

## ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE PLANTAS MEDICINALES DE LA AMAZONIA PERUANA

Joahán Rojas U.<sup>a</sup>, Johann R. Satalaya A. <sup>a</sup>, Maritza Grandez, R. <sup>a</sup>, Luis Vilchez, A.<sup>a</sup>, Elsa Rengifo, S.<sup>b</sup>, Efraín Salamanca, C.<sup>c</sup>, Ninoska Flores Q. <sup>c</sup>, Alberto Giménez T. <sup>c</sup>, Juan Antonio Ávila I. <sup>c</sup>, Grace Ruiz P.<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Sargento Lores 385, Iquitos, Perú. Telf: 51 65 232186. <sup>b</sup>Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, Av. José A. Quiñones km. 2.5 - Apartado Postal 784, Loreto – Perú. Telf: +51+65+265515, <sup>c</sup>Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra 2224, 2° Piso, Miraflores, La Paz-Bolivia Telf: 591 2 2229021

**Keywords:** Extractos, plantas de la amazonia peruana, leishmanicida, óptico, test de reducción de tetrazoilo

### ABSTRACT

In this study the eight medicinal plants from the Peruvian Amazon were evaluated searching their parasiticide activity in vitro: *Ampelozizyphus amazonicus*, *Andira inermes*, *Bellusia pentamera*, *Couma macrocarpa*, *Croton lechleri*, *Unonopsis spectabilis*, *Urena lobata* and *Xilopia parviflor*. The study was performed using different species of promastigotes from *Leishmania*: *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) and *L. donovani* (MHOM/74/PP75). The assays were developed by count trough an optical method in a Neubauer camera and fractions that were active have been evaluated with the colorimetric method using XTT. The organic CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract from *Unonopsis spectabilis* was the more active with an IC<sub>50</sub> 65.3, 54.2 and 24.5 mg/mL vs. *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) and *L. donovani* (MHOM/74/PP75) from the optical method respectively. In order to determine the leishmanicide activity of the organic fraction the colorimetric XTT method was used against *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) and *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012). The results showed values of IC<sub>50</sub> between 10.6 mg/mL and 11.8 mg/mL respectively. / En el presente trabajo se evaluó el efecto parasitocida in vitro de ocho plantas medicinales de la amazonia peruana: *Ampelozizyphus amazonicus*, *Andira inermes*, *Bellusia pentamera*, *Couma macrocarpa*, *Croton lechleri*, *Unonopsis spectabilis*, *Urena lobata*, *Xilopia parviflora*. Los estudios in vitro fueron realizados sobre promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*: *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. donovani* (MHOM/74/PP75) a través del método óptico por conteo en cámara de Neubauer y las fracciones que resultaron activas fueron evaluadas a través del método colorimétrico XTT. El extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Unonopsis spectabilis* fue el mas activo con una CI<sub>50</sub> de 65.3, 54.2 y 24.5 µg/mL frente a *L. amazonensis*, (IFLA/BR/75/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. donovani* (MHOM/74/PP75) por el método óptico respectivamente. A si mismo la actividad leishmanicida de las fracciones por el método colorimétrico XTT contra las cepas *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012), dieron valores de CI<sub>50</sub> entre 10.6 µg/mL y 11.8 µg/mL respectivamente.

Corresponding author: [gracerfm@hotmail.com](mailto:gracerfm@hotmail.com)

### INTRODUCCION

Una de las preocupaciones de la humanidad en todos los tiempos, ha sido mantener el buen estado de su salud. Las sociedades amazónicas no han sido ajenas a esta preocupación, desde su propia concepción de salud y enfermedad y la diversidad biológica de su entorno, cada uno de los pueblos indígenas amazónicos ha desarrollado conocimientos acerca de las propiedades curativas de las plantas<sup>1</sup>. La Amazonia Peruana comparte con los ocho países amazónicos no sólo la más grande cuenca del planeta, sino también la mayor diversidad biológica del mundo. Se considera 3.140 especies útiles, de las cuales 1.044 tienen uso medicinal y constituye una de las más grandes reservas de recursos terapéuticos. El hombre amazónico, a través de toda su historia, ha logrado identificar importantes especies que presentan compuestos biológicamente activos que han contribuido aliviar y curar diversas enfermedades entre ellas la leishmaniasis.<sup>2</sup> Las enfermedades infecciosas tropicales constituyen un problema, para un gran porcentaje de seres humanos que habitan en zonas tropicales de nuestro planeta, se evidencia una urgente necesidad en la búsqueda de alternativas terapéuticas de nuevas moléculas seguras efectivas, económicas y fáciles de administrar<sup>3,4</sup>. Los conocimientos empíricos étnicos son un primer paso para la evaluación de la actividad antiparasitaria in vitro<sup>5</sup> y por

medio de este estudio validar la actividad leishmanicida de las especies vegetales. El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas IIFB de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés de La Paz - Bolivia, esta realizando este tipo de estudios, para que existan respaldos científicos del uso tradicional de las plantas.

## RESULTADOS, DISCUSION

De todas las especies evaluadas la que presentó actividad leishmanicida *in vitro* contra las tres cepas de *Leishmania* fue el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *U. spectabilis*, con una CI<sub>50</sub> de 65.3, 54.2 y 24.5 µg/mL frente a *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. donovani* (MHOM/74/PP75) respectivamente. El extracto EtOH de la misma especie, presentó actividad frente a *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) con CI<sub>50</sub> 64.3 µg/mL y *L. donovani* (MHOM/74/PP75) con CI<sub>50</sub> = 25.5 µg/mL. Otra de las especie que presento buena actividad es el extracto (EtOH), de *Xylopia parviflora* con una CI<sub>50</sub> 31.2 µg/mL frente *L. donovani*, mientras que el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dio actividad frente a *L. braziliensis* con una CI<sub>50</sub> 61.7 µg/mL. El extracto EtOH y EtOH (2) de *Urena lobata* presento actividad frente a *L. donovani* con una CI<sub>50</sub> de 41.9 y 63.9 µg/mL, mientras que el extracto EtOH de *Bellucia pentamera* presento baja actividad frente a promastigote de *L. donovani* CI<sub>50</sub> = 71.7 µg/mL. (Tabla 1)

**Tabla 1.** Actividad leishmanicida *in vitro* de los extractos sobre promastigotes de *Leishmania*, CI<sub>50</sub> expresados en µg/mL

Nombre científico	Solvente	Órgano	<i>L. amazonensis</i> (IFLA/BR/75/PH8)	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/M2903)	<i>L. donovani</i> (MHOM/74/PP75)
<i>Andira inermis</i>	EtOH	H y R	--	--	51
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		--	89.5	92.5
	EtOH(2)		--	--	--
	H <sub>2</sub> O		--	--	--
<i>Unonospsis spectabilis</i>	EtOH	H y R	--	64.3	25.5
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		65.3	54.2	24.5
	EtOH(2)		--	--	--
	H <sub>2</sub> O		--	--	--
<i>Ampeloziphus amazonicus</i>	EtOH	H y R	--	80.6	96.9
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		--	65.4	--
	EtOH(2)		--	--	--
	H <sub>2</sub> O		--	--	--
<i>Couma macrocarpa</i>	EtOH	H y R	--	--	89.8
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		--	--	--
	EtOH(2)		--	--	--
	H <sub>2</sub> O		--	--	--
<i>Xylopia parviflora</i>	EtOH	H y R	--	--	31.2
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		--	61.7	--
	EtOH(2)		--	--	--
	H <sub>2</sub> O		--	--	--
<i>Bellucia pentamera</i>	EtOH	H y R	--	--	--
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		--	--	--
	EtOH(2)		--	--	71.7
	H <sub>2</sub> O		--	--	--
<i>Croton lecheri</i>	EtOH	H y R	--	--	--
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		--	83.8	80.4
	EtOH(2)		--	--	--
	H <sub>2</sub> O		--	--	--
<i>Urena lobata</i>	EtOH	H y R	--	--	41.9
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		--	--	--
	EtOH(2)		--	--	63.9
	H <sub>2</sub> O		--	--	--

De la especie *Unonopsis spectabilis* se obtuvieron 9 fracciones, las que presentaron mayor actividad antiparasitaria *in vitro*, fueron las fracciones (**F2**) con un  $CI_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$  en *L. braziliensis* y *L. donovani*; la fracción (**F6**) con un  $CI_{50} = 54.8 \mu\text{g/mL}$  en *L. braziliensis* y en *L. donovani* con un  $CI_{50} = 52 \mu\text{g/mL}$ ; y la fracción (**F7**), en *L. braziliensis* y en *L. donovani* ambos con un  $CI_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$ . (Tabla 2)

**Tabla 2.** Actividad leishmancida *in vitro* sobre promastigotes de *Leishmania*, ( $CI_{50}$ ) expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de las fracciones de *Unonopsis spectabilis*

Fraciones	<i>L. amazonensis</i> (IFLA/BR/75/PH8)	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903)	<i>L. donovani</i> (MHOM/74/PP75)
F2-JUS	---	50	50
F3-JUS	---	68.7	76.5
F4-JUS	---	69.3	68.7
F5-JUS	---	74.2	75.3
F6-JUS	---	54.8	52
F7-JUS	---	50	50
F8-JUS	---	63.2	55.9
F9-JUS	---	78.2	76.5

La fracción **F6** se subfraccionó dando como resultado 6 subfracciones de las cuales se observó que las únicas subfracciones que presentaron actividad antiparasitaria *in vitro* fueron las fracciones **F6.1-JUS** con un  $CI_{50} = 17.1 \mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50} = 15.8 \mu\text{g/mL}$  en *L. braziliensis* y *L. donovani* respectivamente; la fracción **F6.2** dió un  $CI_{50} = 8.05 \mu\text{g/mL}$  en *L. braziliensis* y en *L. donovani*; mostrando actividad moderada frente a *L. amazonensis* con un  $CI_{50} = 67.3 \mu\text{g/mL}$ ; y la fracción **F6.3** con un  $CI_{50} = 32.2 \mu\text{g/mL}$  en *L. braziliensis* y *L. donovani*. Cabe hacer notar que la actividad antiparasitaria *in vitro* de las subfracciones se incrementa con respecto a la fracción principal (**F6**)  $CI_{50} = 54.8 \mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50} = 52 \mu\text{g/mL}$  en *L. braziliensis* y *L. donovani* respectivamente (Tabla 3).

**Tabla 3.**  $CI_{50}$  de las subfracciones expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de F6 de la especie vegetal *Unonopsis spectabilis* contra promastigote de *Leishmania* *in vitro*

Fraciones	<i>L. amazonensis</i> (IFLA/BR/75/PH8)	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903)	<i>L. donovani</i> (MHOM/74/PP75)
F6.1-JUS	---	17.1	15.8
F6.2-JUS	67.3	8.05	8.05
F6.3-JUS	---	32.2	32.2
F6.5-JUS	71.6	68.7	68.7
F6.6-JUS	---	69	89.5

**Tabla 4.**  $CI_{50}$  de las subfracciones de F7 de la especie vegetal *Unonopsis spectabilis* contra promastigote de *Leishmania* *in vitro* expresados en  $\mu\text{g/mL}$

Fraciones	<i>L. amazonensis</i> (IFLA/BR/75/PH8)	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903)	<i>L. donovani</i> (MHOM/74/PP75)
F7.1-JUS	61	8	8
F7.2-JUS	67.3	7.9	7.8
F7.3-JUS	67.3	7.9	7
F7.4-JUS	---	50	50
F7.5-JUS	---	72.2	---
F7.6-JUS	---	69.3	61
F7.7-JUS	---	44.3	39.1

De la misma manera la fracción **F7** fue subfraccionada en 7 subfracciones, cuya evaluación antiparasitaria nos revela que frente a *L. amazonensis* las fracciones disminuyen la actividad; frente a *L. braziliensis* la actividad de las fracciones **F7.1** ( $CI_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$ ), **F7.2** y **F7.3** ( $CI_{50} = 7.9 \mu\text{g/mL}$ ), y **F7.7** ( $CI_{50} = 44.3 \mu\text{g/mL}$ ) se incrementan con respecto a la fracción principal (**F7**) ( $CI_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$ ); frente a *L. donovani* en las fracciones **F7.1** ( $CI_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$ ), **F7.2** ( $CI_{50} = 7.8 \mu\text{g/mL}$ ), **F7.3** ( $CI_{50} = 7 \mu\text{g/mL}$ ) y **F7.7** actividad antiparasitaria con respecto a la ( $CI_{50} = 39.1 \mu\text{g/mL}$ ), fue mayor la fracción principal (**F7**) (Tabla.4).

#### Evaluación de la actividad por el Método colorimétrico: Test de reducción de tetrazoilo (XTT-PMS)

Por este método fueron evaluados los extracto mas activo, así como las fracciones y subfracciones de la especie vegetal *Unonopsis spectabilis* observandose que frente a *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012); se observa que

la actividad mejora a medida que se va fraccionando. Frente a *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), la actividad de las fracciones **F6.2** ( $CI_{50} = 11.8 \mu\text{g/mL}$ ), mejoró con respecto a la fracción (**F6**), las fracciones **F7.1** ( $CI_{50} = 11.7 \mu\text{g/mL}$ ), **F7.2** ( $CI_{50} = 10.9 \mu\text{g/mL}$ ), y **F7.3** ( $CI_{50} = 10.6 \mu\text{g/mL}$ ), mejoró con respecto a la fracción principal (**F7**) ( $CI_{50} = 49.34 \mu\text{g/mL}$ ). (Tabla 5).

**Tabla 5.**  $CI_{50}$  del extracto activo de *Unonopsis spectabilis*, fracciones y subfracciones frente a promastigotes de *Leishmania* por el test de reducción de tetrazoilo (XTT- PMS) expresados en  $\mu\text{g/mL}$ .

(CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) <i>Unonopsis spectabilis</i>	<i>L. amazonensis</i> (MHOM/BR/76/LTB-012)	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903)
	53.88	51.92
F6 – JUS	54.7	49.34
F7 – JUS	40.67	47.58
F6.2-JUS	28.1	11.8
F7.1-JUS	17.1	11.7
F7.2-JUS	12.3	10.9
F7.3-JUS	10.2	10.6

## PARTE EXPERIMENTAL

### Colección del material vegetal

El material vegetal se recolectó de la Reserva de Allpahuayo Mishana (73° 26'; 0.66" W 04°00"; 175" S), Km 31.5 de la carretera Iquitos–Nauta en el Distrito de San Juan, Provincia de Maynas del Departamento de Loreto, Iquitos, Perú; en Junio del 2008, las cuales fueron depositadas y contrastadas en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. (Tabla 6)

### Preparación de los extractos

El material vegetal seco y finamente pulverizado, de cada una de las especies, se sometió a procesos de extracción con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Etanol (EtOH) y Agua (H<sub>2</sub>O) por separado, durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron filtrados y el residuo obtenido se concentró a sequedad en Rota evaporador (Laborota 4000) acoplado a una bomba de vacío, a una temperatura de 40° C (90 rpm) obteniéndose de esta forma los extractos crudos libres de solventes orgánicos. El residuo vegetal (marco) del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ha sido procesado con etanol a temperatura ambiente por 48 Hrs, posteriormente filtrado y concentrado a sequedad, obteniéndose el extracto etanólico EtOH (2); el residuo vegetal nuevamente fue sometido a cocción en agua durante 30 minutos, posteriormente filtrado, este líquido ha sido congelado a -45° C y liofilizado, consiguiéndose el extracto acuoso. Todo este proceso fue realizado en el Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas (IIFB) en el área de Fitoquímica.

## ESTUDIOS BIOLÓGICOS

### Evaluación de la actividad Leishmanicida por el método óptico: Conteo en cámara de Neubauer

Formas promastigotes de *Leishmania*: *L. donovani* (MHOM/74/PP75), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8), fueron cultivada a 26°C en medio Schneider drosophila (S-9895 Sigma-Aldrich) suplementado al 5% con suero bovino fetal (F-4135 Sigma-Aldrich) inactivado (56°C por 30 minutos), los parásitos en fase de crecimiento logarítmico fueron distribuidos en una microplaca de 96 pozos (Nunc) a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL y cada pozo fue tratado con diferentes concentraciones (100, 50 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos o fracciones durante 72 horas. El vehículo utilizado para la disolución de los extractos fue Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Sigma – Aldrich), en una concentración no superior al 1% (concentración no tóxica para los parásitos). La actividad se evaluó mediante conteo óptico en cámara de Neubauer a través de un microscopio (LEITZ-ARISTOPLAN) comparándose con los controles: parásitos sin tratar, parásitos tratados con la droga de referencia anfotericina B (A-2411 Sigma-Aldrich) y alcaloides totales obtenida de la corteza de la planta de *Galipea Longiflora* (Evanta) utilizada como droga control de un producto de origen natural. La prueba se realizó por triplicado<sup>6</sup>

Tabla 6. Plantas de la Amazonía Peruana y su uso tradicional

Nombre científico	Nombre Vulgar	Parte usada	Uso tradicional
<i>Ampelozizyphus amazonicus</i> . Ducke (Rahmnaceae)	Saracura Mira	Hojas y ramas	Estimulante biosíquico, malaria, problemas hepáticos.
<i>Andira inermis</i> (W. Wright) Kunth ex DC (Fabaceae)	Quinillo colorado	Hojas y ramas	Antihelmíntico, malaria, fiebre, emético.
<i>Bellusia pentamera</i> Naudin (Melastomataceae)	Nispero	Hojas y ramas	Antimalárico, leishmanicida, antibacteriano
<i>Couma macrocarpa</i> Barb. Rodr (Apocynaceae)	Leche caspi	Hojas y ramas	Amebicida, antiprotozoario y vermífugo
<i>Croton lechleri</i> . Muell-Arg (Euphorbiaceae)	Sangre de drago	Hojas y ramas	Cicatrizante, paludismo, úlceras estomacales.
<i>Unonopsis spectabilis</i> . Diles (Annonaceae)	Icoja	Hojas y ramas	Antiprotozoario, Heridas e infecciones de la piel
<i>Urena lobata</i> . Linn (Malvaceae)	Yute	Hojas y ramas	Antidiabético, sedante, antiprotozoario, inflamación intestinal
<i>Xilopia parviflora</i> . Spruce (Annonaceae)	Espintana	Hojas y ramas	Antimalárico, leishmanicida, Antirreumático

### Evaluación de la actividad leishmanicida por el método colorimétrico: Test de reducción de tetrazoilo (XTT-PMS)

La actividad de los compuesto fue evaluada a través del método colorimétrico XTT (X-4251Sigma-Aldrich), que tienen como base la reducción de la sal de sodio 2,3-bis (2metoxi-4-nitro-5-sulfofenil-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide) por las deshidrogenasas mitocondriales hasta cristales de formazán, reacción que se acelera por la adición de un acoplador de electrones como la fenosina metosulfato (PMS) (P-5812 Sigma-Aldrich) el cual permite acelerar la reducción del sustrato. Formas promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012) y *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), se evaluaron siguiendo la misma metodología descrita para el método óptico hasta su evaluación a las 72 horas. Pasado este tiempo se preparó una solución de XTT (1 mg/mL) / PMS (0.001 mg/ $\mu$ L), y se añadió 50  $\mu$ l en cada pozo para luego incubar por 4 horas. Al término de la misma se dio lectura en un espectofotómetro de Elisa (Model 2100 serie-Plate Reader) a 450 nm. La prueba se realizó por triplicado. En cada modelo la  $CI_{50}$  del extracto fue determinada mediante análisis de regresión lineal (porcentaje de inhibición vs logaritmo de la concentración del extracto). Ambas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Quimioterapia Experimental del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz - Bolivia).

### CONCLUSIONES

De las 8 especies vegetales evaluadas frente a promastigotes de *Leishmania*, la especie vegetal *Unonopsis spectabilis* es la más activa con una  $CI_{50}$  de 65.3, 54.2, y 24.5  $\mu$ g/mL frente a *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. donovani* respectivamente. Las sub-fracciones F6.2, F7.1, F7.2 y F7.3 con valores de  $CI_{50}$   $\mu$ g/mL que van desde 7 a 9  $\mu$ g/mL respectivamente resultó tener mayor actividad que la droga control (Pentamidina  $CI_{50}$  = 10  $\mu$ g/mL) y mucho mejor que la corteza de alcaloides totales de (Evanta) (CAT)  $CI_{50}$  33 – 43.

### RECONOCIMIENTOS

J. U. Rojas, J. R. Satalaya, agradecemos al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas y a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, de la UMSA, por habernos acogido en sus laboratorios y llevar adelante el presente trabajo, que nos permitirá obtener el grado de Químico Farmacéutico en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, de Iquitos, Perú. Así como también al Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana.

### REFERENCIAS

1. Brack A. "Plantas Nativas utilizadas en el Perú en relación con la Salud humana". En Salud y Población Indígena de la Amazonía. Quito-Impretec, 993. II: 61-175; 1993.

2. Mejia K, Rengifo E. "Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana". Segunda Edición. AECI-GRL-IIAP. 7-8; 2000.
3. WHO and Traditional Medicine. Bull. of the World Health Org. 66 (2): 266-267, 1988.
4. Gupta, M.P. Plantas Medicinales Iberoamericanas. Presencia, Santa Fé de Bogota, Colombia. 1995.
5. Tagboto, S., Townson, S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. Adv Parasitol. 2001; 50: 199-295.
6. Deharo E, Ruiz G, Vargas F, Sagua H, Ortega E, Rojas A, Giménez A. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antichagas y leishmanicidas. Prisa Ltda.-CYTED: La Paz, Bolivia ; 2004.
7. Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193: 673-675.
8. Waechter AI, Cavé A, Hocquemiller R, Bories C, Muñoz V, Fournet A. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). [Phytother Res.](#) 1999; 13 (2): 175 – 177.
9. [Laprévote, O.](#), [Roblot, F.](#), [Hocquemiller, R.](#), [Cavé, A.](#) Alkaloids of the Annonaceae 87. Azafluorenones from *Unonopsis spectabilis*. J Nat Prod. 1988; 51, (3): 555-561.