

Rev Cubana Med Trop 2005;57(3):

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

Actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum* de extractos de algas del género *Laurencia*

[Lic. Judith Mendiola Martínez,¹](#) [Lic. Hilda Hernández,²](#) [Téc. Deyanira Acuña,³](#) [Téc. Macario Esquivel,⁴](#)
[Ing. Ramón Scull Lizama⁵](#) y [Lic. Juan Abreu Payrol⁶](#)

Resumen

Se prepararon extractos etanólicos mediante maceración de ejemplares de *Laurencia obtusa* y *Laurencia corallopsis* y se evaluó su acción inhibidora *in vitro* sobre la cepa de *Plasmodium falciparum* susceptible a cloroquina F32/Tanzania, para determinar la presencia de actividad antimalárica en algas del género *Laurencia* en Cuba. En este género han sido identificados varios terpenoides con actividad antimalárica, los cuales proceden de plantas colectadas principalmente en las Filipinas y Brasil, sin embargo, este género es uno de los más complejos desde el punto de vista químico a escala mundial. La concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *P. falciparum* de los extractos de *Laurencia* estuvo en el rango entre 44 y 162 µg/mL y en todos los casos se observó una relación dosis-respuesta apropiada, determinándose valores de las CI50 de los extractos de las 2 especies entre 14,82 y 51,3 µg/mL, los cuales muestran resultados comparables a numerosos estudios realizados con extractos de plantas terrestres con acción antipalúdica. La cloroquina presentó una CMI de 100 ng/mL *in vitro*, resultados no superados por las preparaciones crudas. En las muestras de *L. obtusa* se acentuó la respuesta a los ensayos para los terpenoides y/o esteroides y a los análisis de compuestos lactónicos y/o coumarinas, pero también se pudo detectar la presencia de alcaloides, azúcares reductores, saponinas y flavonoides. Teniendo en cuenta que varias moléculas pudieran contribuir a la actividad antiplasmodial del extracto total, se realizarán estudios para lograr la identificación de las sustancias activas.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, *Laurencia*, terpenoides, antimaláricos.

Investigaciones recientes han demostrado que los organismos marinos pueden producir sustancias con actividad contra los parásitos maláricos. Algunos compuestos aislados de esta fuente presentan una actividad antimalárica *in vivo* comparable a la de la cloroquina y superior a la de la artemisina a la misma dosis.¹ La diversidad y naturaleza peculiar de las estructuras químicas con actividad farmacológica que se han identificado en los organismos marinos justifican la búsqueda de nuevos compuestos antimaláricos en esta fuente natural, además de en las plantas terrestres.

El género *Laurencia* (Rhodomeliaceae, Rhodophyta) es uno de los más complejos desde el punto de vista químico, presentando terpenoides y acetogeninas de una variedad sorprendente. Estos productos naturales pueden desempeñar funciones múltiples de gran importancia ecológica entre las cuales se encuentran la defensa contra patógenos y otras actividades biológicas.² Varios compuestos han sido identificados como responsables de la actividad antimalárica en el género *Laurencia*: 4 sesquiterpenos, con radicales bromo- y un epóxido, han sido aislados del extracto cloroformo-metanólico de *Laurencia obtusa*, junto a los compuestos alpha-snyderol, alpha-snyderol acetato y stigmasterol;³ 7 sesquiterpenos fueron aislados de *Laurencia majuscula*, de los cuales el majapolene A fue encontrado también como un componente importante de *Laurencia caraibica*⁴ y en *Laurencia papillosa*, los 2 compuestos aromáticos p-hydroxibenzaldehído y p-methoxibenzyl alcohol también fueron identificados como antimaláricos.⁵ Estos aislamientos proceden de algas colectadas principalmente en las Filipinas y Brasil, sin embargo, *L. obtusa* es una especie que ha demostrado ser fuente de una variedad muy amplia de estructuras químicas en sus metabolitos secundarios según estudios realizados a partir de colecciones procedentes de Grecia, Turquía, Irlanda o Dominica.⁶⁻⁸ El objetivo de esta investigación fue evaluar, de forma preliminar, la presencia de actividad antimalárica en ejemplares de *L. obtusa* y *Laurencia corallopsis* e iniciar los estudios comparativos en cuanto a la cualidad de las sustancias que se aíslan con esta actividad antiparasitaria dentro de este género en Cuba.

Métodos

Se colectaron varios ejemplares de *L. obtusa* (LO) y *L. corallopsis* (LC) en la costa norte de Ciudad de La Habana en el mes de mayo de 2004. Los ejemplares de cada especie fueron agrupados e identificados y una parte de la muestra fue conservada en formalina para la confirmación de laboratorio. La mayor parte de la muestra fue conservada a - 20 °C hasta su uso. *L. obtusa* se presentó en 2 coloraciones diferentes: una crema de punteados rojizos (LOC) y otra verde brillante (LOV). Se prepararon extractos en etanol 80 % para las 3 muestras según el método para la obtención de tinturas por maceración descrito en la norma ramal MINSAP (NRSP311) para medicamentos de origen vegetal.⁹ Una parte de estos extractos fue llevada a sequedad por medio de la evaporación al vacío y el residuo sólido fue pesado y disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a concentraciones de 35 mg/mL para los ensayos de actividad biológica *in vitro*. La otra parte del extracto fue sometida a análisis cualitativo para la detección de los principales grupos de metabolitos secundarios de plantas, según la metodología descrita antes.¹⁰

Para investigar la actividad antimalárica de estos extractos fue empleada la cepa de *Plasmodium falciparum* F32/Tanzania susceptible a cloroquina, donada gentilmente por el Instituto de Investigaciones Farmacobioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. El cultivo *in vitro* de las formas asexuales de *P. falciparum* fue realizado de forma continua en eritrocitos humanos O⁺, siguiendo la metodología de Trager y Jensen.¹¹ La susceptibilidad de *P. falciparum* a los extractos LOC, LOV y LC se determinó en placas de 96 pocillos (TPP, Europa/Suiza), donde diferentes concentraciones del extracto entre 350 y 3 µg/mL (diluciones dobles) fueron añadidas a cultivos asincrónicos en los cuales la parasitemia inicial fue de 1 % y el hematócrito resultante de 2 %. La

incubación se realizó a 37 °C durante 72 h. La estimación de la inhibición del crecimiento de *P. falciparum* se realizó mediante el método directo de conteo microscópico de acuerdo con la metodología recomendada por *Schlichtherle* y otros,¹² en láminas de preparaciones de células de cada pocillo las cuales fueron fijadas en metanol y teñidas con Giemsa. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por inspección de los datos y se definió como la concentración más baja del extracto crudo que produce más de 90 % de inhibición del crecimiento del parásito.¹³ Los valores de concentración inhibitoria media (IC50) fueron calculados mediante análisis probit. Todas las concentraciones de los extractos fueron probadas en triplicado, en 4 experimentos independientes. Se utilizaron controles en los cuales se añadió DMSO 0,5 %, concentración a la cual no se mostró afectación significativa del crecimiento de los parásitos en cultivo. La sal difosfato de cloroquina (Sigma) fue utilizada como droga de referencia.

Resultados

La CMI contra *P. falciparum* determinada para los extractos de *Laurencia* estuvo en el rango entre 44 y 162 µg/mL (tabla), demostrándose una relación dosis-respuesta apropiada en ambas especies que permitió determinar los valores de las CI50 de los 3 extractos. Los resultados obtenidos son comparables a numerosos estudios realizados con extractos de plantas con acción antipalúdica, según criterios etnobotánicos, en los cuales se han seleccionado como especies con actividad significativa aquellas cuyos extractos presentan una CI50 inferior a 50 µg/mL.¹⁴⁻¹⁷ La posterior purificación de estos extractos de plantas medicinales, guiada por bioensayos, ha conducido al conocimiento de una gran variedad de sustancias activas.¹⁸

Tabla. Concentraciones inhibitorias mínimas y medias de los extractos alcohólicos de *Laurencia* spp frente a *Plasmodium falciparum* in vitro

Especie de <i>Laurencia</i>	Extractos etanólicos	CMI (µg/mL)	CI50 (µg/mL) ± ES ^a
<i>L. obtusa</i>	LOC	148	51,3 ± 1,26
	LOV	162	20,66 ± 2,75
<i>L. corallopsis</i>	LC	44	14,82 ± 0,36

a: estimación de CI50, ES: error estándar para valores promedio de 4 determinaciones independientes por triplicado.

El valor obtenido para la CI50 en nuestras plantas de origen marino es inferior a los reportados para extractos isopropanólicos de 2 esponjas, 2 gorgonias, 1 tunicado y 3 echinodermos que mostraron un fuerte efecto citostático a concentraciones de 50 µg/mL.¹⁹ La cloroquina presentó una CMI de 100 ng/mL, resultados no superados por los extractos crudos. En ambas muestras de *L. obtusa* se acentuó la

respuesta positiva a los ensayos para los terpenoides y/o esteroides y a los análisis de compuestos lactónicos y/o coumarinas, pudiéndose detectar además la presencia de alcaloides, azúcares reductores y saponinas.

Discusión

Aunque no se puede excluir que varias moléculas contribuyan a la actividad antiplasmodial del extracto total, sin dudas la detección cualitativa de terpenoides es un argumento fundamental para la actividad antimalárica observada según reportes previos.^{3,4} Sin embargo, futuros bioensayos no debieran excluir el análisis de las fracciones purificadas correspondientes a los alcaloides (LOC, LOV, LC), los compuestos lactónicos (LOC, LOV, LC) y los flavonoides (LOV) detectados; pues *L. corallopsis* resultó la especie de CI50 más baja, aun presentando pocas evidencias de la presencia de terpenoides y/o esteroides. Algunas plantas que presentan coumarinas han sido utilizadas en la medicina tradicional sudamericana como sustitutas de la quinina; debido a su fuerte actividad antiplasmodial.¹⁸ Los flavonoides son objeto de creciente interés.¹⁸ Su actividad antioxidante resulta de sus propiedades quelatantes del hierro y secuestradoras de radicales libres, así como de la inhibición de oxidasas.²⁰ Si bien el estrés oxidativo ha sido planteado como una estrategia para lograr un efecto antimalárico; también lo ha sido el secuestro del hierro.²¹ Por otra parte, las modificaciones sobre otras enzimas pueden ser también la causa de sus múltiples actividades biológicas.²⁰ Se realizan estudios para lograr el aislamiento y la purificación de fracciones con actividad antimalárica en los extractos orgánicos de estas especies de *Laurencia* colectadas en la costa Noroccidental de Cuba, lo que debe resultar en la identificación de sustancias que brinden un aporte novedoso dentro de las estructuras químicas bioactivas con potencialidades para su uso en la terapia antimalárica.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el Programa Especial de la Organización Mundial de la Salud/Banco Mundial/Naciones Unidas para la investigación y la docencia en enfermedades tropicales (TDR, ID 990948) y forma parte de un proyecto auspiciado por el MINSAP. Agradecemos la colaboración del doctor Arsenio Areces quien realizó la identificación taxonómica de las algas y a los especialistas del Banco de Sangre de Marianao. De igual forma destacar la valiosa información ofrecida en los inicios de esta investigación por los doctores Renato Crespo Pereira y Valeria Teixeira y la cooperación brindada por el doctor Alan Brockman para el procesamiento estadístico de los datos.

Inhibiting activity of the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* of extracts from algae of genus *Laurencia*

Summary

Several terpenoids have been identified in the genus *Laurencia* showing antimalarial activity; however it is a genus of great chemical complexity worldwide. The majority of these substances have been

extracted from collections made in Philippines and Brazil. In order to know the presence of antimalarial activity in organisms of this genus from the North West Coast of Cuba, we prepared extracts in ethanol with the whole plant of specimens of *L. obtusa* and *L. corallopsis* and evaluated the inhibition produced by them against growth of *Plasmodium falciparum*, strain F32. The Minimum Inhibitory Concentrations against *P. falciparum* determined for *Laurencia* extracts were in the range of 44 and 162 µg/ml, and values of median inhibitory concentrations were between 14.82 and 51.3 µg/ml. The results are similar to those obtained for extracts from medicinal plants. The extracts did not improve chloroquine results. *L. obtusa* extracts gave strong reactions to the assays for terpenoids and for lactonic/coumarine compounds, but we also detected the presence of alkaloids, free reducing sugars, saponins and flavonoids. Several molecules could contribute to the observed antiplasmodial activity of the extracts, so research is in progress for the isolation and purification of new active principles.

Key words: *Plasmodium falciparum*, *Laurencia*, terpenoids, antimalarial agents

Referencias bibliográficas

1. Ang KKH, Holmes MJ, Higa T, Hamann MT, Kara UAK. *In vivo* antimalarial activity of the beta-carboline alkaloid Manzamine A. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1645-9.
2. Pereira RC, da Gama BAP, Teixeira VL, Yoneshigue-Valentin Y. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Braz J Biol* 2003;63:665-72.
3. Topcu G, Aydogmus Z, Imre S, Goren AC, Pezzuto JM, Clement JA, et al. Brominated Sesquiterpenes from the Red Alga *Laurencia obtusa*. *J Nat Prod* 2003;66(11):1505-8.
4. Erickson KL, Beutler JA, Gray GN, Cardellina JH, Boyd MR. Majapolene A, a cytotoxic peroxide, and related sesquiterpenes from the red alga *Laurencia majuscula*. *J Nat Prod* 1995;58(12):1848-60.
5. Wright AD, Konig GM, Angerhofer CK, Greenidge P, Linden A, Desqueyroux-Faundez R. Antimalarial activity: the search for marine-derived natural products with selective antimalarial activity. *J Nat Prod* 1996;59(7):710-6.
6. Faulkner DJ. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 1999;16:155-98.
7. -----. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2001;18:1-49.
8. -----. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2002;19:1-48.
9. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Medicamentos de origen vegetal. Extractos y tinturas. Proceso tecnológico. Cuba: MINSAP; 1991 (Norma Ramal de Salud Pública (NRSP); 311).
10. -----. Guía metodológica para la investigación fitoquímica en plantas medicinales. Ciudad de La Habana: MINSAP; 1995.
11. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673-5.
12. Schlichtherle M, Wahlgren M, Perlmann H, Scherf A. *Methods in malaria research*. 3ra ed. Virginia: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center; 2000: p.8-10.
13. Kotecka BM, Rieckmann KH. Chloroquine bioassay using malaria microcultures. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49:460-4.
14. Brandao MGL, Krettli AV, Soares LSR, Nery CGC, Marinuzzi HC. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *J Ethnopharmacol* 1997;57:131-8.

15. Franssen FFJ, Smeijsters LJJW, Berger I, Medinilla Aldana BE. *In vivo* and *in vitro* antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(7):1500-3.
16. Toft Simonsen H, Braendegaard Nordskjold J, Wagner Smith V, Nyman V, Palpu P, Joshi P, et al. *In vitro* screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* 2001;74:195-204.
17. Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Muñoz V, Ruiz G, Sauvain M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J Ethnopharmacol* 2001;77:91-8.
18. Fournet A, Muñoz V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem* 2002;2:1215-37.
19. Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol* 2002;2(1):17.
20. Pérez G, Martínez G. Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm Bonaerense* 2001;20(4):297-306.
21. Vial H. Recent developments and rationale towards new strategies for malarial chemotherapy. *Parasite* 1996;3:3-23.

Recibido: 18 de abril de 2005. Aprobado: 17 de junio de 2005.

Lic. *Judith Mendiola Martínez*. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, AP 601, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: mendiola@ipk.sld.cu

¹[Máster en Ciencias en Bioquímica Básica. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” \(IPK\).](#)-

²[Máster en Ciencias en Bioquímica Básica. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. IPK.](#)-

³[Técnico en Veterinaria. IPK.](#)-

⁴[Técnico en Biología. Instituto de Oceanología. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente \(CITMA\).](#)-

⁵[Máster en Ecología. Licenciado en Agronomía. Investigador Agregado. Instituto de Farmacia y Alimentos \(IFAL\).](#)-

⁶[Licenciado en Química. Profesor Auxiliar. IFAL.](#)