

Propiedad antichagásica *in vitro* e *in vivo* de maculina aislada de *Helietta apiculata* Benth. (Rutaceae)

María Elena Ferreira^{1,2}, Hector Nakayama¹, Susana Torres¹, Gloria Yaluff^{1,2}, Luis Sanabria¹, Ninfa Vera de Bilbao¹, Alicia Schinini¹, Antonieta Rojas de Arias³, Isabelle Guy⁴, Helene Guinaudeau⁴, Alain Fournet⁵

¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – UNA

² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UNA

³ Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC/FMB/Diaz Gill Medicina Laboratorial), Asunción, Paraguay CEDIC.

⁴ Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux, Faculté de Pharmacie, Université d'Angers, Angers, France.

⁵ IRD US 084, Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, rue J.B. Clément, 92296 Châtenay.-Malabry cedex, France.

E mail del autor: meferpar@hotmail.com

Actividad antichagásica *in vitro* e *in vivo* de maculina aislada de *Helietta apiculata* Benth (Rutaceae).

La enfermedad de Chagas es uno de los problemas de salud pública más graves en el continente americano. Más allá de las campañas y programas que los países han desarrollado para informar, prevenir y sensibilizar sobre la enfermedad, sus causas y formas de transmisión, el verdadero desafío está en encontrar una cura. En este trabajo se estudió la actividad anti-*T. cruzi* de maculina aislada a partir de corteza de tallo de *Helietta apiculata* Benth —una Rutaceae muy abundante en Paraguay— y estudiada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* sobre la cepa CI (Brener). En los ensayos *in vitro* la maculina presentó niveles muy bajos de actividad anti-*T. cruzi*; sin embargo, el ensayo *in vivo* presentó nivel alto de actividad. La maculina modificó el curso de la infección en ratones en comparación con el grupo control, presentando parasitemias en 62,5% en la administración por vía sub-cutánea y en 97,5% por vía oral, en los días 18 y 68 post-infección respectivamente, a diferencia del grupo control que presentó 100% de parasitemia. Los ratones tratados con benznidazol y maculina comparados con el grupo control en todo el curso de la infección presentaron diferencias significativas en la disminución de la parasitemia, el benznidazol ($p < 0,005$) y la maculina ($p < 0,001$), ambos administrados por vía oral y la maculina por vía sub-cutánea ($p < 0,005$) respectivamente. En la evaluación serológica (ELISA), los ratones tratados con maculina y benznidazol —ambos por vía oral— presentaron 75% de serología negativa en la primera determinación, ambos estadísticamente significativos, el benznidazol ($P < 0,001$) y la maculina ($P < 0,05$), y los valores de densidad óptica más bajos en el benznidazol. En la segunda determinación se observa 37,5% de negativización serológica en todos los grupos tratados, también estadísticamente significativos, donde la maculina presentó valores de ($p < 0,001$) y el benznidazol ($P < 0,05$), ambos vía oral y la maculina ($P < 0,05$) vía subcutánea. Los valores de la densidad óptica más bajos se vieron en maculina administrada por vía oral.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, *Helietta apiculata*, maculina, ensayos biológicos

***In vitro* and *in vivo* antichagasic activity of maculine isolated from *Helietta apiculata* Benth (Rutaceae).** Chagas disease is one of the most serious public health problems in the Americas. Beyond the campaigns and programs that countries have developed to inform, prevent and raise awareness, the real challenge is to find treatment. This work studied the *in vitro* and *in vivo* anti-*T. cruzi* activity of maculine isolated from the stem bark of *Helietta apiculata* Benth on the CI (Brener) strain of *T. cruzi*. *In vitro* bioassays with maculine showed very low level of activity against *T. cruzi*; however, the *in vivo* assays presented a high level of activity. Maculine modified the course of infection compared to the control group; presenting parasitaemia in 62.5% in subcutaneous administration and 97.5% in oral administration at 18 and

68 days post-infection respectively, while the control group presented 100% of parasitaemia. Mice treated with maculine, compared to the control group, showed significant differences in the decrease of parasitaemia; benznidazole ($P < 0.005$) and maculine ($P < 0.01$), both administered orally, and maculine ($P < 0.05$) administered subcutaneously. In the serological evaluation (ELISA), mice treated with maculine and benznidazole —both orally administered— presented 75% of negative serology in the first determination, both statistically significant, benznidazole ($P < 0.001$) and maculine ($P < 0.05$); and the lowest optical density values were observed in benznidazole. In the second determination, 37.5% of mice showed negative serology in all treated groups, also statistically significant, where maculine presented ($p < 0.001$) values and benznidazole presented ($P < 0.05$) values when administered orally; and maculine showed ($P < 0.05$) values when administered subcutaneously. The lowest optical density values were observed in orally administered maculine.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Helietta apiculata*, biological assays

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de los medicamentos, ya que han contribuido grandemente al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la producción de fitofármacos. Es la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países (Tillan, 2002).

En Paraguay, los practicantes de la medicina tradicional son abundantes y formulan tratamientos basados mayoritariamente en plantas, si bien los aspectos como la calidad, la seguridad y la eficacia requieren de una atención más científica y dedicada (Ibarrola, et al. 2011). Habitamos un país con gran número de especies vegetales utilizadas para fines medicinales, y localmente existen demandas de la sociedad para la cobertura en productos innovadores en las áreas de la salud, industria y gestión del ambiente. Disponemos de especies nativas domesticadas, que racionalmente utilizadas asegurarán el desarrollo sustentable del rubro. En el mismo sentido, la OMS reconoce y recomienda la validación científica de la medicina popular en vistas a implementar programas sanitarios basados en plantas, que por ser de uso corriente, ven su aceptación facilitada. Las plantas medicinales han sido identificadas como una oportunidad en el campo de la ciencia, la tec-

nología y la innovación para el desarrollo, y puede ser capitalizado, a través del conocimiento, hacia la generación de genuinos recursos financieros (Ibarrola et al. 2011)

Las infecciones parasitarias son un problema de salud a nivel mundial: esto es particularmente cierto para los países subdesarrollados, donde estas enfermedades también causan una pérdida económica importante (Rollo 1991). La enfermedad de Chagas es uno de los problemas de salud pública más graves que existe en el continente. Más allá de las campañas y programas que los países han desarrollado para informar, prevenir y sensibilizar a las personas sobre la enfermedad, sus causas y formas de transmisión, el verdadero desafío está en encontrar una cura.

El tratamiento actualmente disponible en el mercado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas está limitado a solo dos medicamentos: nifurtimox (Lampit®, Bayer) y benznidazol (Lafepe®, Brasil). Estos compuestos presentan severos efectos colaterales y son más exitosos en la infección aguda y en la crónica temprana (De Andrade et al. 1996). Generalmente, la enfermedad se diagnostica en la fase crónica cuando la terapia ya es ineficaz (Cerecetto and Gonzalez 2002; Caldas et al. 2008). Existe una urgente necesidad de nuevos medicamentos para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas (Rassi et al. 2010). Aunque se necesitan nuevos y eficientes tratamientos para la enfermedad, solo una clase de drogas está en desarrollo clínico, los

triazoles, que han emergido como un nuevo tratamiento potencial (Ribeiro et al. 2009).

En estudios recientes se han demostrado que el extracto crudo de la corteza del tallo y las hojas de una planta perteneciente a la flora paraguaya el *Zanthoxylum chiloperone* y los alcaloides de tipo canthinonas, canthin-6-ona y 5-methoxycanthin-6-ona, extraídos de esa misma planta presentaron actividad contra el *Trypanosoma cruzi* (Ferreira et al. 2007), por lo que se ha sugerido que el estudio de otras plantas puede ser un camino de interés para el tratamiento barato y seguro frente a cepas resistentes a los pocos medicamentos existentes actualmente contra el *T. cruzi*.

En éste trabajo se estudió la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* en ensayos *in vitro* e *in vivo* sobre la cepa Cl (Brenner) del alcaloide maculina (Figura 1) aislado a partir de corteza de tallo de *Helietta apiculata* Benth una Rutaceae muy abundante en nuestro país.

El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad anti-*Trypanosoma cruzi in vitro* del alcaloide maculina extraído de la corteza de tallo de *Helietta apiculata* Benth., en ensayos *in vitro* e *in vivo* frente a parásitos CL (Brenner) de *Trypanosoma cruzi* por vías oral y subcutánea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la evaluación antiparasitaria se utilizaron ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*” en modelos de investigación en ratones, como paso importante para ensayos más avanzados, como son los modos de acción de la droga y estudios farmacodinámicos.

Material de estudio

Colecta de los especímenes vegetales en estudio

La especie vegetal *Helietta apiculata* Benth. utilizada para la realización de los ensayos *in vitro* e *in vivo* fue recolectada por

A. Fournet y M. E. Ferreira en el mes de marzo de 1995 en la Compañía Paso hú de Piribebuy, Departamento de Cordillera, Paraguay, e identificado por N. Soria (Departamento de Botánica de la Facultad Ciencias Químicas Universidad Nacional de Asunción, Paraguay).

Identificación Taxonómica y descripción de los especímenes vegetales

Es una especie botánica de la familia Rutaceae. Es endémica de Argentina y Paraguay. Es heliófita, de matorrales y otros ambientes caracterizados por formaciones subclimáticas edáficas, encontrándose asociada con pindo (*Syagrus romanzoffiana*). También habita sitios húmedos secundarios y chacras. Es endémica en la zona de Piribebuy, lugar donde se realizó la cosecha de los especímenes estudiados.

Nombres vernáculos: “yvyrá oví” (yvyrá= árbol, ov= hoja, i= pequeña) es decir, árbol de hojas pequeñas o puntiagudas”; “yvyrá oví guasú” (guasú= grande o mayor) refiriéndose al tamaño del árbol. Es un árbol siempre verde, de tamaño mediano con una altura de 10 – 25 m. Es muy difundido en la Región oriental, tanto en la cuenca del río Paraná como en la del Paraguay. Su madera amarilla es usada para la confección de flechas y arcos por los indios mbyá. Localmente se utiliza la madera en construcción y para la fabricación de carretas, yugos y otros artículos de utilidad rural. Es además fuente de energía ya que con él se prepara leña y carbón, su regeneración es rápida (Basualdo et al. 1997). En los yerbales la prefieren para el sapecado y tostado de la yerba mate porque despiden muy poco humo al arder (López 1987) Su corteza tiene virtudes afrodisíacas. Utilizada también, en la elaboración de utensilios como mango de herramientas. Además, es utilizada por sus propiedades anti-inflamatorias como medicina popular en forma de infusiones. (Ferreira et al. 2011). El

secado, envenenado y montaje de ejemplares fue realizado según metodología convencional para tratamiento de especímenes.

La identificación correcta del ejemplar en estudio con el concurso de un profesional Botánico (Dra. Nélide Soria) es un paso indispensable antes del estudio fitoquímico, farmacológico y/o toxicológico (Miguel Martínez et al. 2011). Un espécimen de la planta fue depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas UNA con el código (AF 912), luego de haber sido identificado por la Dra. Nélide Soria.

Preparación de los materiales vegetales para extracción y uso

La corteza de *Helietta apiculata* Benth. utilizada en este estudio, fue secada a temperatura ambiente durante una semana, bajo sombra, para evitar la acción de la luz, la temperatura y la acción de microorganismos que pudieran descomponer los compuestos originales (Miguel Martínez et al, 2011).

Molienda y tamizado del material vegetal seco

La molienda se ha realizado con una máquina forrajera convencional y el tamizado por medio de un tamiz de acero inoxidable de 0.5 mm de diámetro. Todos los aislamientos finales e identificaciones de los productos de ésta planta fueron realizados en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Angers-Francia, por las Dras. Isabelle Guy y Helene Guinaudeau coordinados por el Dr. Alain Fournet.

Ensayos in vivo e in vitro (Lisis de parásitos) de Helietta apiculata.

Estudios in vitro (Lisis de parásitos)

Fueron utilizados ratones albinos obtenidos en el bioterio del IICS (Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud –

UNA), infectados experimentalmente con parásitos sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* de la cepa CL (Brenner) mantenidos en ratones albinos e identificados por análisis isoenzimático. La sangre de los ratones albinos infectados se obtuvo por punción cardíaca usando citrato de sodio al 3.8 % como anticoagulante en una relación sangre/anticoagulante de 7:3. La maculina (Figura 1) fue disuelta en DMSO (ácido dimetilsulfóxido) a una concentración final de 250 ug/ml.

Alícuotas de 10 ul del producto en diferentes concentraciones (4, 20, 100 y 250 ug/ml) fueron mezcladas en microplacas con 100 ul de sangre conteniendo concentraciones de parásitos de 1×10^6 parásitos por ml. Sangre infectada con DMSO y sangre infectada conteniendo violeta de genciana fueron usadas como controles. Las placas fueron agitadas por 10 minutos a temperatura ambiente luego mantenidas a 4 °C por 24 horas. Cada solución con 5 ul de muestra en lámina cubierta con laminilla 22x22 fue observada al microscopio con objetivo de 400 X, para el conteo de parásitos (Fournet et al. 1996).

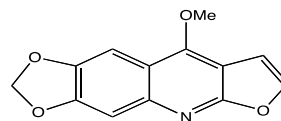


Figura 1. Estructura de la furoquinoleína maculina (1) extraída de *Helietta apiculata*

Estudios in vivo

Animales experimentales. Ratones albinos machos y hembras criados y mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), Asunción – Paraguay.

Tratamiento con las drogas. Los tratamientos se iniciaron al comprobarse que la infección estuviera bien establecida, a través de parasitemias directas, lo que ocurrió a tres días post-infección, y duró 15

días con una administración diaria. Los ratones fueron divididos al azar en cuatro grupos de ocho ratones cada uno. El benznidazol por vía oral a una concentración de 50 ug/ml fue utilizado como droga de referencia. La maculina fue administrada por vía oral y sub-cutánea a una concentración de 5 mg/kg de peso, y un grupo infectado fue el control no tratado a quienes se les administró por vía oral solución fisiológica.

En todos los grupos de ratones las parasitemias fueron determinadas en sangre venosa de la cola semanalmente durante 68 días. El suero de los ratones infectados fue evaluado por un ensayo inmunoenzimático (ELISA), al terminar el tratamiento y al finalizar el protocolo, con el fin de determinar el nivel de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*. Una vez obtenido todos los resultados se analizaron estadísticamente.

Las diferencias entre los grupos se determinaron usando el test *t* de Student. La significancia se estableció para $P < 0.05$. (Ferreira et al. 2011)

RESULTADOS

Ensayos in vitro e in vivo

En los ensayos *in vitro* realizados con el producto maculina (Figura 1), extraído de la corteza de tallo de *Helietta apiculata* Benth., podemos observar que presentó 63 % de lisis de parásitos, niveles muy bajos de actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, sin embargo, en los ensayos *in vivo* presentó resultados muy auspiciosos. La maculina (Vaquette et al. 1976), extraída de *Helietta apiculata* Benth. fué bien tolerada por los ratones y no pudimos observar ningún efecto colateral en los experimentos. A continuación se presentan las tablas de resultados de los ensayos in vivo realizados.

Tabla 1. Efecto del tratamiento con maculina, en ratones experimentalmente infectados con *Trypanosoma cruzi* (fase aguda). Evaluación parasitológica

Días post-infección	Control	PARASITEMIA MEDIA ± SD		
		Benznidazol (50 mg)	Maculina (oral) (5 mg)	Maculina (SC) (5 mg)
4	0	0	0	0
11 *	90.8 ± 257	0	0	0
18 *	313.6 ± 48.7	34.9 + 98.6	748.4 + 1424.9	0
25 *	387.3 + 671.1	250.1 + 503.5	264.8 + 281.8	213.4 + 354.4
32	241.1 + 553.2	296.8 + 625.5	431.6 + 840.5	192.8 + 268.5
40	870.5 + 1902.1	118.3 + 192.9	154.9 + 185.4	230.9 + 276.7
45	865.8 + 1022.7	300.8 + 431.6	78.9 + 126.1 p < 0.005	85.4 + 140.6 p < 0.005
53	1273.3 + 1647.8	23.3 + 65.8 p < 0.05	25.8 + 72.8 p < 0.005	55.9 + 158.0
60	1050 + 2605.5	65.3 + 93.2	1346.6 + 254.9	150.4 + 391.7
68	1144.1 + 1641.9	9.4 + 26.5	85.1 + 153.1	5.3 + 14.8

*Periodo de tratamiento (dos semanas)
P < 0.005 con relación al control

Benznidazol: droga de referencia
N° de ratones por grupo: 8

Tabla 2. Efecto del tratamiento con maculina en ratones experimentalmente infectados con *Trypanosoma cruzi* (Fase aguda). Evaluación serológica

Producto (Dosis)	Nº ratones	Via Adm.	Dosis	1º Serología ^(a) Densidad óptica (Cut-off, 0,264)	Negativización serológica ^(a)	2º Serología ^(b) Densidad óptica (Cut-off, 0,264)	Negativización Serológica ^(b)
Control (PBS)	8	Oral	-	0.3985 ± 0.0922	0 % (0/8)	1598 ± 382	0 % (0/8)
Benznidazol (50 mg/kg)	8	Oral	50 mg	0.1692 ± 0.1179 p < 0.001	75 % (6/8)	793 ± 860 p < 0.05	37.5 % (3/8)
Maculina (5 mg/kg)	8	Oral	5 mg	0.2098 ± 0.1368 p < 0.05	75 % (6/8)	319 ± 591 p < 0.001	37.5 % (3/8)
Maculina (5 mg/kg)	8	S C	5 mg	0.2795 ± 0.1944	50 % (4/8)	582 ± 842 p < 0.05	37.5 % (3/8)

(a) 40 días post-infección; 15 días post-finalización del tratamiento. P<0.001 c/ relación al control

(b) 68 días post-infección; 45 días post-finalización del tratamiento. P>0.05 c/ relación al control
Benznidazol: droga de referencia

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En los ensayos *in vitro* realizados con el producto maculina, extraído de la corteza de tallo de *Helietta apiculata* Benth., podemos observar que presentó 63 % de lisis de parásitos, niveles muy bajos de actividad ant- *Trypanosoma cruzi*, sin embargo, en los ensayos *in vivo* presentó resultados muy auspiciosos.

La administración de maculina modificó el curso de la infección comparado con el grupo control; los niveles de parasitemia se pueden ver en la Tabla 2. Este grupo presentó el día 18 post-infección parasitemias negativas en 5 de 8 ratones (62.5%) y el día 68 (día del sacrificio) 7 de 8 ratones (87.5%) con parasitemias negativas a diferencia del control (Tabla 1).

Los ratones tratados con el benznidazol, demostraron que en todo el curso de la infección presentaron diferencias significativas (P<0,005) en la disminución de la parasitemia comparadas con el grupo control, lo mismo que los tratados con maculina por vía oral y sub-cutánea que alcanzaron diferencias signifi-

ficativas de P < 0,01 y P < 0.005 respectivamente.

En la Tabla 3 están presentados los resultados de la evaluación serológica (ELISA), y vemos que la maculina administrada por vía oral presentó el mismo comportamiento que el benznidazol, comparadas con el grupo control, con 75% de negativización serológica para ambos grupos en la primera determinación, siendo estadísticamente significativa para P < 0.001 en el benznidazol y P < 0.05 para la maculina, siendo los valores de la densidad óptica más bajos en el benznidazol. En la segunda determinación se observó un 37.5% de negativización serológica en los tres grupos tratados, con una inversión de los valores de densidad optica para la maculina administrada por vía oral (p < 0.001) al comparar con la densidad optica del benznidazol y la maculina administrada por vía subcutánea (P < 0.05) (Tabla 2). Aunque la respuesta inmune en este modelo fue más evidente en animales tratados con benznidazol y la maculina por vía oral que en los ratones no tratados, se debe destacar que el criterio de cura es la negativización de las pruebas serológicas o

al menos, una regresión progresiva y persistente del título de anticuerpos (Ferreira et al. 2007).

Este estudio mostró que el tratamiento con maculina por vía oral a ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* produjo la cura parasitológica y serológica similares a los tratados con la droga de referencia, el benznidazol, pues se observó negativización serológica y parasitológica en porcentajes similares en ambos grupos.

En conclusión, este estudio revela que el producto maculina aislado de la corteza de tallo de *Helietta apiculata* presenta un efecto tripanocida en ensayos experimentales *in vivo*, constituyéndose en excelente candidato para completar estudios biológicos, toxicológicos y químicos y se convierte en una nueva perspectiva para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Finalmente debemos recalcar que el uso tradicional de plantas medicinales para una gran parte de la población mundial, es la única vía de tratamiento contra éstas y muchas otras enfermedades, y que la investigación de los productos naturales puede ser empleada para la solución de problemas de salud y bienestar del hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, A. R., Ferro, E. A. 1988. "Quantificación of *Trypanosoma cruzi* parasitemia Bydirect Micromethd". *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82: 248.
- Basualdo, I., Soria Rey, N., Keel, S., Rivarola, N. 1997. "Recursos Fitogenéticos. Parque Nacional Cerro Corá-Amambay. Plantas Útiles". DPNUS. Facultad de Ciencias Químicas S. Lorenzo - Paraguay, *The Nature Conservancy*. p. 66-67.
- Caldas, I. S., Talvani, A., Caldas, S., Carneiro, C.M., de Lana, M., da Matta Guedes, P. M., Bahia, M.T. 2008. "Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions". *Parasitology Research* 103, 413–421.
- Cerecetto, H. & Gonzalez, M. 2002. "Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments". *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2, 1187–1213.
- De Andrade, A.L., Zicker, F., de Oliveira, R.M., Almeida Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L.R., Almeida, I.C., de Andrade, S.S., de Andrade, J.G., Martelli, C.M. 1996. "Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection". *Lancet* 348, 1407–1413.
- Dreyer, D.L. 1969. "Coumarins and alkaloids of the Genus *Ptelea*". *Phytochemistry* 8, 1013–1020.
- Ferreira, M.E., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Schinini, A., Vera de Bilbao, N., Serna, E., Torres de Ortiz, S., Sanabria, L., Lagoutte, D., Soriano-Agatón, F., Poupon, E., Hocquemiller, R., Fournet, A. 2007. "Effects of alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice". *Journal of Ethnopharmacology* 109, 258–263.
- Ferreira, M. E., Cebrián-Torrejón, G., Segovia Corrales, A., Vera de Bilbao, N., Rolón M., Vega Gómez, C., Leblanc, K., Yaluff, G., Schinini, A., Tórrés, S., Rojas de Arias, A., Poupon, E., Fournet, A. 2010. "*Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: First Sustainable Chagas Disease treatment". *Journal Ethnopharmacol.* Doi. 10.1016/j.jep.2010.2011.032
- Ferreira, M. E., Rojas de Arias, A., Yaluff, G., Vera de Bilbao, N., Nakayama, H., Torres, S., Schinini, A., Guyc, I., Heinzen, H., Fournet, A. 2010. "Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*". *Phytomedicine* 17 375–378.

- Steviana*, Vol. 6. 2014. Ferreira et al. Propiedad antichagásica in vitro e in vivo de maculina aislada de *Helietta apiculata* Benth. (Rutaceae)
doi:10.1016/j.phymed.2009.09.009.
- Fournet, A., Ferreira, M. E., Rojas de Arias, A., Schinini, A., Nakayama, H., Tórres, S., Sanabria, R., Guinaudeau, H. & Bruneton, J. 1996. "The effect of bisbenzyisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi*" *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol 91, p 315.
- Galan, R.H., Massanet, G.M., Pando, E., Rodríguez, L.F., Salva, J. 1988. Synthesis of (7)3-1',1'-dimethylallyl)decursinol and 3-(1'-1'-dimethylallyl) xanthyletin. *Heterocycles* 27, 775-777.
- Ibarrola, D. A. y Dejen de Arrúa, R. L. (Editores) 2011. "Catálogo Ilustrado de 80 plantas Medicinales del Paraguay". *Facultad de Ciencias Químicas - UNA & Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)*. Pp. 178.
- Ito, C., Itoigawa, M., Otsuka, T., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H. 2000. "Constituents of *Boronia pinnata*" *J. Nat. Prod.* 63, 1344-1348.
- López, J. A., Little Jr., E. L., Ritz, G. F., Rombold, J. S., Hahn, W. J., Sterrett, W. R., Mc Donald, M. J. 1987. "Arboles comunes del Paraguay - *Ñande yvyra mata kuera*". *Cuerpo de Paz*.
- Martínez, M., Pereira, C., González, F., Benítez, B., Verdán, M., Obdulio, M., Miyazaki, C. 2011. "Estudio y utilización de dos especies vegetales para la obtención de un medicamento piloto rico en minerales y omega-3. *Steviana*, Vol. 3. pp. 54-68". En: Hostettmann K. et al, 2008. "Manual de Estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos". Bogotá - Colombia: Convenio Andrés Bello. 120p.
- Mester, I. 1983. "Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales". In: Waterman, P.G. (Ed.), *Grundon Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*". *Academic Press, London*.
- Pozzi, H., Sanchez, E., Comin, J.H. 1967. "Studies on argentine plants—XXII: Heliettin, a new furocoumarine from *Helietta longifoliata* Britt". *Tetrahedron* 23, 1129-1137.
- Rassi Jr., A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A. 2010. "Chagas disease". *Lancet* 375, 1388-1402.
- Robertson, A.V. 1963. "The protonmagnetic resonance of furoquinoline alkaloids and related compounds". *Austr. J. Chem.* 6, 451-458.
- Ribeiro, I., Sevcsik, A.M., Alves, F., Diap, G., Don, R., Harhay, M.O., Chang, S., Pecoul, B. 2009. "New, improved treatments for Chagas disease: from the R & D pipeline to the patients". *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e 4841, 1-6.
- Rollo, I. M. 1991. "Medicamentos empleados en el Tratamiento de las infecciones por protozoos". En: Goodman L S & Gilman A. "Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Quimioterapia de las parasitosis" Cap. 54. p. 906-913.
- Sankar, S.S., Gilbert, R.D., Fornes, R.E. 1982. "13C NMR studies of some hydroxycoumarins and related compounds". *Organ. Magn. Reson.* 19, 222-224.
- Tillan, J. 2002 Editorial. *Rev. Cub. de Plantas Medicinales*. Vol 7 02. En: Fragas, I.; Melchor, G.; Ruiz, L.; Fernández, O.; Lorenzo, O. y Rodríguez, J." Estudio de eficacia farmacológica de una crema de *Rhizophora mangle* L." *Rev. Salud Anim.* Vol. 25 No. 3: 173-179.
- Vaquette, J., Hifnawy, M.S., Pousset, J. L., Fournet, A., Cave, A. 1976. "Alcaloides d' *Araliopsis soyauxii*". *Phytochemistry* 15, 743-745.