

Artículo Original/ Original Article

<http://dx.doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2022.020.02.06>

Evaluación biológica *in vitro* del extracto etanólico de Kaa tái, *Polygonum punctatum* Elliot. (POLYGONACEAE)

Fátima Benítez-Apodaca¹ , Nilda Elizabeth Portillo-Torales² , Eliana Andrea Alvarenga-Torres² , Tomás Rodrigo López-Arias¹ , Yessica Cáceres¹, Mario Ricardo Galeano-Chena² , Rocío Lucía Beatriz Riveros-Maidana¹ , María Eugenia Laterza¹ , Bonifacia Benítez-de Bertoni¹ ,
*Gloria Yaluff^{1,2} 

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología. San Lorenzo, Paraguay

²Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina Tropical. San Lorenzo, Paraguay

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Benítez F, Portillo N, Alvarenga E, López T, Cáceres Y, Galeano R, et al. Evaluación biológica *in vitro* del extracto etanólico de Kaa tái, *Polygonum punctatum* Elliot. (POLYGONACEAE). Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2022; 20(2): 06-12

RESUMEN

En Paraguay, así como en las Américas, la leishmaniasis constituye una de las problemáticas de salud pública importante, debido a su complejidad tanto epidemiológica, clínica y biológica, afectando especialmente a los más pobres y en los países en vía de desarrollo. *Polygonum punctatum* Elliot. pertenece a la familia Polygonaceae, la medicina popular le atribuye varias propiedades, por medio de estudios anteriores se confirma que diferentes extractos de esta planta presentan actividad antibacteriana, antiinflamatoria y antifúngica. En este trabajo, se evaluó la actividad citotóxica del extracto etanólico de *Polygonum punctatum* de la familia Polygonaceae en concentraciones de 100, 50 y 25 µg/ml en células de macrófagos de ratones, en los cuales no se encontró actividad citotóxica. Además, se evaluó la actividad leishmanicida por medio de estudios experimentales *in vitro* a concentraciones de 100, 75, 50, 25, 20 y 10 µg/ml frente a tres cepas de parásitos: *Leishmania infantum*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, en los cuales se observó una actividad de 58 y 56% de lisis de parásitos con el extracto de 100µg/ml frente a las cepas de *L. braziliensis* y *L. infantum*, respectivamente y 51% para *L. amazonensis*. Estos resultados son prometedores, y aportan una base para el desarrollo y búsqueda de nuevos tratamientos para la leishmaniasis, sin embargo, son necesarios estudios posteriores en cuanto a aislamiento e identificación del compuesto y evaluación en modelos animales *in vivo*.

Palabras clave: Leishmaniasis, *Polygonum punctatum*, *in vitro*.

In vitro biological evaluation of the ethanolic extract of Ka'a tái, *Polygonum punctatum* Elliot. (POLYGONACEAE)

ABSTRACT

In Paraguay, as well as in the Americas, leishmaniasis constitutes one of the important public health problems, due to its epidemiological, clinical, and biological complexity,

Fecha de recepción: marzo 2022. Fecha de aceptación: junio 2022

*Autor correspondiente: Gloria Yaluff. Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. San Lorenzo, Paraguay.

Email: gloriayaluff@yahoo.com



Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons

especially affecting the poorest and developing countries. *Polygonum punctatum* Elliot belongs to the Polygonaceae family, and popular medicine attributes several properties to it. Previous studies confirmed that different extracts of this plant have antibacterial, anti-inflammatory and antifungal activity. In this work, the cytotoxic activity of the ethanolic extract of *Polygonum punctatum* was evaluated at concentrations of 100, 50 and 25 µg/ml in mouse macrophage cells, in which no cytotoxic activity was found. In addition, the leishmanicidal activity was evaluated through experimental *in vitro* studies at concentrations 100, 75, 50, 25, 20 and 10 µg/ml against three strains of parasites: *Leishmania infantum*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. Activities of 58 and 56% of parasite lysis were observed with the 100 µg/ml extract against strains of *L. braziliensis* and *L. infantum*, respectively, and 51% for *L. amazonensis*. These results are promising and provide a basis for the development and search of a new treatment for leishmaniasis. However, further studies are necessary regarding the isolation and identification of the compound and its evaluation in *in vivo* animal models.

Keywords: Leishmaniasis, *Polygonum punctatum*, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una zoonosis, causado por parásitos flagelados del género *Leishmania*, y es transmitida mediante la picadura de un flebótomo, dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada, pueden aparecer una variedad de manifestaciones clínicas en el ser humano. Las lesiones de esta enfermedad son causadas por distintas especies de protozoario del género *Leishmania*, y se han identificado a nivel mundial más de 20 especies; la mitad de ellas han sido encontradas en América. La forma en la que afecta la leishmaniasis en la salud, principalmente a las poblaciones más pobres, ha hecho que se encuentre dentro de las enfermedades tropicales desatendidas identificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), con una estimación anual de 1 a 1,5 millones de casos de leishmaniasis cutánea y 500.000 casos de leishmaniasis visceral⁽¹⁾. En la búsqueda de alternativas terapéuticas a esta problemática de salud se plantea el uso de las plantas, debido a que éstas han sido de mucha importancia para el hombre a través de los tiempos; además, algunas de ellas se utilizan en la medicina tradicional contra la leishmaniasis⁽²⁾. Las plantas medicinales han sido contempladas en el inicio del desarrollo de los fármacos, siguen contribuyendo al descubrimiento de nuevas moléculas con actividad biológica y son utilizadas para futuros fitofármacos. Gracias a los efectos benéficos que han tenido a lo largo de la historia, las plantas o productos botánicos siguen siendo utilizadas hasta hoy en forma de prevención o tratamientos⁽³⁾. Se estima que el 25% de medicamentos sintéticos están hechos a base de 11 plantas, para tratamientos de diferentes enfermedades. La OMS determina como medicamentos básicos y esenciales a 252 medicamentos de los cuales un 11% corresponde a medicamentos que tienen su origen en plantas obtenidas a partir de precursores naturales⁽⁴⁾. En el Paraguay, *P. punctatum* crece como maleza y no se aprovechan sus beneficios. Para este estudio fue elegida esta especie vegetal. El género *Polygonum* posee una distribución mundial, se encuentra desde Estados Unidos hasta el sur de la Argentina. Se desarrolla en los campos de terrenos bajos, inundables, húmedos, a orillas de ríos, arroyos, arrozales, aunque muchas veces forman malezales conocidos con el nombre de "cataysales"⁽⁵⁾. En estudios realizados experimentalmente se comprobaron las actividades antibacteriana y antifúngica de extractos diclorometánico, metanólico, hidroalcohólico y acuoso de *P. punctatum*⁽⁶⁾. En el momento de evaluar un compuesto en busca de una actividad específica, como en este caso en busca de actividad leishmanicida, es fundamental llevar a cabo ensayos citotóxicos cuantificables como complemento a los ensayos *in vitro* sobre las diferentes formas parasitarias⁽⁷⁾. En la búsqueda de alternativas terapéuticas a esta problemática de salud se plantea el uso de las plantas, pues estas han sido de gran importancia para el hombre a través de los tiempos. Debido a que los tratamientos son escasos y poco eficientes, resulta clara la necesidad de la búsqueda de nuevas moléculas candidatas en base a productos naturales para tratamientos efectivos y no tóxicos de esta enfermedad, por ello en este estudio se determinó la actividad citotóxica y el efecto leishmanicida *in vitro* del extracto

etanólico de *P. punctatum*, empleando macrófagos murinos y promastigotes de *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, a modo de tamizaje para elucidar su potencial antileishmaniásico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

La especie vegetal fue colectada en la ciudad de Carapeguá, Municipio de Carapeguá Departamento de Paraguarí con coordenadas geográficas 25°44'40.2" S, 57°20'07.8" W. A fin de verificar la identidad de la especie vegetal colectada, fue identificada por personal del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales (Dpto. de Biología) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN) en cuyo herbario se encuentran depositados los especímenes correspondientes con el Nro.4972, (Benítez Nro. FB 1).

Elaboración del extracto vegetal

Las hojas y tallos de *P. punctatum* Elliot fueron deshidratados a temperatura ambiente durante una semana, en un recinto cerrado. El material vegetal deshidratado obtenido fue transportado al laboratorio del departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud – (IICS-UNA), donde se procedió a la molienda (fragmentación de tallos y hojas en pequeñas partículas) con un molino mecánico hasta obtener una muestra fina homogénea para aumentar el área de superficie y facilitar la penetración del disolvente en las células, la cual fue sometida a un proceso de extracción por maceración continua durante cuatro días con etanol industrial al 98%. El extracto total fue filtrado y evaporado al vacío con un rotaevaporador, con agitación constante a 40 °C de 220V y 50Hz, de esta forma se obtuvo un concentrado, el cual se llevó hasta secar la muestra a baño María y así se obtuvo un extracto bruto crudo.

Ensayos de evaluación biológica

Los ensayos fueron realizados en el Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS- UNA).

Cepas de *Leishmania*

Se utilizaron cepas de LEM 75 - *Leishmania (Leishmania)* (MHOM/FR/78/LEM 75), LEM 690 *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), CUR 22 - *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). Estos parásitos fueron mantenidos por pasajes sucesivos en medio Schneider enriquecido con 10% de suero fetal bovino e incubados en estufa a 28°C. Los pasajes se realizaron cada cuatro días, o cada semana dependiendo de la cepa. Tanto para los pasajes como para los ensayos se realizaron en forma totalmente estéril, y se utilizó una cabina de flujo laminar (GELAIRE® BSB 4ª Flow Laboratories).

Evaluación de la actividad leishmanicida

Se pesó 100 µg del extracto y se disolvió utilizando DMSO (DimetilSulfóxido), más el medio Schneider hasta llegar a una concentración de 100 µg/ml. Los parásitos promastigotes en fase de crecimiento logarítmico de las tres cepas de parásitos de *Leishmania* mencionadas fueron distribuidos en una microplaca de 96 pocillos a una concentración de 10⁶ parásitos/ml. Cada pozo fue tratado con las diferentes concentraciones del extracto (100, 75, 50, 25, 20 y 10, µg/ml) y la prueba fue realizada por triplicado. Se incubaron en estufa a 28°C durante 72 horas, pasado dicho tiempo, se observaron los parásitos utilizando un microscopio invertido OLYMPUS IMT-2. Para el control se utilizó el mismo cultivo de parásitos en medio Schneider también por triplicado. La actividad se evaluó mediante conteo óptico en microscopio, comparándose con pocillos control positivo y negativo. Los resultados de la actividad leishmanicida también fueron expresados en valores de porcentajes en una tabla y gráficos en Excel (2016).

La determinación de la concentración inhibitoria 50% (IC50) se realizó mediante el análisis Probit, para ello se empleó un complemento Excel (Finney, 1952).

Ensayo de citotoxicidad en macrófagos

Para la realización de esta técnica se utilizaron 3 ratones *Mus musculus* albinos, machos sanos de 20 g de peso promedio y con 12 horas de ayuno. Se utilizaron macroplacas de titulación de 24 pocillos con laminillas de forma redondeadas. El procedimiento se realizó en condiciones de total esterilidad utilizando una cabina de flujo laminar GELAIRE® BSB4A Flow Laboratories, las diluciones y los controles se realizaron por triplicado. Los ratones fueron sacrificados utilizando el método de eutanasia por agente químico inhalatorio, cuya especie química es el dióxido de carbono (CO₂) (CIOMS- ICLAS, 2012).

La metodología utilizada fue la extracción del contenido del peritoneo de cada animal, se guardó en un tubo estéril hasta su utilización. Se centrifugó el preparado a 1600 rpm durante 10 minutos. Se resuspendió en medio RPMI y se contó en cámara de Neubauer (1.3.10⁶ macrófagos / ml). Se utilizaron macroplacas de 24 pocillos a las cuales se le colocaron laminillas de forma redondeada previamente sumergidas en ácido nítrico al 3 %, esto para mejor adherencia de los macrófagos.

Se colocaron 100 µl del medio RPMI conteniendo los macrófagos (1.10⁵ macrófagos /cubre) en cada pocillo. Se incubó a 37°C -5% CO₂ durante 3 horas. Se pesaron 2 mg del extracto y se disolvió con PBS. Para este ensayo se realizaron diluciones a concentraciones de producto de 100, 50 y 25 µg/ml. Se realizó un lavado de los pocillos con medio RPMI de manera a eliminar los macrófagos que no se adhirieron a las laminillas y se pusieron en contacto las diferentes diluciones de los productos con las células de macrófagos. Luego se incubaron nuevamente en estufa a 37°C- 5% CO₂ durante 48 horas.

Para la evaluación se utilizó microscopio invertido y la lectura se realiza con azul de tripán al 0.4%. Se contaron 100 macrófagos y se determinó la frecuencia de vivos y muertos. Se compararon los resultados de las concentraciones con el control. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Asuntos estadísticos: Se determinó la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀- es una medida cuantitativa que indica la cantidad de una sustancia que se necesita para inhibir, *in vitro*, un proceso biológico dado o componente biológico en un 50%). Se utilizó la prueba de bondad de ajuste de Pearson para determinar si el modelo Probit se ajusta adecuadamente a los datos proporcionados por los experimentos. La IC₅₀ y el límite de confianza del 95% correspondiente se determinaron a partir de una curva de regresión de mortalidad, usando el método de análisis de Probit.

Asuntos éticos: Se siguieron las recomendaciones de la Guía de Principios Internacionales para Investigaciones Biomédicas que envuelven animales, elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas¹⁸. Se utilizó la cantidad mínima posible de animales y se tomaron todas las precauciones para evitarles sufrimientos innecesarios.

RESULTADOS

Se evaluó la actividad leishmanicida *in vitro* del extracto etanólico de *P. punctatum* Elliot. contra formas promastigotes de las cepas de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*.

Actividad leishmanicida

Se determinó que el extracto etanólico de *P. punctatum* Elliot. presentó mayor actividad frente a las cepas de *L. infantum*, *L. braziliensis*. A una concentración de 100 µg/ml produjo una lisis parasitaria de 56 y 58% de dichas cepas, a esa misma concentración disminuyó la actividad frente a *L. amazonensis*. A una concentración de 50 y 25 µg/ml la actividad fue mayor contra *L. braziliensis*, no así en *L. amazonensis* y *L. infantum*. De esta manera se comprobó que el extracto etanólico de *P. punctatum* presentó una mayor actividad frente a los parásitos de la cepa de *L. braziliensis*, en todas las concentraciones del extracto (Figura 1). Se observó que a medida que disminuía la concentración de extracto disminuía el porcentaje de parásitos muertos.

Con los datos obtenidos del ensayo se procedió a la construcción de curvas dosis-respuesta para cada cepa de parásitos de *Leishmania*, en donde se observó una inhibición del 50% de viabilidad de los parásitos que fueron tratados en los ensayos de efectividad sobre promastigotes y fue comparado con el control positivo anfotericina B, se observó que las concentraciones a las cuales alcanzarían su IC₅₀ eran respectivamente: 107 µg/mL para *L. infantum*, 120 µg/mL para *L. amazonensis*; y 102 µg/mL para *L. braziliensis*.

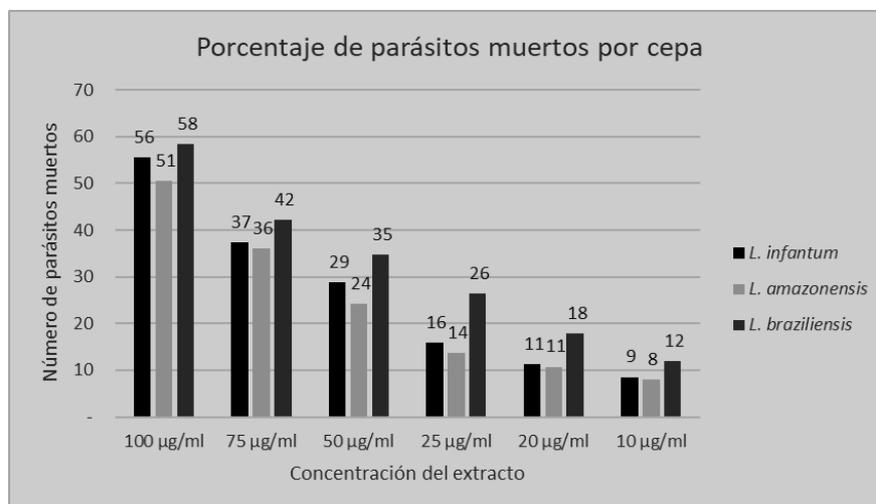


Figura 1. Comparación del porcentaje de lisis entre las diferentes cepas de parásitos y las distintas concentraciones del extracto.

Citotoxicidad en macrófagos

En el presente estudio, se realizó un ensayo para evaluar los parámetros relacionados con la acción citotóxica de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *P. punctatum*.

Para dicha evaluación se realizaron contajes de 100 células por pozo y de esta forma se determinó la frecuencia de vivos y muertos en todas las concentraciones, teniendo en cuenta que el colorante azul de tripán tiñe los macrófagos muertos. A una concentración de 100 µg/mL presentó un porcentaje de células vivas de 94% comparando con el control negativo que fue de 100%. Además, se pudo observar un comportamiento similar comparando con el control negativo en las concentraciones de 50 y 25 µg/mL con 84 y 91% de células vivas. Se pudo observar que todos los porcentajes de células vivas eran valores altos comparados con dicho control negativo aún con altas concentraciones del extracto (Tabla 1). Los resultados obtenidos con el ensayo de viabilidad celular no evidenciaron una acción citotóxica clara del extracto de *P. punctatum* frente a las células de macrófagos a las condiciones experimentales realizadas.

Tabla 1. Porcentaje de células vivas y muertas de cada concentración y control del extracto de *P. punctatum* Elliot y sus respectivas desviaciones estándar.

Concentración de Compuestos	100µg/ml	50µg/ml	25µg/ml	Control Negativo	Control Positivo
Números de Macrófagos	Extracto <i>P. punctatum</i>	Extracto <i>P. punctatum</i>	Extracto <i>P. punctatum</i>	Macrof. +RPMI	Macrof. +DMSO
Vivos	94,33±4,1633	84±1,7321	91,3±2,89	100±0	8,33±1,155
Muertos	5,66±4,163	16±1,7321	8,3±3,215	0	91,66±1,155

DISCUSIÓN

En este estudio de búsqueda de compuestos con actividad leishmanicida de plantas utilizadas en la medicina tradicional se ha demostrado que el extracto etanólico de *P. punctatum* presentó actividad leishmanicida *in vitro* cuando fueron evaluados contra formas promastigotes de tres cepas de parásitos, según se observó que las cepas de

L. infantum y *L. braziliensis* presentaban mayor actividad que la de *L. amazonensis*. Esta diferencia observada en los resultados podría deberse a la gran variabilidad genética entre las cepas estudiadas⁽⁸⁾. El extracto etanólico ensayado es una mezcla de varias partes de la planta, de esta forma la actividad observada podría deberse también a un efecto sinérgico de todas las sustancias presentes en el extracto crudo de la planta, sería importante separar en fracciones y de esa forma obtener las moléculas aisladas⁽⁹⁾. Es importante mencionar que se debe tener en cuenta la parte de la planta utilizada, la época de colecta del material vegetal, la forma de utilización, así como la influencia de factores ambientales, ecológica, climática y geomorfológica que pueden influir en la producción de metabolitos secundarios. Esta variabilidad en la composición química de la planta puede ser un factor importante a la hora de obtener los resultados de ensayos *in vitro* que no confirmen la actividad para el uso tradicional de la planta⁽¹⁰⁾. Existen estudios en los que se utilizó partes aéreas de *P. salicifolium*, una planta del género Polygonum, la cual contenía metabolitos secundarios que presentaban actividad leishmanicida sobre *L. mexicana* y no presentó actividad citotóxica sobre una línea celular humana⁽¹¹⁾.

Para el estudio de viabilidad celular es importante destacar que la tinción de azul tripán en las células expuestas a los extractos permite que se pueda visualizar y diferenciar entre células viables de las no viables, siendo la membrana celular la que deja atravesar color antes si presentan daños, de esta forma se predice la muerte celular, siendo este factor el que justifica los cambios que se seguirán realizando con los extractos para ser considerado un probable candidato a fármaco. El azul tripán mide la acción citotóxica de una sustancia desde el punto de vista metabólico y de viabilidad, en un periodo de tiempo corto, por lo cual puede ser reversible en determinadas circunstancias. Por otro lado, la evaluación de la supervivencia celular por medio de la eficiencia de clonación permite la evaluación de la capacidad proliferativa de la población celular⁽¹²⁾. Se ha observado que *P. punctatum* no presenta actividad citotóxica y tiene actividad antiproliferativa⁽¹³⁾.

En Paraguay *P. punctatum* se utiliza como medicina tradicional debido a sus propiedades antiinflamatorias, las partes aéreas o las hojas se utilizan habitualmente en preparaciones galénicas a partir de la propia planta y es posible que la propiedad antiinflamatoria de la planta se deba a la presencia de poligodios en las partes aéreas, sin embargo, este compuesto es en realidad responsable de la actividad antifúngica⁽¹⁴⁾. En Paraguay este es el primer estudio de evaluación leishmanicida de la planta *P. punctatum*. Se logró evaluar biológicamente el extracto etanólico obtenido de *P. punctatum*. De esta manera, este estudio revela que dicho extracto presenta una actividad leishmanicida en ensayos experimentales *in vitro*, frente a las formas promastigotes de *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, y no presenta citotoxicidad en las células de macrófagos de ratones, en las concentraciones experimentales realizadas, por lo que se podría considerar a *P. punctatum* como candidato para completar con estudios biológicos tanto *in vivo* e *in vitro* sobre otros parásitos como *T. cruzi*.

Para estudios futuros se recomienda separar los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto y determinar sus estructuras, realizar estudios de viabilidad celular de cada fracción con el fin de evaluar su potencial como candidato a fármacos.

Financiamiento: Con fondos del IICS-UNA.

Conflicto de intereses: Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

Contribución de autores: Fátima Benítez, autor principal: elaboración del protocolo, recolección y presentación de resultados.

Nilda Portillo: preparación y cuantificación de cepas, evaluación de los compuestos *in vitro*, evaluación citotóxica de los compuestos.

Eliana Alvarenga: redacción y organización del manuscrito.

Tomas López: Análisis de datos.

Yessica Cáceres: evaluación citotóxica del compuesto *in vitro*.

Ricardo Galeano: Preparación y cuantificación de extractos.

Roció Riveros: Evaluación leishmanicida *in vitro* de los compuestos.

Eugenia Laterza: Evaluación del compuesto *in vitro*.

Bonifacia Benítez: Identificación botánica de la planta.

Gloria Yaluff: Idea, elaboración del protocolo, recolección y análisis de los datos, escritura y revisión final del manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2004 [cited 2020 Jun 18]; 27(5): 305–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147957104000232>
- Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res* [Internet]. 2003 [cited 2022 Mar 15]; 90 Suppl 2 (SUPPL. 2): 55–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12937967/>
- Matthews HB, Lucier GW, Fisher KD. Medicinal herbs in the United States: research needs. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1999 [cited 2022 Mar 15]; 107(10): 773. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.99107773>
- Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001; 39(5): 603–13.
- Vivot E, Cruañes M. Actividades antimicrobiana y antiviral de extractos vegetales de algunas especies de la flora de Entre Ríos. *Ciencia, docencia y Tecnol* [Internet]. 2008 [cited 2022 Jun 17]; XIX: 177–89. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162008000200008
- Vivot E, Sánchez C, Cacik F, Sequin C. Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, docencia y Tecnol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Mar 15]; 45:131–46. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162012000200008
- Cragg GM, Newman DJ. Antineoplastic agents from natural sources: Achievements and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000; 9(12): 2783–97.
- Martinez E, Alonso V, Quispe A, Thomas MC, Alonso R, Piñero JE, et al. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitology* [Internet]. 2003 [cited 2022 Mar 15]; 127 (Pt 6):513–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14700186/>
- Degen R, Soria N, Ortiz M, Basualdo I. Problemática de nombres comunes de plantas medicinales comercializadas en Paraguay. *Dominguezia* 2005; 21(1): 11-16.
- Gallego A, Torres F, Robledo S, Vélez ID, Carrillo L, Muñoz DL, et al. Actividad Leishmanicida y Tripanocida de *Acacia farnesiana*, *Piper arieianum*, *P. Subpedale*, *Sphagnum recurvum* y *Vsimia baccifera* subsp. *ferruginea*. *Actual Biológicas* [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 15]; 28(84): 39–49. Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/329402>
- Zheoat AM, Alenezi S, Elmahallawy EK, Ungogo MA, Alghamdi AH, Watson DG, et al. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activity of Chalcones and Flavanones from *Polygonum salicifolium*. *Pathogens* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 17];10(2): 1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33562567/>
- Fornelli F, Minervini F, Logrieco A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J Invertebr Pathol* [Internet]. 2004 [cited 2022 Mar 15]; 85(2): 74–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15050836/>
- Pastori T, Kuhn AW, Tedesco M, Hoffmann CE, Neves LAS, Canto-Dorow TS, et al. Ação genotóxica e antiproliferativa de *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. *Rev Bras Plantas Med* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jun 17]; 17(2): 186–94. Available from: <http://www.scielo.br/j/rbpm/a/cyDRGMwy4YH9kkYNgsnj6VK/?lang=pt>
- Martínez M, Benítez B, Alvarez S, Prieto R, Rolón M, Da Silva GJ, et al. Determinación de un principio activo de *Polygonum punctatum* elliot; espectros completos de rmn de stigmast-5-en-3p-ol (500/125 MHz). *Rev. Bol. Quim.* [Internet]. 2017 [citado 2022 Jun 17]; 34(1): 14-27. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602017000100003&lng=es