

ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL DE *COCCOCYPSELUM HIRSUTUM* (RUBIACEAE)

Manuel Enrique Tabora Martínez*

RESUMEN

El surgimiento y expansión de cepas del *Plasmodium falciparum* resistentes a las drogas establecidas en los esquemas de tratamiento de primera línea para la malaria no complicada, enfatiza la importancia de la búsqueda de nuevos compuestos activos contra este parásito. El presente estudio muestra la presencia de terpenoides y cumarinas en el análisis fitoquímico preliminar de *Coccocypselum hirsutum Rubiaceae*. La evaluación de la actividad antimalarica consistió en inhibición de la maduración del parásito de formas jóvenes a esquizontes dentro del eritrocito (ensayo de maduración). Se realizó con el extracto etanólico total de la especie frente a dos cepas de *Plasmodium falciparum* FVO y FBC-2, resistente a cloroquina, cada extracto fue ensayado por triplicado a concentraciones de 280, 140, 70 y 35 ppm. Como resultado se obtuvieron valores no significativos de actividad antimalarica menores del 20% demostrando la capacidad de no inhibir la invasión de *P. falciparum* en células sanguíneas in Vitro. (Duazary 2009-II 118-123)

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, terpenoides, cumarinas, actividad antimalárica y análisis fitoquímico.

ABSTRACT

The emergence and spread of strains of *falciparum plasmodium* resistant to drugs in the schemes of first-line treatment for non complicated malaria, emphasizes the importance of finding new active compounds against this parasite. This study shows the presence of terpenoids and coumarins in the preliminary phytochemical analysis of *Coccocypselum hirsutum Rubiaceae*. The antimalarial activity was evaluated by inhibiting the maturation of young forms of the parasite within the erythrocyte esquizontes (test of maturity). It was carried out with the whole ethanol extract of the species against two strains of *Plasmodium falciparum* FVO and FBC-2, resistant to chloroquine; each extract was tested in triplicate at concentrations of 280, 140, 70 and 35 ppm. The results obtained were under 20%, which are not significant values of antimalarial activity. This demonstrates the inability to inhibit the invasion of *P. falciparum* blood cells in vitro.

Key words: *Plasmodium falciparum*, terpenoids, coumarins, antimalarial activity and phytochemical analysis

* Lic. en biología y química Universidad del Magdalena. Especialista en ciencias ambientales Universidad del Magdalena. Especialista en química orgánica Universidad del Magdalena. Magíster en ciencias químicas Universidad Nacional. Director del grupo de investigación en fotoquímica Universidad del Magdalena. quimicatoborda@yahoo.es, mtaboram@unal.edu.co



INTRODUCCIÓN

La malaria es la enfermedad parasitaria de mayor preocupación en el mundo debido a la alta morbilidad, mortalidad y el impacto socio económico que ocasiona a las poblaciones humanas afectadas. Esta enfermedad es causada por un protozooario parásito del género *Plasmodium*; los miembros de este género que infectan al hombre son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, destacándose las dos primeras en salud pública, debido a que *P. falciparum* resulta la más letal y *P. vivax* la más prevalente.^{1,2}

Cerca del 40% de la población mundial permanece expuesta a la malaria, estimándose que cada año ocurren entre 300 a 500 millones de casos clínicos nuevos y alrededor de 2 a 3 millones de muertes^{3,4}. En Colombia la malaria es un problema de salud pública muy extendido. Un 85% del territorio Colombiano está ubicado a menos de 1600 metros sobre el nivel del mar donde viven aproximadamente de 18 a 24 millones de personas expuestas al riesgo de contraer la enfermedad o morir a causa de ella. Aunque la mortalidad por malaria ha disminuido en forma significativa en los últimos decenios, la morbilidad reveló una tendencia creciente durante los últimos cuarenta años. En el decenio las autoridades en Colombia diagnosticaron un promedio de 160.000 casos de malaria por año, pero en 1998, ese número se incremento a casi 250.000 también creció la tasa de infecciones por *P. falciparum*. En el mismo año, algunos municipios ubicados en la costa del pacífico notificaron tasas de incidencia mayores a 400 casos por 1.000 habitantes.⁵ Uno de los principales obstáculos para el control de la transmisión de la enfermedad en muchas partes del mundo, lo constituye el acelerado desarrollo de resistencia de los vectores a los insecticidas que comúnmente los eliminaban y a la propagación de cepas de parásitos maláricos resistentes a los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad.^{6,7,8,9,10} Por otra parte, el progresivo aumento de focos de malaria, producto de los movimientos migratorios de individuos infectados y los cambios ambientales ecológicos o sociales, tales como aquellos derivados de la agricultura u otras explotaciones económicas en regiones selváticas, dificultan también el control de la transmisión.^{4, 11,12,13}

Se estima que cerca del 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para cubrir sus necesidades de atención primaria de salud y se puede asegurar que gran parte de los tratamientos tradicionales

suponen el uso de extractos de plantas o sus principios activos.¹⁴ Existen al menos tres razones que explican la importancia de la medicina tradicional basada en el uso de plantas: primera, estas son mucho más económicas y accesibles; segunda, no existen registros que indiquen resistencia o tolerancia a los extractos totales de las plantas, posiblemente, debido a la acción sinérgica de los diversos constituyentes y tercera es posible que la fitoterapia produzca menos efectos adversos que la quimioterapia.¹⁵ La utilidad clínica de la quinina y la quinidina derivadas de la corteza del árbol *Cinchona spp.* (Rubiaceae), y la artemisina aislada de la planta china *Artemisaanua L.* (Asteraceae), han dado considerable impulso a la búsqueda de nuevas drogas antimaláricas a partir de plantas medicinales.^{16,17,18}

El reconocimiento y validación de la medicina popular, con toda su carga de experiencia práctica, tradiciones, usos y costumbres, pueden conducir al desarrollo de nuevas drogas derivadas de plantas. Es importante, por lo tanto, que aquellas plantas que presentan mayor popularidad en la medicina tradicional por sus propiedades antimaláricas, sean investigadas con el fin de determinar su eficacia y evaluar su potencial como fuente de nuevos principios activos con actividad terapéutica.

El análisis fitoquímico preliminar es un conjunto de pruebas de identificación consistente en una reacción química que produce alteración rápida de la estructura molecular del compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un aducto o un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas.¹⁹

El procedimiento básicamente consiste en tomar una cantidad determinada del extracto y realizar sucesivas extracciones con los solventes indicados para aislar metabolitos secundarios que posiblemente se encuentren presentes, para luego ensayarlos con reactivos específicos que generen precipitados o cambios en la coloración y así poder clasificarlos en los diferentes grupos de compuestos características de las plantas.

Se realizaron diferentes marchas analíticas con un extracto etanólico total de *Coccocypselum hirsutum Rubiaceae*, con el fin de determinar la presencia de los siguientes tipos de metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, nafto y/o antraquinona, taninos saponinas, esteroides y/o triterpenoides, cumarinas y lactonas terpénicas y

glucósidos cardiotónicos. La evaluación de la actividad antimalarica se realizó mediante ensayo "In vitro" de inhibición de la maduración de esquizontes de dos cepas de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA UTILIZADA

Coccocypselum.hirsutum (Bertl) ex DC es una enredadera, hierba rastrera de flores blancas con lóbulos lila y frutos azulosos nativo de América tropical se distribuye desde México hasta Colombia y Venezuela.^{20,21} En nuestro país crece en los departamentos de Antioquia, Atlántico, Bolívar, Chocó, Guajira, Magdalena, Meta, Santanderes y Sucre entre los 100-1.200 m.s.n.m. El material vegetal fue recolectado en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, Departamento del Magdalena a 945 m.s.n.m. La muestra fue determinada por el Dr. Eduino Carbone de la Hoz, Director del herbario de la Universidad del Magdalena, y un ejemplar reposa en esta institución (UTMC.12002).

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

La especie de *Coccocypselum hirsutum* se secó al aire libre a temperatura ambiente durante 40 días, luego fue triturada con ayuda de un molino manual (Corona). Cuatrocientos gramos de muestra se sometió a extracción por percolación en frío con 8,0 litros (EtOH) al 96%, en un percolador de acero inoxidable, al cual se le adicionó solvente hasta ¾ partes de la extracción. La extracción se realizó durante un periodo de 48 horas. El extracto etanólico resultante denominado ChMEtOH fue concentrado a presión reducida. Dos gramos en peso seco del extracto se empleó para la marcha fitoquímica preliminar de acuerdo con la metodología descrita por Sanabria.¹⁹

Las cromatografías en capa delgada (CCD) para la identificación de los posibles metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo se realizaron sobre cromatoplasmas TLC de silica gel 60 HF₂₅₄ de la casa comercial Merck. Como reveladores cromatográficos se empleó luz UV 254 y 364 nm y/o vapores de yodo, y reveladores específicos para diversos metabolitos, Dragendorff, vainillina, Hidroxamato férrico y Raymond.

ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA

Se llevó a cabo con el ChMEtOH de *Coccocypselum hirsutum*, frente a dos cepas de *Plasmodium falciparum*, FVO y FBC-2, resistente a cloroquina. El método utilizado fue estandarizado previamente en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia²². Brevemente, el ensayo consistió

en inhibición de la maduración de formas intraeritrocitarias del parásito *P. falciparum* en estradio de esquizontes, cultivados "In vitro" (ensayo de maduración).

Cultivo de las cepas FVO y FBC- 2 de *Plasmodium falciparum*.

Los glóbulos rojos humanos infectados con el parásito en estado de anillo (parasitemia mayor del 5%) fueron sincronizados con sorbitol, luego adicionados en medio RPMI 1640 sigma suplementado con buffer Hepes, hipoxantina, gentamicina, penicilina, glucosa, NaHCO₃ al 5% y plasma sanguíneo O⁺ al 10% e incubados hasta estadio de esquizonte en condiciones de 37 °C de temperatura, 5% de oxígeno, 5% de CO₂ y 90% de nitrógeno.

Determinación de la actividad antimalárica de ChMEtOH.

Los parásitos en estadio de esquizonte se inocularon en cajas de cultivo de 96 pozos en volúmenes de 100 µL en presencia de 5 µL de extracto en concentraciones de 280, 140, 70 y 35 ppm. Cada extracto se ensayó por triplicado. Los cultivos se incuban a 37 °C, en un ambiente con 5% de oxígeno, 5% de CO₂ y 90% de nitrógeno, durante 18 horas. Como control negativo de inhibición de la invasión se usó la cloroquina y en el control positivo se usaron glóbulos rojos sanos.

Posterior a la incubación se realizó centrifugación a 2800 rpm por 5 minutos de los glóbulos rojos en tubos de poliestireno, remoción del sobrenadante y reemplazo por 100 µL de hidroetidina, seguido por incubación a 37 °C, durante 30 minutos. Las células se lavaron con buffer salino fosfato (PBS) y el precipitado se resuspendió en 300 µL de PBS. La parasitemia final de cada cultivo se cuantificó por citometría de flujo. El porcentaje de inhibición se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{INHIBICIÓN} = \frac{(\% \text{Parasitemia en control} - \% \text{Parasitemia del extracto})}{(\% \text{Parasitemia en control})} \times 100$$

Para el análisis, se consideran valores significativos de inhibición de la invasión las lecturas en el citómetro de flujo mayores del 20%.

RESULTADOS

RESULTADOS DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Los ensayos realizados al ChMEtOH de *Coccocypselum hirsutum*, tanto en las reacciones en tubos de ensayo, como



en placas cromatográficas dieron prueba negativa para alcaloides de diferentes tipos de polaridades y para taninos, flavonoides y saponinas lo que indica la posible ausencia de estos metabolitos en *Coccocypselum hirsutum*.

Los ensayos realizados por cromatografía de capa fina, utilizando reveladores específicos para esteroides y/o triterpenoides y cumarinas, mostraron su posible presencia en el ChMEtOH de *Coccocypselum hirsutum*.

Es necesario señalar que los resultados, tanto en las reacciones en tubos de ensayo, como en placas cromatográficas, dan un indicio de la posible presencia o no de un metabolito en la muestra.

La Tabla No. 1, resume los resultados de la marcha fitoquímica en tubos de ensayo; la Tabla No. 2, los resultados de la Cromatografía en Capa Fina (CCD), muy relevantes para esteroides y/o triterpenoides y cumarinas, prueba positiva con los reveladores cloruro férrico; vainillina y ácido ortofosfórico.

Tabla No. 1 Resultados marcha fitoquímica preliminar del extracto ChMEtOH Etanólico de *Coccocypselum Hirsutum* (Reacciones en tubos de ensayo).

SUSTANCIAS	PRUEBAS	HCl 5%	Solubles en CHCl ₃	Solubles en CHCl ₃ , Et-OH	Alcaloides Fenólicos	Amonio 4° U óxidos de amina
ALCALOIDES	Dragendorff Mayer	Negativo	Negativo	negativo	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo	negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Valsler	Negativo	Negativo	negativo	Negativo	Negativo
	Reineckato	Negativo	Negativo	negativo	Negativo	Negativo
FLAVONOIDES	Cianídina	Negativo				
	HCl (10%)					
NAFTO Y/O ANTRAQUINONAS	Borntrager-Kraus	Negativo				
TANINOS	Gelatina-sal	Negativo				
	Fe Cl ₃	Negativo				
SAPONINAS	Hemólisis	Negativo				
	Espuma	Negativo				
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	C.C.D.					
Lieberman-Buchard	Positivo					

Tabla No. 2 Resultados marcha fitoquímica preliminar del extracto ChMEtOH de *Coccocypselum Hirsutum* (Cromatografía en Capa Fina, CCD).

CCD	PLACA W Vainillina	PLACA X Hidroxamato	PLACA Y Raymond	PLACA Z Vainillina
CUMARINAS	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
CARDIOTÓNICOS	Negativo	Negativo	negativo	Negativo
LACTONAS	negativo	negativo	negativo	Negativo

RESULTADO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMALARICA DE *Coccocypselum hirsutum*.

Los resultados de los ensayos preliminares de actividad antimalárica del extracto etanólico de la especie de *Coccocypselum hirsutum* frente a dos cepas de *Plasmodium falciparum* FVO y FBC-2, se presenta en la Tabla No. 2.

Tabla No. 3 Inhibición de la invasión de *Plasmodium falciparum* en células sanguíneas in Vitro con extracto crudo total de *Coccocypselum hirsutum*

Concentración de extracto ChMEtOH de <i>Coccocypselum Hirsutum</i>	280 ppm	140 ppm	70 ppm	35 ppm
% Inhibición de la maduración	26	24	18	12

DISCUSIÓN

Debido a la falla terapéutica a las drogas antipalúdicas muchas personas recurren al uso de productos naturales para su tratamiento. Se estima que el 80% de la población de los países en desarrollo utilizan las medicinas tradicionales a base de plantas. Un informe OMS año (2003) mostró que el 60% de los niños con fiebre malarica en los países de África Occidental, fueron tratados con hierbas medicinales, Sin embargo, la mayoría de estos extractos siguen siendo procesados mediante métodos artesanales que no siempre garantizan la eficacia, estabilidad y seguridad del producto natural. En África occidental es utilizado el tallo y la corteza de *Morinda lucida* la cual posee antraquinonas;²³ alrededor

de 35 especies del genero *Nuclea* incluyendo *Nuclea orientalis*, *Nuclea latifolia* y *Nuclea officinalis* fueron identificados dos monoterpenos y cinco alcaloides indolicos con propiedades antimalaricas²⁴. En el sur de Vietnam cuarenta y nueve plantas fueron ensayadas su actividad in Vitro frente a *Plasmodium falciparum* a una concentración de 10µg/mL y mostraron inhibición del parasito mayor al 30%.²⁵ En maceración de *Mitragyna ciliata* es utilizada para el tratamiento de la malaria al igual que *Cathium setosum*, y *Pentas lanceolata*.^{26,27} A pesar de que muchas especies de la familia Rubiaceae son utilizadas contra la malaria, los resultados obtenidos con extractos etanolicos crudos de *Coccocypselum hirsutum* ensayados por nuestro grupo presentaron valores no significativos de actividad antimalarica, demostrando capacidad de no inhibir la invasión de *P. falciparum* a células sanguíneas, en el ensayo in Vitro por lo tanto se sugiere que el uso de esta planta en etnomedicina para el tratamiento de esta patología no es justificado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Tropical Diseases Research. 1997. TDR. Twelfth Programs Report: 57-76.
2. World Health Organization. Severe falciparum malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2000; 94: 36-7.
3. World Health Organization. Rapport Technique. 1993; 529:128.
4. World Health Organization. World Malaria Situation in 1993. In: Weekly Epidemiology Record. 1996; 71(3):17-24
5. Valero-Bernal MV. Malaria in Colombia: retrospective glance during the past 40 years. Rev salud pública 2006; 8: 141-9
6. Aljure S, Mendoza K, Mendoza D, Blanco P. Determinación de la mutación ASN -108 del gen DHFR de *Plasmodium falciparum* asociada con Resistencia "in vitro a piretrinas en aislados del departamento de Sucre, Colombia. Duazary 2005; 2(2): 87-94
7. Chaparro J, Wasserman M. Comparación de técnicas in vitro para detectar resistencia de *Plasmodium falciparum* a medicamentos. Biomédica 1999; 19 (2): 103-14.
8. Blair S, Lacharme L, Fonseca J et al. Resistance of *P. falciparum* to 3 antimalarics in turbo Colombia 1998 Rev. panam. Salud pública 2001; 9(1) 23-29.
9. Godoy GA, Volcan GS, Marengo RO, Guevara R, Texeira A. Demostración de resistencia al difosfato cloroquina por cepas de *Plasmodium falciparum* infectando naturalmente al hombre en un área del Estado Bolívar, Venezuela. Rev. Inst. Med. Tro. Sao Paulo. 1975; 17: 34-48.
10. Wernsdorfer WH. The development y spread of drug resistant malaria. Parasitol Today. 1991; 7(11): 297-303.
11. Molina de Fernández D, Saume F, Bisset J, Hidalgo O, Anaya W, González J, Salas O y Bazararte H. Establecimiento de la línea de susceptibilidad de la fase adulta de *Anopheles* spp a insecticidas químicos. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. 1997; 37 (1-2): 55-69.
12. Caraballo A, Rodríguez-Acosta A. Chemotherapy of Malaria and resistance to antimalarial drugs in Guayana area, Venezuela. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999; 61(1):120-24.
13. Pan American Health Organization-World Health Organization. Status report on malaria programs in the Americas. 44th Directing Council, 55th Session of the Regional Committee, Washington, D.C., USA. 2003; 22-23:1-48.
14. Akerele O. Las Plantas Medicinales: Un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud. 1993; 14: 390-95.
15. Willcox ML, Bodeker G. Plant-based malaria control: research initiative on traditional antimalarial methods. Parasitol. Today. 2000; 16 (6):220-21.
16. Klayman DL. Quinghaosu (Artemisinin): An antimalarial drug from China. Science. 1985; 228: 1049-55.
17. Kirby GC. Medical plants and the control of parasites. Medical plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1996; 90: 605-60.
18. Ridley RG. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. Nature 2002; 415: 686-93
19. Sanabria GA. Análisis Fitoquímico Preliminar. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, 1983. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
20. Bassett Maguire and collaborators. The Botany of the Guayana highland . Memoirs of the New York botanical Garden 1967. 17 (1): pp. 305-306
21. Tobias L, Steyermark J. Instituto Botánico Dirección de recursos Naturales renovables Ministerio de Agricultura y Cria, Caracas. Rev. Flora de Venezuela Volumen IX 1963.
22. Lozano JM, Espejo F, Diaz D, Salazar IM, Rodriguez J, Pinzón C, Calvo JC, Guzmán F. Patarroyo ME. Journal of Peptide Research 1998; 52: 457-9
23. Ajayiyeobaa, E.O.. Abiodunb, O.O. Faladec, M.O. Ogbolea, N.O. Ashidia, J.S Happid, C.T. Akinboye D.O. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in

- Nigerian antimalarial ethnomedicine *Phytomedicine* 2006; 13: 295-8
24. Jingyong Sun , HongxiangLou , Shengjun Dai , Hui Xu , Feng Zhao , Ke Liu. Indole alkaloids from *Nauclea officinalis* with weak antimalarial activity. *Phytochemistry* 2008; 69: 1405-10
 25. Nguyen J, Hop Tran P, Tran H, Anh Phan T, Dolecek C, Farrar J, Tinh Hien Tran, Caron P, Bodo B, Grellier P. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 109: 417-27
 26. Toglozombio A, Adjétey K, Koffi Djè M, Vangah-Manda M, Koffi Daho A, Pénali Koné L, Koné M, Guédé-Guina F. Antimalarial activity of *Mitragyna ciliata* (Aubrev and Pellegr) (Rubiaceae): Preliminary study *South African Journal of Botany* 2007; 73: 226-29
 27. Njomnang Soh P, Coise F, Vical B. Are West African plants a source of future antimalarial drugs?. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 114: 130-140