

Efecto leishmanicida del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* (Piperaceae)

Leishmanicidal effect of the butanolic extract of *Peperomia dolabriformis* (Piperaceae)

Deyvi Meléndez Rodríguez

Departamento Académico de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, PERÚ
deyed_bann@hotmail.com // <https://orcid.org/0000-0002-8404-7097>

Willian Blas Cerdán

Departamento Académico de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, PERÚ
wblas@unitru.edu.pe // <https://orcid.org/0000-0001-7581-9297>

José Saldaña Jiménez

Departamento Académico de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, PERÚ
jsaldana@unitru.edu.pe // <https://orcid.org/0000-0001-6111-0869>

Gina Zavaleta Espejo

Departamento Académico de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, PERÚ
gzavaleta@unitru.edu.pe // <https://orcid.org/0000-0001-9087-6767>

Resumen

En la presente investigación se evaluó el efecto leishmanicida del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* (Piperaceae) “congona de zorro” sobre la viabilidad de los promastigotos de *Leishmania peruviana* cepa LC-26. El extracto se obtuvo usando un equipo Soxhlet con solvente butanol diluido al 70% con agua Milli Q. Por cada 100 g de muestra pulverizada se adicionó 1 litro de solvente que luego fue evaporado mediante una cabina extractora de gases. La evaluación del efecto leishmanicida se realizó en un cultivo monofásico con una concentración de 10^6 promastigotos/mL. El control negativo fue buffer fosfato. Los grupos experimentales con el extracto butanólico tuvieron concentraciones de 0,009 mg/mL, 0,09 mg/mL y 0,9 mg/mL, respectivamente y se incubaron a 27 °C, durante 24, 48, 72 y 96 horas. El efecto leishmanicida presentó una eficacia del 100% de mortalidad a la concentración de 0,9 mg/mL.

Palabras clave: Extracto butanólico, leishmanicida, enfermedad transmisible, promastigotos

Abstract

The aim was to evaluate the leishmanicidal effect of the butanolic extract of *Peperomia dolabriformis* (Piperaceae) on the viability of the *Leishmania peruviana* promastigotes strain LC-26. The extract was obtained using Soxhlet equipment with 70% diluted butanol solvent with Milli Q water. For each 100 g of pulverized sample was added 1 liter of solvent which was then evaporated in a gas extractor. The leishmanicidal effect was carried out in a single-phase culture at a concentration of 10^6 promastigotes/mL of *L. peruviana*. The negative control was phosphate buffer. The experimental groups of the butanolic extract of *P. dolabriformis* at concentrations of 0.009 mg/mL, 0.09 mg/mL and 0.9 mg/mL, respectively, were incubated at 27 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. The leishmanicidal effect showed efficacy of 100% mortality at a concentration of 0.9 mg/mL.

Keywords: Butanolic extract, leishmanicidal, communicable disease, promastigotes

Citación: Meléndez, D.; W. Blas; J. Saldaña & G. Zavaleta. 2022. Efecto leishmanicida del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* (Piperaceae).

Arnaldoa 29(1): 205-216 doi: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.291.29113>

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa provocada por *Leishmania* sp., un protozoo intracelular del tejido fagocítico mononuclear, que afecta a la piel y las mucosas (Bassler *et al.*, 2019; Bogdan & Röllinghoff, 1998). La infección se inicia por la picadura de insectos del género *Phlebotomus* o *Lutzomyia*, cuyos hospederos son mamíferos como perros, roedores, otros animales salvajes y el hombre (Vaselec 2021; Geroldinger *et al.*, 2019).

En el Perú, la leishmaniasis es la segunda enfermedad endémica de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad

por enfermedades transmisibles luego de la tuberculosis y malaria (Ampuero, 2000). Se presenta en dos formas clínico-epidemiológicas; la uta y la espundia, la uta es de naturaleza benigna y es endémica en ciertas zonas de la vertiente occidental del Pacífico entre 1200 hasta los 3000 metros de altitud sobre el nivel del mar; la espundia, por el contrario, es una forma más severa y es propia de los valles orientales de la selva baja y toda la llanura amazónica (Cubas *et al.*, 2019).

Los fármacos para el tratamiento de leishmaniasis se basan en el antimonio pentavalente en la forma de estibogluconato de sodio “Pentostam” o antimonio de meglumina “Glucantime”, lo que a

menudo produce efectos tóxicos (Costing *et al.*, 2020). En consecuencia, los habitantes con leishmaniasis alivian los síntomas con tratamientos populares, como ingerir y aplicar cataplasmas de extractos crudos de plantas, tanto para la forma sistémica de la enfermedad, como para el tratamiento de las infecciones de la piel (Passero *et al.*, 2021; Odonne *et al.*, 2009).

La evaluación científica de las plantas medicinales, se fundamenta en las costumbres populares que han proporcionado un valioso aporte a la medicina moderna, y en consecuencia al tratamiento de enfermedades causadas por parásitos protozoarios (Houël *et al.*, 2022; Panda y Luyten, 2018) se han evaluado algunos metabolitos para demostrar la actividad sobre protozoos; tales como naftoquinonas, alcaloides, acetogeninas, iridoides, glicósidos, quinoides y flavonoides (Hilaire *et al.*, 2022; Quílez *et al.*, 2018).

La familia Piperaceae presenta tres géneros y 830 especies principalmente hierbas y arbustos, siendo muchas de ellas son nativas del Perú (León, 2006). El género *Peperomia* presenta cuatro especies (*dolabriformis*, *velutina*, *confertifolia* y *brachyphylla*). *Peperomia dolabriformis* fue descrita por primera vez en Huancabamba y está distribuida en los departamentos de La Libertad, Cajamarca, Lambayeque y Amazonas entre los 200 a 2000 m.s.n.m., se encuentran sobre rocas y en grietas de las mismas, así como en los bosques caducifolios donde comparte su hábitat con cactáceas (Pino, 2006). A ella se le atribuye propiedades cicatrizantes, antidepresivas, antiespasmódicas, etc. (Bussmann *et al.*, 2011). El género *Peperomia* ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones que describen propiedades para el control de la leishmaniasis y otras enfermedades

(Martinez *et al.*, 2019); se ha reportado el efecto leishmanicida *in vitro* del difenol llamado piperogalin, grifolín o ácido grifólico (Fournet *et al.*, 1996).

Con la finalidad de mejorar la calidad de vida de las personas, en relación al tratamiento de las enfermedades antes mencionadas, la presente investigación evaluó el efecto leishmanicida del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* “Congona de zorro” a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de los promastigotos de *Leishmania peruviana* cepa LC-26.

Materiales y métodos

Material biológico

Peperomia dolabriformis “Congona de zorro” de la ACP (Área de Conservación Privada Lomas del Cerro Campana) Trujillo-Perú y *Leishmania peruviana* cepa LC-26 proporcionada por el Laboratorio de Protozoología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Recolección y secado de la muestra

Las plantas enteras con inflorescencias de *P. dolabriformis* fueron recolectadas de las lomas costeras del cerro Campana, a una altitud entre los 200 a 400 m.s.n.m. del distrito de Huanchaco, provincia de Trujillo, región de La Libertad, Perú (Fig. 1) y fueron identificadas en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo con el código N° 58474. Luego se procedió a lavar la superficie de las flores, hojas, raíces y tallos con agua para eliminar partículas contaminantes y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas. El secado se realizó en una estufa a 50 °C por 14 días.

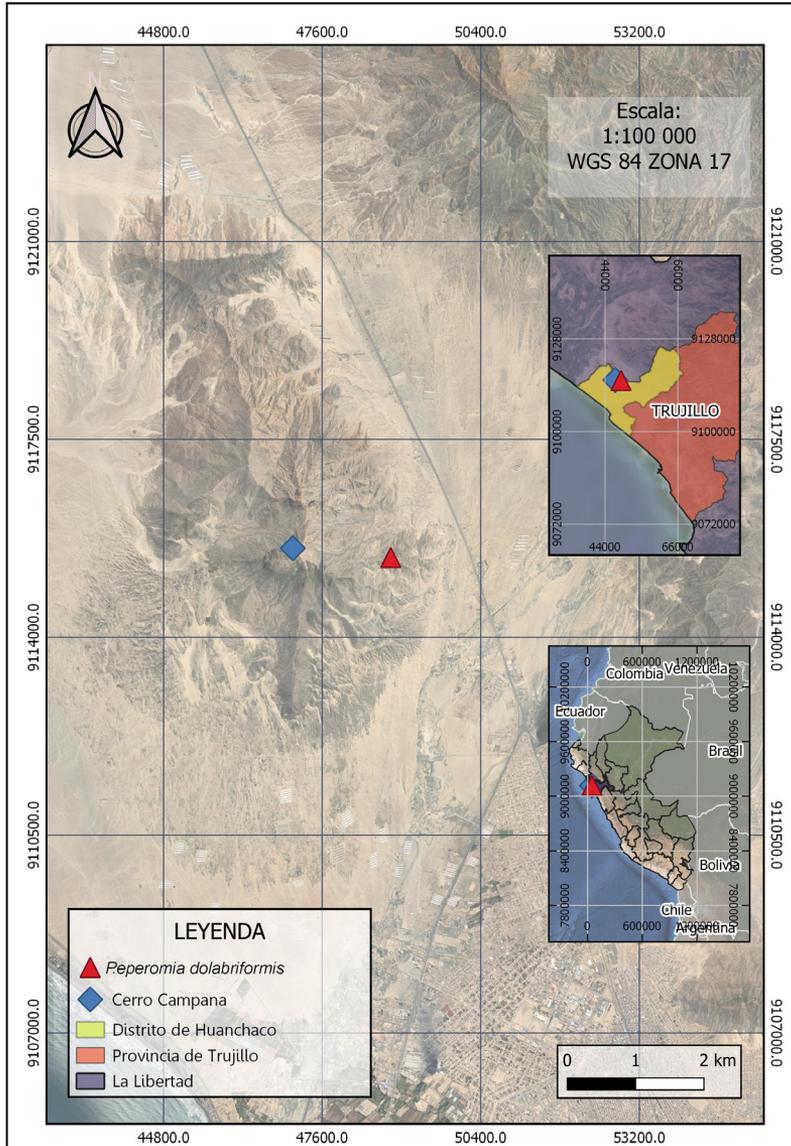


Fig. 1. Mapa indicando el sitio de colección de la especie *Peperomia dolabriformis* L. (Piperaceae)

Preparación del extracto butanólico de *P. dolabriformis*

Para la preparación del extracto butanólico se pulverizó la planta entera en un molino hasta obtener un polvo fino. La extracción se obtuvo con el equipo Soxhlet con el solvente butanol diluido al 70% con agua Milli Q. Por cada 100 g de muestra

pulverizada se colocó 1 litro de solvente (alcohol butanol al 70%) (Immanuel *et al.*, 2004). Se filtró en un sistema al vacío con un kitasato y embudo de Büchner, con un filtro de poro de 0,45 μ m. El disolvente se evaporó en una cabina extractora de gases y se conservó a 4 °C en una placa Petri.

Preparación del medio de cultivo bifásico para obtener promastigotos de *L. peruviana* cepa LC-26

La cepa de *Leishmania peruviana* LC-26 se replicó *in vitro* en 2 tubos de ensayo de 10 mL con tapa; se usó el medio bifásico compuesto por agar base enriquecido, más 10 % de sangre desfibrinada. Para ello, se pesó 4,0 g de agar sangre y se diluyó con 100 mL de agua Milli Q, luego se agregó 10 mL de sangre desfibrinada estéril sin anticoagulante, se homogenizó y se colocó 3,0 mL del agar sangre en el tubo de ensayo estéril y se dejó coagular. Luego, se realizó la suspensión celular utilizando 1000 µL de solución salina fisiológica al 0,9 %. Finalmente, se sembró 200 µL de la suspensión de promastigotos de *L. peruviana* en tubos de ensayo (Eperoni & McMahon-Pratt, 1989).

Preparación del medio monofásico para la exposición a los tratamientos

Para la exposición a los tratamientos se replicó la cepa obtenida del medio bifásico en un medio monofásico líquido; se usó 10 mL de MEM (minimum essential media) de la marca Gibco®, suplementado con suero bovino fetal al 10% en frascos de cultivo celular de 25 cm². Estos fueron cultivados por 10 días a 27 °C hasta obtener una concentración celular de 10⁶ células (Childs *et al.*, 1978).

Diseño experimental para el ensayo leishmanicida

Se usó un diseño experimental en bloques completamente al azar. Se trabajó con el extracto butanólico de *P. dolabriformis* a concentraciones de 0,009 mg/mL, 0,09 mg/mL y 0,9 mg/mL, a partir de una solución madre de 100 mg/mL y buffer fosfato 1X como control negativo. Cada concentración representó un tratamiento y

cada tratamiento se realizó por triplicado con 10 mL de cultivo de MEM con un total de 12 unidades experimentales mantenidas en una estufa a 27 °C (Bussmann *et al.*, 2011). Posteriormente, se contabilizó el número de promastigotos vivos a las 24, 48, 72 y 96 horas constituyendo los bloques.

Toma de datos

Se procedió a contar en la cámara de Neubauer las células vivas dentro de cada tratamiento a las 24, 48, 72 y 96 horas. Para hallar el número de células vivas por cada tratamiento se usó la siguiente fórmula:

$$N.^{\circ} \text{ de individuos/mL} = N \cdot 10000 / 4 \cdot D$$

(Alzamora *et al.*, 2007)

Donde:

- N: Número de células vivas
- 4: Número de cuadrantes contados
- D: Factor de dilución.

Para evaluar el porcentaje de mortalidad del extracto butanólico de *P. dolabriformis* se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad} = [100 - (L2/L1) \times 100]$$

(Alzamora *et al.*, 2007)

Donde:

- L2 = Número de células viables después del tratamiento con el extracto
- L1 = Número de células viables en el cultivo control (PBS)

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se aplicó el análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre los tratamientos según los bloques y la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p \leq 0,05$) (Steel & Torrie, 1996); se utilizó el programa estadístico SPSS versión 22.

Resultados y discusión

Al evaluar el efecto leishmanicida del extracto butanólico de *Peperomia dolabriformis* de los promastigotos de *Leishmania peruviana* cepa LC-26, se observa que en el control negativo con buffer PBS (Fig. 2A) hay un crecimiento exponencial de la cepa con formaciones tipo roseta, lo que evidencia una elevada actividad reproductiva. En las concentraciones de 0,009 mg/mL (Fig. 2B) a las 24 horas se observaron formaciones tipo roseta

en menor cantidad y también células individuales, con la concentración de 0,09 mg/mL (Fig. 2C) evaluadas a las 24 horas se observaron promastigotos reunidos flotando en el medio de cultivo inmóviles y con la concentración de 0,9 mg/mL (Fig. 1D) se observaron promastigotos flotando en el medio de cultivo desde las 24 horas de exposición del extracto butanólico, lo que evidencia la muerte total de los promastigotos en el recuento con la cámara de Neubauer.

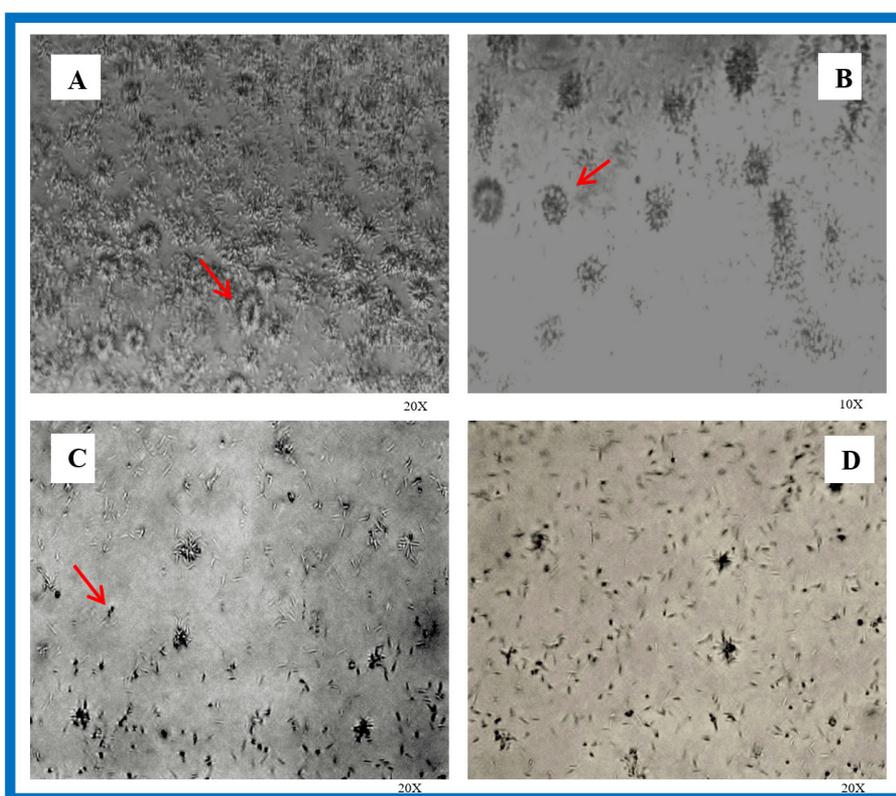


Fig. 2. Efecto de las diferentes concentraciones del extracto butanólico de *P. dolabriformis* sobre la viabilidad de *L. peruviana* cepa LC-26 a diferentes tiempos de exposición; A. *L. peruviana* expuesta al control (negativo) con buffer fosfato crecimiento exponencial con presencia de rosetas a las 24 horas; B. Tratamiento a la concentración de 0,009 mg/mL presencia de rosetas con menor número de promastigotos a las 24 horas; C. Tratamiento a la concentración de 0,09 mg/mL presencia de células individualizadas inmóviles a las 24 horas; D. Tratamiento a la concentración de 0,9 mg/mL a las 24 horas reducción total de rosetas y disminución de promastigotos.

En la Tabla 1, se muestran los promedios de los promastigotos vivos de *L. peruviana* cepa LC-26 expuestos a diferentes concentraciones T1: Control negativo con buffer fosfato (PBS); T2: 0,009 mg de extracto butanólico de *P. dolabriformis* /mL; T3: 0,09 mg/mL; T4: 0,9 mg /mL y tiempos de exposición BI: 24 horas; BII: 48 horas; BIII: 72 horas y BIV: 96 horas evidenciándose una disminución de los promastigotos vivos con respecto

al incremento de las concentraciones del extracto butanólico de *P. dolabriformis* ; así mismo los promedios de los promastigotos vivos fue disminuyendo a medida que aumentaba el tiempo de exposición al extracto butanólico, obteniendo el menor número de promastigotos vivos (77 083) a la concentración de 0,09 mg/mL, a la concentración 0,9 mg/mL ya no se observó la presencia de especímenes vivos.

Tabla 1. Promedios de promastigotos vivos de *Leishmania peruviana* cepa LC-26 expuestos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición al extracto butanólico de *P. dolabriformis*

Bloques	T1* (Buffer fosfato)	Tratamientos T2* (0,009 mg/mL)	T3* (0,09 mg/mL)	T4* (0,9 mg/mL)
BI (24 horas)	2693 333	1285 000	120 000	0
BII (48 horas)	2836 666	1033 333	73 333	0
BIII (72 horas)	2016 666	845 000	70 000	0
BIV (96 horas)	1466 666	435 000	45 000	0
Promedio	2253 333	899 583	77 083	0

$p < 0,05$

En la Tabla 2, se aprecia el efecto leishmanicida del extracto butanólico de *P. dolabriformis* a diferentes concentraciones T1: Control negativo con buffer fosfato (PBS); T2: 0,009 mg de extracto butanólico de *P. dolabriformis* /mL; T3: 0,09 mg/mL; T4: 0,9 mg/mL y tiempos de exposición

BI: 24 horas; BII: 48 horas; BIII: 72 horas y BIV: 96 horas evidenciándose una eficacia del 100 % de mortalidad a la máxima concentración (T4: 0,9 mg/mL). En cuanto al control negativo T1, el porcentaje de mortalidad fue de 0 %.

Tabla 2. Promedios porcentuales de mortalidad de promastigotos de *Leishmania peruviana* cepa LC-26 expuestos a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición al extracto butanólico de *P. dolabriformis*

Bloques	Tratamientos			
	T1* (Buffer fosfato)	T2* (0,009 mg/mL)	T3* (0,09 mg/mL)	T4* (0,9 mg/mL)
BI (24 horas)	0	51,68	95,62	100
BII (48 horas)	0	63,85	97,39	100
BIII (72 horas)	0	57,79	96,53	100
BIV (96 horas)	0	69,96	97,10	100
Promedio	0	60,75	96,66	100

$p < 0,05$

Los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones y tiempos de exposición al extracto butanólico de *P. dolabriformis* (Tabla 1) muestran que a medida que aumenta la concentración y el tiempo de exposición (T1: control negativo; T2: 0,009 mg/mL; T3: 0,09 mg/mL y T4: 0,9 mg/mL), la viabilidad disminuye, lo que evidencia el efecto leishmanicida del extracto butanólico de *P. dolabriformis*.

Con respecto al control negativo el número de promastigotos vivos a las 72 y 96 horas se apreció una disminución de estos, pero se mantuvo a la concentración de 10^6 células resultados similares con los de (Steiger & Steiger (1977); Siripattanapipong *et al.*, 2019) quienes reportaron la disminución de los promastigotos vivos debido al agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo. En los tratamientos T2 y T3 a las 72 y 96 horas, el efecto leishmanicida se incrementó por el efecto aditivo del agotamiento de nutrientes en el medio (Tabla 1).

Existen estudios que muestran que las Piperaceae contienen fitoconstituyentes y metabolitos secundarios con efecto antibacteriano, antifúngico, antiviral y antiparasitario, específicamente contra *Trypanosoma* y *Leishmania* (Ferreira *et al.*, 2014; Scodro *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2015; Donfack *et al.*, 2021). *P. dolabriformis* contiene sustancias como metabolitos fenólicos, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, resinas, catequinas, triterpenos, esteroides, aceites esenciales y saponinas (Roncal & Saldaña, 2014). Es posible que el conjunto de estos o por lo menos uno de ellos ejerza el efecto leishmanicida. Los estudios de Vega *et al.* (2021) reportaron que los aceites esenciales del género Piper tienen acción antiparasitaria en *Leishmania braziliensis* y *Trypanosoma cruzi*.

Los diferentes tratamientos indican una relación directamente proporcional entre el incremento de la concentración del extracto butanólico de *P. dolabriformis* y el porcentaje de mortalidad (T1: control negativo; T2: 0,009 mg/mL; T3: 0,09 mg/mL y T4: 0,9

mg/mL) obteniéndose 0; 60,75; 96,66 y 100 % de mortalidad, respectivamente (Tabla 2). Estos resultados coinciden con el trabajo en *P. galioides* H.B.K oriunda del Perú y ampliamente estudiada por sus propiedades fitomedicinales; mostrando propiedades leishmanicida con el aumento de la concentración en los diferentes extractos (EtOAc, éter de petróleo, EtOH) (Mahiou *et al.*, 1996; Mahiou *et al.*, 1995).

Es importante mencionar que el efecto leishmanicida de los extractos vegetales dependerá del tipo de extracción que se utilice, ya sea con éter de petróleo, metanol, 1-butanol, etanol, etc. Estos compuestos químicos se usan como disolventes debido a su polaridad, por lo tanto, los fitoconstituyentes extraídos variarán en concentración y calidad; así lo demostraron Mahiou *et al.* (1996), quienes usaron diversos tipos de solventes en la extracción de metabolitos de la especie *P. galioides* y encontraron diferencias en la acción leishmanicida con una concentración de 100 µg/mL.

El efecto leishmanicida del extracto butanólico de *P. dolabriformis* probablemente se debería a la presencia de fenoles, como lo demostraron Oliveira *et al.* (2012), quienes aislaron el alquenilfenol gibbilimbol B de *Piper malacophyllum* y mostraron que altera la permeabilidad de la membrana plasmática de *Leishmania*, lo cual conduce a la fuga de iones y consecuentemente a la muerte celular.

Se ha reportado que los flavonoides pueden tener una fuerte actividad antiproliferativa contra la *Leishmania* porque inhiben las enzimas de la biosíntesis de poliaminas, lo que detiene el crecimiento celular; esto los convierte en fármacos potenciales para el tratamiento de todas las formas de leishmaniasis (Araujo *et al.*, 2019).

Se ha reportado la actividad leishmanicida de los flavonoides por la interacción con el cofactor Mn²⁺ y el sustrato L-arginina, lo que inhibe la enzima arginasa de *L. amazonensis*; la arginasa es la enzima diana de la síntesis de poliaminas en *Leishmania*, por lo tanto, al no producirse las poliaminas se detiene el ciclo celular (Singh *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2012).

Es probable que los flavonoides totales, así como las catequinas de *P. dolabriformis* impidan las señales de la transcripción y traducción de *Leishmania* e inhiban el crecimiento celular in vitro (Vannier-Santos *et al.*, 2008).

Los resultados encontrados del efecto leishmanicida de *P. dolabriformis* de las lomas del cerro Campana en la región La Libertad constituyen una nueva alternativa para la elaboración de nuevos fármacos en base a los principios activos de esta planta, por lo tanto, se debe continuar con las investigaciones fitoquímicas, evaluaciones in vivo y a futuro se convierta en una nueva opción para el tratamiento de la leishmaniasis.

Conclusiones

El extracto butanólico de *P. dolabriformis* tiene efecto leishmanicida sobre los promastigotos de *L. peruviana cepa* LC-26.

Existe una relación positiva entre las concentraciones del extracto butanólico de *P. dolabriformis* y el efecto leishmanicida sobre los promastigotos de *L. peruviana cepa* LC-26.

El extracto butanólico de *P. dolabriformis* a la concentración de 0,9 mg/mL ocasionó el 100% de mortalidad a los diferentes tiempos de exposición ensayadas.

Agradecimientos

Al Dr. Franklin Vargas Vásquez por donación de cepa de *Leishmania peruviana* LC-26 y asesoramiento en el mantenimiento y cultivo de la cepa.

Así mismo a la Universidad Nacional de Trujillo por brindar las facilidades de uso de infraestructura y equipamiento para el desarrollo de la presente investigación.

Contribución de autores

D. M., W. B.: Concepción, diseño del trabajo de investigación, recolección de datos; D. M., J. S., G. Z.: Análisis e interpretación de los resultados obtenidos y redacción del artículo. Todos los autores han leído el manuscrito final y aprobado la revisión.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Literatura Citada

- Alzamora, L.; H. Solís; M. Rojas; M. Calderón; N. Fajardo; J. Quispe; E. Alvarez; E. Colona & D. Torres. 2007. Actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae). Revista Peruana de Biología, 13 (3): 211- 214.
- Ampuero, J. 2000. Leishmaniasis, Módulos técnicos monográficos. Ministerio de Salud. 83 p.
- Araújo, M.; A. Queiroz; J. Silva; A. Silva; J. Silva; G. Silva; E. Silva; S. Souza; E. Fonseca; C. Camara; T. Silva & S. Alexandre-Moreira. 2019. Flavonoids induce cell death in *Leishmania amazonensis*: in vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. The Analyst, 144(17): 5232-5244.
- Bassler, K.; J. Schulte-Schrepping; S. Warnat-Herresthal; A. Aschenbrenner & J. Schultze. 2019. The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell. Annu Rev Immunol, 26(37):269-293.
- Bogdan, C. & M. Rölinghoff. 1998. The Immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. Int J Parasitol, 28 (1):121-34.
- Bussmann, R.; G. Malca, G; A. Glenn; D. Sharon; B. Nilsen; B. Parrís; D. Dubose; D. Ruiz; J. Saleda; M. Martinez; L. Carillo; K. Walker; A. Kuhlman & A. Townesmith. 2011. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. J Ethnopharmacol, 137(1):121-40.
- Castro, C.; P. Costa; G. Laktin; P. De Carvalho; R. Geraldo; J. Moraes; P. Pinto; M. Couri; P. Pinto & A. Da Silva. 2015. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. Phytomedicine, 22(10): 921-928.
- Childs, G.; K. Foster & M. McRoberts. 1978. Insect cell culture media for the cultivation of New World Leishmania. Int J Parasitol, 8: 255-258.
- Costin, A.; F. Bonito; J. Alves & H. Barreiros. 2020. Tratamiento de la leishmaniasis localizada mediante el antimonio de meglumina intralesional y la terapia fotodinámica, Actas Dermo-Sifiligráficas, 111 (10): 897-899.
- Cubas, W.; D. Centeno-Leguía; K. Arteaga-Livias & E. Depaz-López. 2019. Revisión clínica y epidemiológica de la leishmaniasis tegumentaria en una región central del Perú. Revista peruana de infectología, 36(6):707-715.
- Donfack, H.; J. Kezetas; Y. Fotsing; D. Dize; B. Kemvoufo; G. Mbahbou; A. Fusi; B. Ndjakou; F. Boyom; S. Augustin; T. Opatz; N. Sewald. 2021. Constituents of *Peperomia vulcanica* Baker & C. H. Wright (Piperaceae) with antiparasitic activity, Phytochemistry Letters 41:14-20.
- Eperoni, S. & D. McMahon-Pratt. 1989. Extracellular Cultivation and Morphological Characterization of Amastigote-Like Forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. J Protozool, 36(5):502-510.
- Ferreira, E.; J. Reigada; M. Correia; M. Young; E. Guimarães; G. Franchi; A. Nowill; J. Lago; L. Yamaguchi & M. Kato. 2014. Antifungal and Cytotoxic 2 Acylcyclohexane-1, 3-diones from *Peperomia alata* and *P. trineura*. J. Nat Prod 2014; 77(6): 1377-1382.
- Fournet, A.; M. Ferreira; A. Rojas De Arias; S. Fuentes; S. Torres; A. Inchausti; G. Yaluff; H. Nakayama; V. Mahiou; R. Hocquemiller & A. Cavé. 1996. In vitro and in vivo leishmanicidal studies of *Peperomia galioides* (Piperaceae). Phytomedicine, 3(3): 271-275.

- Geroldinger, G.; M. Rezk; R. Idris; V. Gruber; M. Tonner; R. Moldzio; K. Staniek; L. Monzote & L. Gille.** 2019. Techniques to study phagocytosis and uptake of *Leishmania tarentolae* by J774 macrophages. *Experimental Parasitology*, 197: 57-64.
- Hilaire, V.; M. Gregory; A. Majoor; F. Hadji-Minaglou; A. Landreau & X. Fernandez.** 2022. New method for screening anti-Leishmania compounds in plants extracts by HPTLC bioautography. *Journal of Chromatography*, 1188:123061.
- Houël, E.; M. Ginouves; N. Azas; E. Bourreau; V. Eparvier; S. Hutter; A. Knittel-Obrecht; A. Jahn-Oyac; G. Prévot; P. Villa; C. Vonthron-Sénécheau & G. Odonne.** 2022. Treating leishmaniasis in Amazonia, part 2: Multi-target evaluation of widely used plants to understand medicinal practices. *Journal of Ethnopharmacology*, 289:115054.
- Immanuel, G.; V. Vincybai; V. Sivaram; A. Palavesam & M. Marian.** 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236: (1-4)53-65.
- León, B.** 2006. Piperaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 13 (2):492-563.
- Mahiou, V.; F. Roblot; R. Hocquemiller; A. Cavé; A. Barrios; A. Fournet & P. Ducrot.** 1995. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. *Journal of Natural Products*, 58(2): 324-328.
- Mahiou, V.; F. Roblot; R. Hocquemiller; A. Cavé; A. Rojas; A. Inchausti.** 1996. New Prenylated Quinones from *Peperomia galioides*; *Journal Natural Products*, 59: 694-697.
- Martínez, B.; L. Bernal; D. Bravo; M. Samain; J. Ramirez & B. Rendón.** 2019. Traditional Uses of the Family Piperaceae in Oaxaca, Mexico. *Tropical Conservation Science*, 12:1-22.
- Ministerio de Salud.** 2000. Leishmaniasis, Módulos técnicos monográficos.
- Odonne, G.; G. Bourdy; D. Castillo; Y. Estevez; A. Lancha-Tangoa; J. Alban-Castillo; E. Deharo; R. Rojas; D. Stien & M. Sauvain.** 2009. Ta'ta', Huayani: Perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. *J Ethnopharmacol*, 126(1):149-158.
- Oliveira, A.; J. Mesquita; A. Tempone; J. Lago; E. Guimarães & M. Kato.** 2012. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. *Exp Parasitol*, 132(2):383-387.
- Panda, S. & W. Luyten.** 2018. Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. *Parasite*, 25:10.
- Passero, L.; E. Brunelli; T. Sauini; T. Amorim; J. Jesus & E. Rodrigues.** 2021. The Potential of Traditional Knowledge to Develop Effective Medicines for the Treatment of Leishmaniasis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 690432.
- Pino, G.** 2006. Estado actual de las suculentas en el Perú. *Zonas Áridas*, 10:155-173.
- Quílez, A.; M. Fernández-Arche; M. García-Giménez & R. De la Puerta.** 2018. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 225, 244-270.
- Roncal, J. & K. Saldaña.** 2014. Caracterización farmacognóstica de las hojas y tallos de la *Peperomia dolabriformis* Kunth "congona de zorro" procedentes de Cerro Campana del distrito de Huanchaco - La Libertad. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo, Perú].
- Singh, N.; B. Mishra; S. Bajpai; R. Singh & V. Tiwari.** 2014. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem*, 22 (1):18-45.
- Siripattanapipong, S.; P. Boontanom; S. Leelayoova; M. Mungthin & P. Tan-Ariya.** 2019. In vitro growth characteristics and morphological differentiation of *Leishmania martiniquensis* promastigotes in different culture media. *Acta Tropica*, 197:105039.
- Steel, R. & J. Torrie.** 2016. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2da. edición. México; Editorial Mc. Graw Hill S.A. p. 188-200.
- Steiger, R. & E. Steiger.** 1977. Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in defined media: nutritional requirements. *J. Protozool*, 1977; 24(3):437-41.
- Scodro, R.; S. Espelho; C. Agostinho; V. Garcia; L. Cardozo-Filho; L. Cortez; E. Pilau; K. Caleffi; V. Siqueira; R. Cardoso & D. Cortez.** 2015. A new benzoic acid derivative from *Piper diospyrifolium* and its anti-Mycobacterium tuberculosis activity. *Phytochem Lett*, 2015; 11:18 - 23.

- Silva, E.; C. Maquiaveli & P. Magalhães.** 2012. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Exp Parasitol*, 130(3):183-188.
- Vannier-Santos, M.; D. Menezes; M. Oliveira & F. de Mello.** 2008. The putrescine analogue 1, 4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiology* 2008; 154(10):3104-3111.
- Vaselek, S.** 2021. Canine leishmaniasis in Balkan-A review of occurrence and epidemiology. *Acta Tropica*, 224:106110.
- Vega, M.; M. Rolón; C. Coronel; J. Pereira; A. Lucas; J. Almeida; S. Almeida; L. Everson; H. Melo; W. Amaral & J. Ribeiro; M. Bezerra.** 2021. Antiparasitic effect of essential oils obtained from two species of Piper L. native to the Atlantic forest. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101958.