

# Estudio químico biodirigido para la evaluación de actividad antimalárica de la especie vegetal *Piper aduncum* mediante el test FBIT

Melgarejo P, José Antonio<sub>1</sub> (\*) - Giménez T, Alberto<sub>2</sub> - Flores Q., Esther<sub>3</sub> - Deharo, Eric<sub>4</sub> - Bourdy, Genevieve, García, Rory<sub>6</sub> - Chuqui, Rogello,

- 1,2,3,6 Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés, e-mail: iifb@hotmail.com. Av. Saavedra # 2224 Miraflores. La Paz - Bolivia.
- 4,5 Investigadores del Institut de Recherche pour le Développement (IRD, Francia) en la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia). Misión IRD.
- 7 Comunidad Santa Rosa de Maravillas (CIPTA)
- (\*) A quien debe remitirse la correspondencia; e-mail: joemelgarejo@yahoo.com

## PALABRAS CLAVES:

FP-IX, Antipalúdicos, *Piper aduncum*, FBIT, hemina, hemozoina atóxica.

## RESUMEN

Para la realización del presente trabajo, se utilizó hojas de la especie vegetal denominada Matico (*Piper aduncum*) que pertenece a la etnia Tacana, provincia Abel Iturralde del departamento de La Paz. El extracto orgánico y las fracciones de esta planta fueron evaluadas a través del test de inhibición de la biomineralización de la ferro-protoporfirina-IX (FBIT), método "In vitro" (no directo), utilizado para la detección y evaluación de la actividad antimalárica.

Los resultados de la actividad antimalárica, se reportaron de acuerdo al valor de las  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria del 50% de la biomineralización de la FP-IX) donde el extracto crudo orgánico presenta un  $CI_{50}$  de 2.24 mg/ml y del seguimiento bio-dirigido de separación por cromatografía líquida al vacío VLC, se logró purificar en 6 fracciones; que, incluyendo el extracto orgánico, presentan muy buena actividad antimalárica con un  $CI_{50} < \text{ó igual a } 5\text{mg/ml}$ , excepto la fracción F1, con un  $CI_{50}$  de 5.60 mg/ml. La fracción más representativa F2 (40%), presenta una actividad antimalárica con un  $CI_{50}$  de 1,12 mg/ml.

Cabe hacer notar que el presente estudio forma parte del proyecto financiado por la OEA: "Aprovechamiento de la Flora Regional como Fuente de Fármacos contra Parásitos y Cáncer" realizado en el Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (UMSA).

## ABSTRACT

With reference to the *Piper aduncum* (Matico) in front to the test (FBIT) of the crude extract organic, it showed antimalaria activity. This activity had  $CI_{50}$  of 2.24 mg/ml. Using a vacuum liquid chromatographic VLC, six fraction was purified and showed very good antimalaria activity with a  $CI_{50}$  less or equal to 5 mg/ml, except the fraction F1 with  $CI_{50}$  of 5.60 mg/ml. The principal fraction F2, with antimalaria activity of  $IC_{50}$  to 1.12 mg/ml.

The present work is part of one project support by OEA: "Regional flora as new sources of Drugs Against parasites and cancer." This work was carried out by the Institute of Investigations Pharmaco Biochemistry of the Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

## INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas en las distintas sociedades y culturas, a lo largo del tiempo, viene siendo empleado para aliviar distintas dolencias que son causa de enfermedad. Así podemos señalar que en las épocas que preceden a la conquista española, en el territorio que corresponde hoy a Bolivia, tanto el Imperio Incaico como la cultura Aymara habían desarrollado una serie de conocimientos en el uso de plantas medicinales que hicieron que esta región recibiera el nombre de Kollasuyo o "país de la medicina".<sup>1</sup>

La identificación del valor curativo de las plantas a provenido, generalmente, de la información proporcionada por el saber médico tradicional y que ha sido utilizada ampliamente para la investigación fitoquímica, la identificación del principio activo y, en algunos casos, para el desarrollo y producción de medicamentos.<sup>2</sup>

La situación de la malaria en el mundo tropical se agrava cada año, por la disminución de los esfuerzos de la lucha contra esta enfermedad debida a la crisis económica, así como el precio de los medicamentos antimaláricos, fuera del alcance de las poblaciones que viven en zonas endémicas, así como al desarrollo de la resistencia de los vectores a insecticidas de elevado precio, la expansión de la resistencia del parásito a la cloroquina y a la mayoría de los otros antipalúdicos utilizados. Este fenómeno es debido principalmente a la vida comercial muy corta de los antipalúdicos a causa del establecimiento rápido de la resistencia y a los bajos ingresos económicos provenientes de la venta de estos medicamentos que, por los elevados costos de desarrollo, son denominados "huérfanos" de la ciencia comercial.<sup>3</sup>

El agente causal de la enfermedad de la malaria (*Plasmodium*) en su fase eritrocitaria, metaboliza la hemoglobina y elimina los grupos hemínicos polimerizándolos en hemozoína atóxica. Una droga capaz de bloquear este proceso es potencialmente tóxica para el parásito. Por lo tanto la elaboración de un test basado en el estudio de la actividad de drogas sobre la conversión de hemina en hemozoína permite ampliar la detección de potenciales fármacos antimaláricos.<sup>4</sup>

Según estudios etnobotánicos, las hojas frescas y secas de la planta *Piper aduncum* son utilizadas por la Etnia Tacana, principalmente en forma de mate para curar el resfriado y la fiebre o para tratar enfermedades venéreas y en forma de emplastos como antihemorrágico.<sup>5</sup>

La especie vegetal *Piper aduncum* fue seleccionada para realizar la purificación preliminar biodirigida de los posibles metabolitos responsables de la actividad antipalúdica, ya que estudios bibliográficos indican que presenta además actividad biológica contra hongos (*Neurospora crassa*, *C. albicans*), y bacterias (*B. subtilis*, *S. aureus*).

En estudios preliminares realizados en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B), la fracción (PA 2) obtenida de forma similar a la hecha en el presente estudio, utilizando como diluyente una mezcla de éter de petróleo y éter dietílico EP:Et<sub>2</sub>O (1:1) luego de ser llevado el extracto orgánico de la *Piper aduncum* a una cromatografía líquida al vacío en gel de sílice (C.L.V.) donde se obtuvieron 4 fracciones entre ellas la citada fracción (PA-2) de la que se pudo determinar a través de pruebas antifúngicas contra *N. crassa* que presentó actividad a una concentración de 60 µg/ml y contra *C. albicans* no presentó actividad. Esta fracción fue sometida a una cromatografía de exclusión Sephadex LH-20, posteriormente purificada mediante cromatografía en capa fina aislándose tres metabolitos secundarios: 5,7-dihydroxiflavona, Pinocebrin, (P-1); 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona, Angophorol, (P-2) el ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico (P-3), los cuales fueron evaluados biológicamente de tal manera que en la prueba antifúngica los productos P-1 y P-2 presentan actividad hasta 60 µg/ml, igual al extracto crudo PA y la fracción PA-2, en cambio el producto P-3 tiene actividad solo hasta 250 µg/ml.

En la prueba antiparasitaria tales metabolitos P-1 (CI<sub>50</sub>= 5 µg/ml), P-2 (CI<sub>50</sub>=6.7 µg/ml) y P-3 (CI<sub>50</sub>= 6.7 µg/ml) frente a *L. braziliensis* se ha incrementado la actividad con respecto a la del extracto orgánico PA (CI<sub>50</sub>= 37µg/ml); frente a *L. amazonensis* y *L. donovani* en los productos P-1 (CI<sub>50</sub>= 6.7 µg/ml) y P-2 (CI<sub>50</sub>= 10 µg/ml) la actividad antiparasitaria se ha incrementado con respecto a la del extracto orgánico; en cambio, en el producto P-3 ha disminuido la actividad biológica (CI<sub>50</sub>= 50 µg/ml) frente a ambos parásitos.

Cabe hacer notar que dichos metabolitos responsables de la actividad antiparasitaria y antifúngica fueron determinados estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas de UV, IR, MS, <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN y representan estructuras correspondientes a flavanonas, dihidrochalconas, derivados del ácido benzoico y del benceno.<sup>6</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se utilizó hojas secas de la especie vegetal Tacana *Piper aduncum*, clasificada botánicamente de acuerdo a un código específico, órgano empleado, familia, orden, género, especie y nombre vernacular o nativo como se muestra en la tabla N°1.

## PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Las hojas secas y molidas de *Piper aduncum* (154g) fueron maceradas en etanol al 70% por 96 hrs, al cabo de las cuales se procedió a filtrar, para luego concentrar al vacío por rotaevaporación y de esta manera obtener el extracto crudo. El etanol empleado para la extracción, fue purificado en destilador de solventes. Para la evaporación del extracto, se usó un rotaevaporador - Buchi RE 111 acoplado a una bomba al vacío de membrana Vacumm.

## SEPARACIÓN QUÍMICA

El extracto crudo obtenido, de la especie vegetal *Piper aduncum*, se re-suspendió con Diclorometano-agua ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  -  $\text{H}_2\text{O}$ ) ver tabla N°3; para la extracción líquido-

líquido y así lograr la separación en dos fases obteniéndose, de esta manera, un extracto orgánico y otro acuoso; el extracto orgánico fue evaporado a sequedad y el extracto acuoso congelado a  $-50^\circ\text{C}$  y liofilizado. Del extracto orgánico se determinó el peso y el porcentaje de rendimiento (%R) como se detalla en la Tabla N°3.

El extracto orgánico de la especie *Piper aduncum* fue sometido a una purificación preliminar, utilizando cromatografía líquida al vacío VLC con silicagel 60H ( $\text{SiO}_2$ ) usando una columna 12x6 cm, luego que previamente, 6 gramos del extracto crudo orgánico sea disuelto con 30 gramos de silicagel; el mismo se rotaevaporó y secó hasta obtener un polvo.

La columna fue empaquetada con 150 gramos de sílica gel para luego de colocar la mezcla ya preparada del extracto orgánico- $(\text{SiO}_2)$ , para que esta sea eluida con mezclas de solventes en orden creciente de polaridad como se describe en la tabla N° 2

Se obtuvieron 6 fracciones que, juntamente con el extracto orgánico, se determinó sus pesos y porcentajes de rendimiento como se muestra en la tabla N°3.

Tanto el extracto orgánico como las fracciones fueron evaluados para determinar la actividad antimalárica mediante el test (FBIT).<sup>7</sup>

TABLA N°1.  
CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE VEGETAL TACANA PIPER ADUNCUM

CÓDIGO	ÓRGANO	FAMILIA	ORDEN	GÉNERO	ESPECIE	NOMBRE COMUN
(*)GB1893	Hojas	Piperacea	Piperales	Piper	Piper aduncum	Matico

TABLA N°2.  
MEZCLA DE SOLVENTES UTILIZADOS PARA LA ELUCIÓN  
CROMATOGRÁFICA EN COLUMNA DEL EXTRACTO ORGÁNICO

MEZCLA DE SOLVENTES	ABREVIATURAS	DILUCIÓN	VOLÚMENES (ml)
ÉTER DE PETRÓLEO	EP	-	1000 ml
ÉTER DE PETRÓLEO : ÉTER DIETÍLICO	EP: ED	7:3	1000 ml
ÉTER DE PETRÓLEO : ÉTER DIETÍLICO	EP: ED	1:1	2000 ml
ÉTER DE PETRÓLEO : ÉTER DIETÍLICO	EP: ED	1:1	2000 ml'
ÉTER DIETÍLICO ED	-	1000 ml	
ÉTER DIETÍLICO : METANOL	ED:MeOH	8:2	500 ml

TABLA N 3.  
PORCENTAJES DE RENDIMIENTO Y PESOS DEL EXTRACTO ORGÁNICO  
Y DE LAS FRACCIONES DE *Piper aduncum* LUEGO DE LA (C.L.V.)

CÓDIGO	SOLVENTE	PESO (G)	% R
Ext. Orgánico	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	7.6	4.9
F1	EP	0.215	2.8
F2	EP: ED (7:3)	3.064	40.2
F3	EP: ED (1:1)	1.155	15.1
F4	EP: ED (1:1)	0.362	4.7
F5	ED	0.268	3.4
F6	ED:MeOH (8:2)	1.287	16.9

### ENSAYOS QUÍMICO-BIOLÓGICOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA.

Para la realización de los ensayos químico-biológicos, en la evaluación de la actividad antimalárica in vitro (No Directa) mediante el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT) se utilizó soluciones de hemina-DMSO (0,5 mg/ml), Tampón Acetato de Sodio (pH 4.4-4.5), NaOH 0,1N, solución extracto/DMSO y fracciones, colocadas en estricto orden en microplacas de cultivo de 96 pozos de fondo plano, más un solvente-control (DMSO), para realizar luego, la lectura de la absorbancia en un lector ELISA Awareness-Technology Inc. model Stat fax-2100.

Se utiliza un derivado sintético como es la hemina o hematina, que se transforma en beta-hematina (FPIX) al realizar el proceso químico, protocolo usado en el método descrito por Basilico et al.<sup>8</sup>, el cual se realiza en una microplaca de 96 pozos donde se colocaron 50 µl de solución de Hemina (0,5 mg/ml), 100 µl de Tampón Acetato de Sodio (pH 4.4-4.5), 50 µl de la solución extracto orgánico/DMSO (10mg/ml), 50µl de cada fracción diluida con DMSO a razón de 10mg/ml y 50 l de la droga de referencia (difosfato de cloroquina) por cada pozo, más 50 µl de un control DMSO. La microplaca fue colocada en una estufa a 37°C por espacio de 18 a 24 hrs.

Transcurrido este tiempo se centrifugó la microplaca a 3000 r.p.m. durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante.

Luego se colocó 200 µl de DMSO y se procedió a centrifugar nuevamente a 3000 r.p.m. durante 5 minutos, y eliminar el sobrenadante.

Se agregaron luego 150 µl de NaOH 0,1 N, para optimizar el pH, se agitó la placa por 30 segundos y se realizó la lectura de la absorbancia, utilizando un lector ELISA a 450 nm.

La absorbancia es proporcional al porcentaje de inhibición de la biomineralización de la hemina. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula:

$$i) \%Inh = \frac{D.O. control - D.O. Droga \times 100}{D.O. control}$$

El cálculo de la CI<sub>50</sub> (concentración inhibitoria del 50% de la biomineralización de la hemina) se realizó mediante la fórmula:

$$ii) \text{Log}(CI_{50}) = \log(X_1) + \frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} [\log(X_2) - \log(X_1)]$$

X<sub>1</sub> = concentración de la droga que da una inhibición de la hemina Y<sub>1</sub> > 50% ;

X<sub>2</sub> = concentración de la droga que da una inhibición de la hemina Y<sub>2</sub> < 50%

Sólo aquellos extractos con un porcentaje de inhibición superior al 50 % fueron considerados activos.

Para considerar los valores de CI<sub>50</sub> se toman en cuenta los siguientes criterios de interpretación:

**Inactivo:** CI<sub>50</sub> > 10mg/ml

**Poco activo:** 5 < CI<sub>50</sub> < ó = 10mg/ml

**Activo:** 1 < CI<sub>50</sub> < ó = 5mg/ml

**Muy activo:** CI<sub>50</sub> < ó = 1mg/ml 9

**RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Las hojas secas de la especie vegetal *Piper aduncum*, fueron sometidas a una extracción por maceración con etanol al 70 % y así se pudo obtener el extracto crudo que se re-suspendió con Diclorometano-agua (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> -H<sub>2</sub>O); para así obtener un extracto crudo orgánico del que se determinó el peso y el porcentaje de rendimiento (%R) como se detalla en la Tabla N°3.

Tal extracto fue sometido a una purificación preliminar, utilizando cromatografía líquida al vacío (VLC), obteniéndose de este proceso 6 fracciones a las cuales, incluyendo el extracto orgánico, se les evaluó su actividad antipalúdica in vitro mediante el Ensayo de Inhibición

de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT). Tanto el extracto orgánico como las fracciones purificadas se evaluaron por triplicado a concentraciones de 10; 5 y 2.5 mg/ml ; aquéllas que resultaron ser activas fueron evaluadas una vez más a concentraciones de 10; 5; 2.5 y 1.25 mg/ml; presentando un valor CI<sub>50</sub> menor a 1.25 mg/ml , para de esta manera, poder confirmar su actividad, como se observa en la Tabla N° 4, gráfico N°1. De la misma forma, fue tratada la droga de referencia (difosfato de cloroquina), preparada en 4 concentraciones a partir de 10 mg/ml para el posterior cálculo de su CI<sub>50</sub>.

Los resultados de actividad de los extractos, se reportaron de acuerdo al porcentaje de inhibición y al valor de la CI<sub>50</sub> (concentración que inhibe el 50% de la

TABLA N° 4.

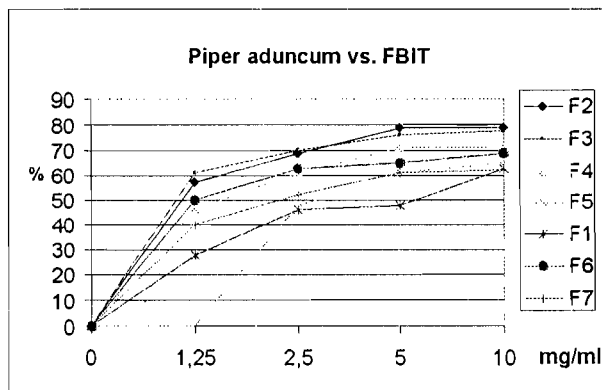
RESULTADOS EN ORDEN DECRECIENTE DE ACTIVIDAD ANTIPALÚDICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ORGÁNICO Y DE LAS FRACCIONES DE LA ESPECIE VEGETAL *Piper aduncum*

CÓDIGO	SOLVENTE	% DE INHIBICION (1,26 mg/ml)	% DE INHIBICION (2,6 mg/ml)	% DE INHIBICION (6 mg/ml)	% DE INHIBICION (10 mg/ml)	IC50 (10 y 6 mg/ml)
F3	EP: ED (1:1)	61	70	76	78	1,03
F2	EP: ED (7:3)	57	69	79	79	1,12
F6	ED:MeOH (8:2)	50	63	65	69	1,25
F4	EP: ED (1:1)	46	61	71	71	1,61
F7 Ext. Org.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	40	52	61	62	2,24
F6	ED	0	48	61	65	2,83
F1	EP	28	46	48	63	5,60

IC50(Cloroquina) =0.06 mg/ml = 450 nm

GRÁFICO N°1

SEGUIMIENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DEL EXTRACTO ORGÁNICO Y SUS FRACCIONES PURIFICADAS DE LA ESPECIE VEGETAL *Piper aduncum* MEDIANTE EL TEST FBIT A DISTINTAS CONCENTRACIONES



biomineralización de la hemina) calculada acorde con las fórmulas (i) y (ii).

Los valores de los porcentajes de inhibición e  $CI_{50}$  obtenidos se muestran en la tabla No 4.

### 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 con la participación de Colombia, Guatemala y Bolivia. Al Proyecto X-5: "Busqueda, Obtención y

Evaluación de Nuevos Agentes Antiparasitarios". Al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) Subprograma X. Química Fina Farmacéutica, Proyecto X-5. A la fundación Alexander von Humboldt de Alemania por la dotación de equipos al I.I.F.B. A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por los fondos destinados al I.I.F.B. del Tesoro General de la Nación. A los comunarios de Santa Rosa de Maravillas (CIPTA) por el apoyo en la colecta de especies vegetales y al Herbario Nacional de La Paz (HNLP) por su ayuda y contactos con R. Callejas (Colombia) para la clasificación taxonómica de la planta.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Girault Louis. Kallawayas Curanderos itinerantes de los Andes. Editor: UNICEF OPS- OMS. ORSTOM-PARIS. La Paz - Bolivia, 1987.
2. O.M.S. Las condiciones de salud en las Américas. Vol. 2. Quinta ed. 1984.
3. Directorio de la Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO). Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo Subprograma X, química fina farmacéutica. Guatemala, 2000.
4. E. Deharo, Ph. Gautret, V. Muñoz, M. Sauvain. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. Primera edición. Impreso en: Imprenta Perez La Paz - Bolivia, junio 2000.
5. Hugo M. De la Quintana Gonzales. Medicina tradicional de los pueblos guaraníes (chaco boliviano). U.M.S.A. La Paz - Bolivia, 2001.
6. Esther Ninoska Flores Quisbert. Metabolitos bioactivos aislados de cinco especies piper con actividad antifúngica y/o leishmanicida. Tesis de Post grado para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas y Biomédicas en la mención de Fitofarmacia. U.M.S.A. La Paz - Bolivia. 2000.
7. José Antonio Melgarejo Pizarroso. Estudios antipalúdicos de especies vegetales latinoamericanas: estudio químico bio-dirigido de piper aduncum. Tesina para optar el título de licenciatura en Bioquímica. U.M.S.A. La Paz - Bolivia. 2001.
8. Basilico N, et.al, Pagani, E, Monti, D, Oliaro, P. and Taramelli D,. A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998; 42: 55-60.
9. Baelmans R, et.al, Deharo E, Muñoz V, Sauvain M, and Ginsburg H,. Experimental Conditions for Testing the inhibitory Activity of Chloroquine on the Formation of -Hematin. Experimental Parasitology. 2000; 96: 243-248.