

Evaluación química y biológica del efecto de extractos de plantas contra *Plasmodium berghei*

Oscar Castro¹, Mariano Barrios, Misael Chinchilla² y Olga Guerrero

¹ Universidad Nacional, Departamento de Química, Heredia, Costa Rica.

² Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, San José, Costa Rica.

(Rec. 3-XII-1995. Rev. 5-I-1996. Acep. 10-I-1996)

Abstract: Extracts from thirteen species of plants were evaluated by "in vivo" antimalarial test against *Plasmodium berghei* effects. Significant activities were observed in the ethyl acetate and aqueous extracts, elaborated of *Cedrela tonduzii* leaves, *Trichilia havanensis* and *Trichilia americana* barks, *Neurolaena lobata* and *Gliricidia sepium* leaves and *Duranta repens* fruits. Compounds identified include flavonoids, coumarins, mellilotic acid and iridoids which some kind of biodinamic activity has previously been reported. The flavone quercetin 1 purified from *C. tonduzii* gave strong antimalarial activity, however, its respective glycosides (quercetin 3-glucoside 2 y robinine 7) showed little significant activity.

Key words: *Plasmodium berghei*, flavones, catechins, coumarin, mellilotic acid, iridoids, resistance.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha estimado que actualmente alrededor de 250 millones de personas son crónicamente afectadas por especies del género *Plasmodium* y que se presentan más de 150 millones de nuevos casos. No obstante, los exitosos esfuerzos por erradicar el mosquito *Anopheles* spp., transmisor de la malaria, esta enfermedad continúa siendo una de las causas de muerte más importantes en muchos de los países tropicales del mundo. Un factor que continúa favoreciendo la propagación de este mal, es la creciente resistencia del mosquito transmisor a insecticidas, agentes químicos, de por sí extremadamente tóxicos a la vida animal en el planeta y, la resistencia de especies de *Plasmodium* a reconocidos agentes terapéuticos como la cloroquina.

Por muchos años, *Cinchona officinalis* (Rubiaceae), ha sido la fuente natural proveedora de la quinina, considerada la droga antimalárica más exitosa que conoce el hombre. Posteriormente, aunque surgieron análogos sintéticos, tales como la cloroquina, que desplazaron drásticamente su empleo en el mercado farmacéutico, recientes in-

vestigaciones han puesto de nuevo al descubierto las bondades de la quinina, en atención a que induce la resistencia de especies de *Plasmodium*, en mucho menor grado que las drogas sintéticas. Recientemente, nuevos compuestos antimaláricos descubiertos en plantas empleadas en la medicina tradicional China, como Artemisina y febrifugina, aisladas respectivamente de *Artemisia annua*, Compositae y *Dichroea febrifuga* Saxifragaceae (Klayman 1985), han renovado el interés por identificar en fuentes botánicas nuevos principios activos (Fig.1).

Artemisina, como producto natural, debido a su baja solubilidad en solventes acuosos y aceitosos, ha presentado algunas desventajas para su aplicación clínica directa. Sin embargo, actualmente se ha formulado una sal de sodio como un derivado sintético, muy soluble en agua y con mejores efectos terapéuticos sobre cepas de *P. berghei* y *P. knowlesi* resistentes a Cloroquina. Febrifugina ha sido clínicamente empleada contra *P. vivax* y *P. ovale*, pero actualmente no se recomienda su empleo porque causa daños al hígado (O' Neill *et al.* 1985).

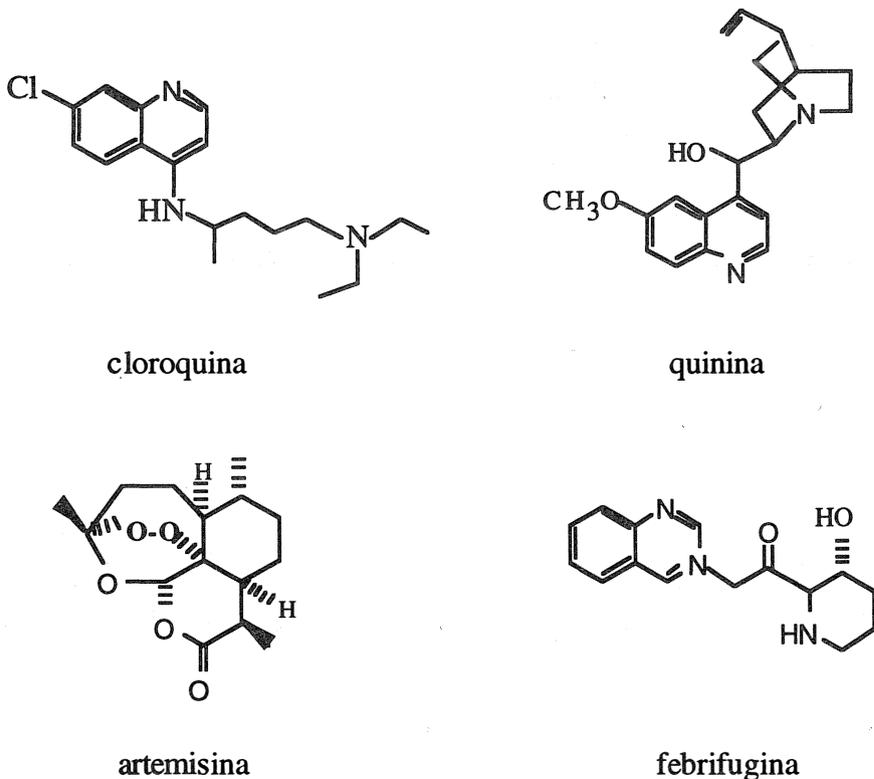


Fig. 1. Drogas de importancia antimalárica.

Esta investigación ofrece informes preliminares sobre algunas plantas de nuestro bosque tropical, que podrían representar, en algún momento, opciones para el tratamiento de la malaria.

MATERIAL Y METODOS

Plantas estudiadas: Tomando como base principalmente criterios etnobotánicos y quimiosistemáticos, se seleccionaron 13 especies de plantas distribuidas en las siguientes familias botánicas: Meliaceae (ocho): *Cedrela odorata*, *Cedrela salvadorensis*, *Cedrela tonduzii*, *Trichilia americana*, *Trichilia arborea*, *Trichilia havanensis*, *Trichilia martiana* y *Trichilia trifolia*. Simaroubaceae (dos): *Picramnia antidesma* y *Simaba cedrón*. Fabaceae/Papilionaceae (una): *Gliricidia sepium*. Asteraceae (una): *Neurolaena lobata* y Verbenaceae (una): *Duranta repens*. Los extractos de estas plantas fueron preparados a partir de hojas y

cortezas incluyéndose en algunos casos frutos. Por lo general se recolectaron muestras que pesaron crudas aproximadamente un kilo.

Preparación de extractos: Las hojas, cortezas y los frutos fueron licuados con una mezcla etanol agua (80:20) y dejados en maceración en frío durante 48 horas. Este procedimiento se repitió por tres veces y los extractos alcohólicos acuosos obtenidos se concentraron, hasta consistencia siruposa, mediante destilación al vacío a temperaturas inferiores a 45°C. Extractos liofilizados se entregaron para el ensayo biológico en muestras que pesaron de 1 a 4 g. Los extractos crudos alcohólicos originales que revelaron efectos positivos importantes, fueron extraídos, sucesivamente, con los siguientes solventes de polaridad creciente: éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo. Todos estos extractos, incluyendo los extractos alcohólicos acuosos remanentes, fueron evaluados para reconocer la naturaleza química del extracto donde se concentra la mayor actividad antimalárica.

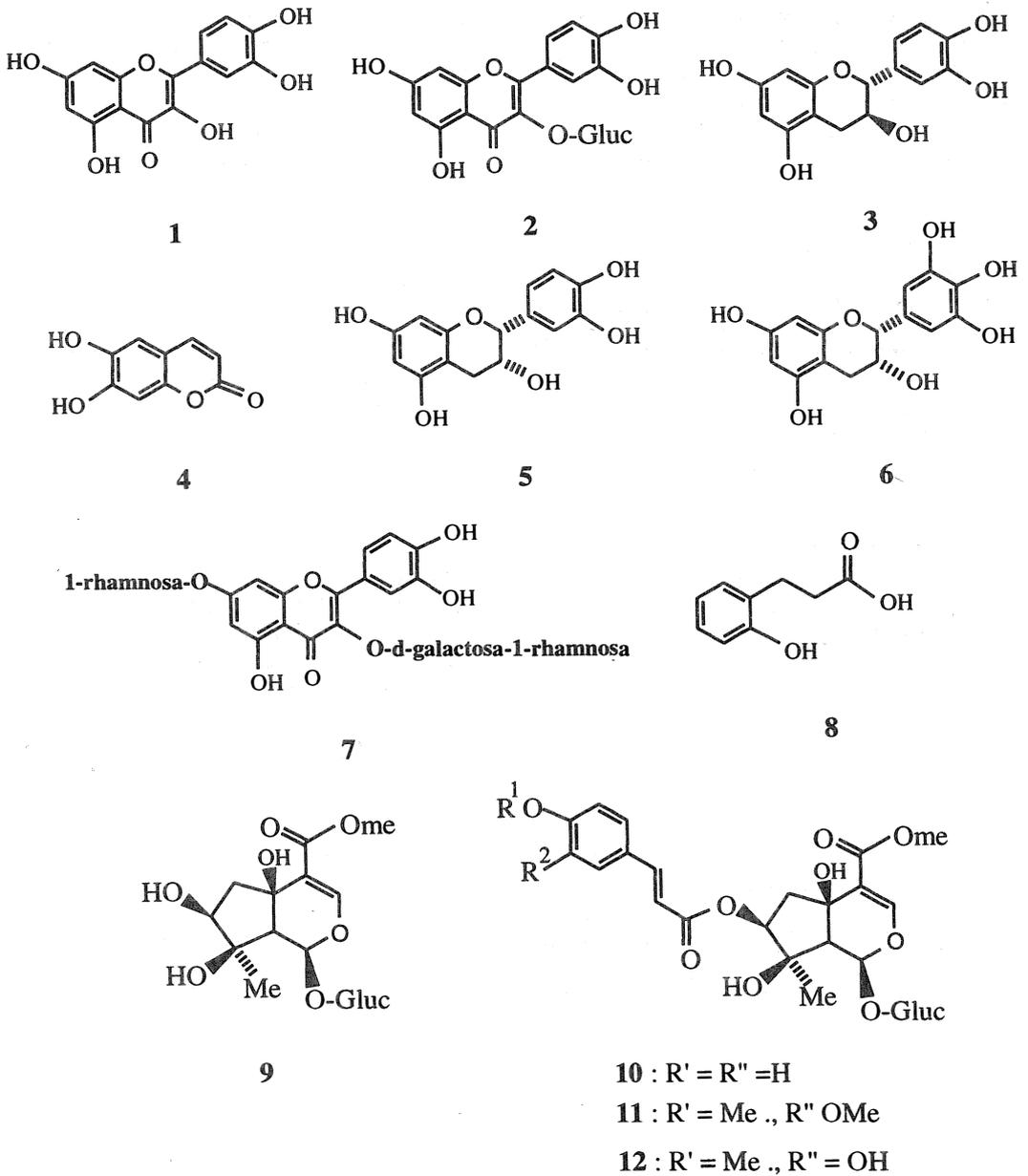


Fig. 2. Metabolitos secundarios identificados en los extractos con potencial antimalárico de *C. tonduzii*, *T. havanensis*, *Glicircidia sepiun* y *Duranta repens*.

Animales: Grupos de 5 ratones blancos de la cepa NGP (20 a 25g de peso), alimentados con un concentrado local y agua ad libitum fueron usados a través de todo el experimento.

Parásito e inoculaciones: Una cepa de *P. berghei* obtenida en nuestro laboratorio y que se mantiene por pasajes semanales, fue utilizada en

este trabajo. La preparación de los inóculos del organismo se hizo de acuerdo con lo descrito por Benavides (1991). Brevemente, se concentraron los glóbulos rojos parasitados determinando el porcentaje de infección y, de acuerdo con un recuento globular total, se realizaron las diluciones del caso para preparar los inóculos pertinentes.

Esquema de tratamiento: El modelo empleado ha sido descrito previamente por Benavides (1991), pero esencialmente los animales fueron tratados vía subcutánea (s.c.) y vía oral con los extractos del caso, comenzando 7 días antes de la infección y continuando hasta la muerte de los animales o 15 días después de la infección en los sobrevivientes.

Seguimiento de la infección: Después de inoculados, se valoró en todos los animales, dos veces por semana, el efecto de los extractos de plantas contra *P. Berghei* siguiendo el proceso de disminución eritrocítica por medio del hematocrito; el índice de multiplicación del parásito, determinando el porcentaje de glóbulos rojos infectados cada vez y el poder de curación, considerando la mayor y menor supervivencia de los animales inoculados. También, dada la importancia del bazo e indirectamente del hígado en las infecciones maláricas, esos órganos fueron pesados para establecer las comparaciones del caso.

Análisis estadístico: Estadísticamente las diferencias entre grupos control y aquellos tratados con extractos que presentaron algún efecto antimalárico, fueron significativas (P: 0,1).

RESULTADOS

Los extractos se clasificaron según el potencial parasiticida manifiesto contra *P. berghei*, que produce una malaria mortal en ratones. Para esta selección se dió prioridad a la consistencia en los resultados relacionados con la toxicidad y los efectos sobre infecciones provocados en los ratones con *P. berghei*, considerando los parámetros de sobrevida, hematocrito y parasitemia, estudiados según metodología descrita previamente (Benavides 1991). De acuerdo a tales análisis, se han seleccionado preliminarmente de todas las plantas estudiadas (Tabla 1), varias especies calificadas como "muy promisorias" o "con efecto importante". En el primer caso se refiere a extractos cuya actividad antimalárica ha sido repetitiva y evidente, mientras que aquéllas con efecto importante, son plantas que al mostrar alguna actividad, deben ser sometidas a mayores análisis para su comprobación definitiva.

Los extractos crudos liofilizados que se revelaron como más prometedores y con efectos importantes fueron reevaluados como mínimo

hasta tres veces, obteniéndose claras diferencias significativas con los controles. Se emplearon extractos originales en combinación con otros elaborados a partir de nuevas recolecciones botánicas. Luego, para verificar la polaridad del extracto donde se concentraba la actividad, estos crudos liofilizados se suspendieron con una mezcla etanol/agua (1:1) y se extrajeron mediante particiones sucesivas con los siguientes solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y acetato de etilo. Una vez evaluados estos extractos se observó en todos los casos que el efecto antimalárico se concentraba en los extractos de mayor polaridad, específicamente, los de acetato de etilo y los alcohólicos acuosos remanentes.

Los resultados sobre las plantas investigadas y su potencial antimalárico se detallan en la (tabla 1). Los únicos extractos que mostraron actividad antimalárica relevante, fueron los provenientes de las hojas de *C. tonduzii* (cedro dulce) y la corteza de *T. havanensis* (uruca). Se determinó, en ambos casos, que la actividad se concentraba en los extractos de acetato de etilo. Los otros extractos que mostraron efectos importantes fueron los provenientes de la corteza de *T. americana*, *N. lobata* (gavilana), las hojas de *G. sepium* (madero negro) y los frutos de *D. repens*. Se verificó, además, que la actividad en *G. sepium* y *D. repens* se concentraba en los extractos polares de acetato de etilo y los alcohólicos acuosos remanentes.

Todos estos materiales resultaron inocuos para los ratones en las diluciones ensayadas y solo los extractos de *T. americana* y *N. lobata* no fueron investigados químicamente. Los demás extractos, exceptuando los de *D. repens*, fueron purificados combinando principalmente técnicas de separación cromatográfica en columna y en capa preparativa, usando como fase estacionaria sílica gel. Para la elución en columna se inició con diclorometano, luego con mezclas de diclorometano / acetona (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), (4:6), y se terminó pasando acetona seguido de etanol de 95°. Las fracciones que concentraron los compuestos mayoritarios se reunieron y purificaron mediante cromatografía preparativa en gel de sílice, usando como solventes de elución mezclas de diclorometano/metanol (9:1) y (8:2).

Dado que la actividad en *D. repens* se concentró principalmente en el extracto acuoso, se purificaron 3.5g de los extractos acuosos liofilizados,

CUADRO 1

Extractos de plantas evaluadas contra efectos de Plasmodium berghei

Planta y familia	Parte	Lugar de recolección
Meliaceae		
<i>Cedrela odorata</i>	Hojas	Santa Ana, San José
<i>Cedrela odorata</i>	Corteza	Santa Ana, San José
<i>Cedrela salvadorensis</i>	Hojas	Club Cariari, Heredia
<i>Cedrela salvadorensis</i>	Corteza	Club Cariari, Heredia
<i>Cedrela salvadorensis</i>	Fruto	Club Cariari, Heredia
<i>Cedrela tonduzii</i> ***	Hojas	Monte La Cruz, Heredia
<i>Cedrela tonduzii</i>	Corteza	Monte La Cruz, Heredia
<i>Trichilia americana</i> **	Corteza	El Rodeo, Ciudad Colón
<i>Trichilia arborea</i>	Corteza	La Pacífica, Cañas, Guanacaste
<i>Trichilia havanensis</i>	Hojas	San Cristóbal Norte, Cartago
<i>Trichilia havanensis</i> ***	Corteza	San Cristóbal Norte, Cartago
<i>Trichilia havanensis</i>	Semilla	Campus, Universidad Costa Rica
<i>Trichilia havanensis</i>	Endodermo	Campus, Universidad Costa Rica
<i>Trichilia martiana</i>	Corteza	El Rodeo, Ciudad Colón
<i>Trichilia trifolia</i>	Corteza	La Pacífica, Cañas, Guanacaste
Simaroubaceae		
<i>Picramnia antidesma</i>	Hojas	El Rodeo, Ciudad Colón
<i>Picramnia antidesma</i>	Corteza	El Rodeo, Ciudad Colón
<i>Simaba cedron</i>	Semilla	Parque Manuel Antonio, Quepos
Fabaceae/Papilionaceae		
<i>Gliricidia sepium</i> **	Hojas	El Rodeo, Ciudad Colón
Asteraceae		
<i>Neurolaena lobata</i> **	Hojas	Guápiles, Limón
Verbenaceae		
<i>Duranta repens</i> **	Frutos	Barrial de Heredia

*** Extractos muy promisorios. ** Extractos con efecto importante.

empleando como soporte cromatografía en fase reversa de sílica gel, de acuerdo al siguiente procedimiento: Sobre un embudo de kitasato con un volumen de 350 ml y 9 cm de altura, se formó una columna con esta sílica de 5 cm de altura. Luego, la muestra disuelta en 20 ml de agua destilada se depositó sobre la superficie de esta columna. Usando vacío y volúmenes de 50 ml, esta muestra fue tratada primero con agua y luego con mezclas de agua/metanol (45:5), (40:10), (35:15), (30:20), (25:25), (20:30), (15:35), (10:40) hasta terminar con metanol puro. En total se recolectaron 15 fracciones, las cuales fueron analizadas en agua deuterada por espectroscopía de Resonancia Magnética Protónica, usando un equipo de 270 MHz marca Bruker y por cromatografía de capa fina en gel de sílice, usando como agente revelador el reactivo de vainillina. Considerando semejanzas en detalles espectroscópicos y cromatográficos las fracciones se reunieron en 2 grupos principales. Un grupo obtenido con agua y las mezclas de agua/metanol (45:5) y (40:10), el cual concentró

principalmente glucosa y, otro conformado por las fracciones obtenidas con agua/metanol (35:15), (30:20), (25:25), que concentraban compuestos cuya naturaleza iridoidal fue evidenciada cromatográficamente, por el color morado de las manchas con que revelaron al ser rociados con el reactivo de vainillina. Estos compuestos fueron purificados, combinando técnicas en cromatografía preparativa de gel de sílice, usando mezclas de cloroformo/metanol (9:1) y (8:2) y mediante cristalizaciones sucesivas en etanol de 95°. La identificación de las estructuras se realizó principalmente, mediante el análisis de sus respectivos datos de Resonancia Magnética Protónica y de carbono-13, utilizando un equipo de 270 MHz marca Bruker y, por comparación con modelos moleculares idénticos descritos previamente (Boros 1990, Breitmair 1989). Se encontró que los extractos activos de *C. tonduzii*, *T. havanensis* y *G. sepium* concentraban compuestos de naturaleza flavonoide mientras que los frutos de *D. repens* acumulaban principalmente compuestos de naturaleza iridoidal. Estos resultados se resumen en la (tabla 2).

CUADRO 2

Extractos activos de planta y metabolitos secundarios identificados

Planta	Parte	extracto activo	Compuestos identificados
<i>Cedrela tonduzii</i>	Hojas	Acetato de etilo	Flavonoides 1,2,3 Cumarina 4
<i>Trichilia havanensis</i>	Corteza	Acetato de etilo	Flavonoides 5,6
<i>Trichilia americana</i>	Corteza	Crudo alcohólico	Ninguno
<i>Gliricidia sepium</i>	Hojas	Acetato de etilo	Flavonoide 7 Ac. melilótico 8
<i>Neurolaena lobata</i>	Hojas	Crudo alcohólico	Lactonas sesquiterpénicas (Manchand 1978) Flavonoides (Kerr 1981)
<i>Duranta repens</i>	Frutos	Acuoso	Iridoides 9,10,11,12

DISCUSION

Para la obtención de los extractos crudos se empleó como solvente etanol, por la capacidad que tiene de inhibir las acciones enzimáticas que intervienen en las transformaciones químicas que se originan en procesos "post mortem". Posteriormente, también para impedir la formación de compuestos diferentes a los que elabora la planta, los extractos hidroalcohólicos se concentraron bajo condiciones de laboratorio muy suaves (destilación al vacío y a temperaturas menores a 45°C).

Las plantas se seleccionaron tomando en consideración principalmente criterios etnobotánicos y quimiosistemáticos. De este modo, se tomaron en cuenta algunas especies recomendadas tradicionalmente como antimaláricas: *D. repens*, frutos en China (Duke 1985), *N. lobata* y *S. cedron* Costa Rica (Pittier 1978) y especies pertenecientes a reconocidas familias de plantas como Meliaceae y Simaroubaceae, las cuales se han distinguido por elaborar complejos metabolitos secundarios de naturaleza terpenica, denominados respectivamente, limonoides y quassinoides. Ambas clases de metabolitos han despertado inusual interés científico por la diversidad de actividades biológicas que producen. Principalmente, se han destacado como agentes antileucémicos, antinutricionales e insecticidas, anti-inflamatorios, antivirales, amebicidas y antimaláricos (Polonsky 1985, Taylor 1987). Se incluyó, además, *G. sepium*, por ser uno de los componentes biomásicos más importantes del país, al cual se le atribuyen, entre otras propiedades, actividades rodenticidas, insecticidas y alelopáticas (Soto 1994).

Los flavonoides y la cumarina identificados en *C. tonduzii*, constituyen modelos moleculares a los cuales se les ha reconocido una amplia gama de actividades biológicas. Así por ejemplo, cumarinas preniladas y la simple 5,6,7-trimetoxicumarina han sido señaladas con buen efecto antimalárico, antipirético, analgésico, sedativo y anticonvulsivante (Adesina 1983). También los flavonoides son conocidos por tener un amplio rango de expectativas biológicas, estas incluyen actividades antitumorales, antiinflamatorias, antihepatotóxicas, antimicrobiales, antivirales, inhibidoras de ciertas enzimas y antioxidantes (Pathak 1991). Específicamente, la flavona quercetina 1, compuesto mayoritario en *C. tonduzii*, ha sido indicada con fuerte actividad antimalárica contra el parásito, demostrando tener efectos antimitocondriales en *P. falciparum* (Khalid *et al.* 1986). No obstante, su respectivo glicósido (Quercetina 3-rutinosido), no evidenció actividad significativa. Esto nos permite presuponer, también, que probablemente el análogo compuesto 2 (Quercetina 3-glucosido) contribuye poco a la actividad observada. En concordancia con estos resultados, los extractos acuosos de *G. sepium*, en donde se concentra fundamentalmente el derivado altamente glucosidado del kaempferol, Robinina 7, solo se observó actividad parcial contra los efectos producidos por malaria.

Contrariamente, los flavonoides tipo flavanas, como las encontradas en *T. havanensis* muestran un espectro de aplicaciones biológicas más limitado. A la (-)-catequina 5, previamente se le han reconocido propiedades antihepatotóxicas, antiinflamatorias y antiúlceras, mientras que al compuesto epigallocatequina 6

ha mostrado actividades antitumorales, antimicrobiales y antivirales (Pathak *et al.* 1991). Compuestos de naturaleza flavánica como 3, 5, y 6, comparados con un típico flavonoide, como la quercetina 1, o su derivado glicosidado 2, muestran dos importantes claras diferencias desde el punto de vista estructural, pérdida de planaridad y ausencia de un grupo carbonilo, que en los flavonoides tiene la particularidad de formar un puente de hidrógeno con el hidroxilo vecinal en el (C - 5), lo que constituye un grupo funcional con notables propiedades, para poder secuestrar cationes divalentes de importancia biológica como iones Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ y Zn⁺⁺. No existen informes previos sobre la participación, como potencial antimalárico de modelos moleculares como la cumarina 4 (6,7 - dihidroxicumarina), el ácido melilótico 8, y los compuestos de naturaleza iridoideal 9-12, aislados respectivamente de *C. tonduzii* (hojas), *G. sepium* (hojas) y *D. repens* (frutos). No obstante, un análogo iridoide conocido como gentiopicrin ha sido referido como antimalárico (Windholtz 1983). Se han indicado, además ciertos grados de asociación entre propiedades antimaláricas y citotóxicas, para compuestos de naturaleza cumarínica y flavonoide (Khalid *et al.* 1986)). En atención a estas comparaciones y considerando que estudios "in vivo", usando parásitos de malaria en animales de laboratorio, contribuyen a discriminar entre actividades antimaláricas generales y específicas, la presencia de flavonoides e iridoideos, en las plantas reveladas con mayor potencial antimalárico, es consistente con los resultados observados.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Biodiversidad (IN-Bio) por el apoyo económico brindado dentro del proyecto de Prospección Química auspiciado por la Fundación McArthur. Al Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) del Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica y al Departamento de Química, Laboratorio de Productos naturales de la Universidad Nacional de Heredia donde se realizó el trabajo. A Frank R. Stermitz del Departamento de Química de la Universidad del Estado de Colorado, por las facilidades para la obtención de

los datos espectroscópicos, los cuales fueron cubiertos con los fondos de la Fundación Nacional de Ciencias de USA (NSF), CHE-9321977.

REFERENCIAS

- Adesina, S.K. 1983. Chemical examination of *Khaya ivorensis* and *Khaya senegalensis*. *Fitoterapia* 54: 141-153.
- Benavides, M.E. 1991. Efecto Antimalárico de un extracto de *Cedrela tonduzii* Meliaceae. Tesis Lic. Biología. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Boros, C.A. & F.R. Stermitz. 1990. Iridoids. An Updated Review. Part I. *J. Nat. Prod.* 53: 1113-1114.
- Breitmaier, E. & W. Voelter. 1989. Carbon - 13 NMR Spectroscopy, VCH. p. 447-456.
- Duke, J.A. 1985 *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC. Boca Raton, Florida, p. 172-173.
- Khalid, S.M., A., Farouk, T.G Geary & J.B. Jensen. 1986. Potential Antimalarial Candidates from African Plants: An In Vitro Approach Using *Plasmodium falciparum*. *J. Ethnopharmacol.* 15: 201-209.
- Klaymán, D.L. 1985. *Gin hao sou* (artemisin): an antimalarial drug from China. *Science* 228: 1049-1055.
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C. 1985. Plants as Source of Antimalarial Drugs. Part. 1. In vitro Test Method for the Evaluation of Crude Extracts from Plants. *Planta Medica* 47: 394-398.
- Pathak, D; K. Pathak, & A.K. Singla. 1991. Flavonoids as medicinal agents - Recent advances. *Fitoterapia.* 62:371-389.
- Pittier, H. 1978. *Plantas Usuales de Costa Rica*. Costa Rica, San José, Costa Rica. 52 p.
- Polonsky, J. 1985. Quassinoid Bitter Principles II. *Fortschritte. Chem. Org. Naturst.* 30: 239-240.
- Soto, S. 1994. Evaluación Fitoquímica del follage de *Gliricidia sepium*. Tesis de Licenciatura en Química, Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Taylor, D.A.H. 1987. The Chemistry of the Limonoids from Meliaceae. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 45: 1.
- Windholz, M. 1983. *The Merck Index*, Merck, N. Jersey. 628 p.