

Evaluación *in vitro* de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*

Yesika Arévalo^{1,2}, Sara Robledo³, Diana Lorena Muñoz³, Diana Granados-Falla^{1,4}, Luis Enrique Cuca⁵, Gabriela Delgado¹.

¹ Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. A. A. 14490. Bogotá, D. C., Colombia. Correo electrónico: lgdelgadom@unal.edu.co.

² Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias de la Salud. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.

³ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Universidad de Antioquia.

⁴ Universidad de la Sabana. Facultad de Ingeniería, doctorado en Biociencias.

⁵ Grupo de Investigación en Química Orgánica de Productos Naturales, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.

Recibido: 14 de septiembre de 2009.

Aceptado: 9 de noviembre de 2009.

RESUMEN

Las leishmaniasis son zoonosis que en el hospedero humano pueden afectar la piel, las mucosas o las vísceras, resultado del parasitismo de los macrófagos por un protozoo flagelado del género *Leishmania*, introducido al organismo por la picadura de un insecto flebótomo. En Colombia, la leishmaniasis cutánea es causada por parásitos del subgénero *Viannia*, al cual pertenecen las especies *Leishmania (L) panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. El tratamiento clínico requiere la administración de medicamentos que, si bien son efectivos, generan efectos adversos en el individuo. Además, se ha detectado una resistencia del parásito, lo que ha favorecido la disminución de la eficacia de los tratamientos usados convencionalmente para controlar la enfermedad. En la búsqueda de nuevas y más seguras alternativas terapéuticas, los productos naturales son una fuente importante de agentes con potencial actividad antileishmanial. Éste es el caso de los aceites esenciales que por sus características físico-químicas, principalmente por su untuosidad, pueden constituirse en una alternativa tópica para el control de la leishmaniasis cutánea (LC). En este estudio, la

actividad antileishmanial de trece aceites esenciales de diferentes familias de plantas colombianas (*Lauraceae*, *Rutaceae*, *Verbenaceae*, *Lamiaceae*, *Zingiberaceae*, *Myristicaceae*, *Cardiopteridaceae* y *Pinaceae*) se evaluó sobre los promastigotes de *L. braziliensis*. La concentración efectiva 50 (CE_{50}) de 87,8 +/- 55,51 $\mu\text{g/mL}$, 265,5 +/- 7,5 $\mu\text{g/mL}$ y 17,4 +/- 0,43 $\mu\text{g/mL}$ para los aceites del fruto de *Persea caerulea*, de las hojas de *Lippia alba* y de las hojas de *Rosmarinus officinalis*, respectivamente, permite sugerir una actividad parasiticida. Si bien, es necesaria la valoración del efecto citotóxico que sobre los macrófagos, como células blanco de la infección por *Leishmania*, puedan generar estos aceites; resulta promisorio la actividad antileishmanial directa sobre las formas promastigotes, la cual puede ser comparable con la observada para pentamidina, fármaco que a diferencia de las sales antimoniales pentavalentes, no es una prodroga que requiera ser descompuesta en metabolitos activos una vez es incorporada al macrófago. Es decir, estos aceites esenciales podrían contener principios activos letales para las formas libres y quizá para las formas intracelulares de *Leishmania* spp, que ameritan seguir siendo estudiados como una alternativa terapéutica en el control de la LC.

Palabras clave: aceites esenciales, ensayos antileishmaniales, *Leishmania braziliensis*.

SUMMARY

In vitro evaluation of essentials oils activity from Colombians plants on *Leishmania braziliensis*

Leishmaniasis is zoonosis that in human host can affect skin, mucosa and viscera, when a flagellar protozoo is phagocyted by macrophages after bite of Phlebotomineo insect. In Colombia, cutaneous leishmaniasis is produced by subgenus Viannia parasites, genus that includes species like *Leishmania panamensis* (L), *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. Clinical treatment requires the administration of effective drugs that induce severe adverse effects in the patient treated. Additionally, the parasite had generated a drug-resistance, which promotes a reduction in this kind of therapeutic schedule. In the searching of new and safer therapeutics alternatives to leishmaniasis control, natural products are an important source of active molecules with pharmacological activity. In this study we reported the antileishmanial activity of 13 essential oils of different Colombian plants (*Lauraceae*, *Rutaceae*, *Verbenaceae*, *Lamiaceae*, *Zingiberaceae*, *Myristicaceae*, *Cardiopteridaceae* y *Pinaceae*) using *L. braziliensis* promastigotes. The effective concentration 50 (EC_{50}) was 87,8 +/- 55,51 $\mu\text{g/mL}$, 265,5 +/- 7,5 $\mu\text{g/mL}$ and 17,4 +/- 0,43 $\mu\text{g/mL}$ for essential oils of *Persea caerulea*

fruit, *Lippia alba* leaves and *Rosmarinus officinalis* leaves, respectively, which permit suggest us, a parasiticide property. Although, it is necessary the cytotoxic effect study on macrophages as infection target cells, result promissory the antileishmanial effect direct to promastigote form, which can be comparable with the effect observed to pentamidine, drugs to a difference of antimonial drugs, is not a pro-drug that require to be metabolized into macrophage. In other words, essentials oils would contain active principles lethal against free forms and maybe, against intracellular *Leishmania* spp forms that need further studies to be considered as therapeutic alternative to leishmaniasis cutaneous control.

Key words: essentials oils, antileishmanial assays, *Leishmania braziliensis*.

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniosis son zoonosis que pueden afectar la piel, las mucosas o las vísceras, a causa del parasitismo de los macrófagos por un protozoo flagelado del género *Leishmania*, introducido al organismo por la picadura de un insecto flebótomo (1, 2). Después de la infección, cuando un promastigote ingresa al macrófago y se diferencia en amastigote, puede aparecer una variedad de manifestaciones clínicas que dependen, entre otros factores, de la especie de *Leishmania* involucrada y de la respuesta inmune del hospedero afectado. La leishmaniosis cutánea (LC) es una enfermedad polimorfa que compromete la piel (forma clínica predominante en Colombia), la cual comienza con una pápula que se agranda y típicamente se transforma en una úlcera indolora. Las lesiones pueden ser únicas o múltiples y, ocasionalmente, no ulceradas y difusas. Pueden cicatrizar espontáneamente en semanas o meses, o persistir durante más tiempo, incluso llegando a generar formas no clásicas de lesión distintas de úlceras (1, 2).

La leishmaniosis es endémica en más de ochenta países de todos los continentes (3). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 350 millones de personas están en riesgo de contraer la infección y dos millones de nuevos casos de las diferentes formas clínicas se reportan anualmente. La leishmaniosis está clasificada en la categoría I de enfermedades re-emergente y sin control, situación manifiesta en el dramático aumento en su incidencia (4).

En el 2005, el Estado colombiano invirtió un poco más de US\$ 4,5 millones en la adquisición de los medicamentos necesarios para tratar la leishmaniosis. Su alto costo y el riesgo del tratamiento incompleto o efectos adversos resaltan la importancia de garantizar no sólo su uso adecuado, sino también de evaluar permanentemente su eficacia y seguridad, lo que genera mayores costos (5).

Durante la década de los noventa del siglo XX, se notificaban en promedio 6.500 casos nuevos de leishmaniosis cada año, cifra que ha venido aumentando progresivamente al punto de pasar en los años 2005 y 2006 a cerca de 20 mil casos cada año notificados al sistema. En Colombia, la leishmaniosis es endémica en casi todo el territorio, excepto en San Andrés (islas), y aunque predomina la LC, también se presenta la forma mucosa y la leishmaniosis visceral (LV). La distribución geográfica de las especies de *Leishmania* en el país, señala que las especies predominantes son la *L. panamensis* y la *L. braziliensis* (6).

Respecto al tratamiento, los medicamentos de primera elección que se suministran a los pacientes una vez diagnosticados mediante la evidencia de los amastigotes intracelulares en muestras de la lesión, son sales de antimonio pentavalente (Sb5+), como el antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®). Ambas formulaciones presentan eficacia similar y se administran para tratar cualquiera de las tres formas clínicas de la enfermedad. La OMS sugiere una dosis diaria intramuscular de antimonio pentavalente de 20 mg/kg de peso/día durante 20 días, que garantiza del 90% al 95% de curación, aunque la forma de administrarla resulta muy dolorosa y en ocasiones es la principal causa de abandono del tratamiento. Igualmente, el isotianato de pentamidina y la anfotericina B, a pesar de ser efectivos su toxicidad, es elevada (7).

Además, se ha detectado una resistencia del microorganismo, definiendo ésta como la disminución de la eficacia a compuestos en una población que previamente era susceptible a ellos. Existen al menos tres mecanismos celulares asociados a la expresión de quimio-resistencia (8): amplificación de los genes que codifican moléculas blanco del fármaco; cambios estructurales y funcionales de las moléculas blanco de las drogas y disminución de los niveles intracelulares del principio activo por unión a transportadores específicos (8, 9).

Por todo lo anterior, es necesario investigar alternativas terapéuticas que siendo igual o quizá más efectivas, resulten más seguras y más fáciles de administrar. A este nivel, los aceites esenciales (cuya untuosidad como características físico-químicas favorece su aplicación local) pueden constituirse en una alternativa tópica para el control de la LC.

Se han descrito múltiples propiedades antimicrobianas y funciones farmacológicas para los también abundantes principios activos encontrados en el recurso etnobotánico (10, 11). Se han reportado propiedades antileishmaniales para 1) la familia Lauraceae y especies como *Ocotea duckei*, empleando formas promastigotes de *L. infantum* y *L. amazonensis* (12); 2) la familia Rutaceae, compuesta de especies como *Dictyoloma peruviana*, planta utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la leishmaniosis, que causaron una lisis total de promastigotes de *L. amazonensis* y *L.*

braziliensis (13); 3) la familia Verbenaceae y el aceite esencial de especies como *Lippia alba*, los cuales mostraron actividad inhibitoria sobre los promastigotes de *L. infantum* (14); 4) la familia Zingiberaceae y especies de cúrcuma (*Curcuma longa*), que exhibieron propiedades terapéuticas con alto potencial antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antifúngico, entre otras (15); 5) la familia Myristicaceae y especies como *Myristica malabarica*, las cuales demostraron su promisoría actividad antileishmanial en ensayos con promastigotes de *L. donovani* (16); y, finalmente, 6) la familia Pinaceae y especies como *Cedrus atlántica*, que exhibieron una importante actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (17).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aceites esenciales

Los aceites se obtuvieron a partir de diversas partes de las plantas, las cuales se colectaron, se secaron a temperatura ambiente y se trataron bajo protocolos previamente estandarizados (18). En la tabla 1 se presenta la lista de los aceites esenciales estudiados en este trabajo.

Tabla 1. Aceites esenciales de plantas colombianas. Relación de los aceites esenciales utilizados en este estudio. Se analizaron en su gran mayoría hojas y sólo cuatro aceites provenientes de frutos y flor de las plantas de interés.

Familia	Especie	Nombre común Colombia	Parte
Lauraceae	<i>Ocotea macrophylla</i>	Aceituno, laurel	Hojas
	<i>Persea caerulea</i>	Canela rosa, amarillo	Fruto
			Flor
Rutaceae	<i>Zanthoxylum monophyllum</i>	Palo rubio	Fruto
	<i>Raputia heptaphylla</i>	Sangretoro	Hojas
	Especie sin clasificación taxonómica	-	Hojas
Verbenaceae	<i>Lippia alba</i>	Prontoalivio	Hojas
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Hojas
Zingiberaceae	<i>Curcuma</i> sp	-	Hojas
Myristicaceae	<i>Iryanthera ulei</i>	No reporta	Hojas
Zingiberaceae	<i>Melissa officinalis</i>	Citronela	Hojas
Pinaceae	<i>Cedrus</i> sp	Cedro	Hojas

2. Cultivo de promastigotes de *L. braziliensis*

Los promastigotes de *L. braziliensis* (CL250) se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Scotland, UK), enriquecido con el 10% de suero fetal bovino (SFB, Microgen, Bogotá, Colombia), y 1X de L-glutamina (Gibco, Scotland, UK) (medio completo, una vez suplementado) a 27 °C y en condiciones de humedad y gasificación ambiente. La cepa de parásitos fue gentilmente proporcionada por la doctora Martha Ayala, del Instituto Nacional de Salud, en Bogotá (Colombia).

3. Ensayo de efectividad *in vitro*

Una vez obtenidos, los aceites esenciales se diluyeron con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Scotland, UK). Se prepararon cuatro diluciones seriadas en base dos a partir de una concentración de 0,5 mg/mL (500, 250, 125 y 62,5 µg/mL). Como medicamento de control positivo inductor directo de la mortalidad de las formas extracelulares de *Leishmania*, se utilizó la pentamidina [Pentamidine Isothionate (May and Baker, Dagenham, UK)] (19). La pentamidina también se evaluó a cuatro concentraciones diferentes partiendo de 50 µg/mL (50, 25, 12,5 y 6,25 µg/mL). En cada pozo de un plato de 96 pozos para cultivo celular (TRP, Trasadingen, Suiza) se dispensaron 2×10^5 promastigotes de *L. braziliensis*/100 µL resuspendidos en medio completo. Dos horas después, se adicionaron tanto los aceites esenciales a las correspondientes concentraciones por evaluar, como la pentamidina. Se emplearon parásitos cultivados en ausencia de cualquier sustancia o medicamento como control de viabilidad. Cada una de las muestras se analizó por duplicado en tres experimentos realizados de forma independiente. Los parásitos en presencia de los compuestos se incubaron a 27 °C en atmósfera al 5% de CO₂ durante 72 horas. Después de este período, se determinó el efecto de los aceites sobre la viabilidad de los parásitos, utilizando el método de Resazurina (19). Para ello, se adicionaron en cada pozo 100 µL de Resazurina 44 uM y se incubaron los platos durante 48 horas a 27 °C en atmósfera al 5% de CO₂. Se realizó la lectura espectrofluorométrica (TECAN GENius), obteniendo de este modo las correspondientes absorbancias (unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF), las cuales son directamente proporcionales a la cantidad de parásitos viables presentes en cada pozo.

4. Análisis estadístico

Con las UAF obtenidas para cada concentración evaluada, se calculó el porcentaje de viabilidad y mortalidad, cuyos resultados permitieron establecer la concentración efectiva 50 (CE₅₀). Para cada concentración, el porcentaje de viabilidad se obtuvo mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{UAF promastigotes expuestos al tratamiento}}{\text{UAF promastigotes control (sin exposición al tratamiento)}} \times 100 \quad (1.1)$$

El porcentaje de mortalidad se calculó con la fórmula: % mortalidad = 100 - % viabilidad.

Los valores de la CE_{50} se calcularon mediante el empleo de software GraphPad (GraphPad Prims 5 Demo software, GraphPad software, Inc, La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se presenta el resultado de la CE_{50} para cada uno de los aceites esenciales. Diez de los trece aceites analizados, no exhibieron efecto alguno sobre los promastigotes a la máxima concentración analizada (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dentro de aquellos a los cuales se les observó un efecto antiparasitario, se encontraron *Lippia alba*, *Rosmarinus officinalis* (Romero) y el fruto de *Zanthoxylum monophyllum*.

Es de resaltar que aún tratándose de la misma especie de planta, los compuestos o la concentración de éstos están presentes en partes específicas de la planta; razón por la cual, el aceite esencial procedente de la flor de *Zanthoxylum monophyllum* no presenta una actividad similar a la del fruto. Dentro de los tres aceites esenciales considerados como promisorios, se ubican los aceites de *Rosmarinus officinalis* (Romero), ya que la CE_{50} de este aceite fue casi treinta veces menor (17,4+/-0,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que la máxima concentración empleada (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabla 2. Actividad *in vitro* de aceites esenciales sobre los promastigotes de *L. braziliensis*. CE_{50} : concentración efectiva 50; (a): desviación estándar procedente de tres experimentos realizados.

Procedencia aceite esencial especie	CE_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Ocotea macrophylla</i> (hojas)	≥ 500
<i>Persea caerulea</i> (fruto)	87,8+/-55,51 ^a
<i>Persea caerulea</i> (flores)	≥ 500
<i>Zanthoxylum monophyllum</i> (fruto)	≥ 500
<i>Zanthoxylum monophyllum</i> (flores)	≥ 500
<i>Raputia heptaphylla</i> (hojas)	≥ 500
Rutacea sin clasificación taxonómica (hojas)	≥ 500
<i>Lippia alba</i> (hojas)	265,5+/-7,50
<i>Rosmarinus officinalis</i> (hojas)	17,4+/-0,43
<i>Curcuma</i> sp (hojas)	≥ 500
<i>Iryanthera ulei</i> (hojas)	≥ 500
<i>Melissa officinalis</i> (hojas)	≥ 500
<i>Cedrus</i> sp (hojas)	≥ 500
Pentamidina	1,53+/-0,01

La relevancia de estas observaciones radica en el mecanismo de acción directo sobre formas libres y posiblemente internalizadas de especies de *Leishmania* que pudieran tener los aceites esenciales de las hojas de *L. alba*, *R. officinalis* y el fruto de *Z. monophyllum*. Aunque, específicamente, las sales antimoniales pentavalentes (antimoniato de meglumina y estibogluconato de sodio) logran su efectividad en el control de las formas internalizadas de *Leishmania* mediante el metabolismo intracelular (al interior del macrófago), generan compuestos trivalentes con la correspondiente toxicidad sobre el parásito (20).

No obstante, no todas las formulaciones antileishmaniales generan un efecto tóxico sobre los parásitos intracelulares producto de un metabolismo intracelular. La pentamidina cuyo mecanismo de acción se ha asociado con cambios en los minicírculos del ácido desoxirribonucleico (ADN) del kinetoplasto de la *Leishmania* (21), no requiere ser metabolizada; es decir, no es una prodroga como las sales antimoniales pentavalentes y su efecto es directo sobre las formas parasitarias. Observaciones previas permitieron inferir dicho mecanismo, debido a que tanto los promastigotes como los amastigotes resultaron sensibles al efecto de este fármaco, contrario a las sales antimoniales pentavalentes que sólo fueron efectivas sobre las formas intracelulares (amastigotes) de *Leishmania* (22).

De la mano con estos resultados, y buscando en paralelo la mejor manera de valorar el efecto tanto de los medicamentos aprobados para el control de la leishmaniosis como de nuevos prototipos analizados en busca de esta misma actividad, se emplean diversas herramientas *in vitro*. Las más adecuadas, pero a la vez las menos sencillas de ejecutar, contemplan el uso de amastigotes intracelulares, y buscan la forma ideal de diseccionar los eventos que ocurren *in vivo*.

Por otro lado, y aunque los promastigotes son la forma infectiva mas no la responsable del cuadro clínico, éstos aún se emplean en los protocolos que a modo de tamizaje pretenden evaluar el efecto antileishmanial de sustancias o compuestos, e incluso la potencial resistencia frente a las formulaciones antiparasitarias (23). En los aspectos favorables que respaldan el uso de los promastigotes en el tamizaje de compuestos antileishmaniales, es su facilidad para ser propagado *in vitro*. Tomando como punto de partida la eficacia observada en la pentamidina, los aceites esenciales de las hojas de *L. alba*, *R. officinalis* y el fruto de *Z. monophyllum* podrían contener compuestos activos frente a la *Leishmania*, que de forma directa, sin necesidad de ser metabolizados, tendrían un efecto antileishmanial potencialmente promisorio.

Conforme a los ensayos preliminares realizados, los aceites esenciales de *L. alba*, *R. officinalis* y el fruto de *Z. monophyllum*, con actividad leishmanicida aunque moderada en los promastigotes, inducen efectos citotóxicos sobre los macrófagos murinos (J774) (datos no mostrados); y aunque aparentemente la concentración letal cincuenta (CL₅₀) es mucho mayor que la CE₅₀ para los promastigotes, lo cual reflejaría un efecto específico contra el parásito, es necesario complementar estas observaciones y validar su eficacia sobre los amastigotes intracelulares, y definir la potencial toxicidad que sobre los macrófagos pudieran llegar a inducir estos aceites esenciales, con el fin de descartar un efecto deletéreo sobre otras poblaciones celulares. Sin embargo, características como la untuosidad de los aceites esenciales favorecerían su empleo a corto plazo sobre lesiones activas producidas por *Leishmania*, siempre y cuando las pruebas, no sólo de efectividad, sino también de seguridad asociadas con cualquier prototipo farmacológicamente promisorio, así lo demuestren.

Es de resaltar que aunque los compuestos de las familias Lauraceae y Verbenaceae se han asociado con actividad antileishmanial, éste es el primer reporte que sobre *L. braziliensis* se documenta para *R. officinalis* (Romero), una especie de la familia Lamiaceae.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a todos los integrantes del Grupo de Investigación en Inmunotoxicología del Departamento de Farmacia y al Grupo de Investigación en Química Orgánica de Productos Naturales del Departamento de Química, ambos de la Universidad Nacional de Colombia.

Este proyecto se realizó gracias a los recursos asignados por la Dirección de Investigación, sede Bogotá (DIB), de la Universidad Nacional de Colombia (proyecto código DIB 11055, Quipú No. 202010013640), y a Colciencias (Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas), mediante el proyecto 110140820378.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Geneva, Switzerland, World Health Organ Tech Rep Se, 793 (1990).
2. P. Desjeux, Leishmaniasis: current situation and new perspectives, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27, 305 (2004).

3. J. Alvar, S. Yactayo y C. Bern, Leishmaniasis and poverty, *Trends Parasitol*, **22**, 552 (2006).
4. TDR. Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis, TDR/SWG/04, (2004).
5. N. G. Saravia y R. S. Nicholls, [Leishmaniasis: a public health challenge that demands concerted effort and will (editorial)], *Biomedica*, **26**, 7 (2006).
6. C. E. Ovalle, L. Porras, M. Rey, M. Ríos y Y. C. Camargo, [Geographic distribution of *Leishmania* species isolated from patients at the National Institute of Dermatology Federico Lleras Acosta E.S.E., 1995-2005], *Biomedica*, **26**, 145 (2006).
7. J. Mishra, A. Saxena y S. Singh, Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future, *Curr. Med. Chem.*, **14**, 1153 (2007).
8. S. L. Croft, S. Sundar y A. H. Fairlamb, Drug resistance in leishmaniasis, *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**, 111 (2006).
9. S. M. Beverley, J. A. Coderre, D. V. Santi y R. T. Schimke, Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization, *Cell*, **38**, 431 (1984).
10. D. J. Newman y G. M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J. Nat. Prod.*, **70**, 461 (2007).
11. L. Fidalgo, I. Ramos, A. Montalvo, N. Garrido, R. Scull y J. Abreu, Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas, *Rev. Cubana Med. Trop.*, **56**, 230 (2004).
12. R. L. Monte, J. M. Barbosa, L. M. Sousa, P. F. Athayde, C. S. Días y M. R. Oliveira, Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) show antileishmanial activity, *Z. Naturforsch C*, **62**, 348 (2007).
13. E. Osorio, G. Montoya y G. Arango, Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria, *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, **13**, 61 (2006).
14. C. Celis, P. Escobar, J. Isaza, E. Stashenko y J. Martínez, Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae, *Scientia et Technica*, **13**, 103 (2007).

15. M. R. Santin, A. O. Dos Santos, C. V. Nakamura, B. P. Dias Filho, I. C. Ferreira y T. Ueda-Nakamura, In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*, *Parasitol Res*, **105**, 1489 (2009).
16. R. Sen, A. K. Bauri, S. Chattopadhyay y M. Chatterjee, Antipromastigote activity of the malabaricones of *Myristica malabarica* (rampatri), *Phytother Res*, **21**, 592 (2007).
17. M. Dakir, F. El Hanbali, F. Mellouki, M. Akssira, A. Benharref, J. F. Quilez del Moral, *et al.*, Antibacterial diterpenoids from *Cedrus atlantica*, *Nat Prod Res*, **19**, 719 (2005).
18. E. E. Stashenko, B. E. Jaramillo y J. R. Martínez, Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity, *J. Chromatogr. A*, **1025**, 93 (2004).
19. R. de Fries y M. Mitsuhashi, Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay, *J. Clin. Lab. Anal.*, **9**, 89 (1995).
20. F. Frezard, C. Demicheli, C. S. Ferreira y M. A. Costa, Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate, *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 913 (2001).
21. W. D. Wilson, F. A. Tanious, A. Mathis, D. Tevis, J. E. Hall y D. W. Boykin, Antiparasitic compounds that target DNA, *Biochimie*, **90**, 999 (2008).
22. G. Delgado, F. Puentes, A. Moreno y M. E. Patarroyo, Flow cytometry, a useful tool for detecting the lethal effect of pentamidine on *Leishmania viannia* complex promastigote forms, *Pharmacol Res*, **44**, 281 (2001).
23. F. J. Pérez-Victoria, M. P. Sánchez-Canete, K. Seifert, S. L. Croft, S. Sundar, S. Castanys, *et al.*, Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use, *Drug Resist. Updat.*, **9**, 26 (2006).