

Actividad antileishmaniásica in vitro del extracto metanólico de las flores de *Tessaria integrifolia* R. et P. [Asteraceae]

In vitro antileishmanial activity of methanolic extract of *Tessaria integrifolia* R. et P. [Asteraceae] flowers

Edgard Marín Sánchez¹, Fredy Pérez Azahuanche²,
Abundio Sagástegui Alva³

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea o “uta” es una enfermedad producida por *Leishmania peruviana* y transmitida en la picadura de diversas especies de mosquitos del género *Lutzomyia*; su terapia se basa en el uso de fármacos antimoniales pentavalentes como el estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumine, a pesar de sus efectos colaterales. Alternativamente, la medicina tradicional usa plantas medicinales sin tener conocimiento de su modo de acción ni haberlas validado científicamente. Se realizó un estudio de *Tessaria integrifolia* R. et P. “pájaro bobo” con el objetivo de determinar su actividad antileishmaniásica y sus constituyentes fitoquímicos. Mediante ensayos in vitro se enfrentó las formas promastigotas de *L. peruviana* contra el extracto metanólico de las flores de *T. integrifolia* R. & P. a las concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 mg/mL; teniendo como droga de referencia estibogluconato de sodio y realizando las lecturas a las 24 y 72 horas. El análisis fitoquímico preliminar se efectuó mediante ensayos a la gota. Los resultados a las 24 horas mostraron que a una concentración del extracto de 100 mg/mL, se produce la lisis de las formas promastigotas de *L. peruviana* y a la misma concentración el estibogluconato de sodio solamente inmovilizó a los parásitos. A las 72 horas, las concentraciones menores inmovilizaron las referidas formas promastigotas del parásito, efecto similar al ocasionado por el estibogluconato de sodio. El análisis fitoquímico reveló la presencia de: esteroides, flavonoides y fenoles. Es decir, el extracto metanólico de las flores de *T. integrifolia* R. et P. “pájaro bobo” demostró mejor actividad antileishmaniásica que el estibogluconato de sodio.

Palabras clave: *Leishmania peruviana*, leishmaniasis cutánea, “uta”, *Tessaria integrifolia* R. et P., actividad antileishmaniásica, análisis fitoquímico.

1 Maestro en Ciencias. Docente de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina Humana, Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú. Email: edmarin@hotmail.com

2 Doctor en Ciencias c/m en Química, Facultad de Ciencia de la Salud, Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú. Email: fperez_a@yahoo.es

3 Doctor en Ciencias Biológicas, Research Associate, The Field Museum, Chicago, U.S.A.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis or "uta" is a vector borne disease produced by *Leishmania peruviana* and transmitted by bites of *Lutzomyia* species. Treatment is based in antimonial pentavalents compounds as meglumine antimoniate and sodium stibogluconate, in spite of side effects. Alternatively, traditional medicine uses some plants without knowledge action mode neither scientific validation. With the objective of determining antileishmanial activity and phytochemical constituents of *Tessaria integrifolia* R. et P. By in vitro assays, promastigotas forms of *L. peruviana* were treated with 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 mg/mL of methanolic extract of *T. integrifolia* R et P. flowers having to sodium stibogluconato as reference drug. The phytochemical study was carried out by drop assays. Results showed that after 24 hours, concentration of *T. integrifolia* R et P. flowers at 100mg/mL caused lisis of promastigotas in comparison with sodium stibogluconate that only caused their immobilization of parasites. After 72 hours, the other concentrations caused immobilization of parasite forms similarly at drug reference. As a conclusion, methanolic extract of *T. integrifolia* R et P. flowers had better antileishmanial activity than sodium stibogluconate and the secondary metabolites founded were steroids, flavonoids and phenols.

Key words: *Leishmania peruviana*, cutaneous leishmaniasis, "uta", *Tessaria integrifolia* R. et P., antileishmanial activity, phytochemical analysis.

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son enfermedades prioritarias de atención para la Organización Mundial de la Salud (OMS); originan importantes problemas de salud pública debido a la diversidad de formas clínicas, especialmente la mucocutánea, que provoca mutilaciones difíciles de tratar e impacto psicológico en las personas^{1,2}.

La "uta", producida por *Leishmania peruviana*, es una enfermedad predominantemente rural en el Perú, endémica en los valles occidentales interandinos y ciertos valles orientales ubicados entre 900 a 3200 msnm, en zonas bióticas bien definidas, con densa vegetación y microclimas favorables para el mantenimiento del vector. Estos lugares son reservorios naturales y fuentes de infección leishmaniásica para insectos y pobladores^{3,4}.

Para el tratamiento de la leishmaniasis, se han empleado diferentes medicamentos, como los antimoniales tri y pentavalentes, anfotericina B, cremas a base de paranomicina al 15%, cloro-metil benzetonio al 12%, cloruro de miristalconio y pentamidina, que actualmente constituyen fármacos de elevados costos y alta toxicidad^{5,6,7,8}.

El estudio de plantas medicinales como parte de la búsqueda de identidades terapéuticas nuevas está avanzando rápidamente gracias al desarrollo de métodos de bioensayos sencillos pero sensitivos para detectar la actividad biológica de extractos vegetales; y de métodos químicos e instrumentación para el aislamiento y determi-

nación de la estructura química de las sustancias activas⁷. De las raíces, tallos, hojas, flores, semillas y frutos de las plantas se extraen los constituyentes activos que constituyen las drogas crudas²⁸, siendo los extractos acuosos y etanólicos los que se usan preferentemente como agentes extractivos en muchas sustancias vegetales²⁹.

El estudio de algunas plantas para determinar su efecto sobre las formas amastigotas o promastigotas ha sido realizado con *Munnozia maroni*²⁴, *Anacardium occidentale*³⁰, *Pera benensis*³¹, *Pescheria van heurkii*³² y *Kalanchoe pinnata*³³, con resultados satisfactorios.

En Bolivia, se está investigando la acción de algunos vegetales sobre protozoarios parásitos como: *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, entre otros^{9,10,11}. Estos estudios toman en cuenta principalmente encuestas etnobotánicas y conocimientos quimiotaxonomicos; han demostrado la actividad antiprotozoaria de alcaloides quinoleínicos aislados de *Galipea grandiflora* y la actividad antileishmanial de una tetralona aislada de *Ampelocera edentula*^{12,13,14,15}.

En el Perú también se ha iniciado este tipo de investigaciones como los trabajos in vitro de diferentes extractos de *Plumbago scandens* y *Lycopersicon pimpinellifolium*, que originaron lisis y/o inmovilización de formas promastigotas de *L. peruviana*^{16,34}. También se ha encontrado que las hojas de *Pernettya prostrata* presentan efecto antileishmaniano en ensayos realizados in vitro^{17,18}.

La variedad topográfica y diversidad de climas que

posee el territorio peruano favorece su potencial vegetal con numerosas plantas medicinales, muchas de ellas poco conocidas o estudiadas^{19,20}, entre las que se encuentra *Tessaria integrifolia* Ruiz et Pavón (Asteraceae), conocida comúnmente como “pájaro bobo”. Esta es ampliamente distribuida en Panamá, Colombia, Venezuela, Paraguay, Brasil, Bolivia y Perú. *Tessaria integrifolia* prefiere la ribera de los ríos, forma, a veces, bosquesillos muy compactos gracias a sus raíces gemíferas; ocasionalmente, se aleja de su hábitat natural acompañando a las acequias y canales de regadío, invadiendo los cultivos y comportándose como maleza; se propaga por semilla y también vegetativamente mediante sus raíces gemíferas²¹.

T. integrifolia es un árbol de 3 a 10 m de alto, con raíces gemíferas. Tallos delgados, más o menos cilíndricos, verdes o verde-parduscos, lenticelados, poco ramificados, glabros o diminutamente puberulentos cuando jóvenes. Hojas alternas, oblongas a oblongo-lanceoladas o lanceoladas, obtusas hasta agudas en el ápice, atenuadas y pecioliformes en la base, enteras o irregularmente dentadas, densa y cortamente cinéreatomentosas o canescente-tomentosas en ambas superficies, de 3-8 cm de largo por 0,8-3,5 cm de ancho. Capítulos heterógamos, discoideos, pequeños, numerosos, subsésiles, dispuestos en densos corimbos terminales. Involucro turbinado, de 5-6 mm de alto por 2-2,5 mm de diámetro. Brácteas involucrales numerosas, imbricadas, 5-seriadas: las externas ovadas y las internas lineales, radiantes, ambas esparcidamente tomentosas. Flores marginales numerosas, femeninas, con corola filiforme, glabra, de 3-3,5 mm de largo; las centrales 1, masculina por esterilidad del gineceo, con corola tubulosa de unos 5 mm de longitud, glabra, profundamente 5-partida (lóbulos de 2-3 mm de largo); estambres exertos. Aquenios gruesos, glabros, de 0,5-0,8 mm de longitud. Pappus formado por numerosos pelos blancos²¹.

Las hojas de *T. integrifolia* R. & P. se usan en medicina popular peruana para curar los trastornos hepáticos; se le aprovecha por sus propiedades diuréticas y como agente antiasmático y antiinflamatorio²². Su inflorescencia es muy visitada por las abejas, por lo que es considerada como planta melífera. En la medicina tradicional argentina se usa como antigonorreico, cicatrizante y resolutivo²³.

Los pocos estudios realizados sobre las aplicaciones medicinales de esta especie, en nuestro medio, motivaron el presente estudio con el objetivo de determinar in vitro la actividad antileishmaniásica del extracto metanólico de las flores de *Tessaria integrifolia* R. & P. sobre formas promastigotas de *Leishmania peruviana* y su composición fitoquímica preliminar.

MATERIAL Y MÉTODO

Material de estudio

Las plantas de *Tessaria integrifolia* R. et P. fueron colectadas en la ribera del río Santa Catalina, provincia de Trujillo, región La Libertad (Figura 1); se encuentran registradas en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, código 17612.

La cepa de *Leishmania peruviana* proporcionada por el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Recolección y secado de la planta

Inicialmente se realizó el secado parcial de las plantas bajo sombra y sobre papel periódico; luego, se separaron las flores manualmente y se secaron a 40 °C en una estufa.

Pulverización de los pétalos y preparación de los extractos

La pulverización de 320 g de pétalos de *T. integrifolia* R. & P. se realizó utilizando un molidor mecánico. La muestra pulverizada fue sometida a maceración con metanol a temperatura ambiente y agitación (3 veces al día), durante una semana. El solvente fue removido en un evaporador al vacío (20 mm Hg) y, luego, en la estufa a 45 °C, se obtuvo un concentrado viscoso de color marrón (24,3 g).

Pruebas biológicas in vitro

Mantenimiento de los parásitos

La cepa de *Leishmania peruviana* fue mantenida en medios de cultivo in vitro (NNN o Agar Sangre) mediante repiques sucesivos, cada 7 a 15 días, en tubos de cultivo tapa rosca; a 27 °C.

Disolución del extracto

Con dimetil sulfóxido (DMSO) al 1,6 %²⁴ se prepararon soluciones del extracto en las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 mg/mL.

Obtención de parásitos y enfrentamiento al extracto

Los parásitos fueron tomados en la fase logarítmica de crecimiento. Se realizaron diluciones 1:10 para el recuento de los promastigotas en una cámara Neubauer y se ajustó a una concentración de 1×10^5 parásitos/mL. Con una micropipeta se introdujo 100 mL de parásitos en cada pozo de una placa estéril de microtitulación, equi-

valente a 100 000 parásitos, e inmediatamente se añadió la misma cantidad de extracto, En los pozos testigo, se sustituyó la droga por SSF y como droga de referencia se utilizó el estibogluconato de sodio. Luego se llevó a estufa de cultivo a 27 °C para realizar las lecturas a las 24 y 72 horas.

Determinación de la actividad antileishmiásica sobre Promastigotas

Se utilizó la siguiente escala:

- ++++ : Lisis total
- +++ : Inmovilidad y falta de desarrollo
- ++ : Disminución de la motilidad
- : Parásitos en condición similar a los testigos

Análisis fitoquímico preliminar

Se realizaron ensayos fitoquímicos preliminares^{25,26}, empleando el método de ensayos a la gota. A partir de 2,0 g de concentrado viscoso, se obtuvieron extractos con cloroformo, metanol y agua, para determinar metabolitos secundarios. En el extracto clorofórmico, se realizaron ensayos para esteroides (Liebermann-Burchard) y quinonas (Borntrager); en el metanólico, ensayos para esteroides (Liebermann-Burchard), flavonoides (Shino-

da), compuestos fenólicos (cloruro férrico) y alcaloides (Dragendorff y Mayer); y en el extracto acuoso, flavonoides (Shinoda), taninos (cloruro férrico), saponinas (espuma) y leucoantocianidinas (Rosenheim).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A las 24 horas, el extracto metanólico de los pétalos de *Tessaria integrifolia* L. “pájaro bobo”, a la concentración de 100 mg/mL, originó lisis de los promastigotas de *Leishmania peruviana* y, a la misma concentración, el estibogluconato de sodio solamente originó inmovilidad y falta de desarrollo, indicando un mayor efecto antileishmaniásico del extracto vegetal. A las concentraciones de 50 y 25 mg/mL de extracto metanólico, se observó inmovilidad y falta de desarrollo, efecto similar al originado por la droga de referencia (100 mg/mL). A las concentraciones de 12,5; 6,25 y 3,125 mg/mL la motilidad disminuyó, situación esperada por que existe mucha diferencia respecto a la concentración del estibogluconato de sodio (Tabla 1).

A las 72 horas, el efecto de 100 mg/mL del extracto metanólico de los pétalos de *Tessaria integrifolia* L. “pájaro bobo” continuó siendo el mismo (lisis de promastigotas de *L. peruviana* en comparación con estibogluconato de

Cuadro 1
ACTIVIDAD IN VITRO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS FLORES DE
Tessaria integrifolia R. et P. **SOBRE PROMASTIGOTAS DE** *Leishmania peruviana*

LECTURA Repeticiones [mg/ml]	24 HORAS					72 HORAS				
	T	1	2	3	S*	T	1	2	3	S*
100	-	++++	++++	++++	+++	-	++++	++++	++++	+++
50	-	+++	+++	+++	+++	-	++++	+++	+++	+++
25	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
12,5	-	++	++	++	+++	-	+++	+++	+++	+++
6,25	-	++	++	++	+++	-	+++	+++	+++	+++
3,125	-	++	++	++	+++	-	+++	+++	+++	+++

* La única concentración de Estibogluconato de Sodio usada como referencia fue de 100 mg/mL.

- Donde: T = Testigos (Promastigotas en movimiento)
 1 = Primera Repetición
 2 = Segunda Repetición
 3 = Tercera Repetición
 S = Estibogluconato de Sodio
 ++++ = Lisis total.
 +++ = Inmovilidad y falta de desarrollo.
 ++ = Disminución de la motilidad.
 - = Similar condición a los testigos.

Cuadro 2
FITOCONSTITUYENTES DETECTADOS EN LAS
FLORES DE *Tessaria integrifolia* R. et P.
UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES

Ensayo	Extracto cloroformo	Extracto metanol	Extracto acuoso
Esteroides	+	+	
Quinonas	-		
Flavonoides		+	+
Fenoles		+	+
Saponinas			-
Leucoantocianidinas			-
Alcaloides		-	

Leyenda: + = Presencia
- = Ausencia



Figura 1. *Tessaria integrifolia* R. et P. (Asteraceae); A. Hábito, B. Rama Florífera.

sodio); y en las demás concentraciones originaron inmovilidad y falta de desarrollo, efectos similares al ocasionado por el estibogluconato de sodio; implicando que es necesario un mayor tiempo para que actúen los metabolitos presentes en el extracto y mejorara los resultados.

No es posible comparar los resultados obtenidos; pues, no existen publicaciones relacionadas al efecto antileishmaniásico de la especie en estudio. Trabajos utilizando extractos de vegetales contra protozoarios parásitos como *Trypanosoma*, son de interés para los investigadores¹⁵; sin embargo, contra *Leishmania* son escasos³⁰.

Se ha determinado la estructura de algunos compuestos antileishmaniásicos en especies vegetales; entre ellos: la plumbagina y dos *bis*-naftoquinonas, 3,3'-biplumbagina y 8,8'-biplumbagina^{24,31,32,35}; la diospirina; una *bis*-naftoquinona (aislada de *Diospyros montana*, activa contra *Leishmania donovani*³⁶); lactonas³⁷; y compuestos quinónicos, son los que mejores resultados han arrojado^{9,11,15}.

Los ensayos con extractos brutos ayudan a tener una referencia sobre lo que posteriormente se podría investigar con mayor profundidad con los principios activos puros de la especie en estudio. Por ello, se considero importante realizar un ensayo fitoquímico preliminar de *Tessaria integrifolia* R. et P. para determinar sus metabolitos secundarios. De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 2, se evidencia la presencia de esteroides, flavonoides y fenoles. Los esteroides y flavonoides ya han sido reportados como fitoconstituyentes del extracto etanólico de *Plumbago scandens* L. "solemanillo" o "solemanillo de flores moradas", planta utilizada para el tratamiento de leishmaniasis cutánea o "uta" en zonas rurales andinas de Contumazá, Cajamarca, Perú³⁸.

En la literatura se han reportado flavonoides de origen vegetal como bracteína, luteolina, quercitina, amantoflavone con potente actividad antileishmaniásica contra promastigotas de *Leishmania donovani*^{39,40,41,42} y 2'-6'-dihidroxy-4'-methoxy chalcona contra *L. amazonensis*⁴³. Dentro de los esteroides con actividad antileishmaniásica se han encontrado varios derivados de la Holacurtina y Holamina contra *L. donovani*⁴⁴, Sarachina contra *L. major*⁴⁵ y contra *L. chagasi*⁴⁶. Por lo que, la presencia de flavonoides y esteroides en el extracto metanólico de la *Tessaria integrifolia* R. et P., respaldarían los ensayos positivos antileishmaniásicos de esta especie. Sin embargo, el estudio debe continuar para determinar la estructura del o los principios activos y la verificación de su acción contra *Leishmania peruviana*. A la fecha, los constituyentes químicos encontrados en la parte aérea y raíz de la *Tessaria integrifolia* R. et P. son: escualeno, acetato de b-amirino,

derivados del bistienil, a-tertienilo, lignano, sesquiterpenos, flavonas y ácido cafeoilquinico^{22,47,48,49,50,51}; sin embargo, falta determinar aquellos que poseen actividad antileishmaniásica.

La medicina tradicional a menudo utiliza hierbas y es ampliamente utilizada en todo el mundo, pero aún es difícil establecer que tan efectivas realmente son y resaltar que plantas son fuente importante de nuevos fármacos⁵². Los resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores y sería importante incorporar a *T. integrifolia* dentro de las plantas medicinales que se utilizan en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea o "uta"; podrían servir como base para la síntesis de nuevas drogas, de origen vegetal, que ayuden a aliviar esta enfermedad.

Si bien los estudios in vitro sirven de base para el inicio de la investigación, la utilización de modelos animales constituye la parte más importante del proceso experimental y los resultados que ofrezcan se aproximarán más a la realidad; pues, en los tejidos del ser humano es donde se evidencia el daño producido por *L. peruviana*^{1,2,53}. Siendo el "hámster" *Mesocricetus auratus* altamente susceptible a varias especies de *Leishmania*, sin que ocurra la cura espontánea⁵⁴ y por haber sido utilizado en modelos experimentales anteriores para trabajos similares^{16,55,56}, es conveniente continuar con las investigaciones respecto a ésta especie vegetal.

CONCLUSIONES

1. El extracto metanólico de las flores de *Tessaria integrifolia* R. et P. posee mejor actividad antileishmaniásica in vitro que el estibogluconato de sodio sobre promastigotas de *Leishmania peruviana*.
2. El análisis fitoquímico preliminar de *Tessaria integrifolia* R. et P. revela presencia de esteroides, flavonoides y fenoles.
3. La actividad antileishmaniásica de *Tessaria integrifolia* R. et P. puede atribuirse a los flavonoides y esteroides presentes.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Douglas Sharon y Rainer Bussmann de la Universidad de California-Berkeley, Convenio Interinstitucional Universidad de California-Berkeley y la Universidad Privada Antenor Orrego-Trujillo-Perú.

A la Facultad de Ciencias de la Salud y Departamento Académico de Ciencias de la Universidad Privada Antenor Orrego-Trujillo-Perú, por las facilidades brindadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atías, A., Neghme, A. 2003. Parasitología Médica. Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago, Chile.
- Botero, D., Restrepo, M. 1998. Parasitosis Humanas. 3ª edición, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.
- Cordero, F., Zevallos, J., Sihuincha, M. 1991. Aspectos epidemiológicos de la leishmaniasis tegumentaria americana en el distrito de Santa Cruz-Ancash. Diagnóstico, 28:11-14.
- Perez, J., Ogozuku, E., Inga, R., Lopez, M., Monje, J., Paz, L., et al. 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* sp. in Perú. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg., 88:161-164.
- Organización Mundial de la Salud. 1990. Lucha contra las leishmaniasis: Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos No. 793, Ginebra.
- Houin, R., Fusai, T., Bories, T., Paul, M., Rivollet, D., M. Deniau. 1993. Action of Pentamidine-bound nanoparticles against Leishmaniasis in a in vivo model. XI Congreso Latinoamericano de Parasitología-I Congreso Peruano de Parasitología, Lima, Perú.
- Miranda-Cueto, H. 2000. Leishmaniasis cutánea andina: principios del tratamiento abreviado mediante la saturación intralésional con antimonio de Meglumine. II Congreso Peruano de Parasitología, Trujillo, Perú.
- Tejada, A., Córdova, P., Aliaga, L. 1995. Tratamiento tópico de Leishmaniasis tegumentaria andina con utanid. II Congreso Nacional de Parasitología, Trujillo, Perú.
- Carvalho, L., Rocha, M., Raslan, S., Olivera, B., Krettli, V., 1988. In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. J. Med. Biol. Res. 21(3):485.
- De Haro, E., Moretti, C., Muñoz, V., Sauvain, M., Ruiz, E. 1992. Aspects de la recherche en chemotherapie antiparasitaire en Bolivie. IBBA-ORSTM STP Pharma, Practiquez, 2(3):189-192.
- Fourneth, A., Muñoz, V., Angelo, A. 1998. Actividad in vitro de los alcaloides de tipo bisbenzilico-quinoleico sobre *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*. Congreso extraordinario de IBBA, La Paz, Bolivia.
- Farnworth, N.R. 1984. Banco de Datos computarizados para Plantas Medicinales. Foro Mundial de la Salud. Vol.5.
- Fourneth, A., Muñoz, V., Angelo, A., Aguilar, M. 1990. Plantas medicinales bolivianas antiparasitarias. Congreso Internacional de Parasitología, París, Francia.
- Fourneth, A., Angelo, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Roblot, F., Cave, A., Richomme, P., Bruneton, J. 1994. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea grandiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. Phytotherapy Research, 8:174-178.
- Fourneth, A., Barrios, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Roblot, F. 1994. Antileishmanial activity of a Tetralone isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. Planta Médica, 60:8-12.
- Marín, E. 2000. Efecto leishmanicida "in vitro" e "in vivo" del extracto foliar de *Plumbago scandens* L. "solemanillo" sobre *Leishmania peruviana*. Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro en Ciencias con mención en Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo, Perú. Presentado en el V Congreso Peruano de Parasitología, Trujillo, Octubre, 2002.
- Valverde, J. 1998. Determinación de fitoconstituyentes del extracto de *Pemettya postrata* y efecto antileishmaniano "in vitro". Tesis para obtener el Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Bolaños, C., Gutiérrez, A. 1999. Obtención del extracto foliar y estudio de la actividad leishmanicida de *Pemettya postrata* en *Mesocricetus auratus* infectado con *Leishmania peruviana*. Tesis para optar el grado académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Univ. Nac. de Trujillo, Perú.
- Weberbauer, A. 1945. "El mundo vegetal de los andes peruanos". Estación Experimental La Molina, Lima, Perú.
- Sagástegui, A. 1995. Diversidad Florística de Contumazá. 1ª. ed., Fondo Editorial Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú.
- Sagástegui, A., LEIVA, S. 1993. Flora invasora de los cultivos del Perú -Trujillo.
- Feo, V. D., D'Agostino, M., Simone, F. D., Pizza, C., 1990. Fito-terapia, 61, 474.
- Tuttolomondo, M. V., Massa, R., Bendersky, D., Cruañes, M. C., Cruañes, M. J., Muñoz, J. De Dios, Ferraro, G., Martino, V., Gutkind, G., Cavallaro, L., Vivot, E. 2004. Rev. Cubana Plant. Med.
- Muñoz, V. 1987. Obtención de la fracción activa y estudio de la actividad leishmanicida "in vitro" sobre promastigotas de la especie vegetal *Mumoxia maroni*. Tesis para obtener la Licenciatura en Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Cain, B.F., Griffin, W.J., Wall, M.E., 1961. New Zeland J. Sci. 4,3.
- Dominguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica, Editorial Limusa, México.
- Soejarto, D. 1994. El estado de la investigación sobre plantas medicinales en la América Latina y en el mundo. Simposio sobre plantas medicinales y/o tóxicas, 24-28 de Octubre, Universidad de Antioquia, Colombia.
- Litter, M. 1988. Compendio de Farmacología. 4ª ed., Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.
- Voigh, P., 1982. Tratado de Tecnología Farmacéutica. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- França, F., Cuba, C., Moreira, E., Miguel, O., Almeida, M., Das Virgens, M., Marsden, P. 1993. Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentale* L.) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 26(3):151-155.
- Fourneth, A., Angelo, A., Muñoz, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cave, A. 1992. Biological and chemical studies of *Pera benensis* a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. Journal of Ethnopharmacology, 37:159-164.
- Muñoz, V., Moretti, C., Sauvain, M., Caron, C., Porzet, A., Massiot, B., Le Men-Olivier, L. 1994. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (Syn. *Tabernaemontana van heurkii*). Planta Med, 60:455-459.

33. Da-Silva, A.G., Almeida, A.P., Costa, S.S., Rossi-Bergmann, B. 1999. Aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* plant up-regulates TH1 cytokines in normal and *Leishmania*-infected mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94(II):222.
34. Chávez-Abanto, L., Casanova-Herrera, H., Saavedra-Suárez, S. 2005. Espectroscopía de los metabolitos secundarios y actividad antileishmaniásica in vitro en *Leishmania peruviana* del fruto de *Lycopersicon pimpinellifolium*. Sciendo 8 (1-2):35-42.
35. Kayser, O., Kiderlen, A., Laatsch, R., Croft, S. 2000. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. Acta Tropica 76(2):131-138.
36. Hazra, B., Saha, A.K., Rar, R., Roy, D.K., Sur, P., Banerjee, A. 1987. Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81:738-741.
37. Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, Lima, Perú.
38. Marín S., E. 2006. Estudio fitoquímico preliminar de *Plumbago scandens* L. (Plumbaginaceae): planta de uso popular para el tratamiento de leishmaniasis cutánea o "uta". Acta Méd Orreguiana Hampi Runa, 6(2):122-126.
39. Kayser, O., Kiderlen, A.F., Folkens, U., Koldzieg, H. 1999. In vitro leishmanicidal activity of aurones. Planta Med. 65, 329-319.
40. Mitra, B., Saha, A., Chowdhury, A.R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., Majumder, H.K. 2000. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. Mol. Med. New York 6:527-541.
41. Chan-Bacab, M.J., Peña-Rodríguez, L.M. 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat. Prod. Rep. 18:674-688.
42. Paredes, F., Clemente, A. 2005. Ámbito Farmacéutico-Fitoterapia, 24(8):85.
43. Torres-Santos, E.C.S., Moreira, D.L., Kaplan, A.M.C., Meirelles, M.N., Rossi-Bergmann, B. 1999. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1234-1241.
44. Kam, T.S., Sim, K.M., Koyano, T., Toyoshima, M., Hayashi, M., Konyiama, K. 1998. Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarthena curtisii*. J. Nat. Prod. 61:1332-1336.
45. Sahpaz, S., Bories, C.H., Loiseau, P.M., Cortes, D., Hocquemiller, R., Lauerns, A, Cavé A. 1994. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. Planta Med. 60:538-540.
46. Moretti, C., Sauvain, M., Lavaud, C., Massiot, G., Bravo, J.A., Muñoz, V. 1998. A novel Antiprotozoal aminosteroid from *Saracha puntata*. J. Nat. Prod. 61:1390-1393.
47. Bohlmann, F., Zdero, C., Silva, M. 1977. Phytochemistry, 16:1302.
48. Jakupovic, J., Misra, L.N., Thi, T.C., Bohlmann, F., Castro, V. 1985. Phytochemistry, 24:3053.
49. Guerreiro, E., Pestchanker, M.J. 1990. Phytochemistry, 29: 877.
50. Peluso, G., Feo, V.D., Simone, F.D., Bresciano, E., Vuotto, M.L. 1995. J. Nat. Prod. 58: 639.
51. Masateru, O., Chikako, M., Yusuke, O., Yasuyuki, I., Toshihiro, N. 2000. Phytochemistry 53:479.
52. TDRNews. 2000. Natural Products for the treatment of parasitic diseases. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, No. 62, June.
53. Sauvain, M. 1994. Una estrategia para descubrir sustancias naturales aisladas de Plantas Medicinales activas contra la leishmaniasis. ORSTOM, Dept Santé, París, France.
54. Rezzano, S., Moreno, G., Scorza, J.V., 1982. Quimioterapia experimental en hámster por paromomicina contra aislados de *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 34:34-45.
55. Trotter, E.R., Peters, W., Robinson, B.L. 1980. The experimental chemotherapy of Leishmaniasis, IV: The development of rodent models for cutaneous infection with *L. major* and *L. mexicana amazonensis*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 74(3):299-319.
56. Merchan-Hamann, E., Costa, A., Cuba, C., França, F., Marsden, D. 1987. Infecção experimental com *Leishmania braziliensis braziliensis* em hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo para estudos quimioterapicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82(I):175.