

Actividad contra *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de plantas en una Reserva Biológica de Costa Rica

Misael Chinchilla-Carmona¹, Idalia Valerio-Campos¹, Ronald Sánchez-Porras², Vanessa Bagnarello-Madrigal¹, Laura Martínez-Esquivel¹, Antonieta González-Paniagua², Javier Alpizar-Cordero¹, Maribel Cordero-Villalobos¹ & Daniela Rodríguez-Chaves¹

1. Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED), San José, Costa Rica; chinchillacm@ucimed.com, valeriaci@ucimed.com, bagnarellomv@ucimed.com, martinezal@ucimed.com, alpizarcj@ucimed.com, corderomv@ucimed.com, danirodrigu@gmail.com
2. Universidad de Costa Rica, Sede Occidente, Sección de Biología, San José, Costa Rica; rsanchez@cariari.ucr.ac.cr, agpaniagua@gmail.com

Recibido 22-XI-2013. Corregido 10-II-2014. Aceptado 13-III-2014.

Abstract: Anti-leishmanial activity in plants from a Biological Reserve of Costa Rica. Leishmaniosis is an important human disease very difficult to treat. For this reason, many researchers in the world have been looking for anti-leishmanial chemical components present in several plant species. In Costa Rica, since no studies have been done in this field, this work aimed at the search of active chemical components in local plants that may have an activity against *Leishmania* sp. A total of 67 plants were selected from the Alberto Manuel Brenes Biological Reserve (REBAMB). For these collected plants, fresh or dried hidroalcoholic extracts of root, stem, mature or young leaves, flowers, and immature or mature fruits, were prepared under conventional methods. All extracts were tested for their effect against a strain of *Leishmania* (OCR with known characteristics). Firstly, by presumptive tests, we selected only those with some activity, and then, more specific studies were done to determine the IC₅₀ in µg/mL; a promising plant was considered only if at least one of its parts presented an IC₅₀<100µg/mL. Under this parameter, the following active plants were obtained and their lowest and highest IC₅₀ obtained values presented (µg/mL): *Bocconia frutescens* (0.6 and 66.7), *Clematis dioica* (27.5 and 44.4), *Cordia megalantha* (80.0), *Eugenia austin-smithi* (90.6), *Guarea bullata* (98.8), *Guateria tonduzii* (44.4 and 66.3), *Mikania holwayana* (45.0 and 95.6), *Nectandra membranacea* (44.5 and 58.6), *Neurolaena lobata* (25.0 and 100.0), *Persea povedae* (76.9), *Piper auritum* (60.0), *Rollinia pittieri* (43.1), *Solanum arboreum* (25.8 and 72.5), *Tetrorchidium euryphyllum* (53.8 and 95.0), *Witheringia solanacea* (15.9 and 98.1) and *Zanthoxylum juniperinum* (23.4 and 97.5). Although the parasitic effect of fresh or dried extracts were almost similar, the fresh material slightly showed better results. That anti-parasitic effect occurred in one or more than four parts of the plant. Most of the active extracts did not produce lysis and agglutination which indicates a low toxicity. Since the species studied are different from those analyzed by other authors, we discuss the importance of these new findings, in relation to the new scientific knowledge, and the possible use of these plants as a leishmaniosis treatment. Rev. Biol. Trop. 62 (3): 1229-1240. Epub 2014 September 01.

Key words: leishmaniosis, *Leishmania*, medicinal plants, *in vitro*, Costa Rica.

La leishmaniosis es una entidad parasitaria compleja por el número de especies involucradas que dependen de la ubicación geográfica de las mismas, la localización corpórea en el ser humano, la patología causada, todo ello afectado por aspectos muy diversos de tipo epidemiológico e inmunológico, ampliamente

estudiados pero aún no totalmente resueltos (Dawit, Girma, & Simenew, 2012; Strazzulla et al., 2013). Esta misma diversidad se refleja también en las dificultades que se presentan en su tratamiento, tanto en relación con el tipo de fármacos usados como en la dosificación de los mismos (Lindoso, Costa, Queiroz, &

Goto, 2012). Su importancia médica es ampliamente conocida en las zonas tropicales del mundo, especialmente en su manifestación visceral, que ha causado y sigue ocasionando un número importante de muertes, especialmente cuando está asociada al virus del SIDA (Alexandrino-de-Oliveira et al., 2010). Los tipos de leishmaniosis cutáneos usualmente no causan la muerte, pero sus manifestaciones ulcerosas, no solo son estéticamente inconvenientes, sino dolorosas y proclives a infecciones secundarias bacterianas. En Costa Rica, este tipo es el más frecuente y el que ha sido más estudiado especialmente desde un punto de vista epidemiológico y de casuística humana. La revisión realizada por Jaramillo-Antillón, Espinoza-Aguirre, y Lobo-Philip (2009) es prolífica en información sobre lo conocido en este país sobre esta parasitosis. En cuanto a la leishmaniosis visceral, existe el reporte perfectamente documentado de un primer caso en Liberia, Guanacaste (Carrillo, Chinchilla, Valverde, Porras, & Mora, 1999), además de otro caso en la misma zona, cuyo diagnóstico parasitológico se hizo en su oportunidad pero no ha sido publicado. Estos hallazgos son de gran importancia y establecen una alerta, ya que como se indicó anteriormente, este tipo de leishmaniosis si puede causar la muerte.

De acuerdo con lo anterior y del hecho que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a esta enfermedad dentro de las prioritarias en el contexto mundial (WHO, 2010), los estudios sobre el tratamiento de la misma siguen siendo motivo de discusión. La razón de estos análisis emergen del hecho de que las principales drogas usadas son antimoniales de conocido efecto negativo en la función hepática, y en muchos casos las dosis necesarias para la cura completa son muy altas (Lindoso et al., 2012). Surgen entonces en el mundo diversos estudios buscando componentes activos naturales que resulten, eventualmente, con una actividad antiparasitaria similar, pero menos tóxicos (Rocha, Almeida, Macedo, & Barboza-Filho, 2005; Castillo, González-Resende, Dea, & Galiana, 2011; Brito, dos Santos, Rodríguez, Brito, & Xavier-Filho, 2013). Se conocen

trabajos en diversos países del Viejo Continente (Githinji et al., 2010; Mwangi et al., 2010; Bero, Hannaert, Chataigné, Hérent, & Quetin-Leclercq, 2011; Fattahi, Reza, Hossein, Barzegar, & Ghafourzadeh, 2011; Kakar et al., 2013), América del Sur (Luize et al., 2005; Peixoto et al., 2011; De Lima et al., 2012; Cechinel et al., 2013) así como en Centroamérica y el Caribe (Fernández-Calienes et al., 2008; García, Monzote, Scull, & Herrera, 2012). En Costa Rica, aunque existen algunos estudios de componentes antiparasitarios en plantas (Castro, Barrios, Chinchilla, & Guerrero, 1996; Chinchilla, Guerrero, Abarca, Barrios, & Castro, 1998; Chinchilla, Guerrero, Tamayo, & Sittenfeld, 2001; Calderón et al., 2010; Chinchilla et al., 2011, 2012), muy pocos de ellos se han realizado en relación con la leishmaniosis. Dada la riqueza de la biodiversidad costarricense y al encontrar en la literatura que contamos con especies de plantas de géneros en las que se han detectado componentes anti-*Leishmania*, se decidió seleccionar algunas de esas especies presentes en la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB), y realizar en ellas, los correspondientes análisis que dan origen al presente estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas: Diferentes partes de 67 especies de plantas seleccionadas previamente (Cuadro 1), de acuerdo con la posible actividad antiparasitaria contra *Leishmania* sp., fueron obtenidas de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB). Las características ambientales en donde se ubica esta Reserva han sido ampliamente descritas en trabajos previos, pero en términos generales se trata de una zona ubicada entre los 600 y 1 640m de altura, con una temperatura promedio de 21°C y una humedad relativa del 98%, todo lo cual incide en la presencia de variados climas y nichos ecológicos (Sánchez, 2000). La recolecta del material se realizó apoyándonos en las publicaciones de Barrantes (2004) y Gomez-Laurito y Ortiz (2004) y de acuerdo con metodología previamente descrita (Chinchilla et al.,

CUADRO 1
Plantas de la REBAMB estudiadas por su actividad contra *Leishmania* sp.

TABLE 1
Plants from REBAMB studied for the anti-leishmanial activity

Familia	Especie	Actividad	Partes activas
Acantaceae	<i>Aphelandra aurantiaca</i>	Negativa	Ninguna
Acantaceae	<i>Aphelandra tridentata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Beilschmieda pendula</i>	Negativa	Ninguna
Papaveraceae	<i>Bocconia frutescens</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Cecropiaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i>	Promisoria	F
Cecropiaceae	<i>Cecropia peltata</i>	Promisoria	HT
Meliaceae	<i>Cedrela odorata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Cinnamomum chavarrianum</i>	Promisoria	FI-HM-HT
Ranunculaceae	<i>Clematis dioica</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Boraginaceae	<i>Cordia cymosa</i>	Promisoria	HT
Boraginaceae	<i>Cordia megalantha</i>	Promisoria	C-HM-R
Euphorbiaceae	<i>Croton megistocarpus</i>	Promisoria	HM-HT
Euphorbiaceae	<i>Croton schiedeanus</i>	Negativa	Ninguna
Sapindaceae	<i>Cupania macrophylla</i>	Negativa	Ninguna
Myrtaceae	<i>Eugenia austin-smithii</i>	Promisoria	C
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	Promisoria	C-HM-HT
Arecaceae	<i>Euterpe precatória</i>	Negativa	Ninguna
Meliaceae	<i>Guarea bullata</i>	Promisoria	FM-HM
Meliaceae	<i>Guarea glabra</i>	Promisoria	FI
Meliaceae	<i>Guarea kunthiana</i>	Promisoria	HM
Meliaceae	<i>Guarea rhopalocarpa</i>	Promisoria	FM
Annonaceae	<i>Gutterria tonduzii</i>	Promisoria	C-FI-HM-R
Malvaceae	<i>Hampea appendiculata</i>	Negativa	Ninguna
Tiliaceae	<i>Heliocarpus appendiculatus</i>	Promisoria	C
Hernandiaceae	<i>Hernandia stenura</i>	Negativa	Ninguna
Campanulaceae	<i>Hippobroma longiflora</i>	Promisoria	FI
Apiaceae	<i>Hydrocotyle mexicana</i>	Promisoria	C-R
Arecaceae	<i>Iriartea deltoidea</i>	Promisoria	F-HM-HT
Caricaceae	<i>Jacaratia spinosa</i>	Negativa	Ninguna
Asteraceae	<i>Liabum bourgeauii</i>	Promisoria	F-HT
Fabaceae	<i>Lonchocarpus pentaphyllus</i>	Promisoria	F-FI-FM
Fabaceae	<i>Macaerium</i> sp.	Negativa	Ninguna
Asteraceae	<i>Mikania holwayana</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Urticaceae	<i>Myriocarpa longipes</i>	Promisoria	HT-R
Lauraceae	<i>Nectandra membranacea</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Asteraceae	<i>Neurolaena lobata</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Lauraceae	<i>Ocotea dentata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Persea povedae</i>	Promisoria	FM
Piperaceae	<i>Piper auritum</i>	Promisoria	F-FI-FM-HM-HT
Piperaceae	<i>Piper friedrichsthali</i>	Negativa	Ninguna
Sapotaceae	<i>Pouteria congestifolia</i>	Promisoria	F
Lauraceae	<i>Povedadaphne quadriporata</i>	Negativa	Ninguna
Rosaceae	<i>Prunus annularis</i>	Negativa	Ninguna

CUADRO 1 (Continuación) / TABLE 1 (Continued)

Familia	Especie	Actividad	Partes activas
Mirtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Promisoria	C-HM
Rubiaceae	<i>Psychotria elata</i>	Promisoria	F-FM-HM-HT
Fabaceae	<i>Pterocarpus hayesii</i>	Promisoria	HT
Fagaceae	<i>Quercus cortesii</i>	Promisoria	HT-R
Fagaceae	<i>Quercus insignis</i>	Promisoria	FI
Annonaceae	<i>Rollinia pittier</i>	Promisoria	FI
Meliaceae	<i>Ruagea glabra</i>	Promisoria	FI-FM
Anathaceae	<i>Ruellia tubiflora</i>	Promisoria	HM
Caprifoliaceae	<i>Sambucus canadensis</i>	Promisoria	C
Caesalpinaceae	<i>Senna papillosa</i>	Promisoria	FI
Siparunaceae	<i>Siparuna thecaphora</i>	Promisoria	FI
Solanaceae	<i>Solanum arboreum</i>	Promisoria	F-FI-FM-R
Solanaceae	<i>Solanum quitoense</i>	Negativa	Ninguna
Bignoniaceae	<i>Tabebuia chrysantha</i>	Promisoria	C
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana longipes</i>	Negativa	Ninguna
Anacardiaceae	<i>Tapiriria mexicana</i>	Negativa	Ninguna
Euphorbiaceae	<i>Tetrorchidium euryphyllum</i>	Promisoria	C-F-FM-HT
Ticodendraceae	<i>Ticodendron incognitum</i>	Negativa	Ninguna
Urticaceae	<i>Urera baccifera</i>	Negativa	Ninguna
Asteraceae	<i>Vernonia patens</i>	Promisoria	F-HT
Clusiaceae	<i>Vismia baccifera</i>	Promisoria	C-FI-HT
Solanaceae	<i>Witheringia solanacea</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Araceae	<i>Xanthosoma undipes</i>	Promisoria	FI
Rutaceae	<i>Zanthoxylum juniperinum</i>	Promisoria	R

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz.

2011, 2012). En síntesis, corteza, flores, hojas maduras y tiernas, así como frutos maduros e inmaduros y raíz, fueron recolectadas en bolsas plásticas que se depositaron en un recipiente con hielo para su transporte al Laboratorio de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED) en donde fue procesado todo el material.

Preparación de los extractos: Todas las partes de las plantas fueron lavadas cuidadosamente y trituradas finamente. Una porción fue usada inmediatamente constituyendo el material fresco de estudio, y otra porción fue sometida a secado y convertida en polvo fino; este material se calificó como seco para todos los efectos del estudio. Para realizar un análisis presuntivo general, se usaron 15g de material fresco o seco el cual fue colocado en frascos ámbar de 250mL para la correspondiente

extracción con 100mL de etanol al 70% por una semana, a temperatura ambiente con agitación ocasional. Estos extractos hidroalcohólicos fueron filtrados al vacío usando un embudo Büchner con papel Whatmann1 y luego concentrados a 40°C con un rotavapor (Buchi R-114); con este procedimiento se eliminó totalmente el alcohol.

Parásitos: Promastigotos de la cepa OCR (gentilmente cedida por el Dr. Rodrigo Zeledón) fueron cultivados en medio de Rugai para el mantenimiento de la cepa y específicamente para los experimentos, en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, ambos medios ampliamente conocidos.

Ensayos *in vitro*: Para hacer una selección previa de las plantas promisorias en cuanto a la actividad contra *Leishmania*, extractos crudos

frescos o secos de las diferentes partes de cada planta fueron diluidos 1:20 en solución salina buferizada (PBS) con adición de DMSO al 10% cuando fue necesario, y mezclados con aproximadamente 5×10^5 a 10^6 promastigotos. Estas muestras más los respectivos controles negativo (sin extracto) y positivo (incluyendo parásitos muertos por calor), fueron colocados a 4°C por 24 horas (Vieira et al., 2001), después de lo cual la viabilidad de los parásitos fue determinada por medio del azul tripano, técnica ampliamente conocida. La actividad antiparasitaria fue determinada estableciendo como parámetro la presencia de más del 50% de promastigotos teñidos.

Aquellos extractos positivos en esta primera prueba fueron sometidos a una segunda de confirmación de potencia del efecto. Para ello se prepararon diluciones dobles de 1:20 a 1:160 de cada extracto promisorio, se agregaron los promastigotos y se procedió con el método antes indicado. Aquellos extractos cuya viabilidad fue menor del 50% en diluciones de 1:80 en adelante, fueron considerados como positivos para el correspondiente seguimiento. Este consistió en las pruebas para determinar la concentración mínima ($\mu\text{g}/\text{mL}$) del producto activo, capaz de producir la disminución de movimiento o muerte del 50% de los organismos (CI_{50}). Para obtener este índice se realizaron diluciones seriadas del extracto de acuerdo con el peso seco previamente establecido en cada caso, procediendo luego al proceso de refrigeración por 24h y la lectura de la viabilidad de los parásitos.

Pruebas de toxicidad: Para este análisis se determinaron los efectos lítico y aglutinante de los extractos seleccionados según las pruebas anteriores y de acuerdo con el procedimiento descrito por Luize et al., (2005) con ligeras modificaciones. Brevemente, a 50 μL del extracto en diluciones de 1:20 a 1:640 se les agregó 50 μL de sangre de ratón heparinizada (heparina sódica para inyección FB 5 000 U.I./ μL . Rotex Medica, lote 30085) en una concentración del 3%. Después de permanecer 24h a 4°C, las placas con las mezclas indicadas

fueron leídas cualitativamente observando el efecto de lisis o aglutinación globular; se consideraron tóxicos aquellos extractos que presentaron esos efectos en diluciones arriba de 1:80.

El método de Probit (Díaz, Bulus, & Pica, 2004) fue usado especialmente para el cálculo de CI_{50} de la actividad antiparasitaria encontrada.

RESULTADOS

De las 67 plantas estudiadas, 47 presentaron una actividad promisorio en los análisis presuntivos iniciales (Cuadro 1). Al realizar una selección de las plantas realmente positivas por su actividad en la dilución de al menos 1:80 en algunas de sus partes, la actividad se mantuvo en casi todas ellas con la única excepción de *Rollinia pittieri*, planta que en conjunto con las consideradas negativas previamente, fueron descartadas para la realización de análisis posteriores. El cuadro 2 indica las partes de las plantas que presentaron una actividad contra *Leishmania* sp. en diluciones de 1:80 y 1:160. Como se puede observar, diferentes partes de esas plantas resultaron activas, tanto para los extractos frescos como para aquellos sometidos a desecación. Estos datos nos garantizaban una actividad medible, la cual se presenta en el cuadro 3, en donde se muestran los valores de CI_{50} para un total de 16 plantas que fueron las que evidenciaron valores menores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentración límite de actividad aceptada como importante por varios autores (Kakar et al., 2013). Se destaca la *B. frutescens* como la planta con valores de CI_{50} más bajos, lo que denota una importante actividad. Otras plantas como *C. dioica*, *M. holwayana*, *N. lobata*, *S. arboreum*, *W. solanaceae* y *Z. juniperinum* mostraron en algunas de sus partes una actividad notoria.

En el cuadro 4 se hace un análisis del tipo de extracto (fresco, seco o ambos) que mostraron resultados positivos para cada una de las partes de las plantas promisorias. Aunque el número de extractos frescos activos fue ligeramente mayor, realmente no hubo diferencias con los extractos que fueron positivos después de la desecación o en ambas condiciones, frescos y

CUADRO 2
Actividad de varias partes de plantas de la REBAMB sobre promastigotos de *Leishmania* sp.

TABLE 2
Anti-*Leishmania* activity of several parts of plants from REBAMB

Familia	Género	Actividad antiparasitaria (Dilución positiva 1/80, 1/160)													
		C		FL		FI		FM		HM		HT		R	
		F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S
Papaveraceae	<i>B. frutescens</i>	160	160	160	160	160	160	160	160		160	160	160	160	160
Cecropiaceae	<i>C. peltata</i>											160	160		
Lauraceae	<i>C. chavarrianum</i>						160				80		80		
Ranunculaceae	<i>C. dioica</i>	160		80	80	80	80	80	80	80	160	80		160	
Boraginaceae	<i>C. cymosa</i>												160		
Boraginaceae	<i>C. megalantha</i>		160								160				160
Euphorbiaceae	<i>C. megistocarpus</i>		160							160		160			
Myrtaceae	<i>E. austin-smithii</i>	160													
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	160						160			160	160	160		
Meliaceae	<i>G. bullata</i>							160			160				
Meliaceae	<i>G. glabra</i>							160							
Meliaceae	<i>G. kunthiana</i>										160				
Meliaceae	<i>G. rhopalocarpa</i>							160							
Annonaceae	<i>G. tonduzii</i>	160		80	160		80	80			80				160
Tiliaceae	<i>H. appendiculatus</i>		160												
Campanulaceae	<i>H. longiflora</i>						160								
Apiaceae	<i>H. mexicana</i>		160												160
Arecaceae	<i>I. deltoidea</i>			80	160						160	80			
Asteraceae	<i>L. bourgeauii</i>			160								160	160		
Fabaceae	<i>L. pentaphyllus</i>				160	80		160	80						
Asteraceae	<i>M. holwayana</i>	160	160	160	160					160	160	160	160	160	160
Urticaceae	<i>M. longipes</i>												160	80	
Lauraceae	<i>N. membranaceae</i>		160		160		160		160	160	160	160	160	160	80
Asteraceae	<i>N. lobata</i>		80	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	80	160
Lauraceae	<i>P. povedae</i>						160	160							
Piperaceae	<i>P. auritum</i>				160				160		160		160		
Piperaceae	<i>P. friedrichsthali</i>														160
Mirtaceae	<i>P. guajava</i>	160							80	160					
Fabaceae	<i>P. hayesii</i>												160		
Rubiaceae	<i>P. elata</i>		80			160					80				
Fagaceae	<i>Q. cortesi</i>	160										160		160	
Fagaceae	<i>Q. insignis</i>						80								
Caprifoliaceae	<i>S. canadensis</i>	160													
Anonaceae	<i>Rollinia pittier</i>				160										
Meliaceae	<i>R. glabra</i>					160		80							
Acanthaceae	<i>R. tubiflora</i>										160				
Caesalpinaceae	<i>S. papillosa</i>					160									
Siparunaceae	<i>S. thecaphora</i>					160									
Solanaceae	<i>S. arboreum</i>				160	160		160	160		160				160
Bignoniaceae	<i>T. chrysantha</i>		160												160
Euphorbiaceae	<i>T. euryphyllum</i>		160						160						
Clusiaceae	<i>V. baccifera</i>		160		160	160							160		
Solanaceae	<i>W. solanacea</i>	160	160	160	160	160			160		160	160	160		160
Araceae	<i>X. undipes</i>					160									
Rutaceae	<i>Z. juniperinum</i>	160													160

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz.

CUADRO 3
Concentración mínima inhibitoria anti-*Leishmania* sp. (CI₅₀, µg/mL) de los extractos frescos (F) y secos (S) de las partes positivas de plantas de la REBAMB

TABLE 3
Minimal inhibitory concentration anti-*Leishmania* sp. (IC₅₀, µg/mL) of the fresh (F) and dry (S) extracts of the positive parts of plants from REBAMB

Especie	Parte de la planta													
	C		FL		FI		FM		HM		HT		R	
	F	S	F	S	f	s	F	S	F	S	F	S	F	S
<i>B. frutescens</i>	9.7	2.8	56.9	38.1	7.5	12.5	6.3	6.4		66.7	30.3	10.8	0.6	3.5
<i>C. dioica</i>	44.4													27.5
<i>C. megalantha</i>		80.0												
<i>E. austin-smithii</i>	90.6													
<i>G. bullata</i>							98.8							
<i>G. tonduzii</i>		53.8				66.3								44.4
<i>M. holwayana</i>	45.0	53.1	65.6								49.2		95.6	
<i>N. membranacea</i>									44.5		58.6			
<i>N. lobata</i>	81.3	100.0			52.8		25.0	46.4	79.4					
<i>P. povedae</i>								76.9						
<i>P. auritum</i>										60.0*				
<i>R. pittieri</i>				43.1										
<i>S. arboreum</i>				53.2		72.5	56.3	72.5						25.8
<i>T. euryphyllum</i>		53.8					95				93.8			
<i>W. solanacea</i>	15.9		76.9		98.1						34.1	82.5		96.3
<i>Z. juniperinum</i>	23.4													97.5

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz, f:fresco, s:seco.

CUADRO 4
Distribución de los extractos positivos (CI₅₀<100µg/mL) según parte de la planta y tipo de extracto

TABLE 4
Distribution of the positive extracts (IC₅₀<100µg/mL) according to part of the plant and extract type

Tipo de extracto	Partes de la planta															
	C		F		FI		FM		HM		HT		R		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Fresco solo	4	23.5	2	11.8	2	11.8	2	11.8	2	11.8	3	17.6	2	11.8	17	41.5
Seco solo	3	21.3	2	14.3	2	14.3	1	7.1	1	7.1	0	0	4	28.6	14	34.1
Fresco y seco	3	30.0	1	10.0	1	10.0	3	30.0	0	0.0	2	20.0	1	10.0	10	24.3
TOTAL	10	24.4	5	12.2	5	12.2	6	14.6	3	7.3	5	12.2	7	17.1	41	100.0

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz.

secos. En la figura 1 se establece el número y el correspondiente porcentaje de plantas con 1, 2, 3, 4 y más de 4 partes positivas. Por la importancia que tiene el efecto tóxico que pueden

presentar las plantas con acción antiparasitaria, en el cuadro 5 se muestra el grado de actividad lítica y aglutinante de cada uno de los extractos positivos. Cabe destacar que de acuerdo con

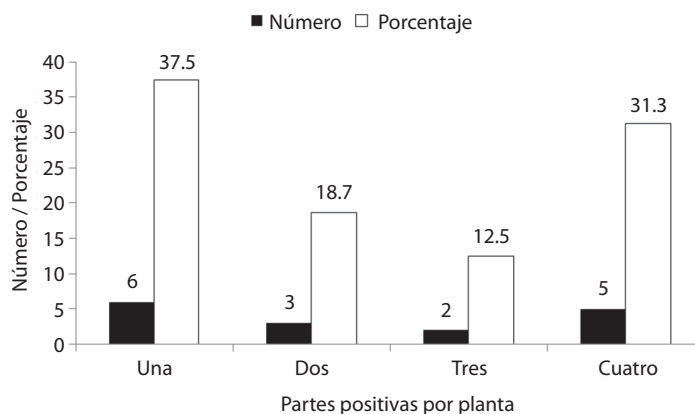


Fig. 1. Distribución de las plantas de acuerdo con el número de sus partes activas contra *Leishmania* sp.
Fig. 1. Distribution of the plants according to the number of active parts against *Leishmania* sp.

CUADRO 5

Relación entre la toxicidad máxima *in vitro* (diluciones 1:80, 1:160) y la actividad contra *Leishmania* sp. de las partes positivas de plantas de la REBAMB

TABLE 5

Relation between the maximum *in vitro* toxicity (dilutions 1:80, 1:160) and the anti-*Leishmania* sp. activity of the positive parts from plants from REBAMB

Especie	Actividad Lítica o Aglutinante				
	Ligera		Intensa		Ausente
	1:80	1:160	1:80	1:160	
<i>B. frutescens</i>	F,Fs	FIs			C,F, FI,FM, HT, R, FMs, HMs, HTs, Rs
<i>C. dioica</i>					C, F, FI, FM, R, Fs, FIs, HMs
<i>C. megalantha</i>	Cs				
<i>E. austin-smithii</i>					C
<i>G. bullata</i>					FM
<i>G. tonduzii</i>	Rs			FI	Cs
<i>M. holwayana</i>		HT		R	C, F, Cs,
<i>N. membranacea</i>				HM, HT	Fs
<i>N. lobata</i>					C,F,FI, HM, Cs, FMs
<i>P. povedae</i>					FMs
<i>P. auritum</i>					HMs
<i>R. pittier</i>	Fs				
<i>S. arboreum</i>					FM ,HT, Fs, FIs, FMs
<i>T. euryphyllum</i>					FM, HT, Fs
<i>W. solanacea</i>				C, F, HT, HTs	FI, Rs
<i>Z. juniperinum</i>	Cs				Rs

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz, s: extracto seco.

nuestro modelo *in vitro* del efecto sobre eritrocitos, la gran mayoría de los extractos presentaron muy baja toxicidad.

DISCUSIÓN

Los fármacos usados hasta ahora contra la leishmaniosis son sumamente tóxicos (Lindoso et al., 2012) por lo que existe coincidencia en que es necesario el hallazgo de nuevos productos efectivos contra esta parasitosis, que sean más tolerables. En Costa Rica actualmente las investigaciones con plantas como antiparasitarios, se circunscriben a unos pocos estudios en relación con la toxoplasmosis (Chinchilla, Marín, & Catarinella, 1990) y con la malaria (Castro et al., 1996; Chinchilla et al., 2011, 2012). Conociendo que en nuestro país existe la leishmaniosis cutánea desde hace mucho tiempo (Jaramillo-Antillón et al., 2009), y más recientemente la visceral (Carrillo et al., 1999), se hacía necesario indagar si tenemos plantas con componentes químicos con actividad contra *Leishmania* sp. Como se puede observar por la secuencia de datos obtenidos, las 67 plantas estudiadas fueron sometidas a estudios piloto que sirvieron de filtro para así descartar plantas sin ninguna o escasa actividad contra el parásito en estudio; después de este proceso, se seleccionaron 16 especies con CI_{50} menor a $100\mu\text{g/mL}$, límite escogido de acuerdo con los reportes de otros autores (Kakar et al., 2013) que lo estimaron adecuado, y considerando que para obtener una cantidad mayor a esa para obtener algún efecto, se necesitaría una cantidad inapropiada y poco práctica de materia prima. El hecho de que existe una ligera diferencia a favor del número de extractos activos frescos, en relación con los desecados, nos indica la importancia del estudio del material recién recolectado; esto se puede considerar congruente con el hecho de que muchos de los tratamientos populares con plantas se hace con material fresco (Idowu, Soniral, Ajana, & Aworinde, 2010). Llama la atención de que no todas las partes de las plantas mostraron la actividad antiparasitaria; en efecto el máximo de partes positivas por plantas fue de cuatro, sin

que se observaran diferencias notorias entre la positividad de cada parte.

Aunque algunos de los géneros encontrados positivos en este estudio son similares a los encontrados en otros países, como se indica a continuación, nuestras especies con componentes activos contra *Leishmania* sp. no han sido reportados aún. Varias partes de *B. frutescens*, por ejemplo, presentaron una actividad importante contra este parásito lo cual se ha observado para otras especies como *B. integrifolia* y *B. pearcei* (Fournet, Barrios, & Muñoz, 1994), pero para nuestra especie, los datos que se conocen son ambiguos y limitados a reportes muy superficiales. El más puntual es un poster presentado en una actividad de investigación estudiantil en que se menciona que extractos crudos de semilla de *B. frutescens* presentaron actividad contra *L. tarentolae* con un CI_{50} de $2.61\mu\text{g/mL}$ (Jansen, 2011). Dentro del género *Clematis* se informa en un reporte tecnológico de Costa Rica el hallazgo de actividad anti-leishmania en *C. acapulcensis* (Moreira-González & Arnáez-Serrano, 2004), pero no se suministra información sobre *C. dioica* cuya raíz en nuestro caso, resultó bastante activa. *M. holwayana*, en que varias de sus partes presentaron algún grado de actividad, se relaciona con *M. micrantha* estudiada en Argentina por Laurella et al., (2012) y *M. glomerata* (Luize et al., 2005), reportadas también como portadoras de componentes anti-leishmaniásicos importantes. *N. lobata* fue reportada por Berger, Passreiter, Cáceres, & Kubelka (2001) con actividad considerable contra este parásito, lo cual concuerda con nuestros resultados. No encontramos reportes para *S. arboreum* y *W. solanacea*. Sin embargo, en este estudio se determinó que la raíz en la primera y la corteza en la segunda, mostraron una actividad llamativa; estos hallazgos pueden considerarse entonces como los primeros para estas plantas.

La poca actividad lítica de eritrocitos, prueba usada para demostrar toxicidad, de la mayoría de los extractos promisorios, es un aspecto positivo en cuanto al eventual uso que se le vaya a dar a los componentes que se identifiquen en las plantas seleccionadas. El

hecho de que éstas se encuentran ubicadas en una zona protegida como la Reserva Biológica, garantiza la permanencia y disponibilidad de las mismas por muchos años, lo cual comienza a ser motivo de preocupación en otros países en que plantas con actividad antiparasitaria están en riesgo de extinción (Dharani et al., 2010).

Este tipo de estudios contribuyen al incremento del acervo cultural y científico de Costa Rica; además, abren las puertas al conocimiento de componentes químicos que extraídos de la rica biodiversidad costarricense, podrían eventualmente, proporcionar un aporte positivo a la salud humana por medio del tratamiento de enfermedades que como la leishmaniosis, están presentes en todas las zonas tropicales del mundo. Este estudio también incorporó el conocimiento de nuevas especies de plantas con actividad contra *Leishmania*, con relevancia internacional. La identificación específica de los componentes químicos que se relacionan con la actividad observada, son motivo de varios estudios que se llevan a cabo en nuestros laboratorios.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue patrocinado en parte por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por medio de los proyectos FI-291-09 y FI-490-2011, el Departamento de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED) y el Centro Regional de Occidente, Universidad de Costa Rica. Agradecimiento especial para Víctor Mora por su ayuda en la identificación de las plantas, a Juan Carlos Vanegas por su colaboración en los análisis estadísticos, a Laura Valerio encargada de la logística del proyecto y a los señores José Bolaños, Luis León y Hugo Pérez, por su labor asistencial y manejo de los roedores que se usan en los experimentos. Los autores agradecen al Dr. Rodrigo Zeledón por el suministro de la cepa OCR de *Leishmania* sp. También a un grupo de estudiantes de la UCIMED que colaboraron en el proyecto.

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad muy importante para el ser humano pero su tratamiento es bastante difícil. Por esta razón muchos investigadores han venido buscando plantas que contengan componentes químicos activos contra esta parasitosis. En Costa Rica no se tienen estudios al respecto y por eso el objetivo de este estudio fue la búsqueda de componentes activos contra *Leishmania* sp. en plantas de Costa Rica; 67 especies de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB) fueron seleccionadas para realizar este trabajo. Para ello se prepararon extractos crudos hidro-alcohólicos de material fresco o desecado de raíz, tallo, hojas maduras o tiernas, flores y frutos inmaduros o maduros. Usando pruebas presuntivas y luego específicas, se analizó el efecto de tales extractos sobre una cepa de *Leishmania* (OCR). Se consideraron plantas promisorias solamente aquellas en que al menos una de sus partes presentara un $CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. Las plantas seleccionadas fueron: *Bocconia frutescens*, *Clematis dioica*, *Cordia megalantha*, *Eugenia austin-smithii*, *Guarea bullata*, *Guateria tonduzii*, *Mikania holwayana*, *Nectandra membranacea*, *Neurolaena lobata*, *Persea povedae*, *Piper auritum*, *Rollinia pittieri*, *Solanum arboreum*, *Tetrorchidium euryphyllum*, *Witheringia solanacea* y *Zanthoxylum juniperinum*. Existió una ligera tendencia de positividad mayor para los extractos frescos y la actividad se presentó en una y hasta más de cuatro partes de la planta. La mayoría de los extractos activos no fueron tóxicos. Se discute la importancia de estos nuevos hallazgos, en relación con el nuevo conocimiento científico y su proyección en el tratamiento de la leishmaniosis.

Palabras clave: *in vitro*, *Leishmania*, leishmaniosis, plantas medicinales, Costa Rica.

REFERENCIAS

- Alexandrino-de-Oliveira, P., Reis Santos-Oliveira, J., Cavalheiros Dorval, M. E., das Chagas Brandão Da-Costa, F., Oliveira Leite Pereira, G. R., da Cunha, R. V., Mello Miranda Paniago, A., & Da-Cruz, A. M. (2010). HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(5), 692-697.
- Barrantes Lobo, T. (2004). *Flora del sotobosque de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes*. San Ramón, Alajuela, Universidad de Costa Rica: Coordinación de Investigación, Sede de Occidente. Recuperado de <http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/8982/>
- Berger, I., Passreiter, C. M., Cáceres, A., & Kubelka, W. (2001). Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. *Phytotherapy Research*, 15, 327-330.

- Bero, J., Hannaert, V., Chataigné, G., Hérent, M. F., & Quetin-Leclercq, J. (2011). In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. *Journal Ethnopharmacology*, *137*, 998-1002.
- Brito, A. M. G., dos Santos, D., Rodrigues, S. A., Brito, R. G., & Xavier-Filho, L. (2013). Plants with anti-*Leishmania* activity: Integrative review from 2000 to 2011. *Pharmacognosy Reviews*, *7*(13), 34-41.
- Calderón, A. I., Romero, L. I., Ortega-Barría, E., Solís, P. N., Zacchino, S., Gimenez, A., Pinzón, R., Cáceres, A., Tamayo, G., Guerra, C., Espinosa, A., Correa, M., & Gupta, M. P. (2010). Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology*, *48*, 545-53.
- Carrillo, J., Chinchilla, M., Valverde, B., Porras, O., & Mora, L. (1999). Visceral leishmaniasis in Costa Rica: first case report. *Clinical Infectious Diseases*, *29*, 678-679.
- Castillo, E., González-Rosende, M. E., Dea, M. A., & Galiana, C. (2011). Productos naturales con actividad leishmanicida y tripanocida. *Revista de fitoterapia*, *11*, 149-156.
- Castro, O., Barrios, M., Chinchilla, M., & Guerrero, O. M. (1996). Evaluación química y biológica del efecto de extractos de plantas contra *Plasmodium berghei*. *Revista de Biología Tropical*, *44*, 361-367.
- Cechinel Filho, V., Meyre-Silva, C., Niero, R., Bolda Mariano, L. N., Gomes do Nascimento, F., Vicente Farias, I., Gazoni, V. F., dos Santos Silva, B., Giménez, A., Gutierrez-Yapu, D., Salamanca, E., & Malheiros, A. (2013). Evaluation of Antileishmanial Activity of Selected Brazilian Plants and Identification of the Active Principles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*. doi:10.1155/2013/265025
- Chinchilla, M., Guerrero, O. M., Tamayo, G., & Sittenfeld, A. (2001). Empleo de técnicas y materiales biológicos en la búsqueda de productos activos contra la malaria. *Información Tecnológica*, *12*, 187-192.
- Chinchilla, M., Valerio, I., Sánchez, R., Mora, V., Bagnarello, V., Martínez, L., González, A., Vanegas, J. C., & Apéstegui, A. (2012). In vitro antimalarial activity of extracts of some plants from a biological reserve in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, *60*, 881-891.
- Chinchilla, M., Valerio, I., Sánchez, R., Mora, V., Bagnarello, V., Martínez, L., González, A., & Vanegas, J. C. (2011). Evaluación in vivo de la actividad antimalárica de 25 plantas provenientes de una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica. *Revista Chilena de Historia Natural*, *84*, 115-123.
- Chinchilla, M., Guerrero, O. M., Abarca, G., Barrios, M., & Castro, O. (1998). An *in vivo* model to study the anti-malaric capacity of plant extracts. *Revista de Biología Tropical*, *46*, 35-39.
- Chinchilla, M., Marín, R., & Catarinella, G. (1990). Increase of sulfadiazine effect against *Toxoplasma gondii* by using watermelon or cantaloupe seeds. *Revista de Biología Tropical*, *38*, 235-241.
- Dawit, G., Girma, Z., & Simenew, K. (2012). A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Acta Parasitológica Globalis*, *3*, 43-53.
- De Lima, J. P. S., Pinheiro, M. L. B., Santos, A. M. G., Pereira, J. L. S., Santos, D. M. F., Barison, A., Silva-Jardim, I., & Costa, E. V. (2012). In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, *4*, 692-702.
- Dharani, N., Rukunga, G., Yenesew, A., Mborra, A., Mwaura, L., Dawson, I., & Jamnadass, R. (2010). *Common Antimalarial Trees and Shrubs of East Africa: a Description of Species and a Guide to Cultivation and Conservation Through Use*. Nairobi: The World Agroforestry Centre (ICRAF).
- Díaz Báez, M. C., Bulos Rossini, G. D., & Pica Granados, Y. (2004). Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. In G. Castillo-Morales (Ed.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas* (pp. 99-124). México: IMTA.
- Fattahi, A., Reza, A., Hossein, M., Barzegar, K., & Ghafourzadeh, M. (2011). The in vivo antileishmanial activity of alcoholic extract from *Nigella sativa* seeds. *African Journal of Microbiology Research*, *5*, 1504-1510.
- Fernández-Calienes, A., Mendiola, J., Scull, R., Vermeersch, M., Cos, P., & Maes, L. (2008). In vitro anti-microbial activity of the Cuban medicinal plants *Simarouba glauca* DC, *Melaleuca leucadendron* L and *Artemisia absinthium* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*, 615-618.
- Fournet, A., Barrios, A. A., & Muñoz, V. (1994). Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *Ethnopharmacology*, *41*, 19-37.
- García, M., Monzote, L., Scull, R., & Herrera, P. (2012). Activity of Cuban Plants Extracts against *Leishmania amazonensis*. *ISRN Pharmacology*, *2012*. doi: 10.5402/2012/104540
- Githinji, E. K. G., Irungu, L. W., Tonui, W. K., Rukunga, G. M., Mutai, C., Muthaura, C., Lugalia, N. R., Gikandi, G., Wainaina, C. W., Ingonga, J. M., & Wanjoya, A. (2010). In vitro effects of *Warburgia ugandensis*, *Psidia punctulata* and *Chasmanthera dependens* on *Leishmania major* promastigotes. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*, *7*, 264-275.

- Gómez-Laurito, J., & Ortiz, R. (2004). Lista con anotaciones de las angiospermas de la Reserva Biológica Alberto Brenes (Microcuencas de los ríos San Lorenzo y San Lorencito), Costa Rica. *Lankesteriana*, 4, 113-142.
- Idowu, O. A., Sonirai, O. T., Ajana, O., & Aworinde, D. O. (2010). Ethnobotanical Survey of antimalarial plants used in Ogun State, Southwest Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4, 55-60.
- Jansen, E. (2011). Screening extracts from the tropical pioneer plants *Bocconia frutescens*, *Guettarda poasana*, and *Phytolacca rivinoides* for anti-parasitic activity. 10th annual celebration for undergraduate research and creative performance. Recuperado de http://digitalcommons.hope.edu/curcp_10/156/.
- Jaramillo-Antillón, O., Espinoza-Aguirre, A., & Lobo-Philip, R. (2009). Estado actual de la leishmaniasis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 51, 158-164.
- Kakar, A. M., Khan, A. A., Nabi, S., Kakar, M. A., Yasin-zai, M., & Al-Kahraman, M. S. A. (2013). In vitro antileishmanial, cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Thuspeinanta brahuica* leaves extract and its fractions. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 520-528.
- Laurella, L. C., Frank, F. M., Sarquiz, A., Alonso, M. R., Giberti, G., Cavallaro, L., Catalan, C. A., Cazorla, S. I., Malchiodi, E., Martino, V. S., & Sulsén, V. P. (2012). In vitro evaluation of antiprotozoal and antiviral activities of extracts from argentinean *Mikania* species. *The Scientific World Journal*, 2012. doi:10.1100/2012/121253
- Lindoso, J. A., Costa, J. M., Queiroz, I. T., & Goto, H. (2012). Review of the current treatments for leishmaniasis. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 3, 69-77.
- Luize, P. S., Tiunan, T. S., Morello, L. G., Korehiza, P., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B. P., Cortez, D. A. G., Mello, J. C. P., & Nakamura, C. V. (2005). Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 85-94.
- Moreira-González, I., & Arnáez-Serrano, E. (2004). Distribución y fenología de *Hippobroma longiflora* Campanulaceae y *Clematis acapulcensis* Ranunculaceae y su actividad biológica sobre Leishmaniasis. *Tecnología en marcha*, 17, 31-39.
- Mwangi, E. S. K., Keriko, J. M., Machocho, A. K., Wanyonyi, A. W., Malebo, H. M., Chhabra, S. C., & Tarus, P. K. (2010). Antiprotozoal activity and cytotoxicity of metabolites from leaves of *Teclea trichocarpa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 726-731.
- Oseni, L. A., Suleman D., & Samson, A. A. (2013). Natural products in antileishmanial drug discovery: a review. *Journal of Asian Scientific Research*, 3, 157-173.
- Peixoto, J. A., Andrade, M. L., Crotti, A. E. M., Veneziani, R. C., Gimenez, V. M. M., Januário, A. H., Groppo, M., Magalhães, L. G. M., dos Santos, F. F., Albuquerque, S., da Silva, A. A., & Cunha, W. R. (2011). Antileishmanial activity of the hydroalcoholic extract of *Miconia langsdorffii*, isolated compounds, and semi-synthetic derivatives. *Molecules*, 6, 1825-1833.
- Rocha, L. G., Almeida, J. R. G. S., Macedo, R. O., & Barboza-Filho, J. M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12, 514-535.
- Sánchez, R. (2000). *Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes*. San José, Costa Rica.
- Strazzulla, A., Cocuzza, S., Pinzone, M. R., Postorino, M. C., Cosentino, S., Serra, A., Cacopardo, B., & Nunnari, G. (2013). Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. *BioMed Research International*, 2013. Recuperado de www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853773.
- Vieira, P. C., Mafezoli, J., Pupo, M. T., Fernandes, J. B., Das, M. F., da Silva, G. F., Albuquerque, S., Oliva, G., & Pavão, F. (2001). Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 617-622.
- World Health Organization. (2010). *Working to overcome the global impact of neglected tropical disease*. (First WHO Report on Neglected Disease). Geneva: World Health Organization.