



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ
GALLO**



Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento Académico de Microbiología y Parasitología

TESIS

Actividad biológica de diferentes concentraciones del extracto crudo de acetato de etilo de plantas silvestres y plántulas *in vitro* de *Piper solmsianum* sobre la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Lambayeque. Agosto 2013- Mayo 2014

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

SUSTENTADA POR:

Br. JORGE LUIS JHOAO MEJÍA PARRA

Br. MICHEL ALEXANDER PÉREZ ARAUJO

LAMBAYEQUE – PERÚ

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO



Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento Académico de Microbiología y Parasitología

TESIS

Actividad biológica de diferentes concentraciones del extracto crudo de acetato de etilo de plantas silvestres y plántulas *in vitro* de *Piper solmsianum* sobre la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Lambayeque. Agosto 2013- Mayo 2014

APROBADO POR:

Dr. Elsa Violeta Angulo de Alva

PRESIDENTA

M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo

SECRETARIA

Mblga. María Teresa Silva García

VOCAL

Dr. Guillermo Delgado

ASESOR

Dra. Judith Roldán Rodríguez

Co - ASESORA

*“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y
la fuente de todo progreso”*

Louis Pasteur

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Delgado Paredes docente de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, por su asesoramiento con dedicación, paciencia, confianza y consejos en la ejecución y redacción de esta tesis.

A la Dra. Judith Roldán Rodríguez, profesora asociada del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo por su gran apoyo, comprensión y orientación en la realización de esta tesis.

A la Msc. Consuelo Rojas Idrogo por su apoyo incondicional y motivación en la realización del presente trabajo de investigación.

A la Blga. Carlota Flores Arrascue por sus consejos y ayuda brindada.

Al Blgo Miguel Iglesias por su apoyo en la prueba de Elisa en los ambientes del laboratorio Escalabs en la ciudad de Trujillo.

A nuestro amigo Richar Morales por el apoyo incondicional durante la ejecución de esta tesis.

A nuestros amigos tesisistas y grupo de investigación de Artropodología Parasitaria Sheyla, Lourdes, Juanito y Jomeny por brindarnos su amistad y apoyo desinteresado en la realización del presente trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la culminación del presente trabajo de investigación.

INDICE

	Pág.
I. RESUMEN	10
II. INTRODUCCIÓN	11
III. ANTECEDENTES	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1.Población y Muestra De Estudio	17
4.2.VARIABLES de estudio	17
4.3.Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	17
4.4.Obtención de extractos crudos de plantas silvestres.....	18
4.5.Obtención de extractos crudos de plántulas <i>in vitro</i>	18
4.6. Evaluación del efecto del extracto crudo de acetato de etilo (tallo, hojas, plántulas <i>in vitro</i> y grandisina) de <i>Piper solmsianum</i> sobre la viabilidad en diferentes formas evolutivas de T. cruzi.....	18
4.7.Análisis de datos	21
V. RESULTADOS	24
5.1.Inhibición de epimastigotes	24
5.2.Inhibición de tripomastigotes	31
5.3.Evaluación ic_{50} en epimastigotes.....	37
5.4.Evaluación ic_{50} en tripomastigotes	37
VI. DISCUSIÓN	39
VII. CONCLUSIONES	42
VIII. RECOMENDACIONES	43
IX. BIBLIOGRAFÍA	44
X. ANEXOS	47

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio de cultivo bifásico BHI modificado	48
Anexo 2. Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en medio de cultivo BHI bifásico modificado, a 28 °C durante 6 días.....	57
Anexo 3. Cultivo y recuento de epimastigotes en cámara de Neubauer.....	50
Anexo 4. Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en sangre de <i>Mus musculus</i>	51
Anexo 5. Esquema de la ejecución del bioensayo in vitro de epimastigotes y tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones 5, 25, 50 µg/mL de los extractos crudos de plántulas in vitro y plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i>	53
Anexo 6. Determinación de la viabilidad in vitro de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> , las concentraciones de 5, 25, 50 µg/mL del extracto crudo de plántulas in vitro y plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i>	54
Anexo 7. Determinación de la viabilidad in vitro de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> , las concentraciones de 5, 25, 50 µg/mL del extracto crudo de plántulas in vitro y plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i>	55
Anexo 8. Absorbancias obtenidas del ensayo in vitro de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de plántulas jóvenes cultivadas in vitro de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	56
Anexo 9. Absorbancias obtenidas del ensayo in vitro de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/ml del extracto de acetato de etilo de plántulas maduras cultivadas in vitro de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	56
Anexo 10. Absorbancias obtenidas del ensayo in vitro de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de tallo de plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	57
Anexo 11. Absorbancias obtenidas del ensayo in vitro de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de hojas de plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	57
Anexo 12. Absorbancias obtenidas del ensayo in vitro de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de grandicina de plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	58

Anexo 13. Absorbancias obtenidas del ensayo <i>in vitro</i> de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 5, 25, 50 µg/mL del extracto de acetato de etilo de plántulas jóvenes cultivadas <i>in vitro</i> de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	58
Anexo 14. Absorbancias obtenidas del ensayo <i>in vitro</i> de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de plántulas maduras cultivadas <i>in vitro</i> de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	59
Anexo 15. Absorbancias obtenidas del ensayo <i>in vitro</i> de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de grandicina de plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	59
Anexo 16. Absorbancias obtenidas del ensayo <i>in vitro</i> de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de hojas de plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492 nm).....	60
Anexo 17. Absorbancias obtenidas del ensayo <i>in vitro</i> de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de tallo de plantas silvestres de <i>Piper solmsianum</i> (Lectura a 492nm).....	60

I. RESUMEN

Se determinó el efecto de diferentes concentraciones de los extractos crudos de acetato de etilo de plantas silvestres provenientes de Brasil y plántulas *in vitro* de *Piper solmsianum* sobre la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en las formas evolutivas de epimastigote y tripomastigote. El bioensayo se realizó en una microplaca donde se establecieron tres grupos experimentales (I, II, III) y dos grupos control (IV y V) tanto para epimastigote y tripomastigote, con tres repeticiones cada uno y en cada pocillo se colocaron 50 µl de 1×10^5 parásitos/mL en medio de cultivo BHI. Se agregó 3 µl de cada uno de los extractos crudos de acetato de etilo a las concentraciones 5, 25 y 50 µg/mL a los grupos I, II y III, respectivamente, BHI al grupo IV y disolvente (DMSO) al grupo V. La microplaca fue incubada a 28 °C por cuatro días, posteriormente se añadió difeniltetrazolio bromuro (MTT) y dodecil sulfato de sodio (SDS). Se realizaron lecturas de las reacciones a 495 nm. Se encontró que las concentraciones de 50 µg/mL de las plántulas *in vitro* de *Piper solmsianum* en tripomastigote presentó más de 90% de inhibición y en epimastigote más de 80% de inhibición. En las plántulas silvestres (extracto de hoja y tallo) y grandisina se encontró que el extracto de tallo presentó 96.39% de inhibición de epimastigote en concentración de 50 µg/mL y en tripomastigote la grandisina fue quien mayor porcentaje de inhibición presentó 93.37%. Se concluye que concentraciones de ≥ 5 µg/mL de plántulas silvestres e *in vitro* de *Piper solmsianum* disminuyen en más de 50% la viabilidad de tripomatigotes y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

II. INTRODUCCIÓN

Desde el hallazgo e identificación de *Trypanosoma cruzi* en Brasil por Carlos Chagas en 1909, en el estado de Minas Gerais, el conocimiento sobre esta infección y su tratamiento ha evolucionado notablemente. Actualmente se calcula que entre 8 y 11 millones de personas en México, Centroamérica y Suramérica tienen la enfermedad de Chagas y la mayoría de ellas no saben que están infectadas (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades 2010). Según la OMS se calcula que en todo el mundo hay aproximadamente 16 a 18 millones de personas infectadas con el parásito de las cuales cada año mueren alrededor de 50 000 (OMS 2008). En el 2004 en el Perú se determinó que la zona costera sur (Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna) es el área donde se ha presentado la mayoría de casos de Enfermedad de Chagas, siendo *Triatoma infestans* el vector y *Cavia porcellus* "cobayo" el principal reservorio. En la zona norte, en cambio, se ha registrado pocos casos humanos, siendo los valles de Reque y Callanca (Lambayeque) zonas endémicas de la enfermedad.

En la actualidad aproximadamente 10 millones de personas padecen de Tripanosomiosis según datos de la Organización Mundial de la Salud. El tratamiento de esta enfermedad se ve referido al Benznidazol, medicamento que es producido en Brasil por el laboratorio federal LAFEPE y en Argentina por el laboratorio Elea. En el 2011 la asociación de Médicos sin Fronteras informó sobre la ruptura del stock de Benznidazol, por lo que se vieron afectados pacientes con bajos recursos, los cuales no podían acceder a este medicamento.

Varias cepas de *T. cruzi* fueron aisladas de diferentes países y áreas geográficas. Las importantes diferencias en la resistencia o susceptibilidad a las sustancias de uso en experimentos de laboratorio o estudios clínicos se han reportado entre diferentes cepas del parásito. Esto complica aún más la búsqueda de nuevos fármacos anti-*T. cruzi* (Morello et al., 1994).

Hoy en día, la quimio-resistencia mostrada por los parásitos está presente en muchos de los países en los que el fármaco no se utiliza de manera eficiente y esto es

debido incluso a la falta de nuevos tripanocidas y al aumento de los estudios de resistencia realizados para entender mejor los mecanismos de acción y la comprensión de la quimio-resistencia con interés tripanocida (Boibessot et al., 2002).

Frente a lo mencionado se hace necesaria la búsqueda de nuevas sustancias con propiedades tripanocidas y con menos efectos colaterales. Entre los recursos existentes en la naturaleza se encuentra *P. solmsianum*, arbusto perteneciente a la familia de las Piperaceas, que se encuentra comúnmente en áreas con suelos tropicales húmedos. Un estudio realizado por Martins et al. (2003) permitió recolectar inflorescencias de *Piper solmsianum* provenientes del Núcleo de Picinguaba, ciudad de Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil, demostrando en bioensayos que aparte del lignano grandisina de *P. solmsianum* existen otros lignanos de esta especie con potente actividad *in vitro* contra los tripomastigotes de *T. cruzi*.

Varias especies de Piperaceas se han investigado extensamente como una fuente de metabolitos secundarios con efectos antitripanosma, ansiolítico, anticonvulsivo y actividades antiinflamatorias.

Investigaciones fitoquímicas de especies de Piper han conducido a la identificación de las clases típicas de compuestos tales como amidas, terpenos, derivados de ácido benzoico, carotenos, e hidroquinonas y además de lignanos, neolignanos y unos alkaloides con grandes efectos tripanocidas y antileishmanoides.

Todas las especies de Piper tienen gran importancia comercial, económica y medicinal; sin embargo, en nuestro país se emplea solo algunas, las cuales están restringidas a usos en medicina natural debido a la carencia de trabajos de investigación, es por ello que se realizó este trabajo de investigación con el siguiente objetivo:

- Determinar el efecto de 3 diferentes concentraciones (5, 25 y 50 µg/mL) del extracto crudo de acetato de etilo de plantas silvestres, la sustancia pura grandicina y plántulas *in vitro* de *P. solmsianum* sobre las formas tripomastigotes y epimastigote de *T. cruzi*.

III. ANTECEDENTES

El parásito *Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo heteroxeno, que requiere la presencia de un hospedador invertebrado en el que se desarrollan varias fases de su ciclo biológico. Se trata de hemípteros hematófagos de las especies *Triatoma infestans*, *T. dimidta*, *Rhodnius prolixus* y *Pastrongylus megistus*, entre otros (Vargas, 2005).

La clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi* según Atias et al. (1991), pertenece al Sub-reino: Protozoa, Phylum 1: Sarcomastigophora, Sub-phylum: Mastigophora, Clase: Zoomastigophorea, Orden: Kinetoplastidea Familia: Trypanomatidae, Género: Trypanosoma, Especie: *Trypanosoma cruzi*.

Este parasito presenta 3 estadios morfológicos: tripomastigote metacíclico y promastigote (tripomastigote sanguíneo), epimastigote y amastigote. En la etapa de tripomastigote metacíclico, carece de capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero, se encuentra en la sangre y no tiene la capacidad para dividirse, pero sí la de invadir la célula. El epimastigote es fusiforme, este estadio se reproduce por fisión binaria, en tanto que, la etapa de amastigote, es de forma redondeada, también llamada leishmanoide y carece de flagelo. El parásito en esta etapa se multiplica intracelularmente en el hospedero (Goldsmith, 1995).

La enfermedad presenta un cuadro clínico variable en el que se aprecian dos fases bien diferenciadas: la fase aguda o temprana es de duración breve (15 o 20 días) y suele ser de manera asintomática. En algunos casos, fundamentalmente en niños, tras la primoinfección puede aparecer una lesión característica denominada chagoma (pequeña inflamación y enrojecimiento en el lugar de la picadura). A medida que los parásitos son dispersados por la circulación linfática, puede producirse inflamación en otros lugares, como los párpados (signo de Romana), ganglios linfáticos y tejidos adyacentes, junto a fiebre y malestar general. Raras veces se produce hepato y esplenomegalia.

La enfermedad, por acción de la respuesta inmune, disminuye su intensidad después de la fase aguda, permaneciendo asintomática durante un período variable, por lo general de diez o quince años, transcurrido el cual, en un porcentaje que ronda el 15%

de los casos, reemerge bajo un cuadro clínico de cardiopatía grave que se manifiesta con palpitaciones, disnea, dolores cardíacos y/o hepáticos y alteraciones del electrocardiograma, además el flagelado puede originar una serie de trastornos digestivos (megaesófago y megacolon, dificultad para deglutir, desnutrición, dolor abdominal y estreñimiento, musculares y nerviosos (Reina-San Martin et al., 2000).

En la actualidad los fármacos de elección para el tratamiento de la tripanosomiasis americana son el Nifurtimox (NFX) y el Benznidazol (BZN). No obstante, además de presentar numerosos efectos adversos, su eficacia en la fase tardía es baja. En los últimos años se ha utilizado el Itraconazol (ITR) con mejores resultados (Bestetti y Muccill, 1997).

Ante la evidencia creciente de la resistencia de *T. cruzi* a fármacos y la necesidad de buscar alternativas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, es que se ha optado por el uso de productos naturales. Por ejemplo, estudios realizados de los extractos orgánicos de las especies *Ambrosia tenuifolia* y *Eupatorium buniifolium* fueron los más activos con porcentajes de inhibición de las formas epimastigótes de *T. cruzi* mayores a 70% a 100 µg/ml (Sunday et al., 2009).

En Bolivia *Caesalpinia pluviosa* y *Astronium urundeuva*, son plantas medicinales de uso tradicional. Para determinar la actividad tripanocida y antioxidante *in vitro* de los extractos etanólicos de estas especies vegetales, se realizó la medición de la inhibición del desarrollo *in vitro* de tripomastigotes de *T. cruzi*, clon CL Brener. En conclusión, este estudio reveló que los extractos de *C. pluviosa* y *A. urundeuva*, tienen un efecto tripanocida y antioxidante *in vitro*, justificando el uso tradicional de la planta y constituyéndose en excelentes candidatos para completar estudios biológicos *in vivo* y químicos (Muñoz et al., 2010)

Otros estudios revelan que los aceites esenciales de *Cimbopogon citratus* (hierba luisa) y *Aloysia triphylla* (cedrón) inhibieron el crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi* con una buena CI₅₀ (concentración requerida para 50% de inhibición) de 63,09 y 96,49 µg/mL, respectivamente (p<0,05). *Mentha spicata* (hierba buena), *Chenopodium ambrosioides* (paico), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Eucaliptus globulus* (eucalipto) exhibieron moderada actividad inhibitoria, con CI₅₀ de

120,23 a 346,74 µg/mL. Por su parte, *Melissa officinalis* (toronjil), *Mentha piperita* (menta), *Minthostachys setosa* (muña) y *Artemisia absinthium* (ajenjo) fueron inactivas (Rojas et al., 2010).

Dentro de la gran variedad de plantas tripanocidas, los miembros de la Familia Piperaceae son muy importantes. Muchas sustancias obtenidas de especies de la familia Piperaceae, en especial las del género *Piper* han sido utilizadas tradicionalmente como insecticidas, especias y fitomedicamentos (Arnason et al., 2005), razones por las que se les han determinado diferentes actividades biológicas, entre las que se destacan la antifúngica, insecticida y antiparasitaria.

La familia Piperaceae es considerada una de las más complejas y diversas entre las angiospermas basales, razón por la cual la definición del número de géneros y especies que la componen, su filogenia y modelo de diversidad floral es, en la actualidad, motivo de grandes controversias (Jaramillo y Manos, 2001). Para algunos autores, incluye 14 géneros y alrededor de 1950 especies ampliamente distribuidas en ambos hemisferios. Comprende plantas herbáceas, arbustivas, algunas veces trepadoras y árboles. Conjuntamente con las Chlorantaceae y Saururaceae forman un grupo taxonómicamente aislado (Orden Piperales) de plantas relativamente arcaicas. Las especies americanas de Piperaceae se clasificaron en los géneros *Lepianthes* Raf. (*Pothomorphe* Miq.), *Peperomia* R. & P., *Piper* L., *Sarcorrhachis* Trel. y *Trianaeopiper* Trel. (Tebbs, 1989), aunque en el Perú se han descubierto únicamente los géneros *Peperomia*, *Piper* y *Sarcorrhachis* y 811 especies, de las cuales 528 son consideradas endémicas (Brako y Zarucchi, 1993); en el Ecuador los géneros *Peperomia*, *Piper*, *Sarcorrhachis* y *Trianaeopiper* y 441 especies, con 134 especies endémicas y en el Brasil los géneros *Ottonia*, *Peperomia*, *Piper*, *Pothomorphe* y *Sarcorrhachis* y 479 especies, sin precisarse el número de endémicas (Yuncker, 1972); posteriormente, las especies de *Ottonia* fueron incorporadas a *Piper* (Tebbs, 1989). La familia Piperaceae contiene metabolitos secundarios como los fenilpropanoides, lignanos y neolignanos, amidas alifáticas y aromáticas (Silva et al., 2002), alcaloides, policétidos y cromenes (Lago et al., 2004).

P. solmsianum es una especie perteneciente al orden Piperales , de la familia de las Piperaceas y del género Piper ; es un arbusto que se encuentra comúnmente en áreas con suelos tropicales húmedos. Un estudio realizado por Martins et al. (2003) permitió recolectar inflorescencia de *Piper solmsianum* provenientes del Núcleo de Picinguaba, ciudad de Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil, realizándose bioensayos utilizando sangre recogida por punción cardíaca de los ratones albinos suizos en el pico de la parasitemia (7mo día). Después de la infección con la cepa Y de *T. cruzi*, la sangre infectada se diluyó con sangre de ratones sanos para lograr una concentración de 10^6 formas tripomastigotes demostrando que aparte del lignano grandisina de *P. solmsianum* existen otros lignanos de esta especie con potente actividad *in vitro* contra los tripomastigotes de *T. cruzi*.

Otras especies de Piperaceas que han sido reportadas con actividad tripanocida son *P. aduncum* y *P. heterophyllum* donde se aislaron metabolitos secundarios con actividad antiparasitaria contra *Leishmania braziliensis* - 2903, *L. amazonensis* - PH8, *L. donovani* - PP75, *T. cruzi* y *Plasmodium falciparum* (Amin, 2011).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Población y muestra de estudio

Las plantas silvestres de *P. solmsianum* procedentes, de colectas en la región de Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil, fueron identificadas, por el Prof. Guillermo E. Delgado, de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG), Lambayeque, Perú. (Figura 1). Las plántulas *in vitro* fueron propagadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Recursos Genéticos de la UNPRG, partiendo de plantas del Banco de Germoplasma *in vitro* en el Laboratorio del Instituto de Química (IQ) de la Universidad de São Paulo (USP) (Figura 2). Se trabajó con dos tipos de plántulas *in vitro*: plántulas jóvenes (6 a 7 meses de cultivadas) y plántulas maduras (10 a 12 meses de cultivadas). Adicionalmente, se contó con una muestra pura del metabolito secundario grandisina, purificado en el IQ/USP, a partir de plantas silvestres de *P. solmsianum*. Las muestras herborizadas se depositaron en el Herbario del IQ/USP.

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

4.2 Variables en estudio

a. Independiente: extractos crudos de *Piper solmsianum*.

b. Dependiente: cultivos de *Trypanosoma cruzi*.

4.3. Tipo de estudio y diseño de la contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación es de tipo experimental, con un diseño clásico (Alvitres, 2000) ya que se establecieron tres grupos experimentales (I, II y III) y dos grupos control (IV y V), cada uno por triplicado, donde los grupos experimentales recibieron el estímulo de la variable independiente y los grupos control no lo recibirán..

4.4. Obtención de extractos crudos de plantas silvestres

- **Extracto de hojas y tallos de plantas silvestres de *P. solmsianum***

Tallos y hojas de plantas silvestres de *P. solmsianum* fueron colectadas en campo y, debidamente empacadas, se llevaron al laboratorio para su procesamiento; luego se procedió a cortar cada una de las partes en trozos pequeños para su secado al ambiente y en estufa a 50 °C de temperatura durante tres días, antes de la molienda en molino mecánico hasta convertirlas en polvo fino. Una vez determinado el peso seco se le agregó el solvente orgánico de extracción acetato de etilo durante 24 horas y por tres veces consecutivas. Después del filtrado, se concentró en placa de Petri de 20 cm de diámetro hasta la total evaporación del solvente; posteriormente, se recuperó el extracto con diclorometano y depositó en un frasco pequeño previamente pesado para, por diferencia de pesos, determinar el rendimiento.

4.5. Obtención de extractos crudos de plántulas *in vitro*

En este caso se utilizaran plántulas *in vitro* completas, con tallos, hojas y raíces, de 6 a 7 meses de edad y plántulas de 10 a 12 meses de edad, las que fueron secadas en estufa a 40 °C de temperatura durante 3 horas, antes de molerlas en mortero de porcelana; luego se procedió a la extracción como en el caso anterior (Figura 3).

4.6. Evaluación del efecto del extracto crudo (EC) de acetato de etilo (tallos, hojas, plántulas *in vitro* y grandisina) de *P. solmsianum* sobre la viabilidad en diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*

a. En epimastigotes

- **Siembra y aislamiento**

A partir de sangre obtenida de dos especímenes de *Mus musculus* BALB/c, infectados con *T. cruzi*, se realizó hemocultivos (Anexo 3a) en medio bifásico BHI suplementado con 10% de sangre de conejo

desfibrinada, los que se incubaron a 28 °C. Estos medios de cultivo fueron examinados diariamente con ayuda de un microscopio invertido.

- **Determinación de la curva de crecimiento**

A partir del cultivo primario, se sembró 1×10^5 epimastigotes/mL, en medio de cultivo bifásico BHI modificado, suplementado con 10% de sangre de conejo desfibrinada y se incubó a 28°C; luego se realizó conteos diarios en cámara de Neubauer (Anexo 3b) para la determinación de la curva de crecimiento en relación al tiempo. El recuento se realizará durante seis días (Anexo 2).

- **Ejecución del bioensayo**

- **Aplicación del extracto**

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. A todos los grupos se agregó 20 µL de epimastigotes de *T. cruzi*, en fase de crecimiento logarítmico a una concentración de 1×10^5 epimastigotes/mL y 80 µL de medio BHI con gentamicina. Se prepararon concentraciones de 5.0, 25.0 y 50.0 µg/mL, utilizando como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) 1%; de cada concentración se aplicó 50.0 µL a los grupos I, II y III respectivamente, al IV 50,0 µL de BHI y al grupo V 50.0 µL de DMSO; la placa fue incubada a 28 °C por cuatro días (Anexo 5).

- **Blancos de estandarización**

Para determinar el porcentaje de inhibición fue necesario contar con los valores de las soluciones de referencia y para ello se establecieron cuatro grupos, a los cuales se añadió 100 µL de BHI con gentamicina; luego al primer grupo se le añadirá 20,0 µL de BHI y a los otros grupos 50.0 µL de EC a las concentraciones de 5.0, 25.0 y 50.0 µg/mL, respectivamente, e incubaron 28 °C durante cuatro días.

- **Determinación de la viabilidad**

Después de cuatro días de incubación de los grupos (Anexo 6), se añadió a cada pocillo 10 µL de 2,5 mg/mL de difeniltetrazodio bromuro (MTT) y se incubaron durante 75 minutos en oscuridad a 28 °C; posteriormente, se agregó 100 µL de una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, la que fue 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.

La concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) fue determinada mediante análisis de regresión lineal del gráfico porcentaje de inhibición vs. Logaritmo de la concentración del extracto. Además, fueron determinados los valores de IC₅₀ de los grupos experimental y control.

$$\% \text{ inhibición} = \left[1 - \frac{(Am - Abm)}{(Ar - Abr)} \right] * 100$$

Dónde: *Am* es la absorbancia de las muestras,

Abm es la absorbancia del blanco de muestra,

Ar es la absorbancia de las soluciones de referencias,

y *Abr* la absorbancia del blanco de referencia.

b. Tripomastigotes sanguíneos

- **Ejecución del ensayo**

A partir de ratones previamente infectados se obtuvo una muestra de sangre por punción cardíaca para la obtención de tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*.

La muestra de sangre obtenida fue colocada en tubos estériles con Heparina y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante fue ajustado a una concentración de 1 x 10⁵ tripomastigotes sanguíneos/mL. (Anexo 4); para el recuento se usó la cámara de Neubauer.

- **Aplicación de EC** : 20 µL de tripomastigotas de *T. cruzi* fueron distribuidos en pocillos de una microplaca, a una concentración de 1 x 10⁵

tripomastigotes/mL; luego, se procedió con el protocolo mencionado anteriormente para epimastigotes. (Anexo 7)

- **Determinación de la viabilidad**

Se siguió el protocolo mencionado anteriormente para epimastigotes.

4.7. Análisis de datos

Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de varianzas (ANOVA) y a una prueba de comparación de medias Tukey a fin de determinar las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales y control, mediante el uso de un programa computarizado SPSS vr. 20 con un grado de significancia de 0.05.



Figura 1. Planta de *Piper solmsianum* establecida en los jardines de la Facultad de Ciencias biológicas procedente del banco de germoplasma del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo – Brasil.



Figura 2. Plantas *in vitro* de *Piper solmsianum*, a. Plántulas maduras *in vitro*, b. Plántulas jóvenes.

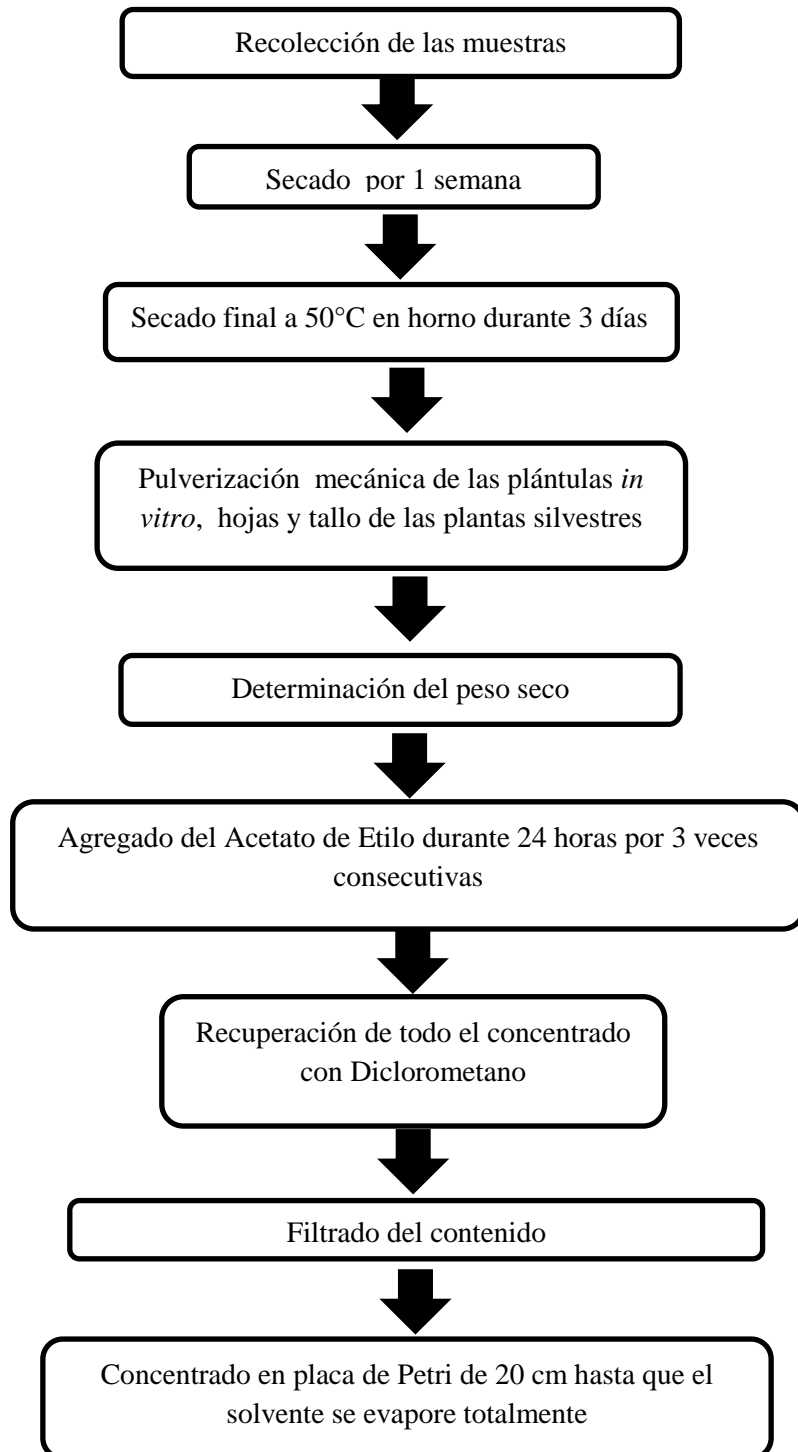


Figura 3. Proceso para la obtención del extracto crudo de acetato de etilo de plántulas *in vitro* y plantas silvestres de *Piper solmsianum*

V. RESULTADOS

5.1 Inhibición de Epimastigotes

En el cuadro 1 se observan los porcentajes de inhibición del ensayo *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a diferentes concentraciones (50, 25 y 5 µg/mL) de extracto crudo de acetato de etilo de plantas silvestres (tallos y hojas) y plántulas *in vitro* de *Piper solmsianum*, los cuales se obtuvieron en base a las absorbancias registradas que se presentan en el anexo 8 hasta el anexo 12; observándose que en los extractos de todas las estructuras vegetales utilizadas se alcanzó una inhibición del 87.34% a 99.52% a la concentración de 50 µg/mL, destacándose el extracto de tallo sobre las demás estructuras.

Utilizando la concentración de 25 µg/mL se observó también, que existe un alto porcentaje de inhibición donde se destaca el tallo con 96.39% seguido de las hojas con 88.93% de inhibición. El porcentaje de inhibición aún sigue considerándose alto al utilizar 5 µg/mL donde el rango de inhibición oscila entre 72.83% en el caso de grandicina pura y del 84.52% en extracto de tallo de planta silvestre.

Cuadro 1. Inhibición de Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con cuatro tipos de extractos de *Piper solmsianum* y grandicina pura a las concentraciones 50, 25 y 5 µg/mL.

% de Inhibición de las concentraciones			
Tipo de Extracto	50 µg/mL	25µg/mL	5 µg/mL
Plántulas jóvenes	87.34%	82.12%	78.47%
Plántulas maduras	89.79%	86.88%	77.69%
Grandicina	88.27%	78.64%	72.83%
Tallo	99.52%	96.39%	84.52%
Hojas	90.73%	88.93%	81.05%

Realizado el Análisis de varianza (ANOVA) respectivo para cada tipo de extracto ensayado, se observa que el efecto sobre los epimastigotes de *T. cruzi* resultaron significativos (Cuadro 2 - 6).

Cuadro 2. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos del extracto de plántulas jóvenes cultivadas *in vitro* de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los epimastigotes de *T. cruzi* resultaron significativos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,011	3	,004	145,861	,000
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,011	11			

Cuadro 3. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos del extracto de plántulas maduras cultivadas *in vitro* de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los epimastigotes de *T. cruzi* resultaron significativos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,008	3	,003	105,560	,000
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,008	11			

Cuadro 4. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos del extracto de tallo de plantas silvestres de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los epimastigotes de *T. cruzi* resultaron significativos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,023	3	,008	18,484	,001
Intra-grupos	,003	8	,000		
Total	,026	11			

Cuadro 5. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos del extracto de hojas de plantas silvestres de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los epimastigotes de *T. cruzi* resultaron significativos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,009	3	,003	117,407	,000
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,009	11			

Cuadro 6. Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos del extracto puro de grandisina de plantas silvestres de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los epimastigotes de *T. cruzi* resultaron significativos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,010	3	,003	92,710	,000
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,010	11			

Realizada la prueba de Tukey correspondiente para concentraciones del extracto de plantas jóvenes *in vitro*, demuestra que 25 µg/mL y 50 µg/mL tiene un efecto estadísticamente similar, la concentración de 5 µg/mL y el control resultaron iguales y diferentes a los demás tratamientos (Cuadro 7 - 11). El extracto de plantas maduras *in vitro*, tallos y hojas de plantas silvestres, así como para grandisina pura, todos resultaron estadísticamente iguales y diferentes al control (Cuadro 8). El efecto de los extractos de tallos y hojas de plantas silvestres, resultaron estadísticamente iguales en las tres concentraciones utilizadas y diferentes a la vez respecto al control (Cuadro 9, 10 y 11).

Cuadro 7. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*. Plántulas jóvenes cultivadas *in vitro*.

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
50	3	,01367	,07267 ,07900
25	3	,01600	
CONTROL	3		
5	3		

Cuadro 8. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*. Plántulas maduras cultivadas *in vitro*.

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
25	3	,00600	,06867
50	3	,00700	
5	3	,01533	
CONTROL	3		

Cuadro 9. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*. Extracto de tallo de plantas silvestres.

CONCENTRACION DE EXTRACTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
50	3	,00767	,11100
25	3	,00833	
5	3	,01733	
CONTROL	3		

Cuadro 10. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*. Extracto de hojas de plantas silvestres.

CONCENTRACION DE EXTRACTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
50	3	,00667	,07233
25	3	,00800	
5	3	,01367	
CONTROL	3		

Cuadro 11. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*. Extracto de grandisina.

CONCENTRACION DE EXTRACTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
50	3	,00867	,08100
25	3	,01733	
5	3	,02200	
CONTROL	3		

Comparando las tres concentraciones utilizadas para cada uno de los extractos frente a su actividad en epimastigotas, se puede observar que existe una tendencia de inhibición que va en el rango de 72.83% con la concentración de 5 µg/mL al 99.52% con concentración de 25 µg/mL de extracto de tallo de plantas silvestres. (Figura 4)

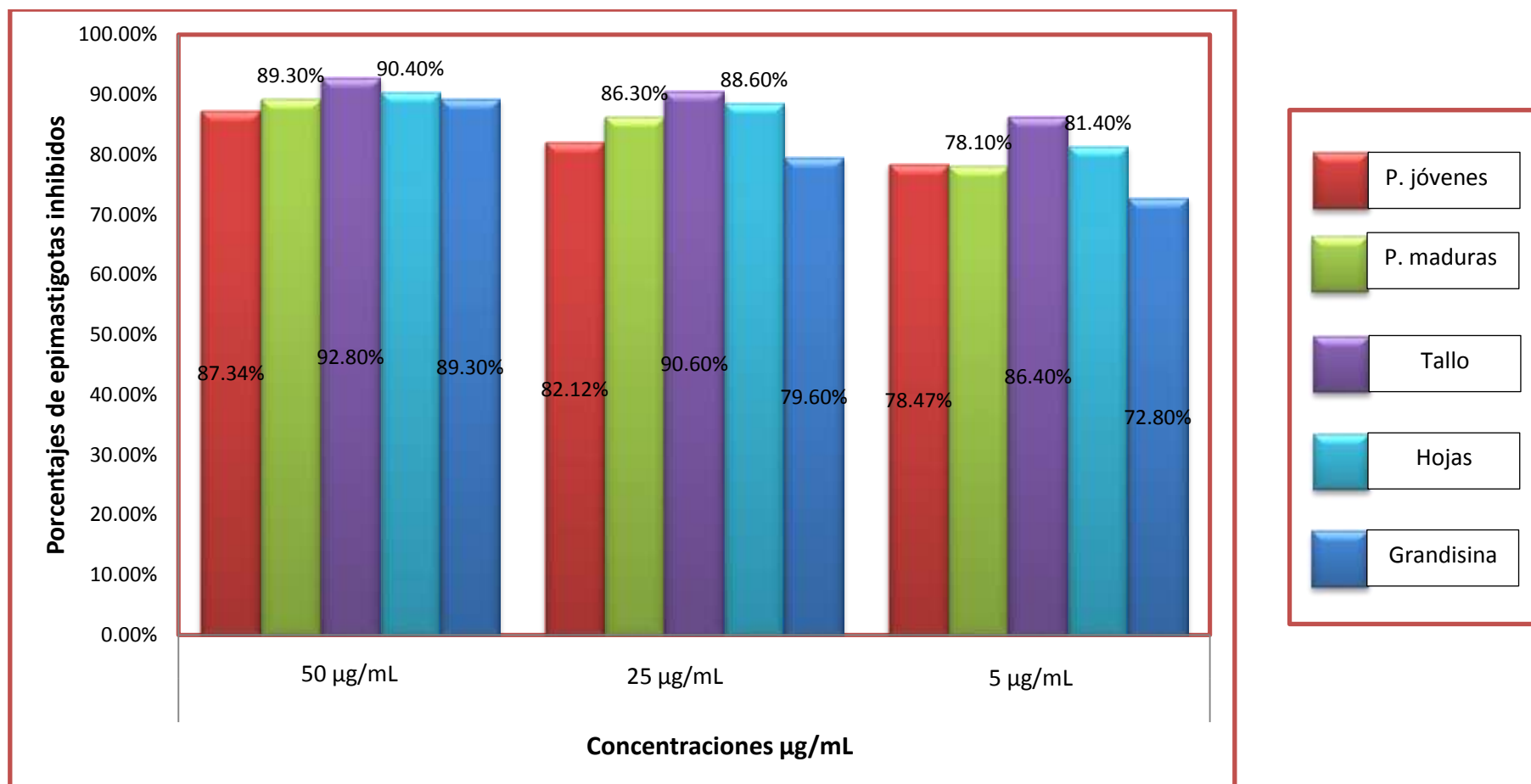


Figura 4. Porcentaje de inhibición de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a las concentraciones 50, 25 y 5 µg/mL de los extracto crudos de acetato de etilo de plantas silvestres y plántulas *in vitro* de *Piper solmsianum* (Porcentaje de inhibición vs concentración)

5.2 Inhibición de Tripomastigotes

En el cuadro 2 se observa los porcentajes de inhibición del ensayo *in vitro* realizado para tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, a las concentraciones de 50, 25 y 5 µg/mL los cuales se obtuvieron en base a las absorbancias registradas que se presentan en el anexo 13 hasta el anexo 17. Aquí, se puede observar que en los extractos de todas las estructuras vegetales y el compuesto grandisina utilizados, se alcanzó una inhibición del 92.96% con extracto de plántulas jóvenes *in vitro* y 93.37% a la concentración 50 µg/mL de grandisina pura, destacándose el compuesto puro de grandisina sobre las demás estructuras vegetales.

Utilizando la concentración de 25 µg/mL se puede observar que también existe un alto grado de inhibición donde destaca el extracto de plántulas jóvenes *in vitro* con 86.80% seguido del extracto de plántulas maduras *in vitro* con 86.77% de inhibición. El porcentaje de inhibición aún sigue considerándose alto al utilizar la concentración de 5 µg/mL donde el rango de inhibición oscila entre 70.88% con extracto de hojas de plantas silvestres a 77.97% con la sustancia pura grandisina.

Cuadro 12. Inhibición de tripomastigotes con cuatro tipos de extractos de *Piper solmsianum* y grandisina pura.

% de Inhibición de concentraciones			
Tipo de Extracto	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL
Plántulas jóvenes	92.96%	86.80%	71.26%
Plántulas maduras	91.56%	86.77%	74.97%
Grandisina	93.37%	86.30%	77.97%
Tallo	91.78%	84.15%	74.25%
Hojas	92.15%	82.35%	70.88%

Realizado el Análisis de varianza (ANOVA) respectivo para cada tipo de extracto ensayado, se observa que el efecto sobre los tripomastigotes de *T. cruzi* es significativo. (Cuadro 13 – 17).

Cuadro 13. Análisis de varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos del extracto de plántulas jóvenes cultivadas *in vitro* de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los tripomastigotes de *T. cruzi* es significativo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,021	3	,007	91,384	,000
Intra-grupos	,001	8	,000		
Total	,021	11			

Cuadro14. Análisis de varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos del extracto de plántulas maduras cultivadas *in vitro* de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los tripomastigotes de *T. cruzi* es significativo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,016	3	,005	658,062	,000
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,016	11			

Cuadro 15. Análisis de varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos del extracto de tallo de plantas silvestres de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los tripomastigotes de *T. cruzi* es significativo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,016	3	,005	2347,286	,000
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,016	11			

Cuadro 16. Análisis de varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos del extracto de hojas de plantas silvestres de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los tripomastigotes de *T. cruzi* es significativo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,016	3	,005	1637,225	,000
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,016	11			

Cuadro 17. Análisis de varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos del extracto puro de grandisina de plantas silvestres de *Piper solmsianum* donde se observa que el efecto sobre los tripomastigotes de *T. cruzi* es significativo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,017	3	,006	916,302	,000
Intra-grupos	,000	8	,000		
Total	,017	11			

La prueba de Tukey, para concentraciones del extracto de plantas jóvenes *in vitro*, demuestra que 25 µg/mL y 50 µg/mL tiene un efecto estadísticamente similar y diferente cuando se utiliza 5 µg/mL y el control es diferente a todos. (Cuadro 18), lo mismo ocurre en el caso del extracto de plantas *in vitro* maduras, siendo la concentración 5 µg/mL diferente a las dos concentraciones superiores y el control diferente a todo (Cuadro 19) . En el caso del extracto de tallo y hojas de plantas silvestres, así como grandisina pura, todos fueron estadísticamente diferentes entre sí, incluyendo al control (Cuadros 18 – 21)

Cuadro 18. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*. Plántulas jóvenes cultivadas *in vitro*

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
50	3	,00500		
25	3	,02467	,02467	
5	3		,03267	
CONTROL	3			,11367

Cuadro 19. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*, plántulas maduras cultivadas *in vitro*.

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
50	3	,00833		
25	3	,01367		
5	3		,02467	
CONTROL	3			,09867

Cuadro 20. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*.

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
50	3	,00833			
25	3		,01600		
5	3			,02600	
CONTROL	3				,10100

Cuadro 21. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*. Extracto de hojas de plantas silvestres.

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
50	3	,00800	,01800	,02967	,10200
25	3				
5	3				
CONTROL	3				

Cuadro 22. Comparación de medias (Tukey) con los datos obtenidos en los ensayos *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes concentraciones de los extractos de acetato de etilo de plántulas cultivadas *in vitro*, de plantas silvestres y el compuesto grandisina de *Piper solmsianum*. Extracto de grandisina.

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
50	3	,00667	,01367	,02200	,10000
25	3				
5	3				
CONTROL	3				

Comparando las tres concentraciones utilizadas para cada uno de los extractos frente a su actividad en tripomastigotes, se puede observar que el porcentaje de inhibición va desde 71.26% como el más bajo a la concentración de 5 µg/mL de plántulas jóvenes al 93.37% como el de mayor inhibición a la concentración de 50 µg/Ll del compuesto puro grandisina, existe una tendencia de inhibición que va en el rango de 70.88% al 92.96% (Figura 5).

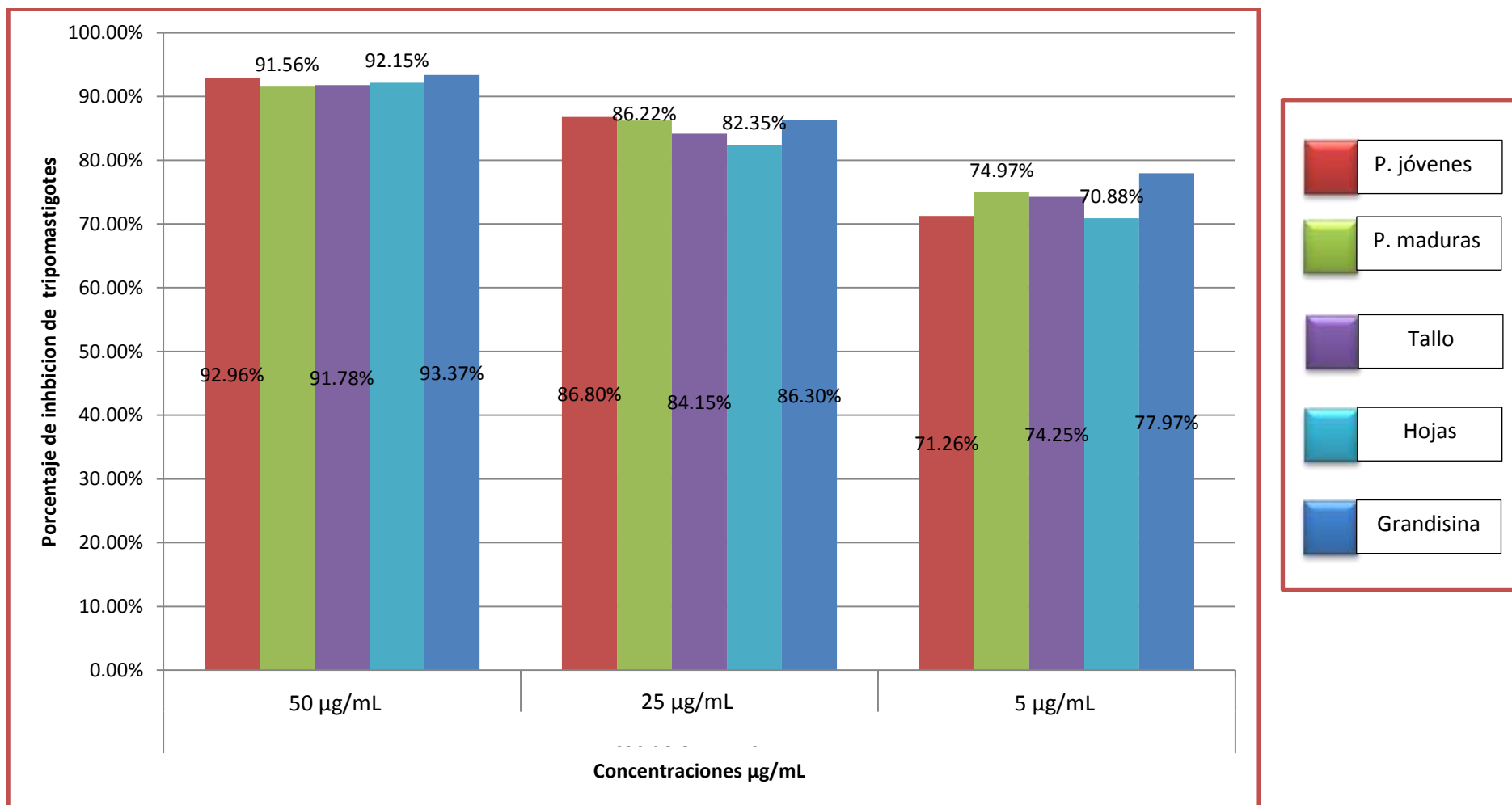


Figura 2. Porcentaje de inhibición de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* a las concentraciones 50, 25 y 5 µg/mL de los extracto crudo de acetato de etilo de plantas silvestres y plántulas *in vitro* de *Piper solmsianum* (Porcentaje de inhibición vs concentración)

5.3. Evaluación IC₅₀ de los extractos de plántulas silvestres, plántulas *in vitro* y el compuesto de grandisina pura de *P. solmsianum* en epimastigotes de *T. cruzi*.

Al analizar las concentraciones inhibitorias medias presentadas en el Cuadro 3, se observó que el extracto de plantas jóvenes *in vitro* inhibió el 50% de la población de epimastigotes con 0.018 µg/mL, seguido de la grandisina con 0.039 µg/ml, el extracto de plántulas maduras *in vitro*, con 0.051 µg/mL y el de hojas de plantas silvestres con 0.064 µg/mL, finalmente el extracto de tallo de plantas silvestres con 0.254 µg/mL. A excepción del extracto de tallo por la mayor concentración efectiva, todos resultaron ser similares en la actividad inhibitoria media.

Cuadro 22. Valores IC₅₀ para tres niveles de cuatro extractos extracto de *Piper solmsianum* y grandicina en epimastigotes de *Tripanosoma cruzi*.

IC ₅₀ para Epimastigotes	
Tipo de extracto	Estimación µg/mL
Plántulas jóvenes	0.018
Plántulas maduras	0.051
Grandisina	0.039
Tallo	0.254
Hojas	0.064

5.4. Evaluación IC₅₀ en de los extractos de plántulas silvestres, plántulas *in vitro* y el compuesto de grandisina pura de *P. solmsianum* en tripomastigotes de *T. cruzi*

En el Cuadro 4, se expresan los valores estimados para la concentración media de inhibición (IC₅₀) para cada uno de los extractos en tripomastigotes. En el caso del compuesto puro de grandisina, el 0.360 µg/mL inhibió al 50% de la población, los extractos de plántulas jóvenes y maduras *in vitro*, así como las de tallo y hojas de plantas silvestres, los valores que inhibieron al 50 % de tripomastigotes fueron superiores al 0.5 µg/mL.

Cuadro 23. Porcentaje de Inhibición para cada Extracto de Tripomastigotes.

IC50 para Tripomastigotes	
Tipo de extracto	Estimación $\mu\text{g/mL}$
Plántulas jóvenes	1.143
Plántulas maduras	0.525
Grandisina	0.360
Tallo	0.575
Hojas	0.576

Realizando una comparación general de los resultados obtenidos, según la figura 4 y 5, se puede apreciar que hay una respuesta casi uniforme para cada tipo de concentración en cada uno de los extractos. Desde la concentración más baja, superando el 50% de inhibición.

VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, como se ha podido observar, se utilizaron cuatro tipos de extractos y la neolignana grandisina pura de actividad tripanomicida, que es sintetizada por *P. solmsianum*, aunque no es la única especie que lo sintetiza, pues fue aislada también de *Virola surinamensis*, especie de la familia Myristicaceae (López et al., 1998); Fueron probadas tres concentraciones y dos estadios de desarrollo de *T. cruzi*, epimastigotes y tripomastigotes.

En los experimentos con epimastigotes, en la concentración más baja de 5 µg/mL se pudo obtener una inhibición de 84.52% al utilizar extracto de tallo de plantas silvestres, lo que equivaldría a deducir que la viabilidad de los epimastigotes estuvo por debajo de 20% como el valor más alto para esta concentración, seguido del extracto de hoja y los demás extractos incluyendo a la grandisina. A medida que aumenta la concentración de los extractos aumenta también el porcentaje de inhibición. El extracto de tallo, a 25 y 50 µg/mL alcanzó el mayor efecto con 96.39 y 99.52% de inhibición, lo que indicaría que a estas concentraciones los parásitos sólo presentaron una viabilidad menor del 1%. Efecto menor se ha podido observar en estudios realizados con extracto de *Acnistus arborescens* (Solanaceae) utilizando 25.0 µg/mL de extracto etanólico de hojas donde sólo se alcanzó la inhibición del 85% de epimastigotas (Gómez, 2012).

En la mayoría de pruebas realizadas para concentraciones inhibitorias medias IC_{50} con extracto de plantas, con actividad tripanocida en el estadio epimastigote, se mencionan los valores de 13.3 y 17.2 µg/mL, como ocurre con el extracto hexánico de hojas de *P. arborium* y *P. tuberculatum*, y las fracciones de frutos consideradas potentes con valores IC_{50} menores a 33 µg/mL (Regasini et al., 2009). El efecto se debería a la presencia de pirrolidin alquilamidas, la piperylina y la 4,5-dihydropiperylina presente en las hojas (Kato & Furlán 2007). Comparando con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observó que los valores IC_{50} en epimastigotes son inferiores al 0.05 µg/mL como corresponde al extracto de plántulas jóvenes *in vitro* (0.018 µg/mL), seguido de la grandisina con 0.039 µg/mL, a excepción del extracto de tallo que llega a 0.254 µg/mL.

En el caso de los experimentos con tripomastigotes, se destaca la grandisina en las tres concentraciones utilizadas, 5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, llegando a inhibir desde 77.97, 86.30 y 93.37%, seguido de los demás extractos con una diferencia de 1 a 2% aproximadamente entre tratamientos. Esta actividad ya ha sido reportada (Martins et al., 2003) y ahora se confirma en el estadio tripanomastigote; a este efecto le siguen los extractos de plántulas maduras *in vitro*, hoja y tallo, con valores IC_{50} menores a 1.0 $\mu\text{g/mL}$, a excepción del extracto de plántulas jóvenes *in vitro* de *Piper solmsianum* que presentó un valor de 1.143 $\mu\text{g/mL}$.

El extracto etanólico de *Acnistus arborescens* (Solanaceae), también fue enfrentado a este estadio, donde 25.0 $\mu\text{g/mL}$ donde los valores de IC_{50} fueron de 10.0 y 14.0 $\mu\text{g/mL}$ de (Gómez, 2012), valores relativamente altos comparados con los resultados obtenidos con los extractos ensayados en el presente trabajo, donde el mayor valor corresponde a 1.143 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de plántulas jóvenes *in vitro*.

Por la actividad tripanocida que presenta, la grandicina ha sido utilizada para ser sometida a modificación molecular para obtener otros compuestos más potentes y con menores efectos colaterales y de mejores características físico-químicas en el combate de la enfermedad de Chagas. Se han obtenido ocho compuestos análogos con resultados de actividad positiva (Bortola, 2012). Por otro lado, en *P. malacophyllum*, ha sido aislado un alkenilfenol con actividad en tripanomastigotes, donde se observó valor IC_{50} de 17 $\mu\text{g/mL}$ y valores citotóxicos CC_{50} de 59 $\mu\text{g/mL}$ y una actividad hemolítica ausente aun utilizando 75 $\mu\text{g/mL}$ (Abe et al., 2002). Los cromenes y una lignana tetrahidrofuránicas grupo al que pertenece la grandicina, estaría siendo sintetizada por *Peperomia blanda*, lo que le proporcionaría la característica de tripanocida (Felipe et al., 2008). Hasta la actualidad más de 130 especies de plantas han sido estudiadas por sus propiedades contra parásitos, especialmente contra los que causan Chagas y Leishmania cuyos responsables son protozoarios (De Oliveira et al., 2012)

El aislamiento de lignanas y neolignanas con actividad tripanocida, abre amplias posibilidades de elaborar otras sustancias de mayor eficacia, utilizando nuevas técnicas de quimioinformática, basadas en la estructura de las moléculas bioactivas sobre las

proteínas relevantes para la sobrevivencia del parásito, hecho que se ha puesto al descubierto con la caracterización del genoma de *T. cruzi* en el 2005. Las investigaciones apuntan a encontrar derivados de las neolignanas que se comporten como inhibidores de la hipoxantina-guanina fosforiltransferasa de la cruzipaina y de la sintetasa de la forniesil- pirofosfato exoquinasa (Campillo et al., 2012).

VII. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones mayores a 5 µg/mL del extracto crudo de plántulas maduras, plántulas jóvenes, hojas y tallo de plantas silvestres de *Piper solmsianum*, disminuyen la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en más de 50%.
2. Las concentraciones de 25 y 50 µg/mL del extracto crudo de plántulas maduras, plántulas jóvenes, hojas y tallo de plantas silvestres de *Piper solmsianum*, disminuyen la viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en más del 70%.
3. Los extractos crudos de plántulas *in vitro* y las plantas silvestres de *Piper solmsianum*, mostraron tener un efecto parecido al de la grandisina pura, contra la viabilidad de tripomastigotes y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
4. Estadísticamente no existe diferencia significativa entre la actividad tripanocida de los extractos crudo, en acetato de etilo, de plántulas *in vitro* y plantas silvestres de *Piper solmsianum*.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos para probar el efecto tripanocida de *Piper solmsianum* en amastigote de *Trypanosoma cruzi*. Para determinar si tiene actividad tripanocida en el interior de la célula.
2. Determinar la citotoxicidad de cada uno de los extractos, para seleccionar el menos toxico y más efectivo.
3. Probar la actividad de los extractos en ensayos *in vivo*.
4. Mantener la cepa de *Trypanosoma cruzi*, fase tripomastigote, en ratones machos albinos BALB/c, para futuros ensayos.
5. Explorar nuevas especies vegetales con principios activos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F.; Nagafuji, S.; Yamauchi, T.; Okabe, H.; Maki, J.; Higo, H.; Akahane, H.; Aguilar, A.; Jiménez-Estrada, M.; Reyes-Chilpa, R. Biol. Pharm. Bull. 2002, 25, 1188
- Alvitres V. (2000). *Método Científico. Planificación de la investigación*. 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Amin D.. Actividad Leishmanicida y Tripanocida de algunas plantas reportadas como medicinales en Colombia. Biofarbo. 2011; 12: 27-30.
- Arnason J. Phytochemical discovery of a new botanical insecticides. Rev Philogene; 2005; 45: 36- 47
- Atías A, Negme W. Clasificación de los protozoos parásitos. En: Atías, A. Parasitología Clínica. 3ªed. Chile: Mediterráneo; 1991: p. 23.
- Bestetti R, Mucillo G. Clinical Course of Chagas Heart Disease : A comparasion with Dilated Cardiomyopathy. International Journal of Cardiology. 1997; 60 : 187-93.
- Brako L, Zarucchi J., Catalogne of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Missouri Botanical Garden. 1993; 45: 884-923
- Coura JR, Castro SL. Acritical review on Chaga disease chemotherapy. Men Inst. Oswaldo Cruz 97: 3- 24. 2002
- Felippe, L. G.; Baldoqui, D. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. S.; Guimarães, E. F.; Cicarelli, R. M. B.; Furlan, M. Phytochemistry 2008, 69, 445.
- Goldsmith T, Heyneman D. Parasitología y Medicina Tropical..El Manual Moderno, 1ª ed. México , D.F; 1995.
- Hoare C. The Trypanosomes of mammals. Zoological Monograph. Blackwen scientific publicactions (Oxford). 1972: 749.
- Jaramillo A. Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae). Rev American Journal of Botany; 2001; 88, 706-716.
- Kato M, Furlan M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. Pure Appl.Chem.2007; 79(4):529-538.
- Lago J, Ramos C, Casanova C, Morandim A. Benzoic acid derivates from Piper species and their fungitoxic activity againgt *Cladopsorium cladospiroids* and *C. sphaerospemum*. J. Nat. 2004; Prod.67:1738-1788.

- Levine N, Corliss J, Cox F, Deroux G. A New Revised Classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*. 1980; 27:37-58.
- Lopez , NP. et al. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. *Planta medica* 64, 667 – 669. 1998.
- Martins C, Latorre J, Sartorelli J, Kato M. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Rev Phytochemistry*. 2003; 55: 843-846.
- Muñoz D. Estudio Fitoquímico y Evaluación de la actividad fungicida e insecticida de la especie *Piper eriopodon* (Piperaceae). [Tesis de Maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Química; 2010.
- Parmar, V, Jain, S, Bsht K., Jain R, Taneja P, Jha A., Tyagi, O, Prasad K., Wengel, J, Olsen, C, Boll. *Phytochemistry of the genus Piper*. *Rev Phytochemistry*. 1997; 46: 597-673.
- Regasini LO, et al radical scavenging capacity of *Piper arborum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Lat Am J. Pharm* 27: 900- 903. 2008.
- Reina San Martín B, Casson A. Lymphocyte Polyclonal Activation: A Pitfall for vaccine Design against Infections Agents. *Parasitology Today*. 2000; 16:62-67
- 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): 161-5.
- Souza D, Garratt, Araujo A, Guimaraes B, Jesus W, Michels P, Hannaert V, Oliva G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde- 3- phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and target inhibition design. *FEBS Lett*. 1998; 424(3): 131-5.
- Sunday E, Funmi O. Evaluation of anti-trypanosomal properties of four extracts of leaves, stem and root barks of *Prosopis africana* in laboratory animals. *Rev Biokemistri*. 2009; 21(2): 101- 108.
- Sunday E, Funmi O. Evaluation of anti-trypanosomal properties of four extracts of leaves, stem and root barks of *Prosopis africana* in laboratory animals. *Biokemistri*. 2009; 21(2): 101- 108.
- Silva R, Navickiene D, Kato M, Bolzani C, Furlan M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Rev Phytochemistry*. 2002; 59:521-527
- Tebbs M. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New world I. Review of characters and taxonomy of *Piper* section Macrostachys. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot)*. 1989; 19:117-158.

Vargas F. Epidemiologia Molecular de la Tripanosomiasis Americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la región norte y nororiental del Perú. [Tesis Doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2005.

Yuncker T. The Piperacea of Brazil. II. Piper – Group V; Ottonia, pothomorhy, sarcorhachic. Hoehnea. 1972; 3: 29-284.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio de cultivo bifásico BHI modificado

1.1 MEDIO CALDO BHI MODIFICADO:

- Extracto de carne..... 0.3 g
- Peptona..... 1.0 g
- Cloruro de sodio..... 0.5 g
- Dextrosa..... 0.2 g
- BHI..... 3.7 g
- Agua destilada..... 99.0 mL
- Gentamicina..... 1.0 mL

Ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C

1.2. AGAR BHI MODIFICADO:

- Caldo BHI modificado..... 99 mL
- Agar Agar..... 1.5 g
- Gentamicina..... 1.0 mL

Ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C

1.3. AGAR SANGRE MODIFICADO al 10%:

- Agar BHI modificado..... 90 mL
- Sangre de conejo desfibrinada..... 10 mL

Ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C

Preparación de MTT (difeniltetrazodio bromuro).

1.4.Buffer para MTT:

- Solución A: 200 mL de agua destilada + 2.396 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Solución B: 200 mL de agua destilada + 2.839 g NaH_2PO_4
- Solución bufferada: 32 mL de la solución A + 172.5 mL de la solución B

Ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C

1.5.MTT (difeniltetrazodio bromuro)

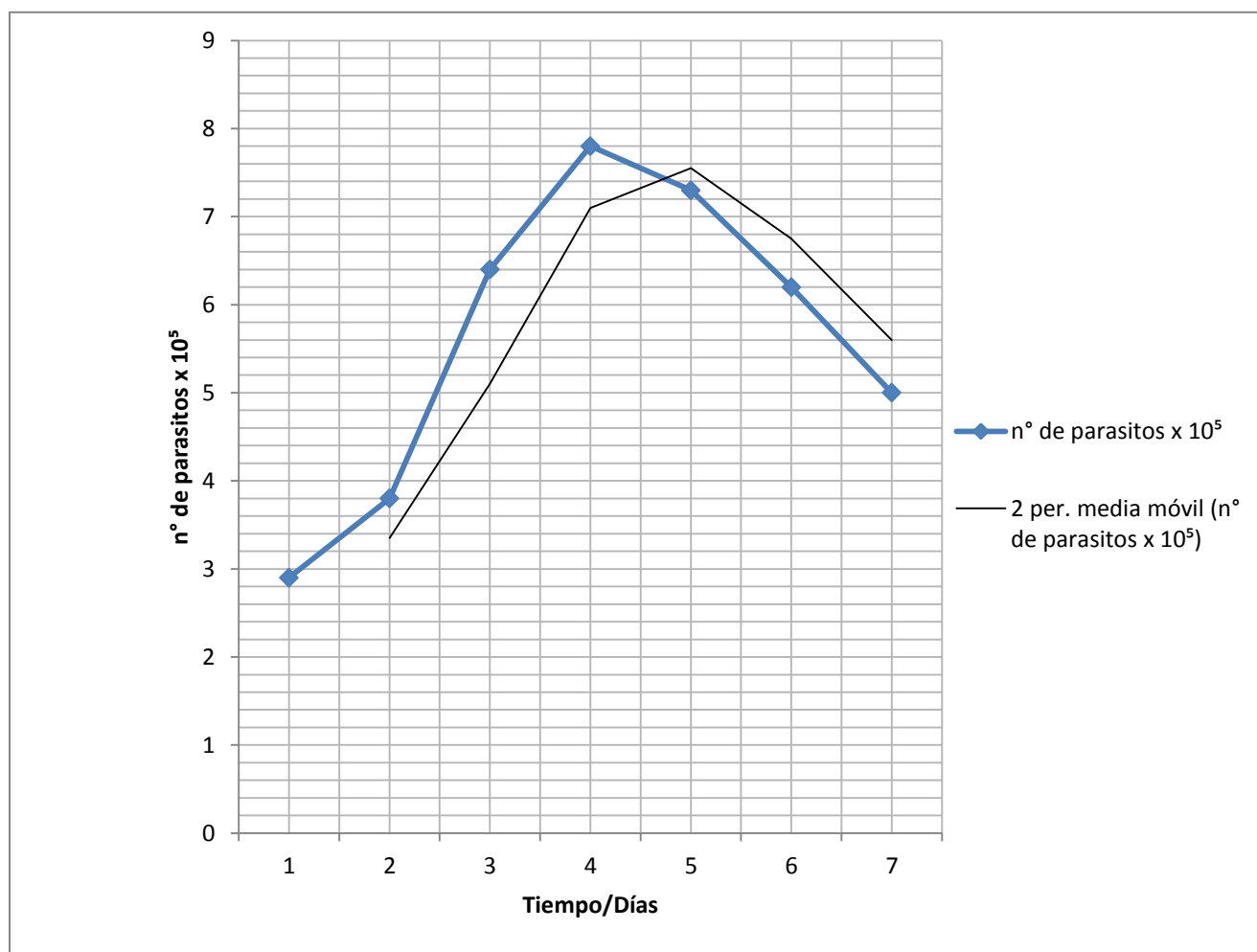
- MTT..... 10 mg
- Solución bufferada..... 4 mL

Mantener en refrigeración a una T° de 4 a 8°C

1.6.Preparación de SDS al 10%

Alcohol isopropilico..... 10 mL
SDS..... 10 g
Agua destilada..... 90 mL

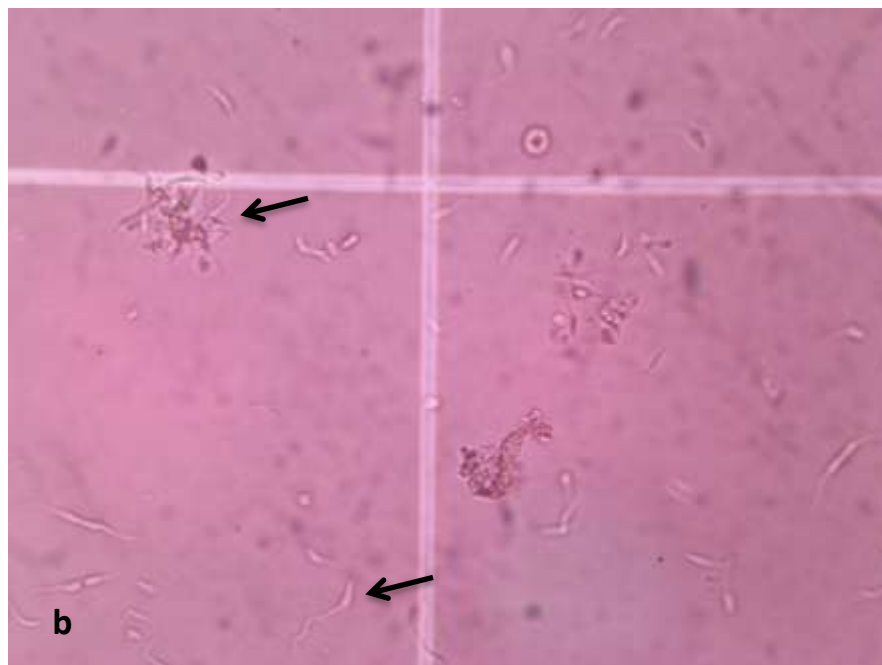
Anexo 2. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en medio de cultivo BHI bifásico modificado, a 28 °C durante 6 días.



Anexo 3. Cultivo y recuento de epimastigotes en cámara de Neubauer.

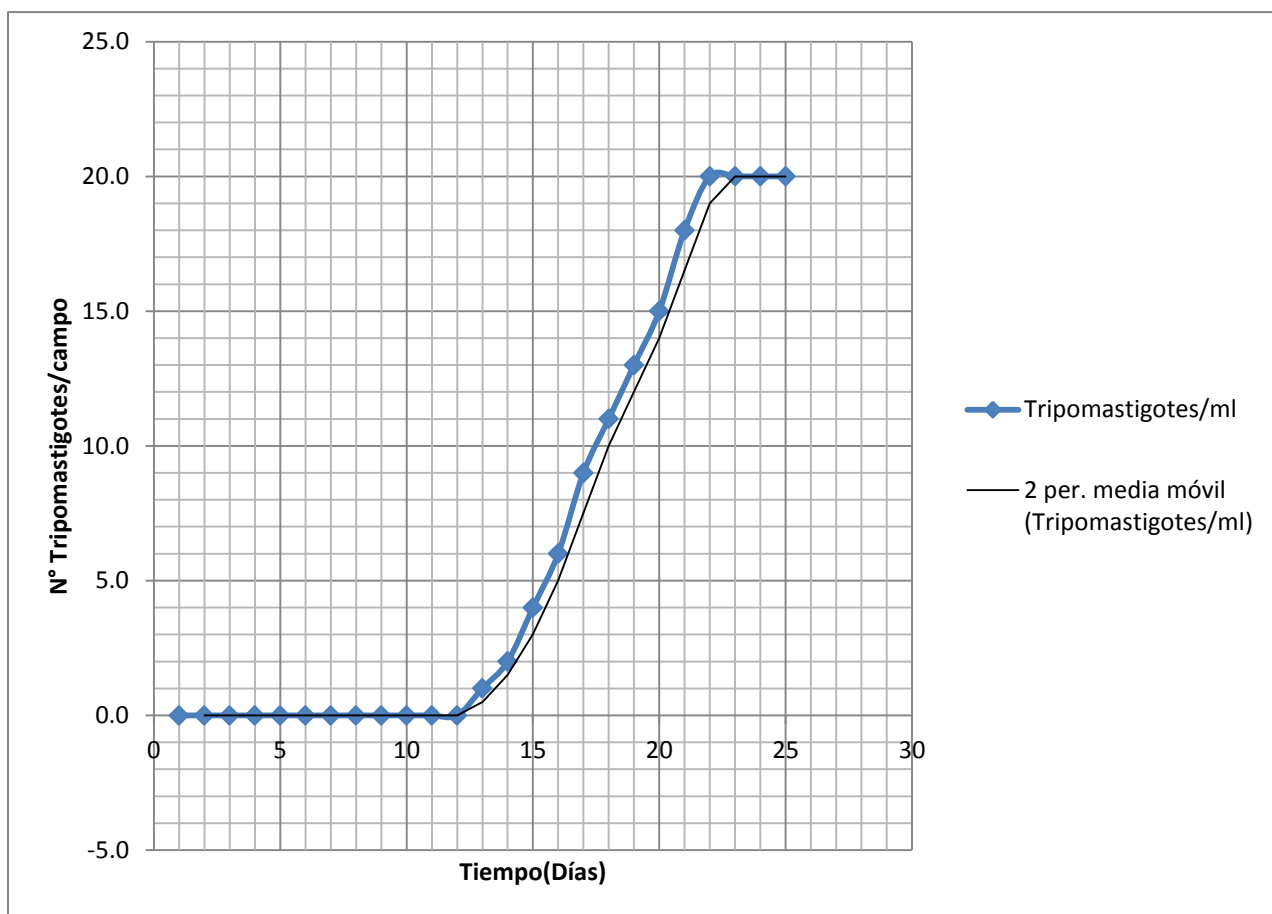


a. Cultivos axénicos de epimastigotes

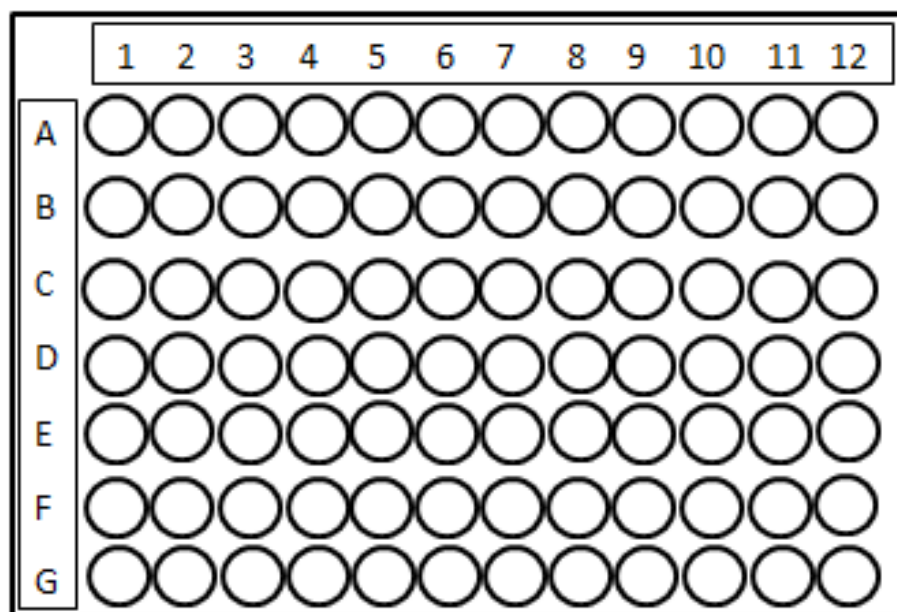


b. Recuento de epimastigotes en cámara de Neubauer

Anexo 4. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en sangre de *Mus musculus*



Anexo 5. Esquema de la ejecución del bioensayo in vitro de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones 5, 25, 50 µg/mL de los extractos crudos de plántulas *in vitro* y plantas silvestres de *Piper solmsianum*.



Grupos experimentales.

2B – 4B: 20 µL del parásito + 80 µL de BHI + 50 µL del extracto (50.0 µg/mL)

2D – 4D: 20 µL del parásito + 80 µL de BHI + 50 µL del extracto (25.0 µg/mL)

2F – 4F: 20 µL del parásito + 80 µL de BHI + 50 µL del extracto (5.0 µg/mL)

Grupos control:

9C – 11C: 20 µL del parásito + 80 µL de BHI + 50 µL de BHI.

9E – 11E: 20 µL del parásito + 80 µL de BHI + 50 µL de DMSO al 1%.

Blancos de estandarización:

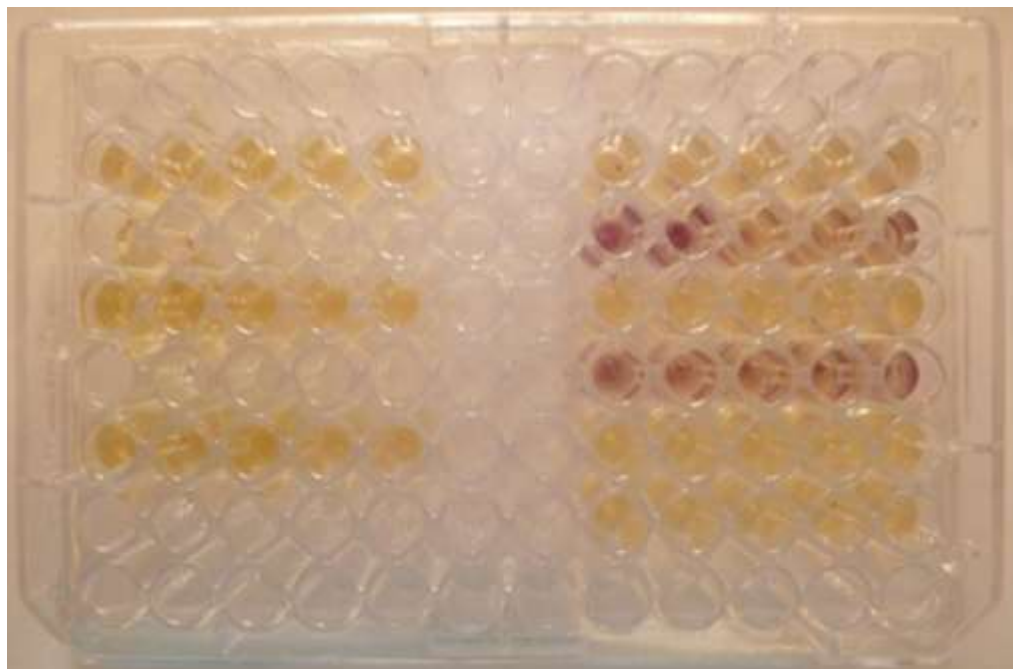
9B – 11B: 100 µL de BHI + 50 µL del extracto (50 µg/mL).

9D – 11D: 100 µL de BHI + 50 µL del extracto (25 µg/mL).

9F – 11F: 100 µL de BHI + 50 µL del extracto (5 µg/mL).

9G – 11F: 100 µL de BHI + 50 µL de BHI.

Anexo 6. Determinación de la viabilidad *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, las concentraciones de 5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ del extracto crudo de plántulas *in vitro* y plantas silvestres de *Piper solmsianum*.



Grupos experimentales.

2B – 4B: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL del extracto (50.0 $\mu\text{g/mL}$)
2D – 4D: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL del extracto (25.0 $\mu\text{g/mL}$)
2F – 4F: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL del extracto (5.0 $\mu\text{g/mL}$)

Grupos control:

9C – 11C: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL de BHI.
9E – 11E: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL de DMSO al 1%.

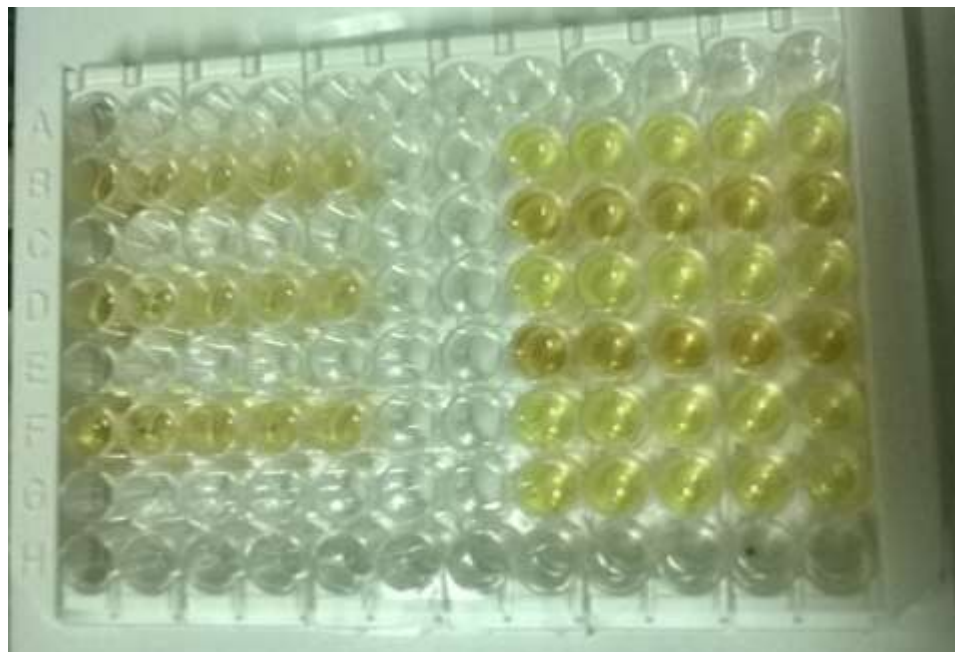
Blancos de estandarización:

9B – 11B: 100 μL de BHI + 50 μL del extracto (50 $\mu\text{g/mL}$).
9D – 11D: 100 μL de BHI + 50 μL del extracto (25 $\mu\text{g/mL}$).
9F – 11F: 100 μL de BHI + 50 μL del extracto (5 $\mu\text{g/mL}$).
9G – 11G: 100 μL de BHI + 50 μL de BHI.

Interpretación:

- Pocillos color violeta: presencia de parásito vivo.
- Pocillo color amarillo: ausencia de parásito

Anexo 7. Determinación de la viabilidad *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, las concentraciones de 5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ del extracto crudo de plántulas *in vitro* y plantas silvestres de *Piper solmsianum*.



Grupos experimentales.

2B – 4B: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL del extracto (50.0 $\mu\text{g/mL}$)
2D – 4D: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL del extracto (25.0 $\mu\text{g/mL}$)
2F – 4F: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL del extracto (5.0 $\mu\text{g/mL}$)

Grupos control:

9C – 11C: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL de BHI.
9E – 11E: 20 μL del parásito + 80 μL de BHI + 50 μL de DMSO al 1%.

Blancos de estandarización:

9B – 11B: 100 μL de BHI + 50 μL del extracto (50 $\mu\text{g/mL}$).
9D – 11D: 100 μL de BHI + 50 μL del extracto (25 $\mu\text{g/mL}$).
9F – 11F: 100 μL de BHI + 50 μL del extracto (5 $\mu\text{g/mL}$).
9G – 11G: 100 μL de BHI + 50 μL de BHI.

Interpretación:

- Pocillos color violeta: presencia de parásito vivo.
- Pocillo color amarillo: ausencia de parásito

Anexo 8. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de plántulas jóvenes cultivadas *in vitro* de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICIONES	CONCENTRACIONES			BLANCOS DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25µg/mL	5 µg/mL		
1	0,094	0,098	0,109	0,077	0,066	0,078	0,216	0,067
2	0,097	0,097	0,107	0,076	0,072	0,070	0,231	0,067
3	0,093	0,095	0,101	0,073	0,070	0,070	0,213	0,066
PROMEDIOS	0,095	0,097	0,106	0,075	0,069	0,073	0,220	0,067

Anexo 9. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/ml del extracto de acetato de etilo de plántulas maduras cultivadas *in vitro* de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICION	CONCENTRACIONES			BLANCO DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,079	0,083	0,075	0,074	0,073	0,058	0,136	0,073
2	0,085	0,083	0,083	0,084	0,074	0,067	0,146	0,073
3	0,089	0,084	0,08	0,074	0,076	0,067	0,142	0,072
PROMEDIO	0,084	0,083	0,079	0,077	0,074	0,064	0,141	0,072

Anexo 10. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de tallo de plantas silvestres de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICION	CONCENTRACIONES			BLANCO DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,076	0,079	0,076	0,071	0,075	0,071	0,217	0,062
2	0,086	0,086	0,096	0,082	0,075	0,069	0,152	0,066
3	0,096	0,082	0,082	0,082	0,072	0,062	0,165	0,073
PROMEDIO	0,086	0,082	0,084	0,078	0,074	0,067	0,178	0,067

Anexo 11. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de hojas de plantas silvestres de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICION	CONCENTRACIONES			BLANCO DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,068	0,078	0,085	0,066	0,072	0,074	0,135	0,072
2	0,079	0,074	0,088	0,067	0,064	0,074	0,137	0,061
3	0,075	0,08	0,09	0,069	0,072	0,074	0,139	0,061
PROMEDIO	0,074	0,077	0,087	0,067	0,069	0,074	0,137	0,064

Anexo 12. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de grandicina de plantas silvestres de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICION	CONCENTRACION			BLANCO DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,072	0,072	0,078	0,063	0,059	0,058	0,144	0,063
2	0,079	0,076	0,074	0,062	0,058	0,058	0,145	0,064
3	0,059	0,081	0,085	0,059	0,06	0,055	0,145	0,064
PROMEDIOS	0,07	0,076	0,079	0,061	0,059	0,057	0,144	0,063

Anexo 13. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 5, 25, 50 µg/mL del extracto de acetato de etilo de plántulas jóvenes cultivadas *in vitro* de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICIONES	CONCENTRACIONES			BLANCOS DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,085	0,082	0,09	0,075	0,062	0,058	0,165	0,058
2	0,08	0,079	0,098	0,076	0,065	0,059	0,172	0,05
3	0,083	0,075	0,087	0,073	0,064	0,06	0,166	0,054
PROMEDIOS	0,082	0,078	0,091	0,074	0,063	0,059	0,167	0,054

Anexo 14. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de plántulas maduras cultivadas *in vitro* de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICIONES	CONCENTRACIONES			BLANCOS DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,085	0,092	0,094	0,08	0,078	0,067	0,16	0,063
2	0,087	0,089	0,095	0,078	0,079	0,07	0,165	0,064
3	0,092	0,093	0,09	0,081	0,076	0,068	0,163	0,065
PROMEDIOS	0,088	0,091	0,093	0,079	0,077	0,068	0,162	0,064

Anexo 15. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de tallo de plantas silvestres de *Piper solmsianum* (Lectura a 492nm).

REPETICIONES	CONCENTRACIONES			BLANCOS DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,087	0,089	0,095	0,078	0,074	0,071	0,169	0,067
2	0,089	0,091	0,093	0,08	0,076	0,065	0,17	0,069
3	0,086	0,09	0,094	0,079	0,072	0,068	0,165	0,065
PROMEDIOS	0,087	0,09	0,094	0,079	0,074	0,068	0,168	0,067

Anexo 16. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de hojas de plantas silvestres de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICIONES	CONCENTRACIONES			BLANCOS DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,083	0,088	0,1	0,074	0,07	0,069	0,167	0,066
2	0,082	0,091	0,098	0,075	0,072	0,066	0,17	0,067
3	0,084	0,09	0,093	0,076	0,073	0,067	0,165	0,063
PROMEDIOS	0,083	0,089	0,097	0,075	0,071	0,067	0,167	0,065

Anexo 17. Absorbancias obtenidas del ensayo *in vitro* de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con las concentraciones de 50, 25, 5 µg/mL del extracto de acetato de etilo de grandicina de plantas silvestres de *Piper solmsianum* (Lectura a 492 nm).

REPETICIONES	CONCENTRACIONES			BLANCOS DE MUESTRA			SOLUCION DE REFERENCIA	BLANCO DE REFERENCIA
	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	5 µg/mL		
1	0,079	0,084	0,085	0,073	0,068	0,066	0,158	0,056
2	0,082	0,08	0,089	0,076	0,068	0,065	0,156	0,06
3	0,083	0,082	0,086	0,075	0,069	0,063	0,16	0,058
PROMEDIOS	0,081	0,082	0,086	0,074	0,068	0,064	0,158	0,058

