



Actividad inhibitoria *in vitro* de extractos etanólicos de plantas del género *Annona* y *Piper* sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*

Cesar M. Fuertes¹, Gustavo A. Ruiz Pacco¹, Ronald Quiñonez Dextre¹, Carlos A. Yauri Cruz¹

Información del artículo

Hist

Recibido: 01/11/18
Aprobado: 29/11/18

Autor correspondal

Cesar M. Fuertes

Financiamiento

Autofinanciado

Con os de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Citar como

Fuertes CM, Ruiz Pacco GA, Quiñonez Dextre R, Yauri Cruz CA. Actividad inhibitoria *in vitro* de extractos etanólicos de plantas del género *Annona* y *Piper* sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Rev Peru Med Integrativa.2018;3(3):112-7

Resumen

Objetivo. Evaluar el efecto de extractos etanólicos de cinco especies del género *Annona* y cinco especies del género *Piper* frente a la línea clonal de referencia de promastigotes de *Leishmania braziliensis*. **Materiales y métodos.** Se evaluó el efecto de los extractos etanólicos de *Annona hypoglauca*, *Annona montana*, *mucosa*, *Annona nitida*, *Annona squamosa*, *Piper acutifolium*, *Piper aduncum*, *Piper callosum*, *Piper carpunya* y *Piper peltatum*; sobre cepas de promastigotes de *Leishmania braziliensis* MHON/BR/79/M2904. El efecto leishmanicida *in vitro* se evaluó mediante el cálculo del IC₅₀ por el método probit. **Resultados.** Las especies con mayor actividad fueron *P. acutifolium* (IC₅₀=19,40 µg/mL) *P. peltatum* (IC₅₀=26,6 µg/mL), *P. callosum* (IC₅₀=21,7 µg/mL), *A. mucosa* (IC₅₀=30,5 µg/mL) y *A. montana* (IC₅₀=16,4 µg/mL). **Conclusión.** Los extractos etanólicos de *P. acutifolium*, *P. peltatum*, *P. callosum*, *A. mucosa* y *A. montana*, han mostrado una actividad leishmanicida *in vitro*. Sin embargo, estos efectos no son superiores a los exhibidos por Anfotericina B.

Palabras clave: *Leishmania/microbiología; Leishmania braziliensis; Annona; Piper; Extractos vegetales (Fuente: DeCS).*

In vitro inhibitory activity of ethanolic extracts from *Annona* and *Piper* species on *Leishmania braziliensis* promastigotes

Abstract

Objective. To evaluate the effect of ethanolic extracts of five species of genus *Annona* and five species of genus *Piper* against a clonal line of reference of *Leishmania braziliensis* promastigotes. **Materials and methods.** The ethanolic extracts of *Annona hypoglauca*, *Annona montana*, *mucosa*, *Annona nitida*, *Annona squamosa*, *Piper acutifolium*, *Piper aduncum*, *Piper callosum*, *Piper carpunya* and *Piper peltatum* were evaluated against strains of *Leishmania braziliensis* promastigotes (MHON/BR/79/M2904). The *in vitro* leishmanicidal effect was evaluated through the IC₅₀, which was calculated by the probit method. **Results.** The species with the highest activity were *P. acutifolium* (IC₅₀=19,40 µg/mL) *P. peltatum* (IC₅₀=26,6 µg/mL), *P. callosum* (IC₅₀=21,7 µg/mL), *A. mucosa* (IC₅₀=30,5 µg/mL) and *A. montana* (IC₅₀=16,4 µg/mL). **Conclusion.** The ethanolic extracts of *P. acutifolium*, *P. peltatum*, *P. callosum*, *A. mucosa* and *A. montana*, had shown some *in vitro* leishmanicidal activity. However, these effects are not superior to those exhibited by Amphotericin B.

Keywords: *Leishmania/microbiology; Leishmania braziliensis; Annona; Piper; Plant Extracts (Source: MeSH).*

¹ Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad crónica metaxénica de baja patogenicidad y de alta morbilidad, cuyas presentaciones clínicas (asintomática, cutánea, mucocutánea o diseminada) pueden variar de acuerdo a los vectores que la transmiten y la respuesta inmune del huésped ⁽¹⁾. Esta enfermedad se puede encontrar en casi todo el mundo; sin embargo, más del 90% de los casos ocurren en Brasil, Perú, Siria, Afganistán, Irán y Arabia Saudita ⁽²⁾. En nuestro país, la incidencia de leishmaniasis ha permanecido entre 3,5 y 4,3 por cada 100 mil habitantes, en el periodo comprendido entre los años 2013 y 2017 ⁽³⁾.

Esta enfermedad es producida por protozoarios del género *Leishmania* de la familia Trypanosomatidae; cuyos vectores son mosquitos dípteros que pertenecen a los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* ⁽⁴⁾. Según el ciclo biológico del agente etiológico, el parásito se presenta bajo dos formas, amastigote y promastigote; el primero es la forma inmóvil, carente de flagelo, mientras que el segundo es de mayor tamaño, con presencia de un flagelo y listo para infectar a otro hospedero ⁽⁵⁾.

El conocimiento del ciclo biológico de este protozoario es de fundamental importancia para el desarrollo de alternativas terapéuticas. En este caso, estas alternativas se reducen al uso de fármacos, principalmente el antimonio pentavalente y la anfotericina B ^(6,7). Sin embargo, la elección de una terapéutica medicamentosa, implica la aparición de otros factores como la especificidad de la especie infectante, los patrones de resistencia y la disponibilidad local de estas alternativas, los que se pueden convertir en determinantes de fracaso terapéutico ⁽⁸⁾.

Bajo estas circunstancias, el uso de la medicina tradicional y de plantas medicinales utilizadas por generaciones en las zonas endémicas, se ha convertido en una opción a explorar por medio de la investigación científica ^(9,10). Las especies del género *Annona*, entre ellas *Annona muricata* han sido probadas en cuanto a su actividad contra protozoarios, cuyos resultados varían según el tipo de solvente utilizado para la preparación del extracto ^(11,12). Por otro lado, las especies endémicas de Perú como *Piper acutifolium* y *Piper aduncum*, han demostrado resultados interesantes basados en su uso tradicional, así como, en estudios realizados en modelos experimentales preclínicos ^(13,14).

Basados en esto, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de extractos etanólicos de cinco especies del género *Annona* y cinco especies del género *Piper* frente a la línea clonal de referencia de promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Materiales y métodos

Especie Vegetal

El material vegetal para el estudio se recolectó en las zonas locales de la provincia de Maynas de la región Loreto, y estuvo constituido por diez especies: *Annona hypoglauca*, *Annona montana*, *mucosa*, *Annona nitida*, *Annona squamosa*, *Piper acutifolium*, *Piper aduncum*, *Piper callosum*, *Piper carpunya* y *Piper peltatum*. Estas especies fueron caracterizadas botánica y taxonómicamente en el Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Preparación de los extractos

Se colectó alrededor de 2 kg de cada especie, las hojas seleccionadas fueron desecadas a 40 °C en una estufa con aire circulante. Las hojas secas se redujeron a polvo en un molino de cuchillas y almacenados en frascos de color ámbar con tapa y depositadas en lugar fresco.

Las muestras fueron sometidas a maceración en alcohol etílico de 90% de la cual se tomó 20 g de cada especie. El solvente fue concentrado en un evaporador rotatorio, el residuo desecado a 39 °C y guardados en el desecador.

10 mg de cada extracto sirvió para preparar la solución madre disolviendo en dimetil sulfoxido (DMSO) hasta obtener una concentración de 10 mg/mL. A partir de esta solución se obtuvieron concentraciones de 100 µg/mL, 10 µg/mL y 1 µg/mL con el medio de cultivo M199 10% SFB. Las concentraciones finales de DMSO en cada muestra no fueron mayores al 1%.

Con el peso de las hojas molidas y el peso obtenido en el extracto seco, se procedió a calcular el porcentaje de rendimiento de cada extracto etanólico.

Cultivo del parásito

Se utilizó una cepa referida por la Organización Mundial de la Salud, *Leishmania (v) braziliensis* MHON/BR/79/M2904. Esta cepa se criopreservó por medio del uso de un tanque de nitrógeno líquido y se mantuvo en un medio bifásico, compuesto por una fase sólida de agar sangre de conejo y una fase líquida de medio M119. El buen crecimiento del parásito se determinó a través de la observación en un microscopio invertido.

Realizada esta parte, se procedió a replicar la cepa en un medio monofásico con medio líquido M199 (al 10% de suero fetal de bovino y 1% de L-glutamina). Dependiendo del crecimiento de los parásitos se realizó una dilución en PBS 0.01 M (o medio de cultivo) de ¼ o 1/10.

Esta investigación se realizó con autorización del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM, bajo los lineamientos éticos y normatividad nacional vigente.

Ensayo in vitro

Se utilizaron placas de cultivo de 96 pozos (well), con un volumen final de 100 μ L. La concentración de parásitos fue de 1×10^5 parásitos totales contenidos en 50 μ L (2×10^6 parásitos/mL).

Se agregó 50 μ L del fármaco de referencia (anfoterecina B) a diferentes concentraciones; de forma similar, se realizó la evaluación de cada extracto de estudio. La evaluación de cada concentración fue realizada por triplicado. En el caso del fármaco de referencia, se utilizó una solución *stock* de 1Mm (Sigma A-2 411), en la cual se pesó 0,92 mg hasta hacer un volumen total de 1 mL en DMSO. Luego de disolver con agitación, se esterilizó por filtración (filtros de 0,22 μ m de diámetro de poro) y se trasladaron 30 μ L en tubos de microcentrífuga de 500 μ L estériles protegidos de la luz. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El crecimiento de los parásitos se pudo observar en un microscopio invertido. El contenido se trasladó a tubos de 15 mL y se centrifugó a 2800 rpm por 10 min. Luego se procedió a lavar el pellet formado, dos veces con 10 mL de PBS 0,01 M también haciendo uso de la centrifugación. El precipitado se suspendió en 5 mL del medio M199/10% SFB; una alícuota de 50 μ L se pasó a un tubo de microcentrífuga. Para determinar la cantidad de parásitos por mL se tomaron 10 μ L de lo aislado y se contó en una cámara de Neubauer.

Prueba de viabilidad con bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Se utilizó una solución *stock* de MMT 5 mg/mL (Sigma M2/28). Se pesó 100 mg, con un volumen de 10 mL, utilizando como diluyente una solución salina con tampón

de fosfatos (PBS) 0,01 M. Esta solución se disolvió con agitación por 2 h a temperatura ambiente, se mantuvo protegido de la luz y se esterilizó por filtración.

Otro insumo utilizado fue la solución *stock* de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (pH 5,4), que fue elaborada con 10 g de SDS y 100 mL de isopropanol al 50% (50 mL de agua tridestilada y 50 mL de isopropanol) agitando hasta disolución. Se ajustó el pH a 5,4 con HCl o NaOH en soluciones diluidas.

Finalmente, la prueba de viabilidad con MTT se resume de la siguiente manera: se adecuó 20 μ L de MTT sobre cada pozo de reacción, se incubó las placas de cultivo por 3 h y 30 min a la temperatura ambiente, se retiró la placa de cultivo de la incubadora y se homogenizó durante 30 min, se agregó 100 μ L de una solución al 50% de isopropanol-10% de SDS, y se homogenizó durante 30 min. Se procedió a calcular los porcentajes de inhibición a diferentes concentraciones y la actividad antileishmania se expresó mediante el IC_{50} calculado por el método probit.

En cuanto a los equipos, se utilizó una cámara de flujo laminar Dauerhaft modelo BBS-DOC y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro de placas a 570 nm (Lector de Elisa Sinnowa modelo ER 500).

Análisis estadístico

Se expresaron frecuencias absolutas y relativas (porcentajes), los cuales fueron calculadas por medio del uso de Microsoft Excel 2016®. Los resultados se expresaron con la ayuda de tablas.

Resultados

Se obtuvo diferentes porcentajes de rendimiento, siendo los extractos etanólicos de *Annona nitida*, con un porcentaje de 4,48%, y *Piper acutifolium*, con un porcentaje de 3,23% los de mayor rendimiento en cada especie (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de los extractos etanólicos de las especies Annona y Piper

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

Tabla 2. Resultados obtenidos de la actividad leishmanicida mediante el modelo estadístico Probit de las especies de *Annona*

Extractos Etanólicos	Porcentaje de Inhibición a las concentraciones			(Probit) $\mu\text{g/mL}$
	100 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	IC ₅₀
<i>Hypoglauca</i>	18,4	-3,7	-5,7	994,5
<i>Mucosa</i>	95,1	1,6	-10,2	30,5
<i>Montana</i>	98,8	23,1	-8,7	16,4
<i>Nitida</i>	88,5	-2,4	-13,1	47,8
<i>Squamosa</i>	33,4	-2,2	-7,3	223,5
Anfotericina B	100,4	100,1	4,1	3,5

Con respecto a la actividad leishmanicida, los extractos de especies de *Annona* mostraron este efecto, especialmente en los casos de *A. mucosa* (IC₅₀=30,5 $\mu\text{g/mL}$), *A. nitida* (IC₅₀=47,8 $\mu\text{g/mL}$) y *A. montana* (IC₅₀=16,4 $\mu\text{g/mL}$) (Tabla 2).

Mientras que en las especies de *Piper*, los extractos etanólicos de *P. callosum* (IC₅₀=21,7 $\mu\text{g/mL}$), *P. peltatum* (IC₅₀=27,6 $\mu\text{g/mL}$) y *P. acutifolium* (IC₅₀=19,4 $\mu\text{g/mL}$) ofrecieron una mayor actividad antileishmania (Tabla N°03).

Discusión

La actividad antileishmania contra promastigotes de *L. braziliensis* fue significativa en los extractos etanólicos de *A. mucosa* (IC₅₀=30,5 $\mu\text{g/mL}$), *A. nitida* (IC₅₀=47,8 $\mu\text{g/mL}$) y *A. montana* (IC₅₀=16,4 $\mu\text{g/mL}$); estos extractos presentan flavonoides, alcaloides y otros fenoles de acuerdo al tamizaje fitoquímico realizado en estudios previos^(15,16).

Otras especies de *Annona*, no estudiadas en el presente estudio, como *Annona purpurea*, han mostrado también, en el tamizaje fitoquímico diversos grupos químicos como acetogeninas, alcaloides indólicos, isoquinolínicos, quinonas, monoterpenos y flavonoides⁽¹⁷⁾.

Annona mucosa es una especie vegetal que ya ha demostrado actividad antibacteriana *in vitro*, contra cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus thuringiensis*⁽¹⁸⁾. Por otro lado, los extractos de hojas de *Annona montana*, también han mostrado efectos citotóxicos resaltantes ante líneas celulares como Hep-G2, HT-29, los cuales evidenciaron selectividad ante la presencia de células normales⁽¹⁹⁾.

Otros estudios han mostrado que especies de la familia Annonaceae, han mostrado también efectos leishmanicidas. Por ejemplo, según Hernández y Tenorio, a partir de un extracto alcohólico de *Rollinia rufinervis*, familia *annonaceae*, en la que identifican la presencia de acetogeninas a la que atribuyen la actividad leishmanicida⁽²⁰⁾. Adicionalmente, un estudio desarrollado por Jaramillo y Arango, también corrobora la actividad leishmanicida presentada por acetogeninas presentes en el extracto de acetato de etilo de *Annona muricata*, que presentó una concentración mínima efectiva (MEC) de 0,1 mg/mL siendo más activa que el glucantime utilizado como compuesto de referencia (MEC=4,1 mg/mL)⁽²¹⁾.

El género *Piper* es el más representativo de las Piperaceae y alcanza alrededor de 2000 especies vegetales distribuidas en la región pantropical. Existen muchos informes de diversos compuestos aislados de plantas de este género

Tabla 3. Resultados obtenidos de la actividad leishmanicida mediante el modelo estadístico Probit de las especies de *Piper*

Extractos etanólicos	Porcentaje de Inhibición a las concentraciones			(Probit) $\mu\text{g/mL}$
	100 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	IC ₅₀
<i>Acutifolium</i>	78,3	38,4	10,1	19,4
<i>Callosum</i>	88,4	17,9	2,0	21,7
<i>Carpunya</i>	30,0	8,1	0,9	282,3
<i>Aduncum</i>	13,0	6,0	-0,1	8054,2
<i>Aeltatum</i>	82,5	21,7	-0,1	27,6
Anfotericina B	100,1	100,1	13,0	2,1

(principalmente aceites esenciales) como agentes con actividad antimicrobiana (hongos y bacterias), antiprotozoaria⁽²²⁻²⁴⁾.

Los extractos etanólicos de *P. callosum* (IC₅₀=21,7 µg/mL), *P. peltatum* (IC₅₀=27,6 µg/mL) y *P. acutifolium* (IC₅₀=19,4 µg/mL) ofrecieron una mayor actividad antileishmania. En el caso de *Piper callosum*, un estudio previo ya mostró que esta especie tiene un efecto insecticida ante especies de *Solenopsis saevissima* (Smith) atribuido a la presencia de componentes como safrole, metileugenol, y β-pineno⁽²⁵⁾. En forma similar, los extractos de *Piper peltatum* ya han sido estudiados en sus capacidades antimaláricas tanto *in vivo* como *in vitro* con resultados promisorios y específicos^(26,27). En contraste, los estudios realizados en *Piper acutifolium* han resultado contradictorios; por un lado, Calderón *et al.*, no encontraron actividad biológica al evaluar sus efectos antimaláricos y leishmanicidas⁽¹⁴⁾; por otro lado, derivados del ácido benzoico provenientes de extractos de esta especie vegetal: metil 3,4-dihidroxi-5-(3'-metil-2'-butenil)benzoato exhibieron actividad leishmanicida (IC₅₀ 13,8-18,5 mg/mL), en forma similar a nuestro estudio⁽²⁸⁾.

Ceole *et al.* postulan que estos resultados pueden ser explicados por el empleo de otros solventes, preferentemente poco polares como el acetato de etilo y el cloroformo, que promueven la participación de acetogeninas y alcaloides, metabolitos de baja polaridad, en el efecto biológico mostrado⁽²⁹⁾.

Este estudio preliminar muestra que distintas especies de los generos Piper y Annona pueden mostrar efectos leishmanicidas, que pueden tener importancia biológica; por ende, la investigación más profunda en estos efectos debe ser promovida y realizada en otros modelos (*in vivo*). Así mismo, estudios de toxicidad en modelos animales deben ser realizados para evaluar un rango terapéutico que beneficie a los tratados con una mínima toxicidad.

Finalmente, se concluye que los extractos etanólicos de *P. acutifolium*, *P. peltatum*, *P. callosum*, *A. mucosa* y *A. montana*, han mostrado una actividad leishmanicida *in vitro*. Sin embargo, estos efectos no son superiores a los exhibidos por anfotericina B. Futuros estudios deberán explorar si estos compuestos pueden potenciar los efectos brindados por la terapia usual en casos de leishmaniasis.

Referencias bibliográficas

- McGwire BS, Sato AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM 2014;107(1):7-14.
- Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am 2012;26(2):293-307.
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Casos de Leishmaniasis. Perú 2000-2018. [Internet]. 2018; Available from: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2018/SE05/leishmaniosis.pdf>
- Pace D. Leishmaniasis. J Infect 2014;69 Suppl 1:S10-18.
- Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2016;9(10):925-32.
- World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. [Internet]. Geneva: WHO; 2010. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=470495A0E514A026897230C43FE941B6?sequence=1
- Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). Am J Trop Med Hyg 2017;96(1):24-45.
- Maxfield L, Crane JS. Leishmaniasis [Internet]. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 [citado 2018 dic 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/>
- Ullah N, Nadhman A, Siddiq S, Mehwish S, Islam A, Jafri L, *et al.* Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario. Phytotherapy Research 2016;30(12):1905-25.
- Da Silva BJM, Hage AAP, Silva EO, Rodrigues APD. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. Journal of Integrative Medicine 2018;16(4):211-22.
- Gavamukulya Y, Wamunyokoli F, El-Shemy HA. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. Asian Pac J Trop Med 2017;10(9):835-48.

12. Vila-Nova NS, de Morais SM, Falcão MJC, Alcantara TTN, Ferreira PAT, Cavalcanti ESB, *et al.* Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Exp Parasitol* 2013;133(3):334–8.
13. Céline V, Adriana P, Eric D, Joaquina A, Yannick E, Augusto LF, *et al.* Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2009;123(3):413–22.
14. Calderón ÁI, Romero LI, Ortega-Barría E, Solís PN, Zacchino S, Gimenez A, *et al.* Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology* 2010;48(5):545–53.
15. Barbalho SM, Goulart R de A, Farinazzi-Machado FMV, Souza M da SS de, Bueno PC dos S, Guiguer EL, *et al.* *Annona* sp: Plants with Multiple Applications as Alternative Medicine - A Review. *Current Bioactive Compounds* 2012;8(3):277–86.
16. Quílez AM, Fernández-Arche MA, García-Giménez MD, De la Puerta R. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 2018;225:244–70.
17. Cárdenas DL, Lora JA, Márquez Vizcaíno RL, Blanco PJ. Actividad leishmanicida de *Annona purpurea*. *Actualidades biológicas* 2005;27(1):35–7.
18. De Souza Barbosa T, Fonseca Ferreira A, De Paula R, Albarello N. Antimicrobial activity of *Annona mucosa* (Jacq.) grown in vivo and obtained by in vitro culture. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015;46(3):785–9.
19. Tauchen J, Bortl L, Huml L, Miksatkova P, Duskocil I, Marsik P, *et al.* Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2016;26(6):728–37.
20. Hernández C. JE, Tenorio V. JL, Rojas CM, Vallejo GA. Evaluación de la Actividad Leishmanicida de los Extractos Etanólicos de *Rollinia rufinervis* sobre *Leishmania chagasi*. *Vitae* 2005;12(2):37–43.
21. Jaramillo MC, Arango GJ, González MC, Robledo SM, Velez ID. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia* 2000;71(2):183–6.
22. Almeida CA, Azevedo MMB, Chaves FCM, Roseo de Oliveira M, Rodrigues IA, Bizzo HR, *et al.* Piper Essential Oils Inhibit *Rhizopus oryzae* Growth, Biofilm Formation, and *Rhizopus* pepsin Activity [Internet]. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 2018 [citado 2018 dic 26]; Available from: <https://www.hindawi.com/journals/cjidmm/2018/5295619/>
23. Brambilla LZS, Endo EH, Cortez D a. G, Lima MMS, Filho BPD. Piper regnellii extract biopolymer-based microparticles: production, characterization and antifungal activity. *Journal of Applied Microbiology* 2018;124(1):75–84.
24. Gamboa F, Muñoz C-C, Numpaque G, Sequeda-Castañeda LG, Gutierrez SJ, Tellez N. Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease [Internet]. *International Journal of Microbiology* 2018 [citado 2018 dic 26]; Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2018/4147383/>
25. Souto RNP, Harada AY, Andrade EHA, Maia JGS. Insecticidal Activity of Piper Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol* 2012;41(6):510–7.
26. Velásquez M, Díaz F, Moneriz C. Plantas de la región Caribe Colombiana con potencial actividad antimalárica. *Revista Cubana de Farmacia* [Internet] 2016 [citado 2018 dic 26];50(4). Available from: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/64>
27. Silva LFR e, Nogueira KL, Pinto AC da S, Katzin AM, Sussmann RAC, Muniz MP, *et al.* In Vivo Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of 4-Nerolidylcatechol Derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015;59(6):3271–80.
28. Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, *et al.* Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. *J Nat Prod* 2008;71(9):1538–43.
29. Ceole LF, Cardoso MDG, Soares MJ. Nerolidol, the main constituent of *Piper aduncum* essential oil, has anti-*Leishmania braziliensis* activity. *Parasitology* 2017;144(9):1179–90.