



Uso de extractos etanólicos de plantas del género Piper con propiedades antiparasitarias contra Trypanosoma cruzi en Colombia.

Revisión de la literatura

Jeysson David Parra Bello

Asesor interno

Nelson Arturo Salazar Buitrago, M.Sc., Ph.D.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, septiembre 2021

Tabla de contenido

Resumen	5
Introducción	6
1. Antecedentes	8
2. Marco Teórico	15
2.1 Agente etiológico, <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
2.2 Enfermedad de Chagas	20
2.3 Género de plantas <i>Piper</i>	26
2.4 Extractos etanólicos	28
2.5 Ensayos de Citotoxicidad	29
3. Diseño metodológico	32
4. Resultados y discusión	33
4.1 Extractos etanólicos de plantas del género <i>Piper</i> con efecto actividad tripanocida presentes en Colombia	33
4.2 Ensayos citotóxicos de plantas del género <i>Piper</i> realizados en modelos celulares	35
4.3 Determinación de la viabilidad de compuestos químicos de plantas del género <i>Piper</i> como terapia contra la enfermedad de Chagas	37
5. Conclusiones	38
6. Referencias bibliográficas	39
7. Anexos	52

Índice de tablas

Tabla 1, Plantas del género Piper cuyos metabolitos presentes en sus extractos etanólicos demostraron tener efecto tripanocida	66
Tabla 2, Modelos celulares empleados en los 7 estudios seleccionados	67

Índice de figuras

Figura 1, Distribución geográfica de <i>T. cruzi</i> en Latinoamérica teniendo en cuenta la clasificación DTU.	54
Figura 2, Estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Figura 3, Ciclos de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
Figura 4, Distribución geográfica por regiones de los principales vectores de <i>Trypanosoma cruzi</i> en Colombia	55
Figura 5, Vías de transmisión oral de la enfermedad de Chagas	56
Figura 6, Regiones clasificadas según su control sobre el vector de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
Figura 7, Presencia de anticuerpos contra <i>Trypanosoma cruzi</i> con relación a la fase de la enfermedad	57
Figura 8, Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i> observada en extendido de sangre periférica.	57
Figura 9, Estructura y partes básicas de plantas pertenecientes al género <i>Piper</i>.	58
Figura 10, Principales compuestos químicos descritos en plantas del género <i>Piper</i>	58
Figura 11, Extractos obtenidos de plantas del género <i>Piper</i>.	64



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Uso de extractos etanólicos de plantas del género Piper con propiedades antiparasitarias contra Trypanosoma cruzi en Colombia.

Resumen

La enfermedad de Chagas es una patología denominada como “desatendida o rechazada”, es causada por el hemoparásito *Trypanosoma cruzi* y se conoce por ser potencialmente mortal y por ser endémica de los países latinoamericanos. La siguiente monografía tiene por objetivo el identificar las especies de plantas del género *Piper* que se encuentren presentes en diferentes regiones de Colombia y cuyos extractos etanólicos posean efectos citotóxicos contra el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Se realizó un estudio descriptivo, mediante un proceso de recolección, análisis y exposición de datos, tanto cuantitativos como cualitativos, a partir de fuentes bibliográficas tales como artículos científicos y trabajos de investigación en donde se hayan descrito experimentos de citotoxicidad contra el parásito causante de la enfermedad de Chagas, haciendo uso de extractos etanólicos de plantas del género *Piper*. Como resultado de este estudio, se encontró que diversas especies de plantas del género *Piper* demostraron tener efecto antiparasitario contra *Trypanosoma cruzi* y que más de la mitad de esos estudios se realizaron con especies que se han descrito en el territorio colombiano, lo cual indica que existen metabolitos de estas plantas con posible efecto terapéutico contra la enfermedad de Chagas y a futuro se pueden realizar más ensayos en nuevas especies de plantas en Colombia que pertenezcan a este género.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, *Piper*, extractos etanólicos, fitoquímica, ensayos citotóxicos, efecto tripanocida, Colombia.

Jeysson David Parra Bello

Nelson Arturo Salazar Buitrago, M.Sc., Ph.D.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Septiembre 2021

Introducción

La enfermedad de Chagas es una enfermedad globalmente conocida por ser potencialmente mortal. Se ha aproximado que alrededor del mundo entre 6 y 7 millones de personas padecen esta infección parasitaria (1) y se estima que 100 millones de personas se encuentran en riesgo de ser infectadas. Anualmente se presentan aproximadamente alrededor de 30.000 casos nuevos, 12.000 muertes y 8.000 recién nacidos que contraen esta enfermedad (2), demostrando así que esta enfermedad representa un problema serio de salud pública. Esta patología se encuentra directamente relacionada con un factor clave, el cual es la carencia de diversos aspectos socioeconómicos, por lo que se le ha denominado una enfermedad “desatendida o rechazada”.

Actualmente la enfermedad de Chagas se considera endémica de los países latinoamericanos, siendo Colombia uno de los países donde se observa un gran impacto causado por esta patología. Según el Sistema de Vigilancia en Salud Pública en Colombia, tan solo en el periodo transcurrido del año 2021 se ha determinado que el porcentaje de positividad de Chagas crónico es de un 37,5% en territorios que se encuentran contemplados dentro del Plan de interrupción, mientras que en territorios que no están priorizados, el porcentaje es de un 27,27%. Además, para el caso de Chagas agudo, hasta el año 2019 se lograron confirmar 248 nuevos casos, entre los cuales un 40,3% de estos fueron ocasionados por brotes de transmisión oral. (3)

La Organización Mundial de la Salud ante esta problemática ofrece dos medicamentos para el tratamiento de personas que se encuentren con infección aguda, los cuales son el Benzonidazol y el Nifurtimox, que al ser usados desde el inicio de la etapa aguda,

ofrecen alta eficacia para curar a los infectados e incluso se ha demostrado que ayudan al buen pronóstico de casos de transmisión congénita; por otro lado, para el caso de las personas que padecen de Chagas en estado crónico no suelen tener buen pronóstico y el tratamiento pierde su eficacia. Aunque ambos fármacos ofrecen una solución definitiva para la enfermedad, existe un alto riesgo al usar cualquiera de las dos terapias, pues la lista de efectos secundarios incluye dermatitis alérgica, neuropatías periféricas, anorexia y pérdida de peso, además de presencia de enfermedades hepáticas y renales graves (4). A día de hoy, se encuentran en desarrollo proyectos de investigación cuyo propósito es determinar la posibilidad de encontrar nuevas alternativas a estas dos terapias, con el fin de lograr encontrar un balance entre ofrecer una solución a quienes se encuentren padeciendo esta enfermedad, como también, asegurarles que la toxicidad del tratamiento será mínima y al mismo tiempo que sea eficaz.

Pregunta problema

¿Cuáles extractos etanólicos de plantas del género *Piper* presentes en Colombia poseen propiedades antiparasitarias contra *Trypanosoma cruzi*?

Objetivos

Objetivo general

Identificar las especies de plantas del género *Piper* presentes en diferentes regiones de Colombia cuyos extractos etanólicos posean efectos citotóxicos contra el protozoo *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos

- Definir las especies de plantas del género *Piper* presentes en Colombia cuyo efecto tripanocida se haya descrito en la literatura haciendo uso de sus extractos etanólicos sobre formas parasitarias de *Trypanosoma cruzi*.
- Sintetizar los datos disponibles de actividad citotóxica de los extractos vegetales de plantas del género *Piper* frente a modelos celulares.
- Determinar la viabilidad del uso de compuestos químicos de plantas del género *Piper* como posible alternativa en la terapia contra la enfermedad de Chagas.

1. Antecedentes

Actualmente se han publicado varias investigaciones con diferentes familias de plantas, las cuales han sido propuestas como alternativa a los tratamientos actuales contra la enfermedad de Chagas y otras patologías parasitarias. Los objetivos planteados en esos estudios se han enfocado en buscar los metabolitos secundarios que puedan tener efecto directo contra parásitos como el *Trypanosoma cruzi*. Neira y colaboradores (2014) lograron demostrar que aceites esenciales (AE) de la familia de plantas *Euphorbiaceae*, tienen la actividad antiparasitaria en cultivos de *Leishmania panamensis* y *Leishmania braziliensis*, así como también con amastigotos de *Trypanosoma cruzi*, y con poca actividad citotóxica en cultivos de células Vero teniendo como controles positivos el Nifurtimox (13).

Rojas y colaboradores (2010), a través de un estudio en donde se tuvo en cuenta aceites esenciales de 10 plantas de uso medicinal, realizaron una evaluación *in vitro* de las capacidades de estos extractos para determinar la actividad antiparasitaria, usando epimastigotos de *Trypanosoma cruzi*, así como también analizaron la capacidad de estos compuestos de generar citotoxicidad en células mamíferas Raw 264,7. En este trabajo determinaron que *Cymbopogon citratus* y *Aloysia triphylla* fueron las plantas cuyos aceites esenciales inhibieron en mayor cantidad el crecimiento de epimastigotos,

presentando IC₅₀ de 63,09 y 96,49 µg/mL, respectivamente y no evidenciaron citotoxicidad contra las células Raw 264,7 (14).

Por otro lado, en el estudio planteado por Calderón y sus colaboradores (2010) se realizó un análisis extenso de un gran número de plantas que se pueden encontrar en Latinoamérica y se hizo la evaluación de 452 extractos de 311 especies de plantas, analizando su actividad antiparasitaria *in vitro*, usando tres géneros de protozoarios, *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma*. Para la determinación de una concentración ideal a la que los extractos generaran la respuesta esperada, se realizó el cálculo del IC₅₀ el cuál debía ser igual o menor de 10µg/m, valor que genera el Benzonidazol, el cual es el medicamento que se espera reemplazar. *Acnistus arborescens*, *Scoparia dulcis*, *Maianthemum paludicola*, *Chromolaena leivensis*, *Annona muricata*, *Argemone subfusiformis*, *Caesalpinia paraguariensis*, *Piper barbatum* y *Piper holtonii* fueron las 9 plantas que cumplieron con este objetivo, ya sea en extractos etanólicos o metanólicos; según informan los investigadores (15), las plantas del género *Piper* son comúnmente usadas en el área colombiana para tratar la Malaria, además de que los estudios revelan que entre los metabolitos encontrados en estas plantas existen Cromenos, sustancias químicas orgánicas con capacidad antiparasitaria que ha sido demostrada *in vitro*.

En São Paulo, Brasil, Passerini (2008) realizó un estudio en donde evaluó la actividad de diversos extractos, fracciones, sustancias puras y también semisintéticas obtenidas a partir de múltiples especies de la familia *Piperaceae* para determinar su capacidad tripanocida contra epimastigotos de *Trypanosoma cruzi*. El objetivo de este trabajo fue evidenciar cuál de las diferentes sustancias podía tener un mejor efecto contra el parásito, además de realizar los cálculos del IC₅₀ de cada sustancia y evidenciar posibles cambios morfológicos que se puedan generar en los protozoarios. Passerini evidenció que, en los extractos analizados, se encontraban metabolitos con alta capacidad tripanocida como lo son los cromenos y las amidas, siendo este último un metabolito que actuaba en sinergia aparente con la piplartina, sustancia química que demostró tener un Índice de selectividad apropiado que permitió a los investigadores

intuir que podría tomarse en cuenta como terapia alternativa para la enfermedad de Chagas (16). Se evidenció en el estudio que los metabolitos presentes en los extractos y fracciones generaron daños en las membranas y en las mitocondrias de los epimastigotos, pero no fue posible determinar una correlación entre ambos casos, ya que la citotoxicidad no fue directamente proporcional a los cambios morfológicos de los parásitos.

Flores y colaboradores (2009) realizaron un estudio en donde analizaron el comportamiento antiparasitario de metabolitos obtenidos en extractos de hojas de *Piper heterophyllum* y *Piper aduncum*, los parásitos contra los que realizaron los ensayos de citotoxicidad fueron *Leishmania spp*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium flaciparum*. De las diferentes fracciones estudiadas, la mejor actividad antiparasitaria encontrada fue contra *Leishmania braziliensis* con un IC_{50} de 6.5 $\mu\text{g/ml}$ en la fracción “3-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl)-4-methoxy-benzoic acid”, pero cabe resaltar la actividad tripanocida que obtuvo la fracción “4-hydroxy-3-(3-methyl-1-oxo-2-butenyl)-5-(3-methyl-2-butenyl) benzoic acid” puesto que presentó un aceptable IC_{50} de 16.5 $\mu\text{g/ml}$ contra *Trypanosoma cruzi* (17).

En Brasil, Luize y colaboradores (2005) evaluaron la capacidad de extractos crudos de diversas plantas medicinales de su región para alterar el crecimiento de *Leishmania amazonensis* y *Trypanosoma cruzi*, además de esto evaluaron la capacidad de estos mismos extractos para causar lisis en glóbulos rojos de ovejas. En los resultados obtenidos para este estudio, se logró demostrar que el extracto de hojas de *Piper regnellii* inhibió el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en un 89.7% aproximadamente y adicionalmente este extracto no realizó lisis de los glóbulos rojos incluso después de una hora de incubación a diferentes concentraciones (18).

Regasini y su grupo de trabajo (2009) realizaron la evaluación *in vitro* de la actividad tripanocida que poseían diversos extractos crudos y fracciones de *Piper arboreum* y *Piper tuberculatum*, determinando el IC_{50} de cada extracto y haciendo uso de diversas partes de las plantas, tanto frutos, como hojas y tallos. Sus resultados fueron

satisfactorios, puesto que las fracciones de hexánicas de las hojas obtuvieron una citotoxicidad cuantificable en IC_{50} de 13.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Piper arboreum* y 17.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Piper tuberculatum* (19).

Esperandim y colaboradores (2013), por otra parte, decidieron realizar un estudio *in vivo* de las propiedades terapéuticas de lignanos obtenidos de extractos de *Piper cubeba*, en un caso de infección aguda de enfermedad de Chagas, para ser más precisos, los lignanos analizados fueron la Cubebina y la Hinokinina. (sustancia parcialmente sintética homologa a la cubebina). En este estudio la población infectada fueron 30 ratones, divididos en seis grupos, a los cuales se les suministraron las dosis diarias de estos lignanos y se logró determinar que a una concentración de 20 mg/kg la parasitemia se disminuyó en un 70,8% aproximadamente. Cabe resaltar, de igual manera que ambos compuestos químicos no presentaron citotoxicidad, pues en experimentos *in vitro* realizados anteriormente por los autores del trabajo, se determinó que el valor de CC_{50} para las sustancias fue de 328.2 μM para la Cubebina y 318.4 μM para la Hinokinina en un ensayo de MTT en células LLCMK2 (20).

En Maringá, Brasil, Veiga y colaboradores (2013) realizaron la evaluación de la capacidad de los compuestos Piperovatina y Piperlonguminina para producir muerte celular de *Trypanosoma cruzi*, además de establecer si estos metabolitos eran citotóxicos contra células LLCMK2. Estos metabolitos fueron obtenidos a partir de los extractos etanólicos de *Piper ovatum* y demostraron tener un IC_{50} de 41.5 ± 0.7 para Piperovatina y 53.8 ± 6.2 μM para Poperlonguminina en el cultivo de *Trypanosoma cruzi*, además de presentar baja toxicidad en las células LLCMK2 ya que su CC_{50} es demasiado elevado, de 332.0 ± 2.2 y 303.1 ± 4.6 μM respectivamente, sugiriendo de esta forma que estos compuestos tienen gran potencial como posible terapia alternativa (21).

Pelizzaro-Rocha y sus colaboradores (2011) decidieron evaluar la capacidad tripanocida de un neolignano de *Piper regnellii* llamado Eupomatenoide-5, teniendo en cuenta si este metabolito era capaz de generar disfunción mitocondrial y daño oxidativo

en los parásitos causantes de la enfermedad de Chagas. Ellos observaron que la estructura celular de los parásitos se veía afectada por la presencia del metabolito vegetal, ya que por medio de microscopía electrónica se evidenciaban los daños descritos. También evidenciaron que el número de células viables se afectaba obteniendo un valor de IC_{50} de 40.5 μ M, valor aceptable para el metabolito teniendo en cuenta que en el ensayo realizado contra células LLCMK2 el valor de CC_{50} era de 122.45 μ M, evidenciando que la concentración necesaria para generar toxicidad en los parásitos es inferior a la requerida para afectar células de mamíferos (22).

En Bolivia, Flores y colaboradores (2008) realizaron un estudio en donde evaluaron la capacidad antiparasitaria de derivados del ácido benzoico encontrados en los extractos etanólicos de *Piper glabratum* y *Piper acutifolium*, este análisis se estructuró de forma que se evaluaron los diversos metabolitos obtenidos en contra de los parásitos causantes de la malaria, la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. De los metabolitos evaluados, los que se denominaron “methyl 3,4-dihydroxy-5-(2-hydroxy-3-methylbutenyl) benzoate” “methyl 4-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl) benzoate” y el “methyl 3,4-dihydroxy-5-(3-methyl-2-butenyl) benzoato” mostraron una actividad tripanocida satisfactoria, con valores de IC_{50} en los rangos de 16,4 a 15,6, y 18,5 μ g/mL, respectivamente, demostrando su potencial como metabolitos a estudiar por su actividad citotóxica contra *Trypanosoma cruzi* (23).

Luize y colaboradores (2006) evaluaron la capacidad tripanocida del Eupomatenoide-5 en cultivos de *Trypanosoma cruzi*, sin presentar citotoxicidad en células LLCMK2, esto debido a que este compuesto ha demostrado tener efectos contra protozoos en anteriores estudios. El Eupomatenoide-5 es un metabolito obtenido a partir de extractos etanólicos de *Piper regnellii* con características fitoquímicas de neolignano. Para el caso de este estudio, se logró determinar una citotoxicidad que reducía la población parasitaria a un 50% a una concentración de 7,0 μ g/mL sin presentar daños a las

células LLCMK2, por lo que se determina que este metabolito es de interés terapéutico en la enfermedad de Chagas (24).

En un segundo estudio realizado por Luize y colaboradores (2006), se aislaron metabolitos secundarios a partir de extractos etanólicos de *Piper regnellii* variante *pallescens* y se realizó un análisis cuantitativo de la actividad tripanocida ofrecida por estos metabolitos contra *Trypanosoma cruzi*, además de evaluar la capacidad de estos metabolitos para lisar células sanguíneas de ovejas y su capacidad citotóxica contra cultivos de células Vero. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, pues se determinó que los compuestos Eupomatenoide-5, Eupomatenoide-6 y Conocarpano presentaron citotoxicidad contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a concentraciones inhibitorias (IC_{50}) de 7,0, 7,5 y 8,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (25). Estos resultados junto al bajo porcentaje de lisis y a la baja toxicidad presentada en cultivos de células Vero, indican que estos metabolitos pueden ser prometedores ya que presentan valores más satisfactorios que incluso los obtenidos por el Benzonidazol, que es el tratamiento farmacológico a elección para la enfermedad de Chagas.

En Perú, Avalos y colaboradores (2016) realizaron un estudio para determinar la capacidad de extractos etanólicos de *Piper aduncum* de generar inmovilidad y, por ende, afectar la supervivencia de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Para esta investigación emplearon tres concentraciones diferentes: 0,5 mg/mL, 0,96 mg/mL y 1,90 mg/mL, las cuales ocasionaron diferentes porcentajes de supervivencia de los tripomastigotes, sin embargo, en la concentración de 0,96 mg/mL se presentó un efecto inhibitorio del 50% en la supervivencia, por lo que es válido identificar esta concentración como el IC_{50} de este estudio (26).

Gomes y colaboradores (2014) realizaron un análisis del efecto antiparasitario de extractos y fracciones provenientes de hojas de *Piper arboreum*, estos efectos se evaluaron contra cepas de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*, además de realizar el experimento en fibroblastos (NCTC929) para comprobar la toxicidad de estos compuestos en células de mamíferos. En los resultados se encontró actividad

tripanocida en los extractos crudos y las fracciones, en especial la fracción hexánica, ya que presentó un porcentaje de muerte contra *T. cruzi* y *L. brasiliensis* del 62 y el 100% respectivamente a una concentración de 500 µg/mL. (27).

En Brasil, Mazzeu (2014) realizó un trabajo en el cual evaluó diversos aspectos, tanto químicos, como biológicos y biosintéticos de la planta *Piper fuliginum*. Para cumplir con este objetivo, el proyecto se enfocó en obtener fracciones y metabolitos secundarios de esta planta a partir de extractos crudos, entre los cuales se encuentran los extractos etanólicos. Después del estudio fitoquímico de estos componentes, se evaluaron sus capacidades antifúngicas frente a diversas especies del género *Candida*, sus capacidades antivirales contra el virus de la Hepatitis C y su actividad tripanocida contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Para el caso del extracto etanólico crudo la concentración inhibitoria 50 fue de 26,67mg/mL, mientras que las fracciones hexánicas y clorofórmicas demostraron que a una concentración de 50 mg/mL generaban una inhibición del crecimiento del parásito en un 34 y 52% respectivamente (28).

En Maringá, Brasil, Barbieri y colaboradores (2002) realizaron un estudio con el objetivo de evaluar los efectos que presentaban extractos crudos y aceites esenciales de plantas usadas en la medicina tradicional de ese país, en cultivos de *Herpetomonas samuelpeessoai*, que es un protozoo trypanosomátido no patógeno usado en investigación como modelo biológico debido a que es bastante similar a *Trypanosoma cruzi* incluso presentando antígenos similares. En total, se evaluaron 15 plantas medicinales en este estudio, entre las cuales se encuentra *Piper regnellii*, de las cuales se realizaron extractos etanólicos con una concentración efectiva de 1000 µg/mL cada una. Para analizar el efecto de estos extractos, se realizó un ensayo para la determinación de la inhibición del crecimiento, en donde el extracto de *Piper regnellii* logró una inhibición del 99.5%; desafortunadamente para el segundo ensayo, en el cual se evaluó la capacidad de los extractos de alterar el ciclo de vida del parásito, los datos obtenidos para *P. regnellii* no pudieron ser analizados por la coloración que se presentó al final del experimento (29).

Con ayuda de los diversos estudios *in vitro* realizados con plantas del género *Piper*, Mgbeahuruike y colaboradores (2017) determinaron diversos compuestos orgánicos que poseen las plantas de este género y así lograron analizar la razón por la cual estas plantas tienen actividades anticancerígenas, antitumorales, y antibióticas, entre otras. Al momento de realizar el análisis fitoquímico, encontraron una larga lista de compuestos bioactivos, entre los que se encuentran amidas, alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, glucósidos, terpenoides y compuestos fenólicos; sin embargo para el caso de la actividad tripanocida, ellos resaltan la función de los derivados del ácido benzoico como posibles metabolitos que deben ser estudiados en más detalle para su posible uso terapéutico en la enfermedad de Chagas (30).

2. Marco teórico

2.1 Agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un protista perteneciente al orden *Kinetoplastida*, al phylum *Sarcomastigophora*, al subphylum *Mastigophora* y a la familia *Trypanosomatidae*. Este microorganismo se clasifica entre los protozoos flagelados que contienen kinetoplasto, el cual es un organelo que contiene ADN y que se encuentra localizado en la

membrana de la mitocondria. Este ADN mitocondrial recibe el nombre de ADN kinetoplastídico (kDNA), se establece que representa aproximadamente un 20% del ADN total del protozoo y contiene características únicas, se encuentra formado por los denominados minicírculos (1.4 kpb) y maxicírculos (20 kpb) de ADN encadenado que forma una red compacta y compleja. Para su correcto desarrollo, requiere de un ciclo de vida dividido en dos partes, el ciclo que se desarrolla en su insecto vector y el ciclo que se presenta en el ser humano. Se habla de que el estadio infectivo, el tripomastigote, tiene lugar en el tracto digestivo del vector y este insecto procederá a infectar a los hospederos a través de sus heces, las cuales también podrán contaminar alimentos y/o bebidas (31).

La diversidad genética presentada por este parásito les ha otorgado a las entidades científicas la capacidad de crear seis grupos denominados Unidades Discretas de Tipificación (DTU, por sus siglas en ingles) que se han nombrado desde el TcI al TcVI, esta clasificación tiene relevancia en el estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas, ya que permite establecer la distribución geográfica de estos genotipos del parásito, además de revelar su tropismo celular y, por ende, el tipo de enfermedad que causará en su hospedero. Para el caso del territorio colombiano, el linaje TcI será el de mayor prevalencia y se podrá encontrar tanto en los ciclos selváticos, como en los ciclos domésticos que presenta este protozoo (32).

(ver anexo 2, Figura 1)

2.1.1 Morfología

Los estudios indican que, en un principio, el parásito tuvo su desarrollo en las áreas silvestres del continente americano, pero gracias a los fenómenos de adaptación pudo evolucionar y desarrollar su ciclo infectivo. Gracias a su ciclo de vida, el *Trypanosoma cruzi* posee tres aspectos morfológicos fundamentales, los cuales podrán ser observados en sus diversos hospederos y adicionalmente, también en diversos medios de cultivos. Los tres estadios fundamentales descritos son amastigote, epimastigote y tripomastigote (33).

- a) **Amastigote.** Su aspecto es esférico, carece del flagelo característico del parásito, su diámetro es de aproximadamente 2-5 μm , su núcleo es redondo y se observa su kinetoplasto en forma de barra. El amastigote es intracelular, es decir, que se encuentra exclusivamente dentro de las células del mamífero que fue infectado por el parásito, y es aquí donde se multiplicará. En un principio, infectará células del sistema fagocítico mononuclear, pero posteriormente se podrá encontrar en células musculares del sistema cardiaco y/o digestivo.
- b) **Epimastigote.** Este estadio tiene una forma alargada, mide 10-15 μm de largo y 1-3 μm de ancho, el núcleo es ligeramente ovalado y su kinetoplasto se encuentra al lado opuesto de su contraparte, el tripomastigote. Posee igualmente flagelo cuya membrana ondulante es más corta. Esta es la forma que se encuentra en el intestino del vector y se conoce como el estadio de multiplicación de este.
- c) **Tripomastigote.** De aspecto fusiforme, se describe como un protozoo de 16-20 μm de largo y 2-4 μm de ancho. Su núcleo es ovalado el cual se ubica en la parte media de la célula, posterior a este núcleo se encuentra el kinetoplasto, es en este organelo donde se origina el flagelo que recorre la parte externa de la célula, asemejando una membrana ondulante, rasgo característico de esta forma del parásito, exteriorizándose en la parte anterior. Este estadio se puede clasificar de acuerdo con el lugar donde se encuentre, en el caso de encontrarse en el contenido rectal del vector se denomina tripomastigote metacíclico y en el caso de presentarse en la sangre de los mamíferos infectados, será tripomastigote sanguíneo. (ver anexo 2, Figura 2)

2.1.2 Ciclo de vida

El ciclo biológico que posee el *Trypanosoma cruzi* se encuentra distribuido en dos fases, la que toma lugar en el invertebrado transmisor (insecto vector) y la que ocurre en el hospedador vertebrado.

2.1.2.1 Ciclo de vida en el insecto

En el vector, el ciclo de vida del parásito tiene lugar en el sistema digestivo del insecto, en su intestino, donde se presenta la morfología de epimastigote, estadio reproductivo del parásito en el vector. Una vez el parásito adquiere su madurez necesaria, se transforma en el tripomastigote metacíclico, este estadio es la forma infectiva para los animales vertebrados, incluyendo al hombre; el parásito se encontrará en el exterior cuando el vector deposite sus heces al momento de alimentarse de sangre del futuro hospedero.

El método más común de transmisión de la tripanosomiosis es por contaminación con heces que contengan tripomastigotes metacíclicos en una herida, que puede ser ocasionada por el insecto transmisor. Los artrópodos transmisores regularmente al picar a su huésped defecan en las proximidades de la picadura, provocando que, al momento de ocasionarse un rascado después de la picadura, los parásitos penetren por la herida.

2.1.2.2 Ciclo de vida en el ser humano

La segunda fase del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* continúa una vez que el tripomastigote ingresa al hospedador vertebrado por vía sanguínea, posteriormente, en el momento en que se encuentre en el sistema reticuloendotelial y en los tejidos, podrá encontrarse el cambio a la forma de amastigote, donde se reproduce por fisión binaria. Una vez el parásito ha llegado a la madurez, será liberado al torrente sanguíneo, en el estadio de tripomastigote sanguíneo, forma que luego podrá ser ingerida por un insecto vector sano, para continuar de nuevo con el ciclo (35,36). (ver anexo 2, Figura 3)

2.1.3 Vectores

Trypanosoma cruzi es transmitido a los huéspedes mamíferos, incluyendo los seres humanos, principalmente por el contacto con heces contaminadas de los insectos hematófagos que pertenecen a la subfamilia Triatominae. Estos insectos son coloquialmente conocidos como “pitos” o “chinchas” en el territorio colombiano, su

tiempo de vida es de un promedio de 15 meses, tiene una longitud de aproximadamente 2-3 cm de largo y en cuanto a morfología, se encuentra que su cuerpo está dividido en tres regiones: cabeza, tórax y abdomen. Este artrópodo se puede infectar por el parásito al picar a un reservorio que haya sido infectado previamente, son de hábitos nocturnos, y reciben su nombre teniendo en cuenta la región geográfica donde puedan encontrarse. Alrededor del mundo se han descrito cerca de 151 especies de triatomíneos, en Colombia se tiene registro de la presencia de 26 de estas especies, de las cuales se han encontrado que 16 pueden estar infectados con el parásito (37,38).

La literatura establece que los principales vectores en el territorio colombiano son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma venosa*, *Triatoma dimidiata* y *Panstrongylus geniculatus*, teniendo en cuenta su distribución a lo largo de las zonas rurales, silvestres y urbanas (39,40). Se ha logrado establecer que estos insectos tienen mayor presencia en zonas rurales y comúnmente se suele asociar su presencia con condiciones propias de municipios con bajos niveles socio económicos.

(ver anexo 2, Figura 4)

2.1.4 Formas de transmisión

2.1.4.1 Transmisión vectorial

Es la principal vía de transmisión del parásito en zonas que se consideren endémicas, esta forma de infección se presenta cuando existe contaminación de piel y mucosas con heces contaminadas con tripomastigotes que son excretadas por los triatomíneos al momento de picar a un vertebrado. cuando el individuo se rasca por la comezón causada por la picadura, estas heces contaminadas procederán a penetrar en el organismo por autoinoculación (41). Los tripomastigotes tienen la capacidad de ingresar por diferentes vías al cuerpo, la principal son las heridas en la piel ocasionada por el rascado, pero también se ha presentado al infectar conjuntivas oculares u otras mucosas.

2.1.4.2 Transmisión oral

Esta vía de transmisión se genera por diferentes causas, entre ellas encontramos: el consumo de alimentos o bebidas que han sido contaminados con heces del vector infectado, por consumo de alimentos que inadvertidamente se hayan contaminado con insectos vectores triturados y por contaminación de los utensilios empleados para la elaboración de diversos alimentos, ya sea con cadáveres de mamíferos infectados o por contacto con secreciones anales de marsupiales infectados (42).

Entre los alimentos que se han podido asociar con este tipo de transmisión, podemos destacar en Colombia el jugo de caña y de frutas como la naranja, la guayaba y el açai; comidas caseras como lo son las sopas, los caldos, la leche, el agua y carne de caza.

El periodo de incubación del parásito por transmisión oral, se ha establecido que ocurre de 3 a 22 días. (ver anexo 2, Figura 5)

2.1.4.3 Transmisión transfusional

Las transfusiones constituyen la segunda causa más frecuente de transmisión de la enfermedad de Chagas, después de la transmisión vectorial, pero presentan mayor frecuencia que la transmisión de forma vertical. Esta infección se da lugar por la presencia de tripomastigotes vivos y con capacidad infectiva en la sangre de donantes que provengan de zonas endémicas. Se ha descrito que el aumento de esta vía de transmisión principalmente se ha derivado del incremento del flujo migratorio de zonas rurales a zonas urbanas (43).

Para la transmisión por transfusiones o trasplantes, se ha establecido que el periodo de incubación del parásito ocurre de 30 a 40 días.

2.1.4.4 Transmisión vertical

La transmisión materno-fetal se ha descrito como el paso del parásito a través de la placenta hacia el feto. Esta vía de transmisión se presenta con gran porcentaje en zonas no endémicas y se puede producir en cualquier fase de la enfermedad, aunque existe predilección por la fase aguda de la infección.

En muchos casos se asume que la transmisión de la enfermedad de Chagas por vía congénita en fase crónica puede resultar mortal para el feto y puede generar partos a pretérmino, placentitis o incluso el aborto. Es de vital importancia realizar una detección por diagnóstico y un tratamiento precoz de la infección congénita, ya que esto puede suponer la curación de la mayoría de los casos (44,45).

Para el caso de la transmisión vertical se ha logrado determinar que el periodo de incubación del parásito transcurre entre el cuarto o noveno mes de embarazo.

2.1.4.5 Transmisión por accidente de laboratorio

Este método de transmisión suele estar asociado a un factor accidental, como lo puede ser la punción u otro tipo de contacto con material contaminado con formas infectivas del parásito. También en laboratorios de investigación se puede generar la transmisión por medio de contaminación con triatomíneos infectados que sean estudiados o con cultivos celulares que contengan tripomastigotos infecciosos.

2.2 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también reportada en la literatura como tripanosomiasis americana, es una infección causada por el hemoparásito protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, quien es transmitido esencialmente por insectos hematófagos y cuya incidencia se encuentra principalmente en América latina, es clasificada como una enfermedad olvidada, rechazada o desatendida ya que, los estudios de su prevalencia únicamente son regionales, e incluso se ha llegado a considerar que existen cifras importantes de subdiagnóstico, razón por la cual no se permite conocer su verdadero impacto.

Esta enfermedad recibe su nombre por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, quien describió por primera vez esta patología en el año 1909 (46), pero diferentes estudios han logrado demostrar que este parásito lleva miles de años

infectando personas en el continente, ya que en momias chilenas del período 4000 a. de C. al 1400 d. de C. se encontró la presencia del *Trypanosoma cruzi*. (47)

Esta patología puede pasar desapercibida en un gran porcentaje de los pacientes, pero otras personas podrán desarrollar algunos síntomas agudos; para la mayoría de los casos, esta fase aguda termina de forma espontánea y sin causar mayores complicaciones. Por otro lado, existe la probabilidad de desarrollar una fase crónica, la cual tiene lugar alrededor de 10 a 20 años después del primer contacto con el parásito, esta fase suele estar asociada a un daño irreversible al corazón y al sistema digestivo humano, especialmente en el esófago y el colon, acompañado de trastornos de la conducción nerviosa en los órganos anteriormente descritos (48), lo que conduce irremediablemente a una pérdida anual de aproximadamente 670.000 años de vida productiva ajustados por discapacidad (conocidos como DALY's, por sus siglas en inglés), por lo que, a pesar de ser considerada una enfermedad olvidada, se convierte en una de las enfermedades parasitarias con mayor impacto en los sistemas de salud y seguridad social latinoamericanos.

2.2.1 Manifestaciones clínicas

Para la enfermedad de Chagas se encuentran diferentes clasificaciones de sus manifestaciones clínicas, cada una con criterios tanto patológicos, diagnósticos y terapéuticos que difieren entre ellos. Para el correcto diagnóstico de la enfermedad y un inicio temprano del tratamiento, es de vital importancia tener en cuenta cuál es la clasificación que le corresponde al paciente.

La primera clasificación de la enfermedad va a tener en cuenta los síntomas que presenta el infectado junto con el tiempo que ha transcurrido desde la primo infección, es aquí donde se determina entonces si la enfermedad se encuentra en fase aguda o fase crónica.

Por otro lado, en la denominada fase crónica se debe tener en cuenta si la enfermedad se encuentra o no afectando algún órgano y de ser así, cual es el sistema que se

encuentra afectado. Esto nos permite clasificar la patología en forma indeterminada, cardíaca y digestiva (49).

2.2.1.1 Fase aguda

Esta fase inicia una vez que el tripomastigote ingresa en el cuerpo del hospedero, el parásito comienza su replicación en las células fagocíticas y posteriormente se diseminará al torrente sanguíneo. Comúnmente se describe la falta de sintomatología presente en esta etapa, pero en el caso contrario, los síntomas tienen una duración de 6 a 8 semanas. Existe la posibilidad de desarrollar una reacción local en el sitio de entrada del parásito, conocido como chagoma de inoculación o signo de Romaña si la inoculación se presenta por vía ocular. Estos síntomas visibles pueden ser acompañados por síndrome febril prolongado y constante, adenopatías, anemia, dolor óseo y muscular, pérdida de apetito, vómito o diarrea (50).

2.2.1.2 Fase crónica

Al día de hoy, aún existen interrogantes sobre la patogenia propia de la enfermedad de Chagas crónica, pero de todas formas se ha logrado establecer que factores como lo son la persistencia del parásito, su clasificación en DTU y un proceso de disfunción a nivel del sistema inmunitario tienen protagonismo en el proceso del daño tisular propio de esta fase de la patología. Se ha definido a esta fase como la consecuencia a largo plazo del curso de la enfermedad, en la cual el parásito procede a presentar tropismo hacia ciertos tejidos, causando daños irreparables y de difícil tratamiento. Uno de los síntomas más característicos se denomina la cardiomiopatía Chagásica, que se evidencia en el paciente por la aparición de alteraciones electrocardiográficas y también por manifestaciones clínicas que involucran disnea, síncope, eventos cerebrovasculares o incluso pueden llegar a un paro cardíaco; en los casos de pacientes con afecciones procedentes de la fase crónica de la enfermedad. El tratamiento suele estar enfocado a la resolución de los síntomas presentados, un ejemplo claro se puede demostrar ya que a muchos de estos casos se les sugiere la implantación permanente de marcapasos o incluso se les recomienda un trasplante cardíaco (51).

(ver anexo 3 para manifestaciones clínicas adicionales)

2.2.2 Epidemiología

Se ha estimado que la enfermedad de Chagas afecta a cerca de 16 -18 millones personas alrededor del mundo, según cifras presentadas por la Organización Mundial de la Salud (1) también se sospecha que cerca de 100 millones de personas se encuentran en riesgo de presentar la infección por encontrarse viviendo mayormente en zonas endémicas o áreas con factores ecológicos o económicos compatibles con esta infección. Por otro lado, en países no endémicos existe también un riesgo de contagio que va a radicar principalmente en la migración de personas que provienen de zonas endémicas.

Esta patología es endémica en 21 países de Latinoamérica, distribuyéndose su hábitat desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina. Debido al desarrollo de la enfermedad de Chagas en fase crónica que se produce en un aproximado del 30-40% de los casos, se estima que cada año mueren de 10.000 a 12.000 personas por esta enfermedad. (54).

Colombia, siendo un país latinoamericano cuya ubicación geográfica le permite poseer zonas tropicales y rurales compatibles con la presencia del vector, además de tener problemáticas sociales y económicos se considera una región endémica para la enfermedad de Chagas, se estima que en este país se ven afectadas más de 437.000 personas, siendo el municipio del Casanare el mayor afectado por sus características eco-epidemiológicas que favorecen su transmisión (55). El Sistema de Vigilancia en Salud Pública en Colombia, en su boletín de la semana epidemiológica 33, expone que, tan solo en el periodo que abarca desde el 2012 al 2019 se confirmaron 248 nuevos casos de Chagas agudo, entre los cuales un 40,3% de estos fueron ocasionados por brotes de transmisión oral (3). (ver anexo 2, Figura 6)

2.2.3 Métodos de diagnóstico

Conforme han avanzado las técnicas de diagnóstico para enfermedades parasitarias, se han descubierto e implementado diversos métodos para diagnosticar la enfermedad

de Chagas. Actualmente se hace uso de más de una metodología, puesto que dependiendo de la fase en la que se encuentre la patología y en algunos casos, dependiendo también del tipo de paciente, existen protocolos que tienen la posibilidad de ser más útiles (57). (ver anexo 2, Figura 7)

(ver anexo 4 para métodos de diagnóstico de enfermedad de Chagas)

2.2.4 Tratamiento para la enfermedad de Chagas

La Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud tienen establecido que el tratamiento aprobado para la enfermedad de Chagas es farmacológico y consiste en el uso de dos drogas, el Nifurtimox (un 5-nitrofurano) y el Benzonidazol (un nitroimidazol), el método de acción de estas sustancias químicas radica en activar las enzimas conocidas como nitroreductasas, las cuales generan efectos citotóxicos que llevan a la muerte del parásito. (59) Aunque estos fármacos posean propiedades químicas antiparasitarias comprobadas, su eficacia provoca que su uso sea recomendado en la etapa aguda, por lo que el objetivo de esta terapia farmacológica es evitar la progresión a la etapa crónica, ya que las drogas de elección se encuentran muchas veces limitadas en esta fase de la infección. (60,61)

También, con el paso de los años se ha determinado que la seguridad y eficacia de ambos fármacos distan mucho de ser ideales, ya que se ha identificado que pueden inducir efectos mutagénicos, genotóxicos y cancerígenos. Actualmente el benzonidazol es el único fármaco que se encuentra aprobado en la mayoría de los países endémicos de América latina, esto se debe a que el nifurtimox fue retirado del mercado en muchos países por orden de la Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos debido a que se detectó que sus efectos secundarios eran demasiados y aún existía una gran incertidumbre con respecto a su efectividad. Esto sumado a que se requieren largos períodos de tiempo para cumplir con el tratamiento de los pacientes, se requiere un extenso seguimiento de cada uno de los casos y que se ha evidenciado que existen cepas de *Trypanosoma cruzi* que han desarrollado resistencia natural a estos fármacos

(62) ha generado inconformidades y la necesidad de buscar terapias alternativas o que fortalezcan las carencias de este tratamiento.

2.2.5 Control y prevención

Teniendo en cuenta que, en la actualidad, no se encuentra disponible ninguna vacuna para la enfermedad de Chagas, el método de prevención a elección para la transmisión vectorial en Latinoamérica es el control directo del vector.

Las recomendaciones sugeridas por parte de la Organización Mundial de la Salud toman en cuenta las diversas vías de transmisión que tiene la enfermedad de Chagas, ya que dependiendo del nivel de riesgo de contagio y cuál forma de transmisión es más común en la región, se deberá evaluar qué medida de control y prevención es más precisa

Para el caso de regiones donde se presente mayor riesgo de contagio vectorial, se sugieren campañas de fumigación con insecticidas en las viviendas y áreas que se encuentren cerca de los domicilios, para controlar la población del hematófago vector. El mejoramiento de la infraestructura de las viviendas se ha sugerido para poder prevenir la infestación por el vector, ya que se ha establecido que este artrópodo posee preferencia por zonas de escasos recursos económicos para su hábitat. Otra medida preventiva más enfocada al cuidado personal es sugerir el uso de toldillos, ya que se conoce la actividad nocturna que presenta el insecto vector.

En regiones cuyos riesgos de infección estén enfocados al contagio por vía oral se recomienda el uso de las buenas prácticas de higiene tanto para la preparación como para el transporte, almacenamiento y consumo de los alimentos y bebidas a los que tienen acceso las personas.

Tanto en países endémicos como en países no endémicos, se ha determinado la necesidad de realizar un tamizaje de los donantes para transfusiones y trasplantes de órganos, así como también se recomienda realizar pruebas de los órganos, tejidos o células, tanto por parte de los donantes como también de los receptores.

Para el caso de la enfermedad de Chagas congénita, el tamizaje de los recién nacidos y otros hijos de madres infectadas será clave para poder proveer tanto un correcto diagnóstico como un tratamiento oportuno y temprano.

Por último, las buenas prácticas de laboratorio y el conocimiento de las normas de bioseguridad serán de vital importancia para prevenir los casos de contagios por accidentes de laboratorio, tanto para el personal de salud que trabaja directamente con muestras biológicas en zonas endémicas, como para el personal de laboratorio que trabaja en investigación con este parásito. (63)

2.3 Género de plantas *Piper*

Las plantas que conforman este género pertenecen al reino *Plantae*, del filo *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida* y a la familia *Piperaceae*, con respecto a su morfología se pueden definir como arbustos, como enredaderas, como hierbas o en ocasiones también con características de árboles, sin embargo, en cuanto a su tamaño suelen tener alturas menores a 2 metros. Presentan en su tronco una madera suave y en la mayoría de las especies presentan nudos, engrosados y prominentes; poseen hojas simples cuya nerviación es generalmente ascendente, estas hojas son alternas con la base de los pecíolos (Figura 9) envolviendo de esta forma el tallo, estas plantas pueden contar con la presencia o con la ausencia de indumento e inflorescencias dispuestas en amentos. Estas plantas pueden poseer frutos que reciben el nombre de drupa, la cual posee una semilla que puede variar en cuanto a tamaño y en cuanto a forma. (11) (ver anexo 2, Figura 9)

Se ha establecido que su distribución se presenta a lo largo de los trópicos, regiones en donde posee un aproximado de 2500 especies. Colombia, gracias a su ubicación geográfica cuenta con bosques húmedos y tropicales, especialmente localizados a lo largo de la región Andina, esto le permite ser un hábitat ideal para las plantas de este género, identificando al país colombiano como uno de los mayores poseedores de

plantas *Piper* en Latinoamérica. Entre el amplio espectro de especies que posee este género, las que mayor representación en el territorio colombiano se han descrito, son: *Piper aduncum*, *P. artanthe*, *P. asperiusculum*, *P. bogotense*, *P. hispidum*, *P. arboreum*, *P. nigrum*, *P. peltatum*, *P. imperiale* y *P. marginatum* a lo largo y ancho del territorio nacional. (65)

2.3.1 Usos comunes del género *Piper*

Las plantas pertenecientes al género *Piper* han sido utilizadas a lo largo del tiempo por diferentes comunidades latinoamericanas como parte de su medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades, para situaciones adversas que comprometen la salud e incluso a nivel ecológico, a nivel de agricultura o a nivel culinario.

Como parte de la medicina tradicional de América latina, se ha encontrado que infusiones realizadas con plantas de este género se han utilizado para diversas enfermedades parasitarias, tales como la malaria y la leishmaniasis. También se han descrito usos en diversas culturas tanto en América latina como en China, ya que en ambos territorios se han utilizados estas plantas para tratar enfermedades o padecimientos a nivel del sistema respiratorio, las infusiones de raíces y frutos han sido utilizados para tratar el asma, dolores de pecho, la bronquitis y el dolor de abdomen, además se conocen sus beneficios en el uso como agente antiinflamatorio, para tratar condiciones como la diabetes, la gripe, la anemia, el cólera y como estimulante para tratar afecciones hemorroidales (66).

Por otro lado, una gran variedad de especies del género *Piper* han empleadas tradicionalmente en las afecciones que se presentan en el sistema digestivo, ya que comunidades afrodescendientes e indígenas trataban el dolor de estómago y las caries dentales con estas plantas. También se tiene el registro por parte de estas comunidades del uso de infusiones y aplicaciones directas de plantas de este género en forma de pasta como agente cicatrizante, como antiinflamatorios, como analgésicos, antirreumáticos e incluso en el tratamiento contra la picadura de serpientes (67).

Al existir una gran variedad en las especies de estas plantas, se pueden identificar algunas que tienen un uso a nivel culinario ya que algunas como la especie *P. methysticum* son usadas para realizar bebidas refrescantes y relajantes. En culinaria e industria alimenticia, entre las plantas del género *Piper*, se encuentra la fuente principal de la pimienta, cuyo representante más conocido es la especie *Piper nigrum*.

Cabe resaltar que el impacto a nivel ecológico que ofrece este género es relevante para diversas culturas, ya que gracias al uso de sus frutos se provee de alimento tanto a especies de aves como a especies de murciélagos frugívoros (68).

2.3.2 Características químicas del género *Piper*

Las especies del género *Piper* han generado un amplio interés entre los investigadores a nivel mundial, siendo el foco central de diversos estudios fitoquímicos. Gracias a los resultados que se han obtenido se ha permitido identificar al género *Piper* como el que presenta un mayor número de compuestos bioactivos de la familia *Piperáceae*.

Estos estudios fitoquímicos se han realizado con la ayuda de estudiar los compuestos que se han obtenido por medio de los aceites esenciales, las fracciones y los extractos de estas plantas y sus diversas partes.

Entre los resultados que se han obtenido en los estudios de composición química de las especies del género *Piper*, los compuestos más relevantes que se han aislado se observan en la Figura 10. Y entre ellos cabe destacar la presencia de flavonoides, quinonas, lignanos, alcaloides, sustancias derivadas del ácido benzoico, fenilpropanoide, terpenos y amidas; la importancia de estos compuestos encontrados y descritos radica en que se han reportado estudios donde se comprueba que estos metabolitos tienen acción en los modelos celulares estudiados y que, entre los efectos causados, se encuentra actividad antiparasitaria. (ver anexo 2, Figura 10)

Este amplio espectro de posibilidades encontrado en los metabolitos obtenidos de las especies de *Piper* se entiende teniendo en cuenta la disposición de sus moléculas y su naturaleza química. La posición de los grupos hidroxilo de las moléculas juegan un

papel fundamental en estas vías de acción, además de poseer un núcleo aromático, presentar una capacidad de ser solubles en grasas y la presencia de grupos orgánicos como lo son el alquilo y el grupo acetato, son características de vital importancia para otorgarle a los compuestos obtenidos en las diversas especies del género, sus cualidades citotóxicas (69).

La presencia de moléculas que presentan actividad contra parásitos, que pueden ser obtenidas por métodos de extracción en las plantas del género *Piper*, genera la necesidad de estudiar el efecto en parásitos del *Trypanosoma cruzi* para identificar cuales plantas poseen metabolitos secundarios que, posteriormente, se podrán estudiar como posibles terapias alternativas a las que se encuentran actualmente suministradas para la enfermedad de Chagas.

2.4 Extractos etanólicos

Para obtener un extracto etanólico, como su nombre lo indica, es necesario realizar un procedimiento de separación de los compuestos de una planta con la ayuda de etanol al 96% como solvente. El etanol por sus cualidades químicas, es capaz de extraer los metabolitos de las muestras vegetales que previamente han sido maceradas y secadas, posterior a esto, el solvente es evaporado y se obtienen los compuestos deseados (ver anexo 5). La cantidad de compuestos extraídos y las propiedades químicas de estos mismos, dependerán del solvente utilizado en la extracción, por lo que es necesario un estudio previo para conocer las cualidades químicas de los metabolitos que se deseen obtener.

2.5 Ensayos de citotoxicidad

En los modelos de investigación de laboratorio, para poder establecer el efectivo funcionamiento de un tratamiento, es necesario estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de dicho tratamiento, esto con el fin de poder ofrecer un resultado cuantitativo del experimento realizado. Los proyectos de

investigación, como parte de una primera fase experimental, hacen uso de las líneas celulares (70,71), las cuales ofrecen una población de rápido crecimiento y de fácil mantenimiento para poder realizar los estudios pertinentes sin recurrir a la experimentación *in vivo*. Los estudios de citotoxicidad *in vitro* se realizan con el fin de estudiar el comportamiento del tratamiento objeto de estudio sobre líneas celulares, así con ayuda de diferentes métodos de tinción celular se obtendrán resultados cuantificables. Una mayoría de estos estudios son de punto final ya que es imposible seguir el comportamiento de las células después de haber sido sometidas a un tratamiento que en muchos casos puede ser mortal.

- Con el objetivo de realizar una prueba *in vitro* ideal donde se busque evaluar la proliferación celular y/o la citotoxicidad, se deben cumplir con las siguientes características principales:
- La prueba debe ser simple, rápida y eficiente.
- La prueba debe ser económica asegurando que pueda ser reproducible sin que esto genere grandes gastos para el laboratorio.
- La prueba debe ser sensible, segura y efectiva en la medida de la población celular viable.
- Se debe observar que no exista ninguna interferencia con el compuesto que se encuentre bajo evaluación (72).

Para poder evaluar la citotoxicidad *in vitro* de un posible tratamiento. Se disponen actualmente de tres tipos de ensayos. El primero tiene como fundamento el uso de colorantes como lo son el cristal violeta y la sulforrodamina B, estos procederán a colorear residuos celulares posterior a un tiempo de incubación con el compuesto que será evaluado.

Para el caso del segundo tipo de ensayo, se hará uso de una serie de sustancias que captan la liberación de componentes que constituyen la estructura celular, estas sustancias podrán permitir la cuantificación de la actividad de enzimas tales como el lactato deshidrogenasa (LDH).

El tercer tipo de ensayo se fundamenta en cuantificar la función metabólica de las células, esto se realiza haciendo uso de las sales de tetrazolio, las cuales al ser reducidas a formazán producen una intensa coloración cuantificable con técnicas espectrofotométricas, algunas de estas sales de tetrazolio pueden ser: El bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT); (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS) y el (23-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido) (XTT).

2.5.1 Ensayo de Lactato Deshidrogenasa

El lactato deshidrogenasa (LDH), es una enzima que se encuentra en el citoplasma de las células vivas, esta enzima es soluble en agua y suele ser liberada cuando existe muerte celular. En este ensayo citotóxico se evalúa la cantidad de LDH que se libera en los medios de cultivo, pues el fundamento de esta prueba establece que en presencia del sustrato del kit, el cual es el lactato, esta enzima transformará el lactato en piruvato, generando en el proceso nicotinamida y adenina NADH; posteriormente la molécula “WST”, que se encuentra presente en los reactivos de citotoxicidad del kit que se esté empleando, reaccionará y se transformará de WST-1 a la forma de naranja de formazán (ver anexo 6)

El final de la reacción genera un cambio de color que puede ser cuantificado y es directamente proporcional a la cantidad de LDH liberada por las células, es decir que un aumento en la citotoxicidad generará una mayor liberación de LDH al medio y en consecuencia una mayor actividad colorimétrica podrá ser cuantificada (73).

2.5.2 Ensayo de bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Este ensayo citotóxico se encarga de evaluar la actividad metabólica celular remanente luego de hacer uso del tratamiento estudiado. El MTT es un compuesto químico que pertenece a la familia de sales de tetrazolio, es un compuesto soluble en agua y posee un característico color amarillo. Su fundamento se basa en la reacción de reducción que ocurre al entrar en contacto con las deshidrogenasas mitocondriales, esta reacción

provoca que el MTT se convierta en un compuesto de la familia de los formazanos, cuyo color violeta es bastante evidente y adicionalmente es insoluble en agua.

Es necesario hacer uso de un disolvente orgánico como lo es el Dimetilsulfóxido (DMSO) para poder realizar su cuantificación por colorimetría mediante la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 570, en este caso para la interpretación del resultado, se observará que, a mayor actividad metabólica producto del tratamiento administrado a las células, mayor será la formación de formazano y se obtendrá un mayor valor cuantificable (74) (ver anexo 7).

3. Diseño metodológico:

3.1 Método de investigación.

De acuerdo a lo establecido por Artiles en su libro “Metodología de la investigación para las ciencias de la salud” se permite establecer que el método de investigación utilizado en este estudio pertenece a la categoría de Investigación Descriptiva. (75)

3.2 Enfoque de la investigación.

Teniendo en cuenta que en este estudio se realiza un proceso de recolección, análisis y exposición de datos tanto cuantitativos como cualitativos, el enfoque de la investigación es mixto.

3.3 Métodos y procedimientos de la investigación.

De acuerdo a lo recomendado por Arksey y O'Malley (76) en su descripción general para poder diseñar la metodología para un estudio de alcance, se tuvo en cuenta los siguientes procedimientos:

- Identificar la pregunta de investigación
- Identificar los estudios más relevantes
- Seleccionar los estudios por medio de criterios de inclusión y exclusión
- Recopilar, resumir e informar los resultados obtenidos

En la recolección de los estudios y resultados se tuvo en cuenta la búsqueda de trabajos de investigación que evaluaran extractos etanólicos de plantas del género *Piper* y su acción citotóxica contra parásitos de *Trypanosoma cruzi* o parásitos de estructura similar. El informe de los datos se presentó en forma de matriz en donde se compararon dichos extractos tomando en cuenta sus capacidades antiparasitarias.

(Ver anexo 9)

4. Resultados y discusión:

4.1 Extractos etanólicos de plantas del género *Piper* con efecto tripanocida presentes en Colombia.

Con el fin de poder identificar las especies de plantas del género *Piper* cuyos extractos etanólicos hayan sido descritos en la literatura por poseer metabolitos con efectos tripanocidas, se realizó una comparación de diversos estudios en donde se

contemplaron 5 variables que aportarán soluciones a los objetivos descritos, tal como se puede observar en la Tabla 1.

En la bibliografía investigada se encontraron artículos científicos, artículos de revisión y trabajos de grado. La primera variable a destacar fue la especie del género *Piper* que fue descrita en el estudio, ya que es de conocimiento que existen mundialmente alrededor de 2500 especies de estas plantas. En este caso cabe resaltar el protagonismo obtenido por parte de las especies de *Piper regnellii*, *Piper aduncum* y *Piper arboreum* ya que las cualidades antiparasitarias de sus metabolitos en contra de *Trypanosoma cruzi* fueron evidenciadas en más de un estudio.

La segunda variable evaluada en el estudio fue la estructura de la planta que fue empleada para realizar los extractos etanólicos. Esta variable es una de las más relevantes a tener en cuenta al momento de desarrollar un trabajo de investigación con extractos vegetales, ya que, en muchas ocasiones elegir la parte más óptima podrá determinar el éxito del desarrollo de un protocolo. Para el caso de *Piper* se observó que las estructuras más empleadas fueron las hojas (H) las raíces (R) los tallos (T) y los frutos (F) sin embargo, se evidenció que existe una gran predilección por las hojas al momento de realizar los extractos, teniendo en cuenta que, de los 17 experimentos seleccionados, 14 (82,35%) realizaron sus extractos con esta parte vegetal.

Como tercera variable estudiada, se tuvo en cuenta la actividad antiparasitaria que presentaron los extractos y metabolitos analizados por los investigadores. El método más común para cuantificar esta actividad citotóxica *in vitro* es por medio de la determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) que se define como la concentración necesaria de un compuesto para disminuir el crecimiento de una población a la mitad; sin embargo, se puede observar que, con relación a las concentraciones, no todos los investigadores reportan sus resultados con la misma nomenclatura. Cabe resaltar también que en 3 de los experimentos no se determinó el resultado en términos de IC₅₀, Luize (18) y Gomes (27) reportaron que en sus estudios analizaron la afectación a la supervivencia en sus cultivos de parásitos con

concentraciones previamente establecidas; en el caso de Luize su extracto a 100 mg/ml redujo la supervivencia de su población en un 89.7%, mientras que, en el caso de Gomes, su concentración estudiada fue 500 µg /mL y la población se redujo un 69%. En el caso de Esperandim y colaboradores (20) su resultado se diferenció de los demás porque su estudio fue realizado *in vivo*, es decir, el experimento fue evaluado en una población de ratones infectados con los parásitos y los resultados expuestos por el grupo de investigación se informaron en términos de reducción de la parasitemia, que en este caso fue del 70,8% con una dosis de 20 mg/kg del metabolito.

El cuarto factor que se tuvo en cuenta fue el uso de modelos celulares para comprobar la citotoxicidad de los metabolitos en contra de células de mamífero. Es de vital importancia considerar esta variable al momento de realizar estudios de citotoxicidad para poder establecer posibles tratamientos, ya que se debe demostrar de forma cuantitativa que los compuestos que tengan actividad antiparasitaria no posean efectos tóxicos contra el modelo celular empleado. En el caso particular de este estudio se pudo determinar que el 41,18% de los experimentos realizados (7 estudios del total de 17) realizaron ensayos con algún modelo celular adicional a los cultivos de *Trypanosoma cruzi*.

Por último, el quinto factor evaluado fue el geográfico, es decir, se estableció la presencia de la especie vegetal estudiada en el territorio colombiano. Se pudo evidenciar que 7 de los 17 estudios analizados (41,18% de los ensayos) se realizaron con especies de *Piper* que, según la literatura, no se han descrito en Colombia.

(ver anexo 8, Tabla 1)

Este estudio tuvo presente los ensayos realizados con base en extractos etanólicos de plantas del género *Piper*, por ende, los experimentos en donde se contemplan extractos crudos con solventes como el metanol, el n-hexano, la acetona, entre otros, se excluyeron del análisis final; los estudios realizados con aceites esenciales tampoco se reportaron en esta investigación, sin embargo, cabe resaltar que no se niega en ningún momento que aquellos extractos vegetales posean actividad tripanocida. Las especies

vegetales que fueron identificadas con un asterisco en la Tabla 1 pertenecen a experimentos en donde se realizaron extractos etanólicos, en un principio y posteriormente los investigadores aislaron moléculas y fracciones específicas para analizar su citotoxicidad.

4.2 Ensayos citotóxicos de plantas del género *Piper* realizados en modelos celulares.

Para la determinación de la viabilidad de un tratamiento con sustancias químicas, ya sean metabolitos o extractos, es de vital importancia realizar ensayos que permitan tener un juicio objetivo sobre la efectividad de la sustancia que se encuentra bajo estudio. La razón principal de que existan un gran número de estudios que busquen terapias alternativas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, radica en los efectos secundarios que poseen los fármacos de elección, tanto el Benzonidazol como el Nifurtimox.

Se busca entonces que un posible tratamiento alternativo debe poseer dos características imprescindibles:

- Poseer efecto tripanocida comprobado en una o más formas del parásito.
- No poseer efecto tóxico contra células de mamíferos, o en caso de tener dicho efecto, que la concentración de la sustancia que genere la citotoxicidad sea mayor que la requerida para el efecto antiparasitario.

En la literatura se ha descrito que la capacidad citotóxica de una sustancia se expresa en términos de su concentración citotóxica 50 (CC_{50}) o la concentración del compuesto necesaria para reducir la viabilidad de las células huésped en un 50%.

Con el fin de establecer una relación numérica entre estas dos condiciones, se han propuesto cálculos con base a la relación de la concentración citotóxica al 50% y la concentración inhibitoria al 50% (cuya fórmula se puede expresar de la siguiente manera CC_{50}/IC_{50}) (77) a esta expresión cuantitativa se le ha denominado Índice de

selectividad (IS) y es la elección, en la mayoría de los estudios, a tomar por los investigadores para poder comparar la efectividad de su sustancia contra la efectividad del Benzonidazol o el Nifurtimox. (78)

En esta investigación se sintetizó cuáles fueron los modelos celulares empleados por los investigadores al momento de realizar sus experimentos, tal como se evidencia en la Tabla 2; para el caso práctico de este estudio, poder determinar el IS de cada extracto representa un reto, debido a que no todos los investigadores realizaron el cálculo del CC_{50} , un ejemplo claro de esto se observa en los experimentos realizados con glóbulos rojos, en donde únicamente se evaluó capacidad de producir lisis celular. (ver anexo 8, Tabla 2)

Se puede observar que existe una predilección al momento de seleccionar el modelo celular, ya que las células LLC-MK2 y las células Vero son ambas líneas celulares que provienen de riñón. Estas células son de fácil mantenimiento y reproducción, poseen gran afinidad de infección con el *Trypanosoma cruzi* y permiten realizar ensayos sin dificultades, como lo son el MTT o LDH. El 57,14% de los ensayos contemplados en esta investigación utilizaron LLC-MK2 como modelo celular de estudio para determinar la citotoxicidad de los extractos y ningún autor dio a conocer algún efecto tóxico en las líneas celulares empleadas a las concentraciones trabajadas.

Se recomienda que se tenga en cuenta este tipo de variable al momento de plantear un trabajo de investigación, el poder sustentar un resultado de citotoxicidad contra células de mamífero puede contribuir con mayor información acerca del efecto que poseen las sustancias que se estén estudiando, además de aportar con datos objetivos las ventajas que tienen los metabolitos investigados contra las drogas de elección en enfermedad de Chagas. Realizar una elección adecuada del modelo celular a emplear, también forma parte vital de la estructura del trabajo, una buena estandarización del protocolo de mantenimiento de las células y un buen manejo y conocimiento de estas herramientas permitirán que los resultados sean los esperados.

4.3 Determinación de la viabilidad de compuestos químicos de plantas del género *Piper* como terapia contra la enfermedad de Chagas.

Destacando y en cuenta lo expuesto por Giraldo (79) en el 2015, Colombia es un país que se puede considerar como privilegiado en aspectos biológicos, ya que cuenta con gran diversidad de especies tanto animales como vegetales, una gran riqueza a nivel ambiental y una gran diversidad en sus regiones y climas; este contexto que envuelve al país genera que haya una mayor cantidad de enfermedades tropicales que pueden afectar a su población, como lo es el caso de la enfermedad de Chagas, pero así mismo, la biodiversidad que posee le puede suministrar la solución o parte de la solución a este problema de salud pública.

En el año 1978 en Kazajistán, se estableció la Declaración de Alma-Ata en la Conferencia Internacional sobre Atención Primaria de Salud en donde la medicina tradicional es considerada por parte del personal de salud, para poder ofrecer sus cualidades en beneficio de la población que lo necesite (80), así mismo el 2008 en la Declaración de Beijing establecida en el Congreso de la OMS sobre Medicina Tradicional (81) se reconoce la importancia de esta práctica en la atención primaria en salud, siguiendo con el desarrollo teniendo en cuenta las bases de la investigación y la innovación, esto toma mayor importancia teniendo en cuenta que como país en vía de desarrollo, es necesario hacer uso de los recursos disponibles y los conocimientos adquiridos por la experiencia.

Es por esta razón que realizar estudios en torno a la actividad que presentan los componentes de plantas que han sido utilizadas en la medicina tradicional colombiana toma especial importancia. Como se pudo evidenciar en la Tabla 1, los extractos obtenidos de diversas especies de plantas del género *Piper* demostraron tener efecto antiparasitario contra *Trypanosoma cruzi*. En la Tabla 2 se puede observar los estudios que se realizaron adicionalmente en modelos celulares, dando así evidencia de que

estos extractos no poseen efectos citotóxicos de importancia a bajas concentraciones. Esto demuestra que los compuestos que provienen de plantas del género *Piper* tienen un gran potencial para poder complementar o incluso reemplazar la terapia disponible actualmente para la enfermedad de Chagas. Encontrar especies con efecto tripanocida en el territorio colombiano ofrece la oportunidad de realizar trabajos de investigación a futuro que permitan determinar nuevos compuestos con uso terapéutico e incluso permite evidenciar las especies de plantas que aún no se han estudiado para iniciar un proyecto de investigación. Además, cabe resaltar la capacidad que posee la fitoquímica de ofrecer a la investigación nuevas alternativas terapéuticas para enfermedades que representen problemas de salud pública en Colombia.

5. Conclusiones:

El uso de compuestos químicos obtenidos a partir de extractos de plantas del género *Piper* ofrece una estrategia llamativa para la medicina actual, ya que se han descrito diversas especies cuyos metabolitos poseen actividades antiinflamatorias, antibacterianas, antimicóticas y antiparasitarias, tal como se pudo evidenciar en este estudio donde se contempló el efecto tóxico contra *Trypanosoma cruzi*. Colombia, al ser un país endémico para la enfermedad de Chagas, requiere de alternativas que permitan controlar este problema de salud pública, por lo que tener en cuenta estos extractos para futuras investigaciones será una alternativa llamativa.

Los estudios realizados con extractos de plantas del género *Piper* contra parásitos y contra células de mamíferos, permiten establecer la existencia de metabolitos presentes en estas especies vegetales que poseen un gran potencial para ser usados como terapia alternativa para tratar la enfermedad de Chagas.

Colombia, al ser un país biodiverso, posee un amplio catálogo de especies vegetales para estudiar y teniendo en cuenta los resultados preliminares, realizar trabajos de investigación en el área fitoquímica le brindará un aporte significativo a la comunidad

científica, a la comunidad médica y a todas las comunidades que se vean afectadas por enfermedades tropicales.

6. Referencias bibliográficas:

1. OMS. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) OMS. [Internet] 2020. [Consultado Octubre 2020] Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-tripanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-tripanosomiasis))
2. OPS/OMS Enfermedad de Chagas PAHO. [Internet] 2020. [Consultado Octubre 2020] Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
3. Ospina ML, Franklyn PA, Walteros D, et al. Boletín Epidemiológico Semanal Semana epidemiológica 14, 4 al 10 de abril de 2021. INS. [Internet] 2021 [Consultado Abril 2021] Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2021_Boletin_epidemiologico_semana_14.pdf
4. División de enfermedades parasitarias y malaria. Tratamiento antiparasitario CDC. [Internet] 2019 [Consultado Octubre 2020] Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/hcp/tratamiento.html>
5. Jaramillo LI, Ruiz C, Martínez LM, et al. Enfermedad de Chagas: una mirada alternativa al tratamiento. Revista Cubana de Medicina Tropical [Internet] 2017. [Consultado Octubre 2020]; 69(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000200009
6. Zambrana T. Beneficios de la fitoterapia. REV CUBANA PLANT MED. [Internet] 2005. [Consultado Octubre 2020]; 10(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200001
7. González J. Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Witheringia coccoloboides* sobre agregados de α -sinucleína en la cepa NL5901 de *Caenorhabditis elegans*. Universidad Nacional de Colombia [Internet] 2018. [Consultado Octubre 2020] Disponible en:

- <http://bdigital.unal.edu.co/69935/1/Tesis%20de%20Maestría%20Johanna%20Lizeth%20Gonzalez%20Devia.pdf>
8. Souza, R et al. Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa Americana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet], 2018. [Consultado Octubre 2020]; 210 (311 – 317). Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874117320317?via%3Dihub>
 9. Calderón, A et al. Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology* [Internet] 2010. [Consultado Octubre 2020]; 48:5(545-553). Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200903193344>
 10. Trujillo W. El género *Piper* L. (Piperaceae) en el alto Caquetá, zona de transición Andino-Amazónica de Colombia. *Revista Colombia Amazónica*. [Internet] 2013. [Consultado Octubre 2020]; 6(110). Disponible en:
<https://sinchi.org.co/files/publicaciones/revista/pdf/6/8%20el%20genero%20piper%20piperaceae%20en%20el%20alto%20caquet%20zona%20de%20transicin%20andino%20amaznica%20de%20colombia.pdf>
 11. Jara Beltrán, Á. Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* (Piperaceae). Montevideo, Uruguay: Universidad de la República [Internet] 2013 [Consultado Mayo 2021] Disponible en: <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/243>
 12. Montero Collazos AY. Estudio fitoquímico de hojas de la especie vegetal *Piper catripense* (Piperaceae) y evaluación de su capacidad antioxidante. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. [Internet] 2017 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/6767/MonteroCollazosAlisonYi?sequence=1>
 13. Neira LF, Stashenko E, Escobar P, Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. *Revista de la Universidad*

- Industrial de Santander. [Internet] 2014. [Consultado Octubre 2020]; 46(15).
Disponibile en: <http://www.scielo.org.co/pdf/suis/v46n1/v46n1a03.pdf>
14. Rojas J, Solís H, Palacios O. Evaluación in vitro de la actividad anti Trypanosoma cruzi de aceites esenciales de diez plantas medicinales. An Fac med. [Internet] 2010 [Consultado Octubre 2020]; 71(3):161-5. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v71n3/a04v71n3.pdf>
15. Calderon AL, et al. Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. Pharm Biol. [Internet] 2010 [Consultado Octubre 2020]; 48(5):545-53. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20645798/>
16. Passerini G. Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da Família Piperaceae em formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi. Universidade Estadual Paulista. [Internet] 2008. [Consultado Octubre 2020] Disponible en: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/88043>
17. Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, Bazzocchi IL. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species. Phytochemistry [Internet] Marzo 2009 [Consultado Marzo 2021] 70(5): 621-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19361822/>
18. Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias FB, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of Leishmania (L.) amazonensis and Trypanosoma cruzi. Rev. Bras. Cienc. Farm. [Internet]. Marzo 2005 [Consultado Mayo 2021] 41(1): 85-94. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322005000100010&lng=en. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000100010>.
19. Regasini LO, Cotinguiba F, Passerini GD, Bolzani V, Cicarelli RM, Kato MJ, et al. Trypanocidal activity of Piper arboreum and Piper tuberculatum (Piperaceae). Rev. bras. farmacogn. [Internet]. Marzo 2009 [Consultado Mayo 2021] 19(1): 199-203. Disponible en:

- http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000200003&lng=en. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200003>.
20. Rodrigues V, Ferreira DS, Souza KC, et al. Evaluation of the in vivo therapeutic properties of (-)-cubebin and (-)-honokinin against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology* [Internet] Abril 2013 [Consultado Mayo 2021] 133(4): 442-446. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489412003761?via%3Dihub>
21. Veiga-Santos P, Desoti VC, Miranda N, Ueda-Nakamura T, et al. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropical* [Internet] Marzo 2013 [Consultado Marzo 2021] 125(3): 349-356. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X12003786?via%3Dihub>
22. Pelizzaro-Rocha KJ, Veiga-Santos P, Lazarin-Bidóia D, Ueda-Nakamura T, et al. Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi* [Internet] Noviembre 2011 [Consultado Marzo 2021] 13(12-13): 1018-1024. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457911001420?via%3Dihub>
23. Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, et al. Benzoic acid derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. *J Nat Prod* [Internet] Septiembre 2008 [Consultado Marzo 2021] 71(9): 1538-43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18712933/>
24. Shima P, Ueda-Nakamura T, Prado B, Garcia DA, et al. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* [Internet] Diciembre 2006 [Consultado Mayo 2021] 100(1): 31-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16783543/>

25. Shima P, Ueda-Nakamura T, Prado B, Garcia DA, Vataru C. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. Var. *Pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol Pharm Bull* [Internet] Octubre 2006 [Consultado Mayo 2021] 29(10): 2126-30. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17015964/>
26. Avalos L, Delgado G, González J, Luján C, Escalante H. Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* sobre la supervivencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. REBIOL* [Internet] 2016 [Consultado Mayo 2021] 36(1). Disponible en:
<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/1315>
27. Gomes F, Relison S, Viera DI, et al. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. *Revista de ciencias farmacéuticas básica y aplicada* [Internet] 2014 [Consultado Mayo 2021] 35(1). Disponible en:
<https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/168>
28. Mazzeu B. Estudo de aspectos químicos, biológicos e biossintéticos em *Piper fuligenium* Kunth (Piperaceae). *Repositório Institucional UNESP* [Internet] Mayo 2014 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/110696>
29. Barbieri F, Ueda-Nakamura T, Prado B, Garcia DA, et al. Efeito de extratos de plantas utilizadas na medicina popular no crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivada em meio definido Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined medium. *Acta Scientiarum - Health Sciences*[Internet] 2002 [Consultado Mayo 2021] 24(0):657–62.
30. Mgbeahuruike EE, et al. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *South African Journal of Botany*. [Internet] 2017. [Consultado Octubre 2020]; 112(54) Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629916340637?via%3Dihub>

31. Flórez Sánchez AC, Caicedo Diaz RA. Guía para la vigilancia por laboratorio del Trypanosoma cruzi. INS [Internet] 2017 [Consultado Mayo 2021] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador/Informacin%20de%20laboratorio/Guia%20para%20la%20Vigilancia%20por%20laboratorio%20de%20Trypanosoma%20cruzi.pdf>
32. Ramirez JD, Guhl F. Molecular epidemiology of parasitic diseases: The Chagas disease model. Epidemiology- Current perspectives on reach an practice. [Internet] 2012 [Consultado Mayo 2021] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/234017755_Molecular_Epidemiology_of_Parasitic_Diseases_The_Chagas_Disease_Model
33. Córdoba Montecinos L. Identificación y descripción molecular de cepas de Tripanosoma cruzi y su análisis filogenético mediante secuenciación del gen para citocromo B. Universidad de Chile.[Internet] 2007 [Consultado Mayo 2021] Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130957/Identificaci%C3%B3n-y-descripci%C3%B3n-molecular-de-cepas-de-Trypanosoma-cruzi-y-su-an%C3%A1lisis-filogen%C3%A9tico-mediante-secuenciaci%C3%B3n-del-gen-para-citocromo-B.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
34. Toso A, Vial A, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev méd Chile [Internet] 2011 [Consultado Mayo 2021] 139(2): 258-266. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872011000200017
35. Pereira A, Perez M. Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño. Universidad de Santiago [Internet] Febrero 2003 [Consultado Mayo 2021] 22(2): 104-111. Disponible en:

- <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-tripanosomosis-enfermedad-c-hagas-enfermedad-del-13043203>
36. CDC. Laboratory identification of parasites of public health concern. CDC [Internet] Abril 2019 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
 37. Lazzari CR, Pereira MH, Lorenzo MG. Behavioural biology of Chagas disease vectors. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [Internet]. 2013 [Consultado Mayo 2021] 108(1): 34-47. Disponible en:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762013000900034&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130409>.
 38. Corté LA, Suárez HA. Triatominos (Reduviidae: Triatominae) en un foco de enfermedad de Chagas en Talaigua Nuevo (Bolívar, Colombia). Biomedica [Internet]. Diciembre 2005 [Consultado Mayo 2021] 25(4):568-74. Disponible en:
<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1383>
 39. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomedica [Internet]. 2007 [Consultado Mayo 2021] 27(1): 143-62. Disponible en:
<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/258>
 40. Ayala CJ, Hernández CM, Eyes M, Romero LR, Álvarez RA, Blanco P. Detección de infección natural de Trypanosoma cruzi (TRYPANOSOMATIDAE) en triatominos del municipio de Coloso, Colombia. Acta biol.Colomb. [Internet]. Abril 2019 [Consultado Mayo 2021] 24(1): 180-184. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2019000100180&lng=en. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n1.72306>.
 41. Ministerio de Salud y Protección Social. Enfermedad de Chagas Memorias. Federación médica Colombiana [Internet] 2012-2013 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:

- https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias_chagas.pdf
42. Díaz ML, González CI. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de Trypanosoma cruzi como una vía de transmisión re-emergente. Rev. Univ. Ind. Santander. Salud [Internet]. Agosto 2014 [Consultado Mayo 2021] 46(2): 177-188. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072014000200009&lng=en.
43. Arrieta R, Cañavate C, Castro E, et al. Enfermedad de Chagas y donación de sangre. Ministerio de sanidad y política social [Internet] Julio 2009 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/informeChagasJulio09.pdf>
44. Oriol M. Enfermedad de Chagas, transmisión materno-fetal y experiencia recogida en nuestro centro. Enfermedades emergentes. [Internet] 2006 [Consultado Mayo 2021] 8(1): 37-39. Disponible en:
<http://enfermedadesemergentes.com/articulos/a513/s-8-supl-010.pdf>
45. Campos AA, Rubio M, Martínez TI, et al. Enfermedad de Chagas: Vectores. Revista ciencia. [Internet] Enero- marzo 2017 [Consultado Febrero 2021] 68(1). Disponible en:
https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_1/PDF/Enfermedad_de_Chagas_vectores.pdf
46. Plamezano JM, Plazas LK, Rivera KE, Rueda VP. Enfermedad de Chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia. MÉD UIS [Internet] Diciembre 2014 [Consultado Mayo 2021] 28(1): 81-90. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a08.pdf>
47. Machado F, Jelicks L, Kirchhoff L, et al. Chagas heart disease: report on recent developments. Cardiol Rev [Internet] 2012 [Consultado MAYO 2021] 20(2): 53-65. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3275684/>

48. Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol. Res.* [Internet]. 2010 [Consultado Mayo 2021] 43(3): 323-331. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602010000300009&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602010000300009>.
49. Andrade JP, Marin JA, Amato PA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. Directriz latinoamericana para el diagnóstico y tratamiento de la cardiopatía chagásica: resumen ejecutivo. *Arq. Bras. Cardiol.* [Internet]. Junio 2011 [Consultado Mayo 2021] 96(6): 434-442. Disponible en:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2011000600002&lng=en. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011000600002>.
50. Murillo-Godínez G. Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Med. interna Méx.* [Internet]. Diciembre 2018 [Consultado Mayo 2021] 34(6): 959-970. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-48662018000600014&lng=es. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i6.2217>.
51. González JM, Cuéllar A, Puerta CJ. La respuesta inmunitaria adaptativa en la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. acad. colomb. cienc. exact. fis. nat.* [Internet]. Diciembre 2017 [Consultado Abril 2021] 41(161): 456-465. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-39082017000400456&lng=en. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.506>.
52. Klahr JI, Uribe AM, Roa N, Gonzáles JM. Inmunidad celular en la patogénesis de la cardiopatía chagásica crónica. *Revista colombiana de cardiología* [Internet] Noviembre-Diciembre 2016 [Consultado Mayo 2021] 23(6): 568-575. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0120563316300511>
53. Madrid AM, Quera R, Defilippi C, Defilippi C, Gil L, Sapunar J, et al. Alteraciones motoras gastrointestinales en la enfermedad de Chagas. *Rev. méd. Chile*

- [Internet]. Agosto 2004 [Consultado Mayo 2021] 132(8): 939-946. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872004000800005&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000800005>.
54. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. The Lancet. [Internet] Abril 2010 [Consultado Mayo 2021] 375(9723): 1388-1402. Disponible en: <https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS014067361060061X/fulltext>
55. Rincon-Acevedo CY, Parada-García AS. Caracterización Clínica y epidemiológica de la enfermedad de Chagas en fase aguda en Casanare-Colombia, 2012-2020. Universidad de Rosario [Internet] Febrero 2021 [Consultado Mayo 2021] Disponible en: <https://repository.urosario.edu.co/handle/10336/31083>
56. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. The Lancet [Internet] Junio 2017 [Consultado Mayo 2021] 391(10115): 82-94. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)31612-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)31612-4/fulltext)
57. Scublinsky D, Pinoni MV, Ibelli F, Valledor A, Soriano ER. Formas clínicas y diagnóstico de la enfermedad de Chagas e inmunosupresores. Rev. argent. reumatolg. [Internet]. Marzo 2019 [Consultado Mayo 2021] 30(1): 11-14. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2362-36752019000100003&lng=es.
58. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, et al. Compariso of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis o imported Chagas disease in Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet] Mayo 2010 [Consultado Mayo 2021] 28(5): 284-93. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19962790/>
59. Jaramillo LI, Ruiz C, Martínez M, Vera S. Enfermedad de Chagas: una mirada alternativa al tratamiento. Rev. Cubana de Medicina tropical. [Internet] Julio 2017 [Consultado Mayo 2021] 69(2). Disponible en: <http://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/140/156>

60. Sengenito LS, Silva V, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, et al. Leishmaniasis and Chagas disease- neglected tropical diseases: treatment updates. Current topics in medicinal chemistry [Internet] 2019 [Consultado Mayo 2021] 19(3).

Disponible en:

<https://www.eurekaselect.com/node/171076/viewhtml/U2s5BVm59Vaz1U1QcIRGgc01u2UWwdrV0k811TDBIOYVtVUVwTVNngdk1k2VG3t2b4k15gOXRtvZEadsM2XNMbODDbOVWs9UVmU1tkdE1fUbGdt0TkXR5hMHhasTnnpRZcnVhoSDFDSdGzJqSuHg4raGRfHVjoE0ZwENmCOW9nka0dcxcd2VmcSHdktNUm1Eai1Jr5WW1m6ZGoxpT6WprqZTVlaanwJVegE1hrMlperbkq9HSdTazfT1RinZGf1ZYt21RgMG9kPVEtICeck5qqZGhmqTmehue9DgweWVhiKbzqBhVg0VOtc1o3zUVARjV3IIUFY1ZiZZ3rx8VAldsueDZtSV2awxdrVpFxcIVC0UXuBWTikVsfYzJfSZIgpaa73hWpSIFzxVEo15bkFJEBTTgtxUmxp2YazFOgZEREWMm3NMVeFE4fM01b6bE8I0TeTNqkTTF4pTmtpRbkHpNgamFuORVgJ3MjJZFBc2VgBVGrNWWvXhU7Y1ZyZ>

61. Pereiro AC. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. The Lancet [Internet] Abril 2019 [Consultado Abril 2021] 393(10180): 1486-1487.

Disponible en:

[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(19\)30288-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)30288-0/fulltext)

62. Acosta N, Yaluff G, López E, Bobadilla C, Ramírez A, Fernández I, et al.

Sensibilidad in vitro a benznidazol, nifurtimox y posaconazol de cepas de Trypanosoma cruzi de Paraguay. Biomed. [Internet]. Diciembre 2020

[Consultado Abril 2021] 40(4): 749-763. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572020000400749&lng=en. Epub Nov 12, 2020. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5187>.

63. Ministerio de Salud y protección social. Enfermedad de Chagas, para su equipo. Federeación médica colombiana [Internet] 2013 [Consultado Mayo 2021]

Disponible en:

https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/para_su_equipo_chagas.pdf

64. California Academy of Sciences. Pimientas Familia Piperaceae. Naturalista [Internet] 2021 [Consultado Mayo 2021]. Disponible en:
<https://www.naturalista.mx/taxa/71604-Piperaceae>
65. Chitiva LC. Búsqueda de sustancias antifúngicas para el control de hongos fitopatógenos a partir de constituyentes químicos presentes en Piper pesaresanum. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Facultad de Ciencias Departamento de Química Química [Internet] Febrero 2020. [Consultado Abril 2021] Disponible en:
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77384>
66. Flores EN. Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana. Dialnet [Internet] 2007 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=39639>
67. Pino N, Valois H. Ethnobotany of four black communities of the municipality of Quibdo, Choco-Colombia. Lyonia [Internet] Diciembre 2004 [Consultado Mayo 2021] 7(2): 61-69. Disponible en:
<https://lyonia.org/downloadPDF-2.312.pdf?pdfID=2.312>.
68. Trujillo-Calderon W, Hoyos-Cardozo F. El género Piper (Piperaceae) en la reserva natural Las Dalías, municipio de La montaña-Caquetá. Momentos de Ciencia [Internet] 2013 [Consultado Mayo 2021] 10(2). Disponible en:
<https://www.uniamazonia.edu.co/revistas/index.php/momentos-de-ciencia/article/view/257/piper>
69. Ladino C. Potencialidad del género Piper como fuente de sustancias para el control de hongos fitopatógenos. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Facultad de Ciencias Departamento de Química. [Internet] Junio 2018 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/64107>
70. Ammerman NC, Beier M, Azad A. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. Current protocols in Microbiology. [Internet] 2008 [Consultado Octubre 2020]; 11 (1-7) Disponible en:

<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780471729259.mca04es11>

71. Gonzalez J, Muñoz S, Ortiz S, et al. Biochemical, Immunological, and Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Populations of the Andean North of Chile. *Experimental Parasitology*. [Internet] 1995. [Consultado Octubre 2020]; 81(125). Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489485711009>
72. Escobar L, Rivera A, Aristizábal FA. Estudio comparativo de los métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae* [Internet]. Enero 2010 [Consultado Abril 2021] 17(1): 67-74. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000100009&lng=en.
73. Cell Biolabs' CytoSelect. LDH Cytotoxicity Assay Kit. Cell Biolab, inc. [Internet] 2019 [Consultado Octubre 2020] Disponible en:
<https://www.cellbiolabs.com/ldh-cytotoxicity-assay-kit>
74. Ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT. Biomodel [Internet] [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>
75. Artilés L, Otero J, Barrios I. Metodología de la investigación para ciencias de la salud. La Habana: Ciencias Médicas; 2008.
76. Levac D, Colquhoun H, O'Brien K. Scoping studies: advancing the methodology. *Implementation Science* [Internet] 2010 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<https://implementationscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/1748-5908-5-69>
77. Ordaz-Trinidad N., Dorantes-Álvarez L., Salas-Benito J., Barrón-Romero B.L., Salas-Benito M., Nova-Ocampo M. De. Citotoxicidad y actividad antiviral de extractos de chiles (*Capsicum* spp). *Polibotánica* [Internet]. 2018 [Consultado Mayo 2021] (46): 273-285. Disponible en:

- http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682018000200273&lng=es. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.46.18>.
78. Neira LF, Vera AM, Escobar P. Genotoxicidad del nifurtimox en diferentes líneas celulares utilizando el ensayo cometa. Revista médica Risaralda [Internet]. Enero 2016 [Consultado Mayo 2021] 22(1): 3-8. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-06672016000100001&lng=en.
79. Giraldo S, Bernal MC, Morales A, Pardo AZ, Gamba L. Uso tradicional de plantas medicinales en mercados de Bogotá, D.C. Nova [Internet]. Enero 2015 [Consultado Mayo 2021] 13(23): 73-80. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000100007&lng=en.
80. Facultad de medicina Universidad de Chile. Declaración de Alma Ata, realizada en la conferencia internacional sobre atención primaria de salud, Alma Ata, URSS, 6-12 de septiembre de 1978. [Internet] [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
<http://www.medicina.uchile.cl/vinculacion/extension/declaracion-de-alma-ata>
81. OMS. Declaración de Beijing, adoptada en el congreso de la OMS sobre medicina tradicional, Beijing (China) [Internet] Noviembre 2008 [Consultado Mayo 2021] Disponible en:
https://www.who.int/medicines/areas/traditional/TRM_BeijingDeclarationSP.pdf
82. Gonzalez A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Universidad Nacional de Colombia. [Internet] 2004. [Consultado Octubre 2020] Disponible en:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>

7. Anexos:

7.1 Anexo 1. Justificación de la monografía.

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, los fármacos propuestos por la Organización Mundial de la Salud son el Nifurtimox y el Benzonidazol, los cuales tienen múltiples efectos tóxicos en el genoma humano, ya que estudios han demostrado su actividad mutagénica y cancerígena, además de generar hepatotoxicidad y supresión a nivel de la médula ósea (5) demostrando así que estas propuestas son actualmente insuficientes, en términos tanto de eficacia como de seguridad. Es aquí donde radica la importancia de la búsqueda de nuevas terapias alternativas para el tratamiento de esta enfermedad. Una de las propuestas más llamativas son las alternativas “naturales”, como lo son la extracción de compuestos o metabolitos vegetales; es conocido que desde los inicios mismos de la medicina, el humano se ha beneficiado haciendo uso de lo que posee a su alrededor para combatir los males que le aquejaban tanto a su especie como a los animales de los que disponía para realizar sus tareas diarias, es aquí donde la fitoterapia surge como una solución tradicional para controlar diversas enfermedades e infecciones, ya sean bacterianas, virales, parasitarias o micóticas (6). Aún en la actualidad esta alternativa sigue siendo llamativa, ya que, a través de los años, las investigaciones en el área fitoquímica han logrado determinar el efecto de los metabolitos vegetales en diferentes enfermedades (7) razón por la que es válido formular la oportunidad de poner a prueba extractos etanólicos de especies vegetales que han demostrado poseer múltiples efectos, entre ellos los antiparasitarios (8,9).

Gracias a los estudios realizados en los últimos años, la comunidad científica ha demostrado un interés considerable en las propiedades fitoquímicas que han presentado los metabolitos de plantas del género *Piper*, estas especies vegetales han demostrado poseer un gran número de compuestos bioactivos que han sido analizados contra diferentes modelos microbiológicos, entre ellos los parasitarios como lo son los géneros de *Leishmania* y *Plasmodium*, obteniendo resultados satisfactorios,

demostrando así que existe una posibilidad de encontrar actividad contra *Trypanosoma cruzi*. Las plantas del género *Piper* se encuentran distribuidas con un número estimado de alrededor de 2500 especies a nivel mundial, especialmente distribuidas a lo largo de Latinoamérica, ya que la región descrita posee múltiples zonas tropicales, especialmente en países como Brasil y Colombia (10,11) de hecho, Colombia se encuentra descrito como uno de los países con mayor distribución de especies pertenecientes a este género, pues se ha podido establecer su presencia en gran parte del territorio Colombiano, como por ejemplo en la región Andina (12), en donde se encuentran principalmente tanto bosques húmedos como bosques tropicales, este país entonces se encuentra beneficiado por su ubicación geográfica, además de encontrarse catalogado entre los países más biodiversos a nivel mundial, permitiendo de esta forma que el rango de especies vegetales a estudiar sea bastante amplio.

Los metabolitos secundarios que han sido obtenidos de plantas de este género han demostrado, por sus cualidades químicas, su amplia gama de posibles usos en la terapia antiparasitaria es por esto que con la ayuda de los estudios que han evaluado *in vitro* la actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas del género *Piper*, se espera ofrecer una posible nueva alternativa al tratamiento de la enfermedad de Chagas.

7.2 Anexo 2. Figuras.



Figura 1. Distribución geográfica de *T. cruzi* en Latinoamérica teniendo en cuenta la clasificación DTU. Ramirez JD, 2021 (32).

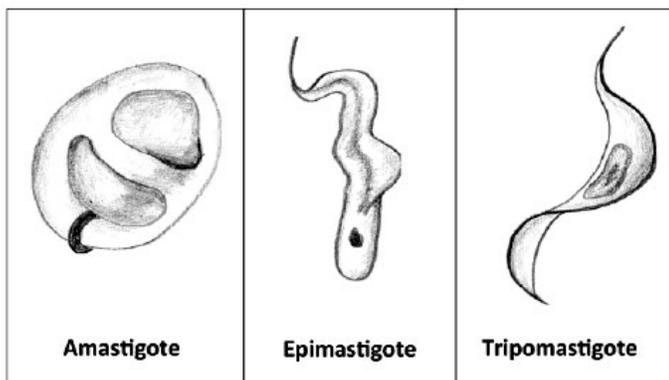


Figura 2. Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. Toso A, 2011 (34)

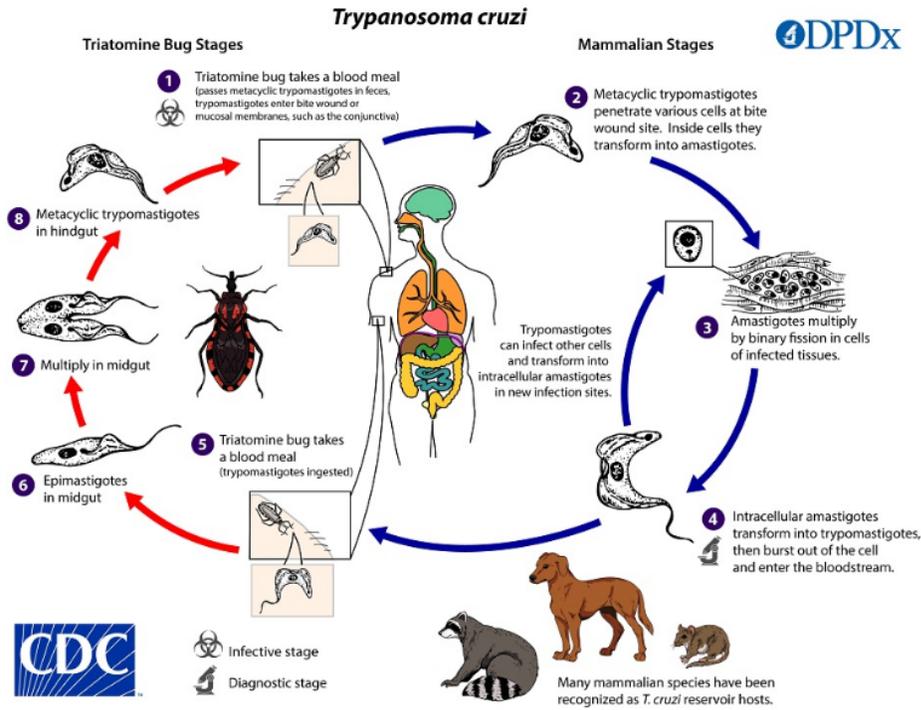


Figura 3. Ciclos de vida de *Trypanosoma cruzi* (Tomado del CDC, 2019)(36)

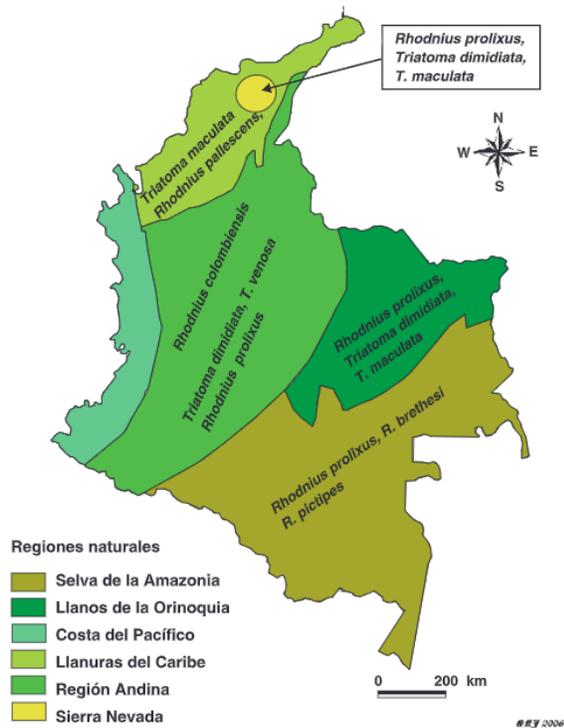


Figura 4. Distribución geográfica por regiones de los principales vectores de *Trypanosoma cruzi* en Colombia. Guhl F, 2007 (39)

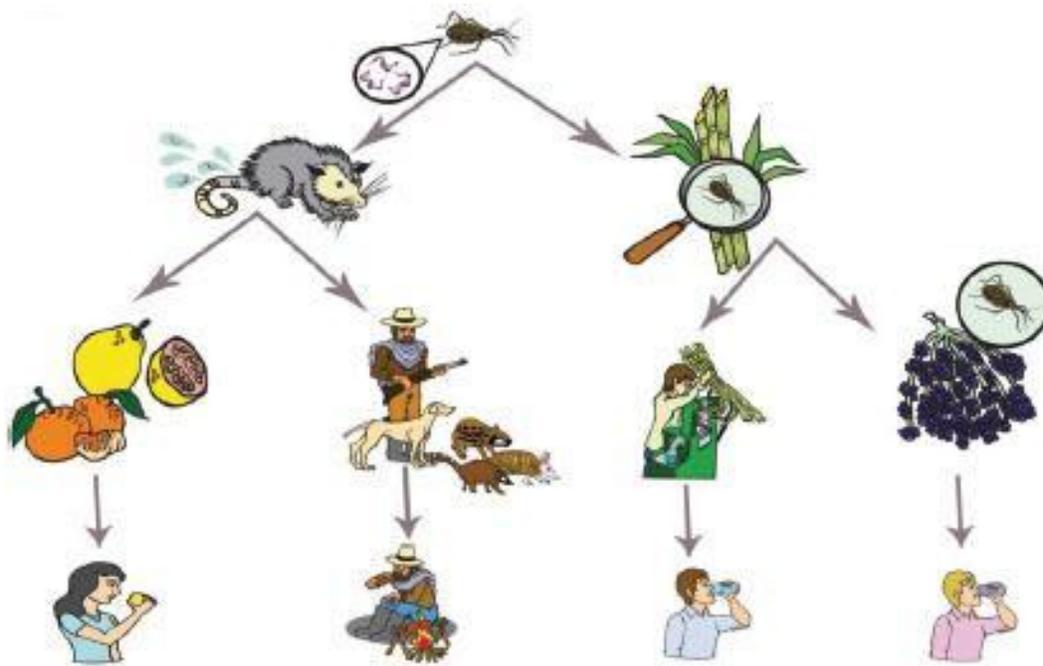


Figura 5. Vías de transmisión oral de la enfermedad de Chagas. Díaz ML, 2014 (42)

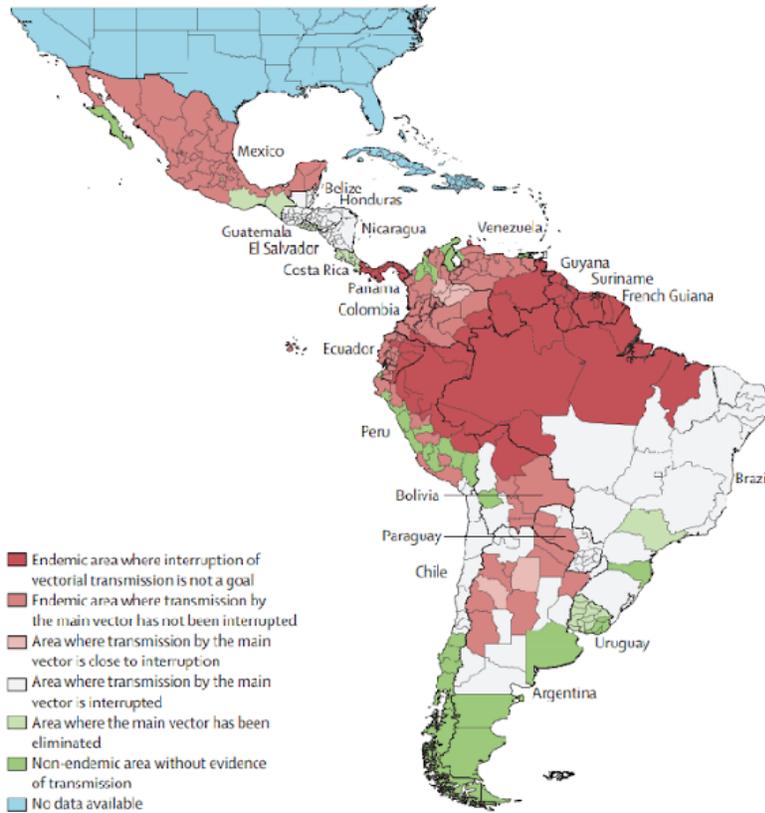


Figura 6. Regiones clasificadas según su control sobre el vector de *Trypanosoma cruzi*. Pérez-Molina JA, 2017 (56)

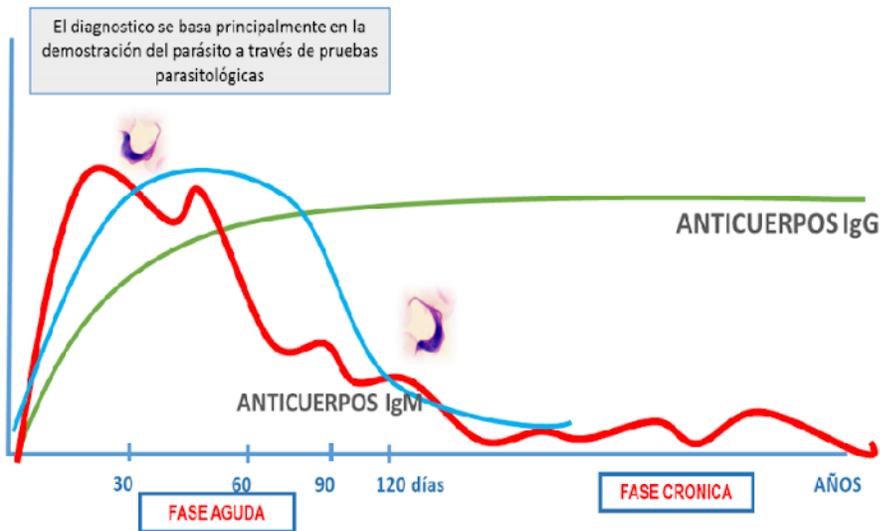


Figura 7. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* con relación a la fase de la enfermedad. Flórez AC, 2017 (31)

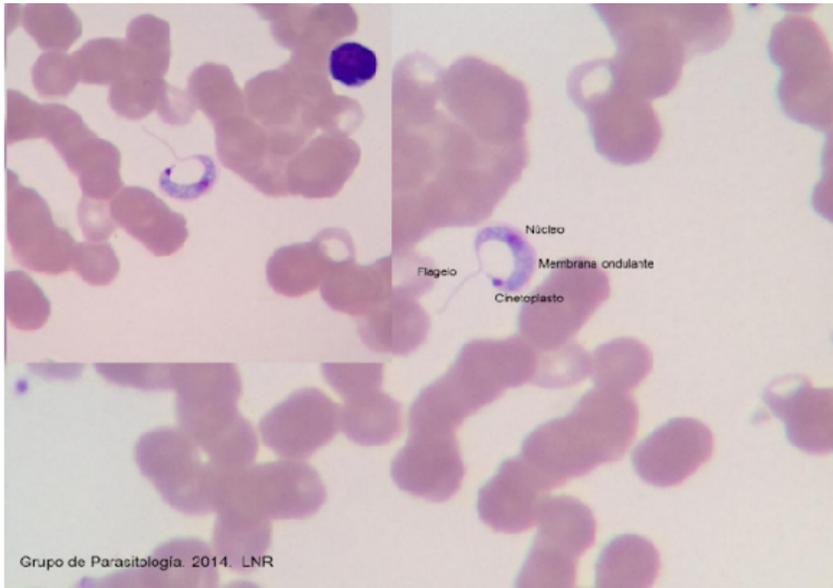


Figura 8. Morfología de *Trypanosoma cruzi* observada en extendido de sangre periférica. Flórez AC, 2017 (31)

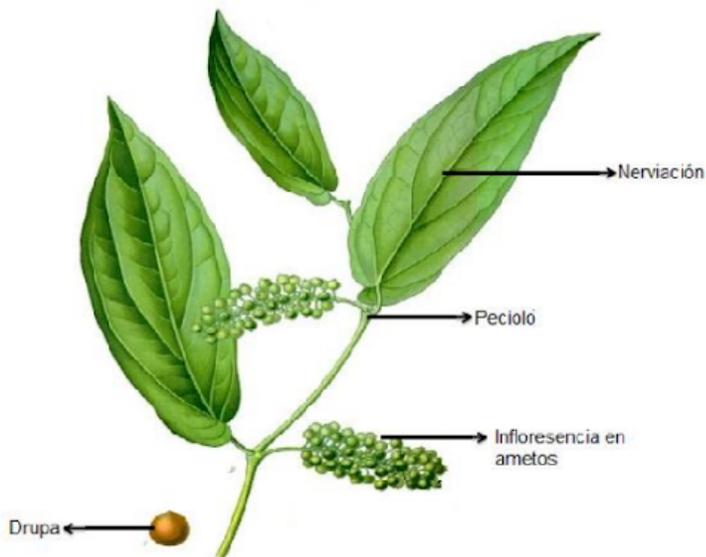


Figura 9. Estructura y partes básicas de plantas pertenecientes al género *Piper*.
Academia de Ciencias de California, 2021 (64)

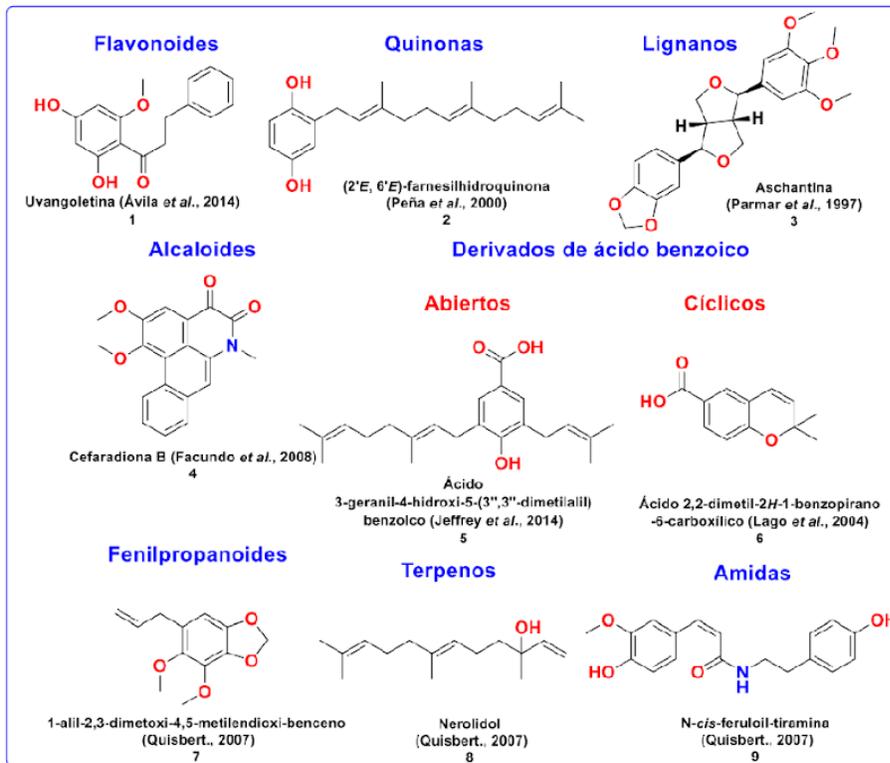


Figura 10. Principales compuestos químicos descritos en plantas del género *Piper*.
Chitiva LC, 2020 (65)

7.3 Anexo 3. Manifestaciones clínicas adicionales.

7.3.1.1 Forma indeterminada

Esta fase se caracteriza por ser parte de la patología en su forma crónica, ya que estos pacientes van a presentar resultados positivos en sus pruebas serológicas, sin embargo, no manifiestan signos ni síntomas propios de la enfermedad. Se ha logrado establecer que esta es la presentación más común de la etapa crónica, ya que únicamente del 2 al 5% de los pacientes con esta presentación de la patología podrán evolucionar a la forma cardíaca de la enfermedad, anualmente. Aproximadamente el 70% de los pacientes crónicos de la enfermedad de Chagas tienen un diagnóstico

favorable y sobrellevarán esta presentación sin evidencia de daño cardíaco o digestivo incluso después de años o décadas.

A pesar del bajo riesgo clínico que presentan estos pacientes, la importancia de esta forma de la enfermedad se va a evidenciar en las zonas endémicas con presencia de la transmisión vectorial, ya que estas personas seguirán siendo reservorios del parásito y podrán seguir contribuyendo al ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*.

7.3.1.2 Forma cardíaca

Esta forma de la enfermedad tiene como característica principal el compromiso cardíaco, que se presentará cuando el parásito tenga la capacidad y preferencia por reproducirse en los cardiomiocitos, se espera que a futuro evolucione a miocardiopatía dilatada o incluso insuficiencia cardíaca congestiva; se tiene un estimado de que el compromiso cardíaco va a ocurrir en cerca del 30% de los individuos que presentan la infección crónica sintomática, y es la causa principal de la mortalidad que caracteriza a la enfermedad de Chagas. Este compromiso cardíaco producido por esta enfermedad es el responsable de, aproximadamente 21.000 muertes por año en América Latina, la falla cardíaca crónica causada por la cardiopatía chagásica crónica tiene un peor pronóstico de lo que se ha podido observar en pacientes cuya falla cardíaca es producida por otras etiologías, siendo que el 48% de las muertes más frecuentes se dan por muerte súbita y el 37% se deben a falla cardíaca. Entre las manifestaciones cardíacas que se pueden encontrar, se destacan las arritmias y su forma de presentación clínica como lo son las palpitaciones, el síncope y la lipotimia (52).

7.3.1.3 Forma digestiva

Esta presentación de la enfermedad en fase crónica no es tan común como lo es la presentación cardíaca, siendo de baja frecuencia en países como Colombia y se caracteriza por afectar principalmente las conocidas vísceras huecas, como lo son el esófago (produciendo el megaesófago) o el colon (generando el megacolon); en el primero de los casos se logra determinar como principal síntoma la disfagia, pero en el

caso del megacolon se identifica como síntoma principal la constipación lenta y progresiva.

El parásito tiene la capacidad de generar esta presentación digestiva de la enfermedad con ayuda de la reacción inmune del hospedero, ya que provocará un proceso inflamatorio, el cual tiene un impacto negativo sobre los plexos intramurales y de fibras nerviosas tanto del plexo submucoso de Meissner y el mientérico de Auerbach. Otros síntomas que se han logrado encontrar en esta forma de la patología son el meteorismo, la distensión abdominal, el timpanismo y la disquecia y, además, se ha logrado demostrar que los pacientes afectados por esta presentación de la enfermedad pueden presentar una disminución de las células intersticiales de Cajal en distintos sitios del colon (53).

7.4 Anexo 4. Métodos de diagnóstico enfermedad de Chagas

7.4.1.1 Diagnóstico en fase aguda

Para la fase aguda (también aplica para la enfermedad de Chagas congénita) la parasitemia es elevada, es decir que las técnicas de diagnóstico se van a basar

principalmente en detectar el hemoparásito por métodos directos, ya sea en sangre periférica o incluso en otros fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo.

7.4.1.1.1 Microscopía directa

Como lo indica su nombre, esta metodología hace uso de la microscopía directa de una gota de sangre del paciente entre lámina portaobjetos y laminilla, aquí se podrá realizar la visualización de los tripomastigotes móviles de *Trypanosoma cruzi*.

7.4.1.1.2 Análisis de sangre con tinciones de Romanowsky

Para estas técnicas se utilizan dos tinciones que usan colorantes derivados de Romanowsky, para el caso de la técnica de gota gruesa se utiliza la coloración de Field en una gota gruesa de sangre capilar sobre una lámina, esta técnica permite una mayor concentración de parásitos, pero una baja calidad en la morfología del protozoo.

Para el frotis extendido de sangre periférica se realiza una tinción de Giemsa, Field o Wright sobre el extendido de la lámina, esta metodología ofrece una mayor calidad al observar la morfología de los parásitos.

(ver anexo 2, Figura 8)

7.4.1.1.3 Técnicas de concentración

La sensibilidad para la detección de infección por el parásito se puede incrementar mediante el uso de las técnicas de concentración, las cuales se basan en la centrifugación de muestras sanguíneas para obtener así un mayor número de hemoparásitos por campo microscópico con respecto al volumen de sangre analizado.

El ejemplo clásico de estos métodos son el microhematocrito, el micrométodo y el método de Strout.

7.4.1.1.4 Métodos indirectos

Para el diagnóstico en la fase aguda se puede hacer uso de técnicas cada vez más en desuso, entre estas técnicas se incluyen el hemocultivo y el xenodiagnóstico, técnicas

que actualmente se encuentran disponibles en laboratorios especializados y cuya función principal se basa en la investigación.

Entre estos métodos también se encuentra contemplado el diagnóstico molecular del parásito, entre estas opciones se realiza la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) que permite tanto la detección del parásito, como también la cuantificación simultánea de ADN satelital de *Trypanosoma cruzi*.

7.4.1.2 Diagnóstico en fase crónica

Teniendo en cuenta que, para esta fase de la enfermedad, la parasitemia disminuye de forma drástica, se sugiere hacer menor uso de los métodos parasitológicos directos, ya que suelen ser negativos en un 60% de los casos y es entonces donde las pruebas serológicas cobran mayor importancia para diagnosticar enfermedad de Chagas en fase crónica.

Este diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos tipo IgG anti-*Trypanosoma cruzi*, inmunoglobulinas que toda persona que se encuentre en fase crónica debe presentar en su suero. Según lineamientos de la Organización Mundial de la Salud, teniendo en cuenta que ninguna de las pruebas serológicas alcanza un valor de sensibilidad y especificidad equivalente al 100%, se establece que el diagnóstico de infección de Chagas en su fase crónica solamente se podrá determinar mediante el resultado positivo de 2 pruebas serológicas realizadas por métodos diferentes simultáneamente (58) en caso de que se presente discordancia entre el resultado de dos pruebas serológicas, se recomienda utilizar una tercera prueba diagnóstica para llegar a un resultado concluyente.

La Organización Panamericana de la Salud tiene contempladas las siguientes pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedad de Chagas en fase crónica:

- Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA)
- Inmunocromatografía (ICT)
- Inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)

- Hemoaglutinación indirecta (HAI)
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

7.5 Anexo 5. Preparación de extractos etanólicos de plantas del género *Piper*.

Este procedimiento de extracción se basa en el descrito por Gonzalez. (82)

En un principio, para obtener los extractos etanólicos, se deberá realizar la recolección de la muestra y se tendrán en cuenta tallos, hojas y raíces de las plantas para esta recolección. Se realiza el pretratamiento que consta de limpiar y secar las muestras. Posterior a esto se realiza la reducción de tamaño en donde se tomará la muestra seca y se macera con un molino. Para la extracción, el material vegetal se pesará y se depositará en los recipientes dispuestos para tal fin, adicionando el solvente, que en este caso es etanol, hasta cubrir completamente el material vegetal, se agitará y se tapará. Se debe mantener en reposo por un período de 10 días con etanol 96%, agitando esporádicamente el contenido. Para obtener finalmente el extracto se filtra el producto, el solvente es recuperado con ayuda de un rotaevaporador, el extracto es pesado y posteriormente almacenado. Por último, se debe realizar control de calidad preliminar por cromatografía de capa delgada y otras pruebas de coloración.



Figura 11. Extractos obtenidos de plantas del género *Piper*. Parra JD, 2020.

7.6 Anexo 6. Ensayo de citotoxicidad con LDH.

Protocolo descrito en el kit “The CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay”.

- Agregar células en medio de cultivo (100 µL) en los pozos que sean designados para cada ensayo. Tener en cuenta los controles recomendados por el kit.
- Agregar el extracto vegetal (50 µL) a cada pozo que sea designado para los ensayos de citotoxicidad con las concentraciones específicas. Tener en cuenta que para los controles negativos debe agregarse 50 µl de medio de cultivo con células. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que en los controles positivos se debe agregar 50 µL del medicamento que se considere de elección para la enfermedad.
- Incubar las células a 37°C según el periodo de exposición designado. Nota: LDH tiene una vida media de 9 horas luego de que es liberada en medio de cultivo por lo que debe optimizarse el periodo de incubación.
- Transferir 50 µl de cada pozo de ensayo a una placa de 96 pozos.
- Agregar 50 µl del reactivo CytoTox 96 en cada muestra. Cubrir la placa de la luz e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 50 µl de la solución de parada en cada pozo de ensayo.
- Reventar las burbujas presentes en el sobrenadante empleando una aguja de jeringa y realizar la lectura de absorbancia a 490 nm o 492 nm dentro de una hora luego de haber agregado la solución de parada. (73)

7.7 Anexo 7. Ensayo de citotoxicidad con MTT.

Protocolo general para realizar ensayos de MTT (74)

- Disociar las células con tripsina EDTA y resuspender en medio de cultivo suplementado
- Sembrar las células de estudio en placas de 96 pozos. Tener en cuenta que aproximadamente debe haber 50.000 células por pozo.
- Incubar a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia.
- Añadir 20 µL de extracto o sustancia de estudio al pozo teniendo en cuenta la concentración deseada.
- Incubar a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir que la sustancia actúe en todas las células.
- Descartar el medio de los pozos.
- Añadir 100 µL de medio sin suero y sin rojo de fenol por pozo.
- Añadir 50 µL de MTT (mg/ml) en solución tampón libre de calcio y magnesio.
- Incubar por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán.
- Descartar el sobrenadante.
- Añadir 100 µL de isopropanol.
- Disponer a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazan sean disueltos.
- La lectura de densidad óptica (DO) se realiza en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

7.8 Anexo 8. Tablas.

Espece	Parte de la planta	Actividad antiparasitaria	Ensayos realizados en modelos celulares	Se encuentra en Colombia	Referencia
<i>Piper barbatum</i>	H	IC ₅₀ 10 µg/mL	No	Si	Calderon AL (15)
<i>Piper holtonii</i>	R	IC ₅₀ 10 µg/mL	No	Si	Calderon AL (15)
<i>Piper crassinervium</i>	F	IC ₅₀ 36,79 µg/mL	No	Si	Passerini G (16)
<i>Piper heterophyllum</i> , <i>Piper aduncum</i> *	H	IC ₅₀ 16,5 µg/mL	No	Si	Flores N (17)
<i>Piper regnellii</i>	H	AS 89,7%: 100 mg/ml	Si	No	Luize PS (18)
<i>Piper arboreum</i>	F/H/T	IC ₅₀ 79,3 - 66,1 y >100 µg/mL	No	Si	Regasini LO (19)
<i>Piper tuberculatum</i>	F/H/T	IC ₅₀ 82 - 44,6 y >100 µg/mL	No	Si	Regasini LO (19)
<i>Piper cubebin</i> *	F	RP 70,8%: 20 mg/kg	Si	No	Rodrigues V (20)
<i>Piper ovatum</i> *	H	IC ₅₀ 41,5 ± 0,7 y 53,8 ± 6,2 µM	Si	No	Veiga-Santos P (21)
<i>Piper regnellii</i> *	H	IC ₅₀ 40,5 µM	Si	No	Pelizzaro-Rocha KJ (22)
<i>Piper glabratum</i> , <i>Piper acutifolium</i> *	H	IC ₅₀ 16,4 - 15,6, y 18,5 µg/mL	No	Si	Flores N (23)
<i>Piper regnellii</i> *	H/R	IC ₅₀ 7,0 µg /mL	Si	No	Shima P (24)
<i>Piper regnellii</i> *	H	IC ₅₀ 7,0 - 7,5 y 80 µg /mL	Si	No	Shima P (25)
<i>Piper aduncum</i>	H	IC ₅₀ 0,96 mg/mL	No	Si	Avalos L (26)
<i>Piper arboreum</i>	H	AS 69%: 500 µg /mL	Si	Si	Gomes F (27)
<i>Piper fuligineum</i>	H	IC ₅₀ 26,67 mg/mL	No	Si	Mazzeu B (28)
<i>Piper regnellii</i>	H/R	IC ₅₀ 500 µg/mL	No	No	Barbieri F (29)

H: Hojas F: Frutos T: Tallos R: Raíces

Tabla 1. Plantas del género Piper cuyos metabolitos presentes en sus extractos etanólicos demostraron tener efecto tripanocida. Construcción propia, Parra JD, 2021.

*: Estudio con metabolitos específicos.

IC50: Concentración en la que se inhibe el crecimiento de la población en un 50%, **AS:** Afectación de la supervivencia, **RP:** Reducción de la parasitemia.

Especie	Modelo celular empleado				Referencia
	Glóbulos rojos	Células LLC-MK2	Células Vero	Fibroblastos NCTC929	
<i>Piper regnellii</i>	X				Luize PS (18)
<i>Piper cubebin</i>		X			Rodrigues V (20)
<i>Piper ovatum</i>		X			Veiga-Santos P (21)
<i>Piper regnellii</i>		X			Pelizzaro-Rocha KJ (22)
<i>Piper regnellii</i>		X			Shima P (24)
<i>Piper regnellii</i>	X		X		Shima P (25)
<i>Piper arboreum</i>				X	Gomes F (27)

Tabla 2. Modelos celulares empleados en los 7 estudios seleccionados. Construcción propia, Parra JD, 2021.

7.9 Anexo 9. Estrategia para el planteamiento metodológico.

Teniendo en cuenta los objetivos planteados para el desarrollo óptimo del presente estudio, se realizó una búsqueda sistemática de artículos y tesis que reporten ensayos de citotoxicidad contra parásitos de *Trypanosoma cruzi* u homólogos, para extractos etanólicos de plantas del género *Piper*, con el fin de encontrar resultados que demuestren acción tripanocida que tenga potencial terapéutico en sus componentes.

Con este fin, la búsqueda se realizó con ayuda de bases de datos que permiten el acceso al material de investigación en línea. Dichas bases de datos consultadas fueron: NCBI/ PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), Science direct (<https://www.sciencedirect.com/>), Google scholar (<https://scholar.google.com/>), Springer (<https://www.springer.com/la>) Scielo (<https://scielo.org/es/>) y Scopus (<https://www.scopus.com/>).

El proceso de búsqueda en estas bases de datos se realizó haciendo uso de palabras clave, tanto en español como en inglés, las cuales fueron: *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas, Extractos etanólicos, Extractos EtOH, Extractos hidroalcohólicos, *Piper*, *Piperaceae*, Citotoxicidad, Efecto tripanocida, Efecto antiparasitario y Ensayo citotóxico, junto con conectores booleanos, para construir ecuaciones que correspondieran a un orden lógico de búsqueda que facilitaron la consulta.

Como criterios de elegibilidad y exclusión para los estudios analizados en el presente trabajo, se tuvo en cuenta los siguientes ítems:

- El modelo celular empleado para determinar el efecto antiparasitario debe ser un estadio del parásito *Trypanosoma cruzi* o un parásito homólogo que se utilice con fines de investigación.
- Los compuestos químicos analizados en el ensayo deben provenir de una extracción primaria cuyo solvente sea Etanol, se tienen en cuenta extractos crudos y fracciones o moléculas que provengan de extractos crudos.
- Los extractos analizados deben proceder de especies de plantas que pertenezcan al género *Piper*, dicha especie debe ser informada en el estudio, además de especificar la parte de la planta empleada para obtener el extracto.
- Los resultados de los ensayos deben ser informados en el documento consultado, dichos resultados deben ser reportados en términos de actividad antiparasitaria.

Con el cumplimiento de los anteriores criterios, se determinó qué estudios eran relevantes para el desarrollo del presente trabajo y se desarrolló el análisis propuesto en los resultados.