

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
ESCUELA DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



Evaluación fitoquímica y actividad antimicrobiana de
***Tessaria integrifolia*, recurso medicinal del Perú**

TESIS
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

AUTOR : MSc. JUAN CARLOS CABALLERO PALACIOS
ASESOR : Dr. CARLOS ALBERTO LEÓN TORRES

TRUJILLO – PERÚ
2014

Nº DE REGISTRO.....

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado Dictaminador:

De acuerdo con lo dispuesto en el Reglamento de Doctorado de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo, pongo a vuestra consideración el trabajo de tesis para optar el Grado Académico de DOCTOR en Ciencias Ambientales titulado: “Evaluación fitoquímica y actividad antimicrobiana de *Tessaria integrifolia*, recurso medicinal del Perú”.

El mismo que dejó a su criterio para su dictamen, esperando reunir los requisitos para vuestra aprobación.

Trujillo, Noviembre 2014

MsC. Juan Carlos Caballero Palacios

JURADO DICTAMINADOR

.....
Dr. JOSÉ MOSTACERO LEÓN
PRESIDENTE

.....
Dr. JOSÉ SILVA VILLANUEVA
SECRETARIO

.....
Dr. CARLOS LEÓN TORRES
MIEMBRO

DEDICATORIA

A DIOS, MI PADRE CELESTIAL

por la vida, por la salud, por las bendiciones concedidas para mí y mi familia, quien guía mis pasos cada día de mi vida.

A MIS PADRES

Carlos, que desde el cielo intercede ante nuestro Señor con sus bendiciones sobre mi y mi familia y a mi madre Aurora, quien con su amor, comprensión y ternura me alienta cada día a seguir adelante.

A MI AMADA ESPOSA

Roxana, por su gran amor, por compartir mis alegrías y tristezas y darme el aliento constante para seguir superándome en la vida cada día.

A MIS HIJOS

Carlos Humberto, Juan Carlos y Celeste Xiomara, quienes con su gran amor comprendieron mis ausencias y permitieron, alcanzar esta meta.

A MIS HERMANOS

María Teresa, Luis Enrique, Juan José, María Antonieta y José Luis, por compartir conmigo esta alegría de ver realizados mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Un sincero agradecimiento al Dr. Carlos Alberto León Torres por su asesoramiento y apoyo constante en la realización del presente trabajo de tesis doctoral, al Dr. José González Cabeza por su aporte incondicional en la parte Microbiológica, al Dr. José Mostacero León por los Consejos vertidos, a mi amigo Dr. Segundo Leiva Gonzáles por su apoyo en la recolección y clasificación de la Planta *Tessaria integrifolia* “Pájaro Bobo”, a la Dra. Esther Caballero Salvador del Departamento de Farmacia de la Universidad de Salamanca – España, por los espectros RMN¹H y CG-EM, a la Universidad Privada “Antenor Orrego” por todo el apoyo brindado y a mi amada esposa Roxana por su constante apoyo en la elaboración de esta Tesis.

ANEXOS

- Anexo 1: Fotografía 1. Flores de la Planta, Pájaro Bobo.
- Anexo 2: Fotografía 2. Flores y Hojas de la Planta, Pájaro Bobo
- Anexo 3: Figura 1. Espectro de Masas de E1 Compuesto Trans-12,13-Epoxiestearato de Metilo.
- Anexo 4: Figura 2. Espectro de Masas de E2 Compuesto Ácido-3-Nitro-1,2-Bencenodicarboxílico.
- Anexo 5: Figura 3. Espectro de Masas Compuesto E4.
- Anexo 6: Figura 4. Espectro de Masas Compuesto S-1 Espatulanol.
- Anexo 7: Figura 5. Espectro de Protón de Compuesto S-1.
- Anexo 8: Figura 6. Espectro de Masas E5 y E6.
- Anexo 9: Figura 7. Rompimiento del Compuesto S-1.

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea o “uta” es una enfermedad producida por *Leishmania peruviana* y transmitida en la picadura de diversas especies de mosquitos del género *Lutzomyia*; su terapia se basa en el uso de fármacos antimoniales pentavalentes como el estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumine, a pesar de sus efectos colaterales. Alternativamente, la medicina tradicional usa plantas medicinales sin tener conocimiento de su modo de acción ni haberlas validado científicamente. Se realizó un estudio de *Tessaria integrifolia* R. et P. “pájaro bobo” con el objetivo de determinar su actividad antileishmaniásica y sus constituyentes fitoquímicos. Mediante ensayos in vitro se enfrentó las formas promastigotas de *L. peruviana* contra el extracto metabólico de las flores de *T. integrifolia* R. & P. a las concentraciones de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 mg/mL; teniendo como droga de referencia estibogluconato de sodio y realizando las lecturas a las 24 y 72 horas. El análisis fitoquímico preliminar se efectuó mediante ensayos a la gota. Los resultados a las 24 horas mostraron que a una concentración del extracto de 100 mg/mL, se produce la lisis de las formas promastigotas de *L. peruviana* y a la misma concentración el estibogluconato de sodio solamente inmovilizó a los parásitos. A las 72 horas, las concentraciones menores inmovilizaron las referidas formas promastigotas del parásito, efecto similar al ocasionado por el estibogluconato de sodio. El análisis fitoquímico reveló la presencia de: esteroides, flavonoides y fenoles. Es decir, el extracto metabólico de las flores de *T. integrifolia* R. et P. “pájaro bobo” demostró mejor actividad antileishmaniásica que el estibogluconato de sodio.

Palabras clave: *Leishmania peruviana*, leishmaniasis cutánea, “uta”, *Tessaria integrifolia* R. et P., actividad antileishmaniásica, análisis fitoquímico.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis or “uta” is a vector borne disease produced by *Leishmania peruviana* and transmitted by bites of *Lutzomyia* species. Treatment is based in antimonial pentavalents compounds as meglumine antimoniate and sodium stibogluconate, in spite of side effects. Alternatively, traditional medicine uses some plants without knowledge action mode neither scientific validation. With the objective of determining antileishmanial activity and phytochemical constituents of *Tessaria integrifolia* R. et P. By in vitro assays, promastigotas forms of *L. peruviana* were treated with 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 mg/mL of methanolic extract of *T. Integrifolia* R et P. Flowers having to sodium stibogluconato as reference drug. The phytochemical study was carried out by drop assays. Results showed that after 24 hours, concentration of *T. integrifolia* R. et P. Flowers at 100 mg/mL caused lisis of promastigotas in comparison with sodium stibogluconate that only caused their immobilization of parasited. After 72 hours, the other concentrations caused immobilization of parasite forms similarly at drug reference. As a conclusion, methanolic extract of *T. integrifolia* R. et P. Flowers had better antileishmanial activity than sodium stibogluconate and the seconday metabolites founded were steroids, flavonoids and phenols.

Key words: *Leishmania peruviana*, cutaneous leishmaniasis, “uta”, *Tessaria integrifolia* R. et P., antileishmanial activity, phytochemical analysis.

I. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son enfermedades prioritarias de atención, para la Organización Mundial de la Salud (OMS); originan importantes problemas de salud pública debido a la diversidad de formas clínicas, especialmente la mucocutánea, que provoca mutilaciones difíciles de tratar e impacto psicológico en las personas (O.M.S., 1990).

La “uta”, producida por *Leishmania peruviana*, es una enfermedad predominantemente rural en el Perú, endémica en los valles occidentales interandinos y ciertos valles orientales ubicados entre 900 a 3200 msnm, en zonas bióticas bien definidas, con densa vegetación y microclimas favorables para el mantenimiento del vector. Estos lugares son reservorios naturales y fuentes de infección leishmaniásica para insectos y pobladores (Cordero, F. y Zevallos, J. 1991).

Para el tratamiento de la leishmaniasis, se han empleado diferentes medicamentos, como los antimoniales tri y pentavalentes, anfotericina B, cremas a base de paranomicina al 15%, cloro-metil benzetonio al 12%, cloruro de miristalconio y pentamidina, que actualmente constituyen fármacos de elevados costos y alta toxicidad (Miranda, H. 2000).

El estudio de plantas medicinales como parte de la búsqueda de identidades terapéuticas nuevas está avanzando rápidamente gracias al desarrollo de métodos de bioensayos sencillos pero sensitivos para detectar la actividad biológica de extractos vegetales; y de métodos químicos e

instrumentación para el aislamiento y determinación de la estructura química de las sustancias activas. De las raíces, tallos, hojas, flores, semillas y frutos de las plantas se extraen los constituyentes activos que constituyen las drogas crudas, siendo los extractos acuosos y etanólicos los que se usan preferentemente como agentes extractivos en muchas sustancias vegetales (Fournet, A.; Angelo, A. y Muñoz, V. 1994).

El estudio de algunas plantas para determinar su efecto sobre las formas amastigotas o promastigotas ha sido realizado con *Munnozia maroni*, *Anacardium occidentale*, *Pera benensis*, *Pescheria van heurkii* y *Kalanchoe pinnata*, con resultados satisfactorios (Weberbauer, A. 1945).

En Bolivia, se está investigando la acción de algunos vegetales sobre protozoarios parásitos como: *Plasmodium*, *Leishmania*, *Tripanosoma*, *Toxoplasma*, entre otros. Estos estudios toman en cuenta principalmente encuestas etnobotánicas y conocimientos quimiotaxonómicos; han demostrado la actividad antiprotozoaria de alcaloides quinoleínicos aislados de *Galipea grandiflora* y la actividad antileishmanial de una tetralona aislada de *Ampelocera edentula* (Fourneth, A.; Muñoz, V. y Angelo, A. 1990).

En el Perú también se ha iniciado este tipo de investigaciones como los trabajos in vitro de diferentes extractos de *Plumbago scandens* y *Lycopersicon pimpinellifolium*, que originaron lisis y/o inmovilización de formas promastigotas de *L. peruviana*. También se ha encontrado que las hojas de *Pernettya prostrata* presentan efecto antileishmaniano en ensayos realizados in vitro (Fournet, A.; Muñoz, V.; Angelo A. 1998).

La variedad topográfica y diversidad de climas que posee el territorio peruano favorece su potencial vegetal con numerosas plantas medicinales, muchas de ellas poco conocidas o estudiadas, entre las que se encuentra *Tessaria integrifolia* Ruiz et Pavón (Asteraceae), conocida comúnmente como “pájaro bobo”. Esta es ampliamente distribuida en Panamá, Colombia, Venezuela, Paraguay, Brasil, Bolivia y Perú. *Tessaria integrifolia* prefiere la ribera de los ríos, forma, a veces, bosquecillos muy compactos gracias a sus raíces gemíferas; ocasionalmente, se aleja de su hábitat natural acompañando a las acequias y canales de regadío, invadiendo los cultivos y comportándose como maleza; se propaga por semilla y también vegetativamente mediante sus raíces gemíferas (Sagástegui, A.; Leiva, S. 1993).

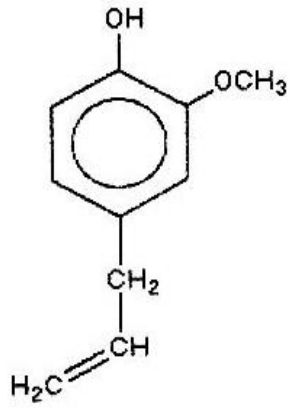
T. integrifolia es un árbol de 3 a 10 m de alto, con raíces gemíferas. Tallos delgados, más o menos cilíndricos, verdes o verde-parduscos, lenticelados, poco ramificados, glabros o diminutamente puberulentos cuando jóvenes. Hojas alternas, oblongas a oblongo-lanceoladas o lanceoladas, obtusas hasta agudas en el ápice, atenuadas y pecioliformes en la base, enteras o irregularmente dentadas, densa y cortamente cinérotomentosas o canescente-tomentosas en ambas superficies, de 3-8 cm de largo por 0,8-3,5 cm de ancho. Capítulos heterógamos, discoideos, pequeños, numerosos, subsésiles, dispuestos en densos corimbos terminales. Involucro turbinado, de 5-6 mm de alto por 2-2,5 mm de diámetro. Brácteas involucrales numerosas, imbricadas, 5-seriadas: las externas ovadas y las internas lineales, radiantes, ambas esparcidamente tomentosas. Flores marginales numerosas, femeninas, con corola filiforme, glabra, de 3-3,5 mm de largo; las centrales 1, masculina por esterilidad del

gineceo, con corola tubulosa de unos 5mm de longitud, glabra, profundamente 5-partida (lóbulos de 2-3 mm de largo); estambres exertos. Aquenios gruesos, glabros, de 0,5-0,8 mm de longitud. Pappus formado por numerosos pelos blancos (Sagástegui, A. 1995).

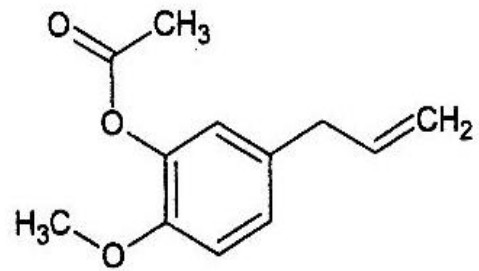
Las hojas de *T. integrifolia* R. & P. se usan en medicina popular peruana para curar los trastornos hepáticos; se le aprovecha por sus propiedades diuréticas y como agente antiasmático y antiinflamatorio. Su inflorescencia es muy visitada por las abejas, por lo que es considerada como planta melífera. En la medicina tradicional argentina se usa como antigonorreico, cicatrizante y resolutive (Sagástegui, A. 1995).

Los pocos estudios realizados sobre las aplicaciones medicinales de esta especie, en nuestro medio, motivaron el presente estudio con el objetivo de determinar in vitro la actividad antileishmaniásica del extracto metabólico de las flores de *Tessaria integrifolia* R. & P. sobre formas promastigotas de *Leishmania peruviana* y su composición fotoquímica preliminar (Valverde, J. 1998).

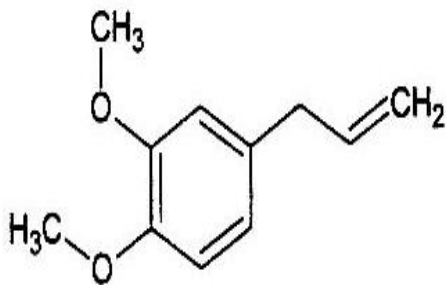
De la revisión bibliográfica se deduce los compuestos aislados para algunas especies de esta familia y su actividad farmacológica. Estos resultados se muestran en los cuadros 2, 3 y 4. Como se precisa en estos cuadros se han identificado aceites esenciales que corresponden a los compuestos Eugenol **(1)**, Acetato de Eugenol **(2)**, Metil Eugenol **(3)**, 3,4-Dimetoxifenilacetico **(4)** (Kustoski, E.; Vega, J.; Ríos, J. 2000).



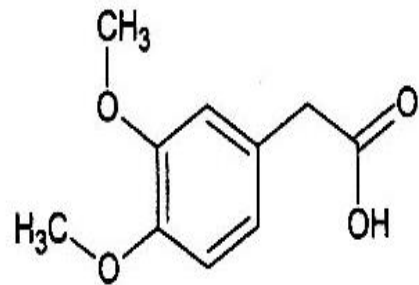
1



2

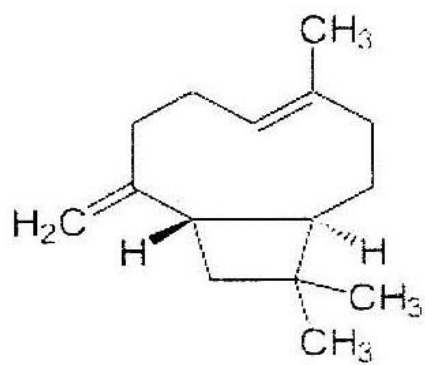


3

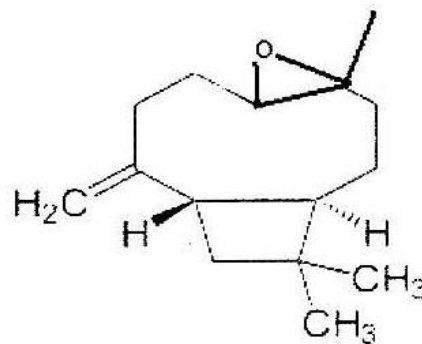


4

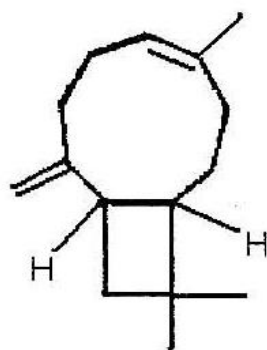
Sesquiterpenos: β -cariofileno (5), epoxido de α - α -humuleno (6), Oxido β -cariofileno (7), α - α -humuleno (8);



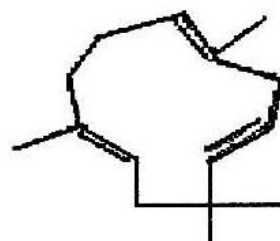
5



6

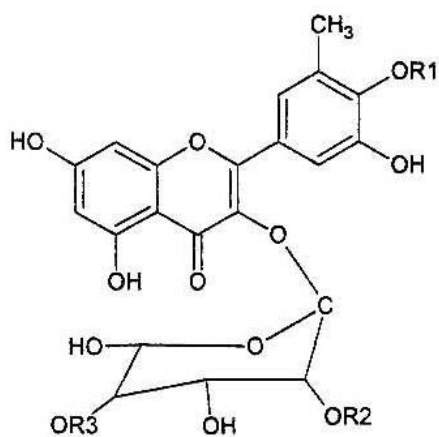


7



8

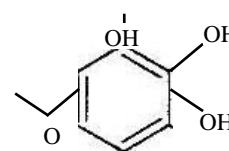
Flavonoles acetilados: Rhamnosidos (**9**), compuestos fenólicos: 3,4-dimetoxifenil-1-O-β-D(6-sulfo)-glucopiranosido (**10**).

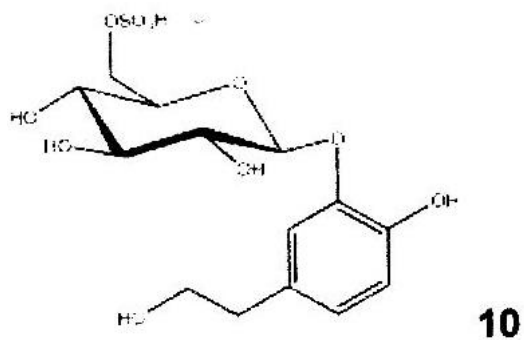


9

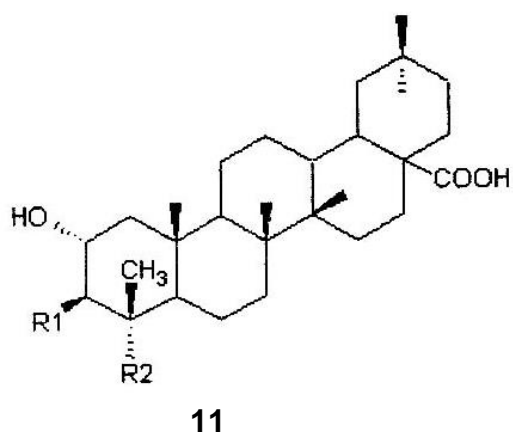
1: R1 = Me , R2 = H , R3 = -COCH₃
 2: R1 = H , R3 = -COCH₃

R2 =





Triterpenoides: Acido 3- β -cis- ρ -Cumaroiloxi-2 α ,23-dihidroxyolean-12-en-28-oico
(11)



R1	R2
1: Cis-cumaroiloxi	OH
2: trans-cumaroiloxi	OH
3: OH	Trans-cumaroiloxi

Por tanto el objetivo de la presente investigación fue determinar los fitoconstituyentes y la actividad antimicrobiana que posee la *Tessaria integrifolia*, recurso medicinal del Perú.

Cuadro 1. Compuestos aislados y actividad farmacológica de la *Tessaria integrifolia*.

Compuestos aislados	Actividad
<p>Triterpenos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acido 3β-<i>cis</i>-ρ-coumaroiloxi-2α,23,dihidroiolean-12-en-28-oico • Acido 3β-<i>trans</i>-ρ-coumaroiloxi-2α,23,dihidroiolean-12-en-28-oico • Acido 23-<i>trans</i>-ρ-coumaroiloxi-2α,23,dihidroiolean-12-en-28-oico • 7,12-dimetilbenz[α]antraceno • Acido Gálico 	<p>Contra el cáncer</p> <p>Prevención del cáncer</p>

Cuadro 2. Compuestos aislados y actividad farmacológica de la *Tessaria integrifolia*.

Compuestos aislados	Actividad
<ul style="list-style-type: none"> • Eugenol 	En la citotoxicidad, la inducción del apoptosis, y la fragmentación del DNA.
<ul style="list-style-type: none"> • Acetileugenol • β-carofileno • Salicilato metílico • Isoeugenol • Metileugenol • α-humulene 	Contra los huevos y las hembras del capitis de <i>Pidiculus</i> .
<p>Taninos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eugeniina • Casuarictina • 1,3-di-O-galloil-4,6-(S)-hexahidroxidifenoil-β-D- 	Insecticida contra la termita japonesa

glucopiranosas • Tellimagrandinal Cromenos Biflorina e isobiflorina	
• Aceite esencial • Acetileugenol • Metileugenol • Isoeugenol	Anticonvulsivo Antiepiléptico Contra ácaros de polvo
• Extracto etanólico	Gastritis
• Oxido β -cariofileno • β -cariofileno • α - α -humuleno • Epóxido del α - α -humuleno • Eugenol	Desintoxicación del hígado Anticancerígeno Antioxidante
• Linalool	Antihongos

Cuadro 3. Compuestos aislados y actividad farmacológica de la *Tessaria integrifolia*.

Compuestos aislados	Actividad
• Extracto etanólico	Hipoglucemiante
Flavonol • Miricetin-3-O-(4"-O-acetil)-3 α -ramnopiranosido (1) Acetileugenol	Hipoglucemiante
Dos glucosidos acetilados del flavonol y 15 polifenoles. Los compuestos nuevos son: • 3-O-(4"-O-acetil)-3 α -L-ramnopiranosio del mearnsetina • 3-O-(4"-O-acetyl-2-O-galoil)- α -L-ramnopiranosio	Hipoglucemiante
• Acido gálico	Antioxidante

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Material de estudio

Las plantas de *Tessaria integrifolia* R. et P. fueron colectadas de la ribera del río Moche del valle Santa Catalina, provincia de Trujillo, región La Libertad (Anexo 1 y 2) las que se encuentran registradas en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, código 17612.

La cepa de *Leishmania peruviana* fue proporcionada por el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

2.1.2. Materiales y Equipos

Molino casero

Rotavapor

Bomba al vacío

Balanza de precisión

Estufa

Equipo soxhlet

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Recolección y secado de la planta

Inicialmente se realizó el secado parcial de las plantas bajo la sombra y sobre papel periódico; luego, se separaron las flores manualmente y se secaron a 40°C en una estufa hasta peso constante (Sagástegui, A. 1995).

2.2.2. Pulverización de los pétalos y preparación de los extractos

La pulverización de 320 g de pétalos de *T. integrifolia* R. & P. se realizó utilizando un molidor mecánico. La muestra pulverizada fue sometida a maceración con metanol a temperatura ambiente y agitación (3 veces al día), durante una semana. El solvente fue removido en un evaporador al vacío (20 mm Hg) y, luego, en la estufa a 45°C, se obtuvo un concentrado viscoso de color marrón (24,3 g) (Bolaños, C.; Gutiérrez, A. 1999).

2.2.3. Pruebas biológicas in vitro

La cepa de *Leishmania peruviana* fue mantenida en medios de cultivo in vitro (NNN o Agar Sangre) mediante repiques sucesivos, cada 7 a 15 días, en tubos de cultivo tapa rosca; a 27°C (Marín, E. 2000).

2.2.4. Disolución del extracto

Con dimetil sulfóxido (DMSO) al 1,6% se prepararon soluciones del extracto en las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12, 5, 6, 25 y 3,125 mg/mL (Marín, E. 2000).

2.2.5. Obtención de parásitos y enfrentamientos al extracto

Los parásitos fueron colectados en la fase logarítmica de crecimiento. Se realizaron diluciones 1:10 para el recuento de los promastigotas en una cámara Neubauer y se ajustó a una concentración de 1×10^5 parásitos/mL. Con una micropipeta se introdujo 100 μ L de parásitos en cada pozo de una placa estéril de microtitulación, equivalente a 100 000 parásitos, e inmediatamente se añadió la misma cantidad de extracto. En los pozos testigo, se sustituyó la droga por SSF y como droga de referencia se utilizó el estibogluconato de sodio. Luego se llevó a estufa de cultivo a 27°C para realizar las lecturas a las 24 y 72 horas (Marín, E. 2000).

2.2.6. Determinación de la actividad antileishmiásica sobre Promastigotas

Se utilizó la siguiente escala:

++++	:	Lisis total
+++	:	Inmovilidad y falta de desarrollo
++	:	Disminución de la motilidad
-	:	Parásitos en condición similar a los testigos

2.2.7. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli*

La bacteria *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) se aisló de una persona que adolecía una faringitis y *Escherichia coli*. fue aislada de muestras de infección del tracto urinario. Ambas cepas bacterianas se incubaron en agar nutriente (Valverde, J. 1998).

2.2.8. Ensayo de la Actividad Antibacterial

Los cultivos bacterianos fueron cultivados en un medio agar sangre de oveja al 5% (SBA) y luego inoculados en agar Mueller-Hinton (LMP) para la prueba. Después de la primera incubación los microorganismos se suspendieron en 10 mL en agua destilada y su concentración equilibrada a un estándar de 0,5 Mc Farland. Con un bastoncillo de algodón estéril, cada muestra fue transferida a discos de papel Muller –Hinton Agar. Six mm Lank saturados con cada extracto en estudio, y aplicados sobre la superficie del medio. La Amikacina fue utilizada por ser el antibiótico disponible con eficacia contra la *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*. Además Se utilizaron discos con agua destilada y con etanol como controles negativos. Seguido Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas, las zonas de inhibición que aparecen alrededor de los discos fueron medidas y registradas en mm. Se realizaron tres repeticiones para cada muestra. (Valverde, J. 1998).

2.2.9. Análisis fitoquímico preliminar

Se realizaron ensayos fitoquímicos preliminares, empleando el método de ensayos a la gota. A partir de 2,0 g de concentrado viscoso, se obtuvieron extractos con cloroformo, metanol y agua, para determinar metabolitos secundarios. En el extracto clorofórmico, se realizaron ensayos para esteroides (Liebermann-Burchard) y quinonas (Borntrager); en el metabólico, ensayos para esteroides (Liebermann-Burchard), flavonoides (Shinoda), compuestos fenólicos (cloruro férrico) y alcaloides (Dragendorff y

Mayer); y en el extracto acuoso, flavonoides (Shinoda), taninos (cloruro férrico), saponinas (espuma) y leucoantocianidinas (Bolaños, C. ; Gutiérrez, A. 1999).

2.2.10. Obtención de Espectros

El análisis espectroscópico de Resonancia Magnética de Protón (RMN¹H) se llevó a cabo en una equipo Bruker de 200MHz usando cloroformo deuterado como solvente. Se obtuvieron sus espectros RMN¹H.

III. RESULTADOS

A las 24 horas, el extracto metabólico de los pétalos de *Tessaria integrifolia* “pájaro bobo”, a la concentración de 100 mg/mL, originó lisis de los promastigotas de *Leishmania peruviana* y, a la misma concentración, el estibogluconato de sodio solamente originó inmovilidad y falta de desarrollo, indicando un mayor efecto antileishmaniásico del extracto vegetal. A las concentraciones de 50 y 25 mg/mL de extracto metabólico, se observó inmovilidad y falta de desarrollo, efecto similar al originado por la droga de referencia (100 mg/mL). A las concentraciones de 12,5; 6,25 y 3,125 mg/mL la motilidad disminuyó, situación esperada por que existe mucha diferencia respecto a la concentración del estibogluconato de sodio (Cuadro N° 4).

A las 72 horas, el efecto de 100 mg/mL del extracto metabólico de los pétalos de *Tessaria integrifolia*. “pájaro bobo” continuó siendo el mismo (lisis de promastigotas de *L. peruviana* en comparación con estibogluconato de sodio); y en las demás concentraciones originaron inmovilidad y falta de desarrollo, efectos similares al ocasionado por el estibogluconato de sodio; implicando que es necesario un mayor tiempo para que actúen los metabolitos presentes en el extracto y mejorara los resultados (Cuadro N° 4).

Los fitoconstituyentes encontrados en *Tessaria integrifolia*, son esteroides, flavonoides y fenoles (Cuadro N° 5).

Los compuestos encontrados en las fracciones etanólicas (E1, E6 y CF6) se encuentran explícitos en el cuadro N° 6.

**CUADRO 4.: ACTIVIDAD IN VITRO DEL EXTRACTO METANOLICO DE LAS
FLORES DE *Tessaria integrifolia* R. et P. SOBRE PROMASTIGOTAS DE
Leishmania peruviana.**

LECTURA Repetición mg/mL)	24 HORAS					72 HORAS				
	T	1	2	3	S*	T	1	2	3	S*
100	-	+++	+++	+++	+++	-	++++	++++	++++	+++
50	-	+	+++	+	+++	-	++++	+++	+++	+++
25	-	+++	+	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
12,5	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
6,25	-	++	++	++	+++	-	+++	+++	+++	+++
3,125	-	++	++	++	+++	-	+++	+++	+++	+++
		++	++	++						

* La única concentración de Estibogluconato de Sodio usada como referencia fue de 100 mg/mL.

Donde:

- T = Testigos (Promastigotas en movimiento)
- 1 = Primera Repetición
- 2 = Segunda Repetición
- 3 = Tercera Repetición
- S = Estibogluconato de Sodio
- ++++ = Lisis total
- +++ = Inmovilidad y falta de desarrollo
- ++ = Disminución de la motilidad
- = Similar condición a los testigos

**CUADRO 5.: FITOCONSTITUYENTES DETECTADOS EN LAS FLORES DE
Tessaria integrifolia R. et P. UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES**

Ensayo	Extracto Cloroformo	Extracto metanol	Extracto acuoso
Esteroides	+	+	
Quinonas	-		
Flavonoides		+	+
Fenoles		+	+
Saponinas			-
Leucoantocianidinas			-
Alcaloides		-	

Leyenda: (+)Presencia (-) Ausencia

**CUADRO 6.: COMPUESTOS ENCONTRADOS EN LAS FRACCIONES E1 E6 y
CF2 de la *Tessaria integrifolia*.**

Fracción	Compuesto	T (min)	Peso Molecular
E1	Trans-12, 13-Epoxiestearato de metilo	20,280	354
E2	Acido 3-Nitro-1,2-benzenodicarboxilico	20,245	279
E4	(1 α R,S,4 α β , 7 α α , 7 β β)-Decahidro-1,1,7-trimetil-4-metilen-1H-ciclopro[e]azulen-7- α -ol. S-1, de nombre vulgar Espatulenol.	11,563	220
E5	Metil crommato	23,140	321
E6	Metil crommato	23,140	321
FCF2	Espatulenol	11,563	220

Actividad Antibacterial

El ensayo antibacterial del extracto clorofórmico puro y la fracción FCF2 frente a la *Staphylococcus aureus* fue positivo.

La prueba con la *Escherichia coli*. dio resultado negativo con el extracto clorofórmico (ECF) puro y las fracciones FCF1, FCF2, FAE1 y FHex. La inhibición del control, Amikacina mostró una zona de al menos 7 mm después de 24 horas de exposición en todos los ensayos de prueba. Especies de plantas que presenten como mínimo 7 mm, se consideran antibacterialmente activos. El halo mostrado con la fracción FCF2 es de 12 mm y del extracto clorofórmico puro (ECF) es de 8 mm, por lo que se considera prueba positiva para la actividad antibacterial frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*. Bolaños, C. 1999.

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos; son únicos, pues, no existen publicaciones relacionadas al efecto antileishmaniásico de la especie en estudio. Existen trabajos utilizando extractos de vegetales contra protozoarios parásitos como *Tripanosoma*; sin embargo, contra *Leishmania* son escasos.

Se ha determinado la estructura de algunos compuestos antileishmaniásicos en especies vegetales; entre ellos: la plumbagina y dos bis-naftoquinonas, 3,3-biplumbagina y 8,8-biplumbagina; la diospirina; una bis-naftoquinona (aislada de *Diospyros montana*, activa contra *Leishmania donovani*); lactosas; y compuestos quinónicos, son los que mejores resultados han arrojado (Anexo 3).

Los ensayos con extractos brutos ayudan a tener una referencia sobre lo que posteriormente se podría investigar con mayor profundidad con los principios activos puros de la especie en estudio. Por ello, se consideró importante realizar un ensayo fotoquímico preliminar de *Tessaria integrifolia*. R. et P. para determinar sus metabolitos secundarios. De acuerdo a los resultados mostrados en el Cuadro N° 5, se evidencia la presencia de esteroides, flavonoides y fenoles. Los esteroides y flavonoides ya han sido reportados como fitoconstituyentes del extracto etanólico de *Plumbago scandens* L. “solemanillo” o solemanillo de flores moradas”, planta utilizada para el tratamiento de leishmaniasis cutánea o “uta” en zonas rurales andinas de Contumazá, Cajamarca, Perú (Sagástegui, A. 1995).

En la literatura se han reportado flavonoides de origen vegetal como bracteína, luteolina, quercitina, amentoflavone con potente actividad antileishmaniásica

contra promastigotas de *Leishmania donovani* y 2-6-dihidroxy-4-methoxy charcona contra *L. amazonensis*. Dentro de los esteroides con actividad antileishmaniásica se han encontrado varios derivados de la Holacurtina y Holamina contra *L. donovani*, Sarachina contra *L. mayor* y contra *L. chagasi*. Por lo que, la presencia de flavonoides y esteroides en el extracto metabólico de la *Tessaria integrifolia* R.et.P., respaldarán los ensayos positivos antileishmaniásicos de esta especie. Sin embargo, el estudio debe continuar para determinar la estructura del o los principios activos y la verificación de su acción contra *Leishmania peruviana*. A la fecha, los constituyentes químicos encontrados en la parte aérea y raíz de la *Tessaria integrifolia* R. et. P. son: escualeno, acetato de b-amirino, derivados del bistienil, a-tertienilo, lignano, sesquiterpenos, flaconas y ácido cafeoilquínico; sin embargo, falta determinar aquellos que poseen actividad antileishmaniásica (Anexo 5 y 6).

La medicina tradicional a menudo utiliza hierbas y es ampliamente utilizada en todo el mundo, pero aún es difícil establecer que tan efectivas realmente son y resaltar que plantas son fuente importante de nuevos fármacos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores y sería importante incorporar a *T. integrifolia* dentro de las plantas medicinales que se utilizan en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea o "uta"; podría servir como base para la síntesis de nuevas drogas, de origen vegetal, que ayuden a aliviar esta enfermedad (Cuadro N° 4).

Si bien los estudios in vitro sirven de base para el inicio de la investigación, la utilización de modelos animales constituye la parte más importante del proceso experimental y los resultados que ofrezcan se aproximarán más a la realidad;

pues, en los tejidos del ser humano es donde se evidencia el daño producido por *L. peruviana*. Siendo el “hámster” *Mesocricetus auratus* altamente susceptible a varias especies de Leishmania, sin que ocurra la cura espontánea y por haber sido utilizado en modelos experimentales anteriores para trabajos similares, es conveniente continuar con las investigaciones respecto a ésta especie vegetal (Cuadro N° 4).

La muestra seca y molida fue sometida a maceración con cloroformo por espacio de 7 días y se obtuvo un extracto (ECF) verduzco pastoso (Miranda, H. 2000). de 52,638 g (2,63%) del cual se usó 10 g para ser sometidos a una columna líquida al vacío (CLV), usando como eluyentes hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol; de esta columna cromatográfica se logró separar seis fracciones FHex, FCF1, FCF2, FAE1, FAE2 y FME1 siendo las fracciones FCF2 y FAE2 las de mayor peso (2,469 g, 2,60 g). Coincidiendo con (Aguilar, 2009 – Tesis Doctoral).

Con el extracto clorofórmico (ECF) se realizó ensayos a la gota identificándose la presencia de flavonoides compuestos fenólicos, esteroides y taninos; confirmando lo que se ha reportado en los estudios realizados para especies de esta familia como se muestran en los cuadros 2, 3 y 4. Los ensayos para los alcaloides dieron positivo solo en dos pruebas, Dragendorff y Mayer, pero negativo con Wagner por lo que no se puede afirmar que existe presencia de alcaloides; la prueba de espuma fue negativa por lo que la presencia de saponinas es nula (Tejada, A.; Córdova, P.; Aliaga, L. 1995).

Los ensayos a la gota realizados con las fracciones demuestran la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, estructuras terpenoidales y taninos para las

fracciones FCF1, FCF2, FAE1 y FME1. En la fracción FAE2 la presencia de flavonoides es nula y en ninguna de las fracciones se encontró presencia de alcaloides y saponinas como puede apreciarse en el cuadro 5.

Los compuestos identificados en E1 y E2 corresponden a ácidos grasos. Como puede observarse en los espectros de masa que aparecen en las Figuras 6 y 7. Los tiempos de retención (tr) son: 20,280 min, 20,245 min y los pesos moleculares de 354 y 279 g/mol respectivamente. En la fracción E4 se identificó un sesquiterpeno con un tiempo de retención de 11,563 y peso molecular 222 g/mol como puede apreciarse en el espectro de masa de la Figura 7. En E5 y E6 se identificó un triterpeno con tiempo de retención 23,140 min y peso molecular 321 como puede leerse en el Anexo 7 y 8. En la fracción FCF2 se identificó el mismo sesquiterpeno que en E4. En E3 no fue posible identificar alguna estructura.

Una de estas fragmentaciones (a) involucra la pérdida del anillo de ciclopentano junto con un átomo de hidrógeno, el ión formado tiene un m/z 147 (31%). La pérdida de CH₃ da origen al fragmento m/z 205 (48%), luego la pérdida de H₂O origina un m/z 187 (19%), sucesivas desmetilaciones y transferencias de hidrógenos origina los iones m/z 173 (20%) y m/z 159 (41%) Anexo 9.

La ruptura (b) es una ruptura alílica que confirma al grupo metilen en el segundo anillo, m/z 138, la posterior pérdida de H₂O y CH₃ evidencia la presencia de estos en el anillo de ciclopentano. La pérdida de C₅H₈ y la formación del ión m/z 150 y posterior desmetilación y deshidratación origina el fragmento m/z 119 (59%) Anexo 9.

Las fragmentaciones en su espectro de masas indicadas en el esquema nos llevan a proponer al compuesto S-1, el sesquiterpeno (1 α R,S,4 α β ,7 α α ,7 β β)-Decahidro-1,1,7-trimetil-4-metilen-1H-ciclopro[e]azulen-7- α -ol.

La comparación con los datos bibliográficos confirman que se trata del sesquiterpeno de nombre vulgar Epatulenol (Fourneth, A.; Muñoz, V.; Angelo, A. 1998).

V. CONCLUSIONES

- La hoja de *Tessaria integrifolia* R. et P. presenta esteroides, flavonoides y fenoles.
- La flor *Tessaria integrifolia*. R. et P. tiene, flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides, taninos y compuestos terpenoidales.
- El extracto metanólico de las flores de *Tessaria integrifolia* R. et P. posee mejor actividad antileishmaniásica in vitro que el estibogluconato de sodio sobre promastigotas de *Leishmania peruviana*.
- La actividad antileishmaniásica de *Tessaria integrifolia* R. et P. se atribuye a los flavonoides y esteroides presentes.
- La fracción FCF2 presentó actividad antibacterial frente a *Staphylococcus aureus*.
- De las fracciones E1 y E2 fueron identificados los compuestos Trans-12, 13-epoxiestearato de metilo, Espatulenol, Metilcromate.

VI. PROPUESTA

Son muchos los elementos que deterioran el medio natural, y muchas las actividades del hombre que tienen consecuencias negativas en los recursos naturales de la Tierra. Entonces, cada vez es mayor el número de alarmas que alertan de los riesgos, no existe ningún medio que no esté afectado, o con grandes posibilidades de afectarse, y no existe ninguna solución que garantice la plena resolución de los peligros.

El vertido de sustancias tóxicas se hace cada año más incalculable, los organismos nacionales e internacionales publican cifras aproximadas, que siempre se refieren a millones de toneladas. Esta llegada de miles de compuestos químicos, creados en laboratorios y utilizados por las industrias, altera el funcionamiento de los ecosistemas y atenta contra la salud de sus habitantes.

Son cada vez mayores las conexiones entre contaminación y salud, ya nadie duda, que no se puede soslayar el hecho de que un ambiente contaminado provoca numerosas enfermedades, desde las relacionadas con la piel o el aparato respiratorio (alergias, dermatitis, asma), a procesos mucho más graves de tipo degenerativo. Como consecuencia de esta situación, la comunidad científica y los poderes públicos deben establecer estrategias para luchar contra la contaminación y su repercusión en nuestra calidad de vida.

Para lograr estas metas, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la Agencia Europea del Medio Ambiente, han establecido programas a escala

mundial que propugnan un ambiente más sano. En ellas se analizan los distintos componentes del medio natural, y su relación con la deposición de residuos peligrosos, tanto en organismos animales y vegetales. Las plantas y su capacidad de absorción y biotransformación son las adecuadas para tratar dichos ambientes o cumplir una función de toxificadora, incluso en el hombre; consumiéndose fresca o procesada; aprovechando así los fitoconstituyentes con diferentes implicancias sobre la salud.

Que tu ambiente sea tu medicamento, reza un dicho y afortunadamente una buena alimentación trae consigo la prevención de enfermedades sobre todo las consideradas de interés público como son las relacionadas al metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, así también como las virosis y parasitosis entre ellas la “uta”, transmitida por el vector *Lutzomyia*, mosquito endémico de nuestra serranía.

La precariedad organizativa, la poca asistencia en los programas de salud pública y la escasez económica hacen que muchas personas con enfermedades, se traten con la medicina popular a base de infusiones de plantas medicinales de uso tradicional; sin embargo los resultados son diversos; en algunos casos exitosos y en otros pocos efectivos quizá por falta de conocimiento al uso correcto o a la parte a utilizar de la planta, con sus bondades terapéuticas; cual sea el caso es muy importante conocer tal efecto e interrelacionar causa-efecto, por tal motivo es importante rescatar tal costumbre ancestral, pero con apoyo de la ciencia, evaluar, clasificar y corroborar su efecto utilizando el método de la ciencia, ver, observar y describir.

Bajo esta perspectiva, se propone el programa de protección y estudio fitoquímico de las plantas medicinales en la Región La Libertad.

6.1. OBJETIVOS:

6.1.1. OBJETIVO GENERAL

- Protección y estudio fitoquímico de las plantas medicinales de la Región La Libertad.

6.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Inventariar las plantas de uso medicinal de cada provincia de la Región.
- Clasificar las plantas de uso medicinal según su uso popular en cada provincia de la Región.
- Revisar estudios fitoquímicos de planta de uso medicinal.
- Caracterización fitoquímica preliminar de las principales plantas de uso medicinal con potencial en enfermedades de salud pública.
- Análisis fitoquímico molecular a las plantas de uso medicinal de interés en salud pública.
- Producir un Vademecum de Plantas Medicinales de la Región La Libertad, señalando, distribución, fitoconstituyentes y acción farmacológica en enfermedades de salud pública.

6.2. PROGRAMA DE PROTECCIÓN DE PLANTAS DE USO MEDICINAL DE LA REGIÓN

Dada la problemática ambiental y la contaminación de nichos ecológicos, como los lagos, lagunas y ríos es preciso de desarrollar planes de recuperación y monitoreo ambiental, preservando así las especies en peligro o amenazadas de extinción, perdiéndose valioso material genético y con ello la oportunidad de obtener nuevas moléculas de interés para la industria farmacológica, en beneficio de la humanidad y oportunidad de mejora de la salud por medicinas nuevas y de escasas o nulas resistencias terapéuticas.

6.2.1. SUBPROGRAMA: INVENTARIO Y CLASIFICACIÓN DE LAS PLANTAS DE USO MEDICINAL

Es preciso contar con un inventario y clasificar las plantas según su uso medicinal para catalogar y sistematizar la información, mejorando así el conocimiento de éstas, sacando mejor provecho del conocimiento ancestral del uso de las mismas, para lo cual será necesario, elaborar encuestas y modelos de recopilación de datos para luego tabular y analizar la información, por ello es preciso recurrir a la fuente de la información como son los mercados de abastos de plantas medicinales y/o a curanderos y público en general.

6.2.2. SUBPROGRAMA DE CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR Y MOLECULAR DE LAS PRINCIPALES PLANTAS MEDICINALES CON POTENCIALIDAD EN SALUD PÚBLICA

Las potencialidades farmacológicas de las plantas están en relación directa a sus fitoconstituyentes por ello se pretende hacer una caracterización fitoquímica, primero desde el punto de vista cualitativo, preliminar y segundo; a aquellas con mejores potencialidades farmacológicas hacer un screening cuantitativo de sus propiedades fitoquímicas, logrando con ello conocer la molécula implicada en la farmacocinética y farmacodinámica; en tal sentido se orientará la investigación a aquellos metabolitos implicados en problemas de salud de interés público, ya que aquellas se presentan como un peligro social y económico desde el punto de vista gubernamental, ya que implica el desarrollo de programas y políticas del sector salud.

6.3. PROGRAMA DE POLÍTICA Y LEGISLACIÓN EN LA PROMOCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN LA MEDICINA TRADICIONAL

Ningún programa o subprograma de los planteados anteriormente será posible si no se establece un marco legal, serio, claro y aplicable a la realidad local y regional, por ello el gobierno regional y nacional del Perú a través de DIGESA, Ministerio de Salud y Ministerio de la Producción deberán orientar sus políticas y Legislación a la protección, preservación e investigación de nuestros recursos de medicina tradicional impulsando la creación de Centros de Investigación, la capacitación y pasantías profesionales en peritos con un alto desarrollo farmacológico, así mismo un

incentivo a los Centros de Educación Superior que realicen investigación en medicina tradicional , pudiendo ser apoyo logístico, técnico-científico y porque no equipamiento e infraestructura acorde a la realidad; otra alternativa puede ser declarar áreas protegidas a zonas o lugares que cuenten con un rico y amplia variedad de plantas de uso médico popular.

En la actualidad se cuenta con programas de rescate de medicina tradicional en algunos lugares de nuestra Región como son Otuzco, Huamachuco, Pataz y Bolívar, lugares muy arraigados en el uso de plantas medicinales, por tal motivo las Facultades de Ciencias de la Salud deben impartir cursos para sus estudiantes de medicina tradicional peruana, ya que en algún momento ellos interrelacionarán con los diferentes estratos socio culturales de la Región y del País; logrando conocer sus costumbres de cada poblador.

A pesar del esfuerzo del Gobierno Regional, DIGESA y el Gobierno Nacional, se avanzado muy poco, en tal sentido, por ello se requiere políticas más agresivas y mayor incentivo en la promoción de la investigación en medicina tradicional peruana. Aprovechando así un legado ancestral en favor de nuestra ciencia y tecnología nacional.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atías, A.; A. Neghme. 2003. Parasitología Médica. Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago, Chile.

Botero, D.; Restrepo M. 1998. Parasitosis Humanas. 3^a edición, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

Cordero, F.; J. Zevallos.; M. Sihuincha. 1991. Aspectos epidemiológicos de la leishmaniasis tegumentaria americana en el distrito de Santa Cruz-Ancash. Diagnóstico, 28:11-14.

Perez, J.; E. Oguzuku.; R. Inga.; M. López.; J. Monje.; L. Paz. 1994. Natural Leishmania infection of Lutzomyia sp. In Perú. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg., 88:161-164.

Organización Mundial de la Salud. 1990. Lucha contra las leishmaniasis: Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Serie de informes Técnicos No. 793, Ginebra.

Houin, R., T. Fusai ; T. Bories ; M. Paul ; D. Rivollet ; M. Deniau. 1993. Action of Pentamidine-bound nanoparticles against Leishmaniasis in a in vivo model. XI Congreso Latinoamericano de Parasitología-I Congreso Peruano de Parasitología, Lima, Perú.

Miranda-Cueto, H.2000. Leishmaniasis cutánea andina: principios del tratamiento abreviado mediante la saturación intralesional con antimonio de Meglumine. II Congreso Peruano de Parasitología, Trujillo, Perú.

Tejada, A.; P. Córdova; L. Aliaga. 1995. Tratamiento tópico de Leishmaniasis tegumentaria andina con utanid. II Congreso Nacional de Parasitología, Trujillo, Perú.

Carvalho, L.; M. Rocha; S. Raslan, B. Olivera; V. Krettli. 1988. In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. J. Med. Biol. Res. 21(3):485.

De Haro, E. ; C. Moretti; V. Muñoz ; M. Sauvain; E. Ruiz. 1992. Aspects de le recherche en chemotherapie antiparasitaire en Bolivia. IBBA-ORSTM STP Pharma, Practiquez, 2(3) :189-192.

Fourneth, A.; V. Muñoz; A. Angelo. 1998. Actividad in vitro de los alcaloides de tipo bisbensilico-quinoleico sobre Leishmania spp. Y Tripanosoma cruzi. Congreso extraordinario de IBBA, La Paz, Bolivia.

Fourneth, A.; V. Muñoz; A. Angelo; M. Aguilar. 1990. Plantes medicinales bolivianes antiparasitaires. Congreso Internacional de Parasitología, París, Francia.

Fournet, A.; A. Angelo; V. Muñoz; R. Hocquemiller; F. Roblot; A. Cave; P. Richommep; J. Bruneton. 1994. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids

isolated from *Galipea grandiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research*, 8:174-178.

Fournet, A.; A. Angelo; V. Muñoz; R. Hocquemiller; F. Roblot; A. Cave; P. Richommep; J. Bruneton. 1994. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea grandiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research*, 8:174-178.

Fourneth, A.; A. Barrios; V. Muñoz; R. Hocquemiller; A. Roblet. 1994. Antileishmanial activity of a Tetralone isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Planta Médica*, 60:8-12.

Marín, E. 2000. Efecto leishmanicida "in vitro" e "in vivo" del extracto foliar de *Plumbago scandens* L. "solemanillo" sobre *Leishmania peruviana*. Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro en Ciencias con mención en Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo, Perú. Presentado en el V Congreso Peruano de Parasitología, Trujillo, Octubre, 2002.

Valverde, J. 1998. Determinación de fitoconstituyentes del extracto de *Pernettya postrata* y efecto antileishmaniano "in vitro". Tesis para obtener el Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Bolaños, C.; A. Gutiérrez. 1999. Obtención del extracto foliar y estudio de la actividad leishmanicida de *Pernettya postrata* en *Mesocricetus auratus*

infectado con Leishmania peruviana. Tesis para optar el grado académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Weberbauer, A. 1945. "El mundo vegetal de los andes peruanos". Estación Experimental La Molina, Lima, Perú.

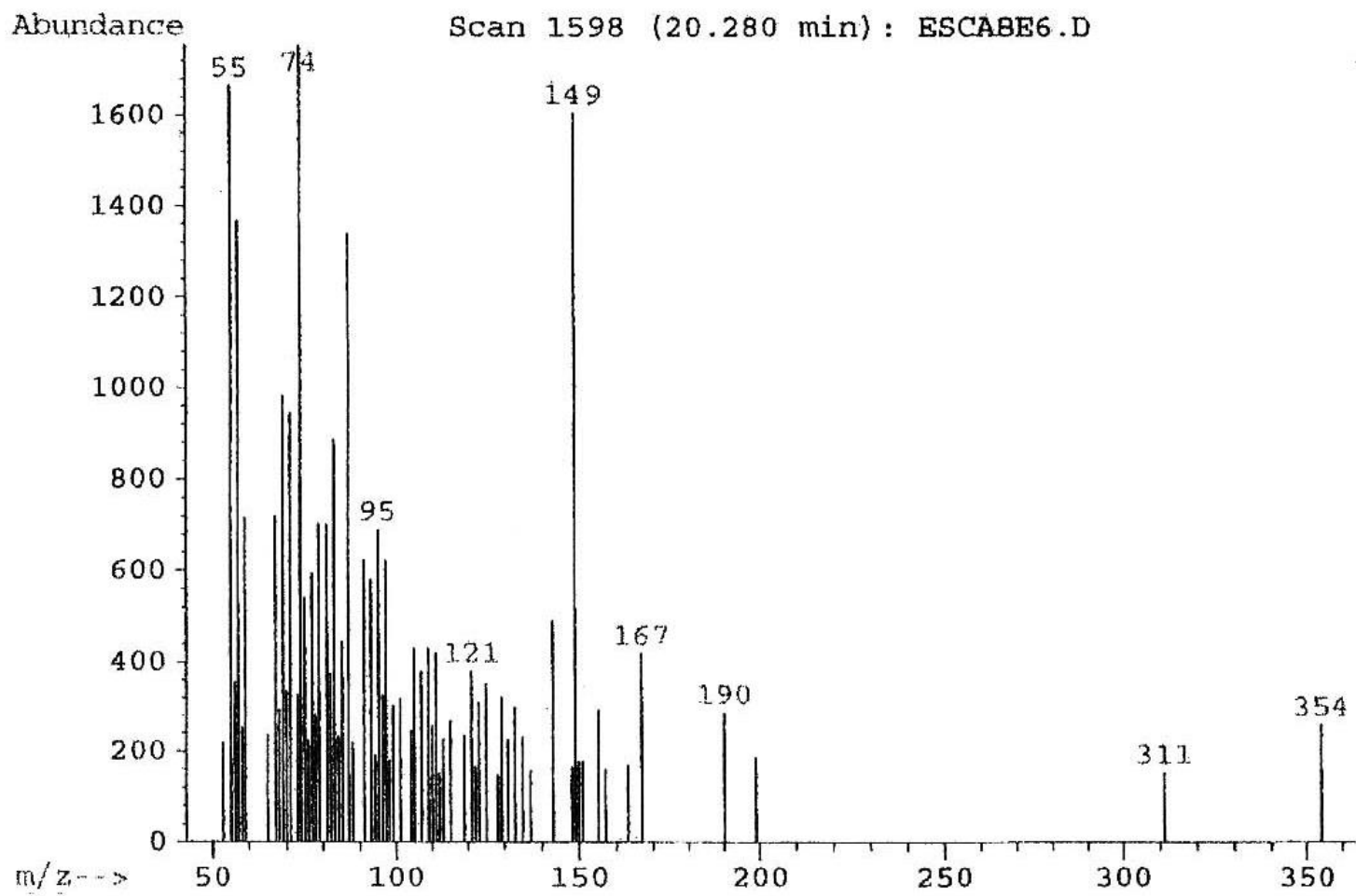
Sagástegui, A. 1995. Diversidad Florística de Contumazá. 1^a. ed., Fondo Editorial Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú.

Sagástegui, A.; S. LEIVA. 1993. Flora invasora de los cultivos del Perú-Trujillo.

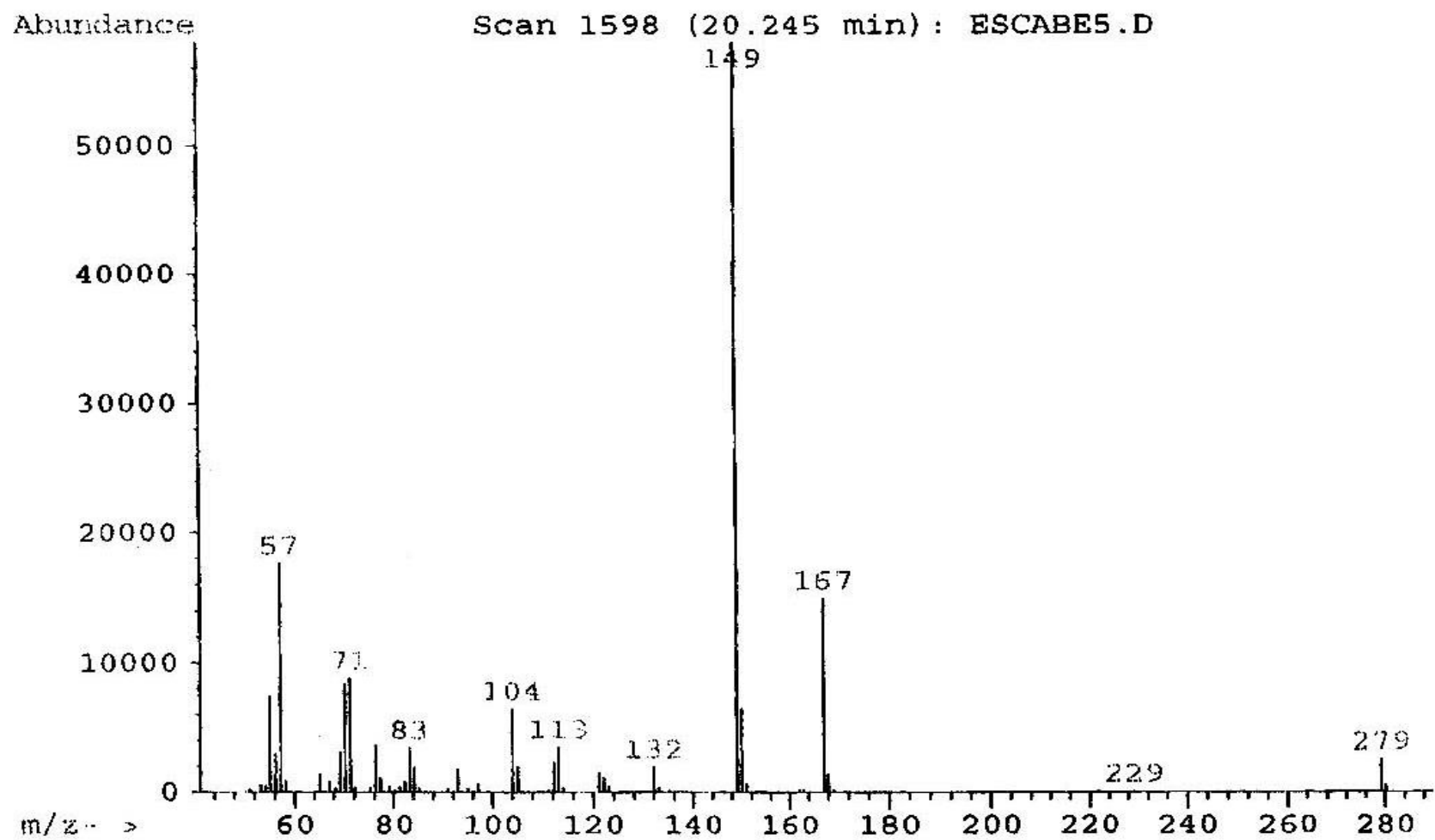
Kuskoski E.; J. Vega; J. Rios; R. Fett. Department of Analytical Chemistry, Department of Pharmaceutical and Organic Chemistry, Food Science and Toxicology, Faculty of Pharmacy, The University of Seville, 41012 Sevilla, Spain. 2000.

ANEXOS

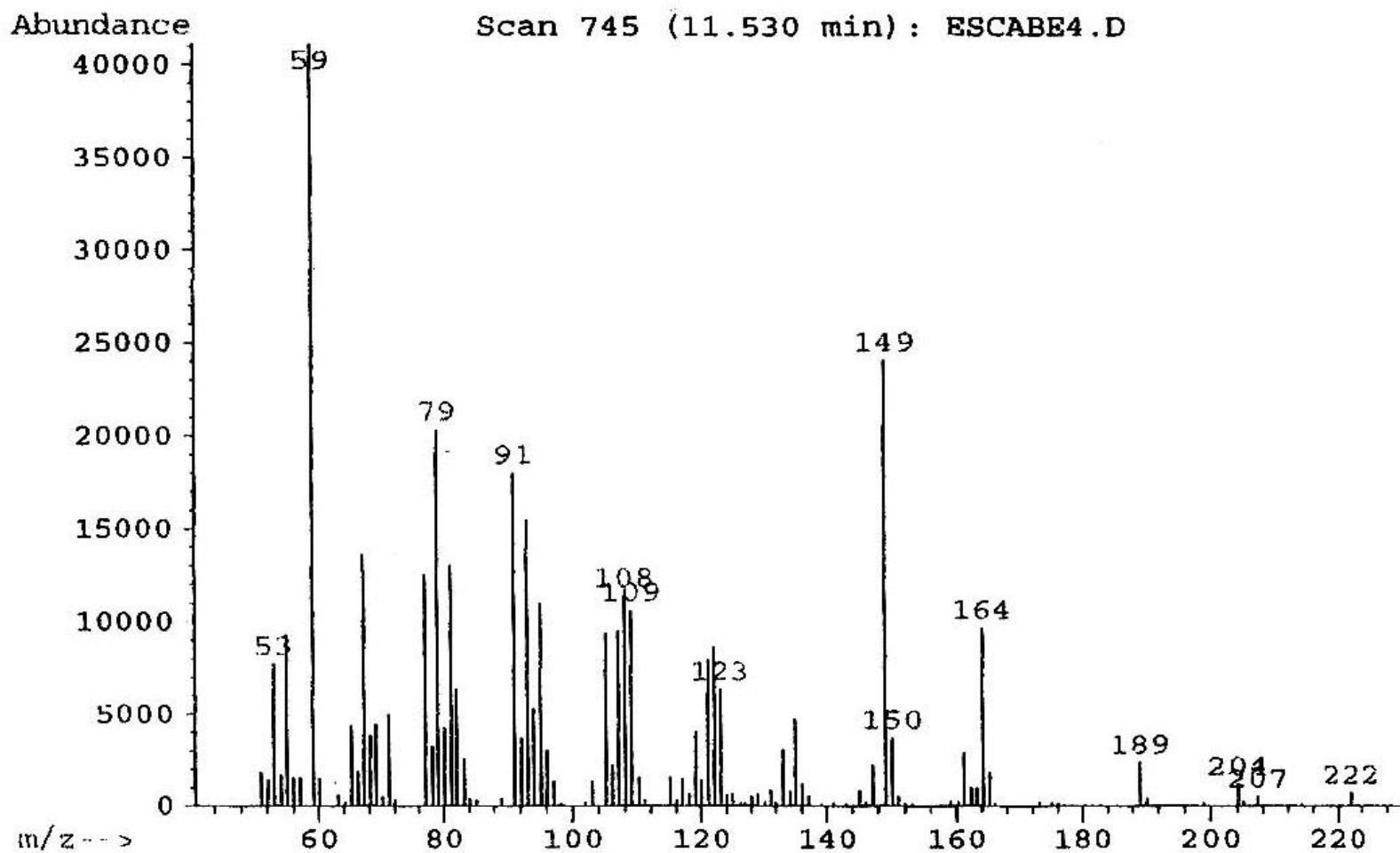
Anexo 3: Figura 1: Espectro de Masas de E1 Compuesto Trans-12,13 – Epoxiestearato de Metilo



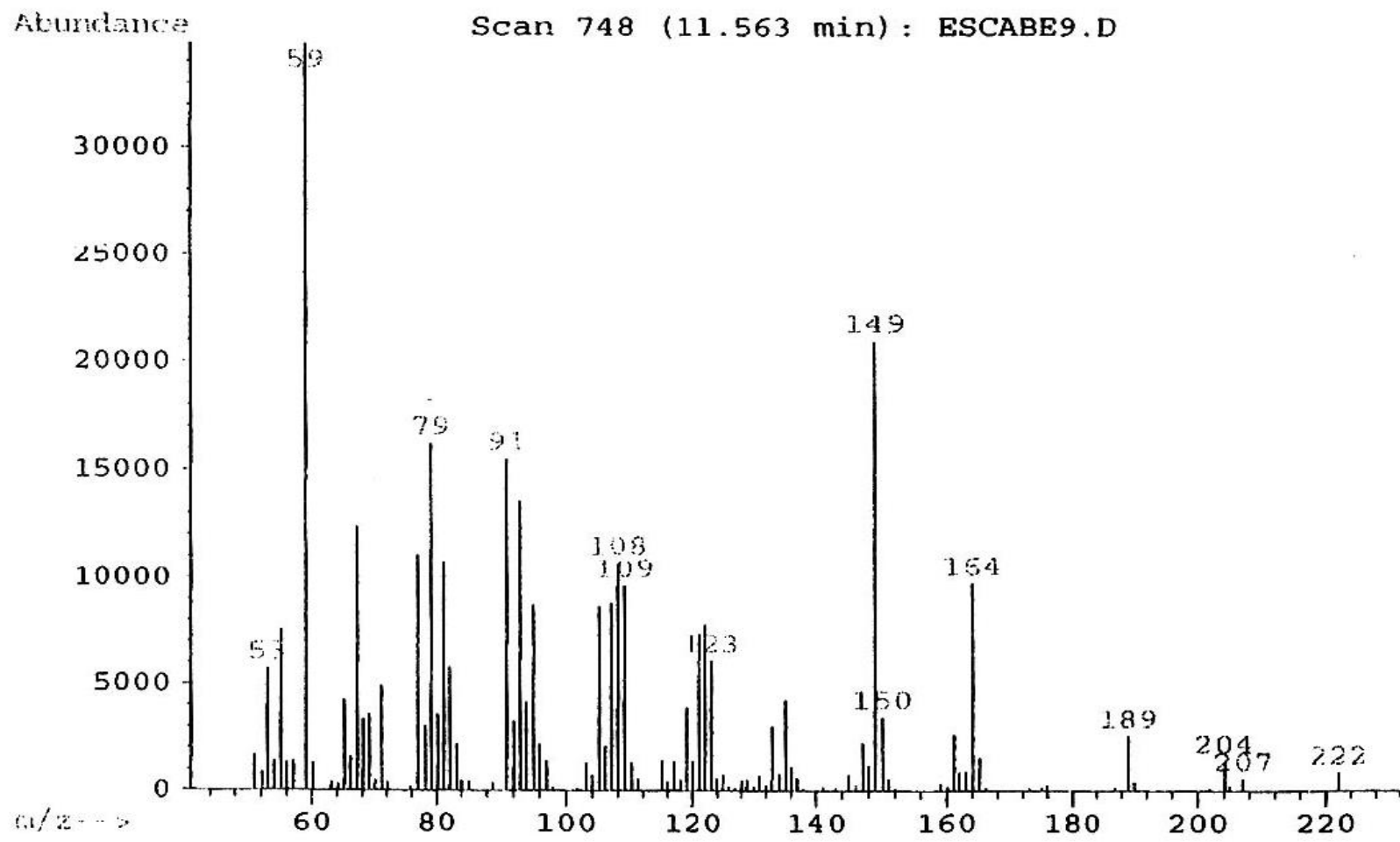
Anexo 4: Figura 2: Espectro de Masas de E2 Compuesto Acido 3-Nitro-1,2-Bencenodicarboxílico



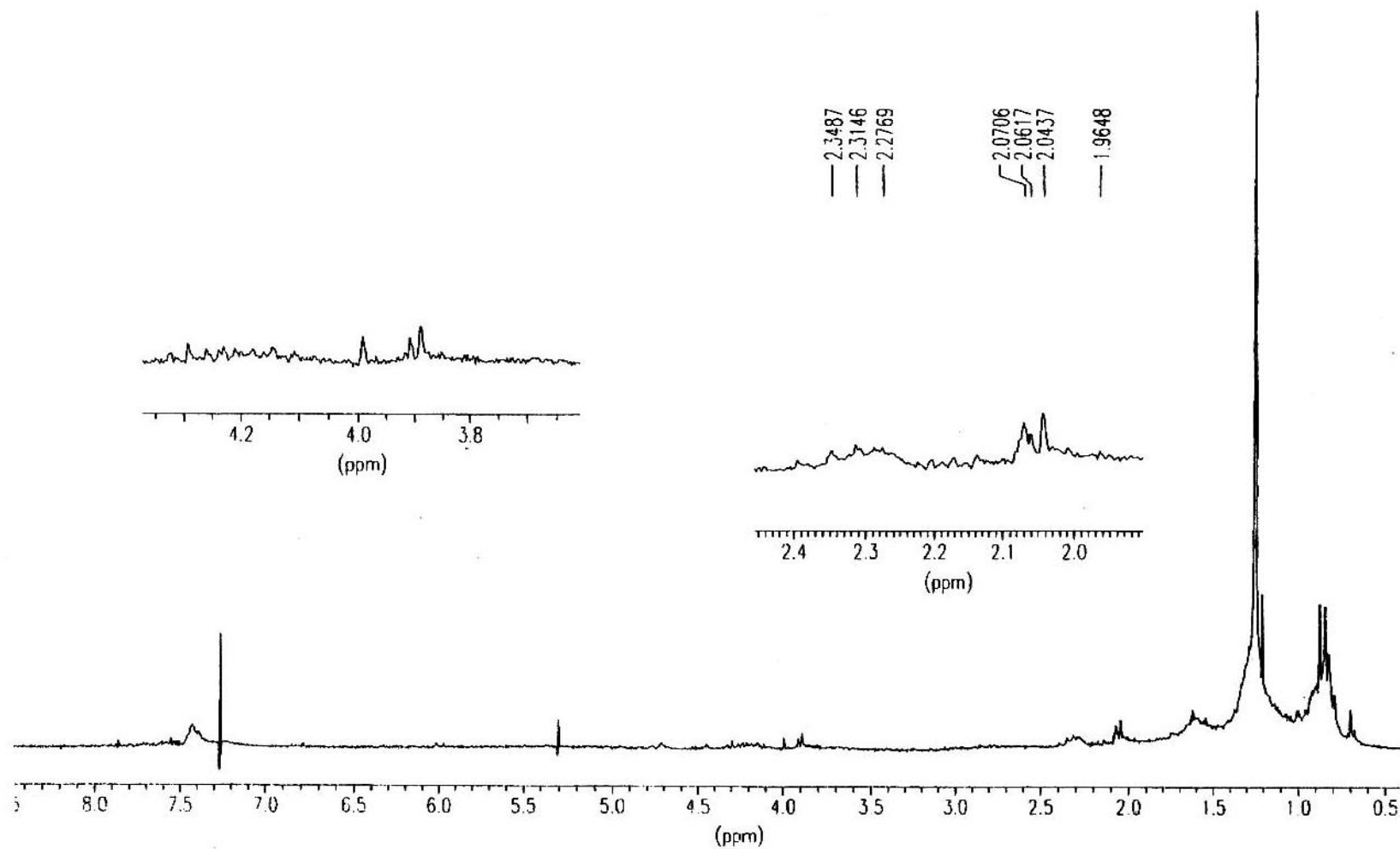
Anexo 5: Figura 3: Espectro de Masas Compuesto E4



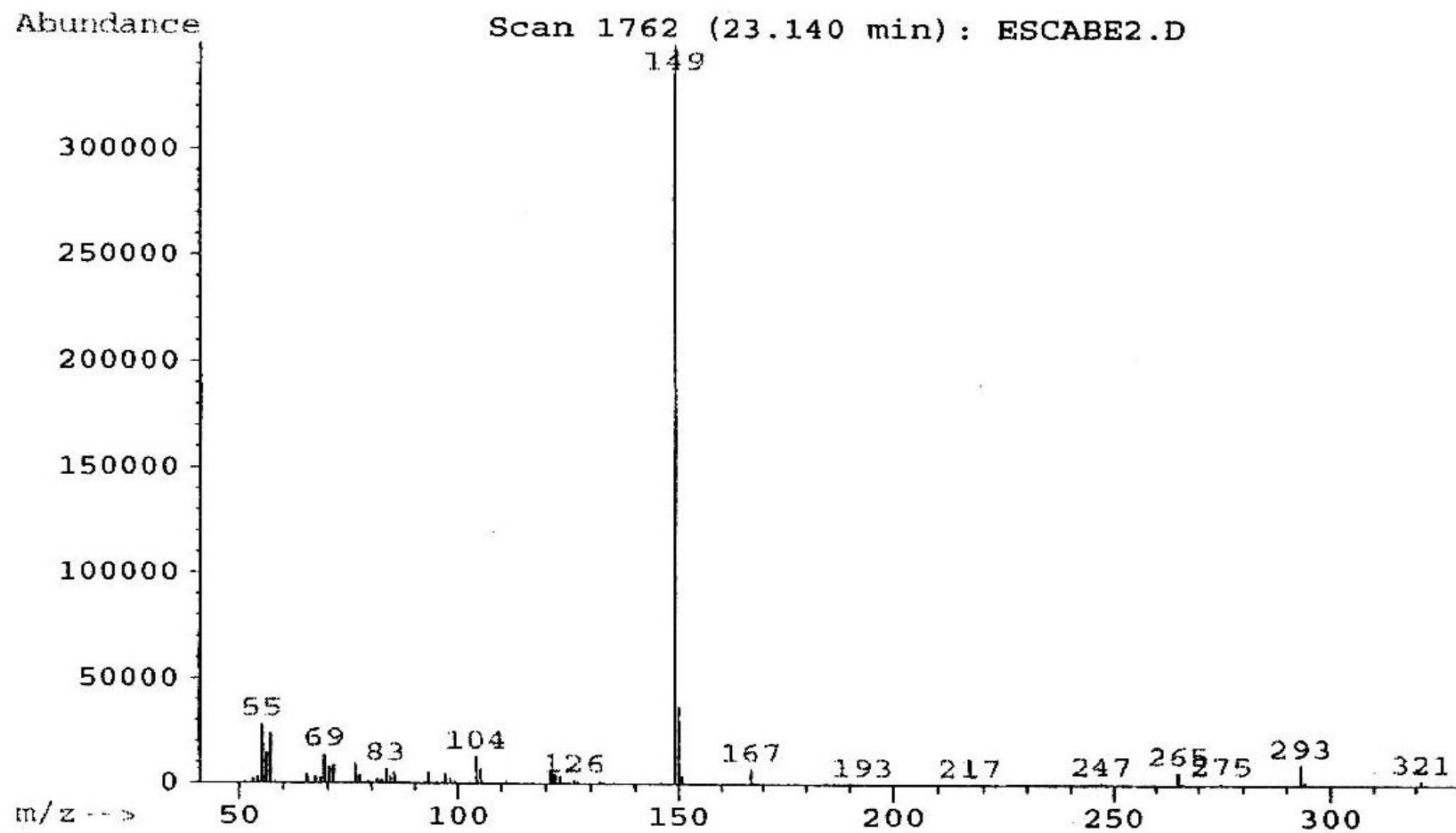
Anexo 6: Figura 4: Espectro de Masas Compuesto S-1 Espatulenol



Anexo 7: Figura 5: Espectro de Pr6ton de Compuesto S-1



Anexo 8: Figura 6: Espectro de Masas E5 y E6



Anexo 9: Figura 7: Rompimiento del Compuesto S-1

