

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS

Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* L.

Aymé Fernández-Calienes Valdés,¹ Judith Mendiola Martínez,¹ Deyanira Acuña Rodríguez,² Ramón Scull Lizama,³ Yamilet Gutiérrez Gaitén³

RESUMEN

Introducción: *Bixa orellana* L. es una especie usada en la medicina tradicional de países de diversos continentes. Entre las propiedades medicinales que se le atribuyen se incluye su acción antimalárica. **Objetivo:** evaluar la actividad antimalárica *in vitro* e *in vivo* de un extracto de *B. orellana* cultivada en Cuba. **Métodos:** la actividad antimalárica del extracto hidroalcohólico de semillas de Bija se evaluó *in vitro* frente a la cepa Ghana de *Plasmodium falciparum* e *in vivo* utilizando un modelo de malaria de roedores, ratones Balb/c infectados con la cepa ANKA de *Plasmodium berghei*. La citotoxicidad se determinó frente a fibroblastos humanos de la línea MRC-5. Además, se caracterizó preliminarmente la composición fitoquímica del extracto estudiado. **Resultados:** el extracto exhibió un valor de concentración inhibitoria media de 11,6 µg/mL, concentración citotóxica media de 60,2 µg/mL e índice de selectividad de 5,1. La administración subcutánea del extracto a la dosis de 500 mg/kg causó una reducción de 50,3 ± 5,8 % de la parasitemia en los animales infectados en comparación con la observada en los controles. El tamizaje fitoquímico fue consistente con la detección de triterpenoides y(o) esteroides, alcaloides, compuestos lactónicos, compuestos fenólicos, taninos y flavonoides. **Conclusiones:** el extracto hidroalcohólico de semillas de *B. orellana* cultivada en Cuba mostró actividad antimalárica moderada tanto *in vitro* como *in vivo*. El fraccionamiento guiado por bioensayos permitiría identificar las moléculas responsables de la actividad demostrada por este extracto y reevaluar sus potencialidades.

Palabras clave: *Bixa orellana*, extracto crudo, malaria, actividad antimalárica, citotoxicidad.

Bixa orellana L., nombrada como bija, es una especie muy conocida por la utilidad de sus semillas como colorante en la industria cosmética y en la alimentaria. Esta planta es también muy usada en la medicina tradicional de muchos países. En Cuba se emplea para combatir el asma bronquial y como cicatrizante de heridas y quemaduras.¹ Entre las propiedades medicinales de esta especie se reporta su acción antitumoral,² antibacteriana,^{3,4} antifúngica,^{4,5} leishmanicida,⁵ antipirética^{1,6} y antimalárica.^{6,7}

Varios estudios han demostrado la acción antiplasmodial de extractos preparados a partir de

diferentes partes de *B. orellana*.⁸⁻¹⁰ Estos trabajos y la baja toxicidad mostrada por el extracto hidroalcohólico de semillas de bija cultivada en Cuba,¹¹ motivaron a los autores del presente artículo a investigar la actividad antimalárica de este preparado. Específicamente, evaluar la actividad *in vitro* del extracto de *B. orellana* frente a *Plasmodium falciparum*, su citotoxicidad frente a fibroblastos humanos y su acción *in vivo* utilizando un modelo de malaria de roedores. Además, caracterizar de manera preliminar la composición fitoquímica del extracto estudiado.

¹ Máster en Bioquímica. Investigadora Auxiliar. Asistente. Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

² Técnica. Departamento de Parasitología, IPK. La Habana, Cuba.

³ Máster en Farmacia. Departamento de Farmacia, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

La identificación de la especie, la colecta de las semillas y la preparación del extracto se describieron detalladamente con anterioridad.¹¹ El ensayo de actividad antimalárica se realizó empleando la cepa Ghana de *P. falciparum* susceptible a cloroquina.¹² Los parásitos se cultivaron en eritrocitos humanos A+ a 37 °C en presencia de una atmósfera baja en oxígeno (O₂: 3 %, CO₂: 4 % y N₂: 93 %), en una cámara modular de incubación (ICN Biomedicals, EE. UU.). Se utilizó RPMI-1640 suplementado con 20 % de suero humano como medio de cultivo. Los experimentos se realizaron en placas de cultivo de 96 pozos con fondo plano (Nunc). Se probaron concentraciones de extractos entre 100 y 1,56 µg/mL; se prepararon diluciones dobles en medio de cultivo hasta un volumen final de 100µL. Al extracto prediluido se le adicionaron otros 100µL de medio que contenía eritrocitos parasitados en suspensión (parasitemia 1 %, hematocrito 4 %), con más de 90 % en el estadio de trofozoito joven (formas anulares). Las placas del ensayo se incubaron durante 48 h, al cabo de las cuales la multiplicación de los parásitos se midió mediante conteo microscópico después de realizar la tinción con Giemsa de una muestra de glóbulos de cada pocillo. Más de 2 000 células rojas se examinaron para ver la presencia de parásitos en cada réplica de cada concentración del extracto en un experimento. El crecimiento de los parásitos en presencia de los extractos se expresó como un porcentaje de los controles sin extracto. Cada concentración de extracto se evaluó 3 veces. Se calculó la concentración del extracto que inhibió 50 % del crecimiento parasitario (CI₅₀) con la utilización del método de interpolación lineal. Se utilizó difosfato de cloroquina (SIGMA) como droga de referencia.

Una línea celular humana embrionaria diploide de pulmón (MRC-5) se usó para determinar el efecto citotóxico del extracto. Las células se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM, Sigma), suplementado con L-glutamina (20 mM), 16,5 mM de hidrógeno carbonato de sodio y 5 % de suero fetal bovino a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. La evaluación se realizó en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano. Para el ensayo, se sembraron 15 000 células por pozo suspendidas en un volumen de 100 µL de MEM. Después de la formación de la monocapa confluyente, se adicionaron 2µL de extracto prediluido para un rango final de concentraciones de 200µg/mL

a 1,56 µg/mL. La incubación se realizó durante 72 h bajo las mismas condiciones de cultivo. Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,1 % y células no tratadas se incluyeron como controles. La citotoxicidad se determinó utilizando el ensayo colorimétrico de la sal de tetrazolium MTT.¹³ Se adicionaron 10 µL de la solución madre de MTT (5 mg/mL) a cada pozo después del período de incubación de las células con los extractos. La incubación de las placas continuó durante 4 h más. Finalmente, se adicionaron 100 µL de una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS 10 % en 0,01 M HCl) a cada pozo. La cantidad de formazan formado se midió mediante la determinación de la absorbancia a 560 nm y a 630 nm (longitud de onda de referencia) utilizando un lector de ELISA (MRX Revelation, Dynex Technology). El daño causado por cada concentración de los extractos se expresó como un porcentaje de la absorbancia de los controles. La concentración de extracto que causó 50 % de la toxicidad celular o concentración citotóxica media (CC₅₀) se calculó por interpolación lineal. El índice de selectividad (IS) se determinó como el cociente de los valores de la CC₅₀ y de la CI₅₀.

Para la evaluación de la actividad antimalárica *in vivo* se utilizaron ratones Balb/c hembras de 20 ± 2 g. Los animales se infectaron por la vía intraperitoneal mediante la inoculación de 0,2 mL de una suspensión de eritrocitos parasitados (1 × 10⁸) con *P. berghei*, cepa ANKA. Los ratones infectados se distribuyeron en 4 grupos de 5 animales. Un grupo de animales se mantuvo sin tratar como control de la infección. En el resto de los grupos los animales se trataron por la vía subcutánea con 0,2 mL de: extracto disuelto en DMSO (10 %) a una dosis de 500 mg/kg, o difosfato de cloroquina disuelta en NaCl (0,9 %) a una dosis de 10 mg/kg o DMSO (10 %) diluido en NaCl (0,9 %) como control del vehículo. El tratamiento se realizó por la vía subcutánea una vez al día durante 4 d seguidos, incluido el día de la infección.¹⁴ Al quinto día se hicieron extensiones de sangre en láminas portaobjetos de todos los animales. Las extensiones de sangre secas se fijaron con metanol y se colorearon con Giemsa. La parasitemia se determinó mediante el conteo microscópico de, al menos, 2 000 células rojas. La inhibición del crecimiento parasitario se determinó por comparación del grupo tratado con el vehículo, tomado como 100 % del crecimiento parasitario.

La composición del extracto de *B. orellana* se caracterizó utilizando reacciones químicas para detectar los principales metabolitos secundarios:¹⁵ reacción de Dragendorff para detectar alcaloides, Fehling para sustancias reductoras, Baljet para detectar compuestos lactónicos, prueba para resinas, prueba de espuma para detectar saponinas, reacción de Lieberman-Burchard para triterpenoides y(o) esteroides, FeCl_3 (cloruro férrico) para fenoles y taninos, ninhidrina para detectar aminoácidos, Börntrager para quinonas, Kedde para glicósidos cardiotónicos, prueba de antocianidinas, y Shinoda para detectar flavonoides.

La droga de referencia mostró una CI_{50} frente a *P. falciparum* de 20 nM, lo cual se corresponde con lo obtenido en evaluaciones anteriores.^{12,16} El extracto hidroalcohólico de *B. orellana* exhibió un valor de CI_{50} de 11,6 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. falciparum*, CC_{50} de 60,2 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 5,1. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores, la CI_{50} de extractos de bija frente a *P. falciparum* muestra valores superiores a 9 $\mu\text{g/mL}$,^{7-10,17} y los valores de IS oscilan entre 2,5¹⁰ y 5,3.⁹ Varias revisiones recientes sobre la actividad antimalárica de extractos crudos de plantas coinciden en establecer un valor de CI_{50} por debajo de 10 $\mu\text{g/mL}$ como criterio de buena actividad *in vitro*.^{18,19} Definir un valor de IS como criterio de eficacia de un extracto crudo es más difícil, porque el componente activo es desconocido. Además, otras moléculas presentes en el crudo pudieran contribuir a la citotoxicidad. No obstante, varios autores proponen $\text{IS} > 10$ para considerar un extracto como fuente de posibles antimaláricos. Teniendo en cuenta estos criterios, la actividad antiplasmodial *in vitro* de nuestro extracto puede ser considerada como moderada y de baja selectividad, aunque estos valores pueden modificarse a partir de un fraccionamiento del crudo.

La administración subcutánea de cloroquina inhibió completamente el crecimiento parasitario. El extracto, administrado por la misma vía, causó una reducción de la parasitemia de $50,3 \pm 5,8 \%$ en los animales infectados a la dosis de 500 mg/kg. Krettli y otros²⁰ consideran un extracto activo cuando administrado por vía subcutánea es capaz de reducir al menos 30 % de la parasitemia de los ratones a la dosis de 1 g/kg. Deharo y otros¹⁷ clasificaron como moderada la actividad antimalárica *in vivo* mostrada por los extractos de plantas que inhibían 50 % de la parasitemia al ser

administrados intraperitonealmente a la dosis de 500 mg/kg. La actividad exhibida por nuestro extracto puede clasificarse, siguiendo este último criterio, como moderada; aunque la vía de administración utilizada por esos autores es mucho más directa que la empleada en el presente estudio. Estos resultados confirman la actividad observada *in vitro* e indican la ausencia de problemas de biodisponibilidad en los componentes activos del extracto.

El tamizaje fitoquímico fue consistente con la detección de triterpenoides y(o) esteroides, alcaloides, compuestos lactónicos, taninos y flavonoides. Un extracto metanólico de las semillas de *B. orellana* cultivada en Brasil mostró una composición similar.⁵ Varios compuestos pertenecientes a las clases químicas detectadas constituyen los principios activos de otras especies de plantas usadas para combatir la malaria.²¹

Las semillas de esta planta son ricas en carotenoides, la presencia de estos metabolitos se hizo evidente al observar el intenso color anaranjado del extracto. Los pigmentos más abundantes son los apocarotenos bixina, norbixina e isobixina, para los cuales se describen varias propiedades farmacológicas² pero no se les ha demostrado acción antimalárica. También están presentes otros carotenoides: orellina, β -caroteno (pro-vitamina A), luteína, criptoxantina y zeaxantina.²²

En la literatura disponible se encuentran reportes del efecto antimalárico de algunos carotenoides. Se ha demostrado el efecto inhibitor del retinol (alcohol de la vitamina A) sobre cultivos de estadios intraeritrocitarios de *P. falciparum*^{23,24} y su acción potenciadora de la eficacia de drogas antimaláricas,²⁵ aunque el mecanismo por el cual el suplemento de vitamina A potencia la resistencia a la malaria consiste esencialmente en el incremento de la fagocitosis de eritrocitos parasitados y la reducción de la respuesta de citoquinas proinflamatorias.²⁶ Otro pigmento perteneciente a esta clase química con buena actividad antimalárica es la fucoxantina, purificada a partir de extractos del alga *Sargassum heterophyllum*,²⁷ este carotenoide mostró valores de CI_{50} frente a *P. falciparum* de 1,5 μM .

En conclusión, el extracto hidroalcohólico de semillas de *B. orellana* cultivada en Cuba mostró actividad antimalárica moderada tanto *in vitro* como *in vivo*. El fraccionamiento guiado por bioensayos permitirá aislar e identificar las molé-

culas responsables de la actividad demostrada por este extracto y reevaluar sus potencialidades.

Antimalarial activity of hydroalcoholic extract from *Bixa orellana* L.

ABSTRACT

Introduction: *Bixa orellana* L. is one species used in traditional herb medicine in several continents. Among the medicinal properties attributed to this plant, the antimalarial action has been included. **Objective:** to evaluate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of extract from *B. orellana* grown in Cuba. **Methods:** the antimalarial activity of the hydroalcoholic extract from Bija seeds was evaluated *in vitro* against *Plasmodium falciparum* Ghana strain and *in vivo* using a model of murine malaria, that is, Balb/c mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA strain. Cytotoxicity was determined against MRC-5 human fibroblasts. Additionally, phytochemical composition of the studied extract was preliminarily informed. **Results:** the extract exhibited IC₅₀ (medium inhibitory concentration) of 11.6 µg/mL, CC₅₀ (medium cytotoxic concentration) of 60.2 µg/mL and SI (selectivity index) of 5.1. Subcutaneous administration of the extract at a 500 mg/kg dose caused parasitemia reduction of 50.3 ± 5.8 % on infected animals compared with that of the controls. Phytochemical screening was consistent with detection of triterpenoids and/or steroids, alkaloids, lactic compounds, phenols, tanins and flavonoids. **Conclusions:** the hydroalcoholic extract from *B. orellana* seeds grown in Cuba showed *in vitro* and *in vivo* moderate antimalarial activity. Bioassay-guided fractioning will allow identifying the molecules responsible for the exhibited extract activity and re-evaluating the potentialities of this extract.

Key words: *Bixa orellana*, crude extract, malaria, antimalarial activity, cytotoxicity.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1974.
- Tibodeau J, Isham C, Bible K. Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13:987-97.
- Fleischer TC, Ameade EP, Mensah ML, Sawyer IK. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*. 2003;74:136-8.
- Cáceres A, Menéndez H, Méndez E, Cohobón E, Samayoa BE, Jauregui E, et al. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *J Ethnopharmacol*. 1995;48:85-8.
- Braga FG, Bouzada ML, Fabri RL, de O Matos M, Moreira FO, Scio E, et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007;111:396-402.
- Milliken W. Plants for Malaria plants for fever. Medicinal species in Latin America- a bibliographic survey. Kew: The Trustees, Royal Botanical Gardens; 1997.
- Bertani S, Bourdy G, Landau I, Robinson JC, Esterre Ph, Deharo E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *J Ethnopharmacol*. 2005;98:45-54.
- Baelmans R, Deharo E, Bourdy G, Muñoz V, Quenevo C, Sauvain M, et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *J Ethnopharmacol*. 2000;73:271-5.
- Hout S, Chea A, Bun S, Elias R, Gasquet M, Timon-David P, et al. Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol*. 2006;107:12-8.
- Nguyen-Pouplin J, Tran H, Tran H, Phan TA, Dolecek C, Farrar J, et al. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Viet Nam. *J Ethnopharmacol*. 2007;109:417-27.
- Fernández-Calienes A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, et al. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop*. 2009;61:254-8.
- Fernández-Calienes A, Mendiola J, Scull R, Gutiérrez Y, Acuña D, Payrol JA. *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of some selected Cuban medicinal plants. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52(4):197-201.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55-63.
- Peters W. Drug resistance in *Plasmodium berghei*, Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp Parasitol*. 1965;17:89-90.
- Lock O. Investigación fitoquímica. Métodos para el estudio de los productos naturales. Lima: Universidad del Perú; 1988.
- Fernández-Calienes A, Mendiola J, Scull R, Vermeersch M, Cos P, Maes L. *In vitro* anti-microbial activity of the Cuban medicinal plants *Simarouba glauca* DC., *Melaleuca leucadendron* L. and *Artemisia absinthium* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(6):615-8.
- 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.
- Krettli AU. Antimalarial drug discovery: screening of Brazilian medicinal plants and purified compounds. *Expert Opin Drug Discov*. 2009;4:95-108.
- Soh PN, Benoit-Vical F. Are West African plants a source of future antimalarial drugs? *J Ethnopharmacol*. 2007;114:130-40.
- Krettli AU, Adebayo JO, Krettli LG. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. *Current Drug Targets*. 2009;10:261-70.
- Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R. Antimalarials from nature. *Bioorg Med Chem*. 2009;17:3229-56.
- Glew RH, Vanderjagt DJ, Lockett C, Grivetti LE, Smith GC, Pastuszyn A, et al. Amino acid, fatty acid, and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina Faso. *J Food Composition Anal*. 1997;10:205-17.
- Hamzah J, Skinner-Adams TS, Davis TM. *In vitro* antimalarial activity of retinoids and the influence of selective retinoic acid receptor antagonists. *Acta Trop*. 2003;87:345-53.
- Hamzah J, Davis TM, Skinner-Adams TS, Beilby J. Characterization of the effect of retinol on *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Exp Parasitol*. 2004;107:136-44.
- Knauer A, Congpuong K, Wernsdorfer G, Reinthaler FF, Sirichaisinthop J, Wernsdorfer WH. Synergism between quinine and retinol in fresh isolates of *Plasmodium falciparum*. *Wien Klin Wochenschr*. 2008;120:69-73.
- Niemoeller OM, Foller M, Lang C, Huber SM, Lang FR. Retinoic acid induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21:193-202.
- Afolayan AF, Bolton JJ, Lategan CA, Smith PJ, Beukes DR. Fucoxanthin, tetraprenylated toluquinone and toluhydroquinone metabolites from *Sargassum heterophyllum* inhibit the *in vitro* growth of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Z Naturforsch C*. 2008;63:848-52.

Recibido: 29 de julio de 2010. Aprobado: 14 de septiembre de 2010. *Aymé Fernández-Calienes Valdés*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía. AP 601. Marianao 13. La Habana. Cuba. Correo electrónico: ayme@ipk.sld.cu