

Artículo Original/ Original Article

Actividad antiparasitaria *in vitro* de extractos etanólicos de *Erythrina crista-galii* L., *Erythrina falcata* Benth y *Erythrina dominguezii* Hassl

Gloria Yaluff¹, Marisel Maldonado¹, María Elena Ferreira¹, Bonifacia Benítez^{II}, Tomás López^{III}, Ninfa Vera^I

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

II. Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

III. Laboratorio de Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis Ambiental. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción

Cómo referenciar este artículo/ How to reference this article:

Yaluff G, Maldonado M, Ferreria ME, Benitez B, Lopez T, Vera N. Actividad antiparasitaria *in vitro* de extractos etanólicos de *Erythrina crista-galii* L., *Erythrina falcata* Benth y *Erythrina dominguezii* Hassl. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2015;13 (2):60-6

RESUMEN

La tripanosomiasis americana y la leishmaniosis son problemas de salud pública relevantes en Iberoamérica. Se evaluó la actividad antiparasitaria *in vitro* de extractos de cortezas y hojas de *Erythrina crista-galii* L., *E. dominguezii* Hassl y *E. falcata* Benth sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. El extracto de corteza de *E. dominguezii* Hassl presentó CI50 de 11,7 µg/ml y 14,9 µg/ml con dos cepas de *T. cruzi*, Ypsilon y CI Brener. El extracto de hoja presentó CI50 mayor a 250 µg/ml. La corteza de *E. falcata* Benth tuvo CI50 de 11,29 µg/ml y 7,37 µg/ml con Ypsilon y CI Brener y el extracto de hojas CI50 de 37,2 µg/ml y 25,68 µg/ml. El extracto de hojas de *E. crista-galii* L. presentó CI50 mayor a 250 µg/ml, y el de corteza CI50 11,2µg/ml y 7,1µg/ml con Ypsilon y CI Brener. El extracto de corteza de *E. dominguezii* Hassl presentó CI50 de 3,22 µg/ml, 6,94 µg/ml y 1,9 µg/ml para *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. braziliensis* y en hojas la CI50 fue mayor a 100 µg/ml. La corteza de *E. crista-galii* L. tuvo CI50 de 2,1 µg/ml, 2,09 µg/ml y 1,6 µg/ml para las tres especies. El extracto de hoja tuvo una CI50 mayor a 100 µg/ml. El extracto de corteza de *E. falcata* Benth tuvo CI50 de 2,17 µg/ml, 2,09 µg/ml y 1,52 µg/ml con las tres especies de *Leishmania* y el de hoja CI50 de 14,9 µg/ml, 10,4 µg/ml y 11,6 µg/ml. Los extractos de corteza podrían ser una alternativa para el tratamiento de estas enfermedades parasitarias, previa confirmación con estudios *in vivo* y de toxicidad

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Leishmania, Extractos, In vitro, *Erythrina*

In vitro antiparasitic activity of ethanolic extracts of *Erythrina crista-galii* L., *Erythrina falcata* Benth and *Erythrina dominguezii* Hassl

ABSTRACT

American trypanosomiasis and leishmaniasis are relevant public health problems in Ibero America. The *in vitro* antiparasitic activity of barks and leaves extracts of *Erythrina crista-galii* L., *E. dominguezii* Hassl and *E. falcate* Benth was evaluated on *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes forms and *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* and *L. braziliensis* promastigotes. The IC50s of the bark extract of *E. dominguezii* Hassl with two *T. cruzi*

Fecha de recepción: diciembre 2014. Fecha de aceptación: junio 2015.

Autor correspondiente: Gloria Yaluff. IICS, UNA

E-mail: gloriayaluff@yahoo.com

strains, Ypsilon and CI Brener, were 11.7 µg/ml and 14.9 µg/ml. Leaf extract showed IC50 higher than 250 µg/ml. Bark extract of *E. falcate Benth* had IC50s of 11.29 µg/ml and 7.37 µg/ml with Ypsilon and CI Brener strains and its leaf extract showed IC50s of 37.2 µg/ml and 25.68 µg/ml. Leaf extract of *E. crista-galli* L. showed IC50 higher than 250 µg/ml while bark extract had IC50s of 11.2µg/ml and 7.1 µg/ml with Ypsilon and CI Brener strains. Bark extract of *E. dominguezii* Hassl showed IC50s of 3.22 µg/ml 6.94 µg/ml and 1.9 µg/ml for *L. amazonensis*, *L. infantum* and *L. braziliensis* and in leaf extract IC50 was higher than 100 µg/ml. Bark extract of *E. crista-galli* L. had IC50s of 2.1 µg/ml, 2.09 µg/ml and 1.6 µg/ml for the three species. Its leaf extract had IC50 higher than 100 µg/ml. Bark extracts of *E. falcate* Benth had IC50s of 2.17 µg/ml, 2.09 µg/ml and 1.52 µg/ml with the three *Leishmania* species and the leaf extract showed IC50s of 14.9 µg/ml, 10.4 µg/ml and 11.6µg/ml. Bark extracts could be an alternative for the treatment of these parasitic diseases previous confirmation by *in vivo* and toxicity studies.

Key words: Trypanosoma cruzi, Leishmania, Extracts, In vitro, Erythrina

INTRODUCCION

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) son causadas por varios agentes infecciosos y son responsables de altas tasas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (1). Alrededor de mil millones de personas están afectadas por estas enfermedades o están expuestas a sus agentes causantes (2). Estos problemas sanitarios tienen causas multietiológicas y multifactoriales, entre ellas los aspectos educacionales, económicos y políticos que han contribuido grandemente a mantener la situación sin una solución clara e inmediata (2). A pesar de la gran cantidad de personas afectadas por estas patologías, la financiación y el enfoque de investigación para el desarrollo de terapias y estrategias de prevención aplicables a estas enfermedades olvidadas siguen siendo insuficientes (2,3).

Entre las ETD, las enfermedades transmitidas por protozoarios son uno de los problemas de salud pública más relevantes en Iberoamérica destacándose la enfermedad de Chagas y la leishmaniosis, enfermedades parasitarias comunes en América del Sur que causan considerable morbilidad y mortalidad por el alto número de personas afectadas y en riesgo de adquirirlas a pesar de los grandes esfuerzos realizados para su control (4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las enfermedades causadas por *Leishmania sp.* amenazan a 350 millones de personas y son responsable de alrededor de 2 millones de casos clínicos cada año en 88 países (5). Los países con mayor prevalencia de leishmaniosis son los países tropicales y en desarrollo, por ejemplo, India, Sudán, Bangladesh, Nepal y Brasil (2).

En Paraguay, las leishmaniosis cutánea y mucosa tuvieron un descenso en el número de casos a través de los años presentando 184 casos en el 2.011. Sin embargo, en el caso de la leishmaniasis visceral se ha observado un incremento registrándose 594 casos hasta el 2.011.

Actualmente, los fármacos disponibles contra la leishmaniosis tienen alta toxicidad, requieren tratamiento a largo plazo y son costosos. Estos problemas reducen la efectividad del tratamiento para los pacientes y aumentan la aparición de cepas resistentes (5). A esto se suma que no hay candidatos de vacunas eficaces contra este parásito. El tratamiento actual de la leishmaniosis se basa en compuestos de antimonio pentavalente, que incluyen estibogluconato sodio (Pentostam®) y antimonio demeglumina (Glucantime®), ampliamente prescritos a pesar de sus graves efectos secundarios en corazón, riñón, páncreas e hígado, el alto costo, la administración venosa y el desarrollo de la resistencia del parásito que los hacen medicamentos de difícil obtención para las poblaciones rurales (5,6). Otros fármacos, tales como la

anfotericina B, pentamidina y miltefosina también se utilizan en el tratamiento de la leishmaniosis, pero su uso en la clínica está limitado debido a su toxicidad, los efectos secundarios adversos y el alto costo (2).

Existen reportes de trabajos que indican que los medicamentos que se utilizan actualmente como el glucantime antimonio derivado, bisamidina, pentamidina y stilbamidina, y la anfotericina B glicromacrolide desarrollan resistencia clínica después de unas semanas de tratamiento y se ha estimado que contribuyen a aumentar coinfecciones como leishmaniasis/VIH (3).

Por otra parte, la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y es la primera causa de lesiones cardíacas en adultos jóvenes. La enfermedad se extiende por 21 países de Centroamérica y Suramérica y está asociada a la pobreza, las malas condiciones de la vivienda y los desplazamientos masivos desde los ambientes rurales a las ciudades. Se calcula que existen 10 millones de infectados y 25 millones de personas en riesgo, con un promedio de 50.000 nuevos casos por año (6). En Paraguay, se estima que alrededor de 200.000 personas padecen la enfermedad de Chagas y 1.700.000 están expuestas al riesgo de infección (7,8).

El tratamiento actualmente disponible en el mercado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas está limitado a solo dos medicamentos: nifurtimox (Lampit®, Bayer) y benznidazol (Lafepe®, Brasil). Estos compuestos presentan severos efectos colaterales y son más exitosos en la infección aguda y en la crónica temprana (8). Generalmente, la enfermedad se diagnostica en la fase crónica cuando la terapia ya es ineficaz (9). Aunque se necesitan nuevos y eficientes tratamientos para la enfermedad, solo una clase de drogas está en desarrollo clínico, los triazoles, que han emergido como un nuevo tratamiento potencial (10).

Por estos motivos, existe una necesidad de desarrollar nuevos fármacos activos contra los protozoarios causantes de estas enfermedades y una fuente importante la constituyen los productos naturales. La naturaleza ha proporcionado una innumerable cantidad de compuestos de actividad biológica y las plantas son todavía la principal fuente de obtención de drogas potenciales (11).

Revisiones recientes reportan la importancia y el potencial de los productos naturales de plantas como antiprotozoarios en donde son reportados más de 850 compuestos y la actividad contra al menos una ETD fue verificada. Se reporta la actividad de los alcaloides, que representan alrededor de 20% del total de compuestos con efecto antiparasitario, y los principales compuestos representativos son las quinolinas, isoquinolinas, indoles, esteroides y diterpenos (12).

Dado los antecedentes de efectividad de las plantas como fuente medicinal se planteó este estudio preliminar del extracto de corteza y hojas de plantas pertenecientes a la Familia Fabaceae, a la que la medicina popular le atribuye propiedades antisépticas para el tratamiento de heridas, como astringente y cicatrizante. También se usa en combinación con otras plantas para el tratamiento de leishmaniosis y llagas. Estos usos populares no están evaluados científicamente y tampoco se tiene conocimiento sobre estudios de actividades biológicas. Existe un estudio previo que indica que algunos de sus componentes químicos, encontrados en las hojas, son los triterpenos, flavonoides y alcaloides (13,14). Por ello, este trabajo tuvo como objetivo la evaluación *in vitro* de la actividad antiparasitaria de extractos de cortezas y hojas de las especies de *Erythrina* de la Familia Fabaceae.

MATERIALES Y MÉTODO

Recolección e Identificación del Material vegetal

Fueron realizadas dos colectas: La especie *Erythrina crista-galli* L. fue colectada en el Dpto. de Paraguari; *Erythrina falcata* Benth y *Erythrina dominguezii* Hassl fueron

recolectadas en el Jardín Botánico de Asunción (área de plantas medicinales) e identificadas por personal del Laboratorio de Análisis Recursos Vegetales (Dpto. de Biología) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, en cuyo Herbario (FACEN) se encuentran depositados los especímenes correspondientes, (Ferreira Nro. MEF 244, Departamento de Paraguarí y González G., Asunción, Dpto. Central).

Preparación de extracto

Las hojas frescas y corteza de las plantas fueron finamente picadas, maceradas y depositadas en un erlenmeyer de 1.000 ml al cual se adicionó etanol al 98% a temperatura ambiente, cubriendo la totalidad del material y haciendo pasar el solvente repetidas veces por el material, seguido de una filtración. El solvente fue eliminado al vacío hasta obtener un residuo sólido.

Evaluación de la actividad leishmanicida

Se utilizaron cepas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301), *Leishmania infantum* (MCAN/ES/96/BCN150) y *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). Estos parásitos fueron mantenidos por pasajes sucesivos en medio Schneider enriquecido con 20% de suero fetal bovino e incubados en estufa a 28°C. Los pasajes se realizaron cada cuatro días, o cada semana dependiendo de la cepa. Tanto los pasajes como los ensayos se realizaron en forma totalmente estéril, utilizando Flujo Laminar (GELAIRE® BSB 4ª Flow Laboratories).

Las formas promastigotes de *Leishmania* fueron cultivadas a 26°C en medio Schneider suplementado al 5% con suero bovino fetal inactivo (56°C por 30 minutos). Los parásitos en fase de crecimiento logarítmico fueron distribuidos en una microplaca de 96 pozos a una concentración de 1×10^6 parásitos/ml y cada pozo fue tratado con diferentes concentraciones de los extractos o fracciones durante 72 horas. La actividad se evaluó mediante conteo en microscopio óptico, comparándose con un control positivo y otro negativo. Anfotericina B fue utilizado como fármaco control. Los extractos fueron evaluados a distintas concentraciones (100, 50, 25, 10, 5, 1, 0,5 y 0,1 µg/ml) y la prueba fue realizada por triplicado. Los resultados de la actividad leishmanicida fueron expresados en valores de CI50 (concentración de la droga que inhibe el 50% del desarrollo de los parásitos obtenido mediante una típica curva dosis respuesta: log de la concentración de la droga vs % de inhibición. Se determinó la CI50 por el método Probit, mediante el software estadístico SPSS 15.0 - 2006.

Evaluación de la actividad tripanocida

Para los ensayos con *Trypanosoma cruzi* se utilizaron parásitos sanguíneos (formas tripomastigotes) mantenidos por pasajes sucesivos cada siete días en ratones albinos. Se emplearon las cepas CL Brener y Ypsilon (Y) de *T. cruzi*. La sangre se obtuvo por punción cardíaca usando citrato de sodio al 3,8% como anticoagulante. El extracto de la planta y los compuestos aislados se disolvieron en frío en DMSO hasta una concentración final de 250 µg/ml. Las alícuotas de 10 µl de cada extracto de diferentes concentraciones (2,5, 5, 10, 20, 40, 100 y 250 µg/ml) se mezclaron en placas de microtitulación con 90 µl de sangre infectada. Como control positivo se utilizó violeta de genciana 250 µg/ml. Las placas se agitaron durante 10 min a temperatura ambiente y se mantuvieron a 4°C durante 24 h. Cada solución fue microscópicamente observada a 400x, colocando una muestra de sangre (5µl) en un portaobjetos y cubriéndola con un cubreobjetos de 22 x 22" (3). La CI50 se calculó utilizando el método Probit, mediante el software estadístico SPSS 15.0 - 2006.

RESULTADOS

Se evaluó la actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos obtenidos contra formas promastigotes de las cepas de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. braziliensis* y formas tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Ypsilon y CI Brener.

Actividad tripanocida

Se encontró que de todas las especies evaluadas con *T. cruzi*, las que presentaron mayor actividad fueron las evaluadas con el extracto etanólico de corteza en ambas cepas. *E. dominguezii* Hassl presentó una CI50 de 11,7 con la cepa Ypsilon y 14,9 con la cepa CI Brener. Sin embargo, los extractos de la hoja presentaron un CI50 mayor a 250 µg/ml.

E. falcata Benth también tuvo buena actividad en corteza con una CI50 de 11,29 para la cepa Ypsilon y 7,37 para la cepa CI Brener y el extracto de hojas con un CI50 de 37,2 con la cepa Ypsilon y 25,68 con la cepa CI Brener. Los extractos etanólicos de hoja de *E. crista-galli* L. presentaron una CI50 mayor a 250 µg/ml, sin embargo, la corteza tuvo una CI50 11,2 para la cepa Ypsilon y 7,1 para CI Brener (Tabla 1).

Actividad leishmanicida

En la evaluación de corteza, la *E. dominguezii* Hassl presentó una CI50 de 3,22, 6,94 y 1,9 µg/ml para las tres cepas de *Leishmania* y el resultado en hojas fue una CI50 mayor a 100 µg/ml.

E. crista-galli L. también tuvo buena actividad en corteza con una CI50 de 2,1; 2,09 y 1,6 µg/ml para *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. Sin embargo, tuvo una CI50 mayor a 100 µg/ml en extracto de hojas.

E. falcata Benth presentó actividad tanto en extracto de hojas como de corteza. Los resultados en la evaluación de corteza con las cepas de *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. braziliensis* presentaron una CI50 de 2,17, 2,09 y 1,52 µg/ml y el extracto de hojas CI50 de 14,9, 10,4 y 11,6 µg/ml (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad *in vitro* de Extractos Etanólicos de *Erythrina* sobre Tripomastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi*, y sobre formas promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* sp.

Familia Botánica Fabacea	Órgano de la planta	<i>T. cruzi</i> CI ₅₀ µg/ml		<i>Leishmania</i> CI ₅₀ µg/ml		
		Ypsilon	CI Brener	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>
<i>Erythrina dominguezii</i> Hassl	Hoja	>250	>250	>100	>100	>100
	Corteza	11,7	14,9	3,22	6,94	1,9
<i>Erythrina crista-galli</i> L.	Hoja	>250	>250	>100	>100	>100
	Corteza	11,2	7,1	2,1	2,09	1,6
<i>Erythrina falcata</i> Benth	Hoja	37,2	25,68	14,93	10,41	11,62
	Corteza	11,29	7,37	2,17	2,09	1,52

DISCUSIÓN

En el trabajo se reportan los resultados de la evaluación biológica de las especies de la planta de *Erythrina* en donde se evidencia la presencia de metabolitos con actividad tripanocida.

En las familias de la planta estudiada se encontró actividad antiparasitaria lo cual indica la posible existencia de una gama de sustancias bioactivas por determinar. En las tres especies se evidencia que el extracto de la corteza es el que presentó mayor actividad antiparasitaria tanto con las formas tripomastigotes, forma infectiva de *T. cruzi*, como con las formas promastigotas de las cepas de *Leishmania*.

En los resultados con las cepas de *Leishmania* se observan que las hojas no presentan actividad excepto en la especie *E. falcata* Benth, sin embargo, los extractos de corteza presentan actividad leishmanicida con las tres especies estudiadas.

En la evaluación con las dos cepas de *T. cruzi* las hojas no presentan actividad excepto en *E. falcata* Benth que presenta actividad tanto en hojas como corteza.

Las hojas de *E. crista-galli* L. no presentaron actividad leishmanicida, sin embargo, existen referencias en investigaciones previas con alcaloides de *Erythrina* en donde se encontró que presenta actividad contra *L. amazonensis* en estudios realizados en otras regiones. Algunos autores afirman que las diferencias observadas en la actividad biológica podría deberse a la diferencia en la composición química de extractos de plantas de regiones diferentes y que se ponen de manifiesto en las diferencias en el perfil de actividad antiparasitaria frente a diferentes especies de *Leishmania* (1). Las variaciones en la composición química, tanto en tipo como cantidad de componentes, podrían explicarse por el hábitat distinto en que se desarrollan las plantas con otros factores climáticos que serían los causantes de que la composición de metabolitos secundarios varíe. Existen teorías que sostienen que la función que cumplen los metabolitos secundarios, que son los responsables de la actividad antiparasitaria en los seres vivos, es la de actuar como sustancias de defensa, producidas en respuesta a las agresiones del medio (13).

Se debe tener en cuenta que la fracción ensayada es una mezcla de varios compuestos, pudiendo deberse la actividad solo a algunos de ellos por lo que se debería separar en fracciones y obtener las moléculas aisladas ya que la actividad observada podría deberse a un efecto sinérgico de todas las sustancias presentes en el extracto crudo de la planta (14).

Adicionalmente, se deberían realizar estudios de citotoxicidad de las fracciones separadas para determinar el índice de selectividad relacionando las mismas con la actividad registrada teniendo en cuenta que realizar estudios de citotoxicidad en los extractos no resulta muy eficiente pues la toxicidad podría deberse a sustancias diferentes o a un efecto sinérgico entre las sustancias presentes como ya se mencionó (11,15).

Según algunos autores debe evaluarse la correlación de los nombres científicos con los nombres vulgares que se le asignan a las plantas en determinadas regiones y además realizar la extrapolación de sus usos etnobotánicos.

También es importante tener en cuenta la parte de la planta que se utiliza en la medicina tradicional, la época de recolección del material, la forma de aplicación y la influencia de factores ambientales, ecológicos, climáticos, geomorfológicos y edáficos en la producción de metabolitos secundarios y según la literatura probablemente esta variabilidad en los nombres y en la composición química sea la causante de que muchas veces los ensayos *in vitro* no confirmen la actividad para la cual se usa corrientemente la planta (16).

Los resultados obtenidos en este estudio son suficientemente interesantes como para continuar con las investigaciones llevando a cabo la separación o fraccionamiento a fin de identificar los compuestos responsables de la actividad antiparasitaria, considerando que en diferentes condiciones ambientales se pueden obtener diferencias en el perfil de metabolitos producidos por la misma especie en hábitats diferentes (17,18). En conclusión, los extractos de la corteza podrían constituir una alternativa para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos parásitos previa confirmación con estudios de toxicidad para determinar el índice de selectividad relacionando toxicidad y actividad registrada de modo que su uso sea viable, así como estudios *in vivo* en modelos animales.

Finalmente, considerando que se han reportado trabajos en donde se evidencian alcaloides con actividad sobre formas promastigotes extraídos de una especie de

Erythrina se podría esperar que la planta sea una fuente potencial de sustancias para el tratamiento de enfermedades consideradas desatendidas por la Organización Mundial de la Salud. También es importante tener en cuenta que los estudios leishmanicidas fueron realizados sobre promastigotas por lo que sería interesante evaluar sobre formas amastigotas ya que éste es el ciclo de vida más importante del parásito (15,19) Estos resultados aportan nuevas perspectivas de investigación sobre la planta estudiada y la quimioterapia para la enfermedad de Chagas, leishmaniosis y otros parásitos de importancia médica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rojas de Arias A. Situación de la Enfermedad de Chagas en el Continente Americano. En: González M, Cereceto H, coordinador. Enfermedad de Chagas. México: Editorial Silanes. 2012; 17-34.
- Sachs-Barrable K, Conway J, Gershkovich P, Ibrahim F, Wasan K. The use of the United States FDA programs as a strategy to advance the development of drug products for neglected tropical diseases. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40(11):1429-34.
- Callejon D, Riul T, Feitosa L, Guaratini T, Silva D, Adhikari A *et al.* Leishmanicidal Evaluation of Tetrahydroprotoberberine and Spirocyclic Erythrina-Alkaloids. *Molecules.* 2014;19:5692-5703.
- Organización Panamericana de la Salud. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly epidemiological record / Internet/.* 2015. /citado 3 set. 2014/; 90 (6): 33-44. Disponible en: <http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf>
- Waechter A, Yaluff G, Inchausti A, Rojas de Arias A, Hocquemiller R, Cave A *et al.* Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Acetogenins Isolated from *Annona glauca*. *Phytother Res.* 1998;12:541-4.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas. Washington DD: OPS; 2013. Informe Leishmaniasis N° 1
- Maldonado M, Rojas de Arias A, Vera N, Martinez J, Schinini A, Carpinelli T. Clinical and Epidemiological Characterization of *Trypanosoma cruzi* infected patients attending a referral center of Chagas disease in Paraguay, Preliminary results. *Rev Patol Trop.* 2013; 42(4):403-16.
- del Olmo E, Alves M, Lopez J, Inchausti A, Yaluff G, Rojas de Arias A *et al.* Leishmanicidal Activity of some aliphatic diamine and amini a-alcohols. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002; 12(4):659-62.
- Fournet A, Ferreira M E, Rojas de Arias A, Schinini A, Nakayama H, Tórres S, *et al.* The effect of bisbenzyisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996; Suppl November 91: 315-7.
- Campos M, Salomo K, Castro-Pinto D, Leon L, Barbosa H, Maciel M, De Castro S. Crotoncajúcara crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 2010;107(5):1193-204.
- Lopez D, Bizzo H, Sobrinho A, Pereira M. Essential Oil from Leaves of Crotoncajúquina. *J Essent Oil Res.* 2003; 15:48-9.
- Cerecetto H, Gonzalez M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr Top Med Chem* 2002;2:1187-213.
- Pin A, Gonzalez G, Marin G, Cespedes G, Cretton S, Chisten P *et al.* Plantas Medicinales del Jardín Botánico. Proyecto Etnobotánico Paraguay. EPY. 2009
- Degen R, Soria N, Ortiz M, Basualdo I. Problemática de nombres comunes de plantas medicinales comercializadas en Paraguay. *Dominguezia.* 2005; 21(1):11-6.
- Callejon R, Thalita R, Feitosa L, Guaratini T, Silva D, Achyut A *et al.* Leishmanicidal Evaluation of Tetrahydroprotoberberine and Spirocyclic Erythrina-Alkaloids. *Molecules.* 2014; 19:5692-703.
- Rojas de Arias A, Ferro EA. Cuantificación de *Trypanosoma cruzi* parasitemia By direct micromethd. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82:248.
- Ferreira ME, Nakayama H, Torres S, Yaluff G, Sanabria L, Vera N. Propiedad antichagásica *in vitro* e *in vivo* de maculina aislada de *Helietta apiculata* Benth (Rutaceae). *Steviana.* 2014;6:5-12.
- Gallego A, Torres F, Robledo S, Velez I, Carrillo L, Munoz D *et al.* Actividad Leishmanicida y Tripanocida de *Acacia farnesiana*, *Piper arieianum*, *P. sphagnum recurvum*, and *Vismia baccifera subsp. ferruginea*. *Actual Biol.* 2006;28(84):39-49.
- Valencia L, Muñoz D, Robledo S, Echeverri F, Arango G, Velez I *et al.* Actividad Tripanocida y Citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica.* 2011;31:552-9.