

## Actividad tripanocida de *Piper solmsianum* C. DC. sobre formas epimastigota y tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*

Trypanocidal activity of *Piper solmsianum* C. DC. against epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*

Jorge I. Jhoao Mejía-Parra,<sup>I</sup> Michel A. Pérez-Araujo,<sup>I</sup> Judith Roldán-Rodríguez,<sup>II</sup> Consuelo Rojas-Idrogo,<sup>I</sup> Massuo J. Kato,<sup>III</sup> Guillermo E. Delgado-Paredes<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.

<sup>II</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

<sup>III</sup> Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, Brasil.

---

### RESUMEN

**Introducción:** la infección por *Trypanosoma cruzi*, conocida como enfermedad de Chagas, es un problema importante de salud pública en países de América Central y Sudamérica.

**Objetivo:** evaluar la actividad de extractos crudos de acetato de etilo de plantas *in vitro* de 6-8 meses y 10-12 meses de edad, de tallos leñosos y hojas de plantas silvestres maduras y el lignano tetrahidrofurano grandisina, aislados de *Piper solmsianum*, sobre las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi in vitro*.

**Métodos:** en la evaluación del efecto de diversos extractos crudos de acetato de etilo y grandisina de *P. solmsianum*, sobre la viabilidad de las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*, se utilizó el método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro).

**Resultados:** en la forma epimastigota, el mejor resultado en la inhibición del crecimiento fue obtenido con 50 µg/mL de extracto de tallo y en la forma tripomastigota con 25 y 50 µg/mL de grandisina y plantas *in vitro* de 6-8 meses de edad, respectivamente. En todos los casos los valores de inhibición oscilaron entre 86 a 96 %. Plantas *in vitro* de 6-8 meses de edad y grandisina fueron más activas sobre las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi* con valores de CI<sub>50</sub> de 0,018 y 0,360 µg/mL, respectivamente.

**Conclusiones:** se demuestra la actividad tripanocida de extractos de plantas silvestres y plantas *in vitro* de *P. solmsianum*.

**Palabras clave:** actividad tripanocida; extracto de plantas; grandisina; Piperaceae; plantas *in vitro*.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** the infection by *Trypanosoma cruzi*, known as Chagas' disease, poses a major public health problem in Central and South America countries.

**Objective:** to evaluate the activity of crude ethyl acetate extracts from *in vitro* plants of 6-8 and 10-12 months of age, stem barks and mature wild plant leaves and tetrahydrofuran lignin grandisin isolated from *Piper solmsianum* against the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* *in vitro*.

**Methods:** in the evaluation of the effect of various crude ethyl acetate extracts and grandisin from *P. solmsianum* on the viability of epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi*, the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was used.

**Results:** in the epimastigote form, the best results in growth inhibition was obtained with 50 µg/mL of stem extract, and in the trypomastigote form, with 25 and 50 µg/mL of grandisin and 6-8 months-old *in vitro* plants, respectively. The inhibition values in all cases ranged from 86 to 96 %. 6-8 months old *in vitro* plants and grandisin were found to be active against the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* with IC<sub>50</sub> of 0.018 µg/mL and 0.360 µg/mL, respectively.

**Conclusions:** the trypanocidal activity of extracts from wild plants and *in vitro* plants of *P. solmsianum* was proved.

**Keywords:** trypanocidal activity; plant extract; grandisin; Piperaceae; *in vitro* plants.

---

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es, después de la malaria, el mayor problema endémico de salud pública en varios países de América del Sur y Central, con 18-20 millones de infectados, lo que representa un riesgo para 25 millones de personas, desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de la Argentina, con 200 000 nuevos casos anuales y 21 000 muertes por año.<sup>1-3</sup> La enfermedad de Chagas está asociada a las condiciones de pobreza de áreas rurales en América del Sur y Central y es causada por *Trypanosoma cruzi* Chagas, parásito transmitido al humano por los vectores *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. nitida*, *Pastrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* y otros. Algunas personas infectadas con el parásito viven toda su vida sin mostrar signos de la enfermedad, pero otras infectadas muestran severos síntomas que en muchos casos resultan fatales.<sup>4</sup> En general, la infección con *T. cruzi* es una seria amenaza para la vida y en su fase aguda y/o crónica acarrea severas complicaciones cardíacas.<sup>5</sup>

---

Durante su complejo ciclo de vida *T. cruzi* tiene tres principales estadios de desarrollo en diferentes hospederos. La forma replicativa epimastigota ocurre en el intestino del insecto vector, y las formas amastigota después que son liberados en el flujo sanguíneo como tripomastigota, en los mamíferos hospederos, pueden infectar otras células o ser ingeridos por el insecto vector. En el intestino del triatomino, los tripomastigota se diferencian en otras formas reproductivas, epimastigota, los que en la ampolla rectal se transforman en los infectivos tripomastigota metacíclicos que son descargados con las heces del insecto hasta alcanzar el flujo sanguíneo de los vertebrados hospederos.<sup>5-8</sup> Los mamíferos constituyen reservorios naturales y tenemos entre estos a armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos y primates silvestres, así como ciertos animales domésticos como perros, gatos e incluso ratas y cobayos.<sup>9</sup>

Las drogas más comunes utilizadas en el tratamiento de la enfermedad son nifurtimox (3-methyl-4(5-nitrofurfurylideneamino)-tetrahydro-[1,4]thiazine-1,1-dioxide) y benznidazol (*N*-benzyl-2-nitro-1-imidazoleacetamide), ambas desarrolladas hace más de cuatro décadas; sin embargo, varios autores han coincidido en señalar que la quimioterapia corrientemente recomendada en el tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas tiene serias limitaciones debido a su limitada efectividad y sus efectos secundarios,<sup>10</sup> en dependencia del área geográfica y la ocurrencia de resistencia natural así como a la baja actividad antiprotozoaria sobre el último estadio crónico.<sup>11</sup> Nifurtimox a menudo causa anorexia, disturbios gastrointestinales, neuropatías y sarpullido, y en ambas drogas se ha observado toxicidad cardíaca y renal, lo cual constituye un fracaso en la cura de la mayoría de pacientes cuando la enfermedad es crónica, de allí que muy pocos pacientes se someten al tratamiento a largo plazo y la mayoría lo abandonan.<sup>5,12,13</sup> Por todas estas razones resulta prioritaria la búsqueda de nuevos agentes quimiopreventivos o quimioterapéuticos,<sup>14</sup> sintéticos o naturales; no obstante, el conocimiento cada vez mayor que se tiene sobre la bioquímica de *T. cruzi* ha conducido al desarrollo de nuevos fármacos como alopurinol, purinas análogas, itraconazol, entre otros, y al conocimiento de su modo de acción,<sup>15-17</sup> pues el desarrollo de una vacuna no es una perspectiva cercana.

Los productos naturales de origen vegetal, con actividad tripanocida potencial, son considerados alternativas válidas sobre las drogas sintéticas convencionales en el control del parásito en sus diferentes estadios de vida. Al respecto, los estudios sobre la actividad tripanocida de especies de Piperaceae son escasos si consideramos que la familia cuenta con 14 géneros y alrededor de 4 000 especies a nivel mundial,<sup>18</sup> en que diversos compuestos bioactivos aislados en las especies de *Piper* y *Peperomia*, como amidas, alcaloides, lignanos, ácido benzoico y cromenos,<sup>19,20</sup> han mostrado actividad tripanocida.<sup>20-32</sup>

Así tenemos, como ejemplos relevantes, que el extracto hidroalcohólico etanol:agua (90:10) de hoja de *Piper regnellii*, colectada en el estado brasileño de Paraná, alcanzó una alta inhibición en el crecimiento de la forma epimastigota de *T. cruzi*.<sup>23</sup> Asimismo, se evaluó la actividad tripanocida de 24 extractos y fracciones de *Piper arboreum* y *Piper tuberculatum*, a través del ensayo colorimétrico MTT, sobre las formas epimastigota de la cepa Y de *T. cruzi*; se observó que las actividades más potentes correspondieron a las fracciones hexánicas de hojas de *P. arboreum* y *P. tuberculatum*, al igual que las fracciones hexánicas de frutos de *P. tuberculatum* y *P. arboreum*.<sup>26</sup>

Por otro lado, en extracto metanólico de hojas de *Piper malacophyllum*, colectado en el estado de São Paulo, se aisló el alquenilfenol gibbilimbol B el cual fue evaluado en su actividad leishmanicida contra las formas promastigota y amastigota de *Leishmania infantum chagasi*, así como actividad tripanocida contra la forma tripomastigota de *T. cruzi*,<sup>20</sup> y más recientemente, se han reportado compuestos aislados de productos naturales, como es el caso de las amidas piperovatina y piperlonguminina, aisladas de *Piper ovatum*, que resultaron activos sobre las formas epimastigota y amastigota intracelular de *T. cruzi*.<sup>32</sup>

En otro estudio también se analizó la actividad tripanocida *in vivo* de sustancias aisladas de especies de *Piper* como, por ejemplo, la evaluación de las propiedades terapéuticas *in vivo* de (-)-cubebina, un compuesto aislado de semillas secas de *P. cubeba* y (-)-hinokinina, preparado por oxidación de (-)-cubebina.<sup>33</sup>

El objetivo del estudio fue evaluar la actividad tripanocida de extractos crudos de plantas *in vitro*, hojas y tallos de plantas silvestres maduras y la sustancia pura grandisina, obtenidos de *P. solmsianum* C. DC. sobre las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas.

## MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico estuvo constituido por espigas maduras (con frutos y semillas), tallos y hojas de plantas silvestres de *P. solmsianum* C. DC., colectado en el Núcleo de Picinguaba, ciudad de Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil, así como plantas *in vitro* crecidas en condiciones asépticas, que comprendió dos grupos de edades, plantas jóvenes de 6 a 8 meses y plantas adultas de 10 a 12 meses. Adicionalmente, se contó con el compuesto puro (-) grandisina, un lignano tetrahidrofurano (Fig. 1), purificado en el Instituto de Química de la Universidade de São Paulo (IQ/USP), a partir de espigas maduras. Las plantas fueron identificadas por el doctor Guillermo E. Delgado-Paredes de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque, quien se basó en la descripción realizada por Yuncker.<sup>34</sup> Una muestra herborizada se depositó en el Herbario IQ/USP.

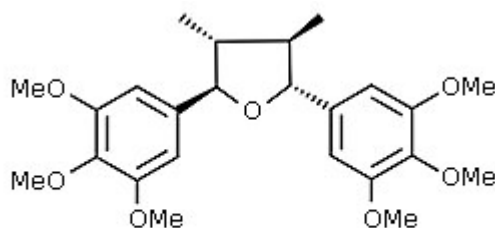


Fig. 1. Estructura molecular de la grandisina.

El parásito *T. cruzi*, procedente del departamento de Arequipa, en el sur del Perú, fue proporcionado por el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, y mantenido en especímenes de ratones (*Mus musculus*) BALB/c, en el Laboratorio de Artrópoda Parasitaria de la Especialidad de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT).

#### OBTENCIÓN Y CULTIVO DE PLANTAS *IN VITRO*

Las semillas de *P. solmsianum* se desinfectaron con etanol 70 % durante 1 min e hipoclorito de sodio (lejía comercial Clorox 5,25 % de cloro activo) durante 5 min, luego enjuagadas con agua destilada esterilizada e inoculadas, a razón de 3-5 semillas por tubo de ensayo de 18 x 150 mm, que contenía las sales minerales MS,<sup>35</sup> las vitaminas m-inositol 100 mg/L y tiamina. HCl 1,0 mg/L, sacarosa 2 % y agar-agar 0,6 %; esta actividad se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Recursos Genéticos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNPRG.

Después de 6 meses de cultivo, las plantas fueron micropropagadas por ápices caulinares y segmentos nodales, en medio de cultivo similar al anterior excepto que fue suplementado con ácido indol-3-acético (AIA) y ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) 0,02 mg/L, respectivamente. El pH del medio de cultivo fue ajustado en  $5,8 \pm 0,1$  con NaCl y HCl 0,1 N, respectivamente, y esterilizado en autoclave a 15 lbs/pulg<sup>2</sup> de presión y 121 °C de temperatura durante 20 min. La incubación de los cultivos se realizó con  $10 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  de irradiancia, 24-26 °C de temperatura y 16-8 h de fotoperiodo.

#### OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE PLANTAS SILVESTRES Y PLANTAS *IN VITRO*

En las plantas silvestres, tallos leñosos y hojas se secaron al ambiente complementándose en estufa a 50 °C de temperatura durante una semana; posteriormente, la materia seca se molió para obtener un polvo fino y se sometió a extracción con acetato de etilo (AcOEt) por tres veces consecutivas durante 24 h. En las plantas *in vitro*, la materia seca, obtenida de individuos completos que incluyó tallos, hojas y raíces, de 6-8 (Fig. 2, A) y 10-12 meses (Fig. 2, B), se sometió a un proceso similar de extracción.



**Fig. 2.** *Piper solmsianum in vitro*. A) Planta joven de 6-8 meses de edad, y B) planta adulta de 10-12 meses de edad.

Las concentraciones del extracto crudo ensayadas resultaron de bioensayos previos; se tomaron como criterio el porcentaje de mortalidad de las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi* en relación con el tiempo transcurrido de exposición; se establecieron las siguientes concentraciones: 5, 25 y 50 µg/mL.

#### EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE AcOEt DE *P. SOLMSIANUM* SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS FORMAS EPIMASTIGOTA Y TRIPOMASTIGOTA DE *T. CRUZI*

##### Epimastigota

En epimastigota la siembra y aislamiento se inició a partir de sangre obtenida de dos especímenes de *Mus musculus* BALB/c, infectados con *T. cruzi*; se realizaron hemocultivos en medio de cultivo bifásico BHI suplementado con 10 % de sangre de conejo desfibrinada e incubados a 28 °C de temperatura. Estos medios de cultivo se examinaron diariamente con ayuda de un microscopio invertido.

La curva de crecimiento se determinó a partir del cultivo primario sembrándose  $1 \times 10^5$  epimastigota/mL, en medio de cultivo bifásico BHI modificado, suplementado con 10 % de sangre de conejo desfibrinado e incubándose a 28 °C de temperatura; luego se realizó conteos diarios en cámara de Neubauer para la determinación de la curva de crecimiento en relación con el tiempo durante seis días.

Durante la ejecución del bioensayo, en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, se establecieron tres grupos experimentales (I, II y III) y dos grupos control (IV y V), cada uno por triplicado, agregándole a cada grupo 20 µL de epimastigota de *T. cruzi*, en fase de crecimiento logarítmico, a una concentración de  $1 \times 10^5$  epimastigota/mL y 80 µL de medio de cultivo BHI con gentamicina. Se prepararon concentraciones de 5,0; 25,0 y 50,0 µg/mL, las que fueron utilizadas en los ensayos, usando como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) 1 % y de cada concentración se aplicó 50,0 µL a los grupos I, II y III, respectivamente, al grupo IV 50,0 µL de BHI y al grupo V 50,0 µL de DMSO. La microplaca fue incubada a 28 °C de temperatura por cuatro días.

En relación con los blancos de estandarización, para determinar el porcentaje de inhibición se contó con los valores de las soluciones de referencia estableciéndose cuatro grupos a los que se incorporó 100 µL de BHI con gentamicina; luego al primer grupo se le suplementó 20 µL de BHI y a los otros grupos 50,0 µL del EC en las concentraciones de 5,0; 25,0 y 50,0 µg/mL, respectivamente, e incubaron a 28 °C de temperatura durante cuatro días.

En la determinación de la viabilidad, después de cuatro días de incubación de los grupos, se añadió a cada pocillo de la microplaca 10 µL de 2,5 mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro (MTT) incubándose durante 75 min en oscuridad a 28 °C de temperatura (Mosmann, 1983);<sup>36</sup> posteriormente, se agregó 100 µl de solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 %, mantenida a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 min. La absorbancia de las muestras fue leída a 492 nm en un lector de ELISA y no a 595 nm como usualmente se realiza, según lo disponible en el laboratorio.

Por otro lado, la concentración inhibitoria 50 % (CI<sub>50</sub>) fue determinada mediante el análisis de regresión lineal del gráfico, porcentaje de inhibición vs. logaritmo de la concentración del extracto. También se determinaron los valores de CI<sub>50</sub> de los grupos, experimental y control, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [1 - (Am - Abm) / (Ar - Abr)] \times 100$$

donde:

Am: absorbancia de la muestra,

Abm. absorbancia del blanco de la muestra,

Ar: absorbancia de las soluciones de referencia y

Abr: absorbancia del blanco de referencia.

### Tripomastigota sanguíneos

En la ejecución del ensayo, a partir de ratones previamente infectados, se obtuvo una muestra por punción cardíaca para la obtención de tripomastigota sanguíneos de *T. cruzi*, la que se colocó en tubos de ensayo esterilizados con heparina y se centrifugó a 2 000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^5$  tripomastigota sanguíneos/mL, realizándose el recuento en cámara de Neubauer.

Durante la aplicación del EC, 20  $\mu$ L de tripomastigota de *T. cruzi* se distribuyeron en pocillos de una microplaca, a una concentración de  $1 \times 10^5$  tripomastigota/mL, y se procedió con el mismo protocolo seguido para el caso de los epimastigota. Asimismo, en la determinación de la viabilidad de los tripomastigota se siguió el protocolo desarrollado para los epimastigota.

### ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias de Tukey con la finalidad de establecer las diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control, para lo cual se utilizó el programa computarizado SPSS vr. 20 con 0,05 de significancia.

## RESULTADOS

### INHIBICIÓN DE EPIMASTIGOTA

Los ensayos de inhibición de epimastigota de *T. cruzi* en diferentes concentraciones (5, 25 y 50  $\mu$ g/mL) de extractos crudos de AcOEt de plantas *in vitro* jóvenes (6-8 meses), plantas *in vitro* maduras (10-12 meses), de tallos leñosos y hojas de plantas silvestres y grandisina, obtenida de espigas maduras, indicaron que la menor tasa de inhibición en el crecimiento de epimastigota fue 72,87 % en 5,0  $\mu$ g/mL de la sustancia pura grandisina mientras que la mayor tasa de inhibición



en el crecimiento de epimastigota fue 96,09 % con 50,0 µg/mL de extracto de tallos (tabla 1). La tendencia general mostrada en la tabla 1 fue que conforme se incrementaba la concentración de los extractos de 5,0 a 50,0 µg/mL aumentaba también la tasa de inhibición en el crecimiento de epimastigota, y fue precisamente en la concentración de 50,0 µg/mL de todos los extractos ensayados, incluyendo la grandisina, en que se alcanzaron las tasas más altas de inhibición en el crecimiento de epimastigota.

**Tabla 1.** Efecto de las concentraciones 5, 25 y 50 µg/mL, de extractos crudos de plantas *in vitro*, de tallos y hojas de plantas silvestres y la sustancia pura grandisina, obtenidos de *P. solmsianum* en la inhibición del crecimiento de epimastigota de *T. cruzi*

Tipo de extracto	Inhibición del crecimiento (%)		
	Concentración del extracto crudo (µg/mL)		
	5,0	25,0	50,0
Plantas <i>in vitro</i> (6-8 meses)	78,47 ± 2,71 c	82,12 ± 0,99 c	87,34 ± 1,37 b
Plantas <i>in vitro</i> (10-12 meses)	77,69 ± 5,90 c	86,88 ± 0,84 b	89,79 ± 7,34 b
Tallos	84,31 ± 9,27 a	92,49 ± 3,16 a	96,09 ± 0,52 a
Hojas	81,09 ± 3,48 ab	88,88 ± 4,22 b	90,73 ± 7,70 b
Grandisina	72,87 ± 2,74 d	78,64 ± 4,99 c	88,27 ± 9,74 b

Los valores presentados son la media ± DE de tres repeticiones por tratamiento. Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p= 0,001$ ;  $\alpha= 0,05$ ).

El análisis de varianza (ANOVA) realizado para cada clase de extracto ensayado, indicó que la inhibición en el crecimiento de epimastigota resultó significativo, con el menor valor en la prueba de F de 18,48 para extractos de tallos y el mayor valor de 145,86 para plantas *in vitro* jóvenes (6-8 meses) (datos no mostrados en tabla 1). Por otro lado, la prueba de Tukey mostró que el extracto de plantas *in vitro* jóvenes (6-8 meses) de 25,0 y 50,0 µg/mL tuvieron un efecto estadísticamente similar, mientras que 5,0 µg/mL y el control resultaron estadísticamente iguales y diferentes a los otros tratamientos; además, los extractos de plantas *in vitro* maduras (10-12 meses), tallos y hojas de plantas silvestres, así como la grandisina, resultaron estadísticamente iguales y diferentes al control, mientras que los extractos de tallos y hojas de plantas silvestres resultaron estadísticamente iguales en las tres concentraciones ensayadas y diferentes respecto al control.

#### INHIBICIÓN DE TRIPOMASTIGOTA

Los ensayos de inhibición de tripomastigota de *T. cruzi* en diferentes concentraciones (5, 25 y 50 µg/mL) de extractos crudos de AcOEt de plantas *in vitro* y estructuras vegetales de plantas silvestres, indicaron que la menor tasa de inhibición en el crecimiento de tripomastigota fue 70,88 % en 5,0 µg/mL de extracto de hojas, mientras que la mayor tasa de inhibición en el crecimiento de tripomastigota fue 93,37 % con 50,0 µg/mL de grandisina (tabla 2).

El análisis de varianza (ANOVA), realizada para cada clase de extracto ensayado, indicó que la inhibición en el crecimiento de tripomastigota resultó significativo, con el menor valor en la prueba de F de 91,38 para extractos de plantas *in vitro* jóvenes (6-8 meses) y el mayor valor de 2347,28 para extractos de tallos (datos no mostrados en tabla 2). Por otro lado, la prueba de Tukey, para concentraciones del extracto de plantas *in vitro* jóvenes (6-8 meses) mostró que 25,0 y 50,0 µg/mL



tuvieron un efecto estadísticamente similar y diferente cuando se utilizó 5,0 µg/mL, mientras que el tratamiento control fue diferente a todos; asimismo, una respuesta similar ocurrió con el extracto de plantas *in vitro* maduras (10-12 meses) en que la concentración de 5,0 µg/mL resultó diferente a las concentraciones de 25,0 y 50,0 µg/mL y el control diferente a todos, mientras que en el caso de los extractos de tallos y hojas de plantas silvestres, así como con grandisina, todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes entre sí, incluyendo al control.

**Tabla 2.** Efecto de las concentraciones 5, 25 y 50 µg/mL, de extractos crudos de plantas *in vitro*, de tallos y hojas de plantas silvestres y la sustancia pura grandisina, obtenidos de *P. solmsianum* en la inhibición del crecimiento de tripomastigota de *T. cruzi*

Tipo de extracto	Inhibición del crecimiento (%)		
	Concentración del extracto crudo (µg/mL)		
	5,0	25,0	50,0
Plantas <i>in vitro</i> (6-8 meses)	71,26 ± 5,30 c	86,75 ± 4,04 a	92,93 ± 3,07 a
Plantas <i>in vitro</i> (10-12 meses)	74,97 ± 2,68 b	86,20 ± 2,14 a	91,56 ± 3,65 a
Tallos	74,25 ± 0,99 b	84,15 ± 0,99 ab	91,75 ± 1,51 a
Hojas	70,88 ± 3,54 c	82,35 ± 1,50 b	92,15 ± 0,98 a
Grandisina	77,93 ± 2,08 a	86,30 ± 2,00 a	93,37 ± 2,08 a

Los valores presentados son la media ± DE de tres repeticiones por tratamiento. Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p = 0,001$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

### EVALUACIÓN DE CI<sub>50</sub>

En la evaluación de CI<sub>50</sub>, si bien los valores mostrados salen fuera de la curva (< 5,0 µg/mL) (tabla 3), lo que indicaría que hubiera sido conveniente el ensayo de concentraciones aún más bajas, los resultados señalaron que el extracto de plantas *in vitro* (6-8 meses) 0,018 µg/mL inhibió el 50 % de crecimiento de epimastigota de *T. cruzi*, seguido de la grandisina, plantas *in vitro* (10-12 meses), hojas y tallos, en que se alcanzó el mayor valor con 0,254 µg/mL. A excepción del extracto de tallos, los otros extractos tuvieron un efecto similar en la actividad inhibitoria media. Referente al crecimiento de tripomastigota de *T. cruzi*, el valor más bajo de CI<sub>50</sub> se alcanzó con la grandisina 0,360 µg/mL, mientras que en los otros extractos ensayados los valores de CI<sub>50</sub> fueron superiores a 0,5 µg/mL; el valor más alto con 1,143 µg/mL correspondió al extracto de plantas *in vitro* (6-8 meses).

**Tabla 3.** Valores de CI<sub>50</sub> para tres concentraciones (5, 25 y 50 µg/mL) y cuatro tipos de extractos crudos y grandisina de *P. solmsianum* en la inhibición del crecimiento de epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*

Tipo de extracto	Estimación (µg/mL)			
	Epimastigota		Tripomastigota	
	CL <sub>50</sub>	Límites	CL <sub>50</sub>	Límites
Plantas <i>in vitro</i> (6-8 meses)	0,018	0,00-0,338	1,143	0,419-2,068
Plantas <i>in vitro</i> (10-12 meses)	0,051	0,00-0,658	0,525	0,084-1,308
Tallos	0,254	0,00-1,806	0,575	0,095-1,407
Hojas	0,064	0,00-0,064	0,576	0,098-1,048
Grandisina	0,039	0,00-0,039	0,360	0,038-1,034

Límites de confianza al 95 % para cada concentración de extracto.

Al comparar los resultados de la inhibición del crecimiento entre epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*, los valores más bajos de CI<sub>50</sub> correspondieron a epimastigota en un rango de 0,018 a 0,254 µg/mL, mientras que los valores más altos de CI<sub>50</sub> correspondieron a tripomastigota en un rango de 0,360 a 1,143 µg/mL; resultados que indicaron que la forma tripomastigota fue más resistente a los tratamientos ensayados -

## DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, causada por el protozoario flagelado *T. cruzi*, constituye un importante problema de salud pública en América Latina que afecta anualmente a millones de personas.<sup>37</sup> El tratamiento más común para el control de la enfermedad es el uso de las drogas nifurtimox y benznidazol; sin embargo, el tratamiento genera diversos efectos colaterales adversos y baja eficacia clínica en dependencia del genotipo del parásito.<sup>10,11,38</sup> Es por ello la necesidad de buscar alternativas en el tratamiento de la enfermedad con el uso de plantas medicinales, muchas de estas utilizadas en la medicina tradicional.

Una familia vegetal importante de amplia ocurrencia en especies en América Tropical es la Piperaceae en que varias especies de *Piper* han mostrado actividad biológica contra plagas y enfermedades; se destacan entre estas *P. solmsianum*, un arbusto de 1-3 m de altura, comúnmente establecido en el sudeste del Brasil, cuyos estudios fitoquímicos revelaron la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos, arilpropanoides, fenilpropanoides, lignanos y neolignanos, con actividad biológica contra bacterias, hongos y la forma tripomastigota de *T. cruzi*.<sup>39</sup>

En algunos estudios se ensayaron extractos crudos y en otros casos sustancias puras. Precisamente, en *P. solmsianum* se evaluaron los lignanos tetrahidrofuranos grandisina (a), *rel*- (7R,8R,7'R,8'R)-3',4'-metilendioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana (b) y *rel*- (7R,8R,7'R,8'R)-3,4,3',4'-dimetilendioxi-5,5'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana (c). Estos últimos químicamente muy similares, aislados de inflorescencias y ensayados sobre formas tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Y) en las concentraciones de 5, 25 y 50 µg/mL; se ha observado una mayor actividad tripanocida en la sustancia (a) que alcanza 92,8 % de inhibición en el crecimiento en la concentración de 50 µg/mL.<sup>21</sup> En *P. regnellii*, extracto hidroalcohólico etanol:agua (90:10) de hoja, en 100 µg/mL de concentración se observó una inhibición en el crecimiento de la forma epimastigota de *T. cruzi* de 89,7 %;<sup>23</sup> de manera que resulta posible que la actividad biológica de *P. regnellii* se deba a la presencia del neolignano eupomatenoide-7 y el lignano fragransina E<sub>1</sub>, aislados de *Aristolochia taliscana* y que inmovilizaron formas epimastigota de *T. cruzi*.<sup>40</sup> En *P. arboreum* y *P. tuberculatum* las fracciones hexánicas de hojas, ensayadas sobre formas epimastigota cepa Y de *T. cruzi*, presentaron mayor efecto inhibitorio, mientras que las fracciones hexánicas de frutos presentaron menor efecto inhibitorio; la actividad biocida se le atribuyó a las amidas, piperilina y 4,5-dihidropiperilina.<sup>26</sup>

Por otro lado, las amidas naturales piperovatina y piperlonguminina, aisladas de *P. ovatum*, resultaron activas sobre la forma epimastigota de *T. cruzi*; se observaron alteraciones en la membrana plasmática y mitocondria, y se asumió que las disfunciones mitocondriales inducidas por las amidas conllevan a alteraciones bioquímicas que conducen a la muerte de las células.<sup>32</sup> Igualmente, en otro estudio realizado en ratones, se evaluó las propiedades terapéuticas *in vivo* de (-)-cubebina (50 mg/kg), un compuesto aislado de semillas secas de *P. cubeba* L. y (-)-hinokina (20 mg/kg), preparado por oxidación de (-)-cubebina; se observaron diferencias en

el núcleo de las células del bazo de ratones no infectados, infectados tratados e infectados no tratados, de manera que resultó el perímetro del núcleo mayor en animales infectados no tratados, sin evidenciar toxicidad.<sup>33</sup>

En general, los resultados de la actividad tripanocida de extractos crudos y sustancias puras de varias especies de *Piper* fueron inferiores frente a los del presente trabajo, como fue el caso de *P. regnellii* en que los resultados fueron iguales que los de extractos de plantas *in vitro* (10-12 meses) (89,7 %) e inferiores que los de extractos de tallos (96,09 %) de *P. solmsianum*, pero en ambos casos con extractos de 50 µg/mL de concentración e incluso con extractos de tallos de 25 µg/mL en que se alcanzó hasta 92,49 % de inhibición en el crecimiento; asimismo, respecto a *P. arboreum* y *P. tuberculatum* en que los valores de CI<sub>50</sub> presentaron menor efecto inhibitorio respecto a los valores de *P. solmsianum*, en el presente trabajo.

En otros estudios realizados en 311 especies evaluadas procedentes de varias regiones de América Central y Sudamérica, solamente 17 especies (5,4 %) mostraron actividad antiparasitaria sobre *Plasmodium falciparum*, *Leishmania mexicana* y *T. cruzi* con CI<sub>50</sub> ≤ 10 µg/mL; la mayor actividad sobre *T. cruzi* correspondió al extracto etanólico de tallos de *Bourreria huanita* (Boraginaceae).<sup>41</sup> Igualmente, en otro estudio similar realizado en Brasil con 92 extractos etanólicos obtenidos de diferentes partes de plantas de numerosas familias de la Mata Atlántica y el Cerrado de São Paulo, sobre la forma epimastigota Y y cepas de Bolivia de *T. cruzi*, se observó que la mayor actividad tripanocida se alcanzó con extractos de frutos de *Ocotea paranapiacabensis* y *Aegiphila lhotzkiana*.<sup>42</sup> También, extractos de diclorometano o metanol agua (4:1) de 31 especies de la región central de Chile se evaluaron sobre formas tripomastigota de *T. cruzi*; la mayor actividad tripanocida se observó con los extractos de *Podanthus ovalifolius*, *Berberis microphylla*, *Kageneckia oblonga* y *Drymis winteri*, y se atribuyó la actividad biológica, en el caso de *D. winteri*, a los sesquiterpenos drimanos: poligodial, drimenol e isodrimenina.<sup>43</sup>

En otro estudio, extractos etanólicos de *Senna villosa* (Fabaceae), *Serjania yucatenensis* (Sapindaceae), *Byrsonima bucidaefolia* (Malpighiaceae) y *Bourreria pulchra* (Boraginaceae), fueron evaluados sobre formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*, y se observó que los extractos de hojas de *S. yucatenensis* y *B. pulchra* fueron más activos sobre epimastigota y tripomastigota; asimismo, solamente el extracto de hoja de *S. yucatenensis* mostró significativa actividad tripanocida en ensayos *in vivo*, y redujo en 75 % la parasitemia en ratones infectados.<sup>44</sup> Al igual que en los estudios anteriores, estos valores, sean expresados en porcentaje de inhibición o como CI<sub>50</sub>, resultaron similares o inferiores a los mostrados en el estudio realizado en nuestro trabajo con *P. solmsianum*.

Aunque los extractos de plantas *in vitro* de *P. solmsianum* mostraron un ligero menor efecto inhibitorio en el crecimiento de *T. cruzi*, respecto a los extractos de plantas silvestres maduras y la grandisina, este fue ligeramente menor en la forma epimastigota, la que en general mostró mayor susceptibilidad que la forma tripomastigota; no se observaron diferencias significativas entre las plantas *in vitro* de 6-8 meses respecto a las plantas *in vitro* de 10-12 meses. La fuerte actividad tripanocida de las plantas *in vitro* abre la posibilidad de biosintetizar los compuestos activos en gran escala con el establecimiento de suspensiones celulares.<sup>45,46</sup> Las mayores ventajas del sistema de cultivo de células sobre los métodos convencionales de propagación de plantas completas, estriban en que los compuestos útiles pueden ser producidos bajo condiciones controladas independientemente de los cambios climáticos o condiciones del suelo; los cultivos

pueden establecerse libres de microorganismos y plagas; las células pueden multiplicarse para producir metabolitos específicos; y el control automatizado del crecimiento celular y la regulación racional de los procesos metabólicos pueden reducir significativamente los costos y mejorar la productividad.<sup>47</sup>

Por otro lado, el uso de sustancias puras no siempre resulta más efectivo que los extractos crudos. Al respecto, se ha señalado que el uso de extractos crudos tiene una profunda significación y ventaja ecológica puesto que por ser fuente de una complejidad de moléculas muestra diversas bioactividades, lo que eleva los niveles de toxicidad en relación con los compuestos individuales químicamente puros, a lo que se suma el riesgo de inducir resistencia.<sup>48</sup> Adicionalmente, se ha propuesto como estrategia de trabajo el uso de extractos heterogéneos de toda la biomasa de la planta, para inducir un efecto sinérgico sobre algún organismo específico.<sup>49</sup> Es el caso que en el control del IV estadio larval de *Anticarsia gemmatalis*, se reportó que los extractos crudos de semillas, hojas y tallos causaron 80 % de mortalidad con 800 µg/insecto y las amidas pillitorina y 4,5-dihidropiperlonguminina causaron 100 % de mortalidad con 200 y 700 µg/insecto,<sup>50</sup> lo que de alguna manera confirmó la importancia de utilizar extractos crudos. Recientemente, en *Croton cajucara* el extracto metanólico de tallo leñoso fue más activo que los compuestos aislados trans-dehidrocrotonina y ácido acetil aleuritólico sobre la forma tripomastigota de *T. cruzi*.<sup>51</sup> En nuestro estudio sobre la actividad tripanocida de *P. solmsianum* sobre las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi*, varios extractos crudos de plantas *in vitro* y plantas silvestres resultaron superiores a la sustancia pura grandisina.

## Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends in Parasitol. 2003;19:495-501.
  2. WHO (World Health Organization). Triatomine bugs. 2007. p. 213. [cited 2015 Aug 12]. Available from: [http://www.who.int/entity/water\\_sanitation\\_health/resources/vector210to222.pdf](http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/resources/vector210to222.pdf)
  3. Organización Mundial de la Salud. Control de la enfermedad de Chagas: segundo informe del comité de expertos de la OMS. Ginebra: OMS; 2003. Serie de Informes Técnicos 905.
  4. Berger I, Barrientos AC, Cáceres A, Hernández M, Rastrelli L, Passreiter CM, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of against *Trypanosoma cruzi*. J Ethnopharmacol. 1998;62:107-15.
- protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemala plants
5. Uchiyama N. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. J Health Sci. 2009;55:31-9.

6. Nakajima-Shimada J, Hirota Y, Aoki T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. *Antimicrob Agents Ch.* 1996;40:2455-8.
7. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:92-100.
8. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001;31:472-1.
9. Carrada-Bravo T. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Mex Patol Clin.* 2004;51:205-19.
10. Paulino M, Iribarne F, Dubin M, Aguilera-Morales S, Tapia O, Stoppani AO. The chemotherapy of Chagas' disease: an overview. *Mini Rev Med Chem.* 2005; 5: 499-519.
11. Da Silva CF, Batista D da G, Oliveira GM, de Souza EM, Hammer ER, da Silva PB, et al. *In vitro* and *in vivo* investigation of the efficacy of arylimidamide DB1831 and its mesylated salt form—DB1965—against *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One.* 2012;7:e30356.
12. Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, et al. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasit.* 1997;86:101-6.
13. Veloso VM, Carneiro CM, Toledo MJO, Chiari E, Tafuri WL, Bahia MT. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:1005-11.
14. Schinella G, Tournier H, Zaidenberg A. *In vitro* and *in vivo* activity of berberine on the blood trypomastigote from *Trypanosoma cruzi*. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 2007;6:81-5.
15. Lockman JW, Hamilton AD. Recent developments in the identification of chemotherapeutics for Chagas disease. *Curr Med Chem.* 2005;12:945-59.
16. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol, Part A.* 2007;146:601-20.
17. Duschak VG, Couto AS. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2007;2:19-51.
18. Monteiro D, Guimaraes EF. Flora do Parque Nacional do Itatiaia - Brasil: *Manekia* e *Piper* (Piperaceae). *Rodriguesia.* 2009;60:999-1024.
19. Kato MJ, Furlan M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure Appl Chem.* 2007;79:529-38.
20. de Oliveira A, Mesquita JT, Tempone AG, Lago JHG, Guimarães EF, Kato MJ. Leishmanicidal activity of an alkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. *Exp Parasitol.* 2012;132:383-7.

21. Martins RCC, Lago JHG, Albuquerque S, Kato MJ. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry*. 2003;64:667-70.
22. Ribeiro TS, Freire-de-Lima L, Previato JO, Mendonça-Previato L, Heise N, de Lima MEF. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:3555-8.
23. Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Pharm Sci*. 2005;41:85-94.
24. Luize PS, Ueda-Nakamura T, Dias BP, Cortez DAG, Nakamura CV. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Mig.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. against *Trypanosoma cruzi*. *Biol Pharm Bull*. 2006;29:2126-30.
25. Felipe LG, Baldoqui DC, Kato MJ, Bolzani VD, Guimarães EF, Cicarelli RMB, et al. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry*. 2008;69:445-50.
26. Regasini LO, Cotinguiba F, Passerini GD, Bolzani VS, Cicarelli RMB, Kato MJ, et al. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Braz J Pharmacog*. 2009;19:199-203.
27. Flores N, Jimenez IA, Gimenez A, Ruiz G, Gutierrez D, Bourdy G, et al. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry*. 2009;70:621-7.
28. Mota JD, Leite AC, Batista JM, Lopez SN, Ambrosio DL, Passerini GD, et al. In vitro trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. *Planta Med*. 2009;75:620-3.
29. Cotinguiba F, Regasini LO, Bolzani VD, Debonsi HM, Passerini GD, Cicarelli RMB, et al. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Med Chem Res*. 2009;18:703-11.
30. Pelizzaro-Rocha K, Veiga-Santos P, Rocha K, Silva S, Ueda-Nakamura T, Dias B, et al. The trypanocidal action of eupomatenoï-5 isolated from *Piper regnellii* var *pallescens* may be related an imbalance between the antioxidant system and ROS. *Planta Med*. 2010;76:479.
31. Batista JM, Batista ANL, Rinaldo D, Vilegas W, Ambrosio DL, Cicarelli RMB, et al. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. *J Nat Prod*. 2011;74:1154-60.
32. Veiga-Santos P, Desoti VC, Miranda N, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Silva SO, et al. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2013;125:349-56.
33. Esperandim VR, Ferreira DS, Rezende KCS, Cunha WR, Saraiva J, Bastos JK, et al. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: a morphometric study of tissue changes in mice. *Exp Parasitol*. 2013;133:442-6.
34. Yuncker TG. The Piperaceae of Brazil II: Piper-Group V; Ottonia, Pothomorphe, Sarcorhachis. *Hoehnea*. 1973;3:29-284.



35. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth a bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15:473-97.
36. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
37. Sánchez-Burgos G, Mezquita-Vega RG, Escobedo-Ortegón J, Ramírez-Sierra MJ, Arjona-Torres A, Ouaisi A, et al. Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;50:333-41.
38. Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:3-24.
39. Balbuena TS, Santa-Catarina C, Silveira V, Kato MJ, Floh EIS. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). *Acta Bot Bras*. 2009;23:274-81.
40. Abe F, Nagafuji S, Yamaguchi T, Okabe H, Maki J, Higo H, et al. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:1188-91.
41. Calderón AI, Romero LI, Ortega-Barría E, Solis PN, Zacchino S, Gimenez A, et al. Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease and leishmaniasis. *Pharm Biol*. 2010;48:545-53.
42. Alves RT, Regasini LO, Funari CS, Young MCM, Rimoldi A, Bolzani VS, et al. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Pharmacog*. 2012;22:528-33.
43. Muñoz OM, Maya JD, Ferreira J, Christen P, San Martin J, López-Muñoz R, et al. Medicinal plants of Chile: Evaluation of their anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Z. Naturforsch*. 2013;68:198-202.
44. Polanco-Hernández G, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Acosta-Viana K, Chan-Bacab M, Sagua-Franco H. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatan Peninsula. *Parasitol Res*. 2012;110:31-5.
45. Danelutte AP, Costantin MB, Delgado GE, Braz-Filho R, Kato MJ. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *J Braz Chem Soc*. 2005;16:1425-30.
46. Delgado-Paredes GE, Kato MJ, Rojas-Idrogo C. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2013;12:269-82.
47. Vanisree M, Lee YC, Lo SF, Nalawade SM, Lin CF, Tsay HS. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue culture. *Bot Bull Acad Sin*. 2004;45:1-22.
48. Bobadilla M, Zavaleta F, Sisniegas M, Zavaleta G, Mostacero J, Taramona L. Evaluación larvicida de suspensiones celulares acuosas de *A. muricata* Linnaeus "guanábana" sobre *Aedes aegypti* Linnaeus. *Rev Peru Biol*. 2005;12:145-52.

49. Leatemia J, Isman B. Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidoptera pests and natural enemies. Int J Trop Insect Sci. 2004;24:150-8.

50. Navickiene HMD, Miranda JE, Bartoli SA, Kato MJ, Bolzani VS, Furlan M. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Pest Manag Sci. 2007;63:399-403.

51. Campos M, Salomão K, Castro-Pinto D, León L, Barbosa H, Maciel M, et al. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 2010;107:1193-1204.

Recibido: 15 de agosto de 2016.

Aprobado: 25 de noviembre de 2016.

*Guillermo E. Delgado-Paredes*. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Ciudad Universitaria, Juan XXIII 391. Lambayeque, Perú.  
Correo electrónico: [guidelg2015@yahoo.es](mailto:guidelg2015@yahoo.es)