



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Estudio de la actividad leishmanicida *in vitro* de
extractos y fracciones de especies vegetales de los
géneros *Annona* y *Piper* en promastigotes de
*Leishmania braziliensis***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Ronald Erik QUIÑONEZ DEXTRE

ASESOR

Dr. César Máximo FUERTES RUITÓN

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Quiñonez R. Estudio de la actividad leishmanicida *in vitro* de extractos y fracciones de especies vegetales de los géneros *Annona* y *Piper* en promastigotes de *Leishmania braziliensis* [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Estudio de la actividad leishmanicida <i>in vitro</i> de extractos y fracciones de especies vegetales de los géneros <i>Annona</i> y <i>Piper</i> en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i>
Área de investigación (*)	Ciencias Farmacéuticas
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	<ul style="list-style-type: none"> • Av. Honorio Delgado 430, Urb Ingeniería, Lima - Perú • Jr. Puno N° 1002-Lima-Perú
Institución que financia si corresponde	Vicerrectorado de Investigación y Posgrado - Fondo de Promoción de trabajo de Tesis de Pregrado
Año o rango de años que abarcó	2016-2018
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Quiñonez Dextre, Ronald Erik
Número de matrícula	10040085
DNI	47210402
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	-
DATOS DEL ASESOR	
Apellidos y Nombres	Fuertes Ruitón, César Máximo
Código docente: 027154	Categoría: Principal Clase: Tiempo completo
Máximo grado alcanzado	Doctor
Código ORCID (obligatorio)	0000-0002-6170-3549
Título profesional	Químico Farmacéutico
Departamento Académico al que pertenece	Departamento de Química Básica y Aplicada
Instituto de investigación al que pertenece	Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"
Grupo de investigación al que pertenece Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Coordinador del Grupo Nature

(*) Según documentos oficiales de la Facultad



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“Estudio de la actividad leishmanicida *in vitro* de extractos y fracciones de especies vegetales de los géneros *Annona* y *Piper* en promastigotes de *Leishmania braziliensis*”

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

RONALD ERIK QUIÑONEZ DEXTRE

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

SORRESALIENTE 17

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 26 de marzo de 2018.


Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Presidente


Mg. Luis Alberto Rojas Ríos
Miembro


Q.F. Robert Dante Aimonacid Román
Miembro


Q.F. Luz Kathia Hernández Calderón
Miembro



“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Dios por permitirme despertar con bien cada mañana y por las oportunidades que me ha brindado.

*También se lo dedico a mis padres **Zoila** y **Luis**, por su amor incondicional y por ser un apoyo constante en mi desarrollo profesional y moral.*

*A mi hermana **Erika** quien siempre estuvo cuidándome desde pequeño brindándome su cariño y compañía.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a mi familia por su constante apoyo y motivación.

*A mis compañeros del grupo de estudios ASEDIREN con quienes compartí
gratos momentos en mi etapa universitaria*

*Agradezco enormemente a mi asesor el doctor César Fuertes por su paciencia,
compresión y grandes enseñanzas.*

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Química de Carbohidratos del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM y en el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Cayetano Heredia, gracias al financiamiento del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado.

ABREVIATURAS

IC₅₀: Concentración inhibitoria media

RPMI: Roswell Park Memorial Institute médium

SFB: Suero Fetal Bovino

MTT: Tetrazolium, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OMS: Organización Mundial de la Salud

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Objetivo general	2
1.2.	Objetivos específicos	2
1.3.	Hipótesis	3
II.	GENERALIDADES	3
2.1.	Antecedentes	3
2.2.	Marco teórico	4
2.2.1	Leishmaniasis	4
2.2.2	Vector de la Leishmaniasis	4
2.2.3	Agente etiológico	5
2.2.4	Ciclo de vida del agente etiológico	8
2.2.5	Formas clínicas de leishmaniosis	9
2.2.6	Epidemiología	10
2.2.7	Situación actual	11
2.2.8	Familia <i>Annonaceae</i>	12
2.2.9	Familia <i>Piperaceae</i>	13
III.	PARTE EXPERIMENTAL	14
3.1.	Tipo de estudio	14

3.2.	Materiales, equipos y reactivos	14
3.3.	Recolección del material vegetal	16
3.4	Procesamiento de las muestras vegetales	17
3.4.1	Obtención de los extractos	17
3.4.2	Obtención de diluciones	18
3.5	Preparación de los reactivos para el ensayo in vitro	18
3.6	Ensayo in vitro	20
3.6.1	Cuenta de Parásitos	20
3.6.2	Enfrentamiento	22
3.6.3	Test de Viabilidad con MTT	24
3.7	Fraccionamiento	25
IV.	RESULTADOS	26
V.	DISCUSIÓN	34
VI.	CONCLUSIONES	37
VII.	RECOMENDACIONES	38
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
IX.	ANEXOS	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies vegetales de estudio

Tabla 2. Taxonomía de especies en estudio

Tabla 3. Conteo de parásitos

Tabla 4. Procedimiento de dilución

Tabla 5. Volúmenes de mezcla

Tabla 6. Aplicación en micropocillos

Tabla 7. Rendimiento de los extractos etanólicos de las especies *Annona* y *Piper*

Tabla 8. Resultados obtenidos de la actividad leishmanicida mediante el modelo estadístico Probit de las especies de *Annona*

Tabla 9. Resultados obtenidos de la actividad leishmanicida mediante el modelo estadístico Probit de las especies de *Piper*

Tabla 10. Screening Fitoquímico a plantas representativas

Tabla 11. Porcentaje de rendimiento en fracciones

Tabla 12. IC₅₀ del extracto etanólico de *Annona mucosa*

Tabla 13. IC₅₀ del extracto etanólico de *Annona montana*

Tabla 14. IC₅₀ extracto etanólico de *Piper callosum*

Tabla 15. IC₅₀ extracto etanólico *Piper peltatum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mosquito flebótomo, vector de la Leishmania

Figura 2. Clasificación filogenética del género Leishmania

Figura 3. Ciclo de vida de la Leishmania

Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología

Figura 5. Constancia de determinación

Figura 6. Plantas colectadas y molidas I

Figura 7. Plantas colectadas y molidas II

Figura 8. Ensayo in vitro de viabilidad celular de promastigotes con reactivo

MTT

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó de manera *in vitro* la actividad leishmanicida de extractos y fracciones obtenidas de especies vegetales no reportados anteriormente. Se partió de extractos etanólicos de las especies *Annona hypoglauca*, *Annona montana*, *Annona mucosa*, *Annona nítida*, *Annona squamosa*, *Piper acutifolium*, *Piper aduncum*, *Piper callosum*, *Piper carpunya* y *Piper peltatum*, los que fueron enfrentados contra una línea clonal de referencia de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, responsable de la leishmaniosis mucocutánea en el Perú. Las especies con mayor actividad fueron: *Piper acutifolium* (IC₅₀=19,4 µg/mL), *Piper peltatum* (IC₅₀=27,6 µg/mL), *Piper callosum* (IC₅₀=21,7 µg/mL), *Annona mucosa* (IC₅₀=30,5 µg/mL) y *Annona montana* (IC₅₀=16,4 µg/mL).

Así mismo, las fracciones obtenidas que presentaron mayor actividad fueron la fracción de hexano de *A. mucosa* (IC₅₀=4,5 µg/mL), fracción de cloroformo de *A. montana* (IC₅₀=3,2 µg/mL), fracción de acetato de etilo de *A. montana* (IC₅₀=9,5 µg/mL) y fracción de hexano de *P. peltatum* (IC₅₀=27,1 µg/mL).

En los extractos etanólicos se identificaron compuestos fenólicos, alcaloides y flavonoides a los cuales posiblemente puede atribuírseles la actividad antileishmania.

Palabras clave: *Annona*, *Piper*, extracto, promastigote, *Leishmania braziliensis*

ABSTRACT

In the present study the leishmanicidal activity of extracts and fractions obtained from plant species not previously reported was evaluated in vitro. It was based on ethanolic extracts of the species *Annona hypoglauca*, *Annona montana*, *Annona mucosa*, *Annona nitida*, *Annona squamosa*, *Piper acutifolium*, *Piper aduncum*, *Piper callosum*, *Piper carpunya* and *Piper peltatum*, which were faced against a clonal reference line of *Leishmania braziliensis* promastigotes, responsible for Mucocutaneous leishmaniasis in Peru. The species with the highest activity were: *Piper acutifolium* (IC₅₀=19,4 µg/mL), *Piper peltatum* (IC₅₀=27,6 µg/mL), *Piper callosum* (IC₅₀=21,7 µg/mL), *Annona mucosa* (IC₅₀=30,5 µg/mL) and *Annona montana* (IC₅₀=16,4 µg/mL).

Likewise, the fractions obtained that showed the highest activity were the hexane fraction of *A. mucosa* (IC₅₀=4,5 µg/mL), the chloroform fraction of *A. montana* (IC₅₀=3,2 µg/mL), the acetate fraction of ethyl acetate of *A. montana* (IC₅₀=9.5 µg/mL) and hexane fraction of *P. peltatum* (IC₅₀ = 27,1 µg/mL).

In the ethanolic extracts phenolic compounds, alkaloids and flavonoids were identified to which the antileishmania activity can possibly be attributed.

Key words: *Annona*, *Piper*, extract, promastigote, *Leishmania braziliensis*.

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta principalmente a pueblos pobres de los países en vías de desarrollo y se estima que anualmente se producen de 700 000 a 1 millón de casos nuevos y de 20 000 a 30 000 fallecimientos.

El control primario de la enfermedad radica en un número limitado de moléculas registradas disponibles, dentro de las cuales encontramos a las sales de amonio pentavalente, como las drogas estándares por más de 60 años, sin embargo, se han registrado casos de resistencia a estas drogas.

Otras drogas como la pentamidina y anfotericina B son caras y generan diversos efectos adversos, inclusive mayores a los generados por los antimonios pentavalentes. A ello podemos sumar la falta de incentivo económico por parte de compañías farmacéuticas en investigar y desarrollar nuevos fármacos para tratar esta enfermedad, especialmente en zonas alejadas de las poblaciones urbanas.

Por todo lo expuesto, se hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos activos que no solo inhiban el crecimiento de los parásitos de Leishmania y que sean de bajo coste, sino que además lo hagan a dosis en las que no se generen efectos adversos y/o toxicidad en las células del organismo.

1.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad leishmanicida *in vitro* de especies vegetales de los géneros *Annona* y *Piper* sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

1.2. Objetivos específicos:

- Determinar la actividad leishmanicida *in vitro* de los extractos etanólicos de especies de los géneros *Annona* y *Piper* sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*.
- Realizar el estudio biodirigido de los extractos con mejor actividad anti-leishmania.
- Identificar los tipos de metabolitos presentes en los extractos seleccionados mediante métodos químicos.

1.3. Hipótesis

Los extractos etanólicos y fracciones de las hojas de especies vegetales de los géneros *Annona* y *Piper* presentan una actividad leishmanicida significativa sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

II. Generalidades

2.1. Antecedentes

Algunos estudios reportan que el extracto de *Annona muricata* en acetato de etilo presenta notable actividad leishmanicida inclusive mucho mayor que el patrón referencial, glucantime. Por lo que resulta de interés el estudio de sus acetogeninas¹.

La evaluación del efecto antiprotozoario de *Annona muricata* se evidencia al enfrentamiento con el uso de su extracto metanólico, sin embargo, para este caso, la actividad no es tan marcada a comparación del estándar de cloroquina².

Hay estudios que profundizan en los metabolitos de *Annona muricata* para combatir los protozoos de Leishmania, para ello aplican ensayos de viabilidad celular con indicadores cromóforos³.

A partir de un estudio extenso y minucioso se plantearon referencias de las piperáceas endémicas del Perú, dentro de las que destacan: *Piper acutifolium* y *Piper aduncum*⁴.

Piper aduncum L. conocida vulgarmente como “yerba del soldado, tilonga, matico o mogo-mogo” reporta uso tradicional, empleando sus hojas frescas o seca, para tratar el resfrío, dolor de garganta, bronquitis, tuberculosis, infección e inflamación, entre otras afecciones del sistema respiratorio⁵.

Evaluaron los aceites esenciales de *Piper acutifolium* obtenido en la localidad de “La Florida” Cajamarca para determinar su composición química utilizando cromatografía de gases acoplada a masas, a partir de esto se determinó que

sus constituyentes principales fueron el (E)- β -ocimeno, α -copaeno, aloaromadendreno, entre otros. Este aceite esencial fue utilizado para evaluar su efecto insecticida y si bien es cierto este no fue marcado, se observó una disminución significativa de la ovoposición⁶.

Se determina el rol antiinflamatorio y antimicrobiano de *Piper porphyrophyllum* frente a *Staphylococcus aureus*, indicando que el sinergismo presente en los metabolitos del extracto hexánico y de acetato de etilo son los responsables de la actividad biológica⁷.

2.2. Marco teórico

2.2.1 Leishmaniasis

La Leishmaniasis es una enfermedad crónica, metaxénica, de baja patogenicidad y de alta morbilidad causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, propio de la familia *Trypanosomatidae*⁸⁻¹⁰.

Actualmente, se describen más de 20 especies de este parásito, los cuales son transmitidos a los seres humanos por la picadura de mosquitos flebótomos femeninos infectados. Se conoce también que más de 90 especies de estos mosquitos transmiten esta enfermedad⁹.

Existen 3 formas principales de leishmaniasis: Leishmaniasis visceral (también conocida como kala-azar, es la forma más grave), cutánea (la más común) y mucocutánea⁹.

2.2.2 Vector de la Leishmaniasis

El mosquito transmisor de la leishmania se encuentra ampliamente distribuido en el mundo.

En el Nuevo Mundo, el vector principal es un mosquito del género *Lutzomyia*, y en el Viejo Mundo, del género *Phlebotomus*. Ambos pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae. En general, el primer género se distribuye principalmente en América Latina y el segundo en Europa (básicamente la zona mediterránea), Asia, África Septentrional y la Península Arábiga ¹¹.

Estos mosquitos se caracterizan por ser dípteros, medir entre 2 – 3 mm y estar cubiertos de finas sedas. El color de su anatomía varía de un color marrón claro a beige. Tanto los machos como las hembras requieren líquidos azucarados para su subsistencia, pero solo la hembra requiere de sangre para la maduración de los huevos lo que las hace causantes de la transmisión de la leishmaniosis y otras enfermedades ¹².



Figura 1. Mosquito flebótomo, vector de la Leishmania

2.2.3 Agente etiológico

Actualmente se conocen 54 especies de *Leishmania*, de estas, 31 parasitan mamíferos y por lo menos 21 son patógenas para los seres humanos. Este parásito heteroxeno (que infecta diferentes tipos de hospederos) alterna su ciclo biológico entre los mamíferos (las células inmunitarias del Sistema Reticulo-endotelial) y el intestino de los mosquitos vectores de la leishmania.

Además, exhiben una distribución mundial presente en América del Centro, Norte y Sur, así como la Cuenca del mediterráneo, el sudeste de Europa, Asia Central, Oriente Medio y Sudoriental, Subcontinente indio, África, e informes recientes señalan su existencia en Australia ^{13,14}.

Recientemente, se ha planteado una nueva división de la Leishmania sobre la base de datos moleculares, que clasifica a las especies de Leishmania en dos linajes filogenéticos principales denominados secciones Euleishmania y Paraleishmania (**Figura 2**). La section Euleishmania comprende cuatro subgéneros: Leishmania, Viannia, Sauroleishmania y complejo *L. enriettii*. La sección Paraleishmania incluye *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* y *L. colombiensis*, así como el antiguo género Endotrypanum. De este grupo, solo *L. colombiensis* es patógeno para los humanos ¹³.

Morfológicamente las variedades de especies de leishmania son difíciles de diferenciar. Para identificar cada especie del género leishmania se toma en cuenta las siguientes peculiaridades:

- A) Inmunológicas: interacción del protozooario con anticuerpos monoclonales y serotipificación del factor de excreción, taxonomía numérica para precisar mejor el cambio molecular y la correspondencia filogenética.
- B) Biológicas: morfología, clase de maduración en el vector flebótomo, en los medios de cultivo y en el hospedador.
- c) Bioquímicas: electroforesis de isozimas, análisis del ADN nuclear y del kinetoplasto¹⁵.

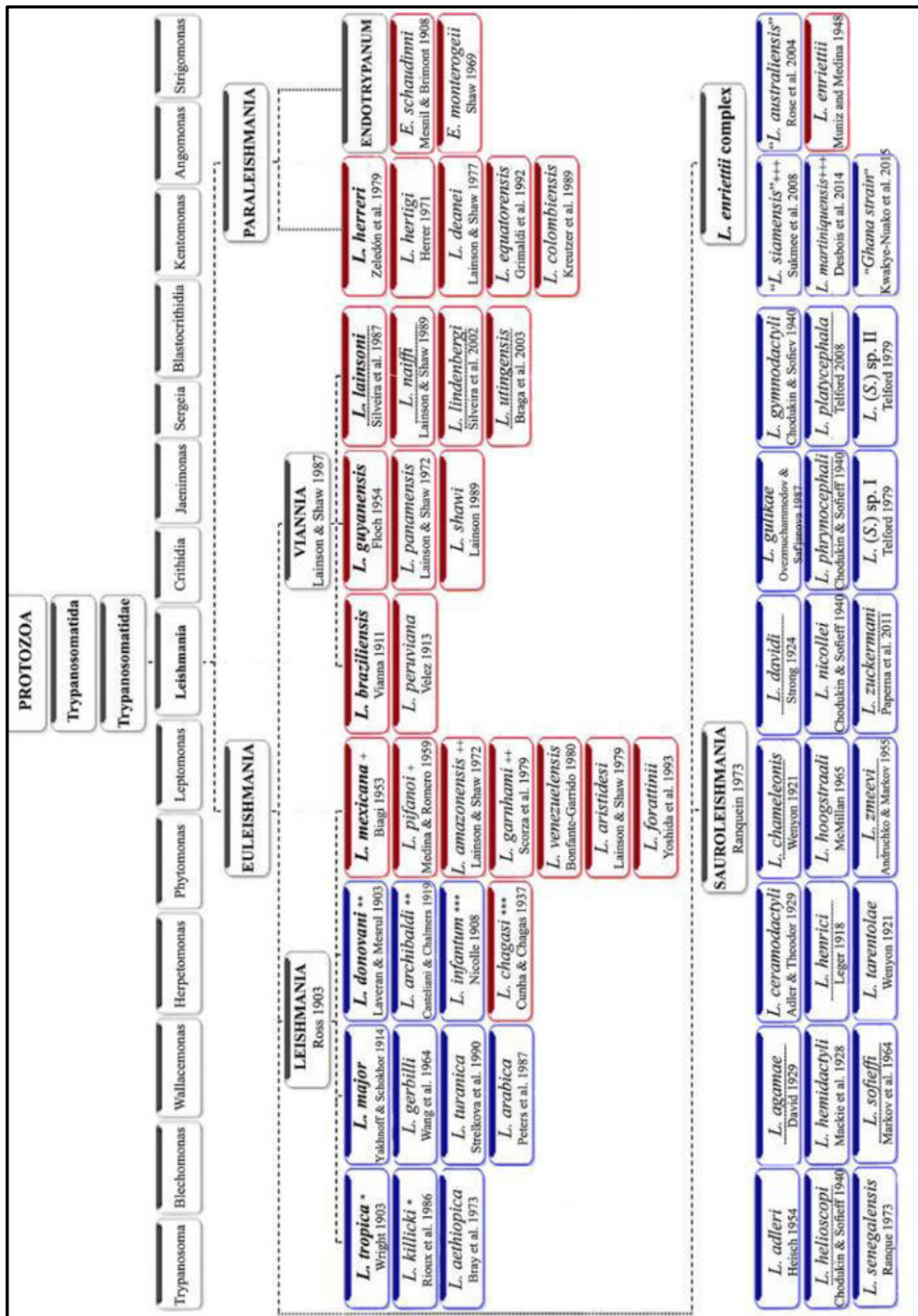


Figura 2. Clasificación filogenética del género Leishmania ¹³

2.2.4 Ciclo de vida del agente etiológico

El parásito se presenta de dos formas: la forma inmóvil o amastigote, caracterizada por su forma oval, con un tamaño de 2-3 μm , carente de flagelo (en hospedadores vertebrados) y presente en los fagocitos; y la forma móvil o promastigote, con una dimensión de 15-24 μm x 2-4 μm , con un solo flagelo (presente en los mosquitos) y listo para infestar a otro hospedero cuando se encuentra en la fase de promastigote metacíclico.

El mosquito flebótomo incorpora los parásitos al ingerir sangre de hospederos infectos, el parásito ingresa en la forma de amastigotes, encontrándose dentro de las células fagocíticas (macrófagos). Durante 4-25 días el parásito sigue su desarrollo en el intestino del insecto convirtiéndose en promastigote, dividiéndose por fisión binaria (promastigote procíclico), incrementando su población y movilizándose hacia la faringe y boca, de donde será inoculada a través de picaduras (promastigote metacíclico). Luego de esto, los promastigotes infectivos (metacíclicos) sufren contacto con la sangre del hospedero y son fagocitadas por células del sistema retículo endotelial, donde pasan a ser amastigotes y comienzan a reproducirse, también por fisión binaria, hasta que destruyen la célula y se liberan en la circulación siendo fagocitadas otra vez repitiéndose el ciclo en el mamífero hasta que son engullidas por un nuevo mosquito ¹⁶.

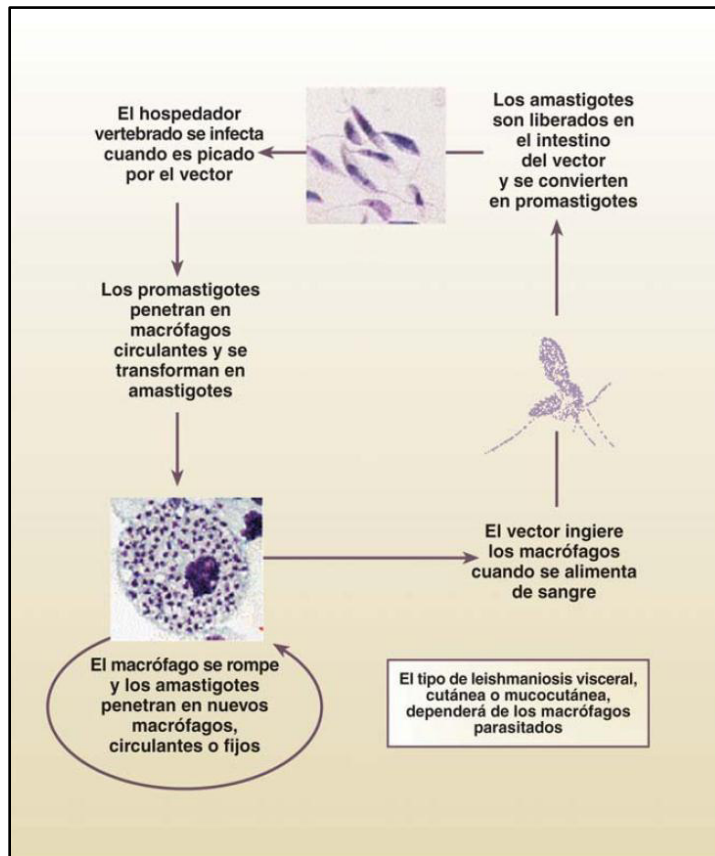


Figura 3. Ciclo de vida de la Leishmania ⁹

2.2.5 Formas clínicas de leishmaniosis

Leishmaniosis cutánea, distinguida por producir lesiones ulcerativas alrededor de la picadura del vector, en la cara, brazos y piernas. Deja usualmente cicatrices permanentes y deformantes. La lesión empieza generalmente con una pápula en la picadura del flebótomo, se agranda a un nódulo y se ulcera durante 1-3 meses.

Las úlceras se limitan a la zona de la picadura del hospedero, aun así, la progresión de la enfermedad a una forma diseminada varía dependiendo de la especie, así como del grado de inmunocompetencia del ser infectado¹⁰.

Las principales especies que la generan son: *L. mayor*, *L. tropica* y *L. aethiopica* (en Europa); *L. infantum* y *L. chagasi* (en regiones del mar Mediterráneo y el mar Caspio); y *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* y *L. guyanensis* (en América) ¹¹.

Leishmaniosis mucosa/mucocutánea, La diseminación mucosa de especies de América (*L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*) ocurre en 1-10% de las infecciones, desarrollándose 1-5 años después de que la leishmaniosis cutánea haya sanado, pero a veces concuerda con lesiones cutáneas activas; esta leishmaniosis mucosa empieza con eritemas y ulceraciones en las fosas nasales, procediendo a la perforación del tabique nasal y lesiones inflamatorias destructivas. Este último puede obturar la faringe o la laringe y producir evidentes desfiguraciones ¹¹.

Leishmaniosis visceral, la forma más grave (mortal) de la infección, determinada por causar episodios febriles, pérdida de peso, malestar general, linfadenopatías y hepatomegalia acompañada de esplenomegalia¹⁰.

2.2.6 Epidemiología

La leishmaniasis es una infección de gran distribución geográfica, y engloba regiones áridas, tropicales y subtropicales. La incidencia se ha incrementado en los recientes años, llegando a un 500%, de acuerdo a la OMS. Se dan aproximadamente 1,5 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea anualmente, el 90% se da en Irak, Afganistán, Argelia, Irán, Arabia Saudita y Siria; y en América en Brasil y Perú¹⁵.

La leishmaniasis cutánea americana no es endémica en países como Chile y Uruguay.

En el Perú se estima una incidencia vigente cercana a los 18 000 nuevos casos por año y una población en riesgo de infección mayor a 1 millón de habitantes¹⁷⁻¹⁸. La zona endémica abarca cerca del 74% de la extensión total del país (951 820 km²), se despliega por los Andes y valles interandinos entre los 600 y los 3000 m.s.n.m. y las zonas de selva alta y baja por debajo de los 2000 m.s.n.m¹⁹⁻²⁰.

2.2.7 Situación actual

Los métodos de control son el diagnóstico y la quimioterapia tempranos; a la fecha, no se dispone de una vacuna efectiva y clínicamente aprobada para uso en humanos²¹. Los tratamientos usados para la leishmaniosis son largos y costosos: inyecciones diarias por tres semanas y gastos que exceden los 2000 soles. La población afectada comprende campesinos o personas dedicadas a la extracción de recursos en la selva amazónica. A los días de trabajo perdidos se añaden los efectos colaterales y últimamente el incremento de falla terapéutica con las drogas convencionales antimoniales²²⁻²³. El personal de salud reclama nuevas drogas para el tratamiento de las leishmaniosis de importancia en salud pública a nivel regional. Se requiere formular nuevas drogas que sean efectivas, seguras y de bajo costo. En este sentido, el descubrimiento y evaluación de nuevos “lead compounds” en cuanto a su actividad antileishmania son de urgente prioridad²⁴⁻²⁵ y una inquietud expresada en los programas de salud global²⁶.

Los productos naturales son una fuente atractiva de una inmensa variedad de compuestos químicos y una fuente importante de agentes terapéuticos contra

enfermedades parasitarias como malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, entre otros. Se han expuesto diversos estudios sobre productos naturales con actividad leishmanicida, como la descrita por L. Rocha y colaboradores, donde recopilan y enumeran una serie de extractos vegetales que exhibieron interesantes propiedades leishmanicidas a nivel *in vitro*²⁷⁻²⁸.

2.2.8 Familia *Annonaceae*

La familia *Annonaceae* está conformada fundamentalmente por árboles de mediano y gran tamaño. En el Perú son reconocidos 27 géneros y 236 especies²⁹. Así mismo, se han identificado 44 endemismos en 15 géneros, de los cuales tres son pertenecientes al género *Annona* (*Annona deminuta*, *Annona asplundiana* y *Annona iquitensis*).

Esta familia se caracteriza por tener diversos fitoconstituyentes, dentro de los cuales podemos mencionar a los flavonoides, alcaloides, sesquiterpenos, cumarinas, entre otros³⁰⁻³¹; además de existir un tipo de metabolito característico: las acetogeninas, las cuales abarcan una larga familia de productos naturales procedentes de ácidos grasos y que también han evidenciado tener buenos efectos antimicrobianos, antiparasitarios, anticancerígenos, entre otros³¹⁻³³.

2.2.9 Familia *Piperaceae*

La familia *Piperaceae* es identificada en el Perú por poseer tres géneros y 830 especies, entre hierbas y arbustos, de los que se describen 491 especies y 68 variedades como endémicos en dos de sus géneros. El género más diverso en especies es *Piper*³⁴.

Además se califica a la familia *Piperaceae* como fuente importante de sustancias con actividad farmacológica; plantas de esta familia se reconocen como especies utilizadas en medicina tradicional latinoamericana para el tratamiento de leishmaniosis, malaria y otras enfermedades tropicales³⁵.

Además existen estudios donde se corrobora su actividad leishmanicida, Ferreira y colaboradores registraron la forma de acción de los alcaloides producidos por especies de *Piperaceae* los que generaron daño mitocondrial que disminuyeron considerablemente la supervivencia de Leishmaniasis³⁶.

Así mismo, otras sustancias químicas derivadas de especies del género *Piper* como *P. heterophyllum*, *P. aduncum*³⁶ y *P. glabratum*³⁷ han evidenciado propiedades antiparasitarias y leishmanicidas.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Tipo de estudio

Experimental y analítico

3.2. Materiales, equipos y reactivos

Material botánico

Hojas de las especies vegetales

Tabla 1. Especies vegetales de estudio

Annonaceas	Piperaceas
- <i>Annona hypoglauca</i>	- <i>Piper acutifolium</i>
- <i>Annona montana</i>	- <i>Piper aduncum</i>
- <i>Annona mucosa</i>	- <i>Piper callosum</i>
- <i>Annona nítida</i>	- <i>Piper carpunya</i>
- <i>Annona squamosa</i>	- <i>Piper peltatum</i>

Material biológico

Se utilizó una cepa referida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/79/M2904, la cual se encontraba almacenada en un tanque de nitrógeno líquido para su conservación.

Materiales de laboratorio

- Embudos
- Embudos de decantación
- Frascos de color ámbar
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 mL
- Tubos de microcentrífuga de 1500 µL y 600 µL

- Placas Petri de vidrio
- Tubos cónicos de centrifugación de 15 mL y 50mL
- Gradillas
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel Kraft
- Frascos de cultivo de 25 cm²
- Pipetas descartables de 1mL y 10mL
- Placas de cultivo de 96 pocillos
- Pipetas automáticas: P1000, P200 y P20

Reactivos

- Alcohol 96° (Merck)
- Agua destilada
- Acetato de etilo (Merck)
- N-hexano (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Medio de Cultivo M199 10%SFB
- Solución de Buffer Fosfato 0,01M
- Estándar de Anfotericina B
- MTT (Tetrazolium, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (10mg/mL)
- Solución al 50% de isopropanol y 10% de sodium dodecyl sulfate
- Medio de cultivo M199 10% SFB
- Agua ultra pura (mQ) estéril

Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar Marca Dauerhaft, modelo BBS-DDC
- Microscopio invertido Marca: ZEISS. Modelo: AxioObserver.D1
- Incubadora Marca: Memmer
- Centrifuga de Mediana Velocidad refrigerada Marca: Eppendorf.
Modelo: 5804 R.
- Vortex LVM 1000 / 2000
- Lector de Elisa Marca: SINNOWA. Modelo: ER500

3.3. Recolección del material vegetal

Las especies vegetales que fueron objeto de estudio se recolectaron en diferentes zonas locales de la provincia de Maynas, departamento de Loreto, la verificación e identificación de estas especies fue realizada en el Centro de Investigación de Recursos Naturales de (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). **(Anexo 1)**

El detalle de las especies vegetales es la siguiente:

Tabla 2. Taxonomía de especies en estudio

	FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMÚN
1	Annonaceae	<i>Annona hypoglauca</i> Mart.	Anonilla sogá
2	Annonaceae	<i>Annona montana</i> Macfad.	Anonilla
3	Annonaceae	<i>Annona mucosa</i> Jacq	Anona
4	Annonaceae	<i>Annona nítida</i> Mart	Anonilla
5	Annonaceae	<i>Annona squamosa</i> L.	Anona
6	Piperaceae	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	Matico
7	Piperaceae	<i>Piper aduncum</i> L.	Cordoncillo
8	Piperaceae	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	Guayusa
9	Piperaceae	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	Carpundia
10	Piperaceae	<i>Piper peltatum</i> L.	Santa maría

3.4 Procesamiento de las muestras vegetales

Se recolectó aproximadamente 2 kg de cada especie vegetal. Las hojas de las muestras vegetales fueron debidamente limpiadas y secadas a 40°C por tres días. Luego fueron molidas hasta un tamaño adecuado y almacenadas en lugares frescos.

3.4.1 Obtención de los extractos

Se sometió a maceración con alcohol etílico al 96% una cantidad de 20g de cada muestra vegetal en frascos ámbar durante una semana. Posteriormente, se filtró cada macerado y se concentró en estufa de aire circulante a una temperatura de 39°C hasta sequedad. Estos extractos etanólicos secos fueron

destinados al primer ensayo *in vitro* sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Para el fraccionamiento de las especies vegetales con actividad leishmanicida significativa se utilizaron 250g de cada muestra vegetal.

3.4.2 Obtención de las diluciones

De cada extracto etanólico seco se tomó 10mg para preparar una solución madre de 10mg/mL en Dimetil Sulfoxido (DMSO). Para los ensayos las soluciones madre fueron diluidas a las concentraciones de 100 µg/mL, 10 µg/mL y 1 µg/mL con el medio de cultivo M199 10% SFB. Las concentraciones finales de DMSO en cada muestra fueron no mayores al 1%.

Se utilizaron los mismos diluyentes para el segundo ensayo *in vitro* con las fracciones de las especies más activas, pero las concentraciones finales fueron 50 µg/mL, 5 µg/mL, 0,5 µg/mL y 0,05 µg/mL.

3.5 Preparación de los reactivos para el ensayo *in vitro*

Stock de Anfotericina B 1mM

Sigma A-2411

PM = 924,1

Proteger de la luz

Pesar : 0,924 mg

Volumen total : 1mL

Diluyente : DMSO

Disolver mediante agitación y luego esterilizar por filtración (filtros de 0,22 µm de diámetro de poro).

Trasladar 30 μ L en tubos de microcentrifuga de 500 μ L estériles. Proteger de la luz.

Almacenar a -20°C hasta su uso.

Solución Stock de MTT 5 mg/mL

Sigma M2128

Proteger de la luz

Pesar : 100 mg

Volumen total : 10 mL

Diluyente : PBS 0,01M

- Disolver mediante agitación constante durante un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente.
- Mantener siempre protegido de la luz.
- Esterilización por filtración (filtros de 0,22 μm de diámetro de poro).

Stock de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10% pH=5,4

Isopropanol al 50%

Volumen : 100mL

Agua mQ : 50 mL

Isopropanol : 50 mL

SDS al 10%

Pesar : 10 gr

Agregarlos en los 100 mL de isopropanol al 50%, agitar hasta que la solución se diluya completamente.

Ajustar el pH a 5,4 utilizando HCl o NaOH diluidos

Cultivo del parásito

Se describió y preservó la cepa de referencia de *Leishmania braziliensis* almacenada en un tanque de nitrógeno líquido, y se mantuvo en un medio bifásico compuesto por una fase sólida de agar sangre conejo y una fase líquida de medio M119. El buen crecimiento del parásito se determina a través de la observación de este durante días empleando un microscopio invertido.

Realizado esto, se procedió a repicar la cepa en un medio monofásico con medio líquido M199 (al 10% de suero fetal bovino y 1% de L-glutamina).

3.6 Ensayo *in vitro*

Se observó el buen crecimiento de los parásitos en un microscopio invertido. Una vez verificado, se trasladó el contenido a tubos de 15 mL y se centrifugó a 2800 rpm por 10 minutos. Luego se procedió a lavar el pellet formado dos veces con 10 mL de PBS 0,01M también mediante centrifugación a 2800 rpm por 10 minutos. El precipitado se suspendió en 5 mL de medio M199 10% SFB y se llevó una alícuota representativa de 50µL a un tubo de microcentrífuga. Para determinar la cantidad de parásitos/mL se tomaron 10µL de lo aislado y se contó en una cámara de Neubauer.

3.6.1 Cuenta de Parásitos:

Dependiendo del crecimiento de los parásitos realizar una dilución en PBS 0,01M (o medio de cultivo) de 1/4 o 1/10.

Tabla 3. Conteo de parásitos

	PBS 0,01M	Parásitos
Dilución 1/4	300 μ L	100 μ L
Dilución 1/10	900 μ L	100 μ L

Se realizó el cálculo correspondiente para determinar el N° parásitos/mililitro y se llevó a una concentración final de 2×10^6 parásitos/m.

Se realizaron las diluciones de la Anfotericina B (stock 1mM) en medio M199 10% SFB como se presenta en la Tabla 4:

Tabla 4. Procedimiento de dilución para el segundo ensayo (fracciones)

Concentración final en la placa	X2 Concentraciones a preparar	Diluciones	M199 10% SFB	Stock de Anfotericina B
5 μM	10 μ M	1/100 \Rightarrow		
		1/10	90 μ L	10 μ L (Stock: 1000 μ M)
		1/10	180 μ L	20 μ L (dil. 1/10)
0.5 μM	1	1/10	180 μ L	20 μ L (dil. 1/100)
0.05 μM	0,1	1/10	180 μ L	20 μ L (dil. Anterior)
0.005 μM	0,01	1/10	180 μ L	20 μ L (dil. Anterior)

La droga posteriormente fue diluida 1/10 al ser agregada en la reacción (10µL de droga para 100µL de volumen total de la reacción). Por lo tanto las concentraciones finales de Anfotericina B fueron: 5µM, 0,5µM, 0,05µM y 0,005µM

3.6.2 Enfrentamiento

Lo siguiente se realizó en una cámara de flujo laminar Marca Dauerhaft, modelo BBS-DDC:

1. Exposición de los parásitos con la droga considerando las siguientes condiciones de la reacción:

- a. Se realizó en placas de cultivos 96 pozos (well).
- b. El volumen final fue de 100 µL
- c. La concentración de parásitos fue de 1×10^5 parásitos totales contenidos en 50µL (2×10^6 parásitos/mL)
- d. Se agregó 50µL de la droga de referencia (Anfotericina B) a las diferentes concentraciones.
- e. La evaluación de cada concentración de la droga fue hecha por triplicado.
- f. Se consideró los siguientes tratamientos

Medio sin parásitos, sin droga

Medio + parásitos, sin droga.

Medio + parásitos + Anfotericina B (cuatro diferentes concentraciones)

Medio + Anfotericina B, sin parásitos (cuatro diferentes concentraciones)

1. Se creó la siguiente tabla para especificar los volúmenes de mezcla en la placa de cultivo de 96 pozos.

Tabla 5. Volúmenes de mezcla

	I	II	III	IV
Medio	100µL	100µL – (A)	90µL– (A)	90µL
M199 10%SFB				
Parásitos	-	A	A	
Anfotericina B	-	-	50µL	50µL

A = volumen de cultivo que contiene 1×10^5 parásitos totales

Nota: Los bordes externos de todo el contorno son ocupados con 200 µL de agua estéril para evitar evaporación del medio y mantener la humedad en el sistema.

2. El número de pozos es calculado de la siguiente manera:

Considerando cada reacción por triplicado tenemos:

Tabla 6. Aplicación en micropocillos

Reacción	Número de pozos
Medio sin parásitos, sin droga	3
Medio + parásitos, sin droga	3
Medio + parásitos + droga	1 droga x 3 (repeticiones) x 4 (concentraciones)

Medio + Droga, sin parásitos	1 droga x 3 (repeticiones) x 4 (concentraciones)
Total	30 pozos totales

1. Las placas con los parásitos fueron incubadas a 26 °C (promastigotes) durante 72 h a condiciones atmosféricas.
2. Luego de incubar por 72 h los parásitos con las drogas, se procedió a realizar el test de viabilidad con MTT.

3.6.3 Test de Viabilidad con MTT:

1. Se adicionó 20 µL de MTT sobre cada pozo de reacción
2. Se incubó las placas de cultivo por 3 horas y 30 minutos a la temperatura ambiente.
3. Se retiró la placa de cultivo de la incubadora y se homogenizó durante 30 minutos.
4. Se agregó 100 µL de una solución al 50% de isopropanol-10% de SDS
5. Se homogenizó durante 30 minutos.
6. Se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro de placas (lector de ELISA) a 570 nm.

3.7 Fraccionamiento

Como se mencionó previamente en el punto 3.4.1, se utilizaron 250g de muestra vegetal de las especies más activas elegidas, ya que se requería una mayor cantidad para el fraccionamiento. El fraccionamiento se realizó mediante particiones sucesivas liquido-liquido con disolventes de distinta polaridad, tales como: hexano, cloroformo y acetato de etilo, en ese orden de polaridad. Luego se concentraron a temperatura ambiente hasta sequedad.

Esquema de los procedimientos experimentales.

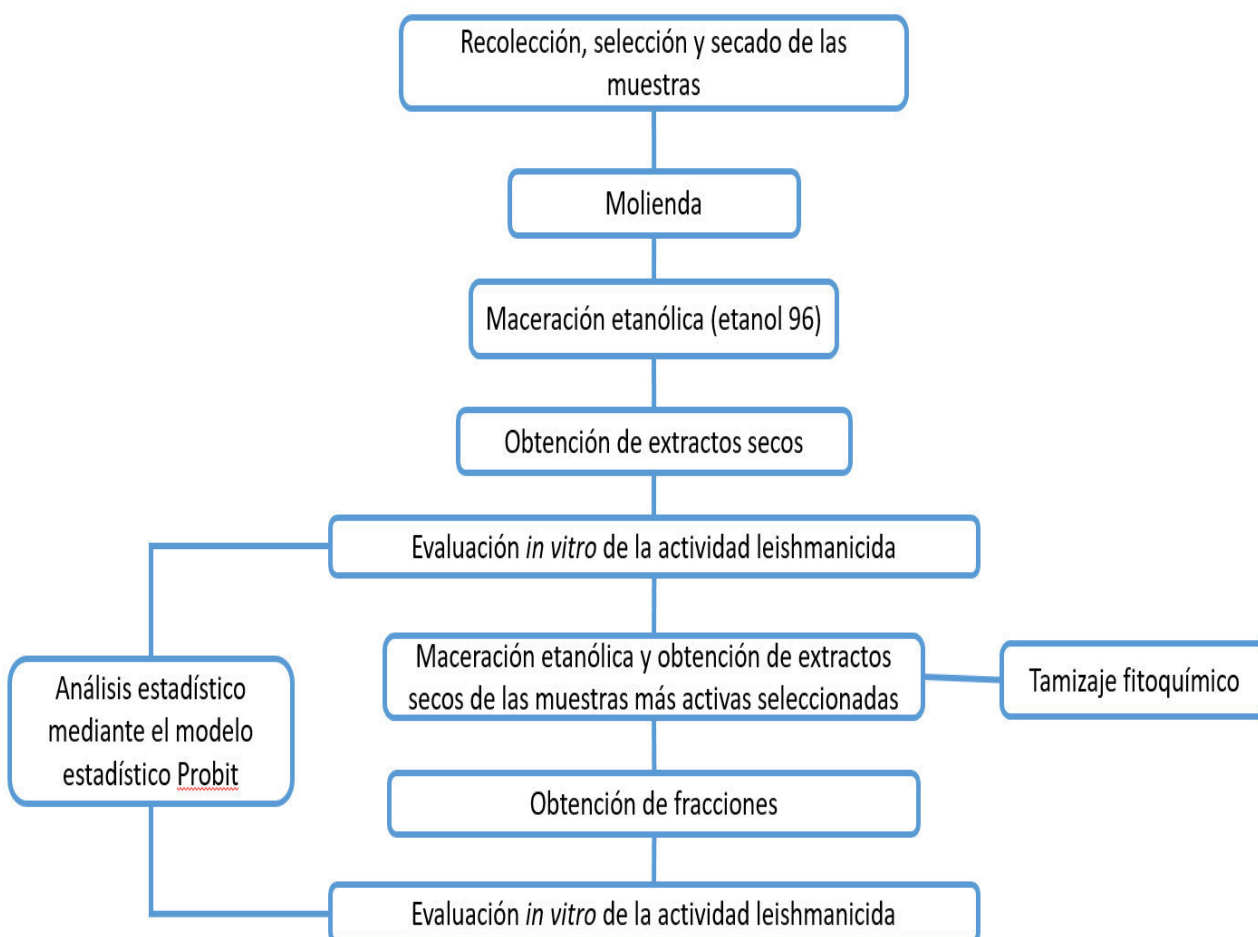


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología

IV. RESULTADOS

4.1. Rendimiento de extractos etanólicos

Se obtuvo diferentes porcentajes de rendimiento, siendo los extractos etanólicos de *Annona nitida*, con un porcentaje de 4,48 %, y *Piper acutifolium*, con un porcentaje de 3,23 %, los de mayor rendimiento en cada especie.

Tabla 7. Rendimiento de los extractos etanólicos de las especies *Annona* y *Piper*

Especie	Peso de hojas molidas (g)	Peso de extracto seco (g)	Rendimiento %
<i>A. hypoglauca</i>	20	0,25	1,25
<i>A. mucosa</i>	20	0,494	2,47
<i>A. montana</i>	20	0,782	3,91
<i>A. nitida</i>	20	0,896	4,48
<i>A. squamosa</i>	20	0,216	1,08
<i>P. acutifolium</i>	20	0,646	3,23
<i>P. callosum</i>	20	0,51	2,55
<i>P. carpunya</i>	20	0,56	2,80
<i>P. aduncum</i>	20	0,28	1,40
<i>P. peltatum</i>	20	0,46	2,30

4.2 Evaluación de la actividad leishmanicida

Tabla 8. Resultados obtenidos de la actividad leishmanicida mediante el modelo estadístico Probit de las especies de *Annona*

Extractos etanólicos	Porcentaje de Inhibición a las concentraciones			Actividad antileishmania (Probit) µg/mL
	100µg/mL	10µg/mL	1µg/mL	IC ₅₀
<i>A. hypoglauca</i>	18,4	-3,7	-5,7	944,5
<i>A. mucosa</i>	95,1	1,6	-10,2	30,5
<i>A. montana</i>	98,8	23,1	-8,7	16,4
<i>A. nitida</i>	88,5	-2,4	-13,1	47,8
<i>A. squamosa</i>	33,4	-2,2	-7,3	223,5
Anfotericina B	100,4	100,1	4,1	3,5

Tabla 9. Resultados obtenidos de la actividad leishmanicida mediante el modelo estadístico Probit de las especies de *Piper*

Extractos etanólicos	Porcentaje de Inhibición a las concentraciones %			Actividad antileishmania (Probit) µg/mL
	100µg/mL	10µg/mL	1µg/mL	IC ₅₀
<i>P. acutifolium</i>	78,3	38,4	10,1	19,4
<i>P. callosum</i>	88,4	17,9	2,0	21,7
<i>P. carpunya</i>	30,0	8,1	0,9	282,3
<i>P. aduncum</i>	13,0	6,0	-0,1	8054,2
<i>P. peltatum</i>	82,5	21,7	0,1	27,6
Anfotericina B	100,1	100,1	13,0	2,1

Tabla 10. Screening Fitoquímico a plantas representativas

COMPUESTO	REACCIÓN	RESULTADOS			
		A. mucosa	A. montana	P. peltatum	P. callosum
Azúcares reductores	Tollens	-	-	-	-
	Felling	-	-	-	-
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	++	++	+	++
	Gelatina	+++	++	++	++
Aminoácidos libres	Rvo, Ninhidrina	-	-	-	-
Flavonoides	Rvo, Shinoda	++	-	-	-
Alcaloides	Mayer	+++	++	++	++
	Dragendorff	+++	++	++	++
Antocianinas y flavonoides catéquicos	Rvo, Rosenheim	+++	++	++	++
Glicósidos	Rvo, Vainillina	-	-	-	-

Leyenda: (-) ausencia de metabolito, (+) Baja cantidad, (++) Ligera cantidad, (+++) elevada cantidad

4.3 Rendimiento de las fracciones de las especies más activas elegidas

Se utilizó 3g de cada extracto etanólico de las especies *Annona mucosa*, *Annona montana*, *Piper callosum* y *Piper peltatum* para el fraccionamiento mediante partición líquido-líquido,

Tabla 11. Porcentaje de rendimiento en fracciones

Especie activa	Fracción	Peso de extracto etanólico (g)	Peso de fracción seca (g)	Rendimiento %
<i>A. montana</i>	Hexano	3	0,56	18,67
	Cloroformo	3	2,30	76,65
	Acetato de etilo	3	0,06	2,01
<i>A. mucosa</i>	Hexano	3	1,53	50,87
	Cloroformo	3	0,86	28,60
	Acetato de etilo	3	0,21	6,93
<i>P. callosum</i>	Hexano	3	1,26	41,90
	Cloroformo	3	0,88	29,31
	Acetato de etilo	3	0,21	6,92
<i>P. peltatum</i>	Hexano	3	1,75	58,26
	Cloroformo	3	0,18	6,11
	Acetato de etilo	3	0,08	2,79

4.4 Resultados obtenidos de la actividad leishmanicida mediante el modelo estadístico Probit de las fracciones de las especies más activas del género *Annona*

Tabla 12. IC₅₀ del extracto etanólico de *Annona mucosa*

Extracto etanólico de <i>A. mucosa</i>	Porcentaje de inhibición a las concentraciones				Actividad antileishmaniana (Probit) µg/mL
	50µg/mL	5µg/mL	0,5µg/mL	0,05µg/mL	IC ₅₀
Fracción de hexano	53,2	5,0	-8,1	2,5	309,7
Fracción de cloroformo	99,3	33,2	-2,7	0,5	4,5
Fracción de acetato de etilo	16,7	0,5	-7,8	0,2	>100
Anfotericina B	100,3	96,1	0,9	-5,9	0,2

Tabla 13. IC₅₀ del extracto etanólico de *Annona montana*

Extracto etanólico de <i>A. montana</i>	Porcentaje de inhibición a las concentraciones				Actividad antileishmaniana (Probit) µg/mL
	50µg/mL	5µg/mL	0,5µg/mL	0,05µg/mL	IC ₅₀
Fracción de hexano	51,0	11,2	7,7	9,2	318,8

Fracción de cloroformo	99,7	26,7	5,6	5,1	3,2
Fracción de acetato de etilo	92,9	11,0	3,4	5,6	9,5
Anfotericina B	100,1	91,1	-1,4	3,1	0,2

4.5 Resultados obtenidos de la actividad leishmanicida mediante el modelo estadístico Probit de las fracciones de las especies más activas del género Piper

Tabla 14. IC₅₀ extracto etanólico de *Piper callosum*

Extracto etanólico de <i>P. callosum</i>	Porcentaje de inhibición a las concentraciones				Actividad antileishmaniana (Probit) $\mu\text{g/mL}$
	50$\mu\text{g/mL}$	5$\mu\text{g/mL}$	0,5$\mu\text{g/mL}$	0,05$\mu\text{g/mL}$	IC₅₀
Fracción de hexano	8,6	-11,5	-14,3	-10,2	>100
Fracción de cloroformo	75,2	8,5	6,6	13,6	31,9
Fracción de acetato de etilo	-23,6	-18,2	-11,7	-13,5	-
Anfotericina B	99,9	93,4	3,3	-3,0	0,2

Tabla 15. IC₅₀ extracto etanólico *Piper peltatum*

Extracto etanólico de <i>P. peltatum</i>	Porcentaje de inhibición a las concentraciones				Actividad antileishmaniana (Probit) $\mu\text{g/mL}$
	50 $\mu\text{g/m}$ L	5 $\mu\text{g/m}$ L	0,5 $\mu\text{g/m}$ L	0,05 $\mu\text{g/m}$ L	IC ₅₀
Fracción hexano	86,9	7,2	-3,8	2,8	27,1
Fracción cloroformo	22,7	2,6	-2,8	4,2	>100
Fracción acetato de etilo	-3,2	-3,7	-4,2	0,1	-
Anfotericina B	99,9	87,0	2,2	3,1	0,2

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se decidió trabajar con la *Leishmania braziliensis* debido a que esta junto con la *Leishmania peruviana* son las que generan la mayor cantidad de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en nuestro país.

La actividad antileishmania contra promastigotes de *Leishmania braziliensis* más significativa fue hallada en los extractos etanólicos de las siguientes especies del género *Annona*: *Annona mucosa* presentó un IC₅₀ de 30,5 µg/mL, *Annona nítida* presentó un IC₅₀ de 47,8 µg/mL y *Annona montana* un IC₅₀ igual a 16,4 µg/mL. Estos extractos presentan flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos de acuerdo con el tamizaje fitoquímico. Esto coincide con lo mencionado por Cárdenas y colaboradores³⁹ en sus resultados: diversos grupos químicos, como alcaloides isoquinolínicos, alcaloides indólicos, quinonas, monoterpenos, flavonoides y acetogeninas obtenidos de extractos vegetales presentan actividad leishmanicida.

En el presente estudio el IC₅₀ del extracto etanólico de *Annona montana* fue de 16,4 µg/mL. En un estudio desarrollado por Osorio y colaboradores⁴⁰ el extracto de acetato de etilo de *Annona muricata* presentó un IC₅₀ de 25 µg/mL frente al mismo parásito en estudio, *Leishmania braziliensis*. Esta diferencia puede deberse a una mayor disolución y arrastre de metabolitos favorecida por el alcohol etílico, utilizado como solvente de extracción. Cabe mencionar que la fracción acetato de etilo de *Annona montana* presentó un IC₅₀ de 9,5 µg/mL, esta coincide con la obtenida por Hernández y Tenorio⁴¹ a partir de un extracto alcohólico de *Rollinia rufinervis*, familia *Annonaceae*, en la que identifican la presencia de acetogeninas a la que atribuyen la actividad leishmanicida. Otro estudio desarrollado por Jaramillo y Arango³¹ también corrobora la actividad

leishmanicida presentada por acetogeninas presentes en el extracto de acetato de etilo de *Annona muricata*, que presentó una Concentración Mínima Efectiva (MEC) de 0,1 mg/mL siendo más activa que el Glucantime utilizado como compuesto de referencia (MEC=4,1 mg/mL).

Por otro lado, la fracción clorofórmica de *Annona mucosa* presentó un IC₅₀ igual a 4,5 µg/mL y la de *Annona montana* un IC₅₀ de 3,2 µg/mL, la que puede ser debida a la presencia de alcaloides tal como reportan Rojas y Ronceros ⁴², los alcaloides son afines a solventes orgánicos apolares.

El género *Piper* es el más representativo de las Piperaceas y alcanza alrededor de 2000 especies vegetales distribuidas en la región pantropical ⁴³⁻⁴⁴. Existen muchos informes de diversos compuestos aislados de plantas de este género (principalmente aceites esenciales) como agentes con actividad antimicrobiana ⁴⁵⁻⁴⁷ (hongos y bacterias), antiprotozoaria ⁴⁸⁻⁵⁰ (*Leishmania* spp. *Plasmodium* spp. y *Trypanosoma* spp.), inhibidora de acetilcolinesterasa ⁵¹⁻⁵³, anti-inflamatoria, antinociceptiva y citotóxica frente a diferentes líneas celulares (de mama, melanómicas, gástricas, entre otras).

Los resultados de la tablas 9, 14 y 15 muestran por primera vez la evaluación de la actividad antileishmanial de las especies *Piper callosum*, *Piper carpunya* y *Piper peltatum* sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*, un parásito protozoario causante de Leishmaniosis Mucocutánea (LMC) en el Perú. No se añadió *Piper acutifolium* a la etapa de fraccionamiento debido a la existencia de un único reporte donde aíslan específicamente derivados de ácido benzoico ⁵⁴ y no consideran la posibilidad de evaluar y/o encontrar otros componentes con mejor actividad antileishmania, *Piper aduncum* se utilizó como comparador debido a la alta gama de estudios que se le ha realizado a esta especie ⁵⁵⁻⁵⁸.

Del primer tamizaje, en cuanto a actividad antileishmania se refiere, se observa que los extractos etanólicos de todas las especies de *Piper* tuvieron mejor actividad que el extracto etanólico de *Piper aduncum* que como se mencionó es la especie sobre la que más estudios se han realizado, Los extractos etanólicos de *Piper callosum* y *Piper peltatum* presentaron la mejor actividad con un IC₅₀ de 21,7 y 27,6 µg/mL, respectivamente. La actividad de *Piper aduncum* fue mayor a 100 µg/mL, sin embargo se reporta que los aceites esenciales de esta especie presentan buena actividad antileishmania contra promastigotes a la concentración aproximada de 77,9 µg/mL^{50 y 59}. Esta concentración es mayor a lo determinado en nuestro extracto crudo, por lo que hace más interesante el fraccionar estos dos extractos (*Piper callosum* y *Piper peltatum*) y acercarnos a las posibles moléculas responsables.

De las fracciones obtenidas de *Piper peltatum*, la fracción hexánica mantuvo un IC₅₀ elevado de 27,1 µg/mL similar a lo obtenido en el extracto crudo (27,6µg/mL), debido a la polaridad del solvente se puede inferir que los compuestos que esta fracción pueda presentar son de carácter muy apolar como lo son los aceites⁵⁸⁻⁵⁹. Caso diferente sucede con *Piper callosum*, cuya fracción con mejor actividad es la fracción clorofórmica con IC₅₀ de 31,9 µg/mL, fracción donde pueden presentarse otro tipo de compuestos con mayor polaridad como alcaloides e incluso flavonoides no asociados a azúcares⁴³.

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó la actividad leishmanicida de los extractos etanólicos de las especies vegetales de los géneros *Annona* y *Piper* sobre promastigotes de *L. braziliensis*, siendo las especies *Piper acutifolium* ($IC_{50}=19,4 \mu\text{g/mL}$), *Piper peltatum* ($IC_{50}=27,6 \mu\text{g/mL}$), *Piper callosum* ($IC_{50}=21,7 \mu\text{g/mL}$), *Annona mucosa* ($IC_{50}=30,5$) y *Annona montana* ($IC_{50}=16,4 \mu\text{g/mL}$) las que presentaron mayor actividad.
- Se realizó el estudio biodirigido de los extractos etanólicos con mayor actividad anti-leishmania determinándose que las siguientes fracciones presentaron mayor actividad: la fracción hexánica de *Annona mucosa* un IC_{50} igual a $4,5 \mu\text{g/mL}$, la fracción de cloroformo de *Annona montana* un IC_{50} de $3,2 \mu\text{g/mL}$, la fracción de acetato de etilo de la misma especie un IC_{50} de $9,5 \mu\text{g/mL}$, la fracción de cloroformo de *Piper callosum* un IC_{50} igual a $31,9 \mu\text{g/mL}$ y con respecto a *Piper peltatum* la fracción de hexano presento un IC_{50} de $27,1 \mu\text{g/mL}$.
- Se identificó la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides y flavonoides en los extractos vegetales con actividad leishmanicida significativa.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir realizando el fraccionamiento biodirigido de las fracciones que presentaron mejor actividad antileishmania utilizando equipos más sofisticados como MPLC y luego pasarlos por HPLC. Esto permitirá aislar los compuestos responsables de tan buena actividad a nivel de extracto crudo que es superior incluso a la de algunas moléculas aisladas de la más estudiada especie *Piper aduncum*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Jaramillo M, Arango G, González M, Robledo S, Velez I. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*. 2000; 71(2):183-186.
- 2 Gavamukulya Y, Wamunyokoli F, El-Shemy H. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017; 10(9):835-848.
- 3 Vila-Nova N, de Moraes S, Falcão M, Alcantara T, Ferreira P, Cavalcanti E et al. Different susceptibilities of *Leishmania spp.* promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins, annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Experimental Parasitology*. 2013; 133(3):334-338.
- 4 León B. *Piperaceae* endémicas del Perú. *Rev peru biol*. 2006; 13(2): 492-563.
- 5 Bussman R, Glenn A, Douglas S. Antibacterial activity of medicinal plants of Northern Peru-can traditional applications provide leads for modern science? *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 2010; 9(4): 742-753
- 6 Lognay G, Bouxin P, Marlier M, Haubruge E, Gaspar C, Rodriguez A. Composition of the Essential Oil of *Piper acutifolium*. Ruiz. and Pav. from Peru. *Journal of Essential Oil Research*. 1996; 8(6):689-691.
- 7 Ahmad F, Emrizal, Sirat H, Jamaludin F, Mustapha N, Ali R et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Piper porphyrophyllum* (Fam. *Piperaceae*). *Arabian Journal of Chemistry*. 2014; 7(6):1031-1033.
- 8 Alzamora, L., Et al. Actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae). *Revista Peruana de Biología* 2007, 13(3): 211 – 214.
- 9 World Health Organization (WHO). 2014. Leishmaniasis. Media Centre.

- 10 Tiunan, T., Adriana O. Santos, A., Ueda-Nakamura, T., Dias, B., Nakamura, C. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases* 2011; 15: 525–532.
- 11 Oryan, A., Akbari, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2016. 9(10): 925–932.
- 12 Lucientes, J. et al. Flebótomos, de la biología al control. *Revista Electrónica de Veterinaria* 2005. 7(8).
- 13 Akhoundi, M., Downing, T., et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine* 2017. 1-29.
- 14 Akhoundi, M., et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016; 10(3): e0004349.
- 15 Sanchez, L. et al. Leishmaniasis. *Dermatología Peruana* 2004;14 (2)
- 16 Pereira, A., Pérez, M. Leishmaniosis. *Offarm* 2002; 21:116-24.
- 17 Red Nacional de Epidemiología (RENACE) –DGE–MINSA. Lima, 2014. Distribución de Leishmaniosis según departamentos Perú años 2004-2013 y 2014 (hasta la SE 25).
- 18 Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7(5):e35671).
- 19 Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, Barker DC, McCann SH, Watts DM. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59(2):312-7.
- 20 Lumbreras H, Guerra H. Leishmaniasis in Peru. In: K.P. Chang and R. Bray (Eds.), *Leishmaniasis*, Vol.1, Elsevier, New York, 1985; pp. 297-311.
- 21 Mutiso JM, Macharia JC, Gicheru MM. A review of adjuvants for Leishmania vaccine candidates. *J Biomed Res*. 2010; 24(1):16-25.
- 22 Arevalo J, Ramirez L, Adui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. Influence of Leishmania (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with

- American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007; 195(12):1846-51.
- 23 Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, Lazo M, De Doncker S, Boelaert M, Robays J, Dujardin JC, Arevalo J, Chappuis F. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(2):223-31.
- 24 Salem MM, Werbovetz KA. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr Med Chem.* 2006; 13(21):2571-98.
- 25 Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2012; 2:11-9.
- 26 Organización Mundial de la Salud (World Health Organization). WHO Technical Report Series (No. 975). 2012. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. Accesible en:
http://r4d.dfid.gov.uk/PDF/Outputs/Misc_CommDis/WHO_TRS_975_eng.pdf.
- 27 Atta-ur-Rahman, FRS, UNESCO. *Studies in Natural Products Chemistry. Volume 36. Bioactive Natural Products (Part P).* Elsevier 2012; 331-382.
- 28 Rocha L, Almeida J, Macedo R, Barbosa-Filho J. A review of natural products with antileishmanial activity *Phytomedicine* 2005; 12: 514–535.
- 29 León B, Christian Monsalve C. *Annonaceae* endémicas del Perú. *Rev. peru. biol.* 2006; 13(2): 35-41.
- 30 Raynaud-Le S, Fourneau C, Laurens A, Bories C, Hocquemiller R, Loiseau P. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from *Annonaceae*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 388–392.
- 31 Jaramillo M, Arango G, Gonzalez M, Robledo S, Velez I. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia* 2000; 71: 183-186.
- 32 Liu H, Huang G, Zhang H, Wu J, Yao Z. *Annonaceous* acetogenin mimics bearing a terminal lactam and their cytotoxicity against cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007; 17: 3426–3430.

- 33 Yang H, Zhang N, Li X, Chen J, Cai B. Structure–activity relationships of diverse *annonaceous* acetogenins against human tumor cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 2199–2202.
- 34 León B. *Piperaceae* endémicas del Perú. *Rev. peru. biol.* 2006, 13(2): 492–563.
- 35 Sánchez-Suárez J. Albarracín D. Rojas M. Et al. Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumanense* y *Piper holtoni*. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2010; Vol. 39 (1), 21-29.
- 36 Ferreira C, Soares DC, Barreto CB, Nascimento MT, Freire-de-Lima L, Delorenzi JC, et al. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry* 2011; Vol.72:2155-64.
- 37 Flores N, Jiménez I, Giménez A, Ruiz D, et al. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry* 2009, 70, 621.
- 38 Flores N, Jiménez I, Giménez A, Ruiz D, et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. *J. Nat. Prod.* 2008; 71, 1538.
- 39 Cárdenas D, Lora J, et al. Actividad leishmanicida de *Annona purpurea*. *Actual Biol* 2005; 27 (1): 35-37.
- 40 Osorio E, et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian *Annonaceae*. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 111: 630-635.
- 41 Hernández J, Tenorio J, Rojas C, y Vallejo G. Evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos etanólicos de *Rollinia rufinervis* sobre *Leishmania chagas*. *Revista de la facultad de química farmacéutica* 2005; 12 (2): 37-43.
- 42 Rojas J, Ronceros S, y Palacios O. Evaluación in vitro de la actividad antileishmaniásica del extracto metanólico de siete plantas medicinales. *Ciencia e Investigación* 2012; 15(2): 90-95.
- 43 Quijano-Abril M.A.; Callejas-Posada R, Miranda-Esquivel D.R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (*Piperaceae*). *J. Biogeogr.* 2006, 33, 1266–1278.

- 44 Ramírez Amezcua J. *Piper commutatum* (*Piperaceae*), the correct name for a widespread species in Mexico and Mesoamerica. *Acta Botanica Mexicana* 2016, 116, 9–19.
- 45 Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heure O, et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015, 6, 22–29.
- 46 Duarte M, Leme E.E, Delarmelina C, Soares A.A, Figueira G.M, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 111, 197–201.
- 47 Gutiérrez Y, Montes R, Scull R, Sánchez A, Cos P, Monzote L, Setzer W. Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. *Chem. Biodivers.* 2016, 13, 1715–1719.
- 48 Pink R, Hudson A, Mouriès M.A, Bendig M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 727–741.
- 49 Villamizar L, Cardoso M, de Andrade J, Teixeira M, Soares M. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4 °C. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2017, 112, 131–139.
- 50 Bernuci K, Iwanaga C, Fernandez-Andrade C.M., Lorenzetti, F.B.; Torres-Santos, E.C.; Faiões, V.D.; Gonçalves, J.E.; do Amaral, W.; Deschamps, C.; Scodro, R.B.; Cardoso, R.F. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. *Molecules* 2016, 21, 1698.
- 51 Colovic M, Krstic D, Lazarevic-Pasti, T, Bondzic A, Vasic V. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* 2013, 11, 315–335.
- 52 Adewusi E, Moodley N, Steenkamp V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* 2011, 77, 638–644.
- 53 Salleh W, Hashim N, Ahmad F, Yen K. Anticholinesterase and antityrosinase activities of ten *Piper* species from Malaysia. *Adv. Pharm. Bull.* 2014, 4, 527–531.

- 54 Flores N, Ignacio A, Jiménez A, Grace David, Genevieve B, Bazzocchi I. Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Antiparasitic Activity. *Journal of Natural Products* 71, 1538-1543 (2008).
- 55 De Oliveira J, Dias I, da Camara C, Schwartz M. Volatile constituents of the leaf oils of *Piper aduncum* L. from different regions of Pernambuco (northeast of Brazil). *J. Essent. Oil Res.* 2006, 18, 557–559.
- 56 Maia J, Zoghbi M, Andrade E, Santos A, da Silva M, Luz A, Bastos C. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour Fragr. J.* 1998, 13, 269–272.
- 57 Navickiene H, Morandim A, Regasini L, Bergamo D, Telascrea M, Cavalheiro A, Lopes M, Bolzani V.D.; Furlan, M.; et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Quim. Nova* 2006, 29, 467–470.
- 58 Vila R, Tomi F, Mundina M, Santana A, Solís P, López J, Balderrama J, Iglesias J, Gupta M, Casanova J, et al. Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*. *Flavour Fragr. J.* 2005, 20, 67–69.
- 59 Ceole L, Cardoso M, Soares M, Nerolidol. The main constituent of *Piper aduncum* essential oil, has anti-Leishmania braziliensis activity. *Parasitology* 2017, 144, 1179–1190.

IX. ANEXOS



Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACE CONSTAR:

Que, las muestras botánicas presentados por el Sr. Ronald Erik Quiñonez Dextre, bachiller de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, pertenecen a la Tesis Titulado: **Estudio de la actividad leishmanicida in vitro de extractos y fracciones de especies vegetales de los géneros Annona y Piper en promastigotes de Leishmania braziliensis**; los cuales fueron verificados e identificados en este centro de investigación y enseñanza, del centro de investigación de recursos naturales (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), que a continuación se detalla:

N°	Familia	Nombre científico	Nombre común
1	ANNONACEAE	<i>Annona hypoglauca</i> Mart.	Anonilla sogá
2	ANNONACEAE	<i>Annona montana</i> Macfad.	anonilla
3	ANNONACEAE	<i>Annona mucosa</i> Jacq.	anona
4	ANNONACEAE	<i>Annona nitida</i> Mart.	anonilla
5	ANNONACEAE	<i>Annona squamosa</i> L.	anona
6	PIPERACEAE	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	mático
7	PIPERACEAE	<i>Piper aduncum</i> L.	cordoncillo
8	PIPERACEAE	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	guayusa
9	PIPERACEAE	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	carpundia
10	PIPERACEAE	<i>Piper peltatum</i> L.	santa maría

Se expide la presente constancia al interesado, para los fines que estime conveniente.

Iquitos, 08 de Agosto del 2017

Atentamente,


Blgo. RICHARD J. HUARANCA ACOSTUPA M.S.
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP



Figura 5. Constancia de determinación taxonómica



Figura 6. Plantas colectadas y molidas I



Figura 7. Plantas colectadas y molidas II



Figura 8. Ensayo in vitro de viabilidad celular de promastigotes con reactivo MTT