

## Actividad tripanocida in vitro e in vivo de extractos etanólicos de algunas plantas medicinales bolivianas

### In vitro and in vivo trypanocidal activity, of ethanolic extracts from some bolivian medicinal plants

Victoria Muñoz Ortiz<sup>1</sup>, Eliana Patricia Duchén Uriarte<sup>2</sup>, Fanny Wagner<sup>1</sup>, María Elena Ferreira<sup>3</sup>, Elva Serna<sup>3</sup>, Susana Torrez<sup>3</sup>, Gloria Yaluff<sup>3</sup>, Mabel Ayaviri<sup>2</sup>, Ninfa Vera de Bilbao<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Puras, Carrera de Química, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Departamento de Medicina Tropical. Asunción, Paraguay

Dirección para correspondencia: Victoria Muñoz Ortiz. Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra No 2246, La Paz, Bolivia.  
E mail : victoriamuo@hotmail.com

Recibido para publicación en 16/03/10

Aceptado en 30/06/10

#### RESUMEN

A 100 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, aun no existen drogas que satisfagan completamente. Los extractos de plantas medicinales son una posibilidad de obtener nuevos compuestos que sean activos contra *Trypanosoma cruzi*. Se evaluó la actividad tripanocida in vitro sobre las formas tripomastigotes de ocho extractos etanólicos provenientes de 4 plantas medicinales bolivianas. El extracto etanólico de la corteza de *Anacardium occidentale* fue el más activo in vitro (CI<sub>50</sub>= 200 µg/ml), seguido de las hojas de *Bowdichia virgilioides* (350 µg/ml). *A. occidentale*, *B. virgilioides* y *Senna reticulata*, no son eficaces en la fase aguda de la enfermedad de Chagas en el modelo murino.

**Palabras Clave:** Actividad tripanocida, *Trypanosoma cruzi*, Plantas medicinales, Bolivia

#### ABSTRACT

Chagas' disease was described 100 years ago, currently available drugs have serious limitations due to limited efficacy. Extracts derived from plants offer possibilities to obtain new compounds that are active against *Trypanosoma cruzi*. Eight alcoholic extracts, belonging to 4 Bolivian medicinal plants were tested for their in vitro trypanocidal activities on trypomastigote forms. *Anacardium occidentale* was the most active in vitro (IC<sub>50</sub> = 200 µg/ml), followed by the *Bowdichia virgilioides* (IC<sub>50</sub> = 350 µg/ml). *A. occidentale*, *B. virgilioides* and *Senna reticulata*, was not effective of acute Chagas' disease in a murine model.

**Key Words:** Trypanocidal activity, *Trypanosoma cruzi*, Medicinal plants, Bolivia

#### INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas esta difundida en Sud y Centro América. Es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* y es naturalmente transmitida por *Triatoma infestans*. Aproximadamente, 18 a 20 millones de personas están afectadas por esta dolencia. 80 millones de personas están en riesgo de adquirir el parásito, 18 países tienen esta parasitemia, en el año 2008, se registraron 11000 defunciones. El número de casos diagnosticados ha aumentado en Australia, el Canadá, los Estados Unidos de América, Europa y el Japón<sup>1,2</sup>.

Bolivia presenta la tasa más alta de infección de América Latina en la Enfermedad de Chagas, aproximadamente el 50% de nuestro territorio es endémico, el 20% de la población estaría infectada, el 48% de los donadores de sangre presentan una serología positiva<sup>3</sup>.

El riesgo de adquirir o desarrollar una infección por unidades contaminadas después de una transfusión sanguínea en países latinoamericanos en los años 2001-2002 fue de 138,28 a 0, por 10000 habitantes, el valor más alto corresponde a Bolivia<sup>4</sup>.

Se conoce que la sangre en condiciones de almacenamiento en bancos conserva tripanosomas viables por periodos de hasta 42 días y se consideraba que las medidas de control como el añadir violeta de genciana, no tenía toxicidad a determinadas concentraciones recomendadas. Sin embargo, Rezende et al. (1965)<sup>5</sup> manifestó que el colorante causa

microaglutinación y alteraciones en el glóbulo rojo. Una otra desventaja es el tiempo que requiere la acción de la droga antes de la transfusión y el color que adquiere la sangre<sup>6</sup>. Otros reportes mencionan que puede presentar un efecto potencial carcinógeno en roedores<sup>7</sup> y una baja mutagenicidad<sup>8</sup>, Schlemper, 1975<sup>9</sup> manifiesta que el colorante puede no tener la misma actividad sobre todas las cepas. Por estas razones el violeta de genciana no es aceptado por los pacientes y los médicos, siendo una prioridad encontrar nuevos quimioprolifáticos.

Han transcurrido 100 años del descubrimiento del parásito y aún la etiopatogenia no está bien definida, a pesar que se ha demostrado que el parásito está presente en todos los períodos de la enfermedad. Las drogas sintéticas como el nifurtimox, un 5 nitrofurano (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) y el benznidazol un 2-nitroimidazole (Rochagan<sup>®</sup>, Roche), tienen mayor efectividad en la fase aguda de la enfermedad, pero, lamentablemente su eficacia es limitada en la fase crónica, los efectos no deseados son importantes<sup>2</sup>. Hasta la fecha, no se ha desarrollado una vacuna que evite el desarrollo de esta parasitemia. Continúa siendo un desafío el desarrollo de nuevas drogas tripanocidas más efectivas y menos tóxicas. Las plantas medicinales siempre han sido una fuente importante de compuestos líderes para el desarrollo de nuevas drogas contra los parásitos.

El propósito de este trabajo fue determinar la actividad tripanocida de ocho extractos etanólicos obtenidos de cuatro plantas medicinales *Anacardium occidentale* L (Anacardiaceae), *Bowdichia virgilioides* Kunth (Papilionaceae), *Triplaris americana* L. (Polygonaceae) y *Senna reticulata* (Willdenow) Irwin & Barnaby (Caesalpiniaceae).

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Planta colectadas e identificación.** *Anacardium occidentale* L (Anacardiaceae), *Bowdichia virgilioides* Kunth (Papilionaceae), *Triplaris americana* L. (Polygonaceae) y *Senna reticulata* (Willdenow) Irwin & Barnaby (Caesalpiniaceae), fueron colectas el año 2008 en la comunidad de San Josecito ubicada en la Provincia Ballivian del departamento de Beni, Bolivia. Las muestras de herbario fueron depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia de la Universidad Mayor de San Andrés. Los especímenes fueron identificados por la Lic. Rossy Michel y el Dr. Stephan Beck.

**Preparación de los extractos.** La hojas y corteza de

la planta fueron secadas, molidas y maceradas con etanol-agua (70-30%) por 48 h a 25 °C, evitando la radiación de la luz del día. La solución etanólica obtenida, fue evaporada al vacío y el residuo concentrado fue directamente evaluado *in vitro* e *in vivo*<sup>10</sup>.

**Ratones y parásitos.** Se utilizaron los ratones Swiss de 6-8 semanas de vida, infectados con el clon CL de *Tripanosoma cruzi*<sup>11</sup>, cepa obtenida del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Departamento de Medicina Tropical, Asunción Paraguay, se la mantuvo en los ratones por inoculación intraperitoneal cada 14 días.

**Actividad tripanocida *in vitro*.** Se utilizaron ratones Swiss infectados con la cepa CL de *T. cruzi* para obtener tripomastigotes.

Los extractos de plantas a evaluar se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO) y se prepararon diferentes concentraciones (500, 250, 100, 50 y 10 µg/ml) con el medio de cultivo LIT (Liver Infusion Triptosa), estas concentraciones fueron mezcladas con igual volumen de sangre parasitada. La densidad del parásito calculada fue de  $2 \times 10^5 / 0.1 \text{ml}$  para cada alveolo, se incluirá alvéolos controles positivos para el DMSO y controles negativos con violeta de genciana. Después de incubar a 4 °C por 24 horas, se cuantificó la suspensión microscópicamente utilizando una cámara de Neubauer<sup>12</sup>. Se determinó la CI<sub>50</sub> (concentración inhibitoria del 50% del desarrollo de los tripomastigotes) por el método gráfico<sup>13</sup>.

**Actividad tripanocida *in vivo*. Fase aguda.** Todos los ratones fueron infectados intraperitonealmente con 1000 tripomastigotes de la cepa CL separados previamente de la sangre.

El tratamiento se inició 12 días después de la inoculación de los parásitos. A los ratones se los dividió en grupos al azar de 8 ejemplares. Se utilizó como droga de referencia en todos los experimentos el benznidazol, por vía oral a 50 mg/kg/día durante 2 semanas.

Los extractos de plantas fueron administrados de forma oral a la concentración 100 mg/kg/día durante 2 semanas<sup>14</sup>.

**Análisis estadístico.** La comparación de los valores promedio fueron realizados usando el Test de Student y ANOVA. El nivel de significancia fue establecido para el valor de  $p < 0.05$ .

**Tabla 1. Uso tradicional, modo de preparación de las especies vegetales estudiadas**

Especie Familia Nombre popular N° de herbario	Uso tradicional <sup>15</sup>	Modo de preparación <sup>15</sup>
<i>Anacardium occidentale</i> L. (Anacardiaceae) Cayu VM17	Disenteria	Se usan la hojas tiernas y el fruto verde o maduro mezclados con otros ingredientes. Se prepara un mate en medio litro de agua. El mate se toma por vasitos, hasta que se detenga la diarrea.
<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth (Papilionaceae) Chirihuano VM4	Disenteria Malaria Leishmaniasis	Se toma un pedazo de la corteza de cinco por diez cm. La parte interna, de color rosado-anaranjado, se tritura y se efectúa una decocción en dos litros de agua, hasta obtener un litro. De esta preparación se toma un vasito en la mañana, en el almuerzo y en la tarde. Durante tres días. Para las leishmaniasis se usan cataplasmas.
<i>Triplaris americana</i> (Polygonaceae) Palo diablo VM20	Eliminar los parásitos, Ascariasis Leishmaniasis Ayudar en el parto Diarrea	Cocción de un pedazo de corteza en agua, hasta la obtención de un color oscuro. Se toma "copitas", una vez al día en ayunas durante tres días
<i>Senna reticulata</i> (Willdenow) Irwin & Barnaby (Caesalpinaceae) Mamuri VM2	Problemas de la piel Insecticida	El jugo de la hoja se coloca en la piel varias veces al día, hasta que sane.

## RESULTADOS

Las concentraciones inhibitorias del 50% (CI<sub>50</sub>) del desarrollo de los tripomastigotes de *T. cruzi*, de 8 extractos etanólicos preparados a partir de 4 plantas medicinales bolivianas, se observan en la Tabla 2. Los valores de las CI<sub>50</sub> de las diferentes plantas fluctuaron entre 200 y >500 µg/ml. El extracto etanólico de la corteza de *A. occidentale* fue el más activo (CI<sub>50</sub>= 200 µg/ml), seguido del extracto de las hojas de *B. virgilioides* (350 µg/ml), ambos resultados no son comparables al violeta de genciana (16 µg/ml). Se investigó la actividad in vivo en ratones en fase aguda de la enfermedad de Chagas con las plantas que tenían mayor cantidad de extractos. Se puede apreciar

en la Figura 1, que la actividad tripanocida en ratones Swiss infectados con *T. cruzi* y tratados oralmente con los extracto etanólicos de las hojas y corteza de *B. virgilioides* a la concentración de 100 mg/kg diariamente, por dos semanas. Los extractos no mostraron actividad (p>0,05), en comparación con el grupo de ratones no tratados. Se observó un 100% de sobrevivencia en todos los grupos de ratones en estudio hasta el día 60, con la excepción del grupo tratado con el extracto de la corteza de *B. virgilioides* en el que murió un ratón en el día 27 después de la infección.

Los extractos de las hojas de *A. occidentalis* y *S. reticulata*, tampoco tuvieron actividad in vivo (p>0,05), durante los 60 días post infección.

Tabla 2. Actividad tripanocida in vitro de plantas medicinales bolivianas

Especie	Parte usada	CI <sub>50</sub> µg/ml
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Corteza	200±20
	Hojas	> 500
<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth	Corteza	500±30,1
	Hojas	350±10
<i>Triplaris americana</i> L.	Corteza	> 500
	Hojas	500±35,1
<i>Senna reticulata</i> (Willdenow)	Corteza	>500±56,5
	Hojas	460±2,3
Violeta de genciana		16±1,41

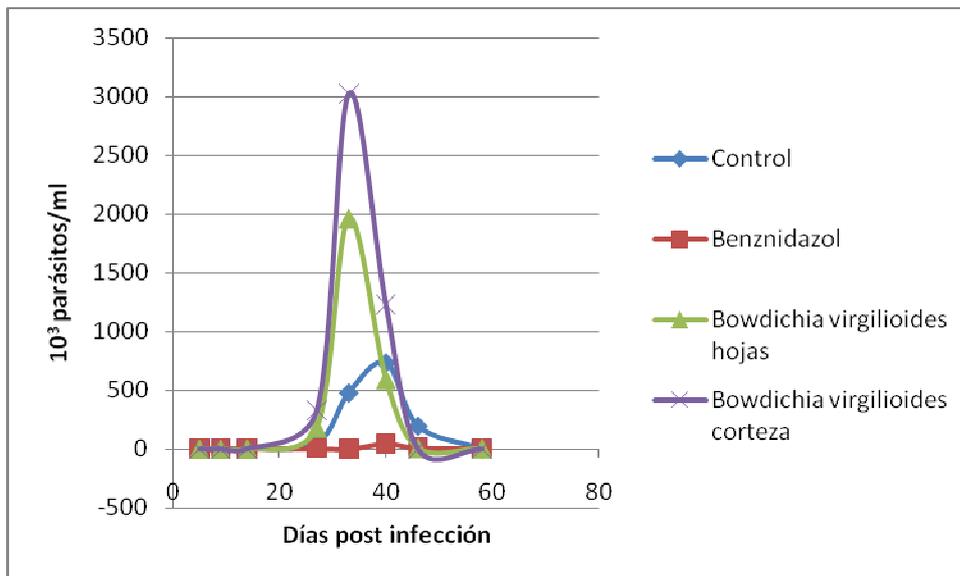


Figura 1. Parasitemia de ratones Swiss en fase aguda, infectados con *T. cruzi* y tratados oralmente con los extractos etanólicos de las hojas (▲) y corteza (×) de *Bowdichia virgilioides* a la concentración de 100 mg/kg administrados diariamente, por 14 días después de 12 después de la infección. El análisis estadístico utilizando T-student no indica una diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre el control (ratones no tratados) y los extractos de *Bowdichia virgilioides* en los diferentes días de post infección.

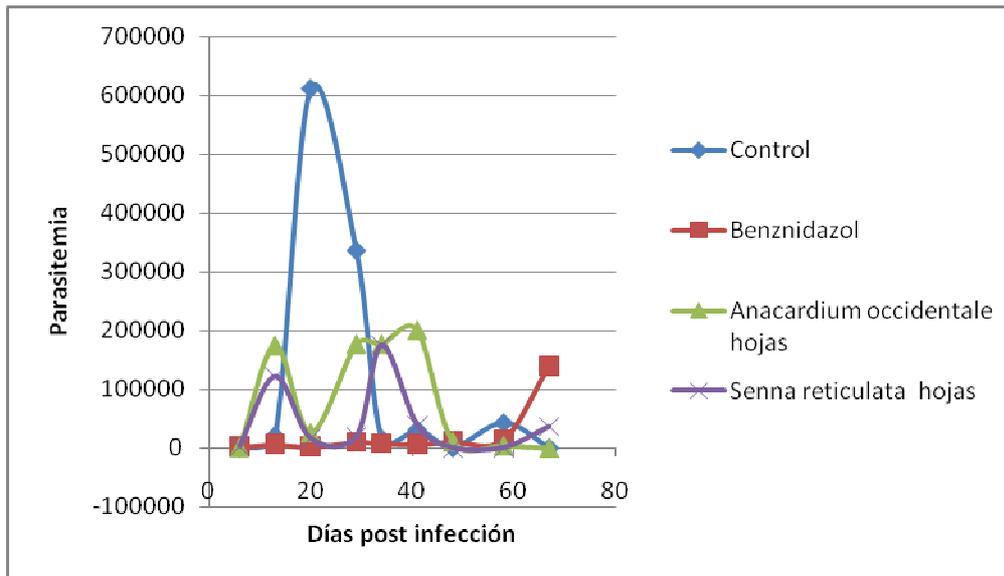


Figura 2. Parasitemia de ratones Swiss en fase aguda, infectados con *T. cruzi* y tratados oralmente con los extractos etanólicos de las hojas de *Anacardium occidentale* (▲) y las hojas de *Senna reticulata* (×) a la concentración de 100 mg/kg administrados diariamente, por 14 días después del día 12 de infección. El análisis estadístico utilizando T-student no indica una diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre el control (ratones no tratados) y los extractos de *Anacardium occidentale* y *Senna reticulata* en los diferentes días de post infección.

## DISCUSIÓN

En la búsqueda de productos naturales con actividad tripanocida, se han evaluado in vitro 8 extractos etanólicos obtenidos de 4 plantas y 4 extractos de 3 especies diferentes in vivo, estos últimos, seleccionados por contar con la mayor cantidad de extractos. Ninguna de las especies medicinales utilizadas tiene un uso específico contra la enfermedad de Chagas, sin embargo, tienen actividad contra otras enfermedades parasitarias y otras patologías, razón por la cual se las eligió para este estudio.

La  $CI_{50}$  ( $200 \pm 20$   $\mu\text{g/ml}$ ) de *A. occidentale* es buena si la comparamos con otros valores obtenidos en diferentes trabajos, como por ejemplo el extracto de *Chresta ecapigera* tiene un porcentaje de lisis de los tripomastigotes de 50,85% a  $4000 \mu\text{g/ml}$ <sup>16</sup>. En Nueva Caledonia de 30 especies diferentes estudiadas sólo *Amborella trichopoda* reduce en un 80% el desarrollo de los tripomastigotes sanguíneos a  $250 \mu\text{g/ml}$ <sup>17</sup>. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *A. occidentale*, no tiene prácticamente ningún porcentaje de inhibición en el desarrollo de los epimastogotes de *T. cruzi*, cepa Y<sup>20</sup>. Estas actividades distintas en diferentes estadios evolutivos, subraya la necesidad de utilizar diferentes técnicas de selección.

*A. occidentale* presenta además una serie de actividades biológicas; el extracto metanólico de la corteza tiene acción antimicrobiana<sup>18</sup> y reveló una  $CI_{50} > 250$   $\mu\text{g/ml}$  en promastigotes de *Leishmania* sp.<sup>19</sup>. El contenido fenólico de los brotes del anacardo tiene actividad antioxidante<sup>21</sup>. En relación a su composición

química de *A. occidentale*, del extracto hidrometanólico del anacardo se aislaron una antocianina y 13 flavonoides glicosilados<sup>22</sup>. Los compuestos fenólicos son conocidos principalmente por su actividad antioxidante, algunos de ellos presentan actividad contra *T. cruzi*<sup>23</sup>. La actividad tripanocida de *A. occidentale* podría estar vinculada con la actividad antioxidante. Las nuevas perspectivas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, indican que se debe incluir terapia antioxidante para atenuar las consecuencias de los procesos oxidativos relativos a la enfermedad<sup>24</sup>.

Este es el primer reporte de actividad sobre tripomastigotes sanguíneos de las hojas y corteza de *B. virgilioides*, sin embargo, las  $CI_{50}$  obtenidas no son comparables al violeta de genciana. Otras actividades reportadas son la antipalúdica<sup>25</sup>, es efectiva contra *Staphylococcus aureus*<sup>26</sup>. Las estructuras químicas que se identificaron fueron un glucósido isoflavonoide, odoratin 7-O-b-D-glucopiranosido, de las raíces de *B. virgilioides*<sup>27</sup>, dos derivados de flavonas<sup>28</sup>, 5 alcaloides de la familia ormosin, con una estructura quinolizidin<sup>29</sup>.

*T. americana* es utilizada como antimalarial por el grupo étnico boliviano Moseten<sup>30</sup>, también presenta actividad inmunomoduladora<sup>31</sup>.

Los extractos de diferentes órganos de *Senna reticulata* (sinónimo de *Cassia reticulata*), presentan una serie de actividades biológicas, como antiviral, antibacteriana y antifúngicas<sup>32</sup> (Santos et al., 2008). El compuesto (8-hydroxymethylen)-trienicosanyl acetato aislado de la hojas de *Senna villosa*, tiene actividad

sobre los epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, estos compuestos podría estar presente en plantas de este género<sup>33</sup>.

En conclusión, esta investigación, de plantas medicinales bolivianas utilizadas contra diferentes parásitos determina por primera vez la actividad in vitro de los extractos de *A. occidentale* y *B. virgilioides* en las formas tripomastigotes de *T. cruzi*. Las hojas de *A. occidentale*, hojas y corteza de *B. virgilioides* y las hojas de *Senna reticulata* no presenta actividad en la fase aguda de la enfermedad de Chagas en ratones.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación, fue financiada por los Recursos IDH (Impuesto a los Hidrocarburos) otorgados por el Gobierno Boliviano.

Se agradece a los doctores Enrique Udaeta Velásquez, Juan Carlos Ávila de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Mayor de San Andrés, José Raphael Gutiérrez, Oscar Yucra, José Santalla del INLASA, Alicia Schinini del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, Paraguay, por la valiosa colaboración brindada a este trabajo.

## REFERENCIAS

1. WHO. Chagas Disease Control. WHO Scientific. Publication 905, Geneva, 109p., 2002.
2. OMS. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. 62ª Asamblea Mundial de la Salud. A62/17. 20 de marzo de 2009.
3. Cassab JA, Noireau F, Guillén G. Ira ed. La Paz, Bolivia: Ediciones gráficas EG;1999.
4. Schmunis AG, Cruz RJ. Safety of the Blood Supply in Latin America. Clin Microbiol Rev. 2005; 18:12–29.
5. Rezende JM, Zuyoeili W, Bufulto MG. O problema da transmissão do doença de Chagas por transfusão de sangue. Emprego do violeta de genciana como medida profilática. Rev Goiana Med. 1965;11:35-47.
6. Docampo R, Moreno SNJ, Gadelha FR, De Souza W, Cruz FS. Prevention of Chagas disease resulting from blood transfusion by treatment of blood: toxicity and mode of action of gentian violet. Biomed Environ Sci. 1988;1:406-413.
7. Littlefield ME, Blackwell BN, Hewitt CC, Gaylor D. Chronic toxicity and carcinogenicity studies of gentian violet in mice. Fundament Appl Toxicol. 1985;5:902-912.
8. Thomas SN, MachPhee DG. Crystal violet: a direct-acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism. Mutat Res.1984;140:165-167.
9. Schlemper BR, Estudos experimentais de quimioprofilaxia da transmissão da doença de Chagas por transfusão sanguínea. Thesis, University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. 1975.
10. Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Bergeron S, Rojas I, Bravo JA, Balderrama L, Ortiz B, Gimenez A, Deharo E. The search for natural bioactives compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Chacobo indians. J Ethnopharmacol. 2000;69:127-137.
11. Cano MI, Gruber A, Vazquez AM, Cortés A, Levin MJ, González A, Degraive W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requena JM, Silveira JF. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. Mol Biochem Parasitol. 1995; 71:273–278.
12. Sülsen PV, Cazorla IS, Frank MF, Redko CF, Anesini AC, Coussio DJ, Malchiodi LE, Martino SV, Muschiatti VL. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(4):654–659.
13. Silva CF, Marcos Meuser Batista M, Renata Alves Mota R, Mello de Souza E, Chad E. Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro M. Activity of “reversed” diamidines against *Trypanosoma cruzi* “in vitro”. Biochem pharmacol. 2007; 73:1939– 1946.
14. Ferreira ME, Nakayama H, Rojas de Arias A, Alicia Schinini A, Vera de Bilbao N, Serna E, Lagoutte D, Flor Soriano-Agatón F, Poupon E, Hocquemiller R, Fournet A. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. J Ethnopharmacol. 2007;109:258–263.
15. Bourdy G, De Walt SJ, Chavez de Michel LR, Roca A, Deharo E, Muñoz V, Balderrama L, Quenevo C, Giménez A: Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. J. Ethnopharmacol. 2000; 70: 87-109.
16. Schinor CE, Salvador JM, Pral FME, Alfieri CS, Albuquerque S, Dias AD. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007
17. Billo M, A. Fournet A, Cabalion P, Waikedre J, C. Bories C, Loiseau P, Prina E, Rojas de Arias A, Yaluff G, Fourneau C, Hocquemiller R. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. Journal of Ethnopharmacology 96 (2005) 569–575.
18. Akinpelu DA. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. Fitoterapia. 2001; 72: 286-287.
19. Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, Matos M, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. J Ethnopharmacol. 2007;11:396–402.
20. Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Cortez DAG, de Mello CP, Nakamura CV. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Cienc Farm. 2005;41:85-94.
21. Razali N, Razab R, Junit SM, Azlina, Aziz AA. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). Food Chemistry. 2008;111:38–44.
22. de Brito ES, de Araújo CP, Lin LZ, James Harnly J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. Food Chemistry 2007;105:1112–1118.
23. Fournet A, Muñoz V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. Curr Top Med Chem. 2002; 2:1215-1237.
24. Mação LB, Wilhelm Filho D, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres MA, Fröde TS. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy

- associated with Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 2007;123:43-49.
25. Muñoz V, Bourdy G, Deharo E, Callapa J, Quenevo C, Sauvain M. Actividad antipalúdica in vitro e in vivo de plantas usadas por el grupo étnico boliviano Tacana. *Cuadernos.* 2002; 47:7-26.
  26. Almeida Alves TM, Fonseca Silva A, Brandão M, Mesquita Grandi TS, Smânia EF, Smânia Júnior A, Zani CL: Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95:367-373.
  27. Velozo LSM, da Silva BP, Bernardo RR, Parente JP, L.S.M. Odoratin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from *Bowdichia virgilioides*. *Phytochemistry.* 1999;52:1473-1477.
  28. Arriaga AM, Gomes GA, Braz-Filho R: Constituent of *Bowdichia virgilioides*. *Fitoterapia.* 2000; 71:211-212.
  29. Torrenegra RG, Bauereiss P, Achenbach H: Homormosanina type alkaloids from *Bowdichia virgilioides*. *Phytochemistry* 1989; 28:2219-2221.
  30. Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deharo E. 2000. The search for natural bioactives compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosetene indians. *J Ethnopharmacol.* 69:139-155.
  31. Deharo E, Baelmans R, Gimenez A, Quenevo C, Bourdy G. In vitro immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia. *Phytomedicine.* 2004;11:516-522.
  32. Santos RN, Silva MG, Braz Filho R. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae): Chemical constituents isolated from the wood of *Senna reticulata* Willd. *Quím. Nova.* 2008;3: 1979-1981.
  33. Guzmán E, Pérez C, Zavala MA, Acosta-Viana KY, Pérez S. Antiprotozoal activity of (8-hydroxymethylen)-trieicosanyl acetate isolated from *Senna villosa*. *Phytomedicine.* 2008;15:892-895.