (2021). Caracterización fitoquímica preliminar del extracto etanólico de Lippia dulcis T. y su actividad antileishmania in vitro sobre promastigotes de Leishmania V guyanensis. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/114>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

**Caracterización Fitoquímica Preliminar del Extracto Etanólico de *Lippia dulcis* T. y su Actividad Antileishmania *in Vitro* Sobre Promastigotes de *Leishmania (V) guyanensis*.**

Emilio Alejandro Bocanegra Dueñas

Programa de Biología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle.

Trabajo de grado para optar por el título de Biólogo.

PhD Yenny Yolanda Lozano Jiménez.

PhD Sara Emilia Giraldo Quintero

22 de julio de 2021

**Notas de autor**

Agradezco a todas aquellas personas que me apoyaron e hicieron esto posible, sin ustedes no lo habría logrado.

Cualquier inquietud respecto a este documento de investigación debe ser remitida al programa de biología de la Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.

E-mail: ebocanegra27@unisalle.edu.co

## Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica, transmitida por la picadura de un insecto flebótomo, presenta tres formas clínicas, siendo la leishmaniasis cutánea (LC) la forma clínica más frecuente. En Colombia el 98,50 % de los casos reportados de leishmaniasis son de LC y, casi el 50 % de los casos son causados por el complejo *Leishmania braziliensis* donde está *L. guyanensis*. Actualmente los tratamientos para LC son costosos, presentan efectos adversos para el paciente, es por esto que surge la necesidad de buscar alternativas terapéuticas que sean seguras, económicas y de fácil acceso a la población. Se han evaluado extractos vegetales de la familia Verbenácea del género *Lippia* que han demostrado tener un efecto antileishmania, siendo *Lippia dulcis* T. una especie no estudiada. Objetivo: Caracterizar fitoquímicamente el extracto etanólico de *Lippia dulcis* T. y su actividad antileishmania *in vitro* sobre promastigotes de *Leishmania (V) guyanensis*. Materiales y métodos: Con el material vegetal de *Lippia dulcis* T. se obtuvo el extracto etanólico para su caracterización fitoquímica preliminar mediante CCD. Se cultivaron los promastigotes de *L. (V) guyanensis* con las 6 concentraciones del extracto etanólico (200 a 6.25 µg/mL) de *L. dulcis* T., por 48 horas; posteriormente se determinó la citotoxicidad con el método MTT. Resultados: Se evidenció la presencia de moderada a abundante de metabolitos de tipo de esteroides y/o terpenoides, antraquinonas y flavonoides. No se evidenció actividad citotóxica por parte de las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T. sobre los promastigotes de *L. (V) guyanensis*.

*Palabras clave:* Leishmaniasis, *Leishmania guyanensis*, *Lippia dulcis*, extracto etanólico.

## **Caracterización Fitoquímica Preliminar del Extracto Etanólico de *Lippia dulcis* T. y su Actividad Antileishmania *in Vitro* Sobre Promastigotes de *Leishmania (V) guyanensis*.**

### **Introducción**

En la familia Trypanosomatidae se encuentra un género de parásitos protozoarios llamado *Leishmania*, con cerca de 20 especies causantes de la enfermedad conocida como leishmaniasis (Kaufer *et al.*, 2017); la cual es catalogada como una enfermedad tropical desatendida, que afecta principalmente a las comunidades más pobres, con escaso acceso a servicios de salud y saneamiento básico (OMS, 2019).

### **Ciclo de Vida**

Los parásitos de *Leishmania* se caracterizan por tener en su ciclo de vida dos hospederos distintos: uno vertebrado, el cual funciona como reservorio y otro invertebrado, el cual cumple la función como vector. El ser humano es considerado el principal reservorio para *Leishmania*, también existen reservorios animales que permiten la endemidad en distintas zonas del mundo (Kaufer *et al.*, 2017).

Los insectos flebótomos se han identificado como el principal vector de *Leishmania*, presentando dos géneros con distinta distribución geográfica, el género *Lutzomyia* para el nuevo mundo y el género *Phlebotomus* para el viejo mundo. Se conocen más de 90 especies de flebótomos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) capaces de transmitir parásitos de *Leishmania* (Kaufer *et al.*, 2017; OMS & OPS, 2019).

Las hembras flebotominas son las encargadas de hospedar y transmitir los parásitos de *Leishmania*, ya que tienen comportamiento hematófago, porque dependen de la ingesta de sangre para la maduración de sus huevos (Oryan & Akbari,

2016). Dentro del insecto se desarrolla una etapa del ciclo de vida del parásito, caracterizada por tener un flagelo y ser altamente móvil, se conoce como metaciclologénesis y dura entre 7 a 14 días (Almeida *et al.*, 2003).

La metaciclologénesis inicia cuando los amastigotes de *Leishmania* ingresan en la hembra flebotomina a través del aparato bucal durante la ingesta de sangre, al llegar a la parte media del intestino del insecto se diferencian hacia una forma móvil denominada promastigotes procíclicos, dividiéndose por primera vez a través de fisión binaria (Sunter & Gull, 2017).

Posteriormente, cambian morfológicamente a promastigotes nectomonados que escapan de la matriz peritrófica y se adhieren a las microvellosidades del intestino medio del insecto evitando ser excretados. Luego, migran hacia la zona anterior del tracto digestivo diferenciándose en promastigotes leptomonados para dividirse nuevamente. Después, pasan a la válvula estomodeal y se adhieren, aquí se encuentran como promastigotes haptomonados (Sunter & Gull, 2017).

En estos últimos estados segregan en mayor cantidad un gel compuesto de lipofosfoglicano que ayuda a bloquear la válvula estomodeal, haciendo que el insecto regurgite antes de ingerir sangre, expulsando así parásitos que se encuentran en el último estado conocido como promastigotes metacíclicos con el cual van a infectar al huésped vertebrado mamífero (Sunter & Gull, 2017). Se ha dado a conocer que promastigotes metacíclicos que siguen permaneciendo dentro del insecto después de haber ingerido sangre, pueden volver al estado de promastigotes leptomonados para multiplicarse y aumentar la capacidad infectiva (Bates, 2018).

En el vertebrado mamífero el ciclo de vida de *Leishmania*, se desarrolla cuando la hembra flebotomina portadora de parásitos introduce sus partes bucales que

causan daño en los vasos sanguíneos superficiales de la dermis, realizando la ingesta a partir de las pequeñas hemorragias que forman un pozo de sangre (Almeida *et al.*, 2003).

Es importante mencionar la participación por parte del insecto al producir sustancias químicas en su saliva con actividad vasodilatadora como maxadilán, adenosina, factores de unión como la interleucina 2, y prostaglandinas, entre otras, que favorecen la infección por parte del parásito (Almeida *et al.*, 2003). Estas acciones desencadenan en el vertebrado una respuesta de defensa en el sitio de la picadura liberándose quimiocinas y citoquinas que reclutan células del sistema inmune innato como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, importantes en la activación del sistema inmune adaptativo (Almeida *et al.*, 2003).

Los promastigotes metacíclicos son inoculados en el pozo de sangre, sin embargo, para llegar a los macrófagos que son su tipo de células hospederas, primero deben atravesar la matriz extracelular de la piel que en su mayoría está compuesta de colágeno I, esta matriz se caracteriza por ser rígida (De Menezes *et al.*, 2016).

*Leishmania* tiene la capacidad de segregar proteasas para ayudar a cambiar conformacionalmente la matriz de la piel y facilitar su movimiento, durante la infección se presenta mayor cantidad de colágeno III haciendo la matriz más suave y aumentando la expresión de fibronectina, necesaria para la captación de los parásitos por parte de los macrófagos, ya que estos reconocen la fibronectina e inhiben la formación de especies de oxígeno reactivo, los cuales son importantes en la eliminación de la infección (De Menezes *et al.*, 2016).

Una vez que el parásito ha ingresado, las células del sistema inmune innato, principalmente macrófagos reconocen al parásito mediante interacciones con

receptores del complemento, receptores de manosa, receptores de fibronectina y receptores Fc gamma (De Menezes *et al.*, 2016). Esta interacción le permite al parásito ser fagocitado en una vacuola parasitófora en cuyo interior cambia a amastigote, realizando división celular hasta que la gran cantidad de amastigotes lisan la vacuola junto con el macrófago quedando libres y así seguir infectando otras células (Sunter & Gull, 2017).

### **Aspectos Epidemiológicos**

Según la OMS (2019) alrededor de 350 millones de personas en el mundo están en riesgo de infectarse y presentar leishmaniasis, esta enfermedad tiene principalmente tres manifestaciones clínicas: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis mucocutánea (LM) y leishmaniasis cutánea (LC), siendo esta última la más frecuente con más del 98% de los casos registrados (INS, 2018).

Como características de estas manifestaciones clínicas la LV causa fiebre en periodos de tiempo irregulares, pérdida de peso, anemia y agrandamiento del hígado y bazo (Organización Mundial de la Salud, 2021); la LM aparece con lesiones en las mucosas principalmente en la nasal y la oral, presentándose úlceras que causan desfiguraciones y en la LC se forma por lo general una pápula en el sitio de la picadura donde se inoculó el parásito, va progresando hasta formar un nódulo y finalmente se forma la úlcera (Abadías-Granado *et al.*, 2021).

La leishmaniasis se encuentra en 5 continentes, considerándose endémica en 88 países (Achtman *et al.*, 2016). Para 2017 más del 95% de los casos nuevos por leishmaniasis aparecieron en seis países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán y República Árabe de Siria. Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 600.000 y 1 millón de casos nuevos de LC, sin contar

casos de extranjeros que se han contagiado por viajar a zonas endémicas y aquellos que no se reportan (Achtman *et al.*, 2016; OMS, 2019).

Los factores de riesgo asociados con la leishmaniasis son la malnutrición, los desplazamientos a zonas con incidencia de casos, malas condiciones de vivienda, cambio climático, el sistema inmunológico débil y la falta de recursos (Manotas-Berdugo *et al.*, 2018; Zambrano *et al.*, 2017).

En Colombia se reportan la presencia de las siguientes especies de *Leishmania*: *L. amazonensis* y *L. mexicana* pertenecientes al complejo *Leishmania mexicana* y causantes de LC; *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* que hacen parte del complejo *Leishmania braziliensis* causantes de LC y LM; *L. infantum chagasi* que pertenece al complejo *Leishmania donovani* causante de LV (Lima *et al.*, 2017; Rodríguez Toro, 1983) y *L. colombiensis*, *L. lainsoni* y *L. equatoriensis*, las cuales no hacen parte de ningún complejo debido a diferencias genéticas (Cupolillo *et al.*, 1998). Esto convierte a Colombia en el país con más especies de *Leishmania* reportadas en el mundo (Ramírez González, 2017).

*L. (V) guyanensis* tiene como hospederos el oso hormiguero, el oso perezoso de dos dedos y la zarigüeya, se distribuye a lo largo de la cuenca amazónica de Sur América, incluyendo a Bolivia, Perú y Brasil (Olivier *et al.*, 2019). En Colombia se distribuye en los departamentos del Amazonas, Caquetá, Meta, Putumayo, Sucre, Tolima y Valle del Cauca (Salgado-Almario *et al.*, 2019).

La leishmaniasis en Colombia llega a afectar a la población que vive hasta los 1750 m.s.n.m, evidenciándose una amplia presencia para la LC de acuerdo con el reporte realizado por el Instituto Nacional de Salud sobre la incidencia de casos por regiones en Colombia, reportando alta incidencia de casos para la región de la



Orinoquía en el municipio de Puerto Carreño, ubicado en el departamento del Vichada y en el municipio de La Uribe, ubicado en el departamento del Meta; para la región Central los municipios con alta incidencia de casos de LC fueron el municipio de El Carmen de Chucurí, ubicado en el departamento de Santander y el municipio de Mistrató limítrofe con Chocó y Antioquia, que se encuentra ubicado en el departamento de Risaralda (INS, 2018).

Para la región Amazónica, se presentó una alta incidencia de casos de LC en el municipio de San José del Guaviare ubicado en el departamento del Guaviare, esta región se encuentra muy relacionada con cultivos ilícitos. La alta incidencia de casos de LC en la región Caribe fue en el municipio de Santa Rosa Sur y en El Carmen de Bolívar, ubicados en el departamento de Bolívar y en la región pacífica se reportó una alta incidencia de casos de LC en el municipio de Tumaco, ubicado en el departamento de Nariño (INS, 2018).

Un seguimiento histórico de la leishmaniasis en Colombia entre el año 2008 y 2018, presentó un reporte de 110.366 casos de los cuales 108.710 casos correspondieron a la forma clínica de LC, representando un 98,50% del total de los casos convirtiéndose en la manifestación clínica con mayor prevalencia en el país, 1404 casos eran de LM correspondiendo al 1.27% y 244 casos fueron de LV siendo un 0.23% (INS, 2018).

Sin embargo, en el primer periodo epidemiológico de 2021 en Colombia, se presentaron únicamente 96 casos de LC, reportando un aumento de casos únicamente en cuatro municipios y evidenciando una tendencia al decremento de casos en departamentos donde se habían reportado anteriormente altos números de casos, esto

posiblemente se asocia a aislamiento social que se ha dado producto de la emergencia sanitaria por el COVID-19 (Gómez Gómez, 2021).

En Colombia, los actores de la violencia armada están totalmente expuestos a la picadura de *Lutzomyia*, así como también los militares que van a combatir a zonas de peligro (Víctor Acero *et al.*, 2015). Es por esto que las personas que padecen LC son estigmatizados socialmente debido a su asociación con el conflicto armado; sumado a esto, existe una situación deficiente de acompañamiento y capacitación por parte de las autoridades de salud al personal de salud que opera en zonas con casos activos de LC, afectando de forma involuntaria a la población que se encuentra en zonas de difícil acceso y que se ven obligadas a desplazarse a centros urbanos para recibir tratamiento, sucediendo a veces una administración tardía del tratamiento, ocasionando que los síntomas se manifiesten severamente en la persona infectada o incluso la muerte (Patiño-Londoño *et al.*, 2017).

Las estrategias que se llevan a cabo en contra de la leishmaniasis en Colombia se basan en el control del vector, detección activa y temprana de los casos y el tratamiento médico de la enfermedad (Ministerio de Salud de Colombia, 2018). Como parte de los lineamientos de atención a la leishmaniasis en Colombia, está el uso de antimoniales pentavalentes (Antimoniato de Meglumina) como tratamiento de primera línea para la LC y LM, seguido de Miltefosina cuando se presenta falla terapéutica; mientras que, para LV el tratamiento de primera línea es anfotericina B, seguido de antimonio pentavalente (Ministerio de Salud de Colombia, 2018).

El uso inadecuado y el incumplimiento de los esquemas de tratamiento de estos fármacos, ha demostrado que conduce a resistencia por parte del parásito (Mahmoudvand *et al.*, 2014). Ocasionando el aumento de la dosis para mantener su

eficacia, exhibiendo diferencias en la sensibilidad de los parásitos (Soto & Soto, 2006). Además, los antimoniales pentavalentes son fármacos tóxicos con efectos adversos frecuentes, tales como arritmia cardíaca y pancreatitis aguda, siendo potencialmente mortales en algunos casos, aumentando el riesgo de muerte en menores de 2 años y mayores de 45 años con síntomas de enfermedad avanzada (Mahmoudvand *et al.*, 2014). También se ha comprobado que otros fármacos como Miltefosina pueden presentar efecto teratogénico, siendo contraindicado en mujeres en estado de embarazo (Oryan & Akbari, 2016).

Se requiere el planteamiento de nuevas investigaciones en alternativas terapéuticas, que resulten más seguras, eficaces y asequibles ya sea como tratamiento o coadyuvantes para el control de la LC, enfocando la investigación en los productos naturales como fuente de metabolitos secundarios que den lugar a extractos vegetales o principios activos con potenciales efectos antiinfecciosos y/o antiparasitarios.

### **Plantas con Actividad Antileishmania**

En Colombia se han evaluado extractos de las especies *Piper cumanense* y *Piper holtonii* con potencial actividad leishmanicida, demostrando un efecto antileishmania por parte de la fracción con hexano de *Piper cumanense* en promastigotes de *L. panamensis*, debido a la presencia principalmente de terpenos y esteroides en el extracto, a estos compuestos ya se les han atribuido actividades antiparasitarias y pueden ser los responsables de los resultados obtenidos en este estudio (Sánchez-Suárez, Albarracín, Rojas, Rincón, Robledo, Muñoz, *et al.*, 2010).

Otro estudio evaluó el extracto metanólico de siete plantas medicinales *Annona cherímola*, *Annona muricata*, *Inga edulis*, *Piper angustifolium*, *Origanum vulgare*, *Eucalyptus globulus* y *Punica granatum*, reportando actividad por parte del

extracto de *Piper aduncum* en contra de amastigotes de *L. peruviana* reduciendo la supervivencia de los amastigotes hasta en un 51.30 %, los demás extractos produjeron un leve efecto o ningún efecto sobre los amastigotes (Rojas *et al.*, 2012).

Mahmoudvand *et al.*, (2014) han evaluado la actividad antileishmania de los extractos etanólicos de *Berberis vulgaris* y *Nigella sativa*, reportando efectos significativos en la reducción de la viabilidad en promastigotes y en amastigotes de *L. trópica* en comparación con el antimonio de meglumina. Nogueira *et al.*, (2013) evaluaron el extracto etanólico de *Physalis angulata*, demostrando tener actividad en contra de promastigotes de *L. amazonensis* y de *L. braziliensis*. Por otro lado, Ghodsian *et al.*, (2020) obtuvieron con el extracto del aceite esencial de *Annona foetida* actividad inhibitoria sobre promastigotes de *L. (V) guyanensis*, este resultado se lo atribuyen a la mezcla de sesquiterpenos que presentó el extracto, aunque los mecanismos de acción son desconocidos.

Dentro de las especies de plantas del género *Lippia* de la familia Verbenácea, se destaca en el estudio realizado por Arévalo *et al.*, (2009), en donde se evaluaron 13 aceites esenciales de diferentes familias de plantas colombianas, resaltando la acción directa antileishmania del aceite esencial de *Lippia alba* sobre promastigotes de *L. braziliensis*. J. Ohashi *et al.*, (2018) evalúan 72 especies de plantas, entre ellas se encuentra *Lippia multiflora* que demostró tener efecto inhibitorio en *Trypanosoma brucei*, este extracto tiene presencia de compuestos como flavonoides y triterpenoides con actividad antiparasitaria.

Por otra parte, Freire de Medeiros *et al.*, (2011) realizaron ensayos evaluando la actividad antileishmania del aceite esencial de *Lippia sidoides*, reportando un efecto inhibitorio en el crecimiento sobre amastigotes y promastigotes de *L. amazonensis*,

evidenciando cambios morfológicos como ruptura de membranas y pérdida del contenido citoplasmático. Neira *et al.*, (2018) evaluaron los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Lippia alba*, también los quimiotipos timol y carvacrol, reportando la mejor actividad por parte del timol en contra de promastigotes y amastigotes de *L. braziliensis*, pero no en *L. panamensis*, sugestivo de una actividad dependiente de la especie de *Leishmania* evaluada. En conjunto, estos resultados evidencian el potencial efecto antileishmania de los extractos de plantas del género *Lippia*.

En la composición química de los aceites del género *Lippia* se encuentran compuestos como limoneno, citral, carvacrol,  $\beta$ -mirceno, camfor, y timol, entre otros más, que, varían de acuerdo con cada especie y a la región que pertenece (Pérez Zamora *et al.*, 2018). En la composición química del aceite esencial de *L. dulcis* T. se han encontrado compuestos como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, 3-metil-2-ciclohexen-2-ona, linalool,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -bourboneno, trans- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, bicyclogermacreno,  $\delta$ -cadineno, espatulenol, óxido de cariofileno y  $\alpha$ -bisabolol (Herrera, 2011). Otros metabolitos reportados dentro del género *Lippia* que pueden ser de interés son los flavonoides, esteroides/terpenoides y alcaloides, los cuales se encuentran presentes en extractos vegetales (Okhale *et al.*, 2016).

*Lippia dulcis* hace parte de la familia Verbenácea, se caracteriza por ser nativa del sur de México a Panamá, fue introducida en Sur América y el Caribe. Por lo general se encuentra en orillas de bosques o riberas de ríos, terrenos abiertos y pastizales hasta 1800 m.s.n.m, pero crece mejor por debajo de los 900 m.s.n.m (Dieseldorff, 2009). Es una planta herbácea aromática, con tricomas en los tallos, tiene hojas lanceoladas, de ápice agudo y margen crenado con tricomas en el haz y de

envés puberulento, presenta inflorescencia de aproximadamente 0.4 cm a 0.9 cm de largo y 0.4 cm a 0.6 cm de ancho (Dieseldorff, 2009).

La especie *L. dulcis* T., ha sido poco estudiada en el país, sin embargo, estudios etnofarmacológicos han descrito su uso tradicional con fines antiinfecciosos como el de Giraldo Quintero *et al.*, (2015), en este estudio se describió el uso tradicional de 13 plantas medicinales en plazas de mercado de Bogotá D.C., destacándose el uso de partes aéreas de *Lippia dulcis* (*Phyla dulcis* T.) por su actividad antiinfecciosa, usada “para la gripa” (24.3%) y “para el sarpullido” (10.8%).

Recientemente, estudios fitoquímicos preliminares del extracto etanólico de *L. dulcis* T., evidenciaron la presencia de metabolitos tipo esteroide y/o terpenoide, así como cumarinas y flavonoides en el extracto (Navarrete Barragán *et al.*, 2020), cuyas propiedades son sugestivas de actividad antileishmania y que aún no han sido evaluadas.

Debido a la actividad antileishmania que el género *Lippia* ha demostrado tener y a la facilidad de cultivar promastigotes bajo condiciones de laboratorio, esta investigación tiene como objetivo “Caracterizar fitoquímicamente el extracto etanólico de *Lippia dulcis* T. y su actividad antileishmania *in vitro* sobre promastigotes de *Leishmania* (V) *guyanensis*”, actividad que aún no ha sido evaluada.

## **Materiales y Métodos**

Este estudio se desarrolló en los laboratorios de la Universidad de La Salle, Bogotá D.C., sede Candelaria.

### **Material Vegetal y Obtención del Extracto Etanólico de *Lippia dulcis* T.**

Aproximadamente, dos kilogramos de material vegetal fresco se compraron en la plaza de mercado de Paloquemao en Bogotá, proveniente del

departamento de Cundinamarca, como se realizó en estudios previos (Navarrete Barragán *et al.*, 2020). Se adquirieron en el mes de enero de 2020. Dos ejemplares fueron seleccionados para su identificación taxonómica en el herbario forestal de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

A partir del material vegetal fresco se seleccionaron 1422 gramos de las partes aéreas de las plantas (tallos, hojas y flores sanos) de acuerdo con estudios etnobotánicos previos (Giraldo *et al.*, 2013), esto se llevó a secado en estufa de aire circulante a 40 °C durante 5 días. Se obtuvo 254.67 de material vegetal seco, al cual se le realizó el procedimiento de extracción sólido-líquido mediante maceración a temperatura ambiente, empleando como solvente etanol grado industrial al 96%, en proporción 1:3 (material vegetal seco: solvente). Se realizaron en total 4 extracciones.

Por último, el extracto líquido se filtró y concentró mediante el uso de rota evaporador a vacío (IKA RV 10 digital), a una temperatura de 50 °C, con presión de 200 milibares y 80 rpm. El extracto seco se almacenó bajo refrigeración protegida de la luz y la humedad.

Se calculó el porcentaje de humedad usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{humedad} = ((mh - ms) / mh) * 100$$

Donde:

mh: Peso muestra vegetal fresca

ms: Peso muestra vegetal seca

Se calculó el porcentaje de rendimiento usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Rendimiento} = (Per / Pms) * 100$$

Donde:

Per: Peso extracto etanólico recuperado

Pms: Peso muestra vegetal seco

### **Caracterización Fitoquímica Preliminar al Extracto Etanólico de *Lippia dulcis* T.**

Para la caracterización fitoquímica preliminar se realizó una cromatografía en capa delgada (CCD) empleando placas de sílica gel (F<sub>254</sub>, 0,25 mm) y patrones de referencia, contemplando las pruebas de coloración para la detección de diferentes grupos de metabolitos, según reportes previos (CYTED, 2000; Navarrete Barragán *et al.*, 2020): Esteroides y/o triterpenoides, flavonoides, alcaloides, antraquinonas y/o cumarinas como se muestra en la Tabla 1.

Se pesaron aproximadamente 10 mg de extracto disuelto en 1 mL de solvente (cloroformo) y alrededor de 1 a 3 mg de patrón en 1 a 1,5 mL de cloroformo o mezclas cloroformo/metanol.

Una vez eluidas las placas se revelaron mediante luz visible (VIS) o UV (254 o 365 nm), según corresponda y reveladores químicos universales o específicos (Sanabria, 1983). Los resultados se valoraron de manera semicuantitativa, de acuerdo con la apreciación subjetiva de la intensidad del color como lo propone Sanabria (1983):

(+++): Coloración intensa o presencia abundante del metabolito

(++): Coloración claramente observable o presencia moderada del metabolito

(+): Coloración débil o presencia escasa del metabolito

(-): No se observa coloración o ausencia del metabolito secundario (o no se detecta).



**Tabla 1.***Procedimiento Para Cromatografía en Capa Delgada*

Metabolitos	Patrón	Fase móvil	Revelador químico	Detección
Esteroides y/o Triterpenos	$\beta$ -citosterol	Hexano: acetato de etilo (60:40)	vainillina al 1% (p/v) en etanol, ácido perclórico al 3% (v/v) y ácido sulfúrico al 10% (v/v) en etanol.	Se observó a 254 nm sin revelar y a luz visible después de asperjar y calentar a 110 °C. Para indicar presencia de terpenoides se tienen que detectar manchas azules, violetas rojas, para polifenoles manchas amarillas y para iridoides manchas cafés.
Flavonoides	Quercetina	cloroformo: metanol (95/5)	NP y PEG 4000	Se observó luego de revelar a 365 nm y al visible sin calentar. Para indicar presencia se tienen que detectar manchas de fluorescencia amarillas, naranjas, rojas, azules o verdes.
Alcaloides	Quinidina	cloroformo: metanol (97.5/2.5)	Dragendorff modificado	Se observó luego de revelar al visible sin calentar. Para indicar presencia se tienen que detectar manchas de color naranja.
Antraquinonas y/o Cumarinas	7-Hidroxicumarina	Hexano: AcOEt (70:30) Cloroformo: Metanol (95:5)	Bornträger	Se observó luego de revelar a 365 nm y al visible sin calentar y luego calentando a 110 °C. Para indicar presencia de antraquinonas se tienen que detectar manchas fluorescentes rojas, para antronas manchas amarillas y para cumarinas manchas azules.

*Notas: La metodología fue adaptada de Navarrete Barragán et al., (2020).*

### **Mantenimiento del Cultivo de Promastigotes de *L. (V) guyanensis***

Agradecimientos a la Dra. Sara María Robledo Restrepo del PECET, Universidad de Antioquia, por suministrar la cepa de *L. (V) guyanensis* (MHOM/CO/84/CL-007). Una vez se descongelaron los promastigotes de *L. (V) guyanensis* se mantuvieron por dos días en medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB)(Mahmoudvand et al., 2014; Sánchez-Suárez, Albarracín, Rojas, Rincón, Robledo, Muñoz, et al., 2010). Además, se cultivaron con penicilina y estreptomycinina al 1%, incubándose a 27 °C y en condiciones de humedad y gasificación ambiente (Arévalo, Robledo, Muñoz, Granados-Falla, *et al.*, 2009).

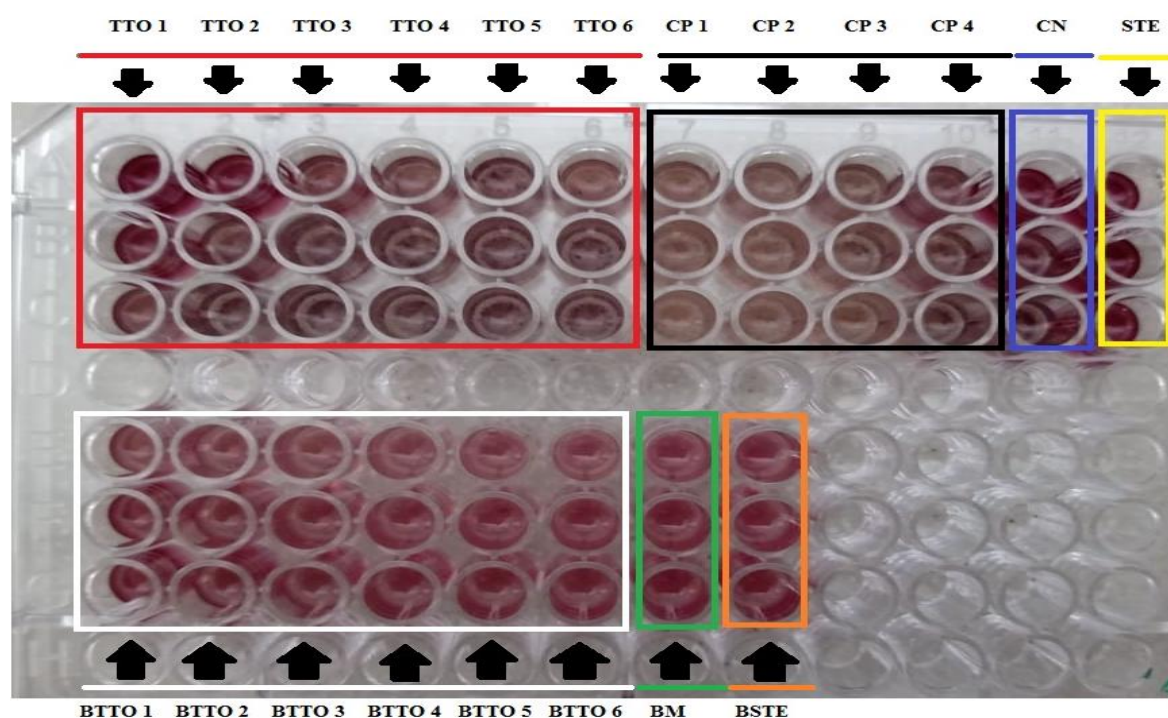
### **Determinación de la Citotoxicidad *in Vitro* del Extracto Etanólico de *Lippia dulcis* T. Sobre Promastigotes de *Leishmania (V) guyanensis***

Para determinar la citotoxicidad del extracto etanólico de *Lippia dulcis* T. sobre los promastigotes de *L. (V) guyanensis*, se usaron placas de 96 pozos para cultivo celular (Figura 1), en donde se dispensaron  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. (V) guyanensis* por pozo, mantenidos en medio RPMI + 10% SFB e incubándose a 27 °C (Puentes *et al.*, 2000).

Se dispensaron en los pozos indicados con TTO (Figura 1) 5  $\mu$ l de cada una de las seis concentraciones (200.00  $\mu$ g/ml, 100.00  $\mu$ g/ml, 50.00  $\mu$ g/ml, 25.00  $\mu$ g/ml, 12.5  $\mu$ g/ml y 6.25  $\mu$ g/ml) del extracto etanólico de *L. dulcis* T. a evaluar sobre los promastigotes de *L. (V) guyanensis* (Marín et al., 2018). Todas las concentraciones del extracto se prepararon en DMSO (0.2 %) que no es tóxico para el protozoo (Freire de Medeiros et al., 2011; Marín et al., 2018). Por otra parte, se sembraron en CN (Figura 1) promastigotes de *L. (V) guyanensis* en ausencia de las concentraciones del extracto etanólico como control negativo.

Figura 1.

*Esquema de Siembra en Placa de 96 pozos, Foto Tomada por Autor.*



Notas: <sup>a</sup> TTO: Tratamiento. <sup>b</sup> CP: Control positivo (anfotericina B). <sup>c</sup> CN: Control negativo. <sup>d</sup> STE: Control solvente. <sup>e</sup> BTTO: Blanco de tratamiento. <sup>f</sup> BM: Blanco medio. <sup>g</sup> BSTE: Blanco solvente.

Como control positivo, promastigotes de *L. (V) guyanensis* se dispensaron en los pozos CP (Figura 1) con 5  $\mu$ l de cada una de las concentraciones (0.125  $\mu$ g/ml, 0.25  $\mu$ g/ml, 0.5  $\mu$ g/ml, 1.00  $\mu$ g/ml, 1.25  $\mu$ g/ml, 2.5  $\mu$ g/ml, 5.00  $\mu$ g/ml y 10.00  $\mu$ g/ml) de anfotericina B preparadas en medio RPMI 1640, (Marín et al., 2018). Además, se sembraron en STE (Figura 1) promastigotes con DMSO (0.2%), como control para el solvente. También, se usó en BTTO (Figura 1) el extracto en las mismas concentraciones y condiciones, pero no expuesto a los promastigotes, como blanco de tratamiento. Por último, para el blanco del medio de cultivo, se dispuso en BM (Figura 1) solamente medio de cultivo y para el blanco del solvente, se dispuso en

BSTE (Figura 1) únicamente medio de cultivo con DMSO (0.2%) (Marín et al., 2018).

48 horas después de haber incubado los promastigotes con los tratamientos (Sarkar *et al.*, 2008), para determinar la citotoxicidad se agregaron 5 µl/pozo de la solución stock de MTT (3-4-5 dimetiltiazol-2-il -2-5-difeniltetrazolio bromuro) que previamente se prepararon a una concentración de 10 mg/ml en solución salina, luego se incubaron a 27 °C por 3 horas (C. W. Cardona *et al.*, 2013). Pasadas las 3 horas se detuvo la reacción enzimática y se solubilizaron los cristales de formazán con la adición de 100 µl de DMSO (99.9 %) y se incubaron durante 30 minutos, por último se determinó la cantidad de formazán producido para cada muestra midiendo la densidad óptica mediante el uso del Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer a 570 nm (Tanaka *et al.*, 2007; Teles *et al.*, 2011).

Según la curva de crecimiento para promastigotes de *L. (V) guyanensis* establecida por Mendes *et al.*, (2019), se evaluaron las concentraciones del extracto etanólico de *L. dulcis* T. durante la fase exponencial que empieza después del segundo día de cultivo.

Se hicieron tres ensayos de manera independiente. Cada tratamiento (extracto en diferentes concentraciones), incluyendo los controles y los blancos se evaluaron por triplicado en cada ensayo, n=9 (Marín et al., 2018).

Se realizó registro fotográfico a los promastigotes de *L. (V) guyanensis* expuestos después de las 48 horas a cada concentración del extracto etanólico de *L. dulcis* T. y también a los que no estaban expuestos a las concentraciones del extracto. Se hicieron los montajes en 100x usando el microscopio invertido (Primo Vert, ZEISS) y se tomaron las fotos usando la cámara para microscopio AxioCam ERc 5s.

## Análisis de Datos.

Con las absorbancias obtenidas se calcularon los (Marín et al., 2018) porcentajes de supervivencia de la siguiente manera:

$$\%S = ((CE - BT)/(CC - BM)) * 100$$

Donde:

CE: Es la absorbancia de las células expuestas.

BT: Es la absorbancia del blanco del tratamiento

CC: Es la absorbancia de las células control, que corresponde al 100% de supervivencia.

BM: Es la absorbancia del blanco del medio de cultivo.

Luego, se calcularon los (Marín et al., 2018) porcentajes de mortalidad de la siguiente manera:

$$\%M = 100 - \%S$$

Se puede realizar una curva de dosis-respuesta, a través de un modelo de regresión no lineal para determinar si hay citotoxicidad por parte de las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T. sobre los promastigotes de *L. (V) guyanensis*.

En la representación gráfica de la relación dosis-respuesta se genera una curva parabólica que genera problemas en la construcción de un modelo lineal, sin embargo, se puede solucionar usando la distribución logística, que es una distribución de probabilidad continua cuya función de distribución es la función sigmoidea o logística, debido a la naturaleza no lineal se requiere el análisis de máxima verosimilitud que respalda la correlación no lineal; este modelo permite determinar si existe una correlación entre la dosis y la respuesta, con una variable de entrada

(independiente) de tipo continúa y una variable de respuesta (dependiente) de tipo discreta (Goyena, 2019; Llinás, 2006; Salcedo Poma, 2007).

Empleando el software estadístico R studio (Versión 1.2.5001) se realizó el modelo de dosis-respuesta, a través de una regresión logística para hallar la  $CL_{50}$  y así determinar si existe una correlación entre las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T. (variable independiente de tipo cuantitativo-continua) y los porcentajes de mortalidad de promastigotes de *L. (V) guyanensis* (variable dependiente de tipo cuantitativa-discreta); se manejó un nivel de significancia para  $\alpha = 0.01$ , y se planteó como hipótesis nula ( $H_0$ ): no existe correlación entre la mortalidad de los promastigotes de *L. (V) guyanensis* y las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T., y para la hipótesis alternativa ( $H_1$ ): existe correlación entre la mortalidad de los promastigotes de *L. (V) guyanensis* y las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T. Con  $p < \alpha$  se rechaza la hipótesis nula. También, se halló la  $CL_{50}$  para la anfotericina B (Fernández, 2019; Kniss AR, 2021; Llinás, 2006; Ritz *et al.*, 2015).

## **Resultados**

### **Material Vegetal y Obtención del Extracto Etanólico de *Lippia dulcis* T.**

En el herbario forestal de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, con la colaboración del Dr. Diego A. Zapata se hizo la plena identificación de la muestra botánica, se afirmó que las muestras corresponden a la especie *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke (Familia Verbenácea). El nombre *Lippia dulcis* Trevir., actualmente corresponde a un sinónimo de *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke.

Se calculó el porcentaje de humedad arrojando un 82.09% de humedad.

El extracto obtenido tuvo un peso total de 27,46 gramos, resultando un rendimiento de extracción del 10,78% con respecto al material vegetal seco.

### Caracterización Fitoquímica Preliminar del Extracto Etanólico de *Lippia dulcis* T.

El estudio preliminar fitoquímico del extracto etanólico de *Lippia dulcis* realizado mediante cromatografía en capa delgada (CCD) permitió detectar de forma semicuantitativa los diferentes grupos de metabolitos según su abundancia en el extracto. Entre estos se evaluaron esteroides y/o triterpenos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas y cumarinas principalmente.

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante la cromatografía en capa delgada (Tabla 2), se pudo evidenciar la presencia de metabolitos de tipo esteroides y/o triterpenos, se le valoró con (+++) lo cual indica una presencia abundante de este grupo de metabolitos.

**Tabla 2.**

*Resultados de la CCD Para los Metabolitos de Interés Valorados de Manera Semicuantitativa del Extracto Etanólico de L. dulcis T.*

Metabolito	Presencia	Coloración de las manchas observadas
Esteroides y/o Triterpenos	+++	Manchas oscuras (UV 254 nm). Violetas, verdes, cafés (VIS)
Flavonoides	++	Regiones amarillas (VIS). Rojas, amarillas y azul (UV 365 nm)
Alcaloides	-	No se observó
Antraquinonas y/o Cumarinas	++	Rojas y azul (UV 365 nm)

*Notas: En esta tabla se observan los resultados de acuerdo con la apreciación subjetiva de la intensidad del color. (+++) Abundante. (++) Moderada. (+) Escasa. (-) Ausencia.*

También, se encontró la presencia de metabolitos de tipo flavonoides, valorándolo con (++) indicando una presencia moderada (Tabla 2). Se reporta presencia de los metabolitos de tipo antraquinonas (++) y cumarinas (+), valorándose en (++) lo que significa una presencia moderada de estos metabolitos (Tabla 2). En cambio, para alcaloides se le asignó una valoración de (-), indicando que hay ausencia

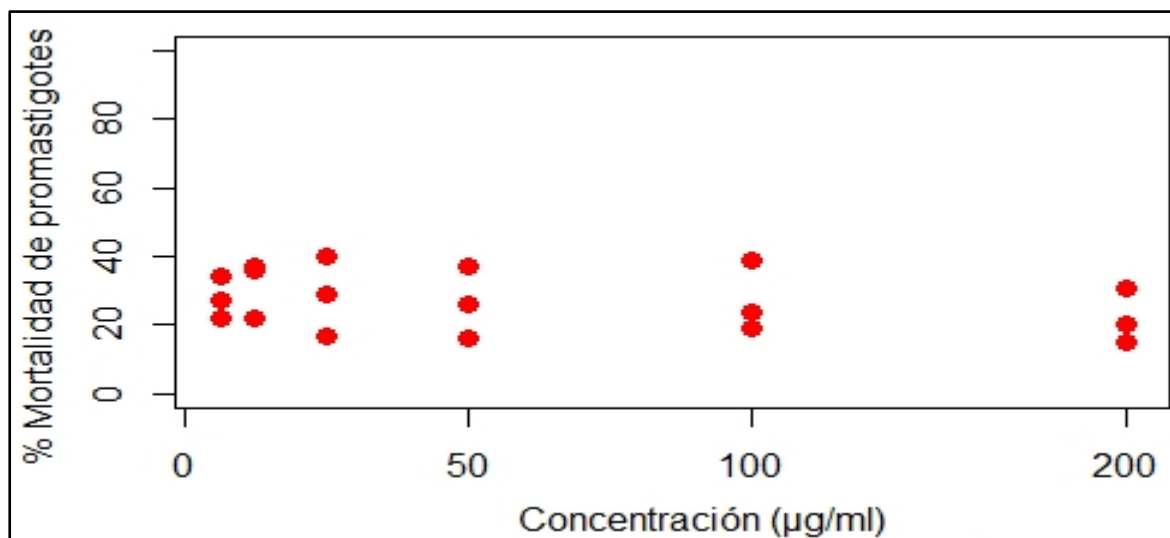
de estos grupos de metabolitos en el extracto o no se detectaron por cromatografía en capa delgada (Tabla 2).

**Determinación de la Citotoxicidad *in Vitro* del Extracto Etanólico de *Lippia dulcis* T. Sobre Promastigotes de *Leishmania* (V) *guyanensis*.**

Los porcentajes de mortalidad de los promastigotes de *L. (V) guyanensis* obtenidos para las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T. se presentan en la Figura 2 se pueden observar los resultados de los tres ensayos realizados.

**Figura 2.**

**Diagrama de Dispersión Entre los Porcentajes de Mortalidad de los Promastigotes de *L. (V) guyanensis* y las Concentraciones del Extracto Etanólico de *L. dulcis* T.**



Notas: Las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T. fueron: 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml y 6.25 µg/ml.

De acuerdo con la Figura 2, la concentración de 200 µg/ml presentó porcentajes de mortalidad del 31 %, 20% y 15%, valores similares a los obtenidos para la concentración de 100 µg/ml, en donde se evidenciaron porcentajes de



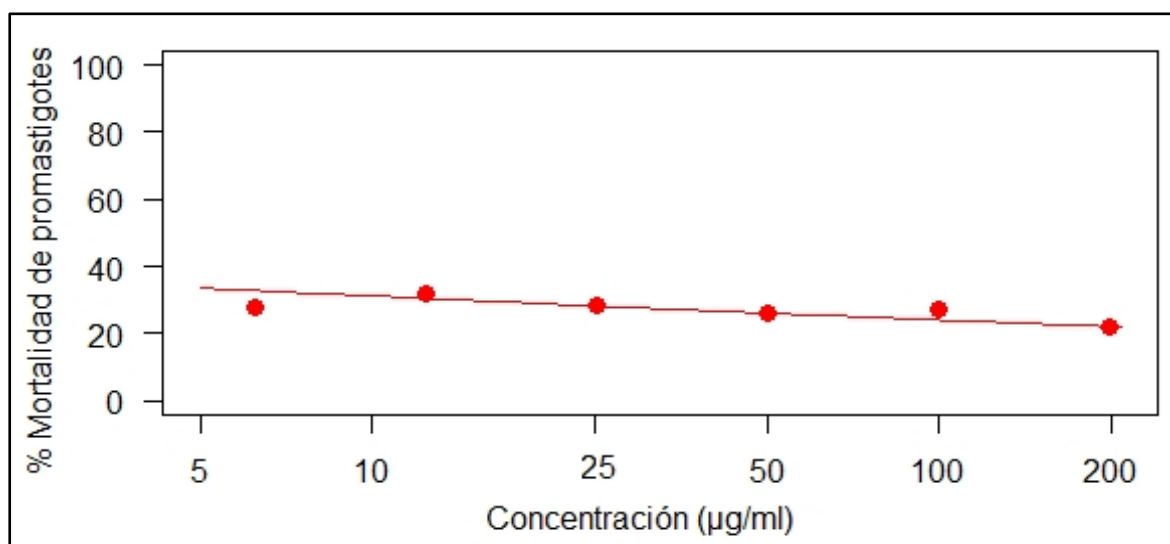
mortalidad del 39%, 24% y 19%. Para la concentración de 6.25  $\mu\text{g/ml}$  del extracto etanólico de *L. dulcis* T. se obtuvieron porcentajes de mortalidad del 34%, 27% y 22% (Figura 2). En la concentración de 12.5  $\mu\text{g/ml}$  los porcentajes de mortalidad fueron 36%, 22% y 27%. Se observó que los porcentajes de mortalidad de los promastigotes de *L. (V) guyanensis* no se mostraron diferentes con el aumento de la concentración (Figura 2).

El solvente empleado (DMSO 0.2%) a la concentración indicada, no presentó efecto citotóxico sobre los promastigotes de *L. (V) guyanensis*.

En la Figura 3, se pueden apreciar los bajos porcentajes de mortalidad de promastigotes de *L. (V) guyanensis* obtenidos para cada concentración evaluada del extracto etanólico de *L. dulcis* T.

**Figura 3.**

***Curva Dosis-Respuesta Entre los Porcentajes de Mortalidad de los Promastigotes de L. (V) guyanensis y las Concentraciones del Extracto Etanólico de L. dulcis T.***



Notas: El intercepto de la pendiente estimada es 0.156 con un  $*p < 0.01$ . La  $CL_{50}$  fue 0.064  $\mu\text{g/ml}$  con un valor de  $p = 0.238$ .

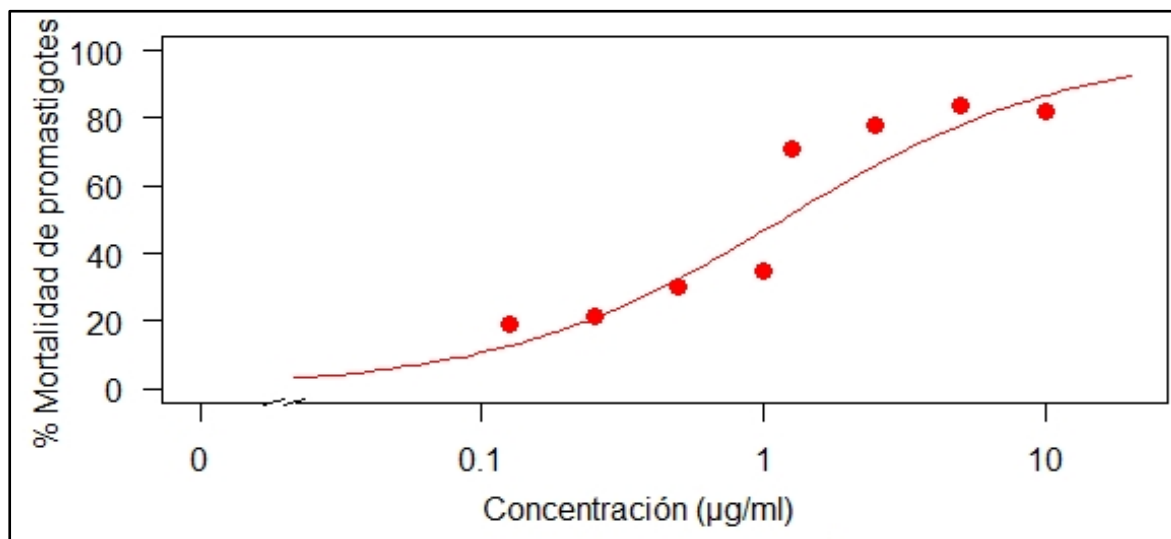
Se obtuvo un valor de  $p$  igual a 0.238 para la CL<sub>50</sub> del extracto etanólico de *L. dulcis* T. (Figura 3), no fue menor a 0.01 indicando que no es estadísticamente significativa esta concentración.

Ya que el valor de  $p$  fue mayor que  $\alpha$ , en términos de la hipótesis planteada no se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ), es decir que, no existe correlación entre la mortalidad de los promastigotes de *L. (V) guyanensis* y las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T.

En la Figura 4, se observó como aumentan los porcentajes de mortalidad a medida que la concentración de la anfotericina B aumenta, mostrando una correlación positiva, como se esperaba por parte del control positivo.

#### Figura 4.

*Curva Dosis-Respuesta Entre los Porcentajes de Mortalidad de los Promastigotes de L. (V) guyanensis y las Concentraciones de Anfotericina B.*

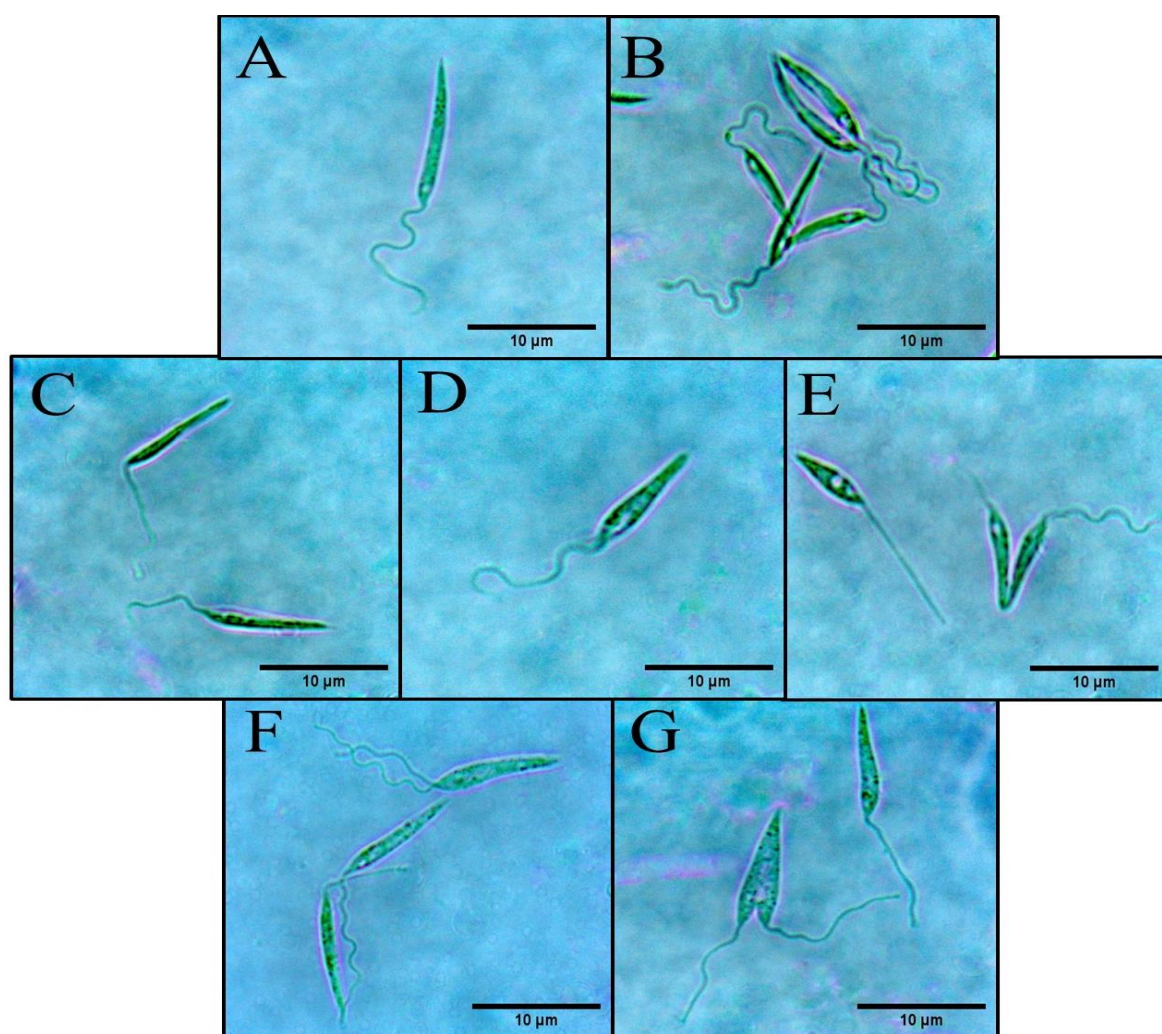


Notas: El intercepto de la pendiente estimada es -0.86792 con un  $*p < 0.01$ . La CL<sub>50</sub> estimada es 1.16 µg/ml con un  $*p < 0.01$ .

Se determinó que la  $CL_{50}$  para la anfotericina B es 1.16  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 4), con un valor de  $p$  menor que 0.01 siendo estadísticamente significativa. Este resultado demuestra que a esta concentración se causa la muerte al cincuenta por ciento de los promastigotes de *L. (V) guyanensis*.

**Figura 5.**

*Promastigotes de L. (V) guyanensis Después de las 48 Horas de Expuestos a Cada Concentración del Extracto Etanólico de L. dulcis T.*



*Notas: A continuación, se indica el control negativo y la concentración de cada fotografía. A. control sin tratamiento. B. 6.25  $\mu\text{g/ml}$ , C. 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , D. 25  $\mu\text{g/ml}$ , E. 50  $\mu\text{g/ml}$ , F. 100  $\mu\text{g/ml}$  y G. 200  $\mu\text{g/ml}$ .*

Los promastigotes de *L. (V) guyanensis* que fueron cultivados en ausencia del extracto etanólico (Figura 5.A) se usaron como referencia con respecto a los promastigotes que se sometieron a las distintas concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T.

Según lo observado en la Figura 5, no se notaron cambios o alteraciones en los promastigotes de *L. (V) guyanensis* cultivados con las concentraciones del extracto etanólico de *L. dulcis* T. La mayoría presentaron formas metacíclicas y algunos continuaban en formas procíclicas. Algo interesante es el proceso de división que se observa en la Figura 5.F (100 µg/ml) donde hay un promastigote que se ve más ancho que los demás y presenta dos flagelos, y en la Figura 5.G (200 µg/ml) donde se aprecian dos promastigotes separándose.

Los resultados obtenidos en la Figura 5 concuerdan con lo que determinó el modelo de regresión logística (Figura 3), indicando que posiblemente no existe citotoxicidad por parte del extracto etanólico de *Lippia dulcis* T. sobre los promastigotes de *Leishmania (V) guyanensis*.

## Discusión

En los resultados obtenidos por la CCD realizada al extracto etanólico de *L. dulcis* T. se evidenció la presencia abundante de los metabolitos de tipo esteroides y triterpenos, esto concuerda según lo encontrado por Navarrete Barragán *et al.*, (2020) quienes reportaron en su estudio fitoquímico preliminar realizado al extracto etanólico de partes aéreas de *L. dulcis* T., la presencia abundante de este tipo de metabolitos detectados por CCD.

En la composición fitoquímica de *Lippia dulcis* T. se reporta la presencia de un alto porcentaje de metabolitos de tipo terpenoides (Ono *et al.*, 2006). Souto-

Bachiller *et al.*, (1997) reportaron altas concentraciones de terpenoides y esteroides en hojas y flores de *L. dulcis* T., asociándose a la presencia de tricomas en el haz de las hojas y a la epidermis glandular presente en pétalos. Compadre *et al.*, (1986) mediante cromatografía de gases, describieron la presencia de metabolitos de tipo triterpenos en extractos de partes aéreas de la planta de *L. dulcis* T., como la glicirricina que tiene propiedades edulcorantes, antiinflamatorias y expectorante. Por otra parte, Ono *et al.*, (2006) reportaron el aislamiento del metabolito ácido betulínico de tipo triterpeno, aislado de las partes aéreas de *L. dulcis* T. y analizado mediante análisis de cristalografía de rayos x.

En el estudio de Navarrete Barragán *et al.*, (2020) reportaron la presencia moderada de los metabolitos de tipo cumarina y antraquinonas mediante CCD, esto confirma los resultados obtenidos en este estudio, sin embargo, se recomienda hacer la reacción de Bornträger-Kraus como prueba adicional para tener una completa confirmación de la presencia de estos metabolitos.

Se obtuvo la presencia moderada de metabolitos de tipo flavonoide al igual que Navarrete Barragán *et al.*, (2020), sin embargo, lo reportaron con presencia escasa en su extracto, recomendando realizar pruebas de CCD con extractos de mayor polaridad. Los flavonoides aparecen con relativa frecuencia en especies de este género y poseen la capacidad de modular las actividades enzimáticas afectando el comportamiento de muchos sistemas celulares (Roy *et al.*, 2002).

Según Ono *et al.*, (2006) se pueden encontrar altas concentraciones de compuestos de tipo flavonoides en extractos etanólicos de hojas de *L. dulcis* T., como la sakuranetina que actúa como una fitoalexina, estos metabolitos pueden conferir protección a los rayos UV y defensa contra herbivorismo (Mahmood, 2019).

Por otra parte, no se evidenció presencia de metabolitos de tipo alcaloides, se hace como sugerencia realizar de forma completa el análisis de alcaloides como lo plantea Sanabria, (1983). Compadre *et al.*, (1986) confirman este resultado, ya que reportan la ausencia de alcaloides y saponinas en su estudio fitoquímico realizado a *L. dulcis* T. donde, además reportaron la presencia de la hernandulcina que es un compuesto sesquiterpeno identificado como el constituyente dulce de la planta. Sin embargo, Cáceres *et al.*, (1993) menciona la presencia de alcaloides en las hojas de *L. dulcis* T.

La presencia de los metabolitos secundarios y las concentraciones de estos pueden variar debido a las condiciones que enfrentan las planta durante el crecimiento, que puede ser condiciones bióticas, como herbivoría, interacción con otras plantas, hongos fitopatógenos etc. y abióticas como fotoperíodos, composición de suelo, pH, etc. (Navarrete Barragán *et al.*, 2020; Okhale *et al.*, 2016; Pérez Zamora *et al.*, 2018; Souto-Bachiller *et al.*, 1997).

Además, cada parte de la planta presenta metabolitos secundarios específicos en distintas concentraciones, debido a la especialización con base en su función (Arévalo, Robledo, Muñoz, Granados-falla, *et al.*, 2009; Mahmoudvand *et al.*, 2014).

Las concentraciones evaluadas del extracto etanólico de *L. dulcis* T. sobre los promastigotes de *L. (V) guyanensis* no presentaron actividad antileishmania. Es posible que, al haberse realizado el extracto a partir de flores, hojas y tallos, estén presentes metabolitos secundarios en diferentes concentraciones. En donde, algunos pueden generar un efecto y considerarse agonistas, y otros metabolitos secundarios no generar ningún efecto considerándose antagonistas, estos últimos competirían por los receptores e impedirían la unión de aquellos que puedan tener efecto en contra de los

promastigotes de *L. (V) guyanensis*. También, el número de uniones agonista-receptor influye en la respuesta, pudiendo obtener un menor efecto (Arévalo *et al.*, 2009; Mahmoudvand *et al.*, 2014; Marin *et al.*, 2018; Sánchez-Suárez *et al.*, 2010).

Es cierto que puede haber presencia de ciertos tipos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de partes aéreas de *L. dulcis* T. que han demostrado inhibir la actividad de la topoisomerasa I eucariota (Roy *et al.*, 2002), y ser antimalárico, causando la pérdida de movimiento en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Abe *et al.*, 2002). Pero, en algunos casos debido a la expresión de distintas moléculas presentes en la superficie de la membrana de estos patógenos, cómo en el caso de *Trypanosoma cruzi* que existen glicoproteínas ancladas con glicosilfosfatidilinositol y en *Leishmania* que en su mayoría son lipofosfoglicanos, pueden evitar que funcionen los metabolitos secundarios de las plantas (McConville *et al.*, 2002) presentes en el extracto, demostrando no tener actividad antileishmania como resultó en este estudio.

## Conclusiones

La caracterización fitoquímica preliminar del extracto etanólico de las partes aérea de *Lippia dulcis* T., permitió la detección semicuantitativa de metabolitos de tipo esteroides y/o triterpenos y flavonoides, antraquinonas y cumarinas en presencia moderada.

Aunque el extracto etanólico demostró tener presencia de metabolitos secundarios que según la literatura tienen efecto citotóxico, en este estudio se determinó que para promastigotes de la especie *L. (V) guyanensis* no hubo actividad citotóxica relevante por parte del extracto a las concentraciones evaluadas.

## Perspectivas y Recomendaciones

Es importante tener en cuenta la procedencia del material vegetal, que haya crecido en condiciones adecuadas y, se recomienda realizar ensayos con extractos etanólicos hechos de partes específicas de *Lippia dulcis* T. sobre promastigotes de *L. (V) guyanensis*.

También, para investigaciones futuras se pueden evaluar a través de ensayos bioguiados fracciones del extracto etanólico de *L. dulcis* T. sobre promastigotes y amastigotes de *Leishmania* con interés clínico.

Se debe tener en cuenta el mecanismo de acción sobre formas libres e internalizadas del parásito, ya que diferentes tratamientos actuales logran su efectividad en el control de amastigotes de *Leishmania* a través del metabolismo del macrófago como las sales antimoniales pentavalentes; sin embargo, otros tratamientos causan un efecto tóxico directo sobre promastigotes y amastigotes del parásito, como la pentamidina cuyo mecanismo de acción se ha identificado que causa cambios en los mini círculos de ADN del kinetoplasto de *Leishmania* (Arévalo, Robledo, Muñoz, Granados-falla, *et al.*, 2009). Con base en lo anterior sería interesante comprobar la actividad del extracto de *Lippia dulcis* T. en macrófagos y amastigotes con el fin de evidenciar si hubiese algún tipo de citotoxicidad en ellos.



### Referencias

- Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, *112*(7), 601–618. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>
- Abe, F., Yamauchi, T., Nagao, T., Kinjo, J., Okabe, H., Higo, H., & Akahane, H. (2002). Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *25*(11), 1485–1487. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1485>
- Achtman, J. C., Ellis, D. L., Saylor, B., & Boh, E. E. (2016). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* in 2 travelers. *JAAD Case Reports*, *2*(2), 95–97. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2015.11.018>
- Almeida, M. de, Vilhena, V., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2003). Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *98*(7), 861–870. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700001>
- Arévalo, Y., Robledo, S., Muñoz, D. L., Granados-falla, D., Cuca, E., & Delgado, G. (2009). Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacéuticas*, *38*(2), 131–141.
- Bates, P. A. (2018). Revising *Leishmania*'s life cycle. In *Nature Microbiology* (Vol. 3, Issue 5, pp. 529–530). <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>
- Cáceres, A., Fletes, L., Aguilar, L., Ramirez, O., Figueroa, L., Taracena, A. M., & Samayoa, B. (1993). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *Journal of*

*Ethnopharmacology*, 38(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90076-H](https://doi.org/10.1016/0378-8741(93)90076-H)

Cardona, C. W., Robledo, S. M., Rojano, B. A., Alzate, F., Muñoz, D. L., & Saez, C. J.

(2013). Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii*

Trel. (Piperaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 268–277.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000200010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200010)

Cardona, J., & Muñoz, J. (2016). Phytochemical variability between Colombian accessions of

*Lippia alba* ( Mill .) N . E . Brown. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 7(2),

39–49.

Compadre, C. M., Robbins, E. F., & Kinghorn, A. D. (1986). The intensely sweet herb,

*Lippia dulcis* Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents. *Journal of*

*Ethnopharmacology*, 15(1), 89–106. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90105-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90105-4)

Cupolillo, E., Momen, H., & Grimaldi, G. (1998). Genetic diversity in natural populations of

new world *Leishmania*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 663–668.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000500018>

CYTED. (2000). I curso taller iberoamericano sobre técnicas de separación e identificación

de productos naturales polares organizado por las redes X.A. “*Red Iberoamericana de*

*Productos Naturales de Uso Medicinal*”.

De Menezes, J. P., Saraiva, E. M., & Da Rocha-Azevedo, B. (2016). The site of the bite:

*Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the

dermis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 9, Issue 1, p. 264). BioMed Central.

<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3>

Dieseldorff, N. G. (2009). *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke: Descripción de características

anatómicas diagnósticas de la droga cruda [Universidad de San Carlos de Guatemala].

[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2972.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2972.pdf)

Fernández, Á. A. (2019). *CL50*. <https://rpubs.com/aafernandez1976/cl50>

Freire de Medeiros, M. das G., da Silva, A. C., Lopes Citó, A. M. das G., Borges, A. R., de Lima, S. G., Dantas Lopes, J. A., & Bressan Queiroz Figueiredo, R. C. (2011). In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitology International*, *60*(3), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.03.004>

Ghodsian, S., Taghipour, N., Deravi, N., Behniafar, H., & Lasjerdi, Z. (2020). Recent researches in effective antileishmanial herbal compounds: narrative review. *Parasitology Research*, *119*(12), 3929–3946. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06787-0>

Giraldo Quintero, S. E., Bernal Lizarazú, M. C., Morales Robayo, A., Pardo Lobo, A. Z., & Gamba Molano, L. (2015). Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá, D.C. *Nova*, *13*(23), 73–80. <https://doi.org/10.22490/24629448.1707>

Giraldo, S. ., Bernal, M. ., Morales, A., & Bernal, H. Y. (2013). Estudio etnobotánico de plantas medicinales comercializadas en mercados populares de Bogotá, DC XI Simposio Argentino. *XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales*, 29–30.

Gómez Gómez, J. L. G. (2021). Leishmaniasis cutánea, Periodo epidemiológico I. Colombia 2021. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS CUTÁNEA PE I 2021.pdf>

Goyena, R. (2019). Caracterización molecular de los genes hsp70,  $\alpha$ -tubulina y nd8 de *Leishmania braziliensis* y detección de factores proteicos asociados a la regulación de

- los genes hsp70. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Herrera, L. (2011). Evaluación de actividad de componentes de aceites esenciales de plantas colombianas frente a *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.* *Universidad Industrial de Santander*.
- INS, I. N. de S. (2018). Leishmaniasis-2018 Boletín epidemiológico Semana 31. *Instituto Nacional de Salud*. [www.ins.gov.co](http://www.ins.gov.co)
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10(1), 287. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>
- Kniss AR, S. J. (2021). *Statistical analysis of agricultural experiments using R*. <https://rstats4ag.org/>
- Lima, E. C. B. de, Barbosa Júnior, W. L., de Brito, M. E. F., de Melo, F. L., Filho, S. P. B., & de Medeiros, Z. M. (2017). Characterization of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with hiv co-infection in Northeastern Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759048>
- Llinás, J. H. (2006). Precisiones en la teoría de los modelos logísticos Introducción Modelos logísticos y modelos relacionados El modelo de Bernoulli. *Revista Colombiana de Estadística*, 29(2), 239–265.
- Mahmood, A. (2019). Isolation, synthesis and pharmacological applications of cirsimaritin – A short review. *Journal of Medicinal Plants*, 7(December), 252. <https://doi.org/10.15413/ajmp.2019.0159>
- Mahmoudvand, H., Sharififar, F., Rahmat, M., Tavakoli, R., Saedi, E., Jahanbakhsh, S., & Sharifi, I. (2014). Evaluation of antileishmanial activity and cytotoxicity of the extracts

of *Berberis Vulgaris* and *Nigella sativa* against *Leishmania tropica*. *Journal of Vector Borne Diseases*, 51(4), 294–299.

<http://www.mrcindia.org/journal/issues/514294.pdf><http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed16&NEWS=N&AN=601058144>

Manotas-Berdugo, H., Toro Maldonado, J. F., Rodríguez-Rodríguez, J., & Salgado-García, D. (2018). Brote urbano de leishmaniasis en Colombia. *Revista de Salud Pública*, 20(1), 89–93. <https://doi.org/10.15446/rsap.v20n1.47135>

Marín, F. J., Torres, O. L., Robledo, S. M., & Doria, M. E. (2018). Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante y leishmanicida de la especie *Pilocarpus alvaradoi* (Rutaceae). *Información Tecnológica*, 29(3), 177–186. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642018000300177>

McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C., & Teasdale, R. D. (2002). Secretory pathway of Trypanosomatid parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 122–154. <https://doi.org/10.1128/membr.66.1.122-154.2002>

Ministerio de Salud de Colombia. (2018). Lineamientos para la atención clínica de Leishmaniasis en Colombia. 32, 1–25. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamientos-leishmaniasis.pdf>

Navarrete Barragán, N. A., Pita-Ospina, E. F., Sánchez Mora., R. M., Giraldo Quintero, S. E., & Bernal Lizarazú, M. C. (2020). Actividad in vitro de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas. *Nova*, 18(33). <https://doi.org/10.22490/24629448.3700>

Neira, L. F., Escobar, P., Mantilla, J. C., & Stashenko, E. (2018). Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-*Leishmania* de aceites esenciales obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del

género *Lippia*. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 17(1), 68–83.

Nogueira, R. C., Rocha, V. P. C., Nonato, F. R., Tomassini, T. C. B., Ribeiro, I. M., Santos, R. R. dos, & Soares, M. B. P. (2013). Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 1304–1311.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.10.013>

Ohashi, M., Amoa-Bosompem, M., Kwofie, K. D., Agyapong, J., Adegle, R., Sakyamah, M. M., Ayertey, F., Owusu, K. B. A., Tuffour, I., Atchoglo, P., Tung, N. H., Uto, T., Aboagye, F., Appiah, A. A., Appiah-Opong, R., Nyarko, A. K., Anyan, W. K., Ayi, I., Boakye, D. A., ... Ohta, N. (2018). In vitro antiprotozoan activity and mechanisms of action of selected Ghanaian medicinal plants against *Trypanosoma*, *Leishmania*, and *Plasmodium* parasites. *Phytotherapy Research*, 32(8), 1617–1630.

<https://doi.org/10.1002/ptr.6093>

Okhale, S. E., Nwanosike, E. M., Fatokun, O. T., & Kunle, O. F. (2016). Phytochemistry and ethnopharmacology of *Lippia* genus with a statement on chemotaxonomy and essential oil chemotypes. *International Journal of Pharmacognosy*, 3(5), 201–211.

[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.3\(5\).201-211](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.3(5).201-211)

Olivier, M., Minguéz-Menéndez, A., & Fernández-Prada, C. (2019). *Leishmania Viannia guyanensis*. *Trends in Parasitology*, 35(12), 1018–1019.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.008>

OMS. (2019). Leishmaniasis. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

OMS, & OPS. (2019). Manual de procedimientos para vigilancia y control de la

Leishmaniasis en las Américas. In *Manual de procedimientos para vigilancia y control de la Leishmaniasis en las Américas* (Vol. 53, Issue 9).

[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Ono, M., Tsuru, T., Abe, H., Eto, M., Okawa, M., Abe, F., Kinjo, J., Ikeda, T., & Nohara, T. (2006). Bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. *Journal of Natural Products*, 69(10), 1417–1420. <https://doi.org/10.1021/np068010m>

Organizacion Mundial de la Salud. (2021). Leishmaniasis. *WHO*.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Oryan, A., & Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(10), 925–932.

<https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>

Patíño-Londoño, S. Y., Salazar, L. M., Acero, C. T., & Bernal, I. D. V. (2017). Aspectos socioepidemiológicos y culturales de la leishmaniasis cutánea: Concepciones, actitudes y prácticas en las poblaciones de Tierralta y Valencia, (Córdoba, Colombia). *Salud Colectiva*, 13(1), 123–138. <https://doi.org/10.18294/sc.2017.1079>

Pérez Zamora, C. M., Torres, C. A., & Nuñez, M. B. (2018). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. *Molecules*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030544>

Pinheiro Mendes, B., Alves Da Silva, I., Pena Damata, J., Castro-Gomes, T., Quercia Vieira, L., Ribeiro-Dias, F., & Fátima Horta, M. (2018). Metacyclogenesis of *Leishmania* (Viannia) *guyanensis*: A comprehensive study of the main transformation features in axenic culture and purification of metacyclic promastigotes by negative selection with *Bauhinia purpurea* lectin. *Parasitology*, 1–12.

<https://doi.org/10.1017/S0031182018002111>

Puentes, F., Diaz, D., Hoya, R. D., Gutiérrez, J. A., Lozano, J. M., Patarroyo, M. E., & Moreno, A. (2000). Cultivation and characterization of stable *Leishmania guyanensis* complex axenic amastigotes derived from infected U937 cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63(1–2), 102–110.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.63.102>

Ramírez González, J. D. (2017). Colombia, el país con más especies de parásitos de *Leishmania*. In *Programa de Comunicación de la Ciencia Universidad Ciencia y Desarrollo*. <http://www.urosario.edu.co/UCD/Leishmania/Documento/pdf-fasciculo-leishmaniasis-universidad-del-rosari/>

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*, 10(12), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>

Rodríguez Toro, G. (1983). Leishmaniasis. 3(3).

<https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/1865/1891>

Rojas, J. P., Ronceros, S. G., & Palacios, O. (2012). Evaluación *in vitro* de la actividad antileishmaniásica del extracto metanólico de siete plantas medicinales. *Ciencia e Investigación*, 15(2), 90–95. <https://doi.org/10.15381/ci.v15i2.2664>

Roy, A., Mandal, S., Mitra, B., Sharma, S., Mukhopadhyay, S., & Majumder, H. K. (2002). Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Medical Science Monitor*, 8(7), 254–261.

<https://www.medscimonit.com/download/index/idArt/13614>

Salcedo Poma, C. M. (2007). Estimación de la ocurrencia de incidencias en declaraciones de



pólizas de importación (Capítulo 2: Modelo de regresión logística). In *UNMSM* (Vol. 10, Issue 20).

Salgado-Almario, J., Hernández, C. A., & Ovalle-Bracho, C. (2019). Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017. *Biomedica*, 39(2), 278–290. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312>

Sanabria, A. (1983). Análisis fitoquímico preliminar, metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae.

Sánchez-Suárez, J., Albarracín, D., Rojas, M., Rincón, J., Robledo, S., Muñoz, D., Oviedo, J., Calderón, M., Fernández, N., & Delgado, G. (2010b). Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 39(1), 21–29. [www.farmacia.unal.edu.co](http://www.farmacia.unal.edu.co)

Sarkar, A., Sen, R., Saha, P., Ganguly, S., Mandal, G., & Chatterjee, M. (2008). An ethanolic extract of leaves of *Piper betle* (Paan) Linn mediates its antileishmanial activity via apoptosis. *Parasitology Research*, 102(6), 1249–1255. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0902-y>

Soto, J., & Soto, P. (2006). Current situation and future of antileishmanial therapy in Colombia. *Biomédica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 26 Suppl 1, 194–206. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1513>

Souto-Bachiller, F. A., De Jesus-Echevarría, M., Cárdenas-González, O. E., Acuña-Rodríguez, M. F., Meléndez, P. A., & Romero-Ramsey, L. (1997). Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry*, 44(6), 1077–1086. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00691-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00691-7)

- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. In *Open biology* (Vol. 7, Issue 9). The Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Tanaka, A. K., Valero, V. B., Takahashi, H. K., & Straus, A. H. (2007). Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* growth and infectivity by aureobasidin A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(3), 487–492. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl518>
- Teles, C. B. G., Moreira, L. S., Silva, A. de A. E., Facundo, V. A., Zuliani, J. P., Stábeli, R. G., & Silva-Jardim, I. (2011). Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(5), 936–942. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000500017>
- Víctor Acero, P., Perla Ángel, B., Esther Fonseca, B., Ferrer, L., & Roura, X. (2015). Canine Leishmaniasis: Tools for diagnosis in veterinary practice in Colombia. *Revista MVZ Cordoba*, 20(3), 4822–4842. <https://doi.org/10.21897/rmvz.52>
- Zambrano, P., Torrez Rodriguez, G., Gomez Romero, S., & Ayala Sotelo, M. (2017). Leishmaniasis: Código 420, 430 y 440.