

ARTICULO INVITADO

EVALUACION FARMACOLOGICA Y TOXICOLOGICA "IN VITRO"
DE ALGUNAS PLANTAS COMUNMENTE EMPLEADAS
EN GUATEMALA CONTRA LA MALARIA

MEDINILLA ALDANA, BEATRIZ EUGENIA
Departamento de Análisis Aplicado,
Escuela de Química Farmacéutica,
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

INTRODUCCION

La malaria, enfermedad aguda y frecuente crónica causada por parásitos del género *Plasmodium*, es aun la enfermedad parasítica más importante a nivel mundial. Se le encuentra en aproximadamente cien países, de los cuales sólo en Africa alrededor de un millón de niños muere anualmente a causa de esta enfermedad (1). Las razones por las cuales la malaria aun representa un serio problema, son varias: la resistencia adquirida por los mosquitos a los insecticidas y la dificultad para implementar o mantener efectivos esquemas de control (2).

La resistencia de los principales agentes causantes, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, a los clásicos medicamentos cloroquina primaquina, ha sido probablemente el problema más importante. (3,4). Las migraciones poblacionales también han contribuido a que dicha resistencia se extienda a otras regiones. Es así como ha surgido un gran interés a nivel mundial

por buscar nuevos agentes antimaláricos con mecanismo de acción diferentes a los de los medicamentos ya disponibles, y debido a esto, la investigación sobre las plantas ha cobrado aun más importancia en la actualidad, sobre todo después del descubrimiento del nuevo agente antimalárico artemisinina, principio activo aislado de la planta *Artemisia annua*, procedente de la China (5,6,7).

El presente proyecto fue desarrollado con el propósito de evaluar la acción antimalárica de cinco de las plantas más comúnmente empleadas en Guatemala contra la malaria: *Croton guatemalensis*, *Croton niveus*, *Neurolaena lobata*, *Sansevieria hyacinthoides* y *Simarouba glauca*. Como modelo "in vitro" se empleó ratones albinos infectados con *Plasmodium berghei*, y como antimalárico de referencia artemisinina. Los extractos acuosos de las cinco plantas fueron capaces de inducir al 7o. día post-infección un porcentaje de supresión de la parasitemia mayor del 50%, no habiéndose detectado efecto tóxico aparente.

MATERIALES Y METODOS

Muestras vegetales:

Nombre científico y común	Parte Invest.	Región de Colecta
<i>Croton guatemalensis</i> (copalchí)	h,c	Escuintla
<i>Croton niveus</i> (copalchí)	h,c	Ciudad Capital
<i>Neurolaena lobata</i> (tres puntas, mano de lagarto)	h	Cobán
<i>Sansevieria hyacinthoides</i> (cuarina)	h,r	Ciudad Capital
<i>Simarouba glauca</i> (aceituno)	c	Ciudad Capital

h = hojas; c = corteza; r = raíz

Animales: ratones hembra suizos, albinos, con peso entre 20 y 25 gramos.

Parásito para inoculación: *Plasmodium berghei* sensible a la cloroquina, cepa K173.

Preparación de los extractos:

Los especímenes vegetales debidamente autenticados por el personal del Herbario de la Facultad de Agronomía y Jardín Botánico de la Universidad de San Carlos de Guatemala, fueron disecados al aire libre, a la sombra, y mediante calor artificial, a temperatura controlada. Luego se prepararon infusiones al 10% de cada una de las plantas, y los extractos obtenidos fueron liofilizados y conservados en refrigeración, dentro de una desecadora, hasta ser utilizados.

Diseño experimental:

Inoculación del parásito: la cepa de *P. berghei* se mantuvo mediante subinoculación semanal por vía i.p de 100,000 eritrocitos parasitados procedentes de ratones donadores, a ratones sanos. Para evaluar la parasitemia se prepararon frotis sanguíneos de la sangre de la cola del animal, y se prepararon las diluciones necesarias con solución salina isotónica, en base al método de Eling et al. (5)

Ensayos preliminares: el mismo día en que se involucró los ratones (día cero) se inició el tratamiento oral con extracto acuoso liofilizado, a dosis de 750 mg/Kg, el cual se continuó diariamente, durante 7 días. Se trabajó con grupos de tres ratones para ensayar cada una de las plantas. Se incluyeron además dos grupos control, con igual número de animales: uno positivo, tratado con artemisinina (antimalárico de referencia), a dosis de 50 mg/Kg., y el otro negativo, al que únicamente se le administró agua como placebo. A cada ratón se administró un volumen de 0.2 ml., mediante sonda gástrica.

Al séptimo día post-infección se prepararon frotis sanguíneos tiñiendo con colorante Wright y se determinaron los porcentajes de parasitemia. Cada ensayo se sometió a dos repeticiones.

Ensayo de toxicidad: tratamiento oral con extracto acuoso liofilizado, a dosis de 3 g/Kg. Con el objeto de detectar posibles efectos tóxicos. La concentración de los extractos preparados coincidió con el límite máximo de solubilidad en agua de algunos de los productos vegetales liofilizados. A lo largo del experimento se mantuvo a los animales bajo constante observación, y

se tomó en cuenta el tiempo medio de sobrevivencia. La dosis de artemisinina empleada también se cuadruplicó hasta 200 mg/Kg. Con excepción de las dosis, las condiciones en que se efectuó el experimento fueron idénticas a las de los ensayos preliminares. Con el objeto de evaluar reproducibilidad se efectuaron tres repeticiones, en diferentes fechas.

Análisis de datos: en base a los porcentajes de parasitemia obtenidos al séptimo día se calcularon los promedios correspondientes, y se establecieron los porcentajes de supresión promedio, de acuerdo a la fórmula utilizada por Zafar (6).

RESULTADOS Y DISCUSION

La inoculación con 100,000 eritrocitos parasitados fue capaz de infectar los ratones albinos, obteniéndose una parasitemia promedio de 25%, al séptimo día post-infección, lo cual coincide con datos anteriormente presentados por Eling et al. (5).

Con respecto al grupo tratado con artemisinina, antimalárico utilizado como referencia, se observaron diferentes obvias: 9% a dosis de 50 mg/kg, y 0% a 200 mg/kg. No se detectó ningún efecto tóxico visible al cuadruplicar la dosis original hasta 200 mg/kg, luego de su administración diaria durante 8 días. A dosis de 50 mg/kg la artemisinina indujo un porcentaje de supresión promedio equivalente al 64%, mientras que a 200 mg/kg la supresión fue de 100%, lo cual confirma la efectividad de la artemisinina como antimalárico.

En cuanto a los extractos vegetales, en general todos brindaron resultados interesantes, los cuales se muestran en la gráfica No. 1.: De las cinco especies estudiadas, *Croton guatemalensis* indujo la mayor acción esquizontocida (a nivel de la corteza, 84% de supresión a 70Mg/Kg a 3 g/Kg, aunque las hojas mostraron efecto menor (56% para ambas dosis). Es interesante observar que la supresión de la corteza alcanzó valores aun mayores que la artemisinina a 50mg/kg (64%).

De manera similar, *Croton niveus*, especie estrechamente relacionada con la anterior, indujo reducciones en los niveles de parasitemia (hojas: 44% para la dosis de 750 mg/kg y 56% para 3g/kg; corteza: 56% para ambas dosis)

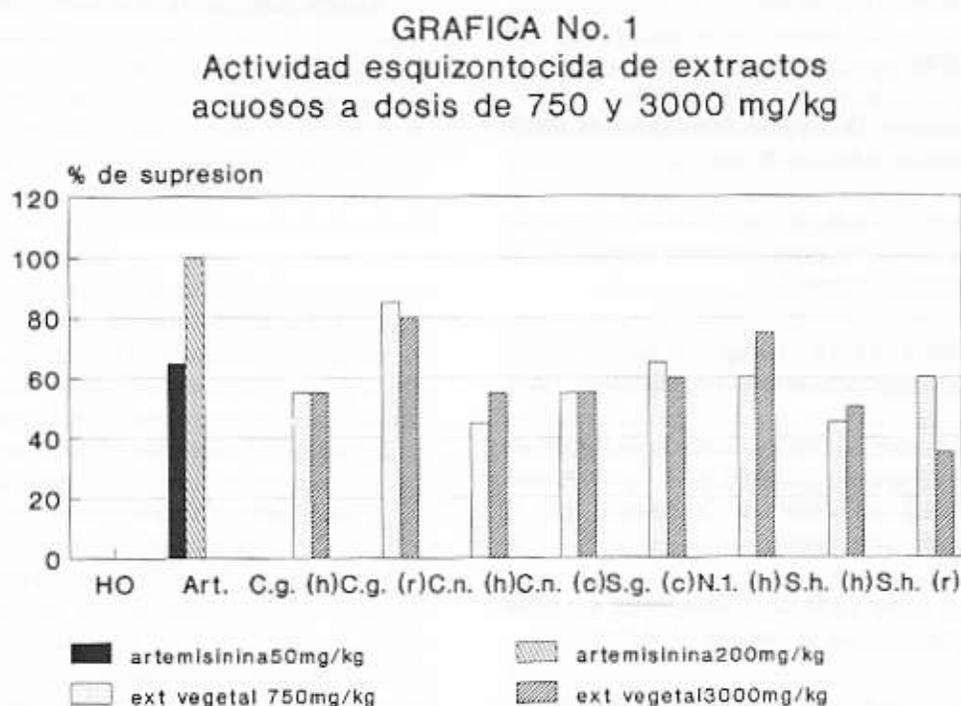
La corteza de *Simarouba glauca* mostró acción esquizontocida similar a la de la artemisinina a 50 mg/

kg: 64 y 60% de supresión, en comparación con 64%. De igual manera, las hojas de *Neurolaena lobata*: 60% a 750 mg/kg; a 3 g/kg su acción fue aun mayor: 76%. Respecto a *Sansevieria hyacinthoides*, el extracto de hojas indujo porcentajes de supresión menores: 46% a 750 mg/kg y 52 % a 3g/kg. La variabilidad de los datos fue mayor para el caso de la raíz: 60% a 750 mg/kg y 32% a 3 g/kg.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, puede afirmarse que las cinco plantas estudiadas muestran valor potencial como agentes antimaláricos, ya que indujeron como mínimo para una de las dos

dosis ensayadas un porcentaje de supresión de la parasitemia mayor del 50%. Es importante mencionar que en ningún caso se detectaron efectos tóxicos visibles ni muertes prematuras luego de la administración de los extractos. Sin embargo, todos los animales, incluso los tratados con artemisinina, fallecieron a consecuencia de la malaria debido a que no se continuó con los distintos tratamientos después de concluido cada experimento. Días antes de morir los ratones mostraron los signos característicos de la enfermedad ya reportados por Polder (7): orejas, nariz y cola blancas, pelo erizado, espalda encorvada, incoordinación motriz y espasmos.

GRAFICA No. 1. Actividad esquizontocida de extractos acuosos a dosis de 750 y 3000 mg/kg.



h = hojas c = corteza r =raiz

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las hojas y corteza de Croton guatemalensis y Croton niveus, corteza de Simarouba glauca, hojas de Neurolaena lobata, hojas y raíz de Sansevieria hyacinthoides poseen valor potencial como agentes antimaláricos, ya que al realizar el estudio "in vitro" sobre ratones albinos infectados con Plasmodium berghei los extractos acuosos de dichas plantas indujeron al séptimo día post-infección un porcentaje de supresión de la parasitemia mayor del 50%, por lo menos para una de las dos dosis ensayadas (750 mg de extracto vegetal liofilizado por kg de peso y 3 g/kg).

Ninguno de los extractos vegetales al ser administrado a dosis de 3g/kg por vía oral, fue capaz de inducir efecto tóxico aparente en los animales de experimentación.

Se recomienda evaluar la acción antimalárica de los extractos alcohólicos de las plantas estudiadas, y realizar el estudio fitoquímico de las mismas, ya que para la mayoría de ellas la información disponible al respecto es sumamente escasa.

Agradecimientos

La autora agradece la valiosa colaboración de la siguientes personas e instituciones:

La Dra. Elfriede Pöll por sugerir el tema de la presente investigación, y colaborar en la colecta e identificación botánica del material vegetal.

La Dirección General de Investigación (DIGI), por el financiamiento otorgado durante el período 1991-1992.

El Dr. Enrique Acevedo, del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), y Dr. Byron Arana, de la Universidad del Valle de Guatemala, por el préstamo de equipo necesario.

El Walter Reed Army Institute of Research, en Washington, por proporcionar la cepa de P. berghei.

El personal del Herbario de la Facultad de Agronomía de la USAC, por colaborar en la caracterización botánica de las plantas.

REFERENCIAS

1. Peeters, P. Liposomes, immunoliposomes and antibodies in the chemotherapy of Plasmodium berghei infections. PhD thesis. Catholic University of Nijmegen. The Netherlands. 1988. 160 P.
2. Phillips, R. Malaria. Studies in Biology No. 152. Camelot. Great Britain. 1983. 58 P.
3. Luzzi, G.; D. Warrell, A. Barnes et al. Treatment of primaquine resistant Plasmodium vivax malaria. Lancet, 1992. 340:310.
4. Peters, W. Chemotherapy and drug resistance in malaria. Academic Press. London. 1970. Pp: 88-106.
5. Eling, W.; a. van Zon & C. Jerusalem. The course of a Plasmodium berghei infection in six different mouse strains. Z. Parasitenk., 1977, 54: 2445.
6. Zafar, M.; M. Hamdard & A. Hameed. Screening of Artemisia absinthium for antimalarial effects on Plasmodium berghei in mice: a preliminary report. J. Ethnopharmacol. 1990. 30:223-226.
7. Polder, T. Morphology of cerebral malaria, clinical and experimental study. PhD thesis. Faculteit der Geneeskunde, Vrije Universiteit te Amsterdam. Amsterdam, the Netherlands 1989. 175 P.
1. Peeters, P. Liposomes, immunoliposomes and antibodies in the chemotherapy of Plasmodium