EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS HOJAS DE *Carica papaya L* Y DEL EFECTO ANTI PROTOZOARIO DE UN EXTRACTO ENRIQUECIDO EN ALCALOIDES A PARTIR DE LA MISMA

PRELIMINARY EVALUATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE LEAVES OF *Carica papaya L* AND THE ANTI-PROTOZOA EFFECT OF THE ALKALOID EXTRACT

CUÉLLAR-CUÉLLAR, ARMANDO [1*] Ph.D., SCULL-LEZAMA, RAMÓN [2] M.Sc., MARTÍNEZ ARMENTEROS, YUNIEL[3] Lic.. FERNÁNDEZ-CALIENES, AYME[4] Lic., MONZOTE, LIANET Ph.D.[5]

[1,2] Profesores del Departamento de Farmacia, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba. [3]Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Farmacia, Universidad de La Habana, Cuba. [4,5] Investigadoras del Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"., Ciudad de la Habana, Cuba.

*Correspondencia: mandyc@infomed.sld.cu

Resumen

El presente trabajo se ocupa del estudio de la parte foliar de las hojas de la especie *Carica papaya L.* debido a su uso generalizado para el tratamiento de diversos parásitos inferido a la presencia del alcaloide carpaina. Se realiza una extracción total en un equipo Soxhlet y el mismo se procesa por el sistema de cambio de fase ácido-base-solvente orgánico para tener una fracción rica en alcaloides con un 1 % de rendimiento respecto al peso de planta de partida. Este extracto se evalúa frente a una cepa de *Plasmodium berghei* teniendo una IC50 aceptable como positiva de 50 µg/mL, no así para una cepa de *Leishmania amazonensis* con una IC50 de 73,3 µg/mL. De esta fracción mediante un proceso de contracorriente con 5 intercambiadores se purifica un producto con todas las características de alcaloide que al realizar los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C comparando con los informes de la literatura se asigna para el mismo la estructura de la carpaina. El presente trabajo permite tener una técnica sencilla para obtener este alcaloide de forma selectiva y da la posibilidad de seguir ampliando diferentes evaluaciones biológicas con el mismo.

Palabras clave: Carpaina, *Carica papaya L*, efecto anti protozoario.

Abstract

Carica papaya L, have been used as anti-parasitic plant in Traditional Medicine in many countries. The activity has been correlated with the alkaloid carpaine. A total alcohol extract is done using a Soxhlet system, after that and acid-base-organic solvent interchange was developed to prepare a fraction that contains mainly alkaloids. The yield of this fraction was 1 %. This extract, was evaluated with *Plasmodium berghei* strain showing an IC50 acceptable positive of 50

µg/mL, different from a *Leishmania amazonensis* strain with IC50 of 73,3 µg/mL. From this fraction, using a countercurrent separation process with 5 separating funnels for the repetition of the partition process, a white solid with alkaloid properties was isolated and characterized using NMR ^{1}H and ^{13}C spectroscopy. In comparison with the literature data, the structure of carpaine was assigned to this solid. The isolation technique is simple and selective for the alkaloid, so it makes possible other biological evaluations with it.

Key words: Carpaine, *Carica papaya L,* anti protozoa effect.

Introducción

Las plantas medicinales son una importante fuente de productos biológicamente activos, muchos de los cuales han servido como modelos para la síntesis de un gran número de fármacos, lo que ha propiciado importantes avances en la terapéutica de varias enfermedades. Según SOUZA BRITO en 1993, el número de estudios que se realiza en esta área ha aumentado, existiendo una tasa promedio de incremento de especies bajo estudio del 10% al año, sin embargo, solamente del 15 al 17% de las plantas existentes han sido estudiadas desde el punto de vista medicinal.

Carica papaya L, es una planta que figura en casi todas las Farmacopeas como medicamento vegetal alternativo y el extracto seco de su látex (Papaina) es considerado un digestivo poderoso y específico de las materias albuminoides, que se emplean diariamente en todas las farmacias fito terapéuticas o dispensariales.

Dentro de los diversos usos que se le ha dado a *Carica papaya L*, además del consumo de la pulpa del fruto, destacan el uso de las semillas en India como desparasitante y antipirético, además las infusiones de flores frescas para combatir la tos y contra el impétigo.

En México suele utilizarse con frecuencia una pasta hecha con las semillas para ablandar carne. Las hojas y la corteza se usan para remover manchas o colorantes. (www.bioextracto.com.mx).

La fitoterapia en el tratamiento de las lombrices intestinales supone la utilización de una serie de plantas medicinales con propiedades antihelmínticas, es decir capaces de matar o expulsar las lombrices. Entre cerca de 200 plantas descritas en Cuba como anti parasitarias (ROIG 1988) se encuentra la papaya (*Carica papaya L*). La capacidad que tiene la papaína para descomponer la carne ha sido aprovechada en la medicina popular para eliminar las lombrices intestinales. La medicina China macera los frutos en vinagre de manzana que luego es bebido para eliminar los gusanos o las tenias. Además de la papaína, intervienen en esta propiedad otros compuestos

químicos como son los alcaloides carpaina o la dehidro carpaina presentes en todas las partes del vegetal (www.botanical-online.com).

Para las hojas de la planta se describen los siguientes componentes químicos: Fenil propanoides: ácido cafeico; esteroles: β-sitosterol; alcaloides: carpaína (hasta 1500 ppm) (GIMLETTED, 1939*)* Fig. 1. dihidrocarpaína I y II, pseudocarpaína, cotinina, miosmina, nicotina, colina (TANG, 1979*)*. También contiene pequeñas cantidades de glicósidos cianogénicos (NAHRSTEDT, 1987*)*.

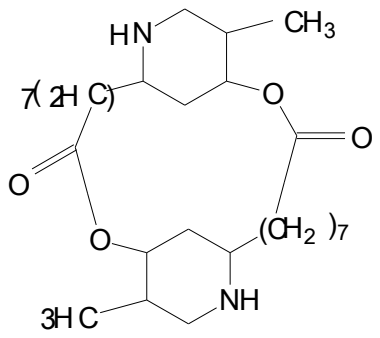

Figura 1. Estructura propuesta para la Carpaina.

In vitro, la carpaina inhibe el Micobacterium tuberculosis y actúa a nivel del corazón de la misma forma que los digitálidos y a dosis elevadas provoca parálisis y depresión cardiovascular (WENIGER, 1988)

Materiales y métodos

Recolección y preparación del material vegetal: La recolección del material vegetal (*Carica papaya L*), se realizó en la Coronela, Lisa, La Habana Cuba en el mes de enero del 2011 de una plantación comercial sin enfermedades sanitarias detectadas, en proceso de floración donde la parte que se utiliza es la parte foliar de la hoja. El material vegetal se identifica por la M.Sc. Ramona Oviedo especialista del Instituto de Ecología y Sistemática de la Academia de Ciencias de Cuba guardándose una muestra de referencia en dicha institución.

La parte foliar separada manualmente, se somete a un proceso de secado en estufa con aire recirculado a 40 ºC. El material vegetal seco se trituró manualmente, posteriormente se tamizó en una malla de 2 mm de porosidad y el polvo obtenido se guardó en una bolsa de nylon cerrada hasta el momento de su uso (una semana posterior al proceso).

Determinación de algunos parámetros farmacognósticos: Se realizaron mediante las técnicas descritas por Lou-Zhi-Cen en las técnicas de análisis de

drogas sugeridas por la OMS en 1980 y las realizadas fueron las siguientes: Determinación de la perdida en peso de agua durante el secado, Determinación de la humedad residual y Tamizaje fitoquímico.

Método de extracción: 100g del material vegetal seco en estufa con aire recirculado a 40 ºC y triturado manualmente y con un tamaño de partícula no mayor de 2 mm, se colocaron en un dedal de un equipo Soxhlet y se extrajeron de forma continua durante 12-16 horas (tiempo medido a partir del momento del inicio de la condensación de los vapores del disolvente en el condensador del sistema), colocando en el balón del equipo 800 mL de metanol. Para refrigerar el condensador se utilizó un criostato con metanol a menos 15 ºC el cual se recircula durante todo el proceso.

Después de concluida la extracción, el metanol se concentra por destilación con evaporador rotatorio a vacío y un baño de agua a la temperatura de 30 ºC hasta el menor volumen posible esperando que quede como un residuo semi seco a temperatura ambiente.
Este residuo se destina para el análisis por cromatografía en capa delgada y para el aislamiento y purificación de (el o los) posible(s) alcaloide(s).

Preparación de la fracción de los alcaloides: El resíduo de la extracción continua por Soxhlet, se redisolvió en 50 mL de ácido sulfúrico al 1 % en agua. Se filtró y el resíduo se extrajo tres veces más con 25 mL del mismo ácido sulfúrico, verificando por el ensayo cualitativo de Dragendorff la no presencia de alcaloides en la solución. Las soluciones ácidas se reunieron y se ajustó a pH alcalino (8-9) la misma con hidróxido de sódio en solución al 5 % en agua y se lavó 5 veces con 150 mL de cloroformo cada vez.

Las fases clorofórmicas se reunieron y se secaron sobre carbonato de sódio anhidro antes de filtrar y evaporar a sequedad en evaporador rotatório para el análisis de la presencia de alcaloides en el mismo.

Purificación de los posibles alcaloides por un sistema de Contra Corriente: Se colocan 5 embudos separadores de capacidad de 125 mL en sus respectivos soportes universales y se prepara 100 mL de ácido tartárico al 1 % que se utiliza como fase estacionaria. Se colocan 25 mL de este ácido en cada embudo separador.

El residuo de la fracción de los alcaloides se disuelve en 25 mL de cloroformo y se coloca en el primer embudo separador agitándose durante algunos minutos.
Se deja reposar y la fase de cloroformo se pasa al segundo embudo y en el primer embudo se colocan 25 mL de cloroformo limpio. Ambos embudos se agitan de igual forma y se separan las fases pasándolas para los próximos embudos y poniendo nuevo cloroformo en el primer embudo.

El proceso se repite tantas veces hasta colectar las cinco fases posibles de cloroformo desde el quinto embudo y envasándolas de forma independiente desde la 1 a la 5.

Las fases ácidas después de ajustar el pH a alcalino (8-9) con hidróxido de sodio al 5 %, se lavan de forma independiente con 25 mL de cloroformo. Se numeran las fases clorofórmicas de la 1 a la 5 de forma independiente. Las 10 fases clorofórmicas así obtenidas se destinan para el análisis por placa delgada para análisis de pureza y se reúnen de acuerdo a su similitud para el proceso de caracterización.

Cromatografía en placa delgada: Para el análisis cromatografico en placas delgadas, se utilizaron placas pre elaboradas en soporte de aluminio de sílica gel G F- 254 de la casa Merck y como disolvente para la elución de las mismas se utilizó cloroformo y metanol en diversas proporciones que se especifican en el análisis de los resultados.

Análisis estructural: El análisis estructural se realizó en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear BRUKER DPX 250 MHrs con deutero cloroformo como solvente para la disolución de la muestra y Tetrametil Silano como referencia interna.

Determinación de la actividad antiprotozoaria.

Preparación de los extractos para la evaluación anti parasitaria: Se realiza la preparación de un extracto total de metanol de la misma forma que lo descrito en el epígrafe 3.1.4. El extracto obtenido se reduce a un tercio su volumen mediante la destilación en evaporador rotatorio con vació y baño de agua a 35 ^{0}C. El extracto parcialmente concentrado se lava tres veces con igual volumen de n-hexano en un embudo separador y ambas fases por separado se concentran a seco en las mismas condiciones de destilación con evaporador rotatorio. El extracto de n-hexano se denomina de desengrase y el de metanol como extracto enriquecido en los alcaloides.

Actividad antiplasmodial: La determinación de actividad se realizó frente a estadios intra-eritrocitarios de *Plasmodium berghei*, cepa ANKA (JANSE CJ 1995). La actividad antiplasmodial se expresó como CI50, determinada según la metodología reportada (HUBER W 1993) utilizando el dato de la inhibición de la maduración de esquizontes (SCHLICHTHERLE M 2000).

Actividad leishmanicida: Para evaluar la actividad leishmanicida de los productos se utilizaron promastigotes de *Leishmania amazonensis*, cepa MHOM/77BR/LTB0016 (COS P 2006, SLADOWSKI D 1993).

Resultados y discusión

Determinación de algunos parámetros farmacognósticos

Pérdida en peso de agua: El estudio de la pérdida en peso de agua se realizó por la técnica establecida, en estufa con aire recirculado a 40^0 C. La parte foliar de las hojas se colocaron esparcidas sobre bandejas esmaltadas dentro de la estufa previamente pesadas. Cada 12 horas se comprobó la pérdida en peso y se detuvo el proceso cuando fue aproximadamente constante lo cual sucedió en un promedio de 5 días.

La pérdida en peso encontrada estuvo en el margen de 90-92 **%.** Después de separar las hojas ennegrecidas pues muchas tuvieron este efecto por la cantidad de agua que contienen, se trituraron manualmente y se tamizaron por tamiz de 2 mm y el polvo obtenido fue destinado como muestra de ensayo para las evaluaciones realizadas.

Determinación de humedad residual: La evaluación se realizó por el método azeotrópico utilizando tolueno como fase de arrastre del agua y los resultados fueron los esperados en comparación con la mayoría de las plantas medicinales y el valor correspondió a 4-5 %.

Determinación de la composición química cualitativa: Se realizó por la técnica del tamizaje fitoquímico utilizando una alícuota del extracto de metanol de las hojas secas obtenido para el procesamiento de los alcaloides presentes en esta parte de la planta.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Se muestra que los ensayos positivos correspondieron a Triterpenoides y/o esteroides, compuestos lactónicos, fenoles y alcaloides.

Obtención de un extracto total

El extracto total de la parte foliar se realizó mediante la utilización de un equipo Soxhlet y metanol como disolvente para la extracción debido a su poder extractivo y su bajo punto de ebullición.

El proceso se extendió durante 12 horas al cabo de las cuales el ensayo de Dragendorff a una alícuota, indicativo de la presencia de alcaloides en el mismo, fue negativa, al no obtenerse precipitado con el reactivo.

El metanol conteniendo los sólidos solubles se concentró a sequedad en evaporador rotatorio obteniéndose un peso de residuo de 8 g que corresponde a un 8 % de rendimiento, teniendo en cuenta que se utilizaron 100 g de planta

para el proceso de extracción. Este residuo se destinó para preparar una fracción rica en los alcaloides que deben estar presentes en la parte foliar de la especie.

Tabla 1. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto de metanol de la parte foliar

Ensayo	Compuesto	Resultado	Comentario
Shinoda	Flavoniodes	Negativo	-------
Baljet	Lactonas	Positivo	Rosado
Cloruro férrico	Fenoles	Positivo	Verde claro
Espuma	Tensoactividad	Negativo	-------
Liebermann-Burchard	Triterpenoides/ Esteroides	Positivo	Carmelita rojizo
Ninhidrina	Aminas libres	Positivo	Violeta claro
Dragendorff	Alcaloides	Positivo	Rojo ladrillo

Obtención de la fracción enriquecida en alcaloides

Para este proceso se utilizó la técnica clásica de cambio de fase que permite la selección de los alcaloides de forma selectiva dentro de todos los posibles componentes a extraer de la parte foliar utilizada.

A partir de los 8 gramos, después del tratamiento con ácido y la separación del residuo insoluble, el mismo se lavó varias veces con pequeñas porciones de ácido hasta que el ensayo de Dragendorff mostró resultados negativos.

Después de basificar y lavar varias veces con cloroformo, la fracción orgánica que debe ser la que está enriquecida en los alcaloides, se concentró a sequedad y el residuo se pesó con los siguientes resultados: Se obtuvo 1,03 g de la fracción parcial que corresponde a un 12,5 % respecto al peso de extracto de partida y a un 1 % respecto al peso de planta utilizada para el proceso de extracción, rendimiento que está en el margen del descrito para la mayoría de plantas portadoras de alcaloides.

Separación de los componentes tipo alcaloides por el sistema de contracorriente

Se observa que tal y como se esperaba que el alcaloide se retiene más en las fases fijas ácidas al realizar el análisis en placa delgada. Para el corrimiento de esta cromatografía, se utilizó una mezcla de cloroformo-metanol 1:1 y el revelado con el reactivo de Dragendorff indicó que las mismas están enriquecidas en un alcaloide de Rf 0,4. El resto de los componentes de la fracción se observaron en las fases móviles del proceso por lo que la separación se considera de excelente.

En las fases móviles se recuperó 0,5 g que corresponde al 50 % del extracto utilizado en el proceso y en las fases fijas se recuperó 0,3 g que corresponde al 30 % del extracto utilizado en el proceso y un 0,003 % respecto al peso de planta de partida y que coincide con el alcaloide referido.

Este sólido se lavó con metanol muy frio para eliminar restos de coloración ligeramente amarilla y se secó apropiadamente en desecadora antes de realizar el análisis estructural mediante la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

Análisis estructural del alcaloide aislado y purificado

El sólido con características de alcaloide se destinó para el análisis estructural por RMN. El espectro de RMN ^{1}H se muestra (Fig. 2).

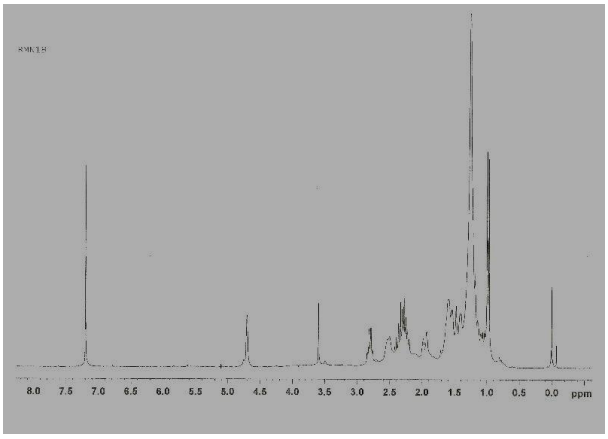

Figura 2. Espectro de RMN ^{1}H del sólido aislado

Por otra parte, el espectro de RMN ^{13}C se muestra en Fig. 3.

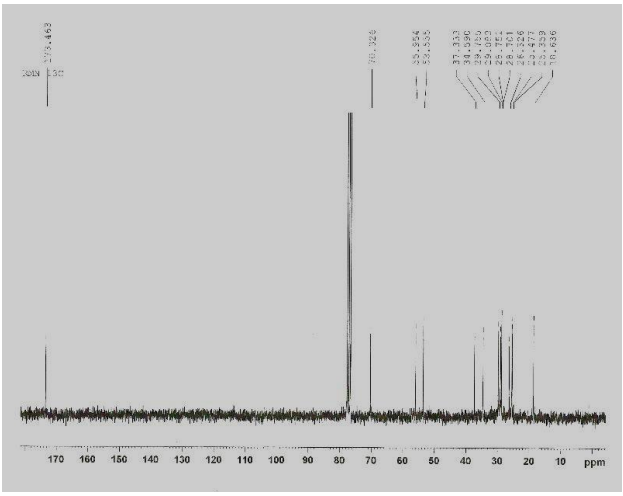

Figura 3. Espectro de RMN ^{13}C del sólido aislado.

Teniendo en cuenta que la estructura del alcaloide descrito para la especie es la carpaina, los análisis de los espectros se realiza en base a la estructura de la misma comparando los valores obtenidos con los reportes de la literatura. En la Fig. 4 se muestra la estructura con la numeración correspondiente de cada posición para referencia de la Tabla II donde se informan los valores del producto aislado y los de la literatura.

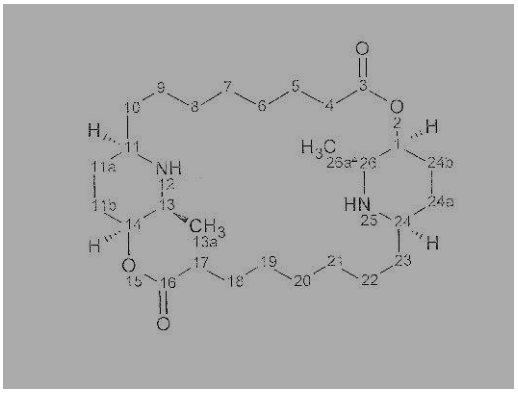

Figura 4. Estructura de la Carpaina con la numeración de referencia

En la Tabla 2 se muestran los datos de los análisis por RMN del sólido purificado.

En el espectro de RMN ^{1}H se observa un doblete intenso a 1,30 ppm que se corresponde con 6 protones en su integración que se asignan a dos metilos equivalentes que sería los metilos señalados en la estructura de la Carpaina como el 13a y el 26a.
De igual forma, en 2,50 ppm se observa una señal en forma de multiplete que se debe corresponder con los dos grupos metinos (en H11 y H 24) unidos a las aminas de los núcleos de la piperidina presente en la estructura y entre 1,40 y 1,85 ppm hay varios multipletes que caracterizan los grupos metilenos de las dos cadenas alílicas que se encuentran en la estructura propuesta.

Los protones tipo metino unidos al grupo éster que corresponden a las posiciones 1 y 14 se encuentran bien observables en una señal de intensidad media en 4,7 ppm. Todos estos aspectos están dentro de los límites de variación de acuerdo al equipo utilizado en concordancia con la literatura pues en los informes que se tienen utilizan un equipo de 500 MHz (LOCK, 1988).

Tabla 2. Datos de RMN de ^{1}H y ^{13}C en ppm para el producto y los informes de la literatura

Posición	^{1}H Producto	^{1}H Literatura	^{13}C Producto	^{13}C Literatura
1 y 14	4,7		70,3	69,2
3 y 16			173,5	174,1
4 y 7			34,5	34,4
5 y 18	1,40-1,85	1,35- 1,90	25,3	24,0
6 y 19	1,40-1,85	1,35- 1,90	28,7	27,8
7 y 20	1,40-1,85	1,35- 1,90	26,3	26,5
8 y 21	1,40-1,85	1,35- 1,90	25,4	25,6
9 y 22	1,40-1,85	1,35- 1,90	29,0	30,1
10 y 23	1,40-1,85	1,35- 1,90	29,7	30,7
11 y 24	2,50	2,45	55,9	58,2
11a y 24a			37,3	34,9
11b y 24b			28,7	29,5
13 y 26			53,5	55,7
13ª y 26a	1,30	1,30	18,63	15,55

La única diferencia observable es la señal que se encuentra en 7,2 ppm que cae en el rango de los dobles enlaces aislados y que LOCK también lo informa como común para asignar los dobles enlaces en solitario en estructuras policíclicas con metinos y metilenos de diversos terpenoides. En el caso de la *Carica papaya L*, se informa también la presencia de otro alcaloide la Dehidro carpaina que debe presentar un doble enlace aislado pero los espectros que hemos podido revisar sólo grafican las señales hasta 5,5 partes por millón así que no podemos inferir la posibilidad de una impureza del otro alcaloide por no tener referencias al respecto y no encontrarse justificación en el espectro de RMN de ^{13}C obtenido en el presente trabajo.

Por otra parte en el espectro de RMN de ^{13}C Se observan claramente 14 señales como era de esperar para esta estructura, ya que la misma corresponde a un dímero cíclico perfectamente simétrico que debe tener una equivalencia de dos en cada señal de los carbonos detectados. Está compuesta por dos núcleos piperidínicos cuyas señales se observan a 28,7; 37,3; 53,5; 55,9 y 70,3 ppm que evidencian un esqueleto trisustituido en las posiciones 2, 3, y 6 (De acuerdo a la numeración que le debe corresponder a este ciclo), estas últimas posiciones correspondientes a las señales más desplazadas a campos bajos.

Las señales de 53,5 y 55,9 ppm corresponden a los carbonos unidos directamente a nitrógeno y la señal de 70,3 a los carbonos tipo metinos unidos directamente al oxígeno de las lactonas. La señal a 18,6 ppm aunque ligeramente más alta que en la literatura debe corresponder a los dos metilos en los carbonos 13 a y 26 a que serían equivalentes a la posición 2 del núcleo de la piperidina. Las señales entre 25 y 37 ppm son características de los carbonos metilénicos y la más desplazada a 173,4 ppm corresponde a los

carbonos del grupo carbonilo. Todos estos datos espectroscópicos sugieren que se ha aislado el alcaloide carpaina al concordar los datos de los espectros obtenidos con los informes de la literatura.

Resultados de la evaluación antiprotozoaria

El extracto enriquecido en alcaloides de *Carica papaya L* mostró mayor actividad que la fracción de desengrase tanto frente a promastigotes de *L. amazonensis* como frente a estadios intraeritrocitarios de *P. berghei* (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración Inhibitoria media (CI50) de los extractos de *C. papaya* frente a protozoos

Extracto	*L. amazonensis**	*P. berghei***
Enriquecido en alcaloides	73,3	50,0
Fracción de desengrase	>100	>50,0

*El valor de la CI50 se expresa como la concentración de extracto (µg/mL) que inhibe el 50% del crecimiento parasitario. **El valor de la CI50 se expresa como la concentración de extracto (µg/mL) que reduce el 50% de la cantidad de esquizontes formados, con respecto al control. De la Tabla 3 se observa que como la CI50 es un parámetro que se utiliza para medir la eficacia de la acción antiprotozoaria, en el caso de la evaluación realizada para los extractos crudos que se preparen, los valores de CI50 deben estar por debajo de 100 µg/mL para que en este ensayo de tamizaje se pueda decir que hay una posible actividad, aunque los extractos antimaláricos más prometedores exhiben valores para este parámetro por debajo de 10 µg/mL (SOH, 2007).

Diferentes partes de *C. papaya* se utilizan en preparaciones herbáreas para tratar diversos tipos de parasitosis. En Mali, se utiliza la decocción de las hojas como antimalárico y en un estudio de campo preliminar el 85 % de los pacientes encuestados refirieron haberse recuperado de la infección después de ingerir la decocción (WILLCOX, 2011). En la India (BHAT, 2001), se utiliza el fruto; las extracciones de la pulpa y la cáscara, con éter de petróleo, mostraron valores de CI50 frente a *P. falciparum* de 18 y 15 µg/mL, respectivamente.

El extracto enriquecido en alcaloides preparado y evaluado en la presente investigación, mostró una CI50 superior (50 µg/mL), por lo que su evaluación en un modelo de malaria *in vivo* permitirá su clasificación definitiva dentro de los extractos prometedores o no como antimaláricos reales de posible uso alternativo para el posible control del parásito.

La evaluación frente a promastigotes de Leishmania *amazonensis* reveló una actividad moderada del extracto enriquecido en alcaloides. Otros autores obtuvieron un mejor resultado contra esta misma especie de *Leishmania* al utilizar el extracto etanólico de esta planta frente a amastigotes con una CI50<10 µg/mL (VALADEAU, 2009).

Referencias

BHAT, G.P.; SUROLIA, N. 2001. In vitro antimalarial activity of extracts of three plants used in the traditional medicine of India. The American Journal of Medicine and Am J Trop Med Hyg. 65:304-8.

BIOEXTRACT. harnesses the power of online.2012 http://www.bioextract.org/query/index.jsp

BOTANICAL-ONLINE. 2012. http://www.botanical-online.com/papayas.htm.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. 2006. Anti-infective potential natural products: How to develop a stronger *in vitro* "proof-of-concept". J Ethnopharmacol 106:290-302.

GIMLETTED, J.D. 1939, ´´ A dictionary of Malayan medicine. Oxford University Press. New York, USA.

HUBER, W.; KOELLA, J.C. 1993. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. Acta Trop. 1:257-61.

JANSE, C.J.; WATERS, A.P. 1995. *Plasmodium berghei*: the application of cultivation and purification techniques to molecular studies of malaria parasites. Parasitol. Today 11:138-43.

LOCK, O. 1988 Investigación fitoquímica. Universidad Pontificia Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima, Pe.rú

LOU ZHI, CEN. 1980. General Control Methods for Vegetable Drugs. World Health Organization. WHO/PHARM/80.50.

NAHRSTEDT, A. 1987. ´Recent developments in chemistry, distribution and biology of the cyanogenic glycosides. Págs. 167-184, 213-234. En´: HOSTETTMANN, K.; LEA, P.J, (Eds.). *Biologically active natural products´*. Oxford Science Publications. Oxford, USA.

ROIG, J.T. 1988. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba´´. Tomo I. p438-440. Editorial científico técnico. Cuba.

SCHLICHTHERLE, M.; WAHLGREN, M.; PERLMANN, H.; SCHERF, A. 2000. Methods in malaria research, 3rd ed., Malaria Research and Reference Reagent Resource Center. Virginia, USA.

SLADOWSKI, D.; STEER, S.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M. 1993. An improve MTT assay. J Immunol Methods 157(1-2):203-7.

SOH, P.N.; BENOIT-VICAL, F. 2007. Are West African plants a source of future antimalarial drugs 114:130-40.

SOUZA, B.; ARM SOUZA BRITO, A.A. 1993.Fourty years of Brazilian plant research . Journal of Ethnofarmacology Cap. 39.

TANG, C, 1979. New macrocyclic piperideine alkaloids from papaya leaves, dehydrocarpaine I and II. Phytochem 18:651-652.

VALADEAU, C.; PABON, A.; DEHARO, E.; ALBÃN-CASTILLO, J.; ESTEVEZ, Y.; LORES, FA, ROJAS R, GAMBOA D, SAUVAIN M, CASTILLO, D.; BOURDY, G. 2009. Medicinal plants from the Yanesha (Perú): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. J. Ethnopharmacol. 25-123(3):413-22.

WILLCOX, M.L.; GRAZ, B.; FALQUET, J.; DIAKITE, CH.; GIANI, S.; DIALLO, D. 2011. A <<reverse pharmacology>> approach for developing an antimalarial phytomedicine. Malaria J. 10(1):S8.

WENIGER, B.; ROBINEAU, L. 1988. Elementos para una Farmacopoea Caribeña. TRAMIL. Edición ENDACARIBE. Cuba.