

Actividad antimalárica *in vitro* de cuatro especies vegetales del género *Rauwolfia* (Apocynaceae)

In vitro antimalarial activity of four plant species of genus *Rauwolfia* (Apocynaceae)

Lastenia Ruiz Mesía¹, Jeshus Jean Pierre López Mesía², Samuel Arévalo Ocumbe², Fernando Abner Nájjar Arana², Leonor Arévalo Encinas², Wilfredo Ruiz Mesía² y Liliana Ruiz Vásquez²

Recibido: noviembre 2014

Aceptado: diciembre 2014

RESUMEN

La malaria es una enfermedad infecciosa producida por parásitos de *Plasmodium* spp., siendo la responsable de más de un millón de muertes por año, lo que constituye un importante problema de salud en todo el mundo, con alta endemicidad en países en vías de desarrollo. Las plantas constituyen una valiosa fuente de nuevos agentes antimaláricos, a partir de ella se han descubierto compuestos como quinina y artemisinina, que hoy en día se utilizan para el tratamiento de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a múltiples medicamentos antimaláricos. En este trabajo se evaluó la actividad antimalárica *in vitro* frente a *P. falciparum* cepa FCR-3 (cloroquina resistente), de los extractos etanólicos y alcaloidales de las especies vegetales de *Rauwolfia macrantha*, *R. paraensis*, *R. sprucei* y *R. andina*. De los extractos alcaloidales evaluados, la raíz de *R. macrantha* y tallos de *R. sprucei* mostraron muy buena actividad antimalárica ($IC_{50} = 2,80-3,96 \mu\text{g/mL}$), comparable a la actividad de *Remijia peruviana* y algunas especies de la familia Simaroubaceae; mientras que los extractos alcaloidales de los tallos y hojas de *R. macrantha*, además del extracto etanólico de la raíz de *R. paraensis* mostraron buena actividad antiplasmodial con $IC_{50} = 6,00 \mu\text{g/mL}$, $7,09 \mu\text{g/mL}$ y $8,37 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, siendo estas especies vegetales una alternativa para el descubrimiento de nuevas drogas antimaláricas de origen natural.

Palabras claves: género *Rauwolfia*, plantas medicinales, *Plasmodium falciparum*, actividad antimalárica.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by parasite of *Plasmodium* spp. It is responsible for more than one million deaths per year, constituting a major health problem worldwide, with highly endemic in developing countries. Plants are a valuable source of new antimalarial agents, from them; it has been discovered as quinine and artemisinin compounds, which today are used to treat resistant strains of *Plasmodium falciparum* to multiple antimalarial drugs. In this paper we evaluated the *in vitro* antimalarial activity against *P. falciparum* strain FCR-3 (chloroquine resistant) of the ethanol and alkaloidal extracts of plant species of *Rauwolfia macrantha*, *R. paraensis*, *R. sprucei* and *R. andina*. Alkaloidal extracts of the root of *R. macrantha* and stems the *R. sprucei* showed very good antimalarial activity ($IC_{50} = 2,80-3,96 \mu\text{g/mL}$), comparable to the activity of *Remijia peruviana* and some species of the family Simaroubaceae; while alkaloidal extracts the stems and leaves of *R. macrantha* and ethanolic extract of the root of *R. paraensis* showed good antiplasmodial activity with $IC_{50} = 6,00 \mu\text{g/mL}$; $7,09 \mu\text{g/mL}$ and $8,37 \mu\text{g/mL}$, respectively, these plant species is an alternative for the discovery of new antimalarial drugs of natural source.

Key words: genus *Rauwolfia*, medicinal plants, *Plasmodium falciparum*, antimalarial activity.

¹Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (Lipnaa). Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (Cirna). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Pasaje Los Paujiles s/n, Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Loreto, Perú. lasteniaruizm@gmail.com

²Lipnaa. Cirna. UNAP. San Juan Bautista, Loreto, Perú.

INTRODUCCIÓN

La malaria es un problema de salud pública de gran importancia a nivel mundial. Se estima que esta enfermedad probablemente cause mayor morbilidad y mortalidad que ninguna otra en el mundo. Se calcula que se presentan alrededor de 110 millones de casos de malaria al año y al menos un millón de personas mueren anualmente por esta enfermedad, principalmente niños. En el 2014, el Boletín Epidemiológico de Malaria en el Perú, ha reportado 16 371 casos de malaria y con claras tendencias al incremento sostenido; en el departamento de Loreto se concentra el 89,8% (14 707 casos reportados) (Mateo, 2013).

Existe una amenaza a la propagación de cepas resistentes a partir del sudeste asiático, donde últimamente se ha demostrado resistencia *in vitro* e *in vivo* a los derivados de artemisina (Rogers *et al.*, 2009). En la ausencia de una vacuna, se evidencia una urgente necesidad de buscar alternativas seguras, efectivas, económicas y fáciles de administrar, que reemplacen o complementen los fármacos en uso. Una de las fuentes importantes desde la antigüedad para el suministro de medicamentos son los alcaloides, que son bases nitrogenadas fisiológicamente activas y que derivan de diferentes precursores biogénicos. Por su parte, la familia Apocynaceae es una fuente importante de alcaloides mono y bisindólicos que han demostrado tener una potente actividad antiparasitaria.

En este trabajo de investigación se han estudiado especies del género *Rauwolfia* (Apocynaceae), con la finalidad de obtener compuestos bioactivos para el tratamiento de la malaria. Este género está constituido por 135 especies distribuidas en América, África, Asia y Oceanía (Tsing y Li, 1977), encontrándose en la Amazonía peruana

cinco especies que se caracterizan por ser bioproductores de alcaloides indólicos como reserpina, yohimbina, serpentina, deserpidina, ajmalina y ajmalicina, compuestos utilizados en el tratamiento de hipertensión (Vakil, 1999) y cáncer de mama (Stanford *et al.*, 1986); asimismo, de las hojas de *Rauwolfia tetraphylla* L., se aislaron los alcaloides reserpilina y 11-desmetoxi reserpilina, los cuales mostraron una actividad antipsicótica significativa, sin toxicidad asociada (Gupta *et al.*, 2012). En medicina tradicional estas plantas se utilizan para el tratamiento de diferentes enfermedades como: hipertensión, desórdenes del sistema nervioso central, insomnio, ansiedad, epilepsia, malaria (Bhatara *et al.*, 1997; Kirtikar y Basu, 1993) y como antidiarreico (Ezeigbo *et al.*, 2012).

MATERIAL Y MÉTODO

Material vegetal

Para el estudio se seleccionaron cuatro especies del género *Rauwolfia* (*R. macrantha*, *R. sprucei*, *R. paraensis* y *R. andina*), que fueron recolectadas en San José, distrito de Belén; río Tahuayo, afluente del río Amazonas, distrito de Fernando Lores; Allpahuayo-Mishana y Arboretum El Huayo, distrito de San Juan Bautista; respectivamente.

Preparación de extractos

Las diferentes partes de las plantas (hojas, tallos, corteza y raíz) fueron secadas, pulverizadas y pesadas; se maceraron con etanol con renovación de solvente cada 48 horas por un periodo de 15 a 21 días; se filtraron y concentraron al vacío.

Los extractos etanólicos fueron disueltos con agitación en una solución de H₂SO₄ [0,5N] y CH₂Cl₂ (1:1) por un periodo de seis horas, se filtraron y se extrajeron con CH₂Cl₂, el filtrado se concentró al vacío y se

obtuvieron los extractos alcaloidales ácidos, la fase acuosa se basificó con NH_4OH (pH = 9), los alcaloides se obtuvieron extrayendo la fase acuosa con CH_2Cl_2 , el solvente se eliminó a presión reducida. Los extractos etanólicos y alcaloidales se pesaron para calcular el porcentaje de rendimiento.

Cultivo *in vitro* y evaluación antimalárica

La cepa FCR-3 (resistente a cloroquina) de *P. falciparum* fue cultivada *in vitro* de acuerdo con la metodología descrita (Trager y Jensen, 1976). Como droga de referencia se utilizó difosfato de cloroquina, Sigma ($\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{C}_1\text{N}_3 \cdot 2\text{H}_3\text{PO}_4$); las concentraciones evaluadas fueron preparadas a partir de una solución madre de 10 mM, de la cual se realizó diluciones seriadas a concentraciones de 10 a 1000 nM, que fueron distribuidas por duplicado en microplacas de titulación en orden creciente. Se determinó la IC_{50} y se corroboró la resistencia de la cepa FCR-3 a esta droga. Se prepararon soluciones madre de los extractos disolviéndolos en DMSO a una concentración de 10 mg/mL (2 mg de extracto en 200 μL de DMSO). A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas a concentraciones de 0,2, 2, 20 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con medio RPMI, distribuidas de menor a mayor concentración y por duplicado en las microplacas, obteniéndose concentraciones finales de 0,1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para el ensayo de actividad antimalárica (Deharo *et al.*, 2000) se colocaron 200 μL de agua destilada estéril en todos los bordes superiores e inferiores de la placa de 96 pozos. En cada pozo se distribuyeron 100 μL de una suspensión de glóbulos rojos 4% en medio RPMI enriquecido con D-glucosa (4,5 g/L), bicarbonato de sodio (1,5 g/L), piruvato de sodio (1 mM), HEPES (10 mM), L-glutamina (300 mg/L), hipoxantina (20 mg/L) y Albumax II al 0,5 %, con una parasitemia final del 1% en estadio anillo; se añadieron

100 μL de las concentraciones seriales de los extractos, droga y solventes (dando un volumen final de 200 μL); se incubó la placa a 37 °C por un periodo de 48 horas; al cabo de este tiempo se determinó la parasitemia por citometría de flujo (BDFACScalibur), para lo cual se tomaron los eritrocitos de cada pozo y se adicionaron 100 μL de bromuro de etido (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubaron por 30 minutos. Se adquirieron y analizaron 100 000 células (Wongchotigul *et al.*, 2000; Contreras *et al.*, 2004; Van Vianen *et al.*, 1993). Se realizaron tres repeticiones para cada extracto evaluado.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inh.} = \text{Control negativo} - \text{tratamiento} / \text{Control negativo} \times 100$$

El valor de IC_{50} se calculó por la siguiente ecuación:

$$\log (\text{IC}_{50}) = \log (X_1) + \frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} [\log (X_2) - \log (X_1)]$$

X_1 = concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia $Y_1 > 50\%$

X_2 = concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia $Y_2 < 50\%$

Para la interpretación de los datos se utilizó el programa estadístico SPS 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron veintiún extractos de las cuatro especies vegetales del género *Rauwolfia* de diferentes órganos de las plantas seleccionadas para el estudio: doce extractos etanólicos, siete extractos alcaloidales básicos y dos extractos alcaloidales ácidos. Los resultados se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Extractos etanólicos y alcaloidales.

Especie vegetal	Parte de la planta	Peso de la planta seca y molida	Tipo de extracto	Peso de los extractos	% de rendimiento
<i>Rauwolfia macrantha</i>	Hojas	686,3 g	Ext. EtOH	173,0065 g	25,20
			Ext. Alc. básico	6,7910 g	0,98
	Tallos	1337,7 g	Ext. EtOH	81,2132 g	6,07
			Ext. Alc. básico	7,0328 g	0,52
			Ext. Alc. ácido	137,7 mg	0,010
	Raíces	1075,6 g	Ext. EtOH	64,4149 g	5,98
Ext. Alc. básico			7,6483 g	0,71	
Ext. Alc. ácido			174,4 mg	0,016	
<i>Rauwolfia paraensis</i>	Hojas	90,4 g	Ext. EtOH	1,5880 g	1,77
			Ext. Alc. básico	1,0568 g	1,16
	Tallos	53,6 g	Ext. EtOH	1,5720 g	2,92
			Ext. Alc. básico	175,6 mg	0,32
	Raíces	47,3 g	Ext. EtOH	1,7368 g	3,67
	<i>Rauwolfia sprucei</i>	Hojas	96,3 g	Ext. EtOH	2,6750 g
Tallos		225,5 g	Ext. EtOH	5,9250 g	2,62
			Ext. Alc. básico	1,3800 g	0,61
Raíces	180,1 g	Ext. EtOH	7,6766 g	4,26	
		Ext. Alc. básico	1,4010 g	0,78	
<i>Rauwolfia andina</i>	Hojas	92,4 g	Ext. EtOH	2,053 g	2,22
	Cortezas	87,0 g	Ext. EtOH	1,825 g	2,09
	Raíces	80,5 g	Ext. EtOH	1,880 g	2,33

Actividad antimalárica *in vitro*

Se evaluó la actividad antimalárica de veintún extractos (etanólicos y alcaloidales) frente a la cepa FCR-3 (cloroquina resistente) de *P. falciparum*. Para la actividad antimalárica se consideró que si los extractos muestran una IC_{50} menor que 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$: la actividad era muy buena, de 5 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: la actividad era

bueno y mayor de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: el extracto se consideró inactivo. Como control positivo se utilizaron los extractos etanólicos y alcaloidales de la corteza de *Remijia peruviana* con $IC_{50} = 2,4 \pm 0,01$; $2,7 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Ruiz Mesía *et al.*, 2005) y difosfato de cloroquina ($IC_{50} = 0,28 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Actividad antimalárica *in vitro* de extractos etanólicos y alcaloidales.

Especie vegetal	Parte de la planta	Tipo de extracto	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Rauwolfia macrantha</i>	Hojas	Ext. EtOH	43,56
		Ext. Alc. básico	7,14
	Tallos	Ext. EtOH	38,56
		Ext. Alc. básico	15,30
		Ext. Alc. ácido	6,00
	Raíces	Ext. EtOH	24,05
		Ext. Alc. básico	2,80
		Ext. Alc. ácido	3,91

Continúa...

Continúa...

Especie vegetal	Parte de la planta	Tipo de extracto	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>Rauwolfia paraensis</i>	Hojas	Ext. EtOH	25,08
		Ext. Alc. básico	7,09
	Tallos	Ext. EtOH	21,60
Ext. Alc. básico		11,04	
<i>Rauwolfia sprucei</i>	Raíces	Ext. EtOH	8,37
	Hojas	Ext. EtOH	14,27
		Ext. Alc. básico	9,10
<i>Rauwolfia andina</i>	Tallos	Ext. Alc. básico	3,96
	Raíces	Ext. EtOH	28,65
		Ext. Alc. básico	15,64
<i>Remijia peruviana</i>	Hojas	Ext. EtOH	37,65
	Cortezas	Ext. EtOH	28,15
	Raíces	Ext. EtOH	45,13
<i>Remijia peruviana</i>	Cortezas	Ext. EtOH	2,40
		Ext. Alc. básico	2,70

De los extractos evaluados, tres extractos alcaloidales (raíces de *R. macrantha* y tallos de *R. sprucei*) mostraron muy buena actividad antimalárica (IC₅₀ = 2,80 - 3,96 µg/mL) comparable con la actividad de *Remijia peruviana* y algunas especies de la familia Simaroubaceae (O'Neill et al., 1985). Los extractos alcaloidales de los tallos (IC₅₀ = 6,00 µg/mL) y hojas (IC₅₀ = 7,14 µg/mL) de *R. macrantha* y el extracto etanólico de las raíces de *R. paraensis* (IC₅₀ = 8,37 µg/mL) mostraron buena actividad antiplasmodial, por lo que es de suponer que los alcaloides serían los responsables de la actividad antimalárica.

El extracto alcaloidal básico de las raíces de *R. macrantha* (IC₅₀ = 2,80 µg/mL) presentó una actividad antimalárica comparable con el extracto alcaloidal básico de *Remijia peruviana* (2,7 ± 0,27 µg/mL).

Ninguno de los extractos presentó actividad antimalárica que se pueda comparar con la droga de referencia difosfato de cloroquina (IC₅₀ = 0,28 ± 0,08 µg/mL), como es de

esperar debido a que los extractos etanólicos y alcaloidales son mezclas complejas de diversos compuestos.

Se reportan en la bibliografía diversas actividades biológicas del género *Rauwolfia*, pero no encontramos información sobre actividad antimalárica; sin embargo, existen estudios relacionados con otros géneros de la familia Apocynaceae que también se caracterizan por sintetizar alcaloides indólicos con una diversidad estructural muy variada; dentro de ellos podemos citar a los géneros *Aspidosperma*, *Tabernaemontana*, *Kopsia*, *Geissospermum* y *Alstonia*, de los cuales se han aislado compuestos con actividad antimalárica. De *Aspidosperma macrophylla* se aisló villalstonina (Phillipson y Wright, 1991), con una IC₅₀ de 0,27 µM, cuya actividad biológica se compara con la del medicamento estándar cloroquina (IC₅₀ de 0,20 µM); de *Aspidosperma pyriforme* Mart. y *A. megalocarpon* Mull. también se aislaron alcaloides indólicos como aspidospermina, demotoxi aspidospermina y palasina, que presentaron actividad

antimalárica con IC_{50} entre 3,2-15,4 μM (Mitaine-Offer *et al.*, 2012).

La corteza de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlechtd resultó ser activa frente *P. falciparum* cepa F32-Tanzania (cloroquina sensible) con una $IC_{50} = 3,9 \mu\text{g/mL}$ (Bourdy *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

El presente estudio nos da a conocer que los extractos alcaloidales de las especies vegetales *Rauwolfia macrantha*, *R. paraensis* y *R. sprucei*, constituyen una alternativa para el descubrimiento de nuevas drogas antimaláricas de origen natural, en un momento en que existe una amenaza de resistencia de *P. falciparum* a los fármacos en uso.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) por haber financiado esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bhatara VS, Sharma JN, Gupta S, Gupta YK. 1997. Images in psychiatry *Rauwolfia serpentine*: The first herbal antipsychotics. *Am. J. Psychiatry*, 154 (7): 894.

Bourdy G, Oporto P, Gimenez A, Deharo E. 2004. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. *J. of Ethnopharmacology*, 93: 269-277.

Contreras CE, Rivas MA, Domínguez J, Charris J, Palacios M, Bianco NE, Blanca I. 2004. Stage-specific Activity of

Potential Antimalarial Compounds Measured in Vitro by Flow Cytometry in Comparison to Optical Microscopy and Hypoxanthine Uptake. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 99 (2): 179-184.

Deharo E, Gautret PH, Muñoz V, Sauvain M. 2000. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. CYTED Cooperación Iberoamericana. Primera edición. La Paz, Bolivia.

Ezeigbo II, Ezeja MI, Madubuike KG, Ifenkwe DC, Ukwani IA, Udeh NE, Akomas SC. 2012. Antidiarrhoeal activity of leaf methanolic extract of *Rauwolfia serpentine*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 430-432.

Gupta S, Kumar Khanna V, Maurya A, Umrao Bawankule D, Kumar Shukla R, Pal A, Kumar Srivastava S. 2012. Bioactivity guided isolation of antipsychotic constituents from the leaves of *Rauwolfia tetraphylla* L. *Fitoterapia*, 83: 1092-1099.

Kirtikar KR, Basu BD. 1993. Indian medicinal plants. Vol. 2, Dehra Dun Publishers, Calcutta, India, p. 289.

Mateo S. 2013. Situación epidemiológica de la malaria en el Perú. *Bol. Epidemiol.*, (Lima), 23(18): 356-358.

Mitaine-Offer C, Sauvain M, Valentin A, Callapa J, Mallié M, Zèches-Hanrot M. 2012. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole Alkaloids. *Phytomedicine*, 9: 142-145.

O'Neill M, Bray DH, Phillipson JD, Warhust DC. 1985. Plants as source of antimalarial drugs. Part I. In vitro test

- method for the evaluation of crude extracts from plants. *Planta Med.*, 61: 394-398.
- Phillipson JD, Wright CW. 1991. Medicinal plants in tropical medicine. 1. Medicinal plants against protozoal diseases. *Trans Roy Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85 (1): 18-21.
- Rogers WHO, Sem R, Chim P, Lim P, Muth S. 2009. Failure of artesunate-nefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J.*, 8: 10.
- Ruiz Mesía L, Ruiz Mesía W, Reina M, Martínez Díaz R, De Inés C, Guadaño A, González Coloma A. 2005. Bioactive *Cinchona* alkaloids from *Remijia peruviana*. *Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1921-1926.
- Stanford JL, Martin EJ, Brinton LA, Hoover RN. 1986. *Rauwolfia* use and breast cancer. A case control study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 76 (5): 817-822.
- Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193 (4254): 673-675.
- Tsing Y, Li PT. 1977. In 'Flora Reipublicae Popularis Sinicae', Ed. Z.-Y. Wu, Science Press, Beijing, Vol. 63: 46.
- Vakil RJ. 1999. A clinical trial of *Rauwolfia serpentine* in essential hypertension. *Br. Heart J.*, 11 (4): 350-355.
- Van Vianen PH, Van Engen A, Thaithong S, Van Der Keur M, Tanke HJ, Van Der Kaay HJ, Mons B, Janse CJ. 1993. Flow Cytometric Screening of Blood Samples for Malaria Parasites. *Cytometry*, 14: 276-280.
- Wongchotigul V, Suwanna N, Krudsood S, Chindanond D, Kano S, Hanaoka N, Akai Y, Maekawa Y, Nakayama S, Kojima S, Looreesuwan S. 2000. The use of flow cytometry as a diagnostic test for malaria parasites. *Flow Cytometry in Malaria Detection*, 35 (3): 128-136.