



“AÑO DEL DIÁLOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL”

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



## TESIS

“Actividad leishmanicida *in vitro* de extractos etanólicos de diez especies vegetales del género *Piper* (Piperáceae) de la región Loreto”

Para obtener el grado de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Autores:

*Bach.* GÓMEZ FREITAS MAYTHE DEL CARMEN

*Bach.* MACEDO DÍAZ EDER LUIS

Asesores:

Blga. VIVIANA VANESSA PINEDO CANCINO Dra.

Q.F. LILIANA RUIZ VÁSQUEZ, Dra.

Q.F. JHESUS JEAN PIERRE LOPEZ MESIA

**IQUITOS – PERU**

**2019**



**UNAP**

Universidad Nacional de la Amazonía Peruana  
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Lima, 1 de febrero de 2019

*"Año de la Lucha Contra la Corrupción y la Impunidad"*

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los cuatro días del mes de marzo del dos mil diecinueve, siendo las 13:45 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución Decanal Nº 097-FFB-UNAP-2018, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- |   |            |
|---|------------|
| ➤ Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.  | PRESIDENTA |
| ➤ M.C. CHARLES OCAMPO FALCÓN            | MIEMBRO    |
| ➤ Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr. | MIEMBRO    |

Se constituyeron en las instalaciones de la Facultad de Farmacia y Bioquímica sala de docentes, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada **"ACTIVIDAD *Leishmanicida In Vitro* DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE DIEZ ESPECIES VEGETALES DEL GÉNERO *Piper* (*Piperácea*) DE LA REGIÓN LORETO"**, presentado por los Bachilleres **MAYTHE DEL CARMEN GÓMEZ FREITAS y EDER LUIS MACEDO DÍAZ**, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria Nº 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:


Adecuadamente

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- La Tesis ha sido Aprobada por unanimidad
- Observaciones ninguna



Siendo las 14:55 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su acertada sustentación

  
Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.  
PRESIDENTA

  
MC. CHARLES OCAMPO FALCÓN.  
MIEMBRO

  
Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.  
MIEMBRO

JURADO



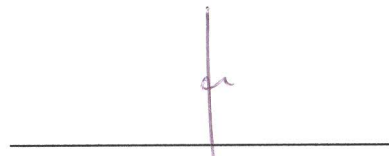
QF. FRIDA E. SOSA AMAY, DRA

PRESIDENTA



Q.F. LUIS NONATO RAMIREZ, DR

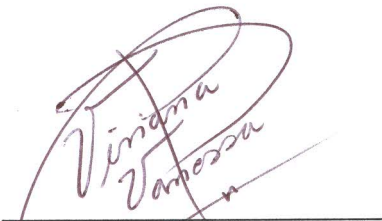
MIEMBRO



MC. CHARLES OCAMPO FALCON

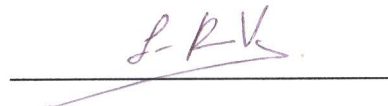
MIEMBRO

ASESORES



Blga. VIVIANA VANESSA PINEDO CANCINO Dra

ASESOR DE TESIS



Q.F. LILIANA RUIZ VÁSQUEZ, Dra

ASESOR DE TESIS



Q.F. JHESUS JEAN PIERRE LOPEZ MESIA

ASESOR DE TESIS

## DEDICATORIA

A **Nuestro Padre Celestial**, por la vida y mi familia.

A mi persona favorita, mi madre **María Iracema Freitas Ferreyra**, por su gran amor, porque la amo y extraño todos los días. Doy gracias por ser mi madre, ser el ángel que me guía y protege. Siempre vivirás en mi corazón.

A mi padre a quien amo, **Fulvio Gómez Llerena**, por su amor, sus enseñanzas, comprensión y que siempre doy gracias a Dios por tenerlo. A mis **hermanos Raí, Fulvio, Howard, y Franco**, a quienes amo, me aman, siempre están a mi lado y son el motor y motivo para seguir adelante.

A **Brian Vidurrizaga Gastón**, por su amor, por estar siempre apoyándome sin reproches en las buenas y en las malas.

***Bach. Maythe del Carmen Gómez Freitas***

A Dios y a Jesucristo su único hijo, Señor y Salvador.

A mis padres Silvia y Luis.

A mi abuelo, Enrique Macedo.

A los que compartieron días conmigo, desde antes del primer llanto hasta esta última alegría

***Bach. Eder Luis Macedo Díaz***

## AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía – LIPNAA, de forma especial a la Dra. Lastenia Ruiz Mesia, por haber depositado su confianza en nosotros y permitirnos este proyecto de tesis.

De manera muy especial a nuestra asesora, Dra. Viviana Vanessa Pinedo Cancino, por ser la pieza fundamental, el motor, gracias por buscar e idear una y mil maneras de desarrollarlo.

Al Q.F. Jhesus Jean Pierre López Mesia, por el tiempo, paciencia y dedicación brindada al capacitarnos, guiarnos en la parte biológica, descriptiva de nuestro proyecto y que tenga un fin satisfactorio.

A la Ing. Leonor Arévalo Encinas, Ing. Hively Ericka Ricopa Cotrina por el apoyo y tiempo brindado en capacitarnos en la parte fitoquímica de nuestro proyecto.

A nuestra asesora, Dra. Liliana Ruiz Vásquez, por sus conocimientos brindados para la redacción de nuestro proyecto.

De manera especial a todo el equipo del LIPNAA-CRNA, por brindarnos su amistad y buenos deseos, durante todo el proceso de nuestro proyecto.

# ÍNDICE

Tabla de contenido	
JURADO y ASESORES	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
ÍNDICE	5
Resumen	10
Abstract	11
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	15
1.1. Antecedentes	15
1.2. Bases teóricas	17
1.2.1. Familia Piperáceae	17
1.2.1.1. Generalidades	17
1.2.1.2 Familia Piperáceae en el Perú	18
1.2.2. ASPECTOS GENERALES SOBRE LEISHMANIASIS	18
1.2.2.1. Género <i>Leishmania</i>	19
1.2.2.2. Ciclo de vida	19
1.2.2.3. Estadío evolutivo	20
1.2.2.4. Vector transmisor de Leishmaniasis	21
1.2.3. CITOMETRÍA DE FLUJO	22
1.2.3.1. Generalidades	22
1.2.3.2. Estructura básica de un Citómetro de flujo	23
1.2.3.3. Información obtenida por el Citómetro de flujo	25
1.2.3.4. Análisis de datos	26

1.2.3.5. Parámetros que se pueden analizar por citometría de Flujo	26
1.2.3.6. Actividad leishmanicida por citometría de flujo	26
1.2.3.7. Ventajas y desventajas de la citometría de Flujo	27
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	28
2.1. Formulación de la hipótesis	28
2.2. Variables y operacionalización	29
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	31
3.1. Tipo y diseño de investigación	31
3.1.1 Tipo de investigación	31
3.1.2 Diseño de la Investigación.	31
3.2. Diseño muestral	31
3.2.1. Población	31
3.2.2. Muestra	31
3.2.2.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN	32
3.2.2.1.1. Criterios de Inclusión.	32
3.2.2.1.2. Criterios de Exclusión.	32
3.3. Procedimientos de recolección de datos	32
3.3.1. MATERIALES DE LABORATORIO	32
3.3.1.1. Materiales utilizados	32
3.3.1.2. Reactivos	34
3.3.1.3. Equipos	35
3.3.2. MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS	35
3.3.2.1. Descripción y recolección de las especies vegetales	35
3.3.2.2. Procedimiento general de extracción	37
3.3.2.3. ADAPTACIÓN DEL CULTIVO Y ACTIVIDAD LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i>	37
3.3.2.3.1. Preparación del medio de cultivo <i>in vitro</i>	37

3.3.2.3.2. Adaptación del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Leishmania braziliensis</i>	38
3.3.2.3.3. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Leishmania braziliensis</i>	39
3.3.2.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i>	40
3.3.2.5. MEDICIÓN DE LA CARGA PARASITARIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	43
3.3.2.6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	43
3.4. Procesamiento y análisis de datos	45
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	47
4.1. Extractos	47
4.2. Cultivos y ensayos de actividad leishmanicida <i>in vitro</i>	48
4.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de la cepa de <i>Leishmania braziliensis</i>	48
4.2.2 Ensayos de actividad leishmanicida <i>in vitro</i>	49
4.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	51
CAPITULO V: DISCUSIÓN	54
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	59
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	60
CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN	61
ANEXOS	65



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1:</b> <i>Piper hispidum</i> Sw., 1788	18
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida del parásito	20
<b>Figura 3:</b> <i>Leishmania</i> sp. amastigotes en macrófago	21
<b>Figura 4:</b> Promastigote de <i>Leishmania braziliensis</i>	21
<b>Figura 5:</b> <i>Lutzomyia</i>	22
<b>Figura 6:</b> <i>Phlebotomus</i>	22
<b>Figura 7:</b> Principios generales de la citometría de flujo	23
<b>Figura 8:</b> Diagrama esquemático de una celda de flujo.	23
<b>Figura 9:</b> Diagrama del sistema óptico	24
<b>Figura 10:</b> Histograma de frecuencias	25
<b>Figura 11:</b> Curva de crecimiento de <i>Leishmania braziliensis</i>	48
<b>Figura 12:</b> Diagrama de cajas comparativas del porcentaje de inhibición de los extractos de acuerdo al tiempo de incubación.	51

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1:</b> Clasificación taxonómica de la Familia Piperáceae	17
<b>Tabla 2:</b> Preparación de las diluciones de los extractos	40
<b>Tabla 3:</b> Preparación de las diluciones del estibogluconato de sodio	41
<b>Tabla 4:</b> Preparación de las diluciones y concentraciones del mix	42
<b>Tabla 5:</b> Porcentaje de Rendimiento de los extractos por especies	47
<b>Tabla 6:</b> Crecimiento celular y tasa de crecimiento por día de cultivo	49
<b>Tabla 7:</b> IC <sub>50</sub> de los extractos estudiados a las 24 y 48 horas frente a la cepa de <i>Leishmania braziliensis</i> (Cribado)	50
<b>Tabla 8:</b> Tamizaje Fitoquímico de los Extractos	52
<b>Tabla 9:</b> Especies con similar composición	53
<b>Tabla 10:</b> Especies con presencia de alcaloides	53

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo 1:</b> Número de casos Leishmaniasis por distritos Perú 2018 (218 casos)	65
<b>Anexo 2:</b> Leishmaniasis según departamentos Perú años 2013 y 2018	65
<b>Anexo 3:</b> Distribución de casos de leishmaniasis por grupo de edad y género. Perú 2018	66
<b>Anexo 4:</b> Casos de leishmaniasis Perú 2018	66
<b>Anexo 5:</b> Recolección de datos	67
<b>Anexo 6:</b> Obtención de extractos etanólicos.	68
<b>Anexo 7:</b> Exicata de especies vegetales	69
<b>Anexo 8:</b> Preparación del medio de cultivo LIT	70
<b>Anexo 9:</b> Descongelamiento y Adaptación de la cepa BTL300 de <i>L. braziliensis</i>	71
<b>Anexo 10:</b> Mantenimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. braziliensis</i>	72
<b>Anexo 11:</b> Evaluación de actividad leishmanicida <i>in vitro</i>	73
<b>Anexo 12:</b> Configuración de la placa por 96 pozos	74
<b>Anexo 13:</b> Medición de la carga parasitaria por citometría de flujo.	75
<b>Anexo 14:</b> Tamizaje fitoquímico	76

## **Actividad leishmanicida *in vitro* de extractos etanólicos de diez especies vegetales del género *Piper* (Piperáceae) de la región Loreto**

Resumen

**Introducción:** Las tasas de infección de leishmaniasis son crecientes, y es considerada un problema de salud pública, al parecer por encontrarse dentro de un grupo de enfermedades llamadas huérfanas, cuyo tratamiento son asumidos por el Estado. El poco interés que genera para la industria farmacéutica la creación de nuevos medicamentos para este tipo de enfermedad, nos impulsó a realizar este trabajo donde se evaluó la actividad leishmanicida *in vitro* de 10 especies vegetales de género *Piper* (Piperáceae).

**Métodos:** Los extractos etanólicos de 10 especies vegetales de género *Piper* (Piperáceae) fueron evaluados frente a parásitos en el estadio de promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Como control positivo se utilizó estibogluconato de sodio y el extracto metanólico de *Jacaranda copaia*. La lectura de la carga parasitaria y viabilidad se realizó a las 24 y 48 horas por citómetro de flujo (BD-FACS Calibur). El IC<sub>50</sub> se determinó por una curva de actividad: dosis-respuesta. (IC=95 %,  $p=0.05$ ).

**Resultados:** De las 10 especies vegetales solo *Piper obtusilimum* C. DC. Presentó actividad frente a *L. braziliensis* (IC<sub>50</sub> de 7,59 µg/mL y 5,09 µg/mL),

**Conclusión:** *Piper obtusilimum* C. DC. Presentó un IC<sub>50</sub> de 7,59 µg/mL y 5,09 µg/mL a las 24 y 48 horas respectivamente, fue más activo que estibogluconato de y el extracto metanólico de *Jacaranda copaia*.

### **PALABRAS CLAVE:**

Extractos, *Piper*, *Leishmania*, citometría de flujo, IC<sub>50</sub>.

## ***In vitro* leishmanicidal activity of ethanolic extracts of ten plant species of the genus Piper (Piperáceae) of the Loreto region**

### **Abstract**

**Introduction:** The infection rates of leishmaniasis are increasing, and it is considered a public health problem, apparently because it is within a group of diseases called orphans, whose treatment is assumed by the State. The little interest generated by the pharmaceutical industry in the creation of new drugs for this type of disease, so that in this work the was evaluated the *in vitro* leishmanicidal activity of 10 plant species of the Piper genus (Piperaceae).

**Methods:** The ethanolic extracts of 10 plant species of the Piper genus (Piperaceae) were evaluated against promastigotes of *Leishmania braziliensis*. As a positive control, sodium stibogluconate and the methanolic extract of *Jacaranda copaia* were used. The parasitic load reading and viability were performed at 24 and 48 hours on a flow cytometer (BD-FACSCalibur). The IC<sub>50</sub> was determined by an activity curve: dose-response. (CI = 95%, p = 0.05).

**Results:** Of the 10 plant species only *Piper obtusilimum* C. DC. Presented activity against *L. brasiliensis* (IC<sub>50</sub> of 7.59µg/mL and 5.09µg/mL).

**Conclusion:** *Piper obtusilimum* C. DC. He presented an IC<sub>50</sub> of 7.59µg/mL and 5.09µg/mL at 24 and 48 hours respectively, was more active than stibogluconate and the methanolic extract of *Jacaranda copaia*

### **KEY WORDS**

Extracts, *Piper*, *Leishmania*, Flow cytometry, IC<sub>50</sub>

## INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis está dentro de las llamadas enfermedades huérfanas, siendo la segunda enfermedad endémica de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad de enfermedades transmisibles después de la malaria y tuberculosis, lo que hace que se convierta en un grave problema de salud pública. En el Perú, se han identificado cinco principales especies de *Leishmania*; siendo la más importante la especie de *L. braziliensis*. (1)

Leishmaniasis afecta de manera ancestral a las poblaciones andina y selvática de nuestro país, produce un impacto social y económico negativo en la población, además, las secuelas destructivas irreversibles que ocasiona, provoca el aislamiento del individuo, particularmente, la forma mucocutánea. (1)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), leishmaniasis es la enfermedad, que afecta a las poblaciones más pobres del planeta. Se estima que cada año se producen 1,3 millones de nuevos casos y entre 20,000 y 30,000 defunciones a nivel mundial.(2) La Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú en el 2017, notificaron 6,665 casos de leishmaniasis.(3) El 52,2 % de los casos de leishmaniasis fueron reportados por los departamentos Cusco, Madre de Dios, Junín, Cajamarca, Amazonas y San Martín.(3) En la actualidad desde la SE 1 hasta la SE 20 - 2018, se han notificado 1,833 casos de Leishmaniasis en el país, (menos casos en relación al 2017 a la misma SE), el 93,02 % de los casos fueron leishmaniasis cutánea (1705) y el 7.3% corresponde a leishmaniasis mucocutánea.(3) Entre los años 2000-2015, a nivel nacional, se reportaron un acumulado de 110,628 casos de leishmaniasis confirmados, el 94,3%, fueron casos de leishmaniasis cutánea y el otro 5,6% fueron casos de leishmaniasis mucocutánea. En esos 15 años se han reportado un promedio anual de 391 casos de la forma mucocutánea y 6,524 de la forma cutánea. (4)

Los lugares de criadero y reposo de flebótomos, vectores biológicos transmisores de *Leishmania*, están relacionados a cambios ambientales, como la deforestación, la construcción de presas, los sistemas de riego y la urbanización. También, los cambios climáticos como la temperatura, las precipitaciones y la humedad pueden poseer efectos importantes en los vectores

y los reservorios, al variar su distribución e influir en el índice de supervivencia y el tamaño de la población. (5)

Asociado a estas condiciones anteriores, existen otros condicionantes: de infraestructura, como las malas condiciones de vivienda y las deficiencias de saneamiento de los hogares. Así mismo la malnutrición, las dietas bajas en proteínas, hierro, vitamina A y Zinc, benefician a que la infección progrese. La migración, debido el desplazamiento de personas no inmunizadas a lugares donde ya existen etapas de transmisión a los cuales se añade el decaimiento del sistema inmunitario y la falta de recursos económicos. (2)

Los índices de infección de leishmaniasis son crecientes, cuyo tratamiento son asumidos por el Estado. El poco interés que genera para la industria farmacéutica la creación de nuevos medicamentos para este tipo de enfermedades, ha determinado que en los últimos años no se descubran nuevos medicamentos para combatirla. (6)

En la Amazonía Peruana las comunidades nativas han usado extractos de plantas para tratar diferentes enfermedades como leishmaniasis, enfermedad de chagas y malaria. (7) Las plantas constituyen recursos muy importantes de la medicina étnica y rural en la región Loreto. La región amazónica tiene una gran biodiversidad y se estima que menos del 5% de la flora amazónica ha sido evaluada farmacológicamente.(8) Los reportes etnobotánicos constituyen una fuente potencial de futuras moléculas con actividad antiparasitaria; el objetivo de la presente investigación es determinar mediante ensayos *in vitro* la actividad leishmanicida de extractos etanólicos de diez especies pertenecientes al género *Piper*, frente a la cepa BLT300 de *L. braziliensis*, con la intención de encontrar principios activos alternativos a los convencionales usados contra leishmaniasis, que sean menos nocivos para los pacientes y más eficaces durante su aplicación y uso, para contrarrestar la enfermedad. La cepa fue cultivada *in vitro* de acuerdo con el protocolo Liver Infusión Tryptose (LIT) y la lectura para la evaluación de la actividad leishmanicida fue realizada por citometría de flujo usando yoduro de propidio (PI).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad leishmanicida *in vitro* de diez extractos etanólicos de especies del género *Piper* de la familia Piperáceas frente al estadio promastigote de *Leishmania braziliensis* (BLT300).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos etanólicos de las especies vegetales del género *Piper* recolectados de la zona de estudio.
- Estandarizar la curva de crecimiento del estadio promastigote de la cepa (LTB300) *L. braziliensis*.
- Determinar la actividad leishmanicida *in vitro* frente al estadio promastigote de la cepa (LTB300) *L. braziliensis* usando el Citómetro de flujo.
- Realizar el tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos obtenidos.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

**Marin et al. (2016).** Evaluaron la actividad leishmanicida de *Esenbeckia litoralis*, utilizando el método de citometría de flujo y así mismo la toxicidad mediante el método MTT. En este estudio lograron aislar siete compuestos, de los cuales el compuesto denominado 1-hidroxi-3-metoxiN-metilacridona y el sub extracto en acetato de etilo de la corteza, presentaron regular actividad frente a *Leishmania panamensis* contando con una IC<sub>50</sub> de 37,5 y 9,2 µg/mL respectivamente. (9)

**Espitia et al. (2014).** Evaluaron la actividad leishmanicida *in vitro* de extractos y fracciones provenientes de hojas de *Cordia dentata* y *Heliotropium indicum* frente a amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140), concluyendo que la fracción de diclorometano de *H. indicum* (Hi-I-5B) presentó actividad biológica y la actividad demostró estar asociada a los alcaloides, además el extracto etanólico de las hojas de *H. indicum* presentó actividad leishmanicida. (10)

**Cardona et al. (2013).** Evaluaron la actividad leishmanicida, citotóxica, antioxidante de extractos alcohólicos y no alcohólicos de *Piper danilgonzalezii*, sobre la línea celular de monocitos/macrófagos humanos U937 y células hepáticas HepG2 en fase exponencial de crecimiento, así como en cultivo primario de macrófagos peritoneales de hámster. En la evaluación que realizaron observaron que los extractos con mejor actividad frente a amastigotes axénicos, fueron el hexánico y el etanólico de las hojas, con valores de 38,5 ± 7,9 y 55,6 ± 9,9 µg/mL, respectivamente. La menor citotoxicidad que se les presentó fue la fracción de acetato de etilo (CL<sub>50</sub>= 140,3 ± 24,0 µg/mL) ; la fracción de hexano y la de diclorometano fueron las más citotóxicas, ambas con valores de 19,3 µg/mL. (11)

**Alzamora et al. (2007).** Evaluaron la actividad leishmanicida *in vitro* del extracto metanólico de siete plantas medicinales y su efecto sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos. Concluyendo que *Piper aduncum* (matico) redujo la supervivencia de los amastigotes hasta 51,30% ( $p < 0,001$ ), además



demonstraron que *Piper aduncum*, *Eucalyptus globulus* y *Púnica granatum* posee un moderado efecto leishmanicida *in vitro*. (12)

**Bocanegra et al. (2010).** Evaluó la actividad del extracto hexánico y clorofórmico del tallo y hojas de *Aristolochia pilosa* (Familia Apocynaceae), frente a *Leishmania peruviana* y *Tripanosoma cruzi*, encontrando que el más efectivo fue el extracto clorofórmico a comparación del extracto hexánico que no presentó actividad. (13)

**Satalaya et al. (2009).** Evaluaron 40 extractos (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOH y H<sub>2</sub>O), derivados de 8 plantas de la Amazonia peruana frente a cepas de *L. donovani* (cepa PP75), *L. brasiliensis* (cepa M 2903) y *L. amazonensis* (cepa PH8), de todas las especies que evaluaron la única que presentó actividad leishmanicida *in vitro* contra las tres cepas fue el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Unonopsis spectabilis*, con una CI<sub>50</sub> de 65,3; 54,2 y 24,5mg/mL. El extracto EtOH de la misma especie, presentó actividad frente a *L. braziliensis* (CI<sub>50</sub> 64,3 µg/mL) y *L. donovani* (CI<sub>50</sub> 25,5 µg/mL). Otra especie que evaluaron y que presentó buena actividad es el extracto etanólico de *Xylopia parviflora* (CI<sub>50</sub> =31,2 µg/mL) frente *L. donovani*, mientras que el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mostro actividad frente a *L. braziliensis* (CI<sub>50</sub> =61,7 µg/mL). (14)

**Ibáñez et al. (2008).** Evaluaron la actividad biológica de 56 especies vegetales frente a cepas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8) y *L. donovani* (MHOM/74/PP75) de las cuales la especie *Bocconia integrifolia* (Papaveraceae) con un IC<sub>50</sub> de 6 µg/ml contra Chagas y 0.4 µg/ml contra tres cepas de *Leishmania* y la especie *Liabum hastifolium* (Compositae) con un IC<sub>50</sub> de 10.4 µg/ml contra tres cepas de *Leishmania*. (15).

**Parmar et al. (1997).** Investigaron y aislaron metabolitos de las especies del género *piper*, destacando una amplia variedad de metabolitos secundarios, alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, las cuales presentan una amplia gama de actividades bilógicas. El compuesto 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, aislada del extracto de *Piper aduncum* presentó una significativa actividad *in vitro* e *in vivo*, inhibiendo el crecimiento intracelular de *L.*

*amazonensis*. Por otra parte, las dihidrochalconas 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona y 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalconas aisladas de las hojas de *P. elongatum*, presentan actividad frente a *L. braziliensis*, *L. tropica* y *L. infantum*. (16)

## 1.2. Bases teóricas

### 1.2. 1. Familia Piperáceae

#### 1.2. 1.1. Generalidades

La familia Piperáceae comprende unas 1300 especies con una gran cantidad de arbustos, hierbas y lianas que se encuentran en los bosques húmedos tropicales de todo el mundo. Comprende de 10 a 12 géneros, entre ellos, *Piper*, *Piperomia*, *Porthomarphe*, *Ottonia*, *Sarhochachis* y *Trianeopiper*.(17) Se tiene como referencia que tiene el mayor número de especies con actividad biológica ensayada y confirmada, las cuales se deben principalmente a una gran cantidad de metabolitos secundarios como alcaloides, amidas, propenilfenoles, lignanos, terpenos, flavonoides, entre otros compuestos biológicamente activos contra agentes patógenos que afectan al ser humano.(14) Sin embargo, son pocas las investigaciones desarrolladas sobre este género de plantas, teniendo en cuenta el número considerable y la dimensión global de sus especies. (18)

**Tabla 1:** Clasificación taxonómica de la familia Piperáceae

Familia Piperáceae	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Orden	Magnoliopsida
Familias	Piperáceae
Género	<i>Piper</i>



**Fuente:** <https://inpn.mnhn.fr/photos/uploads/webtofs/inpn/9/227179.jpg>

**Figura 1.** *Piper hispidum* Sw., 1788

En el Perú el género *Piper*, se le conoce con los nombres de “Matico” o “Cordoncillo”, representa un componente abundante y característico en las zonas alteradas del bosque húmedo tropical, también son muy reconocidas y utilizados desde tiempos inmemorables por sus propiedades medicinales. (18)

#### 1.2.1.2 Familia Piperáceae en el Perú

En el Perú reportan unas 830 especies de Piperáceas, principalmente hierbas y arbustos; este número se ve enriquecido con nuevos registros y especies de manera constante, por ejemplo, en el documento “Diez años de adiciones a la flora de Perú”, que agrega 12 especies para el género *Piper* y 7 especies para el género *Piperomia*, solamente en el lapso de una década. (18)

*Piper* es el género más rico en especies endémicas en el Perú; estas se concentran principalmente en las formaciones de Bosque Húmedo Amazónico, Bosque Muy Húmedo Montano y Bosque Muy Húmedo Premontano, entre los 100 y 2700 m de altitud. (17,18)

#### 1.2.2. ASPECTOS GENERALES SOBRE LEISHMANIASIS

Leishmaniasis es una enfermedad derivada de la infección producida por protozoos del género *Leishmania*, que parasita las células del sistema fagocítico mononuclear. (17) Los parásitos son transmitidos por la picadura de las hembras de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomia*, de las cuales más de 30 especies son vectores identificados. El reservorio suele estar compuesto generalmente mamíferos salvajes o domésticos. (19,20)

Leishmaniasis es endemia en 98 países, con más de 350 millones de personas en riesgo de contraer la infección y 12 millones de personas infectadas. Numerosas desventajas asociadas a los tratamientos actuales promueven la

falta de constancia o abandono del tratamiento y la presencia de cepas resistentes al fármaco. Estos factores han estimulado la búsqueda de alternativas terapéuticas que sean rápidas, seguras, fáciles administrar y económicas. Nace así la etnobotánica, que en combinación con la fitoterapia puede convertirse en una estrategia innovadora para la búsqueda de compuestos de origen natural con actividad leishmanicida. (21)

Además de la mortalidad y morbilidad, la forma de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, que al inicio es menos grave que la visceral, suele producir marginación, mutilación y la desfiguración del rostro tiene un impacto psicológico permanente para las personas que lo padecen. (22)

#### 1.2.2.1. Género *Leishmania*

Son protozoarios intracelulares obligatorios de células del sistema mononuclear fagocitario. Cada especie de *Leishmania* posee características morfológicas, biológicas, manifestaciones clínicas y patológicas particulares, que son utilizadas para su identificación con una distribución geográfica específica. En su ciclo vital el parásito se presenta bajo el estadio amastigote que es la forma intracelular, que se encuentra dentro del sistema mononuclear fagocitario del huésped, así como en frotis y biopsias; y en forma flagelada, promastigote, en el interior del intestino del vector y en los medios de cultivo. En la actualidad, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, según su desarrollo en el intestino de los flebótomos vectores: *Leishmania* en el intestino medio o anterior, y *Viannia* en el intestino posterior, medio y anterior de los flebótomos. (23)

En América Latina, los subgéneros de *Leishmania* y *Viannia* contienen numerosas especies de las que algunas infectan al ser humano.

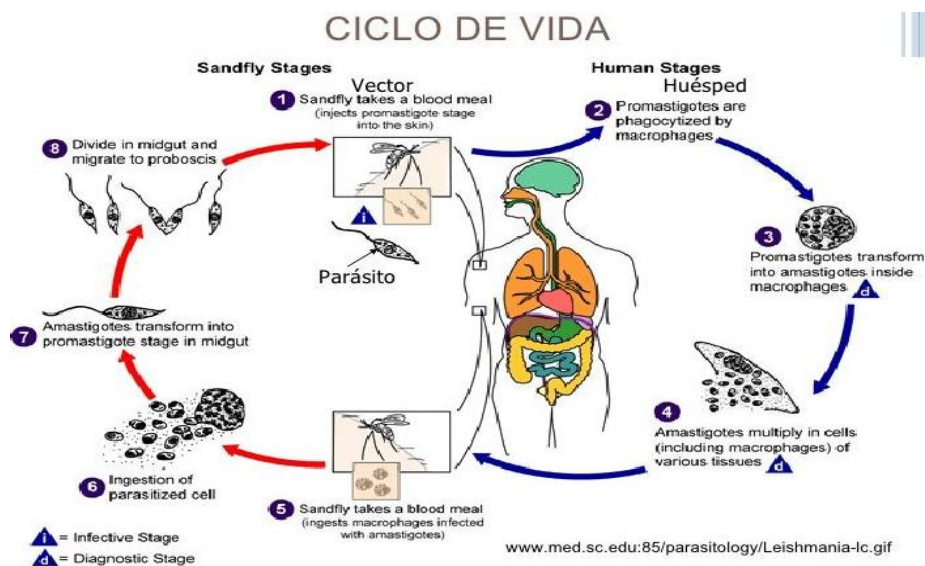
#### 1.2.2.2. Ciclo De Vida

El ciclo de vida de *leishmania* presenta dos hospederos el vertebrado y el vector (*Phlebotomus* y *Lutzomya*) que parasitan las células del sistema fagocítico mononuclear. En el desarrollo de infección el parásito tiene una serie de componentes proteicos con una función determinante de interferencia en los mecanismos de defensa del huésped. (22)

**Etapas en el ser humano:** la leishmaniasis es transmitida por picadura de un mosquito (vector), el cual inocular en la sangre los promastigotes que es el estadio infeccioso.

Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos, que se transforman en amastigotes. Estos se multiplican por división binaria en las células infectadas y afectan a distintos tejidos dependiendo de la especie de *Leishmania*. (22)

**Etapas en el insecto:** el insecto se infecta al ingerir sangre con macrófagos infectados con amastigotes. En el intestino del insecto, los parásitos se transforman en promastigotes, que se multiplican y pasan a la probóscide. Si el insecto realiza otra picadura, los promastigotes pasan a la sangre del huésped, completándose el ciclo. (22)



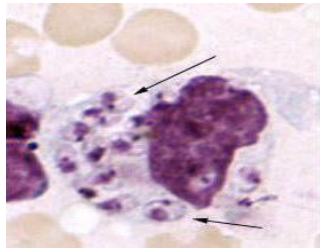
Fuente: [www.med.sc.edu:85/parasitology/Leishmania-lc.gif](http://www.med.sc.edu:85/parasitology/Leishmania-lc.gif)

**Figura 2.** Ciclo de vida del parásito.

### 1.2.2.3. Estadío Evolutivo

Las especies de este género presentan un ciclo de vida dimórfico, en el que existe una etapa de vida extracelular llamado promastigote estadio infectante que se multiplica en el tracto alimenticio del vector, y una etapa intracelular llamado amastigote dentro del fagolisoma de una célula del huésped. (24)

**Amastigotes:** “son células protistas intracelulares, es una forma inmóvil, viven dentro de vacuolas lisosomales de células fagocíticas, que no tienen flagelo y presentan una forma ovalada o redonda y miden de 2 a 4  $\mu\text{m}$  por 1,5 a 2,5  $\mu\text{m}$ , posee núcleo, generalmente excéntrico y adyacente a éste se encuentra el kinetoplasto. Tiene un pH es de 4-5 y su temperatura óptima de desarrollo es 37 °C esto significa que están adaptados a la temperatura corporal y al medio ácido de los fagolisomas de los macrófagos”. (24) (Figura N° 03)



**Fuente:** <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/gallery.htm>

**Figura 3.** *Leishmania* sp. Amastigotes en macrófago.

**Promastigotes:** “Es la forma móvil extracelular, que su morfología es alargada, presenta un núcleo central, y un Kinetoplasto terminal o subterminal, posee en la parte anterior del parásito un flagelo, casi de igual tamaño de cuerpo. Para su Metabolismo, condiciones aeróbicas utilizan aminoácidos y azúcares como fuente principal. Su pH es 7 y temperatura de desarrollo es 25-27°C. En esta etapa del parásito, se asemeja claramente a las condiciones biológicas del intestino del insecto”. (19) (Figura N°05), (Figura N°06)



**Fuente:** <http://micros-vita.blogspot.pe/2006/11/leishmania-donovani.html>

**Figura 4.** Promastigote de *Leishmania braziliensis*

#### 1.2.2.4. Vector Transmisor de Leishmaniasis

Los vectores de Leishmaniasis son mosquitos hematófagos, de los géneros flebotomos, es transmitida por especies de *Phlebotomus* en Europa, Asia y

África, y por especies de *Lutzomyia* en América, su hábitat se encuentra principalmente en lugares húmedos, oscuros y donde abunda la vegetación. Más de 350 especies de mosquitos de las Américas son conocidas, pero sólo 32 de ellos han sido comprometidos como vectores confirmados o sospechosos de transmitir leishmaniasis. (25)

“La *Lutzomyia* es un pequeño mosquito de 1,5 – 2 mm de tamaño. En el Perú, se le conoce a la *Lutzomyia* con el nombre de 'manta blanca' o 'titira', muestra una coloración general gris amarillenta, con ojos muy oscuros que exhibe sobre la cabeza. Su aspecto es muy característico, su cuerpo está cubierto de bastantes pelos y sus alas erectas en forma de “V” ”. (19) (Figura 5) (Figura 6)



Fuente: <http://www.pecet-colombia.org/site/index.php/proyectos/drug-search-for-leishmaniasis>

**Figura 5.** *Lutzomyia*



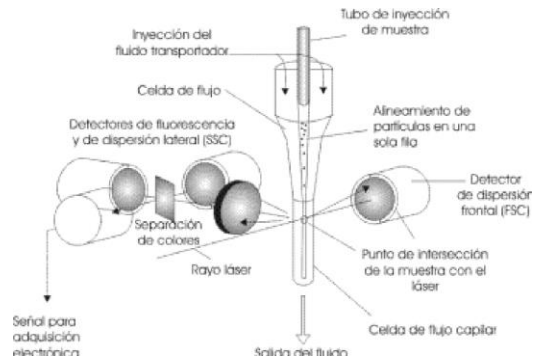
**Figura 6.** *Phlebotomus*

### 1.2.3. CITOMETRIA DE FLUJO

#### 1.2.31.1. Generalidades

Método analítico por el cual se mide la emisión de fluorescencias múltiples y la dispersión de luz de células o partículas microscópicas, alineadas de manera secuencial mediante una corriente líquida laminar, cuando son exhibidas de una en una y a gran velocidad frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada. (26)

El impacto de cada célula con el rayo de luz que ocasionan señales que corresponden a diferentes parámetros: tamaño celular de la célula, estructuras granulares o complejidad celular e intensidad de fluorescencia. Que son recogidos por distintos detectores. Estos transforman estas señales en señales electrónicas que luego serán digitalizadas para que se pueda acceder a la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. (27)



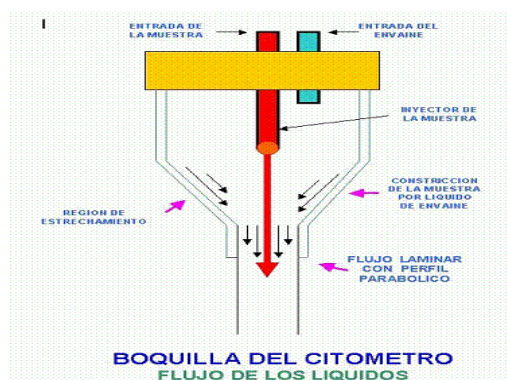
Fuente: <http://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2004/in041g.pdf>

**Figura 7:** principios generales de la citometría de flujo

### 1.2.3.2. Estructura básica de un Citómetro de flujo

Los citómetros de flujo están formados por complejos sistemas:(27,28)

- a. El sistema fluídico: ayuda a acceder a un enfoque hidrodinámico del flujo celular hasta lograr el alineamiento de las partículas o células, y también en los separadores celulares. se desarrolla una rotura del flujo en gotas de una dimensión uniforme para conseguir la separación de células individuales. La interrupción de células individuales pasa a través de una región confinada en la que cada célula es iluminada de una manera secuencial por una fuente de luz uniforme en el punto de observación; luego de que la muestra de células se ingresa en la punta de inyección de muestra, se combina las células con fluido envolvente isotónico utilizando un ensamble de boquilla cónica diseñado en forma geométrica para producir un flujo laminar de fluido.



Fuente: [https://i2.wp.com/epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2010/03/clip\\_image00410.gif](https://i2.wp.com/epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2010/03/clip_image00410.gif)

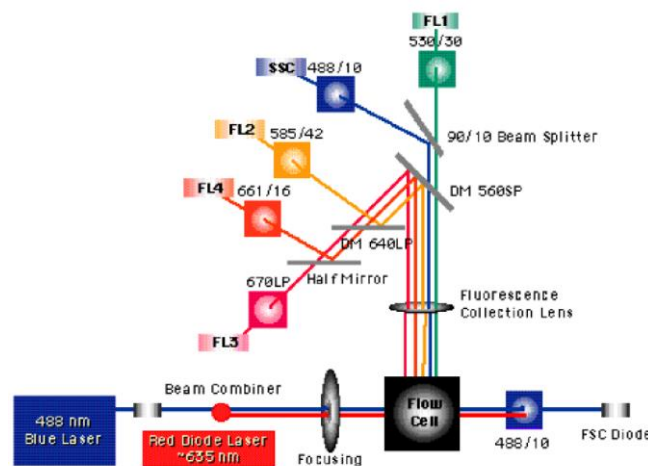
**Figura 8:** diagrama esquemático de una celda de flujo.



- b. Sistema óptico: permiten el enfoque láser en un haz con un diámetro estrecho para impactar sobre la menor cantidad de partículas posibles simultáneamente. La colección de lentes se utiliza para captar la dispersión de la luz fluorescente emitida por las partículas que intercepta con el haz del láser. Un sistema de espejos ópticos y filtros direccionan los comprimentos de ondas de la luz para los detectores ópticos específicos.

Este sistema se forma de dos clases de ópticas:

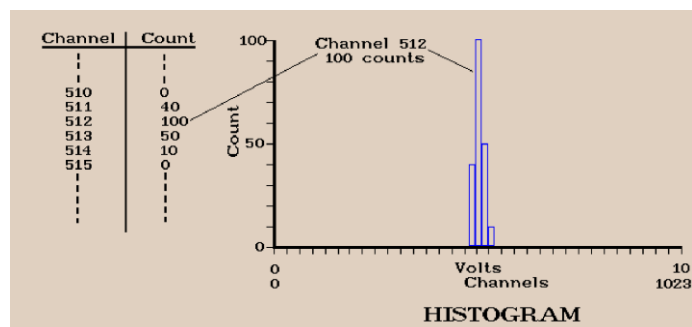
- ✓ La óptica de excitación, conformada del láser y las lentes para enfocar y dirigir el haz de luz.
- ✓ La óptica de lectura, conformada por las lentes de recolección de luz emitida luego de la interacción entre el haz del láser, las partículas, el sistema de espejos y filtros para direccionar longitudes de onda específicas hacia los detectores correspondientes.



Fuente: <http://www.vhir.org/portal1/Global/pdf/ucts/Fundamentos%20citometr%C3%ADalrene%20Sales.pdf>

**Figura 9:** Diagrama del sistema óptico

- c. Sistema electrónico: se encarga de convertir las señales ópticas en señales electrónicas, originando disponibilidad de los datos para análisis en computador.



Fuente: <https://www.uv.es/oconnor/CITOMICA%20FP%202013/Citometria%20de%20Flujo%20FP.pdf>

**Figura 10:** histograma de frecuencias

### 1.2.3.3. Información obtenida por el Citómetro de flujo

Básicamente podemos obtener los siguientes datos:(28)

- ✓ El tamaño celular relativo (Forward Scatter o FSC)
- ✓ La complejidad interna o granularidad relativa (Side Scatter o SSC)
- ✓ Intensidades relativas de emisión de fluorescencia (FL1, FL2, FL3, FL4)

A través de dos tipos de señales:

- a) **Señales de dispersión:** La dispersión aparece de la interacción de la luz con una partícula que ocasiona un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad. En los Citómetros de Flujo se miden dos fracciones de dispersión:
  - ✓ La luz dispersada en ángulo cónico pequeño ( $010^0$ ) que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.
  - ✓ La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula.
- b) **Señales de Fluorescencia:** Los Citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos Antígeno/Anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad

de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula.

#### 1.2.3.4. Análisis de datos

En general todos los citómetros presentan los datos en algunos formatos standard. (28)

- Histograma: Intensidad de fluorescencia por número de células.
- Dot plot (Gráfica de puntos): Cualquier combinación de dos parámetros de los datos obtenidos para la población de células.

#### 1.2.3.5. Parámetros que se pueden analizar por citometría de Flujo

La citometría de flujo permite medir diferentes parámetros de una célula. Éstos se dividen en:(29)

- ✓ Parámetros nucleares
- ✓ Parámetros de citoplasmáticos
- ✓ Parámetros superficie
- ✓ Parámetros estructurales

#### 1.2.3.6. Actividad leishmanicida por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de gran calidad facilita la aplicación en el campo de la investigación, clasificación, evaluación pronóstico y valoración de enfermedad mínima residual. La citometría de flujo permite el análisis de un gran número de células (habitualmente entre 10,000 células por muestra y, más de un millón en los estudios de enfermedad mínima residual). La aplicación de la citometría de flujo en la evaluación leishmanicida permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad), así determinar la viabilidad del parásito o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo) lo que contribuye a aumentar, tanto la especificidad y sensibilidad a la prueba. (29,30)

### 1.2.3.7. Ventajas y Desventajas de la Citometría de Flujo

#### **Ventajas:(31)**

- ✓ Análisis de un número estadísticamente significativo de células (1000 a más de 100 000 células).
- ✓ Múltiples marcajes de una sola célula.
- ✓ Análisis de alto número de partículas en corto tiempo (5 000 eventos/segundo)
- ✓ Tiene alta sensibilidad y objetividad.
- ✓ Medidas separadas de cada célula (no solo el promedio).
- ✓ Medidas cuantitativas: discriminación de las células según la cantidad del marcador.
- ✓ Múltiples parámetros: define subpoblaciones complejas.
- ✓ Miles de células por segundo.

#### **Desventajas:(31)**

- ✓ Escasa información morfológica de la célula.
- ✓ No proporciona información de la ubicación celular de un tejido.
- ✓ Permite analizar solo una cantidad limitada de material (10 millones de células por hora)
- ✓ Requiere suspensión de células individuales.
- ✓ Método destructivo.
- ✓ Incapacidad de visualizar las células que se analizan

## CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1. Formulación de la hipótesis

**Ho:** Los extractos etanólicos de las especies vegetales en estudio de la familia Piperáceae no presentan actividad leishmanicida *in vitro*.

**Ha:** Los extractos etanólicos de las especies vegetales en estudio de la familia Piperáceae al menos una presenta actividad leishmanicida *in vitro*.

## 2.2. Variables y Operacionalización

Variable Dependiente	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Índices	Escala
<b>ACTIVIDAD LEISHMANICIDA <i>in vitro</i> SOBRE PROMASTIGOTES DE <i>Leishmania</i>: <i>L. braziliensis</i>.</b>	Capacidad de los extractos y fracciones de inhibir el crecimiento y lograr un efecto antiparasitario.	Determinación de IC <sub>50</sub> mediante la evaluación del porcentaje de inhibición de la por el método de citometría de flujo	Valor IC <sub>50</sub>	- Activo: IC <sub>50</sub> ≤ 10 µg/ml -No Activo: IC <sub>50</sub> > 10 µg/ml	Tipo de variable: Cuantitativa

Variable Independiente	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Índices	Escala
Extractos de especies vegetales de la Familia Piperáceae de la Región Loreto.	Es una muestra de metabolitos secundarios obtenidos por maceración de una especie vegetal.	Extracción etanólico obtenida por la extracción de sustancias biológicamente activas de una planta, realizado cada 48 horas obteniéndose dos componentes: la solución extraída en su disolvente (el extracto) y el residuo (el bagazo), con posterior filtrado, concentrado y conservado.	*Porcentaje de rendimiento de los extractos.  *Porcentaje de rendimiento de los extractos en función de los metabolitos secundarios.	En función del peso final del extracto obtenido del peso inicial del material vegetal. (+) = Positivo: (+) = Poco (++) = Medianamente (+++)= Abundante ( - ) = Negativo	Tipo de variable: Cualitativo

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Tipo y diseño de Investigación

#### 3.1.1 Tipo de Investigación:

##### **Según el grado de manipulación de variables**

- **Correlacional:** estudio estadístico con dos o más variables, no necesariamente determinar una causa y efecto. Busca establecer una relación/asociación /correlación entre dos o más variables que se prestan fácilmente a la manipulación experimental

##### **En relación a la cronología de los hechos**

- **Prospectivo:** Se determina la relación entre las variables sobre los resultados obtenidos. Se registra los hechos ocurridos a partir de la fecha de ejecución.

#### 3.1.2 Diseño de la Investigación.

**Experimental:** el estudio de la actividad leishmanicida se inició con la obtención de extractos de las especies vegetales de género *Piper*, que fueron evaluados por triplicados frente a la cepa BTL300 de *L. braziliensis* y se midió la parasitemia por citometría de flujo.

### 3.2. Diseño de Muestra

#### 3.2.1. Población

Constituida por las especies vegetales basadas en su clasificación taxonómica (Familia Piperaceae) y que tienen antecedentes de actividad leishmanicida.

#### 3.2.2. Muestra

Constituida por especies del género *Piper*, seleccionadas en base a diferentes antecedentes de especies vegetales de la familia piperácea que tienen actividad leishmanicida.



### 3.2.2.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN

#### 3.2.2.1.1. Criterios de Inclusión.

- Especies vegetales de la Región Loreto de uso tradicional en el tratamiento para leishmaniasis.
- Especies vegetales que no cuenten con estudios previos de evaluación *in vitro* frente a *L. braziliensis*.
- Tener identificación correcta de su clasificación taxonómica.
- Material vegetal en buenas condiciones de conservación.
- Material vegetal previamente identificado y localizado.

#### 3.2.2.1.2. Criterios de Exclusión.

- Especies vegetales que no son de la región Loreto y sin estudios en el tratamiento de leishmaniasis.
- Especies vegetales que cuenten con estudios previos de evaluación *in vitro* frente a *L. braziliensis*.
- Material vegetal que no se encuentre en un buen estado de conservación y que evidencie signos de descomposición antimicrobiana o antifúngica.
- Material vegetal que no posea una correcta identificación en su clasificación taxonómica.

### 3.3. Procedimientos de recolección de datos

#### 3.3.1. MATERIALES DE LABORATORIO

##### 3.3.1.1. Materiales Utilizados

- Baguetas (NORMAX).
- Balón (S35 BUCHI).
- Balones para concentrar de 500 y 1000 mL (SCHOTT DURAN).
- Capilares
- Celda cromatográfica (HEIDELBERG)
- Embudo de decantación (NORMAX).
- Embudos (NORMAX).

- Envases de vidrio (NORMAX).
- Espátulas (SELECTA).
- Gradillas.
- Matraces 100, 500 y 1000mL (PIREX).
- Nueces para soporte.
- Papel filtro.
- Probetas de 5, 10, 50, 100 y 1000mL (BRAND GERMANY).
- Soporte universal.
- Tubos de ensayo (PIREX).
- Vasos de precipitado de 25, 50, 100, 500 y1000mL (LBT GERMANY).
- Viales pequeños y medianos (PIREX)
- Filtros Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  (NALGENE).
- Frasco de vidrio transparente tapa azul 500 y 1000 mL graduado para esterilización (NORMAX).
- Frascos de cultivo de 25 y 75cm<sup>2</sup> de cuello inclinado (NALGENE).
- Frascos de vidrio con tapa (NORMAX).
- Jeringa descartable estéril (ALFYMEDIX).
- Micropipetas de 10-200 $\mu\text{L}$  (EPPENDORF).
- Micropipetas de 100-1000 $\mu\text{L}$  (EPPENDORF).
- Micropipetas multicanal de 30-300 $\mu\text{L}$  (EPPENDORF).
- Microplacas de cultivo de 96 alvéolos de fondo plano estériles (FALCON).
- Parafilm (LABORATORY FILM).
- Pipetas Pasteur (FRISHER BRAND).
- Pipetas serológicas de 5 y 10mL estériles (FALCON).
- Tips con filtro 10-200 $\mu\text{L}$  (EPPENDORF).
- Tips con filtro 100-1000 $\mu\text{L}$  (EPPENDORF).
- Tubos cónicos de centrifuga de 15 y 50mL (FALCON).
- Tubos FACS de fondo redondo 5mL (FALCON).
- Pipetas serológicas 2mL, 5mL y 10mL (LBT GERMANY)
- Cámara de Neubauer (reencuentro de microorganismo).

### 3.3.1.2. Reactivos

- Acetato de etilo (MERCK).
- Ácido clorhídrico [HClcc] (MERCK).
- Anhídrido acético (MERCK).
- Cloroformo (MERK).
- Disolución de ácido pícrico [C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>OH(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>] al 1%
- Disolución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) [0,5 N].
- Disolución de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 1%.
- Disolución de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) al 5%.
- Disolución de hidróxido de potasio (KOH) al 5,7%.
- Disolución de hidróxido de sodio (NaOH) al 5% y 10%.
- Disolución de Ninhidrina (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>) al 5%.
- Disolución salina de cloruro de sodio (NaCl) al 85%.
- Etanol al 96° (ALKOFARMA).
- Etanol absoluto (MERCK).
- Magnesio metálico (MERCK).
- Metanol (MERCK).
- n-hexano (MERCK).
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Óleum.
- Dimetilsulfóxido DMSO.
- Ioduro de propidio (PI) (SIGMA)
- Suero de bovino fetal (FBS) (DIFCO)
- Estibogluconato de sodio (control positivo).
- Trypan Blue (SIGMA)
- Solución salina tamponada con fosfato (PSB). (SIGMA)
- Solución de dodecil sulfato sódico (SDS) (MERCK)
- Cloruro de potasio (KCl). (SIGMA)
- Difosfato de sodio anhidro (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). (DIFCO)
- Infusion de hígado (SIGMA)
- Glicerol (FENWAL)
- Bacto triptosa. (DIFCO)

- D-glucosa anhidra. (DIFCO)
- Hemina. (SIGMA)
- Hidróxido de sodio (NaOH). (MERCK)

### 3.3.1.3. Equipos

- Balanza analítica (SARTORIUS CP 2245)
- Bomba de vacío (VACUBRAND)
- Refrigerador (LG)
- Destilador de solventes (THERMO SCIENTIFIC)
- Destilador de agua
- Rotavapor (Buchi Heating Bath B-490)
- Chiller (LAUDA-ALPHA.RA24)
- Lámpara UV 115V 60Hz (UVP)
- Cabina de flujo laminar (LABCONCO II)
- Centrífuga de microtubos (Eppendorf centrifuga 5415 C)
- Centrífuga Universal refrigerada (HETTICH 13R)
- Citómetro de flujo (BD FACS callibur)
- Cronómetro (FISHERBRAND)
- Incubadora (SANYO MCO-20AIC)
- Microscopio (ZEISS)
- Pro – pipeta automática (ACCU-JET)
- Autoclave (SINCE 1889)
- Ultracongelador (SANYO)
- Ultrasonicador (BRANSON 3510)
- Vortex (VWR Minivortexer)

### 3.3.2. MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

#### 3.3.2.1. Descripción y recolección de las especies vegetales

Las muestras seleccionadas para el estudio realizado fueron recolectadas y transportadas al laboratorio de Fotoquímica II del Laboratorio de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonia (LIPNAA-CIRNA), donde fueron lavadas y secadas a temperatura de 20 °C. Una excicata de cada una de las

especies vegetales se encuentra depositada en el Herbarium “Amazonense” de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (Anexo 4).

***Piper obtusilimum* C. DC.** (32): “Arbusto de 2,5m umbrófilo. Hojas glabras en el haz, esparcidamente pubescente en las areolas y densamente pubescente en los nervios de 1°, 2° y 3°orden en el envés, de 22–25cm de ancho x 40–47cm de largo en hojas de nudos floríferos, elípticas, medialmente simétricas; con ápice cortamente acuminado; base cordada, extensión basal asimétrica con el lobo basal sobre lapando el peciolo en nudos floríferos, ancho basal asimétrico, inserción basal asimétrico con un lado extendiéndose 0,7–1cm más abajo en el peciolo. Peciolo: glabros a ocasionalmente pubescentes en el extremo distal, de 5–1cm de largo, con margen peciolar hasta 1cm antes de la inserción con la lámina. Flores blancas, con brácteas rojas y largos estigmas color café”. (31) código de exicata 011114 (**Anexo 7**)

- ***Piper acutilimum* C. DC.:** Código de exicata 31907
- ***Piper brasiliense* C. DC.:** Código de exicata 0033310
- ***Piper hispidum* Sw.:** Código de exicata 001777
- ***Piper lineatum* Ruiz & Pav.:** Código de exicata 016771
- ***Piper longiacuminatum* Trel.:** Código de exicata 65822
- ***Piper macrotrichum* C. DC.** Código de exicata 14017
- ***Piper stellipilum* (Miq.) C. DC.:** Código de exicata 001197
- ***Piper tenuistylum* C. DC.:** Código de exicata 10391
- ***Piper tridentipilum* C. DC.:** Código de exicata 2736

Nota: El extracto metanólico de las hojas de ***Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don:** código de exicata 004250, utilizado como control positivo, fue otorgado por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (LIPNAA) de la UNAP.

***Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don:**(33) árboles que pueden llegar a medir 20m de altura, la corteza es de color café claro, con la cáscara de color café, este árbol mide 30cm de diámetro, es común encontrarlo en bosques húmedos y lluviosos de 0 a 600m en su hábitat natural, los frutos y semillas de esta planta

son dispersadas por el agua y animales recolectada en la comunidad Urcomirña. Distrito de Mazán (Río Napo).

### 3.3.2.2. Procedimiento general de extracción

El material vegetal seco, se trituró con un molinillo obteniendo así el peso seco de cada una de las especies. Posteriormente se realizó la extracción de cada especie con etanol destilado al 96°, durante un período de 48 horas, luego el proceso se realizó interdiariamente hasta agotamiento, obteniéndose dos componentes: la solución extraída en su solvente (el extracto) y el residuo (el bagazo). Los extractos resultantes se filtraron y se eliminó el disolvente por concentración a vacío en un rotavapor a 45 °C dando lugar a un residuo seco, estos envasados, pesados y almacenados a temperatura de – 10°C.

### 3.3.2.3. ADAPTACIÓN DEL CULTIVO Y ACTIVIDAD LEISHMANICIDA *IN VITRO*

- La cepa de *L. braziliensis* LTB300 utilizada fue otorgada por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (LIPNAA) de la UNAP.
- Orina humana del sexo masculino.

#### 3.3.2.3.1. Preparación del medio de cultivo *in vitro* (**Anexo 8**)

- **Preparación del medio de cultivo LIT (Liver InfusiónTryptose) (34)**

#### **Solución A. para 250 ml**

En esta solución se utilizó 1g de NaCl, 0,1g de KCl, 2g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,25g Bacto triptose, todos se mesclaron con agua destilada (250mL); al finalizar la solución se autoclavó a 120°C por 20 minutos.

#### **Solución B. para 250ml**

Se disolvió 3g de infusión de hígado en 50mL de agua destilada y al finalizar la solución se autoclavó a 120°C por 20 minutos.

### **Solución C. para 250ml**

Se mezcló 2,5g de D-glucosa anhidra en 50mL agua destilada, luego se autoclavó a 120°C por 20 minutos.

### **Solución de Hemina.**

Se disolvió 0,025g de hemina al 1% con NaOH 0,1N (para disolver la hemina), luego se filtró la solución con una membrana estéril de 0,22µm.

### **Solución completa**

Luego de haber autoclavado las soluciones A, B y C, se procedió a realizar la mezcla de las tres soluciones para lograr obtener el medio LIT madre (incompleto). Se preparó una solución de 250mL de medio LIT incompleto, para la cual se tomó 220mL de la solución A, 12,5mL de la solución B y 10mL de la solución C, luego se agregó 250µL de hemina al 1%, se agitó la mezcla para homogenizar, y al finalizar se cubrió la tapa del recipiente que contiene el medio LIT incompleto con parafina y se guardó a 8 °C. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de una cabina de flujo laminar.

- **Preparación de la orina.**

Se colocó la orina en un tubo de centrifuga de 50mL, luego se llevó a centrifugar 3 minutos a 2500 rpm para retirar los cristales y evitar la lisis de las cepas, transcurrido el tiempo se llevó a la cabina de flujo laminar y se filtró con un filtro de 0,22µm, al finalizar se almacenó a 4 °C.

#### 3.3.2.3.2. Adaptación del cultivo de *in vitro* *L. braziliensis* (**Anexo 9**)

- **Cultivo *in vitro* (34)**

En un frasco de cultivo se preparó 5mL de medio LIT completo, se añadió 4250µL de medio LIT incompleto, 250µL orina (5%) y 500µL de FBS (10%) luego se extrajo 100µL de la cepa madre que se encontraba en medio agar sangre y se añadió al frasco de cultivo con el medio LIT completo. Luego se llevó el cultivo a la incubadora a 26 °C, se monitorio diariamente el crecimiento a través del microscopio invertido, después de 72 a 96 horas de crecimiento del parásito se

procedió a hacer el repique del cultivo, repitiendo este procedimiento bajando la concentración del FBS a 5% para la adaptación de la cepa en el cultivo.

- **Congelamiento (34)**

Los repiques al cuarto día de crecimiento en medio LIT fueron congelados en crioviales Eppendorf, se agregó 100µL de FBS, 900µL de la cepa y 100µL de glicerol y se criopreservó a -80 °C.

### 3.3.2.3.3. Cultivo *in vitro* de *Leishmania braziliensis*

- **Descongelación de *L. braziliensis***

Se tomó un criovial conteniendo la cepa de *Leishmania* criopreservada, se colocó en baño maría (37° C) y se incubó por 2 min, luego se procedió a rociar el criovial con mucho etanol y dentro de la cabina de flujo laminar se procedió a transferir todo el contenido a un frasco de cultivo que contenía 3mL de medio LIT con FBS al 10% y 5 % de orina, luego se incubó el frasco a 26 °C por tres días.

- **Adaptación del cultivo**

Luego de 3 días se realizó el repique de la cepa descongelada transfiriendo 100µL del contenido a un frasco de cultivo estéril con 5mL de medio LIT con 5% de FBS y 5% de orina.

- **Mantenimiento del cultivo *in vitro* de la cepa BLT 300 de *L. braziliensis* (Anexo 10)**

Para mantener el cultivo en constante crecimiento fue preciso cambiar el medio de cultivo por otro fresco hasta ajustar el FBS al 5% y contar a través de la cámara de Neubauer cada 24 horas, así monitorear la viabilidad del parásito para la evaluación.

- **Control de la carga parasitaria**

Cada 24 horas se realizó un control de la carga parasitaria mediante la cámara de Neubauer y citometría de flujo.



Se extrajo 20µL del cultivo y se resuspendió en 20µL de PBS 1 X, luego se agregó 20µL de trypan blue y dejó reposar 3 minutos, luego del tiempo de reposo se procedió a lavar con PBS 1 X y se procedió a extraer 10µL de la cepa lavada para realizar la lectura en la cámara de Neubauer. El control se basó en el conteo de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL viables y se calculó bajo las siguientes formulas.

$$\text{concentracion} = \frac{\text{total de células contadas} \times 10000}{\text{numero de cuadrantes}} \times \text{diluciones}$$

### 3.3.2.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA *IN VITRO* (Anexo 11)

La evaluación leishmanicida *in vitro* se realizó después de 24 y 48 horas de haber sido cultivada en una placa de 96 pozos y en fase logarítmica, la evaluación se realizó de la siguiente manera.

#### Preparación de los extractos vegetales

En un tubo de microcentrífuga se pesaron 2mg de cada extracto a evaluar y fueron disueltos en 200µL de DMSO obteniendo así la *solución stock* (10mg/mL) a partir de esta concentración se realizaron las diluciones según la Tabla N° 02.

**Tabla 2:** Preparación de las diluciones de los extractos

Las concentraciones requeridas para los ensayos de la actividad leishmanicida

Cód.	Diluciones (µg/mL)	Extracto (mg)	Volumen stock (µL)	Volumen (µL)	Volumen de solvente	Tipo de solvente
		2mg			200µL	DMSO
A	100µg/mL		5µL		495µL	LIT
B	20µg/mL			100µL	400µL	LIT
C	2µg/mL			50µL	450µL	LIT

fueron: 100µg/mL, 20µg/mL y 2µg/mL.

## Preparación del control positivo (Estibogluconato de sodio y *Jacaranda copaia*)

**Tabla 3:** Preparación de las diluciones del Estibogluconato de Sodio

Cód.	Diluciones (µg/mL)	Estibogluconato Stock (100mg/mL), (µL)	Volumen (µL)	Volumen de solvente (µL)	Tipo de solvente
		100MI			Ampolla
A	1000µg/mL			400µL	LIT
B	100µg/mL		50MI	450µL	LIT
C	10µg/mL		50µL	450µL	LIT
D	1µg/mL		50µL	450µL	LIT

Se trabajó con el extracto metanólico de las hojas de *J. copaia*. La concentración stock, método de dilución y concentraciones empleadas en los ensayos de actividad leishmanicida, fueron los mismos que de los extractos vegetales en estudio.

Con el estibogluconato de sodio se trabajó en una concentración diferente, de una ampolla de estibogluconato (concentración de 100mg/mL), se extrajo 100µL y se diluyó en 400µL de medio LIT completo, a partir de esa concentración se realizó la dilución.

### Control negativo

Se puso 100µL de medio incompleto en cada pozo designado para el control CN.

### Preparación del mix

Al quinto día (fase logarítmica) se realizó el conteo del cultivo mediante la cámara de Neubauer. Se realizó el ajuste de la carga parasitaria para obtener una concentración celular mayor o igual a  $1 \times 10^6$  parásitos/mL, luego se extrajo el volumen requerido y se llevó a centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos descartando el sobrenadante y añadiendo 7mL de medio LIT completo (orina 10 % y FBS 10%).

Preparándose así 7 ml de mix de parásitos por cada placa configurada de 96 pozos, con una concentración parasitaria ( $1 \times 10^6$  cél/mL, Tabla N° 04). Según la fórmula

$$V = \frac{7 \times 10^6}{[C]}$$

**Dónde:** V= volumen a tomar del cultivo

[C] = carga parasitaria del cultivo (cel/mL)

**Tabla 4:** preparación de las diluciones y concentraciones del mix

Componente	Volumen 7000µL	Carga parasitaria (µL)	Concentración final
LIT	5600µL		
Orina hombre	700µL		10%
FBS	700µL		10%
<i>L.braziliensis</i>		233µL	1x10 <sup>6</sup>

#### Preparación de la placa de 96 pozos (Anexo 10)

Se configuro una microplaca de 96 alveolos estéril a 60 pozos, se utilizaron para añadir las diluciones seriadas de los extractos, controles negativos (CN), testigo (T), ruido (R).

- En los pozos se adicionó por triplicado 100µL de la dilución (b) de los extractos y se mezcló con 100µL del mix de manera que en cada pozo tuvo un volumen de 200µL y la concentración de final de 10µg /mL.
- En los pozos con rótulo “CN” se adicionó 100µL de control negativo.
- En los pozos con rotulo “T” se adicionó 100µL de PBS.
- En los pozos con rotulo “R” se adicionó 200µL de medio completo.
- En los pozos restantes se adicionó 200µL de agua destilada/autoclavada, para mantener una humedad suficiente y descartar el “efecto borde”.
- Se incubó a 26°C por 24 y 48 horas.

### 3.3.2.5. MEDICIÓN DE LA CARGA PARASITARIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO. (Anexo 13)

Se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por R&D System: (35)

Después de las 24 y 48 horas, las placas fueron abiertas dentro de la cabina de flujo laminar, cada pozo fue resuspendido antes de ser llevados a la centrifuga.

Se llevó la placa a centrifugar a 4000 rpm a una T° de 20 °C por 3 minutos, y se retiró la placa con mucho cuidado, después se descartó el sobrenadante.

Luego se agregó 100µL de PI (Yoduro de Propidio) preparado y se incubo por 15 minutos en oscuridad, luego de transcurrido el tiempo se volvió a centrifugar a 4000 rpm por 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se colocó 100µL de PBS 1X por cada pozo y se volvió a centrifugar, luego se descartó el sobrenadante y se añadió 150 PBS, se resuspendió el PBS en cada pozo y se transfirió a tubos FACS enumerados por cada muestra. Se encendió el citómetro de flujo media hora antes, se adquirieron 10 000 células en citómetro de flujo BD FACScallibur en el canal FL2. Se determinó el porcentaje de inhibición y el IC<sub>50</sub>. Se determinaron activos a aquellos extractos que mostraron IC<sub>50</sub> ≤ 10 µg/mL. Como controles positivos se utilizaron el estibogluconato de sodio (11,12) y *Jacarando copia*; como control negativo el medio LIT incompleto. Las concentraciones de los extractos y controles fueron distribuidas en los pozos por triplicado, los ensayos fueron repetidos 3 veces.

### 3.3.2.6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Todos extractos etanólicos (EE) adquiridos para la actividad leishmanicida fueron sometidos a pruebas fotoquímicas preliminares para la identificación de metabolitos secundarios por medio de reacciones químicas dando por resultado una manifestación sensible como cambio de color, formación de precipitado o el evolución de gas, lo que indica la presencia o ausencia de un metabolito secundario en particular.

Se realizó de acuerdo a las metodologías propuestas. (36–38).

3.3.2.6.1. **Primera ruta (Dilución etanólico):** Se pesó 5g, de EE y diluyó en etanol, se filtró y se separó en seis tubos de ensayo, el sexto tubo fue el *patrón etanólico*:

**Identificación de fenoles y taninos (FeCl<sub>3</sub>).** En el primer tubo de ensayo, se agregaron 1 o 2 gotas de una solución al 5% de FeCl<sub>3</sub>. La manifestación de un color o precipitado verde – rojo indicó la presencia de fenoles, la manifestación de un color o precipitado azul – negro, la presencia de taninos.

**Identificación de lactonas y cumarinas (Baljet).** En el segundo tubo, se agregó 1mL de ácido pícrico al 1 % y un 1mL de NaOH al 10 %. La aparición de un color o precipitado rojo-anaranjado indicó la manifestación de agrupamientos lactónicos (cumarinas).

**Identificación de flavonoides (Shinoda).** En el tercer tubo, se agregó 1mL de ácido HCl y un trozo de cinta de magnesio metálico, se dejó reposar hasta que termino la reacción con la liberación de hidrógeno. La manifestación de un color amarillo indicó la presencia de flavonoides, isoflavonas y violeta o azul la presencia de flavononas.

**Ensayo para aminoácidos y aminos (Ninhidrina).** En el cuarto tubo se agregó 1mL de una disolución de Ninhidrina al 5 %. Luego se llevó a baño maría durante 5 a 10 minutos, la presencia de una coloración azul violácea confirmó la existencia de aminos.

**Ensayo para saponinas y resinas.** En el quinto tubo se agregó 4mL de agua y se agitó la mezcla fuertemente durante 2 minutos, luego se dejó reposar. La presencia de una espuma jabonosa de más de 2mm de altura en la borde del líquido persistente por más de 5 minutos indicó la presencia de saponinas. La presencia de partículas grumosas en el líquido confirmó la presencia de resinas.

**Ensayo de Cumarinas fijas:** En un papel filtro se sembró dos puntos de la muestra del patrón etanólico y en uno se sembró un punto de KOH al 5,7%, luego se visualizó en una lámpara ultravioleta 115V 60Hz (UVP), la presencia de fluorescencia amarilla y/o verde en el punto donde se sembró la muestra con KOH indica un resultado positivo.

**Ensayo para catequinas:** En un papel filtro se sembró dos puntos de la muestra del patrón etanólico y en uno se sembró un punto de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 1%, luego se visualizó en una lámpara ultravioleta 115V 60Hz (UVP), la ausencia de fluorescencia amarilla y/o verde en el punto donde se sembró la muestra con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  indicó un resultado negativo.

3.3.2.6.2. **Segunda ruta (Dilución ácida):** Se pesó 5g de EE, se diluyó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [0,5 N], se llevó a baño maría para ayudar a disolver la muestra y se filtró para realizar los siguientes ensayos.

**Ensayo directo para alcaloides:** Con la disolución ácida de los extractos se llevó a cabo una prueba directa para alcaloides, en un tubo de ensayo, se agregó 1mL de la disolución ácida a la cual se le agregaron de 1 a 3 gotas de reactivo de Dragendorff. La formación de precipitado floculante de color anaranjado ladrillo indicó de la presencia de alcaloides.

3.3.2.6.3. **Tercera ruta (Dilución clorofórmica):** Se pesó 5g de EE y diluyó en cloroformo, se filtró y se separó en tres tubos de ensayo, el tercer tubo fue el *patrón clorofórmico*:

**Identificación de Triterpenos y esteroides (Liebermann-Buchard):** En el primer tubo, se añadió 1mL de anhídrido acético y se mezcló; por la pared del tubo de ensayo se dejó correr 2 o 3 gotas de  $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ , y se agitó. La presencia de colores rojo – rosado o pardo indicó positivo para estructuras triterpénicas y verde – azul indicó positivo para estructuras esteroidales.

**Identificación de quinonas (Borntrager):** En el segundo tubo, se agregó 1mL de la solución acuosa de NaOH al 5%, se agitó fuertemente y se dejó en reposo. Se formó una fase acuosa alcalina y otra clorofórmica, la fase acuosa alcalina (sobrenadante) al tornarse de color rosado a rojo indicó la presencia de quinonas.

3.4. Procesamiento y análisis de datos.

El porcentaje de inhibición de los extractos frente a la cepa de *Leishmania*, control positivo y control negativo en las diferentes concentraciones se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inh.} = \frac{\text{Parasitemia del c.negativo} - \text{Parasitemia del extracto}}{\text{Parasitemia del c.negativo}} \times 100$$

El valor de IC<sub>50</sub> se calculó por una curva de actividad:

Porcentaje de inhibición vs. Logaritmo de la concentración del extracto, a través del cálculo de interpolación lineal:

$$\text{Log}(IC_{50}) = \text{Log}(X1) + \frac{50 - Y1}{Y2 - Y1} [\text{Log}(X2) - \text{Log}(X1)]$$

**Donde:**

**X1** = Concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia Y1 > 50%

**X2** = Concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia Y2 < 50%;

**Y1** = Porcentaje de inhibición de X1

**Y2** = Porcentaje de inhibición de X2

## CAPÍTULO IV:

### RESULTADOS

#### 4.1. Extractos

Se obtuvo un total de 10 extractos a partir de diferentes partes (hojas, tallo y ramas) de especies vegetales del género *Piper*. El extracto etanólico de *P. acutilimum* fue la especie vegetal que presentó mayor porcentaje de rendimiento (29,4 %) y el extracto *P. obtusilimum* el de menor porcentaje de rendimiento (8,5 %). (Ver tabla 5)

**Tabla 5:** Porcentaje de Rendimiento de los extractos por especies

Nº	Género	Especie	Parte Utilizada	Tipo de extracto	% Red.
1	<i>Piper</i>	<i>acutilimum</i> C. DC	Hojas	EtOH	29,4
2	<i>Piper</i>	<i>basiliense</i> C. DC	Hojas	EtOH	15,6
3	<i>Piper</i>	<i>hispidum</i> Sw	Hojas y tallo	EtOH	12,1
4	<i>Piper</i>	<i>linealatun</i> Ruiz & Pav	Hojas	EtOH	12,4
5	<i>Piper</i>	<i>longeacuminatun</i> Trel	Hojas	EtOH	15
6	<i>Piper</i>	<i>macrotichum</i> C. DC	Hojas	EtOH	13,3
7	<i>Piper</i>	<i>Obtusilimbun</i> C. DC	Hojas	EtOH	8,5
8	<i>Piper</i>	<i>stellipilum</i> (Miq.) C. DC	Hojas y ramas	EtOH	14,9
9	<i>Piper</i>	<i>tenuistylum</i> C. DC.	Hojas	EtOH	12,6
10	<i>Piper</i>	<i>tridentipilum</i> C. DC	Hojas y tallo	EtOH	13
11	<i>Jacaranda</i>	<i>Copaia</i> (Aubl.) D. Don	Hojas	MeOH	19,2



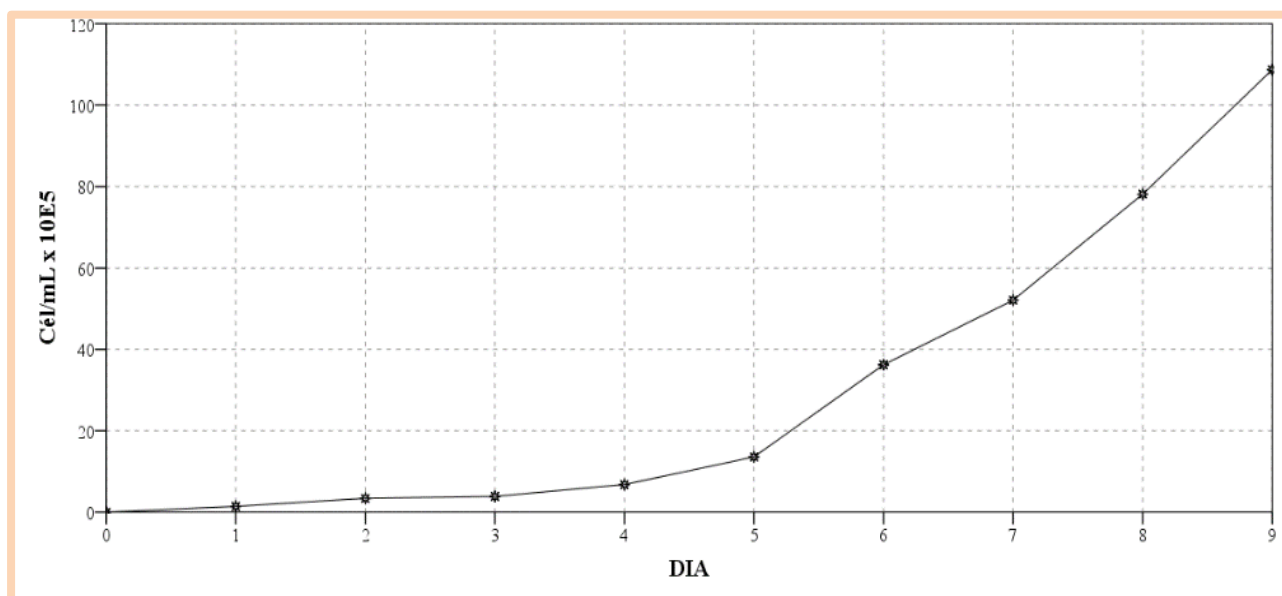
## 4.2. Cultivos y ensayos de actividad leishmanicida *in vitro*

### 4.2.1. Cultivo *in vitro* de las cepas de *Leishmania braziliensis*

Para conocer el parásito estudiado, se realizó primeramente una curva de crecimiento *in vitro* de promastigotes de *L. braziliensis*, que fue vigilada hasta el noveno día.

Al tercer día se observa que se inicia la curva de crecimiento (Figura 11).

Para evaluar la adaptación al cultivo *in vitro* de *Leishmania braziliensis* se realizó el seguimiento de la carga parasitaria durante 9 días, en la Figura 11 se observa un crecimiento adecuado, presentando una tasa de crecimiento promedio de 1,78 (tabla 4) que demuestra que el proceso de adaptación al cultivo *in vitro* fue adecuado.



**Figura 11:** Curva de crecimiento de *Leishmania braziliensis*

En la tabla 6 se observa que en los días 5 y 6 (2 y 2,67 respectivamente) se presenta la mayor tasa de crecimiento correspondiente al inicio de la fase logarítmica y se determina la velocidad de flujo a la cual fueron adquiridas las células.

**Tabla 6:** Crecimiento celular y tasa de crecimiento por día de cultivo

Día	Células/mL	Tiempo de Adquisición (segundos)	Tasa de Crecimiento	MODO *
1	1,43E+5	38		HI
2	3,40E+5	16	2,38	HI
3	3,88E+5	14	1,14	HI
4	6,79E+5	8	1,75	HI
5	13,59E+5	4	2,00	HI
6	36,23E+5	3	2,67	HI
7	52,08E+5	3	1,44	ME
8	78,13E+5	2	1,50	ME
9	108,70E+5	1	1,39	HI
		PROMEDIO	1,78	

\*: Modo de velocidad de adquisición en el Citómetro de flujo

Hi: Alto flujo

Me: Flujo normal

#### 4.2.2 Ensayos de actividad leishmanicida *in vitro*

En este trabajo de investigación se ha evaluado la actividad leishmanicida *in vitro* frente a la cepa de *L. braziliensis* un total de 10 extractos etanólicos de especies vegetales recolectadas de la familia Piperáceae y como control positivo se utilizó del extracto metanólico de las hojas de ***Jacaranda copaia***. El indicador en este estudio para considerar que un extracto es activo contra la forma promastigote del parásito es el IC<sub>50</sub> y este tiene que ser ≤ 10 µg/ml.

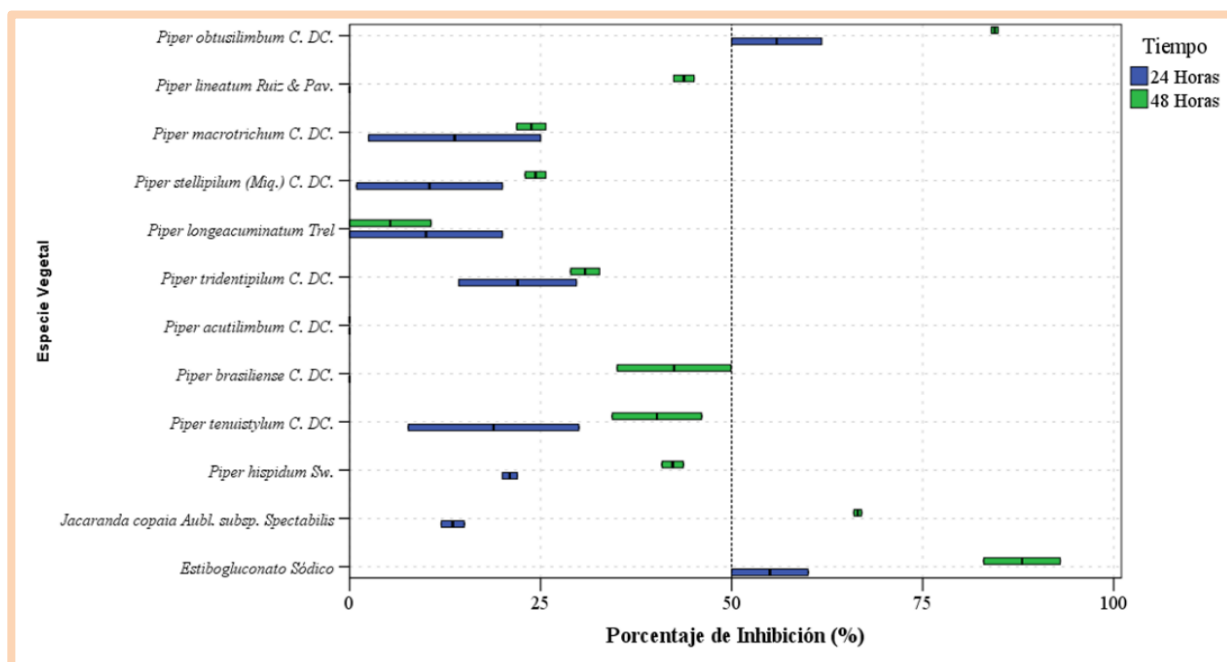
Del total de extractos ensayados solo ***P. obtusilimbun*** presentó actividad leishmanicida, es decir, inhibió el crecimiento *in vitro* de la cepa ensayada, presentando un IC<sub>50</sub> de 7,6µg/mL a las 24 horas y 5,09µg/mL a las 48 horas, con una desviación estándar de 0,74 y 1,23. La actividad leishmanicida presentada por esta especie vegetal resultó mayor al del control positivo pues a las 24 y 48 horas el extracto metanólico de *Jacaranda copaia* Aubl. subsp. *Spectabilis* presentó un IC<sub>50</sub> de >50µg/mL y 5,37µg/mL respectivamente (Tabla 7).

**Tabla 7:** Actividad leishmanicida de los extractos estudiados a las 24 y 48 horas frente a la cepa de *L. braziliensis* (Cribado)

Especies vegetales	Parte utilizada	Tipo de extracto	24 Horas		48 Horas		
			%Inh (±) SD	IC50	%Inh (±) SD	IC50	
<i>Piper obtusilimum</i>	Hojas	EtOH	55.89±8.33	7,59	84.42±0.61	5,09	
<i>Piper lineatum</i>	Hojas	EtOH	0	> 50	43.75±1.90	> 50	
<i>Piper macrotrichum</i>	Hojas	EtOH	13.75±15.91	> 50	23.78±2.68	> 50	
<i>Piper stellipilum.</i>	Hojas y ramas	EtOH	10.47±13.48	> 50	24.33±1.90	> 50	
<i>Piper longeacuminatum</i>	Hojas	EtOH	10±14.14	> 50	5.33±7.53	> 50	
<i>Piper tridentipilum</i>	Hojas y tallo	EtOH	21.99±10.89	> 50	30.83±2.67	> 50	
<i>Piper acutilimum</i>	Hojas	EtOH	0	> 50	0	> 50	
<i>Piper brasiliense</i>	Hojas	EtOH	0	> 50	42.47±10.52	> 50	
<i>Piper tenuistylum</i>	Hojas	EtOH	18.85±15.78	> 50	40.22±8.26	> 50	
<i>Piper hispidum</i>	Hojas y tallo	EtOH	20.97±1.37	> 50	42.28±1.97	> 50	
Control positivo							
<i>Jacaranda copaia</i>	Hojas	MeOH	13.5±2.12	> 50	66.5±0.71	5,37	
				>			
				55±7.07	1000 mM	88±7.07	86,9 mM
Estibogluconato Sódico							

Leyenda: \*: IC50 ≤ 10 µg/mL activo, >10 µg/mL: inactivo

En la figura 12 el diagrama de cajas comparativos de porcentaje de inhibición se observa que el extracto etanólico de *P. obtusilimum* a las 24 horas de incubación ya tenía un porcentaje de inhibición mayor de 50% y a las 48 horas de incubación presentaron un porcentaje de inhibición mucho mayor que de las 24 horas, mientras que el extracto *Jacaranda copaia* (control positivo) solo presentó un porcentaje de inhibición a las 48 horas de incubación frente a *L. braziliensis* cepa BTL300 a una concentración de 10 µg/mL.



**Figura 12:** Diagrama de cajas comparativas del porcentaje de inhibición de los extractos de acuerdo al tiempo de incubación.

### 4.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos que se utilizaron para actividad leishmanicida frente a la cepa de *L. braziliensis*, se muestran a continuación (Tabla 8)

**Tabla 8: Screening Fitoquímico de los Extractos**

Especies vegetales	Parte utilizada	Tipo de extracto	Alc	Tri	Est	Qui	Lac	Fla	Tan	Am/aa	Sap	Fen	Cum
<i>Piper obtusifolium</i> C. DC.	Hojas	EtOH	-	-	+	++	++	-	+++	-	-	+	-
<i>Piper lineatum</i> Ruiz & Pav.	Hojas	EtOH	-	++	-	+++	+++	+	++	-	-	+	-
<i>Piper macrotrichum</i> C. DC.	Hojas	EtOH	-	-	+++	-	-	++	-	-	-	+	-
<i>Piper stellipilum</i> (Miq.) C. DC.	Hojas y ramas	EtOH	-	-	+++	-	-	++	-	-	-	+	-
<i>Piper longeacuminatum</i> Trel	Hojas	EtOH	-	-	+++	-	-	++	+++	-	-	+	-
<i>Piper tridentipilum</i> C. DC.	Hojas y tallo	EtOH	-	-	+++	-	-	+++	++	-	-	-	-
<i>Piper acutilimum</i> C. DC.	Hojas	EtOH	-	-	+++	-	-	++	+++	-	-	++	-
<i>Piper brasiliense</i> C. DC.	Hojas	EtOH	+	-	++	+	++	-	++	-	++	+	-
<i>Piper tenuistylum</i> C. DC.	Hojas	EtOH	+++	+++	-	-	++	-	-	++	-	+	+
<i>Piper hispidum</i> Sw.	Hojas y tallo	EtOH	++	++	-	++	++	++	-	+++	+++	+	+++
<i>Jacaranda copaia</i> Aubl. subsp. <i>Pectabilis</i>	Hojas	MeOH	-	-	+	-	+++	+++	+++	-	+++	-	-

**LEYENDA:** Alc: Alcaloides; Tri: Triterpenos; Est: Esteroides; Qui: Quinonas; Lac: Lactonas; Fla: Flavonoides; Tan: Taninos; Am/aa: Aminas y aminoácidos;

Sap: Saponinas; Fen: Fenoles; Cum; Cumarinas.

**Tabla 9: Especies con similar composición**

Especies vegetales	Parte utilizada	Tipo de extracto	Alc	Tri	Est	Qui	Lac	Fla	Tani	Am/aa	Sap	Fen	Cum
<i>Piper obtusilimum</i> C. DC.	Hojas	EtOH	-	-	+	++	++	-	+++	-	-	+	-
<i>Piper longeacuminatum</i> Trel	Hojas	EtOH	-	-	+++	-	-	++	+++	-	-	+	-
<i>Piper acutilimum</i> C. DC.	Hojas	EtOH	-	-	+++	-	-	++	+++	-	-	++	-
<i>Jacaranda copaia</i> Aubl. subsp. <i>Spectabilis</i>	Hojas	MeOH	-	-	+	-	+++	+++	+++	-	+++	-	-

**LEYENDA:** Alc: Alcaloides; Tri: Triterpenos; Est: Esteroides; Qui: Quinonas; Lac: Lactonas; Fla: Flavonoides; Tan: Taninos; Am/aa: Aminas y aminoácidos; Sap: Saponinas; Fen: Fenoles; Cum; Cumarinas.

**Tabla 10: Especies con presencia de alcaloides**

Especies vegetales	Parte utilizada	Tipo de extracto	Alc	Tri	Est	Qui	Lac	Fla	Tani	Am/aa	Sap	Fen	Cum
<i>Piper brasiliense</i> C. DC.	Hojas	EtOH	+	-	++	+	++	-	++	-	++	+	-
<i>Piper tenuistylum</i> C. DC.	Hojas	EtOH	+++	+++	-	-	++	-	-	++	-	+	+
<i>Piper hispidum</i> Sw.	Hojas y tallo	EtOH	++	++	-	++	++	++	-	+++	+++	+	+++

**LEYENDA:** Alc: Alcaloides; Tri: Triterpenos; Est: Esteroides; Qui: Quinonas; Lac: Lactonas; Fla: Flavonoides; Tan: Taninos; Am/aa: Aminas y aminoácidos; Sap: Saponinas; Fen: Fenoles; Cum; Cumarinas.

## CAPÍTULO V:

### DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la actividad leishmanicida de las especies vegetales de la familia Piperáceae; ***P. acutilimum* C. DC, *Piper brasiliense* C. DC, *Piper hispidum* Sw, *Piper lineatum* Ruiz & Pav, *Piper longecuminatum* Trel, *Piper macrotrichum* C. DC, *Piper obtusilimum* C. DC, *Piper stellipilum* (Miq.) C. DC, *Piper tenuistylum* C. DC, *Piper tridentipilum* C. DC.**

La única especie que presentó actividad sobre ***L. braziliensis***, fue ***Piper obtusilimum* C. DC.**, pues a las 24 y 48 horas presentó un IC<sub>50</sub> de 7,59 µg/mL y 5,09µg/mL respectivamente, en contraste, ***Jacaranda copaia*** presentó a las 24 y 48 horas un IC<sub>50</sub> de >50 µg/mL y 5,37µg/mL respectivamente, incluso ***Jacaranda copaia*** tuvo mejor actividad que el estibogluconato de sodio pues este, a las 24 y 48 horas presentó un IC<sub>50</sub> de > 1000mM y 86.9mM (80.8µg/mL) respectivamente. El extracto etanólico de ***Piper obtusilimum*** demostró ser más activa frente a ***L. braziliensis*** que el extracto metanólico de ***Jaracanda copaia*** y el estibogluconato de sodio.

Los antimoniales pentavalentes, como el estibogluconato de sodio y el antimonio de meglumina se han recomendado para el tratamiento de la leishmaniasis durante más de 70 años, por lo que no es sorprendente que la tasa de resistencia a esta clase de medicamentos esté aumentando, y en algunas zonas endémicas, su uso está limitado debido a la falta de eficacia. Los medicamentos de segunda línea utilizados en el tratamiento de leishmaniasis incluyen diamidinas aromáticas (pentamidina) y Anfotericina B, pero similares a los antimoniales pentavalentes, estos medicamentos son tóxicos y producen efectos secundarios graves (a veces potencialmente mortales). Desde la introducción de la miltefosina a principios de este siglo, que es el único fármaco activo por vía oral contra ***Leishmania***, no se han aprobado nuevos compuestos antileishmaniasis para su uso en el tratamiento de seres humanos. Por lo tanto, el desarrollo de quimioterapias antileishmaniasis seguras, efectivas y asequibles es una prioridad crítica de salud pública global. (39)

La bibliografía reporta el uso en medicina tradicional de infusiones obtenidos de especies vegetales pertenecientes a diversas familias, para el alivio de dolencias y enfermedades, entre ellas leishmaniasis. Varias especies del género **Piper** han presentado actividad contra protozoos del género **Leishmania**, actividad antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiparasitario, anticancerígeno, analgésico, antiinflamatorio, anti-asma, hipotensor e insecticida. (11)

Es importante mencionar que los conocimientos tradicionales sobre el tratamiento de leishmaniasis enfoca el uso de plantas medicinales en el tratamiento de los síntomas asociadas a esta enfermedad, si bien los conocimientos sobre el uso tradicional de plantas medicinales carecen de valor científico, no dejan de ser importantes, por lo tanto, se puede decir que las plantas utilizadas para tratar los síntomas de leishmaniasis pueden tener actividad contra los parásitos causantes. (7)

En la literatura no se reporta sobre la actividad leishmanicida de las especies vegetales estudiadas en el presente trabajo, sin embargo, se cuenta con estudios relacionados de especies de la familia piperáceas u otras familias y especies, bien conocida por ser fuente de metabolitos secundarios, compuestos que han despertado gran interés debido a su compleja estructura, así como propiedades farmacológicas y toxicológicas. (11,14)

Se realizó el screening fitoquímico de los 11 extractos utilizados en la evolución, los resultados muestran que el extracto etanólico de **Piper obtusilimbun** presenta metabolitos secundarios como esteroides, quinolonas, lactonas, taninos y cumarinas; **Jacaranda copaia** quien también demostró actividad inhibitoria, presento lactonas, flavonoides y taninos, estos metabolitos podrían ser los responsable de la actividad, no diferenciándose de los demás extractos ya que presentaron los mismos y aun otros metabolitos; así por ejemplo, en la tabla 8 se muestra el screening de las tres especies (**P. obtusilimbun C. DC;** **P. longecuminatum Trel;** **P. acutilimbun C. DC.**) con similar composición al control positivo (**Jacaranda copaia**) que la literatura refiere ser activa frente a amastigotes de **L. amazonensis** (40) y sin embargo en la evaluación de la actividad los resultados muestran que de estas tres especies solo **P. obtusilimbun** presenta actividad leishmanicida frente a **L. braziliensis**.



Por eso no se descarta que los demás extractos con o sin los mismos metabolitos pudieran presentar actividad frente a diferentes especies de **Leishmania**. Es necesario el estudio constante de los metabolitos secundarios presentes en **P. obtusilimbun** y **Jacaranda copaia** para lograr identificar que moléculas son las que les dan actividad leishmanicida y del mismo modo determinar por qué **P. obtusilimbun** presenta mayor actividad (16 veces más activo que estibogluconato de sodio) y por qué las especies de similar composición no mostraron actividad.

**Flores 2007.** Realizó evaluaciones de actividad leishmanicida y fraccionamiento biodirigidos del género *Piper* donde la especie que presentó mayor actividad fue *P. glabratum* con un  $IC_{50} = 7.6 \mu\text{g/ml}$  frente a promastigotes de *L. braziliensis* y *L. amazonensis*; y el metabolito aislado con mayor actividad fue la flavokavaina con un  $IC_{50} = 3.2 \mu\text{g/ml}$ , además menciona que los metabolitos aislados e identificados que presentaron mayor actividad fueron los flavonoides, en comparación con los resultados que se obtuvo en el presente trabajo podemos decir que la especie vegetal *P. obtusilimbun* fue más activa ( $IC_{50} = 5.092 \mu\text{g/ml}$ ), además que las especies que no presentaron actividad leishmanicida manifestaron gran cantidad de flavonoides y otros metabolitos que pueden ser aislados, identificados y evaluados. (41)

7-[[[(2R\*)-3,3-dimetiloxiran-2-il]metoxi]-8-[(2R\*,3R\*)-3-isopropeniloxiran-2-il]-2H-cromen-2-ona, 7-metoxi-8-(4-metil-3-furil)-2H-cromen-2-ona, heterocíclico oxigenado fue aislado las hojas de **Galipea panamensis**, son cumarinas naturales. (42) Se tiene como referencia que se probaron los derivados naturales disponibles de las cumarinas y se confirmó que eran efectivos contra la forma promastigote del parásito de **Leishmania** dentro de un rango de 17 a  $50 \mu\text{g/ml}$  para un  $IC_{50}$ , (43,44) por lo tanto de acuerdo lo referenciado las cumarinas demostraron tener potencial como agente leishmanicida. También se resalta la 4-(3,4-dimetoxifenil)-6,7dimetoxi-2,4-cromeno-2-one, cumarina que mostró una potente actividad contra amastigotes de **Leishmania donovani** con un  $IC_{50} = 1,1 \mu\text{g/ml}$ . (45) La chalcona oxigenada aislada de las raíces de la planta de **Regaliz china**, inhibió el crecimiento de los promastigotes y amastigotes de **Leishmania major** y **Leishmania donovani**. (46) También existen estudios microscópicos de

electrones que demostraron que la licochalcona "A" alteró la ultraestructura de las mitocondrias de promastigotes de *L. mayor* y de amastigote de *Leishmania spp.* de una manera dependiente de la concentración sin dañar los orgánulos de los macrófagos o la función fagocítica de estas células. (46)

Los metabolitos secundarios que presenta la especie vegetal con actividad son las quinolonas, en la literatura encontramos trabajos que hacen referencia a la actividad biológica que presentan; este metabolito inhibe el GDP-nanosepirofosforilasea leishmanial, un sistema enzimático que produce un gama de gliconjugados de manosa.(47) este estudio confirma que los esteroides, metabolito con mayor presencia en la especie activa estudiada, presenta actividad inhibitoria frente a promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. mayor*. (47)

En el trabajo realizado por **Cardona W, et al.** Hacen mención del mecanismo de acción de los alcaloides producidos por algunas especies de Piperáceae, los cuales generan daño mitocondrial que disminuye considerablemente la viabilidad de *Leishmania sp.* Dentro de estos alcaloides se encuentra piperidina y sus análogos, los cuales están reportados para un amplio grupo de especies del género *Piper* y pueden ser los responsables de la actividad de *P. daniel-gonzalezii* mas no de *Piper obtusilimum*. (11)

Los resultados obtenidos en el trabajo realizado por **Virinder S. P, et al. 2009** donde aislaron metabolitos de las especies del género *Piper*, destacan una amplia variedad de alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, las cuales presentan una amplia gama de actividades bilógicas. De estos resultados obtenidos se presentaron metabolitos aislados de especies de *Piper* con actividad leishmanicida como 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, aislada del extracto de *Piper aduncum* que mostró una significativa actividad *in vitro* e *in vivo*, inhibiendo el crecimiento intracelular de *L. amazonensis*. (48)

A pesar de las referencias citadas, en la tabla 9, se muestran las especies evaluadas que en el screening fitoquímico resultaron poseer alcaloides dentro de su composición (*Piper brasiliense* C. DC.; *Piper tenuistylum* C. DC; *Piper*

*hispidum* Sw.) pero que sin embargo no mostraron actividad frente a *L. braziliensis*. Esto quiere decir que no necesariamente los alcaloides son los metabolitos que le proporcionan actividad biológica a las especies de *Pipers*.

Por otra parte, las dihidrochalconas 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalcona y 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidrochalconas aisladas de las hojas de *P. elongatum*, presentan actividad frente a *L. braziliensis*, *L. tropica* y *L. infantum*.(48) este estudio afirma que los metabolitos encontrados en las especie vegetal estudiada pueden presentar actividad leishmanicida de diferentes especies de *Leishmania*, asegurando así que el extracto etanólico que presentó una mayor actividad de los controles positivos puede ser una potencial fuente de estudio bioactivos.

También es importante resaltar que extractos evaluados no son activos, aunque su ineficacia solo fue demostrada en ensayos *in vitro* no se puede descartar realizar ensayos *in vivo* que simule el complejo proceso de interacción de las moléculas con la forma promastigote de *L. braziliensis*, no olvidemos que una molécula inactiva al ser metabolizada puede convertirse en una de gran actividad, sin embargo los ensayos *in vitro* son los ensayos de referencia para un fraccionamiento biodirigido en busca de nuevas molécula de interés farmacológico siendo los ensayos *in vivo* complementarios.

Estudios confirman que especies del género *Jacaranda* han sido estudiadas y presentaron actividad antileishmaniasis, en la evaluación que realizarón **Céline et al (2009)** de 94 extractos etanólicos de plantas utilizadas por los Yanésha frente a amastigotes de *L. amazonensis*, se determinaron que *Jacaranda copaia* mostró un IC<sub>50</sub> de 16.5±4.5µg/mL, (40) esta referencia confirma que existe actividad leishmanicida; cabe resaltar que las pruebas biológicas no fueron contra *L. braziliensis*. En la evaluación que realizamos se confirmó que *Jacaranda copaia* tiene actividad contra la especie de *L. braziliensis*, pero no fue más activo que *Piper obtusifolium*, esto queda como objeto de estudio, sintetizar e identificar el o los metabolitos que le dan dicha actividad biológica.

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Solo el extracto etanólico de las hojas de *P. obtusilimbun* mostró actividad leishmanicida, al inhibir el crecimiento de promastigotes de la cepa TLB300 de *L. braziliensis*.

El extracto etanólico de las hojas de *P. obtusilimbun* fue más activo ( $IC_{50}=7.59$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 24 horas y  $5.09$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 48 horas) que el extracto metanólico de las hojas de *Jacaranda copaia* ( $IC_{50}=5.37$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), además presentó mejor actividad que el estibogluconato de sodio que a las 24 y 48 horas presentó un  $IC_{50}$  de  $> 1000$  mM y  $86.9$  mM ( $80.8$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) respectivamente. El mayor porcentaje de rendimiento de todas las especies estudiadas fue de *P. acutilimbun* C. DC (29.4 %).

El extracto etanólico con mayor actividad leishmanicida (*P. obtusilimbun*) mostró en el tamizaje fitoquímico, la presencia de taninos, esteroides, lactonas y quinonas.

## CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Abordar más estudios sobre evaluación leishmanicida de especies vegetales de la familia Piperáceae, ya que basados en antecedentes de estudios previos, reportes de uso en medicina tradicional de estas especies y sobretodo respaldados en los resultados obtenidos en este estudio, podemos calificar a esta familia como fuente de metabolitos con actividad biológica frente a *Leishmania sp.*
- Actualizar o establecer nuevos protocolos de investigación que se siguen como directrices para el estudio de actividad leishmanicida, además de realizar estudios más detallados y profundos sobre el ciclo de vida y metabolismo del parásito que ayude al desarrollo estudios más completos con respecto a la actividad biológica demostrada por especies de plantas de la familia piperácea en este estudio, frente a *Leishmania sp.*
- desarrollar estudios de fraccionamiento químico biodireccionado de extractos que exhiban actividad leishmanicida, mediante técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, HPLC, etc.); que determine las estructuras químicas utilizando técnicas espectroscópicas (IR, 13C, 1H, etc.) y espectrometría (baja masa y alta resolución).
- Realizar pruebas de actividad leishmanicida de los compuestos aislados para confirmar dicha actividad y, asimismo, pruebas de evaluación leishmanicida *in vivo* y pruebas de toxicidad de las especies vegetales que demostraron actividad biológica, frente a *Leishmania braziliensis*.

## CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Ministerio de Salud del Perú, editor. Normas y Procedimientos para el Control de las Leishmaniasis en el Perú. A edición. Lima - Perú: Minsa; 1993. 67 p.
2. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2018 [citado 13 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
3. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - MINSA. Reporte Semana Epidemiológico N° 20 – 2018.
4. 4. MINSA-Boletín Epidemiológico. (Del 24 al 30 de Mayo del 2015). Volumen 24 – Semana Epidemiológica N° 21 ISSN versión impresa: 1563-2709 ISSN versión electrónica: 1816-8655. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/boletin.php>.
5. Cardona D. Moléculas bioactivas contra leishmania (*viannia*) panamensis. Actividad y optimización molecular. 2018.
6. Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep*. 2001; 18(6):674–688.
7. Rutter RA. Catálogo de plantas útiles de la Amazonía peruana. Minist Cult [Internet]. 1990 [citado 13 de diciembre de 2018]; Disponible en: <http://repositorio.cultura.gob.pe/handle/CULTURA/645>
8. Dakir M, El Hanbali F, Mellouki F, Akssira M, Benharref A, Quilez Del Moral JF, et al. Antibacterial diterpenoids from *Cedrus atlantica*. *Nat Prod Res*. Octubre de 2005; 19(7):719-22.
9. Marin Severiche FJ, Torres Ayazo OL, Santafe Patiño GG, Saez Vega AA, Guzman Teran CA. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante de *Esenbeckia litoralis* Donn.Sm. (Loro grande). *Rev Cubana Plant Med*. 2016; 21(4):1-12.
10. Espitia Baena JE, Robledo-Restrepo SM, Cuadrado Cano BS, Duran Sandoval H del R, Gómez Estrada HA. Perfil fitoquímico, actividad anti-Leishmania, hemolítica y toxicológica de *Cordia dentata* Poir. y *Heliotropium indicum* L. Phytochemical profile and antileishmanial, hemolytic and toxicological activity of *Cordia dentata* Poir and *Heliotropium indicum* L [Internet]. 2014 [citado 13 de diciembre de 2018]; Disponible en: <http://repositorio.colciencias.gov.co:80/handle/11146/22050>
11. Cardona Galeano W, Robledo Restrepo SM, Rojano BA, Alzate Guarín F, Muñoz Herrera DL, Saez Vega J. Actgividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae). *Rev Cuba Plantas Med*. Junio de 2013; 18(2):268-77.
12. Alzamora L, Solís H, Rojas M, Calderón M, Fajardo N, Quispe J, et al. Actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de

- Lepidium peruvianum, Chacón (Brassicaceae). Rev Peru Biol. julio de 2007;13(3):211-4.
13. Bocanegra OS. Agentes antiparasitarios de plantas de la Amazonia Peruana empleadas en medicina tradicional [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad Autónoma de Madrid; 2010 [citado 13 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=37452>
  14. Rojas U. Joahan, Satalaya A. Johann R, Grandez, R. Maritza, Vilchez, A. Luis, Rengifo, S. Elsa, Salamanca, C. Efrain et al. Rev. Bol. Quim [Internet]. 2009 Oct; 26(2): 43-48. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0250-54602009000200001&lng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602009000200001&lng=es).
  15. Ibáñez-Calero SL, Ruiz G, Michel R, Sauvain M. EVALUACION DE LA FLORA EN EL VALLE DE ZONGO CONTRA LEISHMANIA Y CHAGAS. Rev Boliv Quím. Diciembre de 2008; 25(1):43-52.
  16. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1 de octubre de 1997; 46(4):597-673.
  17. Tincusi BM. Metabolitos secundarios bioactivos de la flora medicinal iberoamericana: Piper elongatum, Copaifera paupera, Crossopetalum tonduzii y Maytenus cuzcoina [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de La Laguna; 1999 [citado 13 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=1013>
  18. León B, Monsalve C. Apocynaceae endémicas del Perú. Rev Peru Biol. 2006; 13(2):46–48.
  19. Ampuero J.S. (2000) Ministerio de Salud del Perú. Oficina General de epidemiología leishmaniasis. Módulos Técnicos. Series Documentos Monograficos N°8. Lima 2000.p. 11-12, 27-36
  20. Ministerio de salud. Dirección General de salud. Dirección de Programa de Control de Enfermedades Transmisibles. (1995).Control de Malaria y OEA. Doctrinas, Normas y Procedimientos para el control de Leishmaniasis en el Perú.
  21. Viviana Milena Taylor, Yesmil Karina Ríos R, y Daniel Arturo León. Plantas con actividad fotosensibilizadora y potencial terapéutico en leishmaniasis cutánea: Hipericina, una alternativa terapéutica.2013; 12(2):90-102
  22. Atias A. (1999).Parasitología Médica. Editorial Mediterraneo. Santiago de Chile. Pág. 242-250, 227-241.23. Weiss P. Epidemiología y clínica de las leishmaniasis tegumentarias en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. Septiembre de 1943; 2(3):209-48.
  24. Gillespie S., Pearson R.D. (2001). Principles and practice of clinical parasitology.1ªEdición, Copyright

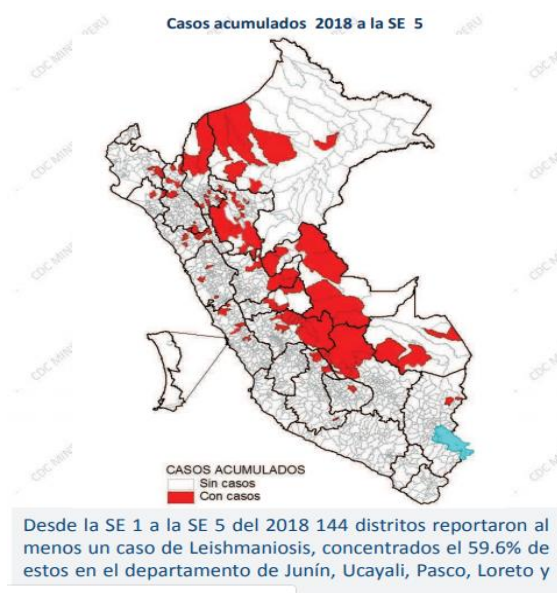
25. Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* Julio de 1993; 6(3):230-50.
26. Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 36 – Formulario nacional. EE.UU. NF 31. 2013; 1:517-522. [Farmacopea americana].
27. Suárez VM, Pérez LO del V, Domínguez GD, Abraham CM. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 10 de abril de 2015 [citado 13 de diciembre de 2018]; 31(3). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/313>
28. Resino por S. Citometría de Flujo [Internet]. EMEI. 2011 [citado 13 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://epidemiologiamolecular.com/citometria-flujo/>
29. Barrera Ramírez LM, Drago Serrano ME, Pérez Ramos J, Sainz Espuñes TDR, Zamora AC, Gómez Arroyo F, et al. CITOMETRÍA DE FLUJO: VÍNCULO ENTRE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y LA APLICACIÓN CLÍNICA. *Rev Inst Nac Enfermedades Respir.* Marzo de 2004; 17(1):42-55.
30. Yaluff G, Maldonado M, Ferreira ME, Benítez B, López T, Vera N. Actividad antiparasitaria in vitro de extractos etanólicos de *Erythrina crista-galii* L., *Erythrina falcata* Benth y *Erythrina dominguezii* Hassl. *Mem Inst Investig En Cienc Salud* [Internet]. 26 de julio de 2015 [citado 13 de diciembre de 2018]; 13(2). Disponible en: <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/599>
31. Sharrow SO. Overview of Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol.* 2002; 50(1):5.1.1-5.1.8.
32. Trujillo W, Hoyos Cardozo F. El género Piper (Piperaceae) en la reserva natural Las Dalias, municipio de La Montañita-Caquetá. *Rev Momentos Cienc.* 1 de enero de 2013; 10:88-96.
33. Hernandez J. *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae) [Internet]. Área de Conservación Guanacaste. 2014 [citado 15 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.acguanacaste.ac.cr/paginas-de-especies/plantas/283-bignoniaceae/604-i-jacaranda-copaia-i-bignoniaceae>
34. Pinedo-Cancino V, Laurenti MD, Kesper N, Umezawa ES. Evaluation of Leishmania (*Leishmania*) infantum excreted-secreted antigens for detection of canine leishmaniasis. *Acta Trop.* 1 de septiembre de 2016; 161:41-3.
35. Flow Cytometry Protocol for Analysis of Cell Viability using Propidium Iodide: R&D Systems [Internet]. [citado 18 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>
36. Olga Lock De Ugaz. Investigación Fitoquímica métodos en el estudio de Productos Naturales. 2º Ed. p. 8-18. [Libro].



37. Schabra SC, Ulso FC, Mishin EN. Phytochemical screening of tanzanian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984 (11): 157-159. [Revista].
38. Matos JA. Introducción a la fitoquímica experimental. Brasil: Editorial UFC. 1998. [Libro].
39. Roychoudhury J, and Ali N. Sodium Stibogluconate: Therapeutic use in the Management of Leishmaniasis. *Indian J. Biochem. Biophys.* Febrero del 2008, **45**, 16-22[ Revista]
40. Valadeau C, Pabon A, Deharo E, Albán-Castillo J, Estevez Y, Lores FA, et al. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *J Ethnopharmacol*. 25 de junio de 2009; 123(3):413-22.
41. Flores Quisbert EN. Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *Piper* de la flora boliviana.[ tesis doctorales]. 2007
42. Spino C, Dodier M, Sotheeswaran S. Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil. *Bioorg Med Chem Lett*. 15 de diciembre de 1998; 8(24):3475-8.
43. Arango V, Robledo S, Séon-Méniel B, Figadère B, Cardona W, Sáez J, et al. Coumarins from *Galipea panamensis* and Their Activity against *Leishmania panamensis*. *J Nat Prod*. 28 de mayo de 2010; 73(5):1012-4.
44. Iranshahi M, Arfa P, Ramezani M, Jaafari MR, Sadeghian H, Bassarello C, et al. Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry*. febrero de 2007;68(4):554-61.
45. Pierson JT., Dumetre A, Hutter S, Delmas F, Laget M, Fine JP, Azas N, Combes, et al. Synthesis and biological evaluation of 4-arylcoumarin analogues of combretastatins. *J Med Chem*, 12 de mayo 2011,54(9): 3153-62.
46. Chiaradia LD, dos Santos R, Vitor CE, Vieira AA, Leal PC, Nunes RJ, Calixto JB, Yunes RA. et al. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2, 4, 6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 cells stimulated by LPS: quantitative structure-activity relationships.
47. Lackovic K, Parisot JP, Sleebs N, Baell JB, Debien L, Watson KG, et al. Inhibitors of *Leishmania* GDP-mannose pyrophosphorylase identified by high-throughput screening of small-molecule chemical library. *Antimicrob Agents Chemother*. Mayo de 2010; 54(5):1712-9.
48. Virinder, SP, Subhash, CJ, Kirpal, SB, Rajni J, Poonam T, Amitabh J, Om D T, Ashok K P, Jesper W, Carl EO, Per M B. (2009)*Phytochemistry*, 46, 597-673.

## ANEXO

### Anexo 1: Número de casos Leishmaniasis por distritos Perú 2018 (218 casos)



FUENTE: Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA

### Anexo 2: Leishmaniasis según departamentos Perú años 2013 y 2018

DEPARTAMENTOS	Total Año ( hasta la SE 52)						Corte en la SE actual 5					
	2013	2014	2015	2016	2017	2018*	2013	2014	2015	2016	2017	2018
JUNIN	485	376	355	489	535	39	13	7	10	14	8	0
UCAYALI	257	346	277	340	332	28	6	2	9	12	12	2
PASCO	174	140	127	169	187	25	6	4	2	6	7	0
LORETO	257	287	221	192	311	20	4	8	8	5	8	0
SAN MARTIN	619	702	359	362	606	18	16	21	14	7	10	2
AMAZONAS	325	366	323	305	333	15	10	8	9	4	8	3
CAJAMARCA	385	496	430	645	561	11	15	13	18	10	17	0
CUSCO	895	765	633	828	966	10	19	9	22	22	36	0
LA LIBERTAD	251	308	274	381	217	9	4	4	14	9	8	0
PIURA	647	555	515	653	323	8	17	18	22	39	17	0
AYACUCHO	95	112	134	164	93	7	0	3	3	1	5	0
LIMA	393	362	351	516	176	7	6	12	5	11	4	2
HUANUCO	276	266	241	321	303	6	10	8	7	10	10	0
LAMBAYEQUE	186	376	285	129	126	5	0	9	10	5	3	0
ANCASH	341	466	467	803	254	3	11	5	31	25	8	0
MADRE DE DIOS	1021	698	794	869	669	3	26	17	40	31	18	0
PUNO	273	201	195	245	271	3	10	3	4	11	5	0
APURIMAC	23	29	17	17	20	1	1	0	0	0	1	0
AREQUIPA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CALLAO	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
HUANCAVELICA	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
ICA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
TUMBES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MOQUEGUA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TACNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total general</b>	<b>6903</b>	<b>6851</b>	<b>5999</b>	<b>7428</b>	<b>6291</b>	<b>218</b>	<b>174</b>	<b>151</b>	<b>228</b>	<b>222</b>	<b>185</b>	<b>9</b>

FUENTE: Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSA

#### Anexo 4: Casos de leishmaniasis Perú 2013-2018

**Número de casos, incidencia y fallecidos por leishmaniasis.  
Perú 2013 – 2018\***

AÑOS	2013	2014	2015	2016	2017	2018
N° de casos	1075	1054	955	1241	1355	218
Incidencia por 100 mil hab.	3.5	3.4	3.1	3.9	4.3	0.7
Defunciones	0	0	1	0	0	0

FUENTE: Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSa

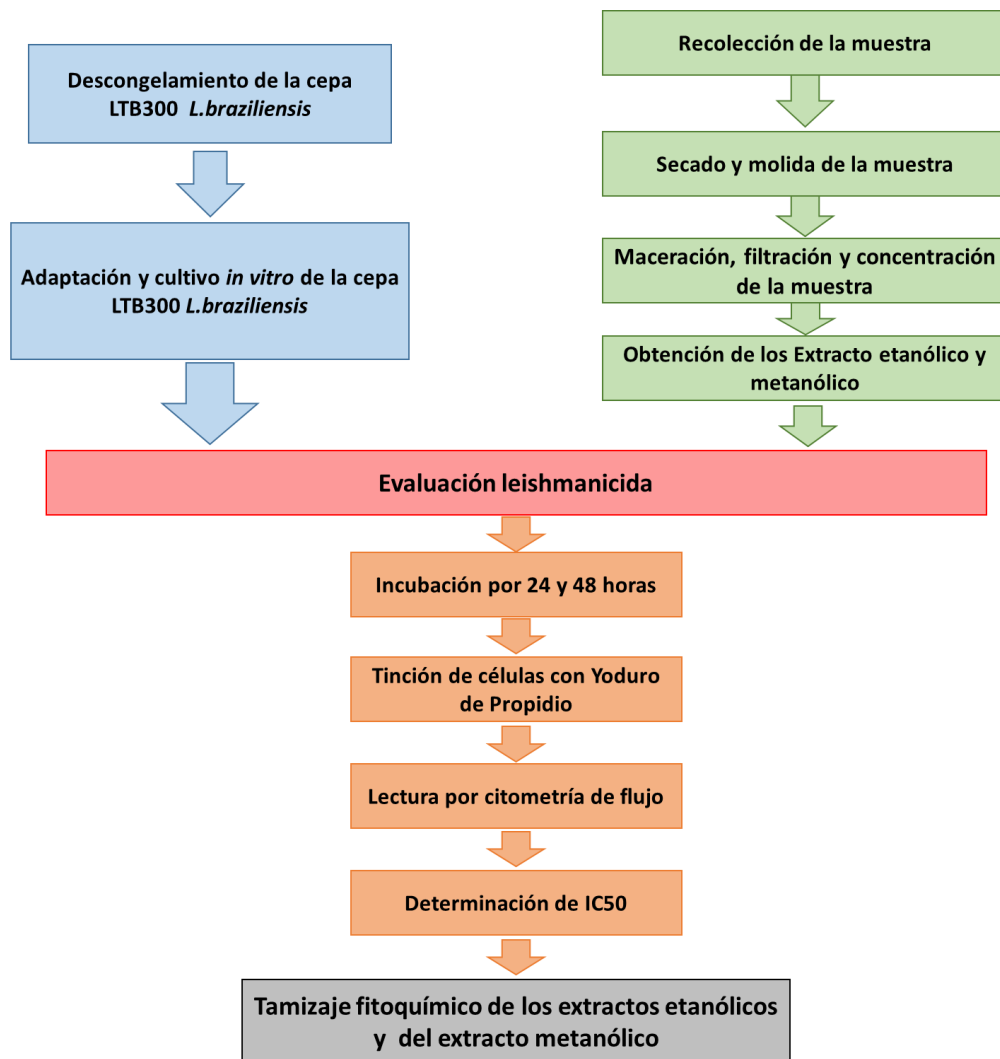
#### Anexo 5: Distribución de casos de leishmaniasis por grupo de edad y género.

Perú 2018

	N° casos	%	TIA por 100 mil Hab.
<b>Según grupo de edad</b>			
Niños (0 - 11 años)	40	18.3	0.58
Adolescentes ( 12 - 17 años )	27	12.4	0.77
Joven (18 - 29 años )	44	20.2	0.66
Adulto (30 - 59 años )	92	42.2	0.80
Adulto mayor (60 + años)	15	6.9	0.46
<b>Total</b>	<b>218</b>	<b>100</b>	<b>0.68</b>
<b>Según género</b>			
Hombres	135	61.9	0.85
Mujeres	83	38.1	0.52

FUENTE: Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE – MINSa


## Anexo 5: Flujograma de Recolección de datos



## Anexo 6: Obtención de extractos etanólico



## ANEXO 7: Exicata de las especies vegetales

 **UNAP**  
Centro de Investigación de  
Recursos Naturales  
Herbarium Amazonense – AMAZ

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

**CONSTANCIA N° 010-2018-AMAZ-UNAP**

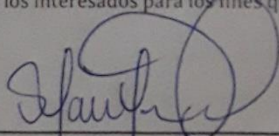
El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de La Universidad Nacional De La Amazonia Peruana


**HACE CONSTAR:**

Que, las muestras botánicas presentadas por **EDER LUIS MACEDO DÍAZ** y **MAYTHE DEL CARMEN GÓMEZ FREITAS**, Bachilleres de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, pertenecen la tesis titulada: "Actividad Leishmanicida *in vitro* de Extractos Etanólicos de 10 Especies Vegetales del Género Piper (PIPERACEAE), de la Región Loreto"; los cuales fueron verificados e identificados en este centro de investigación y enseñanza Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP, como sigue:

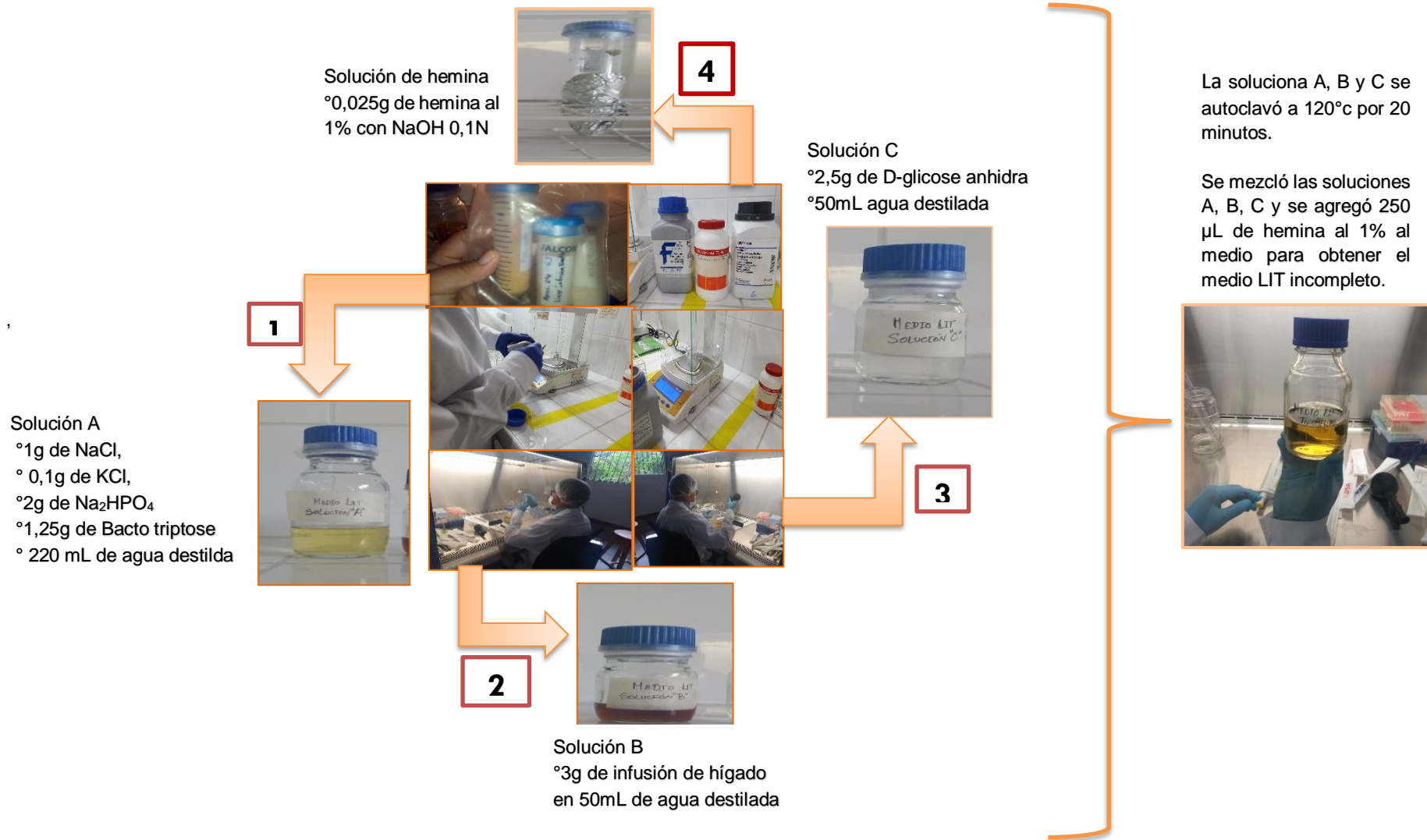
Código AMAZ	Familia	Genero	Nombre Científico
31907	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper acutilimbium</i> C. DC.
0033310	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper brasiliense</i> C. DC.
001777	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper hispidum</i> Sw.
016771	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper lineatum</i> Ruiz & Pav.
65822	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper longeaecuminatum</i> Trel.
14017	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper macrotrichum</i> C. DC.
011114	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper obtusilimbium</i> C. DC.
001197	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper stellipilum</i> (Miq.) C. DC.
10391	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper tenuistylum</i> C. DC.
2736	PIPERACEAE	Piper	<i>Piper tridentipilum</i> C. DC.
004250	BIGNONIACEAE	Jacaranda	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don

Se expide la presente constancia a los interesados para los fines que se estimen conveniente.  
Atentamente,

  
Blgo. Richard J. Huaranca Acostupa M.Sc.  
Coordinador del Herbarium AMAZ  
CIRNA – UNAP



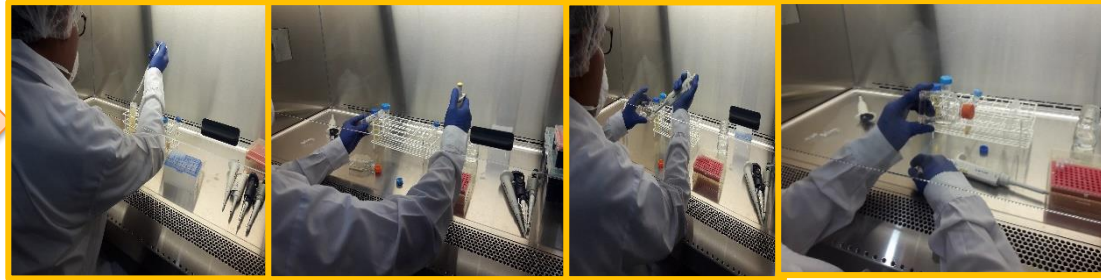
## Anexo 8: Preparación del medio de cultivo LIT



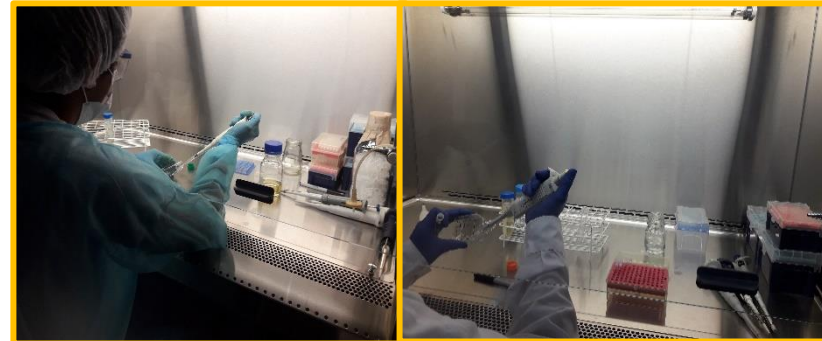
## Anexo 9: Descongelamiento y Adaptación de la cepa BTL300 de *L. braziliensis*



Se colocó en baño maría la cepa criopreservada



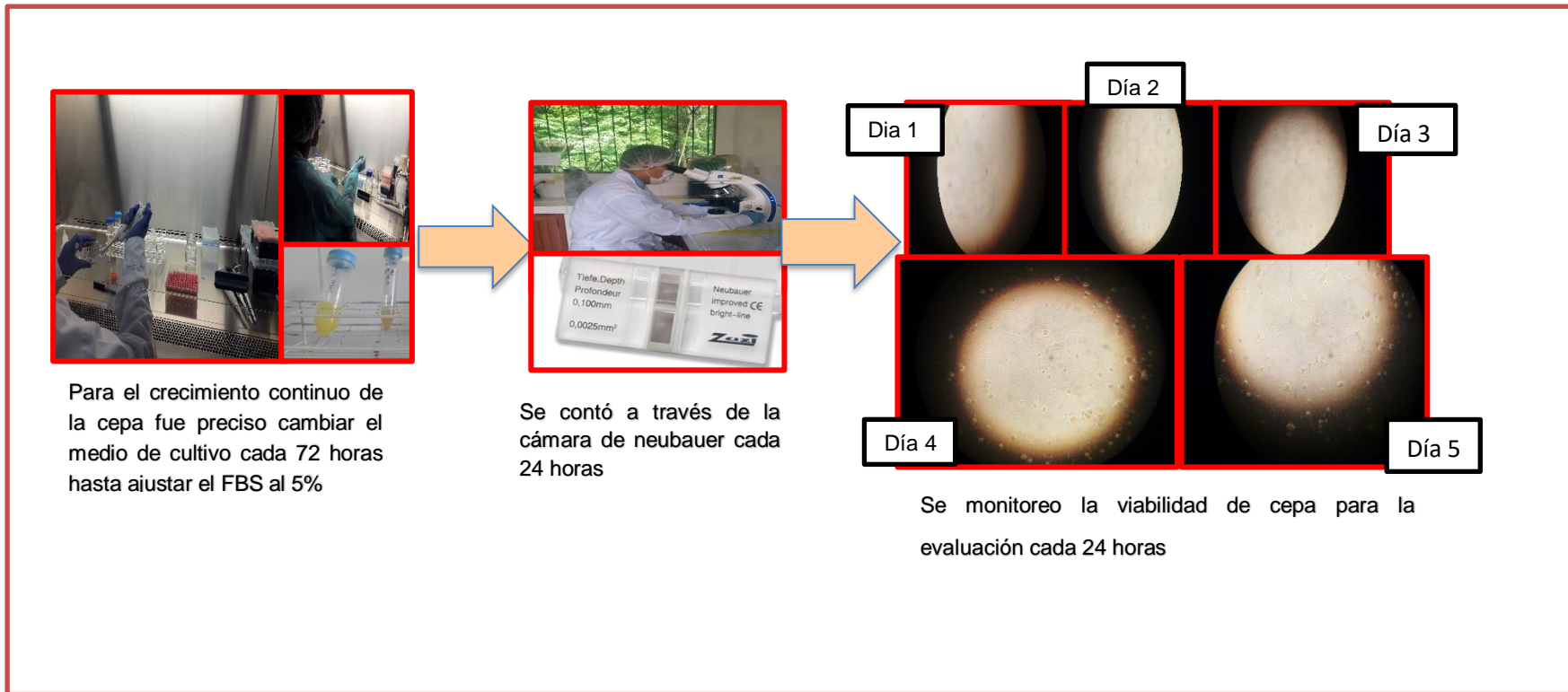
se procedió a transferir todo el contenido del criovial a un frasco de cultivo con 3mL medio LIT con 10% de fbs y 5% de orina, luego se incubó el frasco a 26°C durante tres días.



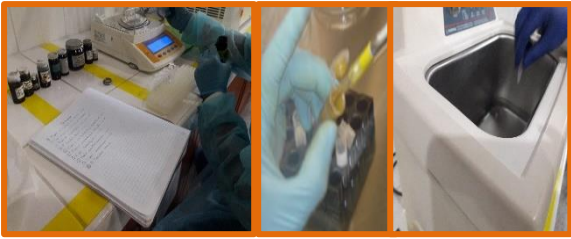
A los 3 días se realizó el repique de la cepa descongelada transfiriendo 100µL del contenido a un frasco de cultivo estéril con 5 mL medio LIT, 5% de FBS y 5% de orina.



## ANEXO 10: Mantenimiento del cultivo *in vitro* de *L. braziliensis*



## Anexo 11: Evaluación de actividad leishmanicida *in vitro*



Se pesó 2mg de cada extracto a evaluar y fueron disueltos en 200 $\mu$ L de DMSO con ayuda del sonificador.

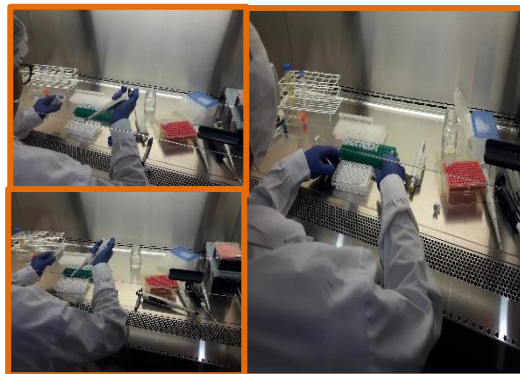


Diluciones de los extractos (100 $\mu$ g/mL, 20 $\mu$ g/ mL y 2 $\mu$ g/ mL) y del estibogluconato



Distribución: se adicionó por triplicado 100 $\mu$ L de la dilución (b) de los extractos y se mezcló con 100 $\mu$ L del mix de manera que cada pozo tuviera un volumen de 200 $\mu$ L.

Se incubó por 24 y 48 horas



## Anexo 12: Configuración de la placa por 96 pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	CN	CN	CN	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1a	2b	2b	2b	3c	PBS
C	PBS	3c	3c	CN	CN	CN	4a	4a	4a	5b	5b	PBS
D	PBS	5b	6c	6c	6c	CN	CN	CN	7a	7 <sup>a</sup>	7a	PBS
E	PBS	8b	8b	8b	9c	9c	9c	CN	CN	CN	10a	PBS
F	PBS	10 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11b	11b	11b	12c	12c	12c	CN	CN	PBS
G	PBS	CN	STG	STG	STG	R	R	R	CN	CN	CN	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

### Donde:

**Extractos:** 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12

**CN:** Medio incompleto.

**STG:** Estibogluconato de sodio

**R:** Ruido (medio completo)

### Anexo 13: Medición de la carga parasitaria por citometría de flujo.



Cada pozo se resuspendió, luego fue llevado a centrifugar a 4000rpm a una T° de 20°C por 3 minutos y se descartó el sobrenadante.



Se agregó 100µL de PI preparado y se incubó por 15 minutos en oscuridad, luego se vuelve a centrifugar a 4000rpm por 3 minutos.



Se lavó con PBS y se transfirió a tubos FACS



Medición de la parasitemia por citometría de flujo

## Anexo 14: Tamizaje Fitoquímico

Extracto  
etanólico

**Patrón etanólico  
(ETOH)**

- Identificación de fenoles y taninos (**FeCl<sub>3</sub>**)
- Identificación de lactonas y cumarinas (**Baljet**)
- Identificación de flavonoides (**Shinoda**)
- Ensayo para aminoácidos y aminas (**Ninhidrina**)
- Ensayo para saponinas y resinas Ensayo de cumarinas fijas y catequinas

**Patrón  
Clorofórmico  
(CHCL<sub>3</sub>)**

- Identificación de triterpenos y esteroides (Liebermann-Buchard)
- Identificación de quinonas (Borntrager)

**Patrón Ácida  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
[0.5N]**

- Ensayo directo para alcaloides:  
Reactivo de Dragendorff

