

Artículo de investigación

## Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*)

Yesmit Karina Ríos R.<sup>1</sup>, Astrid Carolina Otero J.<sup>1</sup>, Diana Lorena Muñoz H.<sup>2</sup>, Mónica Echeverry R.<sup>2</sup>, Sara María Robledo R.<sup>2</sup>, Maira Alejandra Yepes C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Estudiante Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad de Santander, UDES, Cúcuta. Contribución por igual con el artículo.

<sup>2</sup> Universidad de Antioquia, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET. Carrera 53 # 61-30, Teléfono: (4) 219 6502. Fax: (4) 219 6511. Medellín, Colombia. Correo electrónico: sara\_robledo@pecet-colombia.org; srobledo@guajiros.udea.edu.co

<sup>3</sup> Universidad de Santander, UDES, Cúcuta.

Recibido para evaluación: agosto 11 de 2008

Aceptado para publicación: noviembre 10 de 2008

### RESUMEN

Este estudio describe la evaluación de las actividades citotóxica y leishmanicida del aceite esencial de *Matricaria chamomilla*, una planta conocida como "manzanilla" a la que se le atribuye una variedad de usos en la medicina tradicional. La actividad del aceite esencial se evaluó *in vitro* contra amastigotes axénicos de *L. (V) braziliensis*, a concentraciones menores o iguales que 250 µg/ml, y amastigotes intracelulares de *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis*, a concentraciones menores o iguales que 30 µg/ml. Por su parte, la actividad citotóxica se evaluó contra células mamíferas de la línea promonocítica humana U-937, a concentraciones por debajo de 1,0 mg/ml. El aceite esencial de manzanilla mostró ser activo contra amastigotes intracelulares de *L. (V) panamensis* y *L. (V) braziliensis* (CE<sub>50</sub> de 2,87 y 10,30 µg /ml, respectivamente). Aunque el aceite esencial de manzanilla también mostró ser potencialmente tóxico para las células mamíferas (CL<sub>50</sub> de 30,21 µg /ml), esta toxicidad fue similar a la mostrada por la Anfotericina B (CL<sub>50</sub> de 31,39 µg /ml). El aceite esencial de manzanilla no mostró actividad contra las formas axénicas de *L. (V) braziliensis*, demostrando la importancia del metabolismo del compuesto en el interior de la célula para que se produzca el metabolito activo contra el parásito. Estos resultados aportan bases para sugerir que el aceite esencial de manzanilla tiene potencial para el desarrollo de medicamentos contra *Leishmania*, el cual debe ser validado en estudios futuros *in vivo* en modelos animales.

**Palabras clave:** *Matricaria chamomilla*, actividad leishmanicida, citotoxicidad, manzanilla, productos naturales, *L. (V) panamensis*, *L. (V) braziliensis*.

## SUMMARY

### In vitro leishmanicidal and cytotoxic activities of *Matricaria chamomilla* essential oil

This study describes the evaluation of cytotoxic and leishmanicidal activities for *Matricaria chamomilla* essential oil. *M. chamomilla* is a plant commonly named "manzanilla" that has many uses in traditional medicine. The activity of essential oil was evaluated in vitro against axenic amastigotes of *L. (V) braziliensis* at concentrations lower than or equal to 250 µg/ml and intracellular amastigotes of *L. (V) braziliensis* and *L. (V) panamensis* at concentrations lower than or equal to 30 µg/ml. On other hand, the cytotoxic activity was assessed against mammalian cells of the promonocytic human cell line U937 at concentrations below 1.0 mg/ml. The essential oil of *M. chamomilla* showed activity against intracellular amastigotes of *L. (V) panamensis* and *L. (V) braziliensis* (EC<sub>50</sub> of 2.87 and 10.30 µg/ml, respectively). Although the essential oil of *M. chamomilla* also shown to be potentially toxic to mammalian cells (LC<sub>50</sub> of 30.21 µg/ml) this toxicity was similar to that shown by Amphotericin B (LC<sub>50</sub> of 31.39 µg/ml). This essential oil showed no activity against axenic forms of *L. (V) braziliensis* suggesting the importance of the compound metabolism inside cells to produce the metabolite that would be active against parasites. These results suggest that the essential oil of *M. chamomilla* has potential for development of drugs anti-*Leishmania* that must be validated in future studies *in vivo* using animal models.

**Key words:** *Matricaria chamomilla*, leishmanicidal activity, cytotoxicity, chamomile, natural products, *L. (V) panamensis*, *L. (V) braziliensis*.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es considerada un problema de salud pública en los países donde la enfermedad es endémica, incluido Colombia. La enfermedad es producida por al menos 20 especies de protozoos del género *Leishmania* y se manifiesta en tres formas clínicas principales que son: la leishmaniasis cutánea, la leishmaniasis mucocutánea y la leishmaniasis visceral. *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis* son dos de las especies más frecuentemente aisladas en Colombia causantes de las formas cutánea y mucocutánea de la enfermedad (1).

Para el tratamiento de la infección en cualquiera de las formas clínicas se utiliza el antimonio de meglumina (Glucantime), una sal derivada de antimonio pentavalente (Sb<sup>v</sup>) que, a pesar de presentar inconvenientes como toxicidad moderada, administración a altas dosis y esquemas prolongados, se continúa utilizando como medicamento de primera línea. Sin embargo, la diferente sensibilidad de las especies de *Leishmania* infectante y la aparición de resistencia en el parásito a los Sb<sup>v</sup> inciden, además, en la respuesta clínica al tratamiento (2).

La pentamidina y la Anfotericina B son medicamentos de segunda línea y se emplean en pacientes que no responden al tratamiento con antimonio pentavalente. La pentamidina, por excretarse en forma prolongada, permite, a diferencia de los Sb<sup>v</sup>, su administración en días alternos, pero tiene el inconveniente de ser más tóxica y más costosa que el Sb<sup>v</sup> (3). Por su parte, la Anfotericina B es muy efectiva para cualquiera de las formas clínicas, pero debido a su toxicidad se requiere una administración intrahospitalaria. Aunque existe una formulación liposomal de Anfotericina B menos tóxica (4), su costo es mayor, lo que dificulta su consecución, especialmente en países en vías de desarrollo, donde la leishmaniasis es endémica y los gobiernos subsidian los tratamientos, como es el caso de Colombia.

La necesidad de encontrar medicamentos que superen las desventajas que ofrecen los que están disponibles en el mercado sustenta la búsqueda y el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de la enfermedad. Los productos naturales o compuestos derivados de ellos proporcionan una fuente valiosa de medicamentos gracias al contenido de numerosas moléculas con una variedad de actividades farmacológicas (5). La inmensa diversidad química y el amplio rango de actividades biológicas de las plantas han permitido el desarrollo de miles de drogas farmacológicas. Es así como en los últimos 25 años, de 1010 nuevas sustancias aprobadas para el manejo clínico de diferentes enfermedades, 490 (48,5%) son de origen natural (6).

Miembros de la familia Asteraceae, los cuales han demostrado diferentes actividades biológicas, han sido utilizados para propósitos medicinales por diferentes comunidades en el mundo. *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), conocida popularmente como "manzanilla", ha sido utilizada como planta medicinal desde hace siglos por sus propiedades relajantes, sedantes, antiespasmolíticas, antiinflamatorias, cicatrizantes, digestivas, entre otras (7 y 8). La planta ha demostrado, además, actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Pseudomonas auriginosa*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (9). El extracto crudo hidroalcohólico de *M. chamomilla* es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. (L.) amazonensis* en 98,1 y 92,7%, respectivamente (10). Las generalidades de *M. chamomilla* se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características de *Matricaria chamomilla* (manzanilla).

<b>Nombre científico</b>	<i>M. chamomilla</i> , <i>M. recutita</i>
<b>Familia</b>	Astereaceae (alt. <i>Compositae</i> ).
<b>Sinónimos</b>	(=) <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert (=) <i>Matricaria recutita</i> L.
<b>Nombres comunes</b>	Camomila azul, camomila común, camomila alemana, camomila húngara, matricaria, camomila perfumada, falsa camomila dulce, camomila salvaje, camomila, manzanilla.

<b>Distribución</b>	Es nativa de Europa y Asia occidental. Actualmente es de amplia distribución mundial.
<b>Características botánicas</b>	Planta herbácea, de tallo cilíndrico, erguido, ramificado, de hasta 50 cm de altura. La manzanilla, en realidad, son dos plantas: manzanilla romana ( <i>Anthemus nobilis</i> ) y manzanilla alemana ( <i>Matricaria recutita</i> ). La manzanilla romana es una planta perenne y de bajo crecimiento, con una fragancia ligeramente más fuerte que la manzanilla alemana. Ambas tienen, como la margarita, flores que aparecen hacia el final de la primavera y perduran hasta finales del verano. El tallo ramificado es algo erecto, redondo y hueco, y crece hasta cerca de 20 pulgadas. Las hojas son finamente divididas. Toda la planta tiene olor a piña o manzana.
<b>Propiedades medicinales</b>	Como antiséptico, cicatrizante, antiinflamatorio, digestivo, diurético, analgésico, expectorante; se utiliza para el tratamiento de eccemas, neuralgias, gastritis y para el lavado de úlceras y heridas.
<b>Parte utilizada</b>	Capítulos florales.
<b>Componentes</b>	$\alpha$ -bisabolol, colina, ácido galacturónico, glucosa, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxicinámico, 3-careno, ácido 3-hidroxi-2-metilideno-butyrico-angelato, ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico, ácido 4-metoxibenzoico, 6-3-dimetoxiquercetina, 6,7-dimetoxiquercetina, 6-hidroxi-luteolina-7-glucósido, 6-metoxikempferol, $\alpha$ -bisabololóxido a, $\alpha$ -bisabololóxido b, $\alpha$ -bisabololóxido c, $\alpha$ -bisaboloneóxido-a, $\alpha$ -muuroleno, apigenina glucósidos, ácido ascórbico, axillarina, azuleno, betacariofileno, $\beta$ -damascenona, bisabolena, borneol, bornil acetato, ácido cafeico, calameno, ácido cáprico, ácido caprílico, taninos, camazuleno, ésteres de camomila, camomilol, ácido clorogénico, crisoeriol, crisoeriol-7-glucósido, crisosplenol, crisosplentin, cis-cariofileno, cis-en-in-dicicloéter, épsilon-1-(2,6-dimetilfenil)-2-buten-1-ona, etil-benzoato, etil-decanoato, etil-palmitato, etil-fenil acetato, eupaletin, farneseno, farnesol, furfural, galactosa, ácido gálico, ácido gentísico, geraniol, herniarina, hiperósido, ácido isoferulico, isorhamnetina, isorhamnetina-7-glucósido, jaceidina, kemferol, ácido linoleico, luteolina, luteolina glucósidos, matricarina, matricina, niacina, ácido O-coumarico, ácido P-coumarico, ácido palmítico, patuletina, ácido péctico, perillil-alcohol, poliacetileno, quercetagetina 3,5, 6,7, 3',4'-hexametiléter, quercetagetina-3,6,7,3',4'-pentametiléter, quercetagetina, tetrametiléter, quercetin, quercetin-3-galactósido, quercetin-7-glucósido, quercetrin, quercimeritrina, ácido salicílico, tiamina, trans-en-in-dicicloéter, triacontano, xantoxilina, xilosa.

Adaptado de ISHS, Acta Horticulturae 749, I International Symposium on Chamomile Research, Development and Production, 2007 y [www.rain-tree.com/chamomile.htm](http://www.rain-tree.com/chamomile.htm).

El aceite esencial de manzanilla es un ingrediente popular en tópicos de salud y de belleza por sus efectos calmante y antiinflamatorio sobre la piel (11). Debido al amplio uso del aceite esencial de manzanilla, en el presente estudio se evaluó el po-

tencial citotóxico y contra *Leishmania* de este aceite. La actividad contra *Leishmania* se determinó *in vitro* contra amastigotes axénicos de *L. (V) braziliensis* y contra amastigotes intracelulares de *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis*. La actividad citotóxica se evaluó en células promonocíticas humanas U-937.

## METODOLOGÍA

### **Aceite esencial de *M. chamomilla***

El aceite esencial de manzanilla se adquirió de Essential Wholesale (Clackamas, OR, USA). Para las evaluaciones de citotoxicidad y actividad contra *Leishmania*, el aceite esencial se solubilizó en Polivinilpirrolidona (PVP). Las diluciones del aceite solubilizado se hicieron en el medio de cultivo a emplear en los respectivos ensayos, es decir, RPMI 1640 o medio de Schneider, según el caso.

### **Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad**

La actividad citotóxica del aceite esencial de manzanilla se evaluó sobre la línea celular promonocítica humana U-937 (ATCC CRL 1593.2) siguiendo la metodología descrita previamente por Weniger y col, 2001 (12). Para ello, las células se cultivaron a una concentración de 100.000 células/ml en medio RPMI 1640 con 10% de suero bovino fetal (SBF), en platos de 96 pozos para cultivo celular. Se realizaron seis diluciones dobles seriadas del aceite esencial de manzanilla a partir de 1,0 mg/ml. De la misma manera, se hicieron diluciones de Anfotericina B a partir de 0.1 mg/ml. Este medicamento se usó como control de toxicidad. También se utilizaron células cultivadas en ausencia de los compuestos, pero mantenidas en las mismas condiciones, como control negativo del ensayo.

Las células en presencia de las diluciones de cada compuesto se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Luego de las 72 horas de incubación, el efecto de los compuestos se determinó midiendo la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, adicionando 10µl/pozo de MTT (bromuro de 3-(5,4 dimetil tizol-2-l) -2-5 difenil tretrazolium) e incubando a 37°C durante 3 horas. Después de este tiempo se adicionaron 100µl/pozo de una solución al 50% de isopropanol y 10% de SDS, para solubilizar los cristales de Formazán. La producción de Formazán se midió a 570 nm en un lector de microplatos, 30 minutos después de la adición de la solución isopropanol-SDS.

Cada concentración del compuesto (los medicamentos), así como del control sin compuesto se evaluó por triplicado en tres experimentos diferentes. Los resultados se expresaron como la Concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), que correspondió a la concentración a la cual ocurrió el 50% de muerte celular. La CL<sub>50</sub> se calculó por el análisis Probit, un método paramétrico de regresión lineal que permite el análisis de la relación dosis-respuesta (13).

### Evaluación *in vitro* de la actividad contra *Leishmania*

El efecto del aceite esencial de manzanilla se evaluó sobre amastigotes axénicos de *L. (V) braziliensis* y sobre amastigotes intracelulares de *L. (V) panamensis* y *L. (V) braziliensis*.

**Amastigotes axénicos.** La actividad leishmanicida se evaluó en amastigotes axénicos de *L. (V) braziliensis* (M/HOM/87/UA301) mediante el método MTT. Los amastigotes axénicos se cultivaron a una concentración de 1.000.000 parásitos/ml en medio Schneider pH 5.4 con 20% de SBF, en platos de 96 pozos para cultivo celular. Se realizaron seis diluciones dobles seriadas del aceite esencial de manzanilla, a partir de 250µg/ml. De la misma manera, se hicieron diluciones de Anfotericina B a partir de una concentración de 0,25µg/ml, medicamento que se utilizó como control de efectividad en el ensayo. Parásitos cultivados en ausencia de los compuestos, pero mantenidos en las mismas condiciones, fueron utilizados como control negativo del ensayo.

Los parásitos cultivados en presencia de las diluciones del aceite esencial y de la Anfotericina B se incubaron a 32°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Luego de las 72 horas de incubación, el efecto de los compuestos se determinó midiendo la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, adicionando 20µl/pozo de MTT e incubando a 32°C durante 4 horas. Después de este tiempo, se adicionaron 100µl/pozo de una solución al 50% de isopropanol y 10% de SDS, y la producción de Formazán se midió a 570 nm en un lector de microplatos, 30 minutos después de la adición de la solución isopropanol-SDS.

Cada concentración del compuesto (los medicamentos), así como el blanco, se evaluó al menos por duplicado en tres experimentos diferentes. Los resultados se expresaron como la Concentración Efectiva 50 (CE<sub>50</sub>), que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50% de muerte de los parásitos. La CE<sub>50</sub> se calculó por el análisis Probit, como se describió previamente.

**Sobre amastigotes intracelulares.** La efectividad del aceite esencial de manzanilla se evaluó sobre amastigotes intracelulares de *L. (V) braziliensis* (MHOM/CO/87/UA/UA301) por análisis al microscopio de placas teñidas con Giemsa y amastigotes intracelulares de *L. (V) panamensis* (M/HOM/88/UA140pirGFP), por citometría de flujo. Puesto que en las infecciones *in vitro* los índices de infección son dependientes de la proporción parásito:célula empleada, para cada una de estas especies de *Leishmania* se determinó la Concentración Infecciosa 50 (CI<sub>50</sub>), al infectar 1x10<sup>5</sup> células/ml con diferentes proporciones de parásito:célula (1:1, 5:1, 10:1, 20:1, 40:1 y 80:1). La CI<sub>50</sub> que corresponde a la proporción de parásitos con la cual ocurre el 50% de infección de las células fue calculada por el análisis Probit (13).

Para *L. (V) braziliensis* se siguió el protocolo descrito por Robledo y col (1999) (14) con algunas modificaciones. Se prepararon células U-937 a una concentración de

$1 \times 10^5$  células/ml de medio RPMI 1640 y 100ng/ml de Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). En cada pozo de una placa para cultivo celular de 24 pozos se dispensó 1 ml de células y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 48 horas de incubación, las células adheridas se infectaron con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento (sexto día de crecimiento), en una proporción de 25 parásitos por cada célula, que corresponde a la CI<sub>50</sub> calculada previamente para esta cepa de *L. (V) braziliensis*.

Las células en contacto con los parásitos se incubaron durante 2 horas a 34°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, se realizaron dos lavados con solución tampón de fosfatos (PBS) para eliminar los parásitos libres, se adicionó un medio nuevo y se incubaron nuevamente durante 24 horas. Luego se reemplazó el medio por uno más fresco que contenía las diferentes concentraciones del aceite esencial de manzanilla. Las células infectadas se expusieron a cada concentración del aceite durante 72 horas y se lavaron tres veces con PBS. Para la tinción, las células se dejaron secar a temperatura ambiente, se fijaron con metanol y se colorearon con Giemsa. Después de lavar con agua destilada, los pozos se dejaron secar y las láminas adheridas al fondo se desprendieron y se depositaron en una lámina portaobjetos para proceder con la lectura al microscopio. Se contaron al menos 100 células (infectadas y no infectadas), registrando el número de amastigotes contenidos en cada una de las infectadas. Como control de infección del ensayo, se utilizaron células infectadas y cultivadas en ausencia de los compuestos, pero mantenidas en las mismas condiciones. Los resultados se expresaron como la CE<sub>50</sub> calculada por el análisis Probit (13).

Para la evaluación con *L. (V) panamensis* se prepararon células U-937 a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/ml de medio RPMI 1640 y 100 ng/ml de Forbol-12-miristato Acetato (PMA). En cada pozo de una placa para cultivo celular de 24 pozos se dispensó 1 ml de la suspensión de células y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 48 horas de incubación, las células adheridas se infectaron con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento (cosechados al quinto día de crecimiento), en una proporción de 15 parásitos por cada célula, que corresponde a la CI<sub>50</sub> determinada previamente para las infecciones con esta cepa de *L. (V) panamensis*.

Las células con los parásitos se incubaron durante 2 horas con 5% de CO<sub>2</sub> a 34°C. Luego de dos lavados con PBS para eliminar los parásitos libres, se adicionó un medio nuevo y las células se incubaron de nuevo. Después de 24 horas de incubación, se reemplazó el medio por uno más fresco que contenía las diferentes concentraciones del aceite esencial de manzanilla. Células infectadas y cultivadas en ausencia de compuestos sirvieron como control de infección. Las infectadas se expusieron a cada concentración del aceite durante 72 horas; posteriormente, se removieron cuidadosamente del fondo del plato utilizando el émbolo de una jeringa y se analizaron por citometría de flujo. Las células se tiñeron con 5µl de anticuerpo anti-CD33 (un antígeno de membrana específico para la línea monociti-



ca/mieloide (15) marcado con ficoeritrina (PE). El porcentaje de células infectadas (eventos CD33+, GFP+) y la carga parasitaria se analizó por citometría de flujo en 10.000 eventos. Los datos se procesaron con el programa WinMDI (Joe Trotter, Purdue University, USA). La  $CE_{50}$  se calculó según la reducción de la carga parasitaria, al dividir la intensidad de fluorescencia (IF) obtenida con el aceite esencial por la IF obtenida en ausencia de compuestos. La Anfotericina B se utilizó como medicamento de control de efectividad para ambos ensayos. Cada concentración del aceite esencial y del medicamento, así como el control sin medicamento, se evaluó por triplicado en dos experimentos diferentes. Los resultados se expresaron como la  $CE_{50}$  calculada por el análisis Probit, como se describió previamente. El índice de selectividad (IS) se calculó dividiendo la actividad citotóxica por la actividad leishmanicida ( $IS = CL_{50} / CE_{50}$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se demuestra que el aceite esencial de *M. chamomilla* (manzanilla) tiene actividad *in vitro* contra *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis*, las dos especies más prevalentes responsables de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Colombia. Las actividades leishmanicidas y citotóxicas se establecieron según rangos de concentraciones previamente establecidos en nuestro laboratorio (Tabla 2). La evaluación de la actividad del aceite esencial de manzanilla sobre estas especies de *Leishmania* permitió demostrar que el compuesto es muy activo contra amastigotes intracelulares, tanto de *L. (V) panamensis*, como de *L. (V) braziliensis*, siendo *L. (V) panamensis* ligeramente más sensible que *L. (V) braziliensis* al aceite esencial de manzanilla, pero también a la Anfotericina B (Tabla 3). Si bien las diferencias pueden explicarse mediante el método de evaluación de la sensibilidad utilizado, es decir, citometría de flujo y microscopía, siendo la citometría de flujo un método automatizado y la microscopía un método de evaluación que está sujeto a la experiencia del evaluador, consideramos que las diferencias en sensibilidad se debe a diferencias inherentes al parásito, ya que cuando existen diferencias en sensibilidades *in vitro* éstas se han observado previamente aun entre cepas de una misma especie de *Leishmania* (14). Si tenemos en cuenta que un compuesto es muy activo cuando presenta  $CE_{50}$  cercanas o inferiores a  $10\mu\text{g/ml}$ , las  $CE_{50}$  observadas de 2,87 y  $10,30\mu\text{g/ml}$  para *L. (V) panamensis* y *L. (V) braziliensis*, respectivamente, sugieren que el aceite esencial es muy activo contra estas especies de *Leishmania*. Esta mayor sensibilidad no es significativa, toda vez que la actividad se conserva en el mismo rango de sensibilidad esperado para compuestos activos ( $0-10\mu\text{g/ml}$ ) (Tabla 2). Dada la cantidad de componentes constituyentes del aceite esencial de *M. chamomilla* (Tabla 1), cada uno de ellos con propiedades biológicas distintas, se hace necesario realizar estudios de actividad contra *Leishmania* con los componentes aislados para poder atribuir esta actividad a un componente en particular.



**Tabla 2.** Clasificación de la citotoxicidad y actividad leishmanicida para extractos y fracciones derivados de plantas y productos naturales<sup>a</sup>.

CL <sub>50</sub> (µg/ml)	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	IS
<10: muy tóxico	<10: muy activo	<10: selectivo para células (tóxico)
>10 y <100: tóxico	>10 y <50: activo	
>100 y <1000: medianamente tóxico	>50 y <100: medianamente activo	>10: selectivo para parásitos (activo)
>1000: potencialmente no tóxico	>100: potencialmente no activo	

<sup>a</sup> Criterios definidos por el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, con base en las investigaciones realizadas desde 1992.

Resultados contrarios se obtuvieron cuando se evaluó la actividad del aceite esencial en la forma axénica de amastigotes de *L. (V) braziliensis*. En esta evaluación se encontró que el aceite esencial de manzanilla no es activo contra la forma axénica de amastigotes de *L. (V) braziliensis* con una CE<sub>50</sub> de 230,24 µg/ml (Tabla 3). El hecho que el aceite esencial tenga actividad contra la forma intracelular, pero no contra la extracelular del parásito, sugiere que el compuesto, al ser liposoluble, sea internalizado por la célula y metabolizado por la misma, y que probablemente son los productos derivados de este metabolismo intracelular los responsables de la actividad del aceite esencial, haciéndolo más efectivo sobre la forma intracelular del parásito que sobre la axénica. Esta situación se observa en medicamentos como los antimoniales pentavalentes, los cuales son reducidos a antimoniales trivalentes en el interior del macrófago para que puedan ejercer su efecto leishmanicida (16 y 17). Sin embargo, debido a que no se dispone de información acerca del metabolismo celular de los distintos componentes del aceite esencial de *M. chamomilla*, es necesario realizar estudios futuros con el fin de determinar lo que sucede con el aceite luego de su ingreso en la célula.

**Tabla 3.** Efecto del aceite esencial de manzanilla en el crecimiento y viabilidad de *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis*.

Compuesto	CL <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>	CE <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>		
	U937	Amastigote axénico	Amastigotes intracelulares	
			<i>L. (V) braziliensis</i>	<i>L. (V) panamensis</i>
<b>AEMC</b>	30,21 ± 1,55	230,24 ± 6,97	10,30 ± 3,37	2,87 ± 0,08
<b>AB</b>	31,39 ± 7,58	1,77 ± 1,13	0,11 ± 0,06	0,03 ± 0,01

<sup>a</sup> Los datos representan el valor promedio más la desviación estándar ( $X \pm DS$ ) de evaluaciones en tres experimentos independientes. CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50; CE<sub>50</sub>: Concentración Efectiva 50; AEMC: Aceite Esencial de *M. chamomilla*; AB: Anfotericina B.

El aceite esencial de manzanilla, por su parte, tuvo una actividad citotóxica similar a la mostrada por la Anfotericina B ( $CL_{50}$  de 30,21 y 31,39  $\mu\text{g/ml}$  para el aceite esencial y la Anfotericina B, respectivamente). Teniendo en cuenta que  $CL_{50}$  inferiores a 100 $\mu\text{g/ml}$  se consideran como potencial tóxico (Tabla 2), la  $CL_{50}$  obtenida para el aceite de manzanilla sugiere que este compuesto, al igual que la Anfotericina B, es tóxico para las células. La toxicidad mostrada por el aceite esencial de manzanilla posiblemente se debe a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes como compuestos constituyentes importantes que pueden alterar la estructura celular (18 y 19).

El índice de selectividad (IS) del aceite esencial de manzanilla fue de 2,93 y 10,52 sobre amastigotes intracelulares de *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis*, respectivamente, mientras que el índice de selectividad para amastigotes axénicos de *L. (V) braziliensis* fue menor a 1,0 (IS=0,14). (Tabla 4). El índice de selectividad observado para el aceite esencial de manzanilla indica que la actividad contra *Leishmania* del aceite sobre ambas especies es mayor que la actividad citotóxica observada sobre células U937. Si tenemos en cuenta que un  $IS > 10$  es indicativo de actividad selectiva sobre el agente infeccioso (Tabla 2), nuestros resultados sugieren entonces que el aceite esencial de manzanilla tiene potencial como compuesto leishmanicida. Aunque el aceite esencial mostró ser potencialmente tóxico para las células mamíferas con una  $CL_{50}$  de 30,21  $\mu\text{g/ml}$ , la buena actividad contra *Leishmania* mostrada contra la forma intracelular del parásito sugiere que el compuesto tiene potencial como molécula candidata a medicamento. Sin embargo, este potencial debe ser validado en estudios *in vivo*, ya que existen mecanismos que pueden disminuir considerablemente la toxicidad del compuesto, como la manipulación de las moléculas activas, ya sea con liposomas o polímeros que permitan la reducción de la toxicidad celular. Un ejemplo de esto es la fórmula liposomal de la Anfotericina B, que por estar recubierta por una monocapa de naturaleza lipídica no sólo facilita la entrada del medicamento en la célula, sino que evita el daño que produciría la anfotericina libre al unirse a la membrana celular (20).

**Tabla 4.** Selectividad de la actividad del aceite esencial de manzanilla por *Leishmania* versus célula mamífera.

Compuesto	Amastigote axénico		Amastigote intracelular	
	<i>L. (V) braziliensis</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>	<i>L. (V) panamensis</i>
<b>AEMC</b>	0,14	2,93	10,52	
<b>AB</b>	20,31	285,3	1212,0	

El Índice de Selectividad (IS) se calculó al comparar la toxicidad ( $CL_{50}$ ) con la actividad contra *Leishmania* ( $CE_{50}$ ), con la siguiente fórmula:  $IS=CL_{50}/CE_{50}$ . AEMC: Aceite Esencial de *M. chamomilla*; AB: Anfotericina B.

En conclusión, los resultados del presente estudio aportan bases para sugerir que el aceite esencial de manzanilla posee potencial para el desarrollo de medicamentos

contra *Leishmania*, el cual debe ser validado en estudios futuros *in vivo* con modelos animales. Estos resultados también sustentan el potencial de la medicina tradicional basada en plantas y otros productos naturales como fuente importante para el descubrimiento de nuevos fármacos que puedan utilizarse para el tratamiento de la leishmaniasis.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS (Código No. 1101-00018-9999, 2006).

## BIBLIOGRAFÍA

1. I.D. Vélez, E. Rodríguez, R. Duarte, L. López, M. Castaño, D.P. Colorado, L.M. Carrillo, D.M. Sierra, S.M. Robledo, J.C. Quintana y C.A. Rincón. *Enfermedades tropicales*. Guía de manejo de ETV y accidente ofídico. Programa de prevención y control de enfermedades tropicales y accidente ofídico en las fuerzas militares. Litografía Solingraf, Medellín, Colombia, 2005, 150 p. ISBN958-655-881-9.
2. B.L. Herwaldt. Leishmaniasis, *Lancet*. **354**, 1191, 1999.
3. S.M Robledo, J.A. Puerta, D.L. Muñoz, M. Guardo e I.D. Vélez. Efficacy and tolerance of pentamidine for treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V) panamensis* in Colombia. *Biomédica*, **26**, 188, 2006.
4. S. Sundar, H. Mehta, A.V. Sures, S.P. Singh, M. Rai y H.W. Murray. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional vs. lipid-formulations. *Clinical of Infectious Diseases*, **38**, 377, 2004.
5. D.J. Newman, G.M. Cragg y K.M. Snader. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, **66**, 1022, 2003.
6. D.J. Newman y G.M. Cragg. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, **70**, 461, 2007.
7. G.D. Appelt. Pharmacological aspects of selected herbs employed in Hispanic folk medicine in San Luis Valley of Colorado, USA: *Matricaria chamomilla*. *Journal of Ethnopharmacology*, **13**, 51, 1985.
8. D.L. McKay y J.B. Blumberg. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research*, **20**, 519, 2006.

9. J.C. Nogueira, M. de F. Diniz y E.O. Lima. In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia* (Engl Ed.), **74**, 118, 2008.
10. P.S. Luize, T.S. Tiuman, L.G. Morello, P.K. Maza, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, D.A. García Cortez, J.C. Palazzo de Mello y C.V. Nakamura. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41**, 85, 2005.
11. No authors listed, *Matricaria chamomilla* (German chamomile) - Monograph. *Alterative Medicine Review*, **13**, 58, 2008.
12. B. Weniger, S. Robledo, G.J. Arango, E. Deharo, R. Aragón, V. Muñoz, J. Callapa, A. Lobstein y R. Anton. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **78**, 193, 2001.
13. D.J. Finney. "Statistical method in biological assay", London, Griffin, 508 p., 1978.
14. S.M. Robledo, A.Z. Valencia y N.G. Saravia. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *Journal of Parasitology*, **85**, 360, 1999.
15. D. Simmons y B. Seed. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. *Journal of Immunology*, **141**, 2797, 1988.
16. P. Shaked-Mishan, N. Ulrich, M. Ephros y D. Zilberstein. Novel intracellular Sb-V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 3971, 2001.
17. H. Denton, J.C. McGregor y G.H. Coombs. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochemistry Journal*, **381**, 405, 2004.
18. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck y M. Idaomar. Biological effects of essential oils. *Food Chemistry Toxicology*, **46**, 446, 2008.
19. G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice y R. Bruni. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chemistry*, **91**, 621, 2005.
20. J. Miñónez Conde, Anfotericina Liposomal: Una aproximación fisicoquímica al conocimiento de su mecanismo de acción. *Anal Real Academia de Farmacia*, **68**, 1 (2002).