

Evaluación de la actividad antiplasmódica in vitro de extractos de *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia* y *Croton lechleri*

Evaluation of the in vitro antiplasmodic activity of extracts from *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia* and *Croton lechleri*

David Gutierrez Yapu¹, Diana Sangama Mozombite², Elsa Rengifo Salgado³, Alberto Gimenez Turba¹

¹ Departamento de Quimioterapia Experimental, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. Bolivia.

² Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Amazónica del Perú, Nina Rumi, San Juan Bautista, Maynas. Iquitos. Perú.

³ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Av. José A. Quiñones km. 2.5, Iquitos. Perú.

Dirección para correspondencia: David Gutierrez Yapu. Departamento de Quimioterapia Experimental, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés Av. Saavedra # 2224 Miraflores, La Paz, Bolivia.

Telf-Fax: 2229021 Cel. 719 63560

E mail : doyneldavid@yahoo.es

RESUMEN

La enfermedad de la malaria continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, particularmente en países subdesarrollados que presentan zonas tropicales en su geografía, como es el caso de la región amazónica de Sud América. Tanto la malaria, la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, son enfermedades estrechamente ligadas a la pobreza por lo que para su control las organizaciones de salud pública mundial en la erradicación de la malaria han creado estrategias para un tratamiento antimalárico oportuno.

Uno de los principales obstáculos que agrava la situación de esta enfermedad y su erradicación es el desarrollo de la resistencia de cepas de *Plasmodium* frente a las drogas antipalúdicas de elección. Otro problema es el desarrollo de la resistencia del mosquito vector frente a los insecticidas utilizados para su eliminación y prevención en la transmisión.

Este trabajo tiene como objetivo el de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de la malaria, aprovechando la existencia de diversas plantas empleadas según la medicina tradicional en la región amazónica Perú-Boliviana. Se estudio la actividad antiplasmódica de 27 extractos correspondientes a 9 especies vegetales, provenientes de la Amazonía Peruana, estos fueron evaluados sobre *Plasmodium falciparum* (cepa FCR3 resistente a la Cloroquina) mediante el método visual directo, la cepa fue mantenida por el método de cultivo contínuo in vitro.

Los extractos diclorometánico y etanólico de *Euterpe oleracea* tuvieron una CI_{50} de 3 y 5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, las CI_{50} de los extracto acuoso y etanólico de *Myrciaria dubia* tuvieron un valor de 3 y 6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y el extracto acuoso de *Croton lechleri* tuvo una CI_{50} de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Fueron dos especies vegetales las cuales presentan actividad con dos tipos de extracto, lo cual representa mayor probabilidad de que estas especies presenten compuestos con actividad antiplasmódica.

Palabras Clave: *Plasmodium falciparum*, Amazonía, Plantas antimalariales, *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia*, *Croton lechleri*.

ABSTRACT

The malaria disease continues to be a problem of public health at world level, particularly in underdeveloped countries with tropical zones in their geography, as it is the case of the amazonian region of Sud America. Malaria, leishmaniasis and Chagas, are diseases closely linked to poverty reasons, and that is why, for us to control them, the world-wide public health organizations compelled in the eradication of malaria disease have created strategies for an opportune antimalarial treatment.

One of the main obstacles that aggravate the situation of this disease and its eradication is the development of the resistance from *Plasmodium* strains in relation to antimalarial drugs of election. Another problem is the development of the resistance from the mosquito

vector in relation to insecticides used for its elimination and prevention in the transmission.

This work has as its main objective to look for new alternatives for the treatment of malaria, taking advantage of the existence of diverse plants used in terms of the traditional medicine in the amazonian region of Peru and Bolivia. The antiplasmodic activity of 27 extracts corresponding to 9 vegetal, originating species of the Peruvian Amazonia was studied. These were evaluated on *Plasmodium falciparum* basis (resistant strain FCR3 to the chloroquine) through the direct visual method, and it is necessary to mention that this strain was maintained through the in vitro continuous culture method.

The dichloromethanic and ethanolic extract of *Euterpe oleracea* had a CI_{50} of 3 and 5 $\mu\text{g/mL}$ respectively, the CI_{50} of watery and ethanolic extract of *Myrciaria dubia* had value of 3 and 6 $\mu\text{g/mL}$ respectively and the watery extract of *Croton lechleri* had a CI_{50} and was 2 $\mu\text{g/mL}$.

It was two vegetal species which presented activity with two types of extract, this fact represents a major probability that these species present compounds with antiplasmodic activity.

Key Words: *Plasmodium falciparum*, Amazonian, Antimalaric plants, *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia*, *Croton lechleri*

INTRODUCCIÓN

Las llamadas enfermedades tropicales continúan siendo un problema de salud pública a nivel mundial, particularmente en los países que se encuentran en zonas tropicales, como es el caso de las regiones amazónicas de Loreto en Perú¹, Beni y Pando en Bolivia y otras regiones de América Latina. Patologías como la malaria, la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, son enfermedades ligadas a la pobreza y relacionadas con las condiciones higiénico-sanitarias, socio-económicas y ambientales con una considerable morbilidad y mortalidad.

La enfermedad de la malaria, está estrechamente relacionada con la historia de la humanidad. Hasta nuestros días, esta enfermedad permanece con una prevalencia considerable en el mundo, obstaculizando

el desarrollo económico de comunidades y países considerados zonas endémicas. Los informes recientes de la Organización Mundial de la Salud muestran que 300 a 500 millones de personas presentan la enfermedad clínica cada año, muriendo mas de un millón, especialmente los niños en África^{2,3}. Esto debido a que la mayoría de la población está distribuida en zonas altamente endémicas que corresponden a zonas subtropicales y tropicales con una incidencia elevada en: África, Sud y Sudoeste de Asia, Sud y Centro América, donde el riesgo de infección es continuo⁴.

Para su control, las organizaciones de salud pública mundial en la erradicación de la malaria han creado estrategias globales basadas principalmente en el tratamiento antimalárico oportuno. Uno de los principales obstáculos que agrava la situación de esta enfermedad y su erradicación es el desarrollo de la resistencia de cepas de *Plasmodium* frente a las drogas antipalúdicas de elección⁵. Otro problema es el desarrollo de la resistencia del mosquito vector frente a los insecticidas utilizados para su eliminación y prevención en la transmisión².

Este trabajo tiene como objetivo el de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de la malaria, aprovechando la existencia de diversas plantas empleadas según la medicina tradicional en la región amazónica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal. El material vegetal se colectó de la región amazónica de Loreto en el Perú, a 200 m.s.n.m. a una temperatura media de 30°C, posteriormente estas muestras se secaron y molieron a temperatura ambiente. Las plantas utilizadas en este estudio están constituidas por 9 especies vegetales. Las plantas se pulverizaron y se sometieron a maceración por 48 horas a temperatura ambiente en etanol al 70%. El residuo obtenido al evaporar el solvente, se separó por extracción líquido-líquido con diclorometano, obteniéndose los compuestos solubles en diclorometano (extracto orgánico) y agua (extracto acuoso). El extracto orgánico es evaporado a sequedad y el extracto acuoso es congelado a -50°C para luego liofilizarlo. (Tabla 1)

Tabla 1. Especies vegetales estudiadas.

Especie	Nombre común	Familia	Partes usadas
<i>Brunfelsia grandiflora</i> D. Don.	Chiric sanango	Solanaceae	Raíz
<i>Cortón lechleri</i> Muell-Arg.	Sangre de grado	Euphorbiaceae	Látex seco
<i>Euterpe oleracea</i> Mart.	Huasái	Arecaceae	Raíz
<i>Maquira coriacea</i> (Karsten) C.C. Berg	Capinurí	Moraceae	Corteza
<i>Maytenus macrocarpa</i> (R. & P) Briq.	Chuchuhuasi	Celastraceae	Corteza
<i>Myrciaria dubia</i> (H.B.K) Mc Vaugh	Camu camu	Myrtaceae	Corteza
<i>Smilax officinalis</i> Kunth.	Zarzaparrilla	Liliaceae	Raíz
<i>Spondias mombim</i> L.	Ubos	Anacardiaceae	Corteza
<i>Uncaria tomentosa</i> Will.	Uña de gato	Rubiaceae	Corteza

Evaluación de la actividad antiplasmódica in vitro por el método visual directo. El método de cultivo continuo in vitro empleado fue desarrollado en 1976 por Trager y Jensen⁵. De acuerdo a esta técnica las formas parasitarias de *Plasmodium falciparum* cepa FCR3 resistente a la cloroquina, fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementada con suero humano al 10 % y un hematocrito del 4 % que se obtuvo añadiendo 200 µl de glóbulos rojos totales en 4,5 ml de RPMI 1640 y 0,5 ml del suero o plasma (Grupo sanguíneo 0, Rh⁺) e incubados a 37°C en un medio anaeróbico⁷.

Para realizar la evaluación de la actividad antiplasmódica in vitro, los extractos fueron disueltos en DMSO y la cloroquina en agua para luego ser diluidos con el mismo medio obteniéndose las concentraciones requeridas (0,10 ; 1 y 10 µg/ml). Los cultivos fueron sincronizados de acuerdo al método descrito por Lambros y Vanderberg en 1979⁸ con una parasitemia y un hematocrito del 1 y 2 % respectivamente, estos fueron alicuotados en un volumen de 100 µl en placas de 96 pozos por triplicado, además de 100 µl de los extractos, y finalmente fueron incubados a 37 °C por 48 horas. Pasado este tiempo de incubación, se eliminó completamente la fase superior del cultivo, se realizó un frotis del sedimento de cada alveolo, fijando luego con metanol y realizando la tinción con Giemsa. Se observó cada frotis en el microscopio, con lente de inmersión x 100, contando glóbulos rojos no infectados (GRL) y glóbulos rojos infectados (GRI) para obtener el % de inhibición. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Cálculo de Porcentaje de Inhibición.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{GRL} - \text{GRI})}{\text{GRL}} \times 100$$

El cálculo para hallar los valores de concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) en la maduración de los esquizontes se realizó a través del programa informático Cricket Graph 1,3. que consiste en la interpolación lineal cuya fórmula se presenta a continuación. (Cuadro 2)

Cuadro 2. Cálculo de IC₅₀.

$$\log(\text{IC}_{50}) = \log(\text{X1}) + \frac{50 - \text{Y1}}{\text{Y2} - \text{Y1}} [\log(\text{X2}) - \log(\text{X1})]$$

X1 = concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia Y1 > 50%;

X2 = concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia Y2 < 50%.

Se consideraron extractos con actividad considerable aquellos que presentaron un IC₅₀ menor a 10 µg/ml^{9,10}.

RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos in vitro podemos determinar la existencia de 5 extractos con

buena actividad y 22 extractos que pueden considerarse como inactivos. (Tabla 2)

Tabla 2. Actividad in vitro de extractos correspondientes a *Euterpe oleracea*, *Myrciaria dubia* y *Croton lechleri* sobre *Plasmodium falciparum* FCR3.

Nº	Material vegetal N. científico	IC ₅₀ µg/mL EtOH	IC ₅₀ µg/mL CH ₂ Cl ₂	IC ₅₀ µg/mL H ₂ O
1	<i>Brunfelsia grandiflora</i>	> 10	> 10	> 10
2	<i>Croton lechleri</i>	> 10	> 10	2
3	<i>Euterpe oleraceae</i>	5	3	> 10
4	<i>Maquira coriaceae</i>	> 10	> 10	> 10
5	<i>Maytenus macrocarpa</i>	> 10	> 10	> 10
6	<i>Myrciaria dubia</i>	6	> 10	3
7	<i>Smilax officinalis</i>	> 10	> 10	> 10
8	<i>Spondias mombim</i>	> 10	> 10	> 10
9	<i>Uncaria tomentosa</i>	> 10	> 10	> 10

Estos valores de CI₅₀ pueden ser comparados con los valores de la droga patrón como es la cloroquina cuyo CI₅₀ es 10 nM (0.06 µg/mL).

Si bien los extractos activos no poseen valores similares a los de la sustancia patrón como es la cloroquina, estos pueden ser comparados con otras sustancias patrón, que resultan ser extractos crudos de especies vegetales con actividad sobre el *Plasmodium falciparum* de acción ya conocida, como la *Remijia peruviana* (CI₅₀ 7,4 µg/mL), *Cinchona officinalis* y *Cinchona pubescens* (CI₅₀ de 4,2 y 1 µg/mL respectivamente).

DISCUSIÓN

Se evaluó un total de 27 extractos crudos orgánicos y acuosos de origen natural, de los cuales, 5 resultaron ser activos y 22 extractos inactivos, lo que proporcionalmente nos da a lugar un 18,52% de extractos activos. Estos resultados presentan gran similitud con otro estudio realizado anteriormente con otras especies procedentes de la misma región, donde se obtuvieron 7 extractos activos de un total también de 27 evidenciando, que la proporción se mantiene^{11,12}, también se cuentan otros estudios como los realizados con extractos procedentes de Colombia, donde se obtuvieron similares proporciones de actividad y donde además se pudo apreciar que los extractos de *Rollinia exsucca* son los más activos en dos tipos de cepas¹³.

Los resultados de este estudio muestran que algunos extractos poseen potente actividad antiparasitaria lo

que justifica la conducción de futuras investigaciones para la extracción e identificación de los compuestos químicos activos responsables de dicha la actividad.

De las especies evaluadas, muchas no mostraron actividad antiplasmódica pese a que son mencionadas con frecuencia en la literatura como antiparasitarias, estos resultados podrían ser explicados en parte, por el hecho de que muchas plantas son utilizadas en el tratamiento de estas enfermedades no por sus efectos antiparasitarios, sino por otras propiedades con valor terapéutico para el paciente tales como la reducción de la fiebre, alivio del dolor de cabeza u otros y posiblemente por estimular el sistema inmune.

Otra posible explicación de la ausencia de actividad de los extractos, es que las plantas tradicionales son administradas para el tratamiento de las enfermedades como una mezcla de ellas y tal vez, solo resulten activas en combinación debido a sus efectos sinérgicos.

Estos resultados, al igual que otros previamente reportados enfatizan la importancia de evaluar drogas antiparasitarias desde un abordaje etnobotánico, basado en el uso tradicional de las plantas medicinales.

Con estos nuevos parámetros podemos afirmar que la actividad es aceptable para la continuación de los nuevos estudios. Estos cinco diferentes extractos provenientes de tres especies vegetales se encuentran actualmente en un proceso de purificación para una nueva evaluación a través de estudios químicos y biológicos.

AGRADECIMIENTOS.

A la O.E.A. por el financiamiento del proyecto multilateral: “Aprovechamiento de la Flora Regional como fuente de fármacos contra parásitos y cáncer” bajo la dirección de Panamá y la participación de Colombia, Guatemala y Bolivia; al proyecto X-5: “Búsqueda, Obtención y Evaluación de Nuevos Agentes Antiparasitarios”; al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), Subprograma X. Química Fina y Farmacéutica; a la fundación Alexander Von Humboldt – Stiftung por la dotación de equipos al I.I.F.B; y a la Universidad Nacional Amazónica del Perú. Al Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP).

REFERENCIAS

1. Quimper M. Malaria en la Región Loreto: Investigación para el Proyecto Integrado de Malaria en la Región Loreto. CARE-Perú, Julio 1998.
2. Organización Mundial de la Salud. Una estrategia mundial para combatir el paludismo. Ginebra; 1994.
3. Organización Panamericana de la Salud. Malaria en las Américas. Bol Epidemiol; 1992.
4. Kondrachine A, Trigg PI. Control of Malaria in the World. Indian J Malariol. 1997; 34: 92-110.
5. Blair S, Lacharme L, Carmona J, Tobón A. Resistencia de *Plasmodium falciparum* a tres fármacos antimaláricos en Turbo (Antioquia, Colombia). Rev Panam Salud Pública. 2001; 9 (1): 23-29.
6. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science. 1976; 193 (4254): 673-675.
7. Deharo E, Gautret P, Muñoz V, Sauvain M. Técnicas de Laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. 1ª Ed. La Paz. Bolivia; 2000.
8. Lambros C, Vandenberg J. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J.Parasitol. 1979; 65 (3): 418-420.
9. Oporto P. Evaluación in vitro de la actividad antipalúdica de extractos de plantas de la etnia guaraní. [Tesis de Maestría]. La Paz. Bolivia; 2002.
10. Gutiérrez D. Evaluación de la actividad antimalárica de derivados sintéticos y naturales. Estandarización de modelos in vitro sobre cultivos de *Plasmodium falciparum*. [Tesis de Maestría]. La Paz. Bolivia; 2004.
11. Sosa F, Gutierrez D, Ruiz G, Rios J, Gimenez A, Silva C. Evaluación antimalárica de especies amazónicas de uso etnofarmacológico. 3er Congreso Internacional / 3er Congreso Peruano de Plantas Medicinales. 2007 Lima – Peru.
12. Gutierrez D, Sosa F, Paco M, Ruiz G, Giménez A. Actividad Antipalúdica de plantas procedentes de la Amazonia peruana. Biorfarbo. 2004; 12: 33-38.
13. Osorio E, Arango G, Gracia E, Muñoz K, Ruiz G, Gutierrez D, Paco M, Gimenez A. Actividad antiplasmódica in vitro e inhibición de la formación de la -hematina de plantas colombianas de la familia Annonaceae. Acta Farm. Bonaerense. 2005; 24 (4): 527-532.