



## Artículo Original

# Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* sobre la supervivencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

## In vitro effect of hydro-alcoholic extract of *Piper aduncum* on the survival of *Trypanosoma cruzi*-tripomastigotes

Lucía Avalos<sup>1</sup>, Guillermo Delgado<sup>1</sup>, Jensen González<sup>1</sup>, Carlos Luján<sup>1</sup> y Hermes Escalante<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudiantes de la EAP de microbiología y parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo, Perú,

<sup>2</sup>Departamento de microbiología y parasitología. UNT.

### RESUMEN

Se determinó el efecto “in vitro” del extracto hidroalcohólico de las hojas de matico, *Piper aduncum*, sobre los tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* C1 obtenidos por metaciclologénesis a partir de epimastigotas. Los epimastigotes fueron cultivados en medio bifásico BHI/PYLB y la metaciclologénesis fue inducida en Grace’s Insect Medium. La susceptibilidad de los tripomastigotes frente al extracto hidroalcohólico de las hojas de matico se evaluó enfrentando el extracto disuelto en DMSO, a las concentraciones de 0.5 mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL con los tripomastigotas cultivados en medio GRACE’S. La supervivencia se midió mediante el recuento en hemocitómetro de flagelados móviles comparados con el control (sin matico). Se observó inmovilidad en las tres concentraciones empleadas en proporción directa con la concentración: a mayor concentración mayor inmovilidad.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, *Piper aduncum*, extracto hidroalcohólico; efecto tripanocida.

### ABSTRACT

The effect "in vitro" of hydroalcoholic extract of leaves matico, *Piper aduncum* on the trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* C1 obtained by metacyclogenesis from epimastigotes is determined. The Epimastigotes were grown in BHI biphasic medium/PYLB and metacyclogenesis was induced in Grace's Insect Medium. The susceptibility of tripomastigotes against the alcoholic extract of the leaves of matico was evaluated facing the extract dissolved in DMSO, at concentrations of 0.5 mg/mL, 0.96 mg/mL, and 1.90 mg/mL with tripomastigotes cultured in medium GRACE'S. Survival was measured by hemocytometer counting in mobile flagellates compared to control (without matico). Immobility was observed in the three concentrations used in direct proportion to the concentration: the higher the concentration increased immobility.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; *Piper aduncum*; hydroalcoholic extract; trypanocidal effect.

### INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, infecta a aproximadamente 10 millones de personas en el continente americano y causa la tercera más frecuente dolencia desatendida a nivel mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis. En el Perú, la zona costera de sur (Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna) son las zonas donde se han presentado la mayoría de casos, siendo *Triatoma infestans* el vector y *Cavia porcellus* “cobayo” reservorio.<sup>1,2</sup>

Entre otras causas, la elevada frecuencia se debe a la falta de un medicamento efectivo; por ello, se ha buscado drogas alternativas, ya que no se cuenta con vacunas. Se sabe, por ejemplo, que el extracto de las hojas de *Baccharis dracunculifolia* “chilca”, *Ampelozizyphus amazonicus* “ducke”, *Nectandra falcifolia* “laurel de río”, *Helicteres gardneriana*, *Cayaponia podantha* “taiuiá”, *Mimosa arenosa* “cuji”,

*Paullinia elegans* “ojo de muñeca”, *Rosmarinus officinalis* “romero”, *Eucalyptus globulus* “eucalipto”, *Corymbia citriodora* “eucalipto moteado”, *Cinnamomum verum* “canela”, *Myrocarpus frondosus* “incienso”, *Eugenia uniflora* “capulí”, *Citrus limón* “limón” y *Rosmarinus officinalis* “romero”; presentan actividad tripanocida<sup>7</sup>.

*Piper aduncum* “matico” (Piperaceae), planta usada en la medicina popular para el tratamiento de afecciones respiratorias, estomacales y hepáticas, presenta en sus hojas lactonas sesquiterpénicas, dehidroleucodina, helenalina, amidas, terpenos, flavonoides, neolignanos y lignanos que tendrían efectos antifúngicos, antimicrobianos, tripanocida y leishmanicida, tal como ha ocurrido con el efecto de otros extractos de plantas. En base a este antecedente se propuso la presente investigación, que estuvo orientada a determinar el efecto sobre la supervivencia de tripomastigotes de *T. cruzi* C4 del extracto hidroalcohólico de las hojas de matico, a las concentraciones de 0.5; 0.96 y 1.90 mg/mL. Se plantea que a medida que aumenta la concentración del extracto, el efecto anti-*T. cruzi* es mayor.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Plantas:

Se obtuvieron en Huaranchal, Provincia de Otuzco, Departamento de La Libertad, Perú, en el 2015, a partir de plantas de *Piper aduncum* “matico”; se seleccionaron plantas jóvenes y vigorosas, se empaquetaron en bolsas de polietileno con cierre hermético y se transportaron a temperatura ambiente al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú), para su identificación.

### Parásitos:

Se utilizó una población de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, denominada C4, aislados a partir de excreciones de *Triatoma infestans* capturados en el departamento de Arequipa y mantenidos por cultivos sucesivos en medio bifásico BHI/PYLB.

### Obtención del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* “matico”

Después de seleccionar las hojas, se procedió a secarlas a temperatura ambiental colocándolas sobre papel Kraft por 3 días. Luego fueron llenadas en bolsas del mismo papel y se colocaron en la estufa a 40°C durante 48 horas. Fueron sacadas de la estufa y se procedió a pulverizar las hojas manualmente. Luego se tamizó hasta obtener un tamaño de partículas >1<2 mm. Se procedió a instalar el equipo Soxhlet, se colocó 4 cartuchos previamente llenados con 25g del tamizado; humedeciéndolos con alcohol de 70°C hasta su límite. Cada cartucho se extrajo durante 1 hora; obteniéndose aproximadamente 100 mL de extracto hidroalcohólico. El extracto fue puesto en estufa a 40°C por 24 horas para obtener un extracto libre de etanol, para su posteriormente realizar la liofilización.

### Preparación del medio bifásico

Se extrajo 20 ml de sangre de conejo por punción cardíaca y se colocó en un matraz con perlas de vidrio agitándolo con movimientos circulares hasta ver la formación de coágulo y lograr la defibrinación de la sangre. En un matraz se agregó 10.5 g de agar BHI suplementándolo con 2 g de glucosa y se disolvió en 200 ml de agua destilada, se llevó al autoclave por 15 min a 120° C. Se dejó enfriar hasta 45 - 47°C, se agregó los 20 ml de sangre de conejo defibrinada y se mezcló hasta homogenizar. Se vertió 8 ml de medio en cada tubo 25x150mm con tapa rosca (20 tubos) y se dejó solidificar inclinando el tubo. Para el caldo PYLB, se agregó en otro matraz 0.6 g de extracto de levadura, 0.6 g de glucosa, 1.6 g de cloruro de sodio, 1.5 g de fosfato disódico y 0.08 g de cloruro de potasio. Se disolvió en 200 ml de agua destilada, se llevó a la autoclave por 15 min a 120 °C. Se dejó enfriar a 25°C, se agregó 1 ml de Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y 1 ml de Gentamicina 160mg (0.25mL/100mL). Se vertió en caldo PYLB a cada tubo 25x150mm con tapa rosca conteniendo el medio sólido.

### Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* fueron cultivadas en 20 tubos de 25x150mm, estériles, con medio bifásico constituido agar BHI más 20% de sangre defibrinada de conejo (9 mL), y caldo PYLB (11 mL). La siembra se hizo a partir de dos tubos procedentes del mantenimiento de la cepa, a razón de 1 mL por tubo. El lote de cultivo fue dejado a temperatura ambiental (22 ± 4 °C) durante un máximo de 15 días, para lograr el nivel máximo de replicación de epimastigotes.

### Inducción de la metaciclologénesis in vitro de *T. cruzi*

A partir del lote de epimastigotes, se extrajo los medios líquidos en tubos estériles de 13x150mm., tratando de retirar los parásitos confinados en la base del tubo, para luego centrifugarlos a 4000 rpm por

5 min. Inmediatamente después, se descartó el sobrenadante de cada tubo y los precipitados se reagruparon en un solo tubo hasta formar aprox. 2mL. Se realizó dos procesos de lavado con PBS estéril pH 7.26 conteniendo 0.5 % de Penicilina G sódica UI 1000000 / 5 mL y 0.25 % de Amikacina 500 mg /2 mL, para lo cual se agregó al tubo resultante 4 o 5 mL de PBS utilizando un gotero estéril, haciendo que la biomasa se resuspenda y entonces nuevamente se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, con la finalidad de eliminar residuos del medio de cultivo de proliferación. Los epimastigotes lavados fueron transferidos al medio de transformación Grace's Insect Medium SIGMA®, pero previamente fueron sometidos a un lavado con el medio a experimentar. Finalmente, se acondicionó 3 tubos de 13x150mm provistos con tapones de jebes estériles, para repartir equitativamente 1 mL del volumen de pellet obtenido y añadirle seguidamente Grace's Insect Medium en proporción 1:5. Se adicionó al medio ciertos antibióticos: Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Amikacina 500mg (0.25mL/100mL). Los tubos resultantes fueron dejados a temperatura ambiental durante 6 días. Transcurrido este periodo se realizó la verificación de la presencia de tripomastigotes y de los parásitos que se mantuvieran como epimastigote, mediante observación directa sobre lámina en microscopio.

## RESULTADOS

Se encontró que el extracto hidroalcohólico de *P. aduncum* presenta efecto sobre la supervivencia de los tripomastigotes de *T. cruzi* (Tabla 1). De la población de tripomastigotes de *T. cruzi* se evidenció diferentes porcentajes de supervivencia a las concentraciones 0.5mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL del extracto de *P. aduncum*. (Tabla 2).

**Tabla 1.** Efecto *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* en tres concentraciones diferentes: 0.5mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL, sobre poblaciones de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* C4.

CONCENTRACIÓN	EFEECTO
0.5mg/mL	Nulo
0.96 mg/mL	Poco efecto
1.90 mg/mL	Poco efecto

**Tabla 2.** Porcentaje de supervivencia de tripomastigotes de *T. cruzi*, tras el enfrentamiento *in vitro* con el extracto hidroalcohólico de *P. aduncum* en tres concentraciones diferentes, 0.5mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL.

SISTEMA	PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA (%) DE TRIPOMASTIGOTES DE <i>T. cruzi</i>		
	0.5mg/mL	0.96 mg/mL	1.90 mg/mL
1ª Repetición	83	48	35
2ª Repetición	80	50	30
3ª Repetición	83	30	33

## DISCUSIÓN

La actividad tripanocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aducum* se encuentra relacionada con los alcaloides, flavonoides, terpenos, y lignanos por ser los componentes que se logran extraer mediante el extracto hidroalcohólico<sup>4</sup>.

Los flavonoides actuarían inhibiendo a nivel de la arginina cinasa, enzima clave en el metabolismo energético del parásito, así mismo, algunos tipos de flavonoides tienen como organelo blanco a la mitocondria de *T. cruzi*, del mismo modo causan daño en la estructura interna del parásito, como vacuolización y aparición de otros cuerpos residuales. Causa también cambios en la excreción de ciertos metabolitos, como acetato y succinato, posiblemente por la acción sobre ciertas enzimas o directamente sobre su síntesis, o sobre la membrana citoplasmática, causando la pérdida de su funcionamiento; los

flavonoides podrían afectar la vía glicolítica, para la obtención de energía, se sabe que *T. cruzi* consume una alta tasa de glucosa, sin embargo es incapaz de degradarla completamente en CO<sub>2</sub> bajo condiciones aeróbicas, excretando al medio varios productos fermentativos, que en su mayoría son acetatos, succinato y L-alanina, es acá donde los flavonoides juegan el rol de inhibir la excreción de estos metabolitos<sup>5</sup>.

Los alcaloides isoquinolínicos están implicados fuertemente en la inhibición de una enzima antioxidante esencial del *Trypanosoma*, la tripanotiona reductasa. Esta enzima por sí misma ejecuta una variedad de funciones y protege al parásito de varias especies reactivas de oxígeno generadas por las células de defensa del huésped. Del mismo modo, los alcaloides se ven involucrados en la inhibición de traducción proteica, alquilación del material genético, e inhibición de otras enzimas.

Los principales terpenos con actividad tripanocida son monoterpenos del grupo de los iridoides, sesquiterpenos y triterpenos. A algunos sesquiterpenos se les atribuye la actividad tripanocida, ya que se les atribuye una alta lipofiliidad y una fuerte interacción de sus grupos metileno terminales con los grupos SH de las proteínas del parásito.

Ciertos lignanos tienen una acción selectiva por la SOD del parásito, bloqueando la unión del ión metálico de la misma, inhibiendo así la acción de esta enzima.

En general, todos los compuestos alteran morfológicamente las estructuras del parásito: separación de la membrana nuclear,

Alteración de la membrana citoplasmática y desorganización de la subpelícula de los microtúbulos, la mitocondria y kinetoplasto se ven igualmente afectados. Sin embargo se sugiere, que para un mejor estudio, se aumente la concentración del extracto hidroalcohólico, puesto que a la máxima concentración, usada en la investigación, resulta tener “poco efecto”.

La actividad tripanocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum* se encuentra relacionada con los alcaloides, flavonoides, terpenos, y lignanos por ser los componentes que se logran extraer mediante el extracto hidroalcohólico<sup>4,5</sup>.

Se han descrito varios mecanismos por los cuales estos productos derivados de las hojas pueden ejercer su efecto anti-*Trypanosoma cruzi*.

Los flavonoides actuarían inhibiendo a nivel de la arginina cinasa, enzima clave en el metabolismo energético del parásito, así mismo, algunos tipos de flavonoides tienen como organelo blanco a la mitocondria de *T. cruzi*<sup>6</sup>, del mismo modo causan daño en la estructura interna del parásito, como vacuolización y aparición de otros cuerpos residuales. Causa también cambios en la excreción de ciertos metabolitos, como acetato y succinato, posiblemente por la acción sobre ciertas enzimas o directamente sobre su síntesis, o sobre la membrana citoplasmática, causando la pérdida de su funcionamiento; los flavonoides podrían afectar la vía glicolítica, para la obtención de energía, se sabe que *T. cruzi* consume una alta tasa de glucosa sin embargo es incapaz de degradarla completamente en CO<sub>2</sub> bajo condiciones aeróbicas, excretando al medio varios productos fermentativos, que en su mayoría son acetatos, succinato y L-alanina, es acá donde los flavonoides juegan el rol de inhibir la excreción de estos metabolitos<sup>3,7</sup>.

Los alcaloides isoquinolínicos están implicados fuertemente en la inhibición de una enzima antioxidante esencial del *Trypanosoma*, la tripanotiona reductasa. Esta enzima por sí misma ejecuta una variedad de funciones y protege al parásito de varias especies reactivas de oxígeno generados por las células de defensa del huésped<sup>12,35</sup>. Del mismo modo, los alcaloides se ven involucrados en la inhibición de traducción proteica, alquilación del material genético, e inhibición de otras enzimas.

Los principales terpenos con actividad tripanocida son monoterpenos del grupo de los iridoides, sesquiterpenos y triterpenos<sup>30</sup>. A algunos sesquiterpenos se les atribuye la actividad tripanocida, ya que se les atribuye una alta lipofiliidad y una fuerte interacción de sus grupos metileno terminales con los grupos SH de las proteínas del parásito.

Ciertos lignanos tienen una acción selectiva por la SOD del parásito, bloqueando la unión del ión metálico de la misma, inhibiendo así la acción de esta enzima<sup>37</sup>.

En general, todos los compuestos alteran morfológicamente las estructuras del parásito: separación de la membrana nuclear, alteración de la membrana citoplasmática y desorganización de la subpelícula de los microtúbulos, la mitocondria y kinetoplasto se ven igualmente afectados<sup>37</sup>. En conclusión, se comprobó, que *P. aduncum* tiene propiedad tripanocida. Se sugiere que para un mejor estudio se aumente la concentración del extracto hidroalcohólico, puesto que a la máxima concentración, usada en la investigación, dio como resultado un “poco efecto”.

A medida que se aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper aduncum*, entre 0.5 y 1.9 mg/mL, aumenta el efecto tripanocida “in vitro” sobre los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nuns MPC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am CollegeCardiol* 2013; 62(9):767-776
2. Becerril MA. Parasitología médica. 3ra ed. México: McGraw Hill; 2001.
3. ShimaLuize P, ShiojiTiuman T, Morello LG, Korehiza Maza P, Ueda-Nakamura T, DiasFilho BP, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2005; 41 (1):85-94.
4. Da Silva Filho AA, De Sousa JPB, Soares S, Furtado NAJC, Andrade e Silva ML, Cunha WR, et al. Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Naturforsch.* 2008; 63 : 40-46.
5. Rosas LV, Cordeiro MSC, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, França SC, et al. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(5):663-670.
6. Truiti MCT, Ferreira ICP, Zamuner MLM, Nakamura CV, Serragiotto MH, Souza MC. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38: 1873-1878.
7. Mishina YV, Krishna S, Haynes RK, Meade JC. Artemisinins Inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma bruceirhodesiense* In Vitro Growth. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(5):1852-1854.
8. Rojas J, Palacios O, Ronceros S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla britton* (CEDRÓN) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2012; 29 (1): 61-68
9. Acevedo D, Navarro M, Monroy L. Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). *Inf. Tecnol.* 2013; 24 (4): 43-47.
10. Ferreira ME, Cebrián-Torrejón G, Corrales AS, Vera de Bilbao N, Rolón M, Gomez CV, et al. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable Chagas disease treatment. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133(3):986-93.
11. Azeredo CMO, Santos TG, Lameiro de Noronha Sales Maia BH, Soares MJ. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC COMPLEM ALTERN M.* 2014, 14:309.
12. Rojas J, Solís H, Palacios O. Evaluación *in vitro* de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *AnFacmed.* 2010; 71(3):161-165.
13. Muñoz Ortiz V, Duchén Uriarte EP, Wagner F, Ferreira ME, Serna E, Torrez S, et al. Actividad tripanocida in vitro e in vivo de extractos etanólicos de algunas plantas medicinales bolivianas. *BIOFARBO.* 2010; 18(1): 69-75.
14. Tenorio Vergara JL, Hernández Carvajal JE, Adolfo Vallejo G, Dairo Ramos J. Actividad tripanocida en el *Trypanosoma cruzi* del extracto etanólico de las semillas de la *Xylopiá aromática*. *Rev Cubana Farm,* 2006. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152006000300008&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152006000300008&script=sci_arttext)
15. Cano E, Cano Ortiz A, Martínez Lombardo MC, Alatorre Cobos J. flora medicinal utilizada en las enfermedades de la piel y en belleza. *Boletín. Instituto de EstudiosGiennenses.* 2009; 200:165-179
16. Gualtieri M, Villalta C, Guillén AM, Lappena E, Andara E. Determinación de la actividad Antimicrobiana de los Extractos de la *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). *INHRR (versión online)* 2004 enero [acceso 18 de octubre de 2014]; 35(1). Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-04772004000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-04772004000100003&script=sci_arttext)
17. Mann A, Ifarajimi OR, Adewoye AT, Ukam C, Udeme EE, Okorie II, et al. In vivo antitrypanosomal effects of some ethnomedicinal plants from nupeland of north central Nigeria. *J Tradit Complement Altern Med.* 2011; 8(1):15-21.
18. Atías A. Parasitología médica. 1ra ed. Chile: Mediterraneo; 1998.
19. Zaidenberg A, Tournier HA, Schinella GR, Buschiazzi HO. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2000; 42:21-26.
20. Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira R. The Haemoculture of *Trypanosoma minasense* Chagas, 1908. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996; 91 (4):501-505.
21. López Eyzarguirre N, D 'Jesús R. Infectividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* diferenciadas por primocultivo en medio LIT. *Revista Med-ULA.* 1999; 5 (1-4): 44-47.
22. Durán C, Quiroga MF, Díaz-Bello Z, Silva S, Roschman-González A, Strauss M, tertejo F. *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*: Conducta trófica en cultivos axénicos puros y mixtos. *Bol. Mal. Salud Amb.* 2009; XLIX (1): 97-106.

23. Saldaña C, Córdova O, Vargas F. Utilización de *Lepidium peruvianum*, Maca, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Perú. med. exp. salud pública. 2006; 23(2):137-140.
24. Gomes Pereira F, Dias dos Santos PR, Guimarães EF, Villela Romanos MT, Coelho Kaplan MA, De Lima Moreira D. Antiviral activity of the crude n-hexane extract from leaves of *Piper lepturum* var. *angustifolium* (C.DC.) Yunck. (Piperaceae). J. MedPlants Res. 2013; 7(42): 3076-3080.
25. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X Química Fina Farmacéutica. Colombia: Pinzón R, editor; 2000.
26. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega S.A.; 2002.
27. Duque Beltran S, Caceres Vega E, Corredor Arjona A. Comportamiento de flagelados de la familia Trypanosomatidae en dos medios de cultivo modificados. RevBiomed.1988; 8(1,2)
28. Acosta N, López E, Ferreira ME, Vera de Bilbao N. Determinación de la sensibilidad in vitro de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* al benznidazol y al extracto de hoja de la planta *Zanthoxylum chiloperone*. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2013; 9(2): 16-25.
29. Muñoz Ortiz V, Mollinedo P, Garcia P. Actividad tripanocida y antioxidante in vitro de los extractos etanólicos de *Caesalpinia pluviosa* DC. y *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. BIOFARBO. 2011; 19(2): 1-5.
30. Muñoz Ortiz V, Duchén Uriarte EP, Wagner F, Ferreira ME, Serna E, Torrez S, y col. Actividad tripanocida in vitro e in vivo de extractos etanólicos de algunas plantas medicinales bolivianas. BIOFARBO. 2010; 18(1): 69-75.
31. Escalante H, Jara AJ, Mayhuay R. Antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* detectados por Western Blot usando sueros de pacientes con parasitosis confirmada. REBIOL 2013; 33(2): 67-75.
32. Reiche E, Cabazzana M, Okamura E. Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas disease: Hospital Estatal de Londina, Brazil. Am J Trop Med Hyg 1998; 59(5): 750-756.
33. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72(1): 248-254
34. Aurazo C, Roldán J y Jara CA. *Trypanosoma cruzi*: características del crecimiento y susceptibilidad a violeta de genciana “in vitro” de dos poblaciones nativas de Zaña, Lambayeque, Perú. REBIOL 2013; 34(1): 69-75.
35. Jimenez V, Brengio S, Giordano O, Tonn C, Sanchez M, Burgos M, et al. The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. J Parasitol. 2005; 91(1):170-4.

<b>Correspondencia:</b> Hermes Escalante Añorga. Email: hescalante@unitru.edu.pe
--