

Extracción acuosa de corteza de *Galipea longiflora* y su actividad leishmanicida

Aqueous extraction from bark of *Galipea longiflora* and their leishmanicidal activity

Fabiola Llanos Medina¹, Boris Espinoza Cruz¹, Efraín Salamanca Capusiri¹, Rogelio Chuqui², Ninoska Flores Quisbert¹, Alberto Giménez Turba¹

¹Unidad de Productos Naturales, Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

²Comunidad Tacana de Santa Rosa de Maravilla, Prov. Abel Iturralde. La Paz, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Alberto Giménez Turba Ph.D. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra # 2224, 2º Piso, Miraflores. La Paz, Bolivia.

Telf. : 2229021

E mail: agimenez@megalink.com

Recibido para publicación en 31/07/09

Aceptado en 15/12/09

RESUMEN

En el presente trabajo describimos los primeros estudios sobre el extracto acuoso obtenido a partir de la corteza de Evanta (*Galipea longiflora*), cuya decocción es utilizada tradicionalmente en el tratamiento de diarreas con sangre y leishmaniasis. Los extractos acuosos de Evanta, fueron preparados por: Coccción en un sistema cerrado (1); Reflujo (2) y Coccción en un sistema abierto (3). Los cálculos del rendimiento de cada extracto se han determinado mediante liofilización (L). La cuantificación de los principios activos (CAT), se ha determinado mediante una extracción directa del extracto acuoso (D) y una extracción ajustando a pH 3 (P), utilizando CH₂Cl₂ como solvente. De esta manera se obtuvieron nueve extractos: L1-L3, D1-D3 y P1-P3. Todos los extractos fueron evaluados por su actividad leishmanicida frente a promastigotes de *L. amazonensis* y *L. braziliensis*. El mayor porcentaje de rendimiento se obtuvo con L2 (37,2%) y el mayor rendimiento de los alcaloides totales (CAT) se obtuvo con los extractos P1 (0,38%) y D1 (0,36%). Los niveles de actividad leishmanicida de todos los extractos derivados de D y P fueron evaluados frente a *L. amazonensis* y *L. braziliensis*. La mejor actividad se encontró en el extracto D1 para *L. amazonensis* [CI₅₀=47,7±10,7] y D2 para *L. braziliensis* [CI₅₀=29,5±6,5]. Las actividades que se reportan tienen valores muy parecidos entre sí, sin embargo estos están ligeramente por debajo a los valores obtenidos con nuestro patrón CAT (extraído con CH₂Cl₂) [CI₅₀=30,5±0,4 y CI₅₀=24,7±2μg/ml

respectivamente] Mientras que extractos liofilizados L1-L3, no presentaron actividad (CI₅₀>100μg/ml), indicando claramente que durante la concentración por liofilización se perdieron los principios activos dada su naturaleza volátil. **Palabras claves:** Extracto acuoso, Evanta, *Galipea longiflora*, actividad leishmanicida, liofilización, *Leishmania amazonensis* y *L. braziliensis*.

ABSTRACT

The present work describes the first studies on the aqueous extract obtained from Evanta's bark (*Galipea longiflora*), which is a decoction traditionally used for the treatment of diarrhoea with blood and leishmaniasis. The aqueous extracts were obtained by: decoction in a closed system (1), reflux (2) and decoction in an open system (3). The yield of the extraction was calculated by freeze drying (L). The quantification of the active principles (QAP) was determined by direct extraction of the aqueous extract (D), and by previous adjustment to pH 3 (P), using CH₂Cl₂ as the organic solvent. Nine extracts were obtained: L1-L3, D1-D3 and P1-P3. All extracts were evaluated for leishmanicidal activity against promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and *L. braziliensis*. The highest chemical yield was obtained with L2 (37.2%) and the highest yield for QAP was obtained with extracts P1 (0.38%) and D1 (0.36%). The leishmanicidal activity of all the D and P extracts against *L. amazonensis* [D1 IC₅₀=47.7±10.7; D2 IC₅₀=53.2±12.1; P1 IC₅₀=48.5±7.5;

P2 IC₅₀=50.3±8.62 y P3 IC₅₀=56.7±17.7μg/ml] and *L. braziliensis* [D1 IC₅₀=31.3±6.15; D2 IC₅₀=29.5±6.5; P1 IC₅₀=29.6±3.3; P2 IC₅₀=34.2±0.6 y P3 IC₅₀=36.3±2.4μg/ml], were very similar but somewhat lower than the values obtained for a reference QAP sample [IC₅₀=30.5±0.4 and IC₅₀=24.7±2μg/ml, respectively]. The freeze dry extracts L1-L3, did not show biological activity (IC₅₀>100μg/ml), showing that during the freeze drying process, the active principles are lost due to their volatile nature. **Key words:** Aqueous extract, Evanta, *Galipea longiflora*, leishmanicidal activity, freeze drying, *Leishmania amazonensis* and *L. braziliensis*

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias de distribución mundial transmitidas al ser humano por la picadura de alrededor de 30 especies de flebótomos infectados por protozoos del género *Leishmania*. Esta enfermedad, es manifestada por sus formas: cutánea, mucocutánea, y visceral, siendo además resultado de la compleja interacción entre la especie del parásito involucrado y la respuesta inmunológica del paciente¹. Según la Organización Mundial de la Salud se estima que se presentan cada año 2 millones de casos nuevos en todo el mundo, de los cuales 1,5 millones corresponden a leishmaniasis cutánea. Se estima que el número de personas infectadas sobrepasa los 12 millones. Sin embargo, los datos oficiales subestiman la realidad de la afección humana por estos protozoarios debido a que gran parte de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva, numerosos casos no son diagnosticados, y existen un gran número de casos asintomáticos. Por otra parte las políticas gubernamentales para los casos de leishmaniasis son declaración obligatoria en solo 32 países de los 88 clasificados como endémicos¹. La leishmaniasis en Bolivia se encuentra geográficamente distribuida en el área rural de las zonas tropicales y subtropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y Chuquisaca. En el año 2006 en Bolivia se ha notificado en el departamento de La Paz 1.502 casos (48%), en el Beni con 889 casos (28%) y en Pando 416 casos (13%)². La especie medicinal *Galipea longiflora* K. (sinónimo *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki) tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta. Pertenece a la familia Rutaceae, es un árbol que crece hasta 12 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un peciolo frecuentemente alado y sus flores aparecen en forma de racimos. En Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos de Beni y La Paz³. Esta especie se encuentra registrada en farmacopeas

tradicionales, como planta medicinal en la cura de la "lepra blanca", como también se conoce a la leishmania, o problemas digestivos. Esta sintomatología puede ser interpretada por la medicina occidental, como antiparasitaria (leishmanicida). Esta planta es usada de manera tradicional por las etnias Tacana, Mosekene y Tsimane. El uso tradicional más frecuente según los Tacanas es en forma de coccción para el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos; para el tratamiento de la leishmaniasis, la corteza fresca o seca es molida y aplicada directamente en forma de cataplasma sobre las úlceras, dos veces al día hasta que sane, además de beber la decocción⁴. Entre los años 1985-1991, en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA) dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), un grupo de investigadores Franco-Boliviano estudiaron la actividad antiparasitaria de los extractos de la *Galipea longiflora* (Evanta), hojas, raíces y corteza, aislándose e identificando 15 alcaloides quinoléicos^{5,6,7}. Algunos de estos alcaloides presentes en hojas resultaron eficaces y con baja toxicidad in vivo, por lo que fueron patentados (Chimaninas A, B, C y D US4209519/15/04/93)^{8,9,10}. En la actualidad el Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB), de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, forma parte de un equipo multidisciplinario que está llevando adelante estudios clínicos sobre la eficacia de formulaciones farmacéuticas, a base de los principios activos de Evanta, frente a la leishmaniasis cutánea y continua en sus trabajos de investigación sobre nuevas alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis a partir de extractos vegetales. El objetivo del presente trabajo sobre *Galipea longiflora*, se enfoca en la estandarización de nuevos métodos de extracción y el análisis de los cinco alcaloides quinoléicos principales aislados de la corteza *Galipea longiflora*: 2-fenilquinolina; 2-pentilquinolina; 4-metoxi-2-fenilquinolina; 2-propilquinolina y 2-(3,4-metilendioxfeniletíl)-quinolina. Estas moléculas representan cerca del 90% del total de los alcaloides, las estructuras de los mismos han sido determinadas por técnicas espectroscópicas de RNM de ¹H y ¹³C (1 y 2D) y espectrofotometría de masas de alta resolución¹¹. En esta investigación, presentamos los resultados de los estudios realizados del extracto acuoso de la corteza de *Galipea longiflora*, colectada en la comunidad de Vencedores Provincia Sud Yungas del Departamento de La Paz. Los extractos acuosos de corteza de *Galipea longiflora* fueron obtenidos por tres métodos diferentes. Los extractos obtenidos fueron evaluados por su actividad leishmanicida sobre formas promastigote, utilizando el método colorimétrico (XTT) frente a cepas de *Leishmania amazonensis* y *Leishmania. braziliensis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los equipos utilizados para las diferentes extracciones fueron; liofilizador (FINN AQUA mod. LYOVAC GT 2), rotaevaporador (Heidolph Laborota-400) con bomba al vacío (Diaphragm Vacuum Puma DC-4). Para la comparación se utilizó placas cromatográficas sílice gel con fluorescencia UV 254nm (Macherey-Nagel) de 25µm de espesor con base de aluminio y reveladas con una cámara fluorescente de 254nm y 356nm (Spectroline Mod; CM-10). Los solventes utilizados en los procesos de extracción y análisis fueron: agua destilada, diclorometano p.a., metanol p.a. Merck y HCL 1N. El análisis de datos y obtención de los CI_{50} de los extractos acuosos frente a las dos cepas de *Leishmania* fue realizado en programa Excel 2000, previamente descrito por Cornelly et al.¹² Las placas fueron leídas en un lector ELISA (Modelo 2100 series-Plate Reader) a 450nm^{13,14}.

Colección del material vegetal. La corteza de *Galipea longiflora* fue colectada por el Dr. Alberto Gimenez y el equipo del Instituto de Investigaciones Farmaco Boquímicas (IIFB), en la comunidad de Vencedores (Hernández S15°21'110 y W 87°20'342) a una altura de 469 m.s.n.m, en la provincia Sud Yungas de Departamento de La Paz, Bolivia. Su identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con muestras Vaucher (AS49 mayo de 1996 y SD17 septiembre de 1994) depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia. Fue secado a temperatura ambiente fuera del alcance de los rayos del sol y de la humedad.

Métodos de extracción. La corteza de *Galipea longiflora* secada y molida, fue extraída por tres tipos de cocciones acuosas: (1) Cocción en sistema cerrado, corteza (100gr) en agua (2L) durante 1h; (2) a reflujo, corteza (100gr) en agua (1L) durante 1h; (3) cocción en un sistema abierto corteza (100gr) en agua (2L) durante 1h. Posteriormente cada una de las muestras fue filtrada en caliente y se tomó una alícuota de 100 ml para extracción directa con diclorometano (D); extracción a pH 3 (P) y liofilizado (L), como se describe a continuación. El extracto acuso D fue extraído directamente con

CH_2Cl_2 (ext. liq.-liq.), la fase orgánica de la acuosa, la cual fue deshidratada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y finalmente concentrada al vacío hasta peso constante, obteniéndose: D1, D2 y D3 de la fase orgánica. (líq-líq) El extracto acuoso P fue acidificado con HCl 1N hasta $pH \geq 3$, y extraído con CH_2Cl_2 , posteriormente la fase orgánica fue deshidratada con sulfato de sodio anhidro, filtrada, y se secada al vacío hasta peso constante, obteniéndose: P1, P2 y P3. El extracto acuoso L fue congelado a $-80^\circ C$ y posteriormente liofilizado obteniéndose: L1, L2 y L3.

Estudios cromatográficos. Las diferentes muestras obtenidas P1-P3, D1-D3 y L1-L3 fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas cromatográficas de gel de sílice con fluorescencia UV 254nm de 25µm de espesor con base de aluminio; utilizando como sistema de elusión CH_2Cl_2 : MeOH al 0.1%. Los productos puros fueron obtenidos del extracto de diclorometano del *G. longiflora* después de sucesivas cromatografías e identificadas por RMN y EM, por el Dr. Alberto Gimenez en la Universidad de Lund, Suecia³. **Evaluación antiparasitaria in vitro por el método colorimétrico (XTT) sobre promastigotes de Leishmania.** Se realizó la evaluación antiparasitaria de todos los extractos obtenidos por método colorimétrico (XTT)¹⁵ sobre promastigotes de dos especies de *leishmania* (*L. braziliensis* M2903 MHOM/BR/75/M2903) y *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/LTB-012), utilizando como blancos para cada concentración de los extractos acuosos, un control de parásitos y DMSO al 1%, un control de parásitos con Anfotericina B y otro con una muestra patrón de alcaloides totales de corteza de Evanta (CAT). Las placas se incubaron durante 72hrs. Para determinar la CI_{50} se utilizó una solución de XTT con Fenasin metosulfato (PMS)¹³.

RESULTADOS

Los porcentajes de rendimiento obtenidos después de las extracciones por los distintos métodos, son los que se muestran en las Figuras 1 y 2

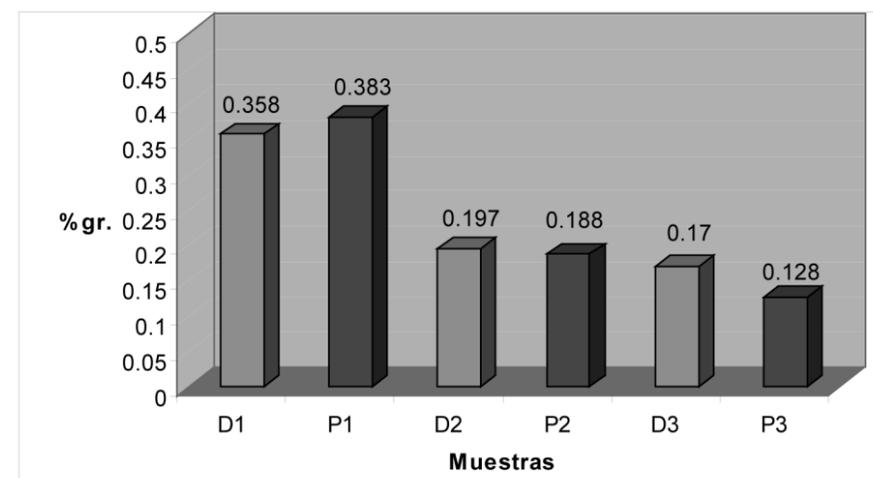


Figura 1. Porcentaje en gramos de CAT por extracción directa con CH_2Cl_2 (D1-D3) y extracción a pH ácido (P1-P3) de los extractos acuosos.

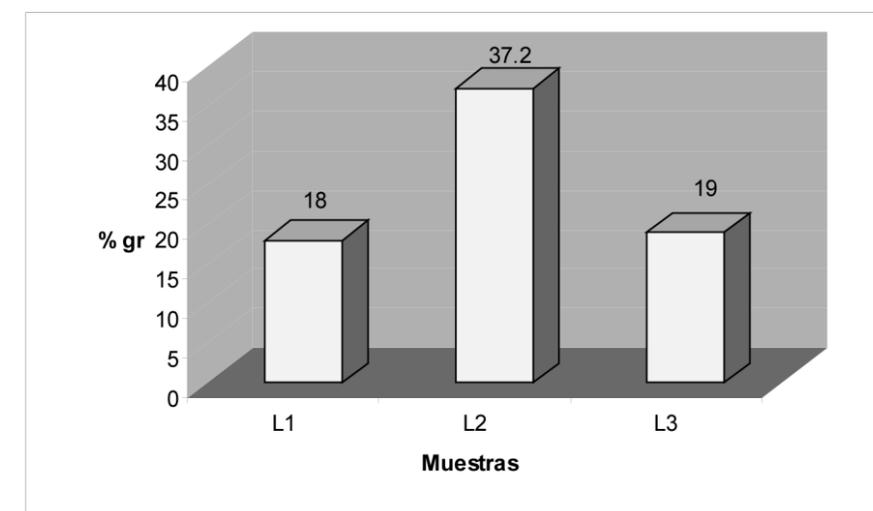


Figura 2. Porcentaje en gramos de rendimiento químico de los extractos acuosos liofilizado

De los tres métodos de extracción se pudo observar claramente que el mayor rendimiento se obtuvo con L2 (37.2%). Por otra parte, las extracciones de CAT con CH_2Cl_2 presentaron los mayores porcentajes de rendimiento para D1 (0.35%), y P1 (0.38%), indicando que no hay una variación significativa al ajustar el pH del extracto antes de la extracción con el solvente orgánico.

Los nueve extractos obtenidos fueron analizados mediante

cromatografía en capa fina (CCF) para definir los perfiles cromatográficos de cada muestra y se compararon dichos perfiles con los de las sustancias puras aisladas de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* (CAT) 2-fenil-quinolina ($R_f = 0.61$), 2-fenil-4-metoxi-quinolina ($R_f = 0.24$), 2-n-pentilquinolina ($R_f = 0.28$), 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina ($R_f = 0.20$), evolitrina ($R_f = 0.17$) y Skimanina ($R_f = 0.12$).

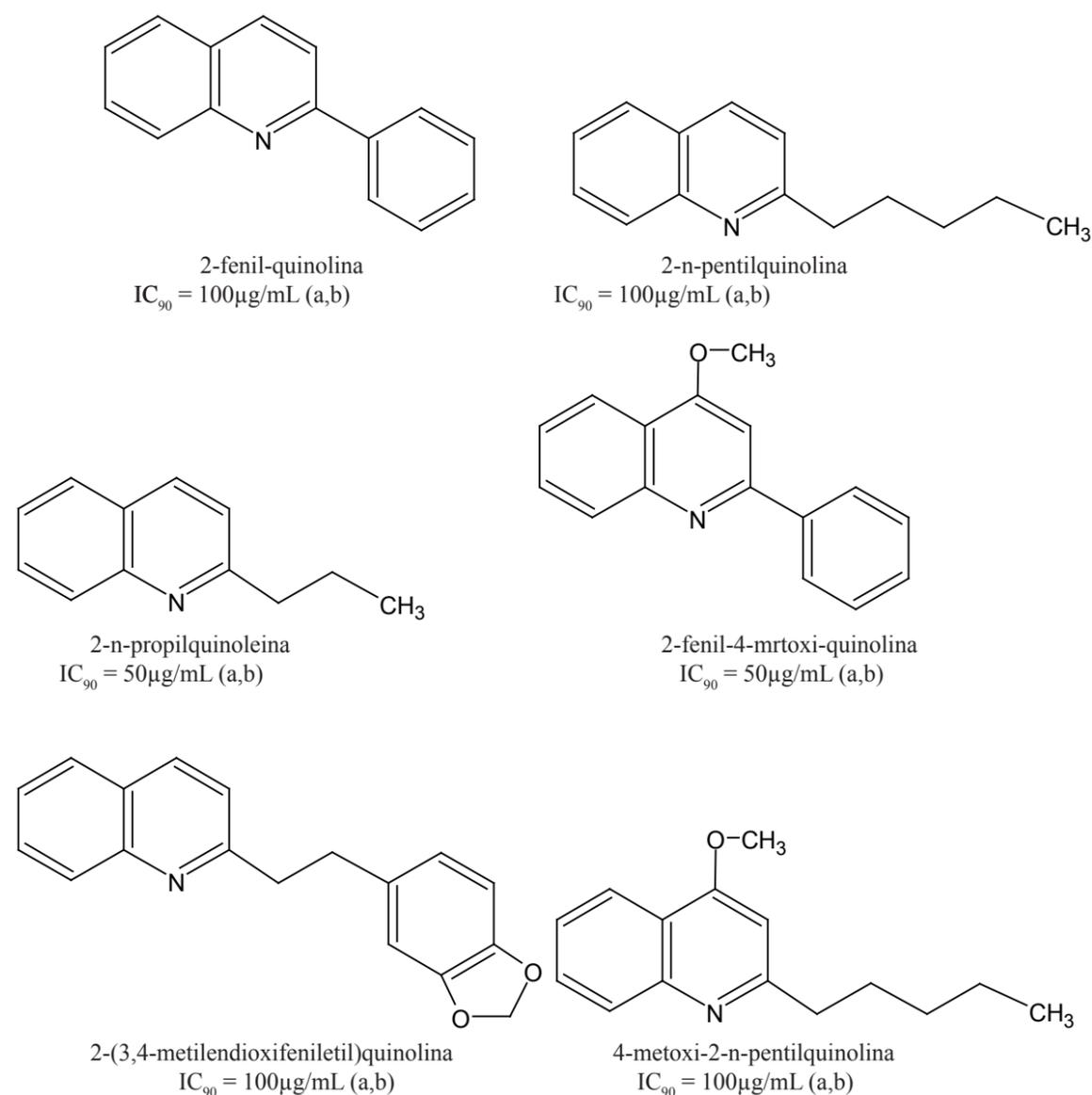


Figura 3. Estructuras químicas de 6 alcaloides quinolínicos aislados de *Galipea longiflora* y su actividad leishmanicida in vitro frente: a) *L. braziliensis* (2903), b) *L. amazonensis* (PH8) (Fournet,1994)¹⁶

Los cromatogramas obtenidos permitieron determinar que en todos los extractos de D1-D3 y de P1-P3 se encontraba presente la 2-fenilquinolina como alcaloide mayoritario, acompañada de los otros 4 alcaloides. En los extractos de L1-L3 se observó la presencia de pequeñas cantidades de 2-fenilquinolina y algo de evolitrina, confirmando la pérdida de las sustancias activas durante el proceso de liofilización al vacío.

Todos los extractos D, P y L fueron evaluados por su actividad leishmanicida in vitro, sobre formas promastigotes de *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, mediante el método colorimétrico con XTT.

Los resultados obtenidos de la actividad biológica de los extractos liofilizados L1, L2 y L3 mostraron una CI₅₀ >100µg/ml, indicando que éstos no presentaron actividad leishmanicida. Los extractos D1-D2, y P1-P3 presentaron actividades con valores de CI₅₀ semejantes, frente a cada una de las cepas de leishmania evaluadas, pero estos valores fueron algo menores que los obtenidos con muestras patrón de CAT que se manejan en el IIFB (Tabla 1).

Tabla 1. Evaluación de la actividad leishmanicida in vitro de los extractos acuosos de *Galipea longiflora* frente a dos cepas de *Leishmania*

Código	IC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µg/ml
	<i>L. braziliensis</i> (MHOM/BR/75/M2903)	<i>L. amazonensis</i> (MHOM/BR/76/LTB-012)
L1	>100	>100
L2	>100	>100
L3	>100	>100
D1	31,3±6,15	47,7±10,7
D2	29,5±6,5	53,2±12,1
D3	NE	NE
P1	29,6±3,3	48,5±7,5
P2	34,2±0,6	50,3±8,62
P3	36,3±2,4	56,7±17,7
CAT	24,7±2	30,5±0,4
AFO-B	0,2	1,1

NE: No Evaluados

DISCUSIÓN

De acuerdo a los extractos obtenidos, se observa un mayor rendimiento en el extracto liofilizado L2, con un 37.2% debido a que éste contiene diferentes compuestos polares presentes en el extracto al igual que todos los liofilizados y L2 en especial por provenir de una decocción al reflujo con relación al peso seco de corteza y con un valor significativamente mayor al obtenido por extracción con solventes orgánicos que está en el orden del 4%. En cuanto al rendimiento de la extracción de los principios activos los extractos D1 y P1, ellos proporcionaron rendimientos del 0,36 y 0,38% respectivamente, que es considerablemente más bajo que el 2% de CAT que se obtiene de un extracto orgánico^{3, 11}. Estos resultados sugieren la importancia de realizar estudios más profundos sobre los niveles de eficacia de los extractos acuosos que son los utilizados por la medicina tradicional.

En el análisis del perfil cromatográfico en placa fina de los nueve extractos frente a patrones de referencia, se observa que todos los extractos acuosos tienen alcaloides quinolínicos en proporciones semejantes. Entre D1-D3 y P1-P3 se puede apreciar sustancias con R_f idénticos muestras patrón de 2-fenil-quinolina, 2-fenil-4-metoxi-quinolina, 2-(3',4'-metilen-dioxi-fenil-etil)-quinolina, 2n-pentil-quinolina y evolitrina¹⁶, pero sin embargo en los extractos L1-L3 sólo se observa la presencia de la 2-n-fenilquinolina y evolitrina en mucho menor proporción que los observados para los extractos D y P. Esto se debe fundamentalmente al bajo contenido de alcaloides en los extractos acuosos o a su naturaleza volátil, es decir que los alcaloides se pierden al ser sometidos a alto vacío por varios días mientras se logra la liofilización completa.

En cuanto a la actividad leishmanicida podemos concluir que no existen diferencias significativas entre los valores de

CI₅₀ entre los extractos D y P frente a *L. amazonensis* [D1 CI₅₀=47,7±10,7 y P1 CI₅₀=48,5±7,5; D2 CI₅₀=53,2±12,1 y P2 CI₅₀=50,3±8,62] y frente a *L. braziliensis* [D1 CI₅₀=31,3±6,15; P1 CI₅₀=29,6±3,3 y D2 CI₅₀=29,5±6,5; P2 CI₅₀=34,2±0,6] por lo que no existe diferencia significativa al ajustar el pH antes de extraer el extracto acuoso. Podemos indicar que los valores de actividad biológica de los CAT obtenidos de los extractos acuosos son algo más bajos que los valores de los obtenidos para CAT (CI₅₀ 24,7±2 y 30,5±0,4 µg/ml, respectivamente) de extractos orgánicos. Estos resultados sugieren que se debe realizar un estudio más detallado y cuantitativo sobre la composición y porcentajes relativos de las moléculas que conforman el CAT en extractos acuosos. (Tabla 1).

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado parcialmente por el proyecto Evanta UMSA-IDH-2007, el proyecto Enfermedades Infecciosas ASDI/SAREC. A la fundación Alexander Von Humboldt Stiftung y la OEA por la donación de equipos. Al proyecto y campamento OSCAR por la infraestructura y las comunidades de Vencedores-Hernández de la provincia Sud Yungas del Departamento de La Paz.

REFERENCIAS

- Ministerio de Salud y Deportes. Situación general y tendencias. Respuesta del sistema de salud OPS/OMS representación Bolivia; 2004 Noviembre [acceso 20 de junio de 2009]. Disponible en: http://saludpublica.bvsp.org.bo/ass/analisis_situacion/bolivia/perfil-bolivia-2004.pdf
- Mollinedo S. coordinador. Leishmaniasis guía operativa para el control en Bolivia. 1^{ed}. La Paz: Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis; 2007.

3. Giménez A, Ávila JA, Ruiz G, Paz M, Udaeta E, Ticona JC, Salamanca E, Paredes C, Rodríguez N, Quints K, Feraudy C, Gutiérrez I, Chuqui R, Quenevo C, Dalence MF, Bascope M. Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora* Krause. *Rev Bol Quím.* 2005; 22(1): 94-107.
4. UMSA: IIFB-IIQ-IBBA, FONAMA-EIA. Tacana: conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas. La Paz: Centro de información para el desarrollo; 1999.
5. Fournet A, Vagneur B, Richomme P, Bruneton J. Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*. *Can J Chem.* 1989; 67: 2116-2118.
6. Fournet A, Hocquemiller R, Roblot F, Cave A, Richomme P, Bruneton J. Les Chimanines, Nouvelles Quinoléines Substituées En 2, Isolées D'une Plante Bolivienne Antiparasitaire: *Galipea longiflora*. *J Nat Prod.* 1993; 56 (9):1547-1552.
7. Muñoz MH, Mayrarque J, Fournet A, Gantier JC, Hocquemiller R, Moskowitz H. Synthesis of an antileishmanial alkaloid isolated from *Galipea longiflora* and of related compounds. *Chem Pharm Bull.* 1994; 42 (9): 1914-1916.
8. Fournet A, Gantier JC, Gautheret A, Leysalles L, Muñoz MH, Mayrargue J, Moskowitz H, Cavé A, Hocquemiller R. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania Donovan*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 33: 537-544.
9. Fournet A, Ferreira ME, Rojas A, Torres S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R. In Vivo Efficacy of Oral and Intralesional Administration of 2-Substituted Quinolines in Experimental Treatment of New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(11): 2447-2451.
10. Fournet A, Angelo A, Muñoz V, Hocquemiller R, Cavé A, Bruneton J. 2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potencial Antileishmanial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37 (4): 859-863.
11. Ticona Huallpara J. Estudio de dos plantas bolivianas de la etnia Tacana [Tesis de maestría]. La Paz: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés; 2008.
12. Cornelly W, Espinosa O, Monternegro H, Cubila L, Capson T, Ortega- Barria E, Romero L. Hidrosoluble Formazan XTT: Its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *J Microbiol Methods.* 2003;55: 813-816.
13. Salamanca E, Ruiz G, Ticona JC, Giménez A. Método colorimétrico – XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *BIOFARBO.* 2008;16: 21-27.
14. Giménez A, Gupta M, Deharo E. Manual de técnicas de laboratorio para la evaluación de sustancias tripanocidas y leishmanicidas. La Paz; 2005.
15. Salamanca E. Actividad antiparasitaria múltiple de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* krause kallunki (Evanta) [tesis de Maestría]. La Paz: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés; 2008.
16. Fournet A, Barrios A, Muñoz V, Hocquemiller R, Roblot F, Cavé A, Richomme P, Bruneton J. Antiprotozoal Activity of Quinoline Alkaloids Isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. *Phytother Res.* 1994; 8: 174-178.