

## **Actividad anti-*Leishmania in vitro* de los extractos naturales obtenidos de *Crescentia cujete* y *Piper aduncum***

[*In vitro* anti-*Leishmania* activity of the natural extracts obtained from *Crescentia cujete* and *Piper aduncum*]

**Angélica M Posada Bermúdez**

Estudiante biología universidad EAFIT

Contacto: [aposad17@eafit.edu.co](mailto:aposad17@eafit.edu.co)

---

**Abstract:** The present study aimed to measure *in vitro* anti-*Leishmania* activity of leaf extract in water, leaves plus stems in water and leaves in ethanol obtained from *Crescentia cujete* and *Piper aduncum*, to achieve this, cytotoxicity was calculated which for all extracts it was high (LC<sub>50</sub>: <100 µg/mL). The anti-*Leishmania* activity was also determined and even though values are in the high activity range (EC<sub>50</sub>: <25 µg/mL), by taking into account low results of selectivity index (SI), it is possible to affirm that it is due to cell death, hence of parasites, although their death is not because of extracts. In conclusion, extracts present more cytotoxicity than activity.

**Keywords:** Natural extracts, *Crescentia cujete*, *Piper aduncum*, cytotoxicity, antileishmanial activity.

**Resumen:** El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad anti-*Leishmania in vitro* de los extractos de las hojas en agua, las hojas más tallos en agua y hojas en etanol obtenidos de *Crescentia cujete* y *Piper aduncum*, para esto, se calculó la citotoxicidad, que para todos los extractos fue alta (CL<sub>50</sub>: <100 µg/mL). Se determinó también la actividad anti-*Leishmania* y aunque los valores están dentro del rango de actividad alta (CE<sub>50</sub>: <25 µg/mL), al tener en cuenta los resultados bajos del índice de selectividad (IS), es posible afirmar que se debe es a la muerte de la células y por ende de los parásitos más no por la muerte de estos a causa de los extractos. En conclusión, los extractos presentan más citotoxicidad que actividad.

**Palabras clave:** Extractos naturales, *Crescentia cujete*, *Piper aduncum*, citotoxicidad, actividad anti-*Leishmania*.

## Introducción

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *leishmania*, es transmitida por un vector flebótomo hembra del género *Lutzomyia*, en las américas y *Phlebotomus* en el viejo mundo (Singh *et al.*, 2014; Arrivillaga-Henríquez *et al.*, 2017). Esta forma de la enfermedad se caracteriza por lesiones inicialmente en forma de pápula, las cuales, se transforman en nódulos que posteriormente se ulceran, estas úlceras son rosadas de forma redondeada, con bordes elevados y puede estar o no con costra (Sanchez, 2019). Se estima que cada año ocurre aproximadamente de 0,7 a 1,2 millones de casos de leishmaniasis cutánea en el mundo, en Colombia es la forma más común de la enfermedad con el 98,5% de los casos (Alvar *et al.*, 2012; Anónimo, 2019).

Los medicamentos más utilizados para tratar la enfermedad incluyen los antimoniales pentavalentes; otras opciones son el isetionato de pentamidina, la miltefosina, la anfotericina B y la anfotericina B liposomal (Sanchez, 2019; Singh *et al.*, 2012), sin embargo, los efectos secundarios de estos medicamentos debido a la alta toxicidad de los mismos, los costos elevados, la diferente respuesta del medicamento dependiendo de la cepa y la resistencia a los medicamentos hacen que sea una necesidad el desarrollo de nuevas y mejores alternativas para tratar la enfermedad (Murillo *et al.*, 2019; Osorio *et al.*, 2007).

Debido a la escasez de fármacos para tratar la leishmaniasis cutánea, la búsqueda de alternativas basadas en plantas medicinales para la obtención de nuevos compuestos con actividad superior y sin efectos secundarios graves son necesarios. Además, la gran mayoría de personas expuestas a la enfermedad viven en zonas endémicas, con dificultades para acceder a los servicios de salud, por lo que acuden a tratamientos con base en la medicina tradicional (Osorio *et al.*, 2007).

La familia de plantas Bignoniaceae incluye 120 géneros con 800 especies, y algunas de ellas han mostrado actividad significativa en contra de promastigotes de *Leishmania* (Mostafa *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2004; Malerich *et al.*, 2013). De esta familia se ha demostrado que metabolitos secundarios presentes en la misma como las naftoquinonas, y sus derivados como el lapachol, la alkanina y la shikonina han mostrado tener diversas actividades, entre esas, actividad antiparasitaria (González *et al.*, 2013). Del mismo modo, la familia de plantas Piperaceae incluye 13 géneros con 3600 especies, los cuales, también han demostrado actividad anti-*Leishmania* (Kwete, 2017; Marques *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2010). De esta familia se ha demostrado que metabolitos secundarios presentes en la misma como el nerolidol, el lialool y el gibbilimol B han mostrado tener actividad leishmanicida (De Oliveira *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2010). Además, especies de ambas familias han sido utilizadas para tratar afecciones en la piel (Hernández-Rivas y Campos-Sosa, 2007; Aguilar-Ovando, 2019).

Dado el uso tradicional y la actividad anti-*Leishmania* demostrada para algunas especies de estas dos familias, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la actividad antileishmania *in vitro* de los extractos de las hojas en agua, las hojas más tallos en agua y hojas en etanol obtenidos de *Crescentia cujete* (Bignoniaceae) y *Piper aduncum* (Piperaceae).

## Metodología

### Material vegetal y obtención de los extractos:

La selección de las plantas se basó en la literatura reportada para plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones de la piel (Mostafa *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2004; Malerich *et al.*, 2013; Kuete, 2017; Marques *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2010; Hernandez-Rivas y Campos-Sosa, 2007; Aguilar-Ovando, 2019). Adicionalmente se tuvo en cuenta la facilidad de obtención de las mismas.

Las plantas elegidas fueron *Crescentia cujete* (*C. cujete*) y *Piper aduncum* (*P. aduncum*), ambas recolectadas en el municipio de Santa fe de Antioquia.

El método utilizado para la obtención de los extractos fue la percolación. Para ello, luego del secado y molido de las hojas, una porción se dejó en agua y otra porción se dejó en etanol. Por su parte, la combinación de tallos y hojas se dejó en agua. Las cantidades de material vegetal (en gramos) y el volumen de solvente (agua o etanol) se detallan en la Tabla 1.

El material se dejó un sitio oscuro durante ocho días, luego se procedió a filtrar el material y una vez filtrados se agregaron 100 mL de estos filtrados a cada recipiente para luego secar durante 72 horas en el horno de venteo.

**Tabla 1: Medidas utilizadas de las plantas y los solventes**

Planta	Hojas (Agua)		Hojas (Etanol 98%)		Hojas y tallos (Agua)		
	g	mL	g	mL	g tallo	g hojas	mL
<i>Crescentia cujete</i>	32.96	800	32.95	250	32.90	32.90	1500
<i>Piper aduncum</i>	81.62	1500	81.60	250	81.67	81.67	1500

### **Evaluación de la citotoxicidad:**

La actividad citotóxica de los extractos se evaluó sobre la línea celular de promonocitos humanos U937, obtenidas de médula ósea, siguiendo la metodología descrita por Weniger y col. (2001) con ciertas modificaciones. Las células se cultivaron en platos de 96 pozos a una concentración de 200.000 células/mL en medio RPMI con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Los compuestos fueron agregados a concentraciones entre 200 y 1,675  $\mu\text{g/mL}$ . Como control de toxicidad se evaluó la doxorubicina a las mismas concentraciones. Como control negativo se incluyeron células no expuestas a ninguna sustancia diferente al medio de cultivo. Las células expuestas a los extractos y a la doxorubicina se incubaron durante 72 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez pasado este tiempo se procedió a agregar 20  $\mu\text{L}$  de bromuro de 3-(5,4 dimetil tizol-2-Il) -2-5 difenil tretrazolium (MTT) en cada uno de los pozos. Incubando durante tres horas a 37°C y de esta manera medir la actividad metabólica de las células (Ferrari *et al.*, 1990), finalmente se agregan 100  $\mu\text{l}$  de DMSO, se incuba nuevamente durante 30 minutos y se procede a leer los platos en el Varioskan a 570 nm.

El ensayo se realizó por duplicado y los resultados se expresan en concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), que corresponde a la concentración en la que la mitad de las células mueren por estar en contacto con el compuesto y la cual fue calculada con el método Probit (Ríos *et al.*, 2008). La actividad citotóxica se clasificó según los valores de CL<sub>50</sub> de la siguiente manera: citotoxicidad alta cuando los valores de CL<sub>50</sub> fueron <100  $\mu\text{g/mL}$ ; citotoxicidad moderada cuando los valores de CL<sub>50</sub> estuvieron en el rango entre >50 a <200  $\mu\text{g/mL}$  y citotoxicidad baja cuando los valores de CL<sub>50</sub> fueron >200  $\mu\text{g/mL}$  (Marín *et al.*, 2018).

### **Actividad antileishmanial:**

La eficacia de los extractos fue evaluada sobre parásitos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* modificados con la proteína GFP, la cual les confiere fluorescencia (Pulido *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2009). Las células fueron adheridas a platos de 24 pozos, para esto las células U937 en suspensión se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón fue resuspendido a una concentración de 250.000 células/ ml de RPMI al 10% de SFB y 1% de antibióticos (gentamicina y penicilina). Seguidamente se agregó 1  $\mu\text{g/ml}$  de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y se incuban durante 48 horas a una temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>; una vez transcurrido el tiempo las células se infectaron con promastigotes de *L. (V) braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento, en una proporción de 15 parásitos por célula (15:1). Las células expuestas a los parásitos se incubaron a una temperatura de 34°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 2 horas de incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS con el fin de eliminar los parásitos libres y se agregó medio RPMI fresco. Las células infectadas se incubaron nuevamente durante 24 horas a 34°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cumplido este tiempo se reemplazó el medio de cultivo por medio RPMI fresco conteniendo cada uno de

los extractos a las respectivas concentraciones (50 – 25 – 12,5 – 6,250 – 3,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células expuestas a los extractos se dejaron en incubación durante 72 horas a 34°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . El control infección consistió en células infectadas sin estar expuestas a los extractos y como control de efectividad consistió en células infectadas y expuestas a anfotericina B a las concentraciones de 10 – 5 – 2,5 – 1,250 y 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células adheridas al fondo de cada pozo se desprendieron con EDTA/tripsina y los platos se analizaron en el citómetro de flujo. El ensayo se realizó por duplicado y los resultados se expresan en concentración efectiva 50 ( $\text{CE}_{50}$ ) que corresponde a la concentración en la que la mitad de la cantidad total de parásitos no son más viables, fue calculado utilizando la herramienta estadística Probit.

La actividad anti-*Leishmania* se clasificó según los valores de  $\text{CE}_{50}$  de la siguiente manera: actividad alta cuando los valores de  $\text{CE}_{50}$  fueron  $<25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; actividad moderada cuando los valores de  $\text{CE}_{50}$  estuvieron en el rango entre  $>25$  a  $<50 \mu\text{g}/\text{mL}$  y actividad baja cuando los valores de  $\text{CE}_{50}$  fueron  $>50 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Weniger *et al.*, 2001).

La actividad antileishmania y la citotoxicidad se correlacionaron para calcular el índice de selectividad (IS), con la fórmula:  $\text{CL}_{50} \div \text{CE}_{50}$  (Marín *et al.*, 2018). Se considera un IS adecuado cuando es  $>1$ . Sin embargo, entre mayor sea la relación, la actividad anti-*Leishmania* será más selectiva o específica en relación a la citotoxicidad.

## Resultados

Los resultados de la  $\text{CL}_{50}$ , la  $\text{CE}_{50}$  y la relación de ambos, es decir, el IS, fueron obtenidos gracias a las densidades ópticas, las fluorescencias obtenidas en el citómetro de flujo y la aplicación de la fórmula  $\text{IS} = \text{CL}_{50} \div \text{CE}_{50}$  respectivamente, estos resultados pueden observarse en la tabla 2.

Teniendo en cuenta los valores bajos en las  $\text{CL}_{50}$  y altos en las  $\text{CE}_{50}$ , es posible afirmar que todos los extractos obtenidos de las plantas evaluadas mostraron una citotoxicidad alta para macrófagos humanos U937 y de igual forma, ningún extracto mostró actividad anti-*Leishmania*. Estos resultados fueron validados por los controles usados, en donde la doxorubicina que es un compuesto tóxico, mostró valores de  $\text{CL}_{50}$  que corresponden a una citotoxicidad alta. Así mismo, la anfotericina B que es un medicamento con actividad anti-*Leishmania* mostró valores de  $\text{CE}_{50}$  que corresponden a una actividad anti-*Leishmania* alta.

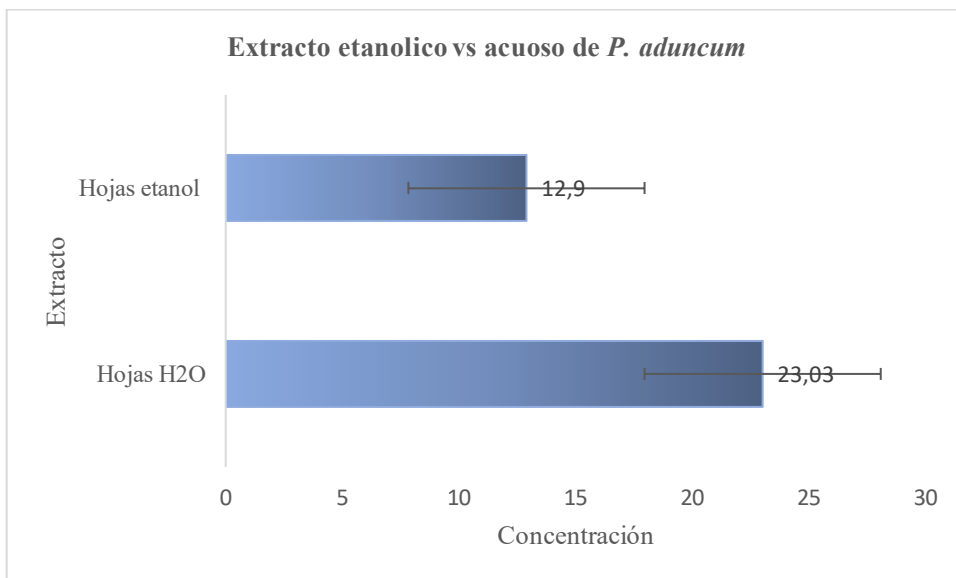
**Tabla 2: Citotoxicidad y actividad antileishmania de los extractos de las plantas *C. cujete* y *Picramnia* además de los controles para cada ensayo.**

Compuesto	Citotoxicidad			Actividad antileishmania			Interpretación
	CL <sub>50</sub> (µg/mL)		Interpretación	CE <sub>50</sub> (µg/mL)			
	X	DS*		X	DS*	IS**	
<i>P. aduncum</i> hojas H <sub>2</sub> O	23,03	3,71	Citotoxicidad alta	>12	NA	<1.91	Citotoxicidad mayor que actividad
<i>P. aduncum</i> etanol (hojas)	12,9	2,21	Citotoxicidad alta	>6	NA	<2.15	Citotoxicidad mayor que actividad
<i>P. aduncum</i> (tallo + hoja) H <sub>2</sub> O	18,36	0,94	Citotoxicidad alta	>10	NA	<1.83	Citotoxicidad mayor que actividad
<i>C. cujete</i> hojas etanol	29,95	5,96	Citotoxicidad alta	>15	NA	<1.99	Citotoxicidad mayor que actividad
<i>C. cujete</i> (hojas + tallo) H <sub>2</sub> O	22,01	3,85	Citotoxicidad alta	>10	NA	<2.2	Citotoxicidad mayor que actividad
<i>C. cujete</i> hojas H <sub>2</sub> O	15,44	1,2	Citotoxicidad alta	>8	NA	<1.93	Citotoxicidad mayor que actividad
Doxorrubicina	1,2	0,7	Toxicidad alta	NA	NA	NA	NA
Anfotericina B	32,6	4	Toxicidad alta	0,3	0,06	108.66	Actividad alta

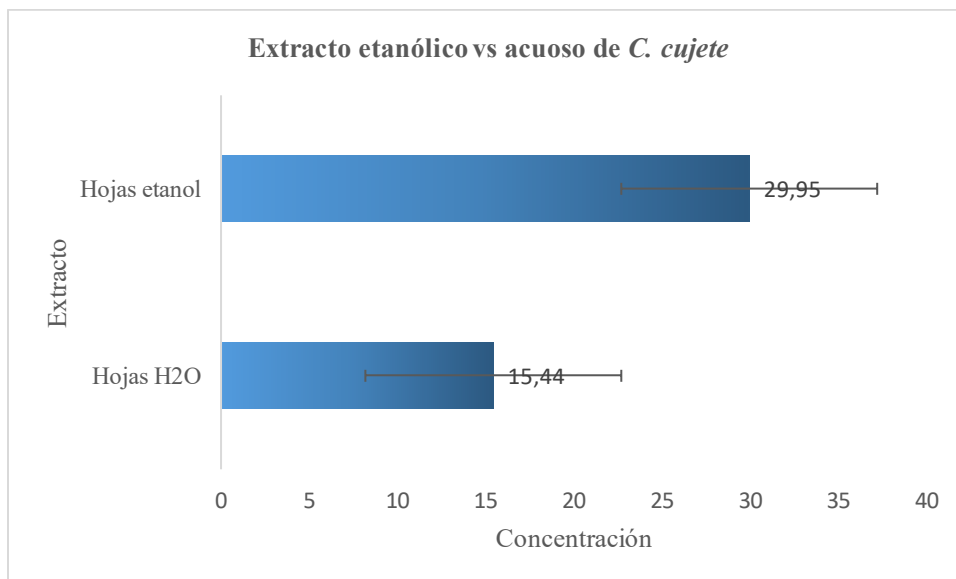
\*DS: Desviación estándar

\*\*IS: Índice de selectividad

La figura 1 compara la actividad citotóxica de los extractos evaluados para *P. aduncum* y en la figura 2 se compara la citotoxicidad de los extractos evaluados para *C. cujete*.



**Figura 1: Comparación de citotoxicidad (CL<sub>50</sub>) entre los extractos etanólicos y acuosos de *P. aduncum*.**



**Figura 2: Comparación de citotoxicidad (CL<sub>50</sub>) entre los extractos etanólicos y acuosos de *C. cujete*.**

### Análisis y discusión de los resultados

Aunque los resultados obtenidos para las  $CE_{50}$  se encuentran en un rango de 0.1 a 25  $\mu\text{g/mL}$  (tabla 2), no es posible afirmar que hay actividad en contra del parásito, ya que teniendo en cuenta los resultados del IS es correcto afirmar que estas bajas concentraciones están acabando con la célula más no con el parásito directamente, es decir, que los resultados bajos para la  $CE_{50}$  se deben a la muerte de las células y por ende de los parásitos más no por muerte directa de los parásitos. Lo anterior también se respalda en los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad (tabla 2), en donde se observan valores bajos para todos los extractos, lo que indica una alta citotoxicidad para las células.

Con respecto a los extractos de *P. aduncum* se puede observar en la figura 1 los valores bajos en su  $CL_{50}$ , indicando su alto grado de citotoxicidad, sin embargo, el extracto etanólico es un poco más citotóxico en comparación con el acuoso, esto puede deberse a los efectos de restos de etanol que hayan podido quedar en el extracto y que actué sobre la membrana de la célula afectando su viabilidad (Elvir, 2003). Se sugiere realizar un ensayo futuro para comprobar el efecto del porcentaje de etanol presente en los extractos utilizados y de esta manera afirmar o rechazar esta hipótesis.

Por otro lado, en *C. kujete* se observa que el extracto acuoso es un poco más tóxico que el extracto etanólico (figura 2), esto puede deberse a las propiedades inherentes de la planta; ciertos metabolitos secundarios pueden en el extracto etanólico inhibirse o reducir el efecto por la interacción de dichos metabolitos con el etanol y hacerlo menos tóxico en comparación con el acuoso. Adicionalmente se observa que la combinación de las hojas y los tallos tanto de *C. kujete* como de *P. aduncum* no los hacen menos citotóxicos y no mejora las actividades. Es posible pensar que en el proceso de obtención de los extractos por diferencias en polaridades, solubilidades y/o en la permeabilización dichos metabolitos pudieron haberse separado y/o acumulado intracelularmente afectando por ende su actividad (Arias-Zabala *et al.*, 2009). Es posible que la concentración de dichos metabolitos haya influido en los resultados ya que pueden variar dependiendo del clima, suelo, edad de la planta, entre otros (Reyes *et al.*, 2010; Osuna y Pérez-Amador, 2003; García *et al.*, 2003). La diferencia en las cantidades de hojas, tallos y los solventes utilizados inicialmente pudo influir también en la cantidad de extractos y por ende en los resultados.

Teniendo en cuenta lo anterior y al considerar tanto la citotoxicidad como la actividad antileishmania y el índice de selectividad es posible confirmar que ninguno de los extractos tanto etanólicos como acuosos de *C. kujete* y *P. aduncum* son aptos para ser considerados para investigaciones a nivel *in vivo* puesto que la capacidad de causar daño en la célula supera la capacidad de matar el parásito.

## Conclusión

Los seis extractos evaluados mostraron altas citotoxicidades para macrófagos humanos, para *P. aduncum* el extracto etanólico resultó siendo el más tóxico mientras que para *C. kujete* el extracto acuoso fue el más tóxico, este trabajo corresponde a una primera aproximación y aunque no es viable seguir en futuras investigaciones antileishmania con estos extractos dada su citotoxicidad, no se descarta la idoneidad para estudiar su potencial anticancerígeno.

**Conflicto de interés:** Se declaran que no existe ningún conflicto de interés en la realización del presente trabajo.

**Financiación:** El presente trabajo fue financiado por Universidad EAFIT, Universidad de Antioquia y Colciencias (CT-695-2014).

## Referencias:

Aguilar Ovando, E. (2019). Estudio Fitoquímico Exploratorio de *Peperomia cucumatana* Véliz y *Peperomia moralesii* Véliz (Piperaceae), Especies Endémicas de Guatemala. Retrieved from <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/tesis/Q178.pdf>.

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J.,... & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.

Anónimo (2019). Boletín Epidemiológico Semanal (BES). Retrieved from <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2031.pdf>.

Arias Zabala, M., Aguirre Cardona, A. M., Angarita Velásquez, M. J., Montoya Vallejo, C., & Restrepo, J. Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*; Vol. 76, núm. 157 (2009); 109-121 *DYNA*; Vol. 76, núm. 157 (2009); 109-121 2346-2183 0012-7353.

Arrivillaga-Henríquez, J., Enríquez, S., Romero, V., Echeverría, G., Pérez-Barrera, J., Poveda, A.,... & Benítez, W. (2017). Aspectos ecoepidemiológicos, detección natural e identificación molecular de

Leishmania spp. en Lutzomyia reburra, Lutzomyia barrettoii majuscula y Lutzomyia trapidoi. *Biomédica*, 37, 83-97.

De Oliveira, A., Mesquita, J. T., Tempone, A. G., Lago, J. H. G., Guimarães, E. F., & Kato, M. J. (2012). Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from Piper malacophyllum is related to plasma membrane disruption. *Experimental parasitology*, 132(3), 383-387.

Elvir, J. R. (2003). Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Rev. Med. Hondureña*, 61(1), 20-24.

Ferrari, M., Fornasiero, M. C., & Isetta, A. M. (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of immunological methods*, 131(2), 165-172.

García, D. E., Ojeda, F., & Montejó, I. (2003). Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de Morus alba (Linn.). I Análisis cualitativo de metabolitos secundarios. *Pastos y Forrajes*, 26(4).

González, R. N. C., Ligas, L. P., Flores, S. D. N., López, L. I. L., & Bermúdez, L. B. (2013). Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 14(2), 48-56.

Hernández Rivas, E. A., & Campos Sosa, A. R. (2007). *Utilización del zumo de jicaro (Crescentia cujete) en el tratamiento de la dermatomycosis en terneros de la raza Reina en la Finca Santa Rosa de la UNA* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria, UNA).

Kuete, V. (2017). *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (p. CHAPTER 8 Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables).

Lima, N. M., Correia, C. S., Leon, L. L., Machado, G., Madeira, M. D. F., Santana, A. E. G., & Goulart, M. O. (2004). Antileishmanial activity of lapachol analogues. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7), 757-761.

Malerich, J. P., Li, J., Joder, D., Vieria, É. L., Keesen, T. S., Vaidyanathan, R., ... & Tanga, M. J. (2013). Antileishmanial Activity of Natural Product-Like Naphthoquinones. *Drug Development Research*, 74(4), 237-241.

Marin, F. J., Torres, O. L., Robledo, S. M., & Doria, M. E. (2018). Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Actividad Antioxidante y Leishmanicida de la Especie *Pilocarpus alvaradoi* (Rutaceae). *Información tecnológica*, 29(3), 177-186.

Marques, A. M., Barreto, A. L. S., Curvelo, J. A. D. R., Romanos, M. T. V., Soares, R. M. D. A., & Kaplan, M. A. C. (2011). Antileishmanial activity of nerolidol-rich essential oil from *Piper claussonianum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5), 908-914.

Marques, A. M., Barreto, A. L. S., Batista, E. M., Curvelo, J. A. D. R., Velozo, L. S., Moreira, D. D. L., ... & Kaplan, M. A. C. (2010). Chemistry and biological activity of essential oils from *Piper claussonianum* (Piperaceae). *Natural product communications*, 5(11), 1934578X1000501131.

Monzote, L., García, M., Montalvo, A. M., Scull, R., & Miranda, M. (2010). Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 168-173.

Mostafa, N. M., Eldahshan, O. A., & Singab, A. N. B. (2014). The genus *Jacaranda* (Bignoniaceae): an updated review. *Pharmacognosy Communications*, 4(3), 31-39.

Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Kolli, B. K., Dutta, S., Chang, K. P., & Muskus, C. (2009). *Leishmania* (Viannia) panamensis: an in vitro assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Experimental parasitology*, 122(2), 134-139.

Murillo, J. A., Gil, J. F., Upegui, Y. A., Restrepo, A. M., Robledo, S. M., Quiñones, W., ... & Escobar, G. (2019). Antileishmanial activity and cytotoxicity of ent-beyerene diterpenoids. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(1), 153-160.

Osorio, E., Arango, G. J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., ... & Robledo, S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3), 630-635.

Osuna, M., & Pérez-Amador, C. (2003). Metabolitos primarios y secundarios en la descomposición. *Ecología del suelo en la selva tropical húmeda de México*, 123.

Pulido, S. A., Muñoz, D. L., Restrepo, A. M., Mesa, C. V., Alzate, J. F., Vélez, I. D., & Robledo, S. M. (2012). Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. *Acta tropica*, *122*(1), 36-45.

Reyes, S. R., Casanova, E. V., Gaona, M. C., & Saldarriaga, C. E. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV-SCIENTIA*, *2*(2), 11-22.

Ríos, Y. K., Otero, A. C., Muñoz, D. L., Echeverry, M., Robledo, S. M., & Yepes, M. A. (2008). Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, *37*(2).

Sanchez, J. (2019). OPS/OMS. Leishmaniasis cutánea y mucosa. Retrieved from [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=es).

Singh, N., Kumar, M., & Singh, R. K. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, *5*(6), 485-497.

Singh, N., Mishra, B. B., Bajpai, S., Singh, R. K., & Tiwari, V. K. (2014). Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *22*(1), 18-45.

Weniger, B., Robledo, S., Arango, G. J., Deharo, E., Aragón, R., Muñoz, V., ... & Anton, R. (2001). Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of ethnopharmacology*, *78*(2-3), 193-200.