

Perfil fitoquímico, actividad anti-*Leishmania*, hemolítica y toxicológica de *Cordia dentata* Poir. y *Heliotropium indicum* L.

Phytochemical profile and antileishmanial, hemolytic and toxicological activity of *Cordia dentata* Poir. and *Heliotropium indicum* L.

MSc. Jorge Eliecer Espitia-Baena,^I PhD. Sara María Robledo-Restrepo,^{II}
MSc. Bernarda Soraya Cuadrado-Cano,^I Esp. Harriette del Rosario Duran-Sandoval,^I PhD. Harold Alberto Gómez-Estrada^I

^I Grupo de Investigación en Química de Medicamentos, Grupo de Investigación en Microbiología y Sistemas Simbióticos. Universidad de Cartagena. Colombia.

^{II} Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales. Universidad de Antioquia. Colombia.

RESUMEN

Introducción: la leishmaniasis constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial. En Colombia, la forma clínica cutánea tiene la mayor incidencia y es causada principalmente por especies de *Leishmania (Viannia) panamensis*. Dado que los tratamientos disponibles para esta enfermedad resultan ineficaces, es necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos en especies vegetales utilizadas por la medicina popular.

Objetivo: evaluar el perfil fitoquímico, la actividad hemolítica, citotóxica y anti-*Leishmania in vitro* de extractos y fracciones provenientes de hojas de *Cordia dentata* y *Heliotropium indicum*.

Métodos: al extracto etanólico total y fracciones obtenidas de hojas de *C. dentata* y *H. indicum*, se les realizó perfil fitoquímico, determinación de actividad hemolítica, efecto tóxico en larvas de *Artemia salina* y sobre la línea celular promonocítica humana U937 (CRL-1593.2TM), así como también, la actividad anti-*Leishmania* sobre amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140) transfectados con Green Fluorescence Protein.

Resultados: los extractos y fracciones de ambas especies no exhibieron actividad hemolítica en las condiciones evaluadas. Las fracciones de *H. indicum* fueron más

tóxicas que las de *C. dentata* frente a larvas de *A. salina* y células U937.

La actividad de la fracción de diclorometano de *H. indicum* (Hi-I-5B) sobre los amastigotes intracelulares está fuertemente relacionada con la presencia de alcaloides.

Conclusiones: el extracto etanólico de las hojas de *H. indicum* exhibe propiedades antileishmaniales, a diferencia de la especie *C. dentata*, por lo que se podría pensar que la primera especie vegetal, representa una fuente potencial de moléculas útiles en el tratamiento de leishmaniasis cutánea.

Palabras clave: leishmaniasis, citotoxicidad, *Cordia dentata*, *Heliotropium indicum*.

ABSTRACT

Introduction: leishmaniasis is a serious public health problem worldwide.

In Colombia, its cutaneous clinical form has the greatest incidence, and is mainly caused by species of *Leishmania (Viannia) panamensis*. Given the ineffectiveness of the available treatments, it is necessary to find new therapeutic agents in plant species used in folk medicine.

Objective: evaluate the phytochemical profile and the hemolytic, cytotoxic and antileishmanial *in vitro* activity of extracts and fractions from leaves of *Cordia dentata* and *Heliotropium indicum*.

Methods: the total ethanolic extract and fractions obtained from leaves of *C. dentata* and *H. indicum* underwent phytochemical profiling and determination of their hemolytic activity, toxic effect on *Artemia salina* larvae and on human promonocytic cell line U937 (CRL-1593.2™), as well as their antileishmanial activity against intracellular amastigotes of *L. (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140) transfected with Green Fluorescence Protein.

Results: hemolytic activity was not observed in the extracts and fractions from either species under the study conditions. *H. indicum* fractions were more toxic than *C. dentata* fractions against *A. salina* larvae and U937 cells. Activity of the *H. indicum* dichloromethane fraction (Hi-I-5B) on intracellular amastigotes is closely related to the presence of alkaloids.

Conclusions: the ethanolic extract from *H. indicum* leaves has antileishmanial properties, unlike the extract from the species *C. dentata*. This suggests that the former plant species is a rich potential source of molecules useful for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Key words: leishmaniasis, cytotoxicity, *Cordia dentata*, *Heliotropium indicum*.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis comprende un conjunto de enfermedades parasitarias consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema grave de salud pública en el mundo.¹ La mayoría de países donde la leishmaniasis es endémica se encuentran en vías de desarrollo, y anualmente en todo el mundo, se presentan alrededor de dos millones de casos, 90 % de los cuales corresponden

a leishmaniasis cutánea (LC).^{2,3} Entre las distintas manifestaciones clínicas, la LC se caracteriza por ser una condición desfigurante que conduce a largo plazo a discapacidad tanto física como psicológica, debido al fuerte estigma social asociado a la misma.⁴

En Colombia, territorio endémico para la enfermedad, el 70 % de los casos de LC son causados por *Leishmania (Viannia) panamensis*,⁵ y debido a que la enfermedad es transmitida por vectores invertebrados, su control y/o erradicación resulta ser una tarea difícil ya que está condicionada a la distribución del mosquito.⁶

Los medicamentos existentes para el tratamiento de la LC incluyen antimoniales pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, pentamidina y miltefosina,^{5,7} todos ellos relacionados con importantes efectos tóxicos, altas tasas de recaída y aparición de resistencia por parte de los parásitos;⁷ razón por la cual, resulta de gran importancia la búsqueda de moléculas activas provenientes de especies vegetales, como fuentes para el desarrollo de nuevos agentes antiprotozoarios.^{8,9}

Dentro de las plantas de la flora colombiana con potencial efecto antileishmanial, encontramos algunas pertenecientes a la familia *Boraginaceae* Juss.,¹⁰ más específicamente, las especies *Cordia dentata* Poir.¹¹ y *Heliotropium indicum* L.,¹² abundantes en la costa norte colombiana y conocidas como "uvito" y "rabo de alacrán" respectivamente.^{13,14}

Con el fin de explorar nuevas alternativas terapéuticas antiparasitarias y al mismo tiempo proteger y validar el conocimiento popular sobre el uso medicinal de los recursos vegetales presentes en Colombia, este trabajo tuvo como objetivo fundamental evaluar el perfil fitoquímico, la actividad hemolítica, citotóxica y anti-*Leishmania in vitro* de extractos y fracciones provenientes de hojas de *Cordia dentata* y *Heliotropium indicum*.

MÉTODOS

Estudio Fitoquímico

Recolección de la muestra

Las hojas frescas de *C. dentata* Poir. (Código JBC2507) y *H. indicum* L. (Código JBC3691) se recolectaron en el municipio de Turbaco, Departamento de Bolívar (10°21´05" Norte, 75°26´16" Oeste y elevación 83 m.s.n.m). Se seleccionaron hojas que no mostraron deterioro físico y/o microbiológico evidente. Partes representativas de cada planta se utilizaron en la identificación taxonómica, la cual fue efectuada en el Jardín Botánico Guillermo Piñeres de la Ciudad de Cartagena-Colombia.¹⁴

Tratamiento del material vegetal

Los especímenes fueron lavados con agua potable y secados a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se redujo el tamaño de partícula y cada especie fue colocada en recipientes con etanol grado comercial.¹⁵

Preparación del extracto total y fracciones

La maceración alcohólica de las hojas se efectuó bajo agitación, durante cuatro días a TA en recipientes de vidrio cerrados y protegidos de la luz;¹⁵ mediante filtración, se separó el marco y la solución etanólica hasta agotamiento del material vegetal.¹⁶ El solvente se retiró a presión reducida y 40 °C con un rotaevaporador (Heidolph VV2000) hasta obtener un extracto etanólico total seco y concentrado de consistencia semisólida¹⁷ (Figura 1). En el proceso de fraccionamiento, se mezcló de manera homogénea 20 g de extracto total de cada especie con 100 g de sílica gel. Todo el contenido fue vertido en una columna tubular abierta con la ayuda de hexano, obteniendo las diferentes fracciones mediante elución con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol) hasta agotamiento del extracto.

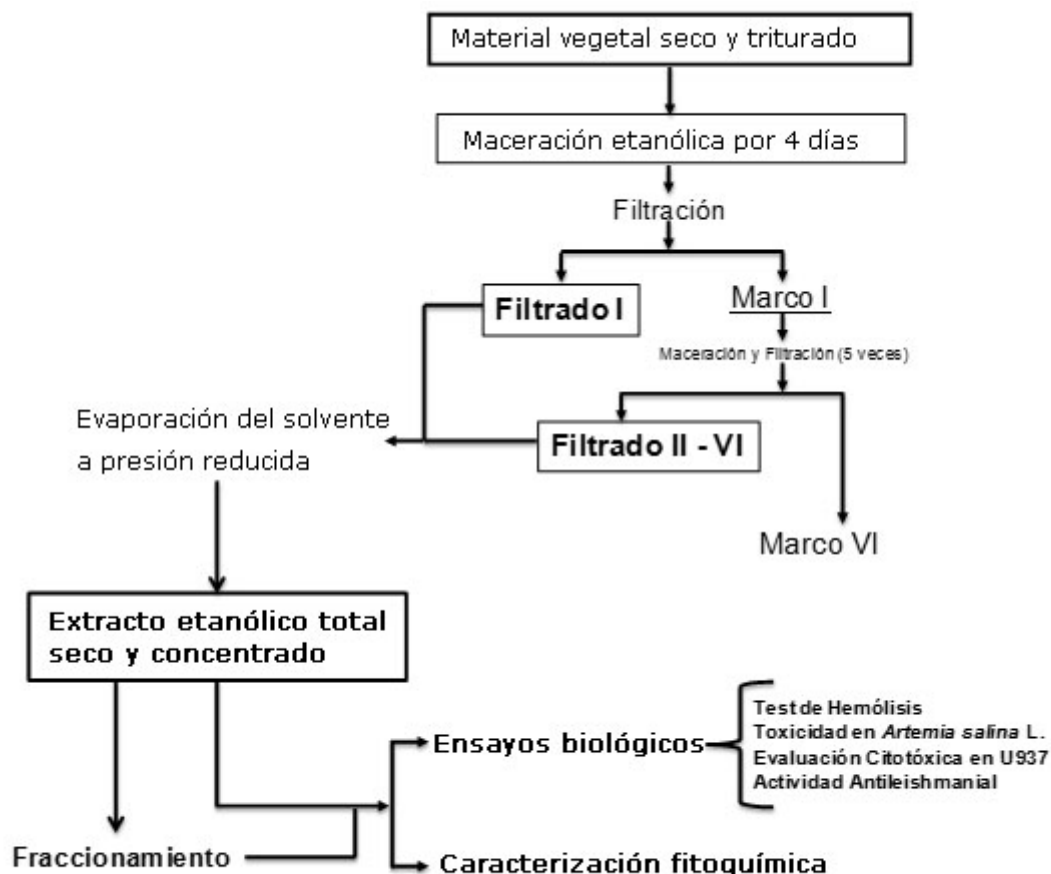


Fig. 1. Esquema para la obtención del extracto etanólico total de *Cordia dentata* Poir. y *Heliotropium indicum* L. Adaptado de Espita-Baena et al.²⁴

Caracterización fitoquímica

El tamizaje preliminar fitoquímico de los principales grupos de metabolitos secundarios en los extractos y fracciones, se llevó a cabo empleando la metodología microquímica descrita por Carvajal et al.¹⁸ y Duran et al.,¹⁹ la cual fue complementada con cromatografía en capa fina sobre cromatoplasmas de Sílica gel 60 F₂₅₄ con soporte de aluminio.²⁰ Todos los solventes fueron grado analítico y los reactivos de identificación se prepararon al momento de realizar los ensayos para minimizar errores por degradación de las soluciones.¹⁵ Se utilizó lámpara UV (λ=254 nm y λ=365 nm), ácido sulfúrico al 10 % en metanol, vainillina y reactivos de revelación universales o específicos dependiendo del grupo de compuesto a evaluar.²⁰

Estudio Biológico

Evaluación de la actividad hemolítica

El efecto hemolítico de extractos y fracciones de ambas especies vegetales fue evaluado sobre glóbulos rojos (GR) humanos O+ provenientes de sangre obtenida de un donante masculino sano con hematocrito de 48 %.

Preparación de las soluciones de prueba

De cada extracto total y fracción de *C. dentata* y *H. indicum* se pesó 20 mg, los cuales fueron disueltos, mediante agitación, empleando solución salina normal (SSN) y dimetilsulfóxido (DMSO) hasta 10 mL, con lo que se obtuvo una solución con concentración de 2000 mg/L. Las soluciones fueron filtradas y se prepararon diluciones seriadas base 2, quedando para evaluación las siguientes concentraciones: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81 y 3,91 mg/L para cada extracto o fracción. Como control negativo se utilizó SSN y como control positivo agua estéril grado inyectable.²¹ Adicionalmente, se evaluó el efecto hemolítico del DMSO²² a concentración de 2 % y la anfotericina B a concentraciones similares a las de extractos y fracciones.

Procedimiento

5 mL de sangre anticoagulada con citrato de sodio al 3,2 %, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos, descartando el plasma.²² Luego los GR se lavaron tres veces con SSN y fueron centrifugados hasta que quedaron limpios. Una porción de GR fue utilizada para preparar suspensiones al 4 % en SSN y agua estéril respectivamente. 100 µL de la suspensión de GR en SSN, se colocó en cada uno de los pozos de una microplaca de 96 pozos para cultivo celular,^{22,23} excepto en aquellos destinados para la evaluación del control positivo, en los cuales, se adicionó 100 µL de la mezcla preparada con GR y agua estéril. Inmediatamente, se adicionó una alícuota de 100 µL de cada una de las soluciones a ensayar (extracto y fracciones de *C. dentata* y *H. indicum*, DMSO, anfotericina B, control positivo y negativo) a las correspondientes concentraciones. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas,²² centrifugándose posteriormente a 3500 rpm durante 10 segundos. El contenido de hemoglobina en el sobrenadante se determinó en un lector de placas de ELISA a 550 nm.²¹

Cada concentración de extracto y fracción se evaluó por triplicado y en tres experimentos independientes. La concentración hemolítica media (CH50) se calculó a partir de la absorbancia de las soluciones de prueba²¹ utilizando el método estadístico Probit del software Stat Plus 2009 Professional 5.8.4.

Evaluación de actividad tóxica *in vivo* sobre larvas de *Artemia salina* L

El agua de mar para este bioensayo se obtuvo de aproximadamente 10 metros bajo el nivel del mar en un punto medio entre Tierra Bomba y Castillo Grande en el departamento de Bolívar (Colombia).¹⁵ Las larvas de *A. salina* utilizadas fueron provenientes de la eclosión de huevos recolectados en la bahía de San Francisco (EE. UU.).

Tratamiento y caracterización del agua de mar

Con el propósito de garantizar uniformidad en las propiedades fisicoquímicas del agua durante todo el ensayo, esta se filtró a presión reducida y se determinó su conductividad eléctrica, pH y densidad.

Preparación de las soluciones de prueba

Para cada especie vegetal se pesó 50 mg de extracto total y cada una de las fracciones y se disolvió en una mezcla 9:1 de agua de mar/DMSO,²⁴ agitando hasta completa homogenización. Estas soluciones se trasladaron a balones aforados de 25 mL, completando volumen con agua de mar. Luego de filtrar las soluciones anteriores, se prepararon diluciones seriadas base 2, hasta obtener concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.13 mg/L, para cada extracto o fracción. Se empleó agua de mar como control negativo y una solución de fenol al 5 % como control positivo.²⁵ Adicionalmente, se evaluó el efecto tóxico del DMSO a una concentración de 0,4 % y la anfotericina B a concentraciones similares a las de extractos y fracciones.

Procedimiento

Huevos de *A. salina* fueron puestos a eclosionar en agua de mar, bajo condiciones de iluminación artificial indirecta por 24 horas y temperatura de 28 ± 2 °C.²⁶ Las larvas se separaron en grupos de 10 nauplios y fueron colocadas en viales que contenían 2 mL de agua de mar.¹⁹ A cada recipiente, se le adicionó la solución de prueba completando volumen a 10 mL con la cantidad de agua necesaria para cada caso. La lectura de mortalidad se realizó a las 24 horas.^{15,24} La concentración letal media (CL50), se calculó por el método PROBIT.²⁶ Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en tres experimentos independientes.

Evaluación de actividad tóxica *in vitro* en células mamíferas

La actividad de extractos y fracciones de cada especie vegetal se evaluó sobre la línea celular promonocítica humana U937 (CRL-1593.2™) en fase logarítmica de crecimiento, utilizando el método MTT.²⁷

Preparación de las soluciones de prueba

De cada extracto o fracción se prepararon soluciones a una concentración de 2000 mg/L, disolviendo 2 mg de muestra en 1 mL de DMSO con agitación vigorosa. Las anteriores soluciones, se diluyeron de forma seriada con medio RPMI 1640, de tal manera, que al momento de colocarlas en contacto con las células U937 en los platos estándar de 96 pozos, la concentración evaluada para cada especie vegetal fue de 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 mg/L. En todos los ensayos se utilizó anfotericina B como control positivo de citotoxicidad,²⁸ así como también, medio de cultivo como un control de viabilidad.

Procedimiento

Las células en suspensión, con una viabilidad mayor al 90 %, se ajustaron a una concentración de 1×10^5 células/mL. En cada pozo se dispensaron 100 μ L de la suspensión de células, así como también, 100 μ L de las diluciones de cada especie vegetal, anfotericina B o medio de cultivo. Los platos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 72 horas.²⁸ Posteriormente, se adicionaron 20 μ L de MTT a cada pozo e incubó el contenido a 37 °C durante 3 horas, protegiendo los platos de la luz. Finalmente, se adicionó 100 μ L de DMSO a cada pozo e incubó nuevamente cada plato a TA durante 30 minutos, y calculó la producción de formazán mediante la determinación de la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 570 nm.²⁹ La concentración letal media (CL₅₀), se calculó por el método Probit. Los ensayos fueron realizados por triplicado y en dos experimentos independientes.³⁰

Evaluación de actividad antileishmanial *in vitro* sobre amastigotes intracelulares

Para este ensayo se utilizó amastigotes presentes en la porción citoplasmática de células U937 en fase logarítmica de crecimiento,²⁸ los cuales fueron producto de la diferenciación de promastigotes de *L. (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140) transfectados con GFP (Green Fluorescence Protein)³¹ en fase estacionaria de crecimiento y cultivados en medio Novy, McNeal, Nicolle (NNN) modificado.

Preparación de las soluciones de prueba

De la solución madre del extracto total y fracciones de cada especie vegetal, antes preparada para la evaluación en células U937 (2000 mg/L), se hicieron diluciones seriadas base 2, con una concentración máxima de 100 mg/L, o en su defecto, la mitad de la CL50 calculada sobre las células U937. Se utilizó anfotericina B como control positivo,^{28,30} así como también, un control de viabilidad de parásitos (células infectadas), control de viabilidad celular (células no infectadas) y un blanco de medio (medio de cultivo sin células).

Procedimiento

Se preparó una suspensión de células U937 utilizando forbol-12-miristato-13-acetato 0,1 µg/mL hasta una concentración de 3x10⁵ células/mL, de la cual se dispensó 1 mL a cada pozo de un plato de 24 pozos y se incubó a 37 °C durante 48 horas.⁵ Por otro lado, se ajustó la cantidad de promastigotes hasta una concentración de 30 parásitos/célula U937.²⁸ Después de lavar las células, se adicionó en cada pozo 1 mL de suspensión de parásitos y se incubó el plato a 34 °C con 5 % de CO₂ por 3 horas,²⁸ tiempo después del cual, se lavaron con PBS los parásitos no internalizados y se incubó de nuevo a 34 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir la diferenciación a amastigotes;⁵ pasado este tiempo, se adicionaron los extractos y fracciones a las distintas concentraciones, al igual que la anfotericina B o el medio sin compuesto. Las células infectadas en presencia de cada solución se incubaron a 34 °C con 5 % de CO₂ durante 72 horas.²⁸ Finalmente, las células fueron desprendidas suavemente del fondo del plato y leídas a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión con un láser de argón en un citómetro de flujo (Cytomics FC500 MPL Beckman-Coulter).³¹

La concentración efectiva media (CE50), fue calculada por el método Probit. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en dos experimentos independientes.³⁰ Se calculó el índice de selectividad (IS) dividiendo la actividad citotóxica entre la actividad antileishmanial.²⁸

RESULTADOS

Según la identificación taxonómica, las especies vegetales empleadas en esta investigación correspondieron en efecto a *Cordia dentata* Poir. (Código JBC2507) y *Heliotropium indicum* L. (Código JBC3691) de la familia Boraginaceae. Después de realizar la clasificación y limpieza se obtuvieron 400 g para *C. dentata* y 447 g para *H. indicum*, los cuales fueron extraídos con cuatro litros de etanol y concentrados hasta obtener 80 g de extracto total para *C. dentata* y 76 g para *H. indicum*, resultando rendimientos de extracción de 20 % y 17 % respectivamente. Las fracciones fueron obtenidas a partir de 20 g del extracto total de cada especie vegetal. Por su parte, en la marcha fitoquímica se encontró que las hojas de ambas

plantas presentan siete de los ocho grupos de metabolitos secundarios evaluados (alcaloides, glucósidos cardiotónicos, cumarinas, flavonoides, taninos, derivados antracénicos, triterpenos y esteroides), exceptuando las saponinas, ya que no fueron detectadas por el método microquímico ni por cromatografía en capa delgada (tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de extracción y tamizaje fitoquímico de extractos y fracciones de *Cordia dentata* Poir. y *Heliotropium indicum* L.

Especie vegetal	Muestra	Código	Rendimiento de Extracción	Alcaloides		Cardiotónicos		Cumarinas	Flavonoides		Taninos		
				Mayer	Dragendorff	Baljet	Kedde	KOH 5% en ETOH	Shinoda	Amoniaco	FeCl ₃	Gelatina	Gelatina-NaCl
<i>Cordia dentata</i> Poir. (uvito)	Extracto total	Cd-I-4A	20,0 %	++	+++	-	-	-	++	+	+++	+	++
	Primera fracción hexano	Cd-I-4B	5,8 %	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Segunda fracción hexano	Cd-I-4C	5,8 %	+	+	-	-	++	-	-	-	-	-
	Fracción diclorometano	Cd-I-4D	31,8 %	++	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	Primera fracción acetato de etilo	Cd-I-4E	24,9 %	-	-	-	-	+	-	-	+++	++	++
	Segunda fracción acetato de etilo	Cd-I-4F	5,8 %	-	-	+	-	-	-	-	++	++	++
	Fracción metanol	Cd-I-4G	26,0 %	++	++	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Heliotropium indicum</i> L. (rabo de alacrán)	Extracto total	Hi-I-4A	17,0 %	++	++	+	+	-	++	+++	+	+	++
	Fracción hexano	Hi-I-5A	10,7 %	+	+	++	+	++	-	-	-	-	-
	Fracción diclorometano	Hi-I-5B	7,5 %	+	++	+	+	++	-	-	+	+	+
	Primera fracción acetato de etilo	Hi-I-5C	9,2 %	-	-	+	+	+	-	-	+++	+	++
	Segunda fracción acetato de etilo	Hi-I-5D	17,3 %	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	Fracción metanol	Hi-I-5E	55,3 %	+++	+++	+	+	-	++	+++	-	-	-
				MQ	TLC	TLC	MQ	TLC	MQ	TLC	TLC	MQ	MQ
Resultados:	No detectado (-)												
	Leve (+)	MQ	Prueba realizada por test microquímico										
	Moderado (++)	TLC	Prueba realizada por cromatografía en capa Fina										
	Abundante (+++)												

La actividad hemolítica (figuras 2 y 3), toxicidad en *Artemia salina* y células U937, así como también, el efecto antileishmanial en amastigotes intracelulares de extractos y fracciones de *C. dentata* y *H. indicum*, se resumen en la tabla 2.

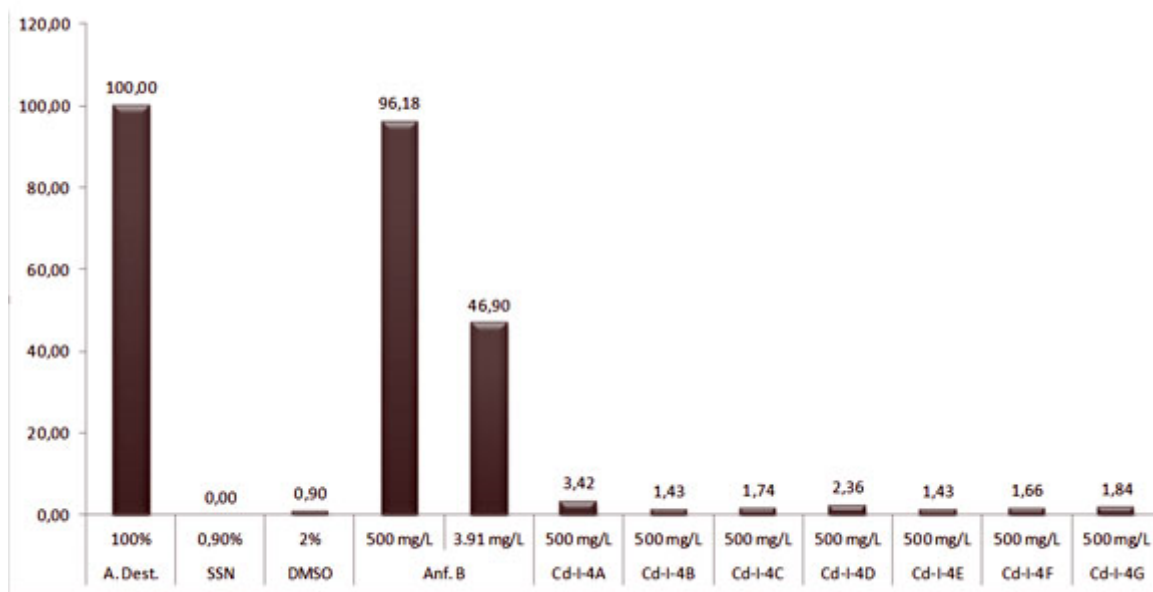


Fig. 2. Porcentaje de hemólisis de extractos y fracciones de *Cordia dentata* Poir.

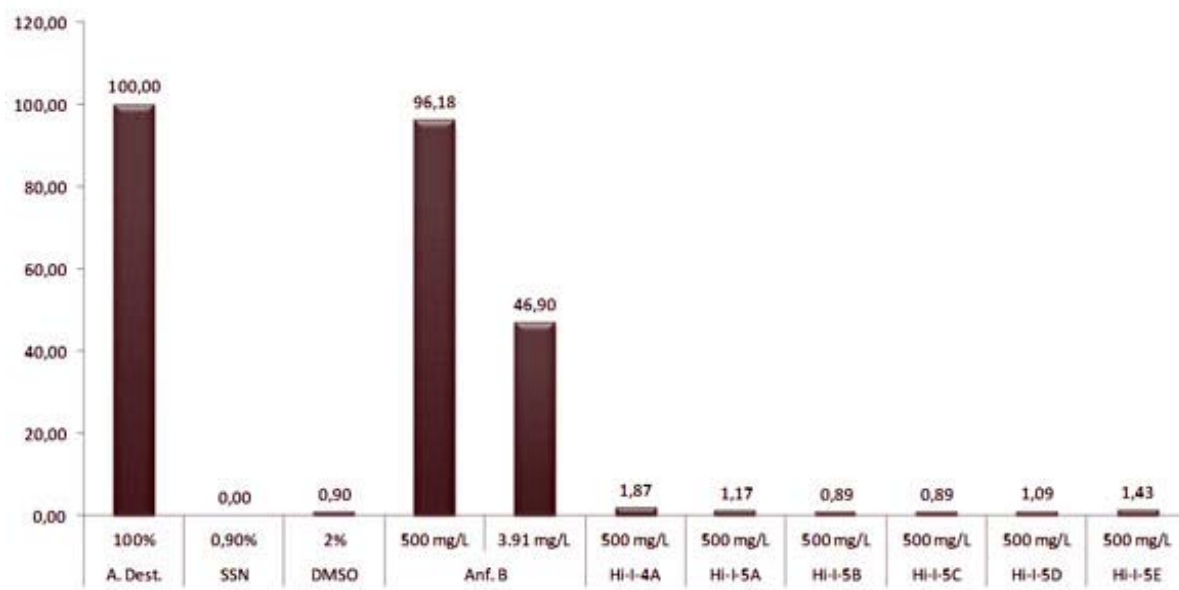


Fig. 3. Porcentaje de hemólisis de extractos y fracciones de *Heliotropium indicum* L.

Tabla 2. Evaluación biológica de extractos y fracciones de *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* L

Extractos / Fracciones (Códigos)	CH ₅₀ (mg/L)	CL ₅₀ (mg/L)	CL ₅₀ (mg/L)	CE ₅₀ (mg/L)	Índice de selectividad (IS)
	X ± CV	X ± CV	X ± CV	X ± CV	
	Glóbulos rojos O+	<i>Artemia salina</i> L.	Células U937	Amastigotes intracelulares	
Cd-I-4 ^a	> 500,0	> 200,0	> 200,0	> 100,0	ND
Cd-I-4B	> 500,0	> 200,0	> 200,0	> 100,0	ND
Cd-I-4C	> 500,0	> 200,0	> 200,0	> 100,0	ND
Cd-I-4D	> 500,0	> 200,0	94,9 ± 21,6	43,9 ± 9,8	2,6
Cd-I-4E	> 500,0	189,1 ± 15,4	99,6 ± 20,1	38,0 ± 7,9	2,6
Cd-I-4F	> 500,0	> 200,0	> 200,0	> 100,0	ND
Cd-I-4G	> 500,0	> 200,0	> 200,0	> 100,0	ND
Hi-I-4 ^a	> 500,0	> 200,0	126,3 ± 4,4	61,2 ± 19,6	2,1
Hi-I-5 ^a	> 500,0	> 200,0	141,8 ± 0,5	> 100,0	< 1,4
Hi-I-5B	> 500,0	46,8 ± 29,0	22,9 ± 4,6	18,5 ± 4,9	1,2
Hi-I-5C	> 500,0	> 200,0	84,8 ± 15,9	44,9 ± 9,8	1,9
Hi-I-5D	> 500,0	> 200,0	> 200,0	> 100,0	ND
Hi-I-5E	> 500,0	> 200,0	> 200,0	> 100,0	ND
Anfotericina B	5,20 ± 0,02	75,32 ± 28,85	33,5 ± 0,90	0,07 ± 0,01	478,6

X: Promedio; CV: Coeficiente de Variación; CH₅₀: Concentración Hemolítica Media; CL₅₀: Concentración Letal Media; CE₅₀: Concentración Efectiva Media; ND: No Determinado

Todos los extractos y fracciones mostraron ser potencialmente no hemolíticos con valores de CH₅₀>500 mg/L. Así mismo, tanto *C. dentata* como *H. indicum* manifestaron ser potencialmente no tóxicos para *A. salina*, dando CL₅₀>200 mg/L, con excepción de la primera fracción diclorometano de *H. indicum* (Hi-I-5B) que mostró ser toxica, con una CL₅₀ = 46,8 ± 29,0 mg/L.

Tanto el extracto total (Cd-I-4A) como la primera y segunda fracción hexano de *C. dentata* (Cd-I-4B y Cd-I-4C, respectivamente) al igual que la segunda fracción acetato de etilo (Cd-I-4F) y la fracción metanol (Cd-I-4G) mostraron ser potencialmente no tóxicas para células mamíferas U937, exhibiendo CL₅₀>200 mg/L mientras que las fracción diclorometano (Cd-I-4D) y la primera fracción acetato de etilo (Cd-I-4E) resultaron ser moderadamente tóxicas con valores de CL₅₀ = 99,9 ± 21,6 y 99,6 ± 20,1 mg/L, respectivamente.

Para *H. indicum*, solo la segunda fracción acetato de etilo y la fracción metanol mostraron ser potencialmente no tóxicas para células U937 con valores de $CL_{50} > 200$ mg/L. Sin embargo, la fracción diclorometano mostro ser tóxica con $CL_{50} = 22,9 \pm 4,6$ mg/L, seguida por la primera fracción acetato de etilo, el extracto total y la fracción hexano, las cuales mostraron ser moderadamente tóxicas con CL_{50} de $84,8 \pm 15,9$, $126,3 \pm 4,4$ y $141,8 \pm 0,5$ mg/L, respectivamente.

La evaluación de la actividad de extractos y fracciones contra amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* mostró para *C. dentata*, que solo la fracción diclorometano y la primera fracción acetato de etilo fueron activas, con valores de CE_{50} equivalentes a $43,9 \pm 9,8$ y $38,0 \pm 7,9$ mg/L, respectivamente. Tanto el extracto total como las demás fracciones de *C. dentata* evaluadas se consideraron sin actividad sobre los parásitos, ya que la CE_{50} fue > 100 mg/L. Por su parte, para *H. indicum* la fracción más activa resulto ser la diclorometano (Hi-I-5B), con $CE_{50} = 18,5 \pm 4,9$ mg/L, seguida de la primera fracción acetato de etilo con $CE_{50} = 44,9 \pm 9,8$ mg/L y el extracto total con $CE_{50} = 61,2 \pm 19,6$ mg/L, respectivamente. Las demás fracciones para efectos de la presente investigación no mostraron actividad contra los amastigotes intracelulares ($CE_{50} > 100$ mg/L).

DISCUSIÓN

En términos generales, los resultados del tamizaje fitoquímico coinciden con lo reportado por Li et al.³² y Oluwatoyin et al.³³ para la familia Boraginaceae. En efecto, para el género *Cordia* la literatura reporta la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides pirrolizidínicos, cordiaquinonas, triterpenos y taninos,^{34,35} y para el género *Heliotropium* alcaloides, flavonoides, triterpenos y derivados aromáticos,^{36,37} resultados que son correspondientes en gran medida a los encontrados en esta investigación. La caracterización fitoquímica para las dos especies, propuesta por varios autores, pone de manifiesto la presencia de alcaloides, taninos y saponinas como metabolitos secundarios comunes a ambas plantas,^{13,37-40} siendo las saponinas el único grupo de metabolito disímil con lo hallado en este estudio.

La distribución y abundancia relativa de flavonoides, triterpenos y esteroides fue similar en las dos especies vegetales, aun cuando para *H. indicum* se encontró en un número mayor de fracciones en contraste con *C. dentata*. Además, *H. indicum* mostró mayor contenido de glicósidos cardiotónicos que *C. dentata*, y distribuidos en mayor número de fracciones (todas excepto la Hi-I-5D). La no detección de cumarinas en los extractos totales de ambas especies vegetales pero si en sus respectivas fracciones, puede deberse a un enmascaramiento por parte de otros grupos de metabolitos revelados a nivel del extracto total, tales como alcaloides, flavonoides, taninos, derivados antracénicos, triterpenos y esteroides. En ningún extracto o fracción de las plantas estudiadas se logró la detección de saponinas, resultados que coincide con lo reportado por Meher et al.⁴¹ y Jethinlalkhosh et al.⁴² para *H. indicum*, pero difiere de lo propuesto por García et al.¹³ para *C. dentata*.

De otro lado, para el género *H. indicum* se ha reportado presencia de alcaloides en todos sus órganos en mayor o menor grado, y se logró determinar, que el fraccionamiento del extracto total de sus hojas concentra los flavonoides en fracciones de mayor polaridad, por lo que se ubican preferiblemente en la porción metanólica,^{39,40} resultados que se correlacionan fuertemente con lo mostrado en la tabla 2. Así mismo, los resultados del tamizaje fitoquímico obtenidos en esta investigación tienen un 66,7 % de similitud al efectuado por Rahman et al.,⁴⁰

siendo las saponinas y los glucósidos cardiotónicos los únicos grupos de metabolitos secundarios disimiles entre los dos estudios, lo cual podría estar fuertemente relacionado con la diferencia geográfica y ambiental entre los sitios de recolección de las muestras. Al no encontrar suficiente literatura científica sobre el perfil fitoquímico de *C. dentata*, el presente estudio aporta datos valiosos referentes a la caracterización de esta especie, los cuales podrían ayudar a explicar o sugerir potenciales efectos farmacológicos derivados de la utilización de sus hojas.

Teniendo como punto de partida, que porcentajes de hemólisis inferiores al 10 %, indican una inocuidad de las soluciones de prueba sobre el modelo experimental, y que los resultados conseguidos (figura 2 y 3) para el DMSO a la concentración ensayada (máxima utilizada para disolución de extractos y fracciones) están por debajo del 1 %, es posible sugerir que el DMSO se puede utilizar como ayudante en la disolución de extractos y fracciones derivados de productos naturales, ya que no tiene un notable efecto hemolítico en las condiciones de experimentación. Por su parte, la anfotericina B a la más baja concentración ensayada (3,91 mg/L) es capaz de generar lisis de aproximadamente el 50 % de la población de eritrocitos y a la más alta concentración (500 mg/L) destruye poco más del 96 % de las células expuestas, resultado que permite explicar el efecto hemolítico visto en pacientes con leishmaniasis y tratados con este medicamento.^{43,44}

Los extractos totales, tanto de *H. indicum* como de *C. dentata*, a la máxima concentración ensayada muestran un efecto hemolítico que resulta ser ligeramente superior al doble del promedio obtenido para sus respectivas fracciones; es así, que en el caso de *C. dentata* el valor obtenido de 3,42 resulta ser superior al promedio encontrado para sus fracciones en un 51 %, mientras que el valor de 1,87 para *H. indicum* es superior en un 58 % al promedio calculado para sus fracciones. Además, se resalta que el extracto total de *C. dentata* tiene un efecto hemolítico superior al de *H. indicum* en un 54,7 %, aunque al considerar el hecho de que el mencionado efecto se logra con una concentración de 500 mg/mL, podríamos aseverar sin lugar a duda que ninguna de las dos especies vegetales tiene la capacidad de lisar de manera aguda glóbulos rojos a las concentraciones evaluadas. Lo anterior, se puede soportar en el hecho de que los resultados del tamizaje fitoquímico dieron negativos para saponinas, las cuales representan el tipo de metabolitos secundarios más ampliamente reportados como hemolíticos.⁴⁵ En relación al bioensayo con *A. salina*, se estableció que los extractos o fracciones fueron considerados muy tóxicos cuando presentaron CL50 menores a 50 mg/L, tóxicos los que tuvieron CL50 entre 51-100 mg/L, levemente tóxicos aquellos con CL50 entre 101-200 mg/L y finalmente no tóxicos los que mostraron CL50 mayores a 200 mg/L, todo esto, con el propósito de delimitar un rango de concentraciones similar al propuesto por Valencia et al.⁴⁶ para las células U937, y de esta forma intentar correlacionar ambos bioensayos. De manera similar, la citotoxicidad en las células U937 se categorizó en tres niveles, en donde extractos con CL50 menores de 50 mg/L fueron considerados muy citotóxicos; aquellos con CL50 entre 51 mg/L y 100 mg/L medianamente citotóxicos y finalmente los que presentaron CL50 superiores a 101 mg/L poco citotóxicos.⁴⁶

Los extractos y la gran mayoría de fracciones estudiadas no tienen considerable efecto tóxico sobre larvas de *A. salina* a las concentraciones y tiempo evaluado. Además, al realizar un paralelo entre los resultados del tamizaje fitoquímico de las fracciones que dieron activas para cada planta, se podría proponer a los taninos y cumarinas como los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad ya que se encuentran presente en ambas fracciones (Cd-I-4E y Hi-I-5B), aunque, no se debe descartar que el mencionado efecto sea debido a los alcaloides, cardiotónicos, triterpenos y esteroides hallados adicionalmente en la fracción Hi-I-5B de *H. indicum*.^{8,9}

En años recientes, se ha optado por no evaluar concentraciones demasiado altas de extractos o fracciones de origen vegetal, con el propósito de no generar falsos positivos.⁴⁰ Es así, que al hacer un paralelo entre un estudio realizado en el año 2011 sobre el extracto metanólico de las raíces de *H. indicum* frente a *A. salina*⁴⁰ y la presente investigación, se logró establecer que las hojas de esta planta presentan menos efecto tóxico que sus raíces (CL50 hojas: 200 mg/L y CL50 raíces: 47.86 mg/L), posiblemente debido a la presencia de glicósidos cardiotónicos como metabolito diferencial entre los dos órganos vegetales. Por su parte, es posible afirmar que la especie *C. dentata* no tiene efecto deletéreo sobre las larvas, ya que la única fracción de esta que fue nociva, está en la categoría de levemente tóxica.

La citotoxicidad *in vitro* sobre células U937 y la actividad antileishmanial en amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*, se realizó con el propósito de calcular el índice selectividad (IS), el cual es un parámetro que permitió clasificar los extractos y fracciones como promisorios, cada vez que tomó valores mayores o iguales a dos.⁴⁷

Relacionando la información de las tablas 1 y 2, las dos fracciones más promisorias de *C. dentata*, teniendo en cuenta sus IS, presentaron grupos de metabolitos secundarios tipo alcaloides y cumarinas (fracción Cd-I-4D) y cumarinas y taninos (fracción Cd-I-4E), siendo las cumarinas un grupo de metabolitos comunes a ambas. Por su parte, en *H. indicum* las tres fracciones más promisorias hacia la búsqueda de compuestos antileishmaniales tienen alcaloides, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, taninos, derivados antracénicos, triterpenos y esteroides (fracción Hi-I-4A), alcaloides, cardiotónicos, cumarinas, taninos, triterpenos y esteroides (fracción Hi-I-5B) y cardiotónicos, cumarinas, taninos, derivados antracénicos, triterpenos y esteroides (fracción Hi-I-5C); siendo los cardiotónicos, taninos, triterpenos y esteroides comunes a todas las fracciones de esta última especie vegetal. Por lo tanto, se podría concluir que los posibles metabolitos secundarios, responsables del efecto generado por ambas especies vegetales, sobre la forma parasitaria de *L. (V.) panamensis* podrían ser de tipo alcaloide, cumarinas o taninos, teniendo mayor preferencia por los alcaloides debido a la gran cantidad de reportes existentes en la literatura científica en los que se asocia la presencia de los mismos con importantes efectos antileishmaniales, tal como lo expuso Rocha et al.⁸ en su revisión sobre productos naturales con actividad antileishmanial, en la cual, de varias moléculas activas frente a parásitos de *Leishmania*: 68 eran de tipo alcaloide, 29 triterpenoides, 19 sesquiterpenoide, 16 quinoidal, 13 flavonoide, 13 diterpenoide, 10 esteroidal, 3 cumarina y 1 monoterpenoide.

Es de destacar también los altos valores de CL50 encontrados en la mayoría de fracciones, tanto para *A. salina* como para células U937, en comparación con el fármaco de referencia, lo cual indica que es necesario buscar un mecanismo de fraccionamiento biodirigido en el que se logre aislar el o los metabolitos responsables de la actividad antileishmanial, para de esta manera mejorar los valores de CE50 y por ende el IS, sin afectar la toxicidad de los compuestos en células diferentes al parásito.

Otro resultado que se observa en la tabla 2, es que los grupos de metabolitos secundarios con mayor potencialidad para ser utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis se ubican preferiblemente en las fracciones de mediana polaridad (Cd-I-4D, Cd-I-4E, Hi-I-5B y Hi-I-5C), y entre las cuatro fracciones, aquella que merece ser explorada detalladamente en busca de moléculas antiparasitarias podría ser la Cd-I-4E, ya que mostró el segundo más alto valor de CL50 y el segundo más bajo valor de CE50, además, porque el tamizaje fitoquímico mostró resultados positivos para taninos y cumarinas, estando las cumarinas en mayor abundancia

relativa con respecto al otro grupo de metabolitos. Sin embargo, el extracto de *H. indicum* también podría ser empleado como fuente importante de moléculas antileishmaniales útiles en el tratamiento de la forma cutánea de la enfermedad por pobladores de zonas endémicas, ya que tiene baja toxicidad y una selectividad (macrófago/parásito) superior a 2,0.

Al comparar los datos de toxicidad obtenidos frente a *A. salina* y células U937 para las dos fracciones activas (Cd-I-4E y Hi-I-5B) en ambos modelos biológicos, se aprecia que la CL50 en *A. salina* es aproximadamente el doble que la conseguida con la línea celular, lo cual posiblemente sea debido a la mayor complejidad bioquímica de las larvas, por lo que se hace necesario seguir explorando cuidadosamente este comportamiento con el propósito de establecer si existe realmente una correlación útil que permita predecir el comportamiento en un modelo biológico a partir del otro.

Aún cuando existen reportes de la utilidad de frutos maduros y flores de *C. dentata* en el tratamiento de parásitos intestinales,⁴⁸ este trabajo representa la primera aproximación al estudio de esta especie vegetal, como potencial agente antileishmanial. Además, es el primer estudio que pone de manifiesto las propiedades antileishmaniales de *H. indicum* sobre amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*.

Finalmente, los datos obtenidos en esta investigación indican, una vez más, que las especies vegetales, son una fuente importante de metabolitos con bioprospección para el tratamiento de múltiples enfermedades; abriendo nuevas perspectivas de investigación sobre la flora colombiana y la quimioterapia para la leishmaniasis y otros parásitos de importancia médica.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Cartagena y Colciencias por permitir el desarrollo de esta investigación, de acuerdo con lo dispuesto en el Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores "Virginia Gutiérrez de Pineda" convocatoria nacional 525/2011. De igual forma, al profesor Fredyc Díaz director del LIFFUC de la Universidad de Cartagena-Colombia; Diana Muñoz, David Jurado y Carol Mesa, investigadores del PECET de la Universidad de Antioquia (Colombia), por la valiosa asistencia técnica brindada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO (World Health Organization). Control of the Leishmaniases: Report of a meeting of the WHO expert committee on the control of Leishmaniases. WHO Technical report Series 949, 2010. 2010. [citado Septiembre 28 de 2011]; 202 pantallas. Disponible en: URL: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf
2. Cavalli A, Bolognesi M. Neglected tropical diseases: Multi-Target-Directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. Journal of Medicinal Chemistry. 2009;52(23):7339-59. doi: 10.1021/jm9004835.
3. Taylor V, Cedeño D, Robledo S. Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. Infectio. 2011;15(4):277-288.

4. Fernando S, Siriwardana H, Guneratne K, Rajapaksa L. Some sociological aspects of cutaneous leishmaniasis in patients attending a tertiary referral centre in Colombo, Sri Lanka. *International Health*. 2010;2(1):69-74. doi: 10.1016/j.inhe.2009.12.002.
5. Varela R, Muñoz D, Robledo S, Kolli B, Dutta S, Chang K, et al. *Leishmania (Viannia) panamensis*: An *in vitro* assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Experimental Parasitology*. 2009;122(2):134-9.
6. Bacon K, Hotez P, Kruchten S, Kamhawi S, Bottazzi M, Valenzuela J, et al. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. *Vaccine*. 2013;31(3):480-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.032>
7. Oliveira L, Schubac A, Martins M, Passos S, Oliveira R, Marzochi M, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*. 2011;118(2):87-96. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.02.007.
8. Rocha L, Almeida J, Macêdo R, Barbosa-Filho J. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. 2005;12(6-7):514-35. doi: 10.1016/j.phymed.2003.10.006.
9. Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine*. 2011;18(12):1056-69. doi: 10.1016/j.phymed.2011.03.004.
10. López L, Leyva E, García R. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2011;42(1):1-12.
11. Tropicos. *Cordia dentata* Poir. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [Internet]. 2013. [citado 26 de febrero de 2013]. Disponible en: URL: <http://www.tropicos.org/Name/4001215>
12. Tropicos. *Heliotropium indicum* L. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [Internet]. 2013b. [citado el 26 de febrero de 2013]. Disponible en URL: <http://www.tropicos.org/Name/4000972>
13. García A, Abadía B, Barahona R, Sánchez S. Caracterización fitoquímica de factores antinutricionales en las hojas de uvito (*Cordia dentata* Poir). *Rev. MVZ Córdoba* 2009;14(1):1611-1623.
14. Gómez-Estrada H, Díaz-Castillo F, Franco-Ospina L, Mercado-Camargo J, Guzmán-Ledezma J, Gaitán-Ibarra R, et al. Folk medicine in the northern coast of Colombia: An overview. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2011;7(27):1-10. doi: 10.1186/1746-4269-7-27. [citado Diciembre 20 de 2012]. Disponible en URL: <http://www.ethnobiomed.com/content/7/1/27>
15. Espitia-Baena J, Duran-Sandoval H, Fandiño-Franky J, Díaz-Castillo F, Gómez-Estrada H. Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2011;16(4):337-46.
16. Dua V, Verma G, Dayal D, Kaiser M, Brun R. Antiprotozoal activities of traditional medicinal plants from the Garhwal region of North West Himalaya, India. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;136(1):123-8. doi: 10.1016/j.jep.2011.04.024.

17. Lakshmi B, Naidu K, Murthy Y, Bobbarala V, Pandit N. Bio-efficacy of some medicinal plants against pathogens of cereal crops and phytochemical examination of *Prosopis juliflora* (Sw) Dc. Journal of Pharmacy Research. 2010; 3(2): 356-60.
18. Carvajal L, Hata Y, Sierra N, Rueda D. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). Revista Colombia Forestal. 2009; 12(1): 161-70.
19. Duran H, Espitia J, Díaz F. Screening preliminar fitoquímico y estudio biológico del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. [Tesis de Pregrado]. 2009. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena.
20. Hussein E, Taj-Eldeen A, Al-Zubairi A, Elhakimi A, Al-Dubaie A. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant and antibacterial activities of callus from *Brassica nigra* L. hypocotyl explants. International Journal of Pharmacology. 2010; 6(4): 446-53.
21. Liu Z, Li N, Gao W, Man S, Yin S, Liu C. Comparative study on hemostatic, cytotoxic and hemolytic activities of different species of *Paris* L. Journal of Ethnopharmacology. 2012; 142(3): 789-94.
22. Karou S, Tchacondo T, Djikpo M, Anani K, Ouattara L, Simpore J, et al. Screening Togolese medicinal plants for few pharmacological properties. Pharmacognosy Research. 2012; 4(2): 116-22. doi: 10.4103/0974-8490.94737.
23. Holland W, Litaker R, Tomas C, Kibler S, Place A, Davenport E, et al. Differences in the toxicity of six *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species measured using an *in vitro* human erythrocyte lysis assay. *Toxicon*. 2013; 65: 15-33. [citado enero 15 de 2013]. Disponible en URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.016>
24. Fernández-Calienses A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, et al. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Rev Cubana Med Trop. 2009; 61(3): 254-8.
25. Roach J, Devappa R, Makkar H, Becker K. Isolation, stability and bioactivity of *Jatropha curcas* phorbol esters. Fitoterapia. 2012; 83(3): 586-92. doi: 10.1016/j.fitote.2012.01.001.
26. Freitas M, António J, Ziulli R, Yoshida M, Rey N, Diniz R. Synthesis and structural characterization of a zinc (II) complex of the mycobactericidal drug isoniazid - Toxicity against *Artemia salina*. Polyhedron. 2011; 30(11): 1922-1926. doi: 10.1016/j.poly.2011.04.027.
27. Fotakis G, Timbrell J. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology Letters. 2006; 160(2): 171-7. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
28. Galvis J, Muñoz D, Ocampo D, Ocampo R, Robledo S. Evaluación de la actividad leishmanicida *in vitro* de extractos de *Annona cherimolioides*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2010; 15(4): 208-17.

29. Weniger B, Robledo S, Arango J, Deharo E, Aragon R, Munoz V, et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;78(2-3):193-200.
30. Osorio E, Arango G, Jiménez N, Alzate F, Robledo S, Ruiz G, et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;111(3):630-5. doi:10.1016/j.jep.2007.01.015.
31. Pulido S, Muñoz D, Restrepo A, Mesa C, Vélez I, Robledo S, et al. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania spp.* for the *in vitro* and *in vivo* screening of antileishmanial drugs. *Acta Tropica* 2012;122(1):36-45. doi:10.1016/j.actatropica.2011.11.015.
32. Li L, Li M, Xu L, Guo N, Wu-Lan T, Shi R, et al. Distribution of seven polyphenols in several medicinal plants of Boraginaceae in China. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(12):1216-21.
33. Oluwatoyin S, Illeogbulam N, Joseph A. Phytochemical and antimicrobial studies on the aerial parts of *Heliotropium indicum* Linn. *Annals of Biological Research*. 2011;2(2):129-136.
34. Kuroyanagi M, Seki T, Hayashi T, Nagashima Y, Kawahara N, Sekita S, et al. Anti-androgenic triterpenoids from the Brazilian medicinal plant *Cordia multispicata*. *Chem. Pharm. Bull.* 2001;49(8):954-7.
35. Thirupathi K, Kumar S, Raju V, Ravikumar B, Krishna D, Krishna G. A review of medicinal plants of the genus *Cordia*: Their chemistry and pharmacological uses. *Journal of Natural Remedies*. 2008;8(1):1-10.
36. Souza J, Machado L, Pessoa O, Braz-Filho R, Overk C, Yao P, et al. Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium indicum*. *J. Braz. Chem. Soc.* 2005;16(6B):1410-4.
37. Sharma R, Singh B, Singh D, Chandrawat P. Ethnomedicinal, pharmacological properties and chemistry of some medicinal plants of Boraginaceae in India. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009;3(13):1153-1175.
38. Frölich C, Ober D, Hartmann T. Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. *Phytochemistry*. 2007;68(1):1026-37. doi:10.1016/j.phytochem.2007.01.002.
39. Dash G, Murthy P. Studies on wound healing activity of *Heliotropium indicum* Linn. leaves on rats. *ISRN Pharmacol.* 2011; Volumen 2011, Article ID 847980:1-8. doi:10.5402/2011/847980. [citado noviembre 7 de 2012]. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3198611/pdf/PHARMACOLOGY2011-847980.pdf>
40. Rahman M, Mia M, Shahid I. Pharmacological and phytochemical screen activities of roots of *Heliotropium indicum* Linn. *Pharmacologyonline*. 2011;1(1):185-192. [Consultada febrero 06 de 2013]. Disponible en URL: <http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2011/vol1/018.rahman.pdf>
41. Meher A, Panda S, Agrahari A, Pradhan A, Bhoi R. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of *Heliotropium indicum* L. stem. *Indian Journal of Novel Drug delivery*. 2011;3(4):303-6.

42. Jethinlalkhosh J, Lathika V. Screening of phytochemical constituents and antimicrobial activity of traditional medicinal plants. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2012; 3(3): 461-5.
43. Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros M, Torrado J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008; 361(1-2): 64-9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.05.013.
44. Serrano D, Hernández L, Fleire L, Torrado J, Montoya A, Ballesteros M, et al. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 447(1-2): 38-46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.038>
45. Gilabert-Oriol R, Mergel K, Thakur M, Von Mallinckrodt B, Melzig M, Fuchs H, et al. Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013; 21(8): 2387-2395. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.061>
46. Valencia L, Muñoz D, Robledo S, Echeverri F, Arango G, Vélez I, et al. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica*. 2011; 31(4): 552-559.
47. Sánchez-Suárez J, Albarracín D, Rojas M, Rincón J, Robledo S, Muñoz D, et al. Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2010; 39(1): 21-9.
48. López-Sáez J, Pérez-Soto J. Etnobotánica medicinal y parasitosis intestinales en la isla de Ometepe, Nicaragua. Instituto Politécnico Nacional (México). *Polibotánica*. 2010; 30(1): 137-61. ISSN 1405-2768. [Citado enero 17 de 2013]. Disponible en URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62114250010>

Recibido: 27 de mayo de 2013.

Aprobado: 8 de abril de 2014.

MSc. Jorge Eliecer Espitia-Baena. Universidad de Cartagena, Colombia.
Correo electrónico: jespitiab@unicartagena.edu.co