

Actividad antiplasmodial de lactonas de *Parthenium hysterophorus* L. y alcaloides de *Argemone mexicana* L. en Cuba

Anti-plasmodial activity of *Parthenium hysterophorus* L. lactones and *Argemone mexicana* L. alkaloids in Cuba

Aymé Fernández-Calienes Valdés,^I Judith Mendiola Martínez,^I Ramón Scull Lizama,^{II} Luis Morier Díaz,^I Ramón Linares Domínguez,^I Dianeya Mendoza Llanes,^I Armando Cuéllar Cuéllar^{II}

^I Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

^{II} Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: *Argemone mexicana* L. y *Parthenium hysterophorus* L. son plantas con antecedentes de uso contra la malaria en Cuba. Varios estudios avalan la actividad antiplasmodial de estas especies en otros países. Alcaloides y lactonas son los principios activos de estas plantas.

Objetivo: evaluar la actividad antiplasmodial de extractos enriquecidos en alcaloides y en lactonas de *A. mexicana* y de *P. hysterophorus* colectadas en Cuba.

Métodos: se prepararon extractos crudos de la parte aérea de *A. mexicana* y de la raíz de *P. hysterophorus*; un extracto enriquecido en alcaloides de *A. mexicana*; así como enriquecidos en lactonas de raíz y parte aérea de *P. hysterophorus*. La actividad de los extractos se evaluó *in vitro* frente a *P. berghei* y se determinó su citotoxicidad frente a fibroblastos humanos MRC-5. El extracto más selectivo se evaluó *in vivo* en un modelo de malaria de roedores.

Resultados: solamente las fracciones sin alcaloides y sin lactonas no presentaron acción inhibitoria del desarrollo de la esquizogonia de *P. berghei* a 100 mg/mL. El extracto enriquecido en lactonas de la parte aérea de *P. hysterophorus* fue el más citotóxico y menos selectivo (IS < 1). El resto de los extractos activos presentaron índices de selectividad similares (3,0; 3,7 y 3,1). La administración intraperitoneal del extracto crudo de *A. mexicana* causó la reducción significativa de la parasitemia en los ratones tratados con 500 mg/kg, mientras el enriquecido en alcaloides provocó toxicidad a 200 mg/kg y no produjo reducción significativa de la

parasitemia a 100 mg/kg y 150 mg/kg. El tratamiento con el extracto crudo de la raíz de *P. hysterophorus* fue muy tóxico a la dosis de 500 mg/kg, mientras el de lactonas no produjo toxicidad y causó reducción significativa de la parasitemia en los ratones tratados con 1 000 mg/kg.

Conclusiones: los resultados demuestran la potencialidad del extracto enriquecido en lactonas de la raíz de *P. hysterophorus* como base para un futuro fitomedicamento contra la malaria.

Palabras clave: malaria; *Plasmodium berghei*; actividad anti-plasmodial; plantas; *Parthenium hysterophorus*; lactonas.

ABSTRACT

Introduction: Argemone mexicana L. and Parthenium hysterophorus L. are plants with history of antimalarial use in Cuba. Several studies have validated the antiplasmodial activity of these species in other countries. Alkaloids and lactones are the active principles of these plants.

Objective: to evaluate antiplasmodial activity of alkaloid-rich and lactone-rich extracts from *A. mexicana* and *P. hysterophorus* harvested in Cuba.

Methods: Crude extracts from the aerial parts of *A. mexicana* and from the root of *P. Hysterophorus*; alkaloid- rich extract from *A. mexicana* and two lactone-rich extracts from root and aerial part of *P. Hysterophorus* were prepared. The activity of these extracts was evaluated in vitro against *P. berghei* and cytotoxicity against human fibroblast MRC-5 was determined. The most selective extract was evaluated in vivo in a rodent model.

Results: Only those fractions without alkaloids and without lactones exhibited non inhibitory action on *P. berghei* squizogony development at 100 g/mL. The lactone-rich extract of *P. hysterophorus* aerial part was the most cytotoxic but the least selective ($IS < 1$). The rest of active extracts exhibited similar selectivity indexes (3.0; 3.7 y 3.1). Intraperitoneal administration of *A. mexicana* crude extract caused significant reduction of parasitemia in the mice treated with 500 mg/kg, whereas, alkaloid- rich extract caused toxicity at 200 mg/kg and caused a non-significant reduction of parasitemia at 100 mg/kg and 150 mg/kg. The treatment with crude extract of *P. hysterophorus* root was very toxic at a dose of 500 mg/kg, whereas the lactone-rich extract was no toxic and brought a significant reduction of parasitemia in mice treated with 1 000 mg/kg.

Conclusions: The results show the potential of lactone-rich extract from *P. hysterophorus* root as a basis for a future anti-malarial phytomedicine.

Keywords: malaria; *Plasmodium berghei*; anti-plasmodial activity; plants; *Parthenium hysterophorus*; lactones.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad provocada por protozoos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos del género *Anopheles*. Es endémica en 103 países y provoca más de 600 000 muertes cada año, el 91 % ocurre en África y el 86 % corresponde a niños menores de cinco años.¹

El control de la malaria descansa básicamente en las acciones sobre el vector y en el tratamiento. Hallazgos recientes sobre fallos en los tratamientos recomendados por la Organización Mundial de la Salud constituyen una alerta sobre la futura aparición y expansión de la resistencia.¹

El éxito de las plantas como fuentes de antimaláricos se evidenció desde el descubrimiento de la quinina a partir de la corteza de *Cinchona* sp. y, posteriormente, de la artemisinina a partir de *Artemisia annua*. Estos hallazgos continúan estimulando internacionalmente las investigaciones sobre las especies medicinales. Más de 1 200 especies de plantas se utilizan para el tratamiento de la malaria y las fiebres en todo el mundo, por lo que constituyen fuentes potenciales importantes de nuevos tratamientos antimaláricos.²

En Cuba, se informó el último caso autóctono de malaria en el año 1967³ pero se mantiene el riesgo de transmisión ante la presencia de vectores en todo el país y de la entrada constante de personas provenientes de países endémicos de la enfermedad. Consideramos de gran utilidad explorar las alternativas terapéuticas autóctonas para combatir la malaria. Con anterioridad se compiló información sobre plantas utilizadas contra la malaria en Cuba y se demostró la actividad antiplasmodial de extractos crudos de varias especies cultivadas en el país.^{4,5}

Parthenium hysterophorus L., conocida como Escoba amarga, pertenece a Asteraceae y su distribución geográfica es pantropical. Es una de las yerbas más comunes y abundantes de toda la isla de Cuba.⁶ Según correspondencia publicada en *El País*, el 19 de octubre de 1935, los vecinos de la península de Zapata y de la Ciénaga se "inmunizaban" contra el paludismo con el cocimiento de la raíz de esta planta.⁶ Otros informes de la actividad antimalárica de esta especie se recogieron en otras localidades del país⁷⁻⁹ y en otros países.^{10,11} Los extractos vegetales de la parte aérea y de la raíz de *P. hysterophorus* presente en Cuba demostraron buena actividad antiplasmodial en un modelo *in vitro*.^{4,5}

Adicionalmente, Escoba amarga produce una gran variedad de lactonas sesquiterpénicas.¹² Dichos metabolitos pueden jugar una función altamente significativa como agentes farmacéuticos; los derivados de la lactona sesquiterpénica artemisinina son los antimaláricos disponibles más efectivos actualmente.¹³ La partenina, lactona sesquiterpénica producida por *P. hysterophorus*, demostró actividad *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum*,¹⁴ y se conoce de su abundancia en la parte aérea de la planta presente en Cuba.¹⁵

Argemone mexicana es otra de las especies utilizadas como antipalúdicas por la población de Cuba⁸. Pertenece a la familia Papaveraceae y su distribución geográfica es pantropical. Es una yerba silvestre en toda Cuba, presente en terrenos yermos y cultivados, conocida con el nombre vulgar de Cardo Santo.⁶ El uso antimalárico de esta planta se extiende a otros países de América,¹⁵ Asia¹⁶ y África.^{17,18} Su actividad antiplasmodial se atribuye a la presencia de alcaloides;¹⁹ pero se desconoce si ocurre algo similar con la planta presente en Cuba pues la composición química está determinada por el genotipo de la planta, pero influenciada por condiciones agronómicas y ambientales.²⁰

Con el propósito de obtener preparaciones vegetales a partir de especies presentes en Cuba, que pudieran llegar a convertirse en un fitomedicamento contra la malaria, el objetivo fue evaluar la actividad antiplasmodial de extractos enriquecidos en lactonas de la raíz y de la parte aérea de *P. hysterothorus*, y en alcaloides de la parte aérea de *A. mexicana*.

MÉTODOS

COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES

Las especies en estudio son muy comunes y abundantes en Cuba, no están protegidas ni en peligro de extinción. Se colectaron en el municipio La Lisa por el especialista Ramón Scull del Instituto de Farmacia y Alimentos. Cada órgano de las plantas se separó cuidadosamente evitando la contaminación con otras partes o con materiales extraños. Un ejemplar de cada especie se dejó como testigo, *A. mexicana* en el herbario del Jardín Botánico Nacional (HFC 87090) y *P. hysterothorus* en el del Instituto de Ecología y Sistemática (HAC 43044).

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

El material vegetal se secó en una estufa con ventilación a 40 °C y, posteriormente, se pulverizó en partículas de aproximadamente 2 mm. A partir del material pulverizado de la parte aérea de *A. mexicana* se prepararon un extracto crudo y dos extractos fraccionados, mientras, de la raíz y de la parte aérea de *P. hysterothorus* se prepararon un extracto crudo y cuatro extractos fraccionados.

Para la obtención de los extractos crudos se realizó la extracción líquida mediante maceración en etanol 80 % durante 7 días.²¹ Se usó una relación masa de material vegetal/volumen de solvente de 1:10.

La preparación del extracto enriquecido en alcaloides de *A. mexicana* se realizó siguiendo el método descrito por Cuéllar y otros²² en donde el material pulverizado se maceró durante 21 días en metanol; posteriormente, se filtró, se concentró hasta la tercera parte del volumen y se lavó con éter de petróleo. La fase aérea se denominó sin alcaloides. La fracción metanólica se concentró a sequedad, se añadió ácido sulfúrico (1 %) y se filtró. La fracción ácida se basificó y se lavó con cloroformo. Finalmente, la fracción clorofórmica se concentró y se obtuvo la fracción rica en alcaloides. Mediante la reacción del Dragendorff se verificó la presencia (reacción positiva) o ausencia de alcaloides (reacción negativa).

Los extractos enriquecidos en lactonas se obtuvieron según la metodología descrita por Miranda y Cuéllar;²³ El material seco y molido se extrajo macerando 21 días con cloroformo. Se filtró y se concentró al menor volumen. Se añadió metanol 70 % y se filtró una vez más. El residuo del filtrado se disolvió con cloroformo, se concentró para obtener la fracción "sin lactonas". La solución metanólica se lavó con éter de petróleo, y la fase de metanol acuoso se concentró y se obtuvo la fracción rica en compuestos lactónicos. Se verificó la presencia de lactonas mediante la reacción química con el reactivo de Baljet.²⁴

El solvente de los extractos se eliminó mediante evaporación a presión reducida durante 24 h. El residuo sólido se conservó en congelación hasta su posterior liofilización. Se prepararon soluciones a 20 mg/mL de cada extracto liofilizado en dimetilsulfóxido (DMSO) 100 %. Las soluciones se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIPLASMODIAL *IN VITRO*

Los experimentos que involucraron animales se realizaron en las instalaciones del Bioterio del Instituto "Pedro Kourí". Se utilizaron ratones albinos suizos (OF1) y BALB/c entre 18 y 22 g de peso libres de patógenos específicos suministrados por Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los ratones se colocaron en jaulas en grupos de 5 a 7 animales con acceso libre al agua y los alimentos, ciclos de luz-oscuridad de 12 h/12 h, temperatura de 20 °C-24 °C y humedad relativa de 70 %. Se esperaron 3 días para que los animales se adaptaran a su nuevo ambiente antes de comenzar los experimentos.

La cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (gentilmente donada por el Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene de la Universidad de Amberes, Bélgica) se utilizó en todos los experimentos. Se propagó por pases sucesivos de eritrocitos parasitados a ratones sanos. Los procedimientos se hicieron siguiendo las Normas Internacionales para la experimentación biomédica.²⁵

Para el cultivo de las formas eritrocitarias, se seleccionaron animales con parasitemias entre 0,5 y 1 % con predominio de formas anulares (> 70 %). Se preparó una suspensión de glóbulos rojos, con hematocrito de 2 %, en medio RPMI (Sigma, EUA) enriquecido con suero fetal bovino (20 %). En una placa de 96 pocillos se realizaron diluciones dobles seriadas de los extractos y de DMSO (control de solvente) en el medio. La suspensión de glóbulos rojos se mezcló en partes iguales con las diluciones hasta obtener un rango de concentraciones de extracto entre 1,56 y 100 µg/mL. Después de 18-20 h de incubación en "candle jar" a 37 °C, se realizaron gotas gruesas de cada pocillo de la placa. Los parásitos se tiñeron con Giemsa. El porcentaje de esquizontes formados se determinó mediante conteo directo de 200 parásitos utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania). La actividad antiplasmodial se expresó como la concentración inhibitoria media (CI₅₀) y se determinó según la metodología de Huber y Koella²⁶ a partir del cálculo del porcentaje de inhibición de la maduración de esquizontes.²⁷ Se utilizó difosfato de cloroquina (Sigma, EUA) como control positivo.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Para determinar el efecto citotóxico de los extractos fraccionados, se utilizó una línea celular humana (MRC-5). Las células se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM), 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 fondo plano de 96 pozos. 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 2 µL de extracto prediluido para un rango final de concentraciones de 200 µg/mL a 1,56 µg/mL. La incubación se realizó durante 72 h bajo las mismas condiciones de cultivo. Células no tratadas y DMSO al 0,1 % se incluyeron como controles. Posteriormente, se cuantificó la citotoxicidad utilizando el ensayo colorimétrico con la sal bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (SIGMA, St. Louis, MO, USA).²⁸ El daño causado por cada concentración de los extractos se expresó como un porcentaje de la

absorbancia de los controles. Se calculó por interpolación lineal la concentración de extracto que causa el 50 % de la toxicidad celular o concentración citotóxica media (CC₅₀). El índice de selectividad (IS) de los extractos se determinó como el cociente de los valores de la CC₅₀ y de la CI₅₀.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIPLASMODIAL *IN VIVO*

En el modelo *in vivo* de malaria de roedores, se evaluaron solamente los extractos que mostraron un IS > 3. Los animales se infectaron por la vía intraperitoneal mediante la inoculación de 0,2 mL de una suspensión de eritrocitos parasitados (1 x 10⁷). Los ratones infectados se distribuyeron en grupos de cinco a siete animales. Un grupo se mantuvo sin tratar como control de la infección. En el resto de los grupos, los animales se trataron por la vía intraperitoneal con 0,2 mL de: extracto disuelto en DMSO (hasta 10 % en NaCl (0,9 %)) a una dosis máxima de 1 000 mg/kg, difosfato de cloroquina disuelta en NaCl (0,9 %) a una dosis de 10 mg/kg y DMSO (hasta 10 %) diluido en NaCl (0,9 %). El tratamiento se realizó diariamente a partir de las 4 h de infección y durante 4 días.²⁹ Al quinto, se pesaron todos los animales y se les extrajo 5 µL de sangre por incisión de la vena caudal para realizar extensiones finas de sangre. Se aplicó punto final humanitario mediante dislocación cervical cuando la pérdida de peso fue ≥10 % y/o la parasitemia ≥20 % para evitar sufrimiento por anemia severa.

Las extensiones secas de sangre se fijaron con metanol y se colorearon con Giemsa. La parasitemia se determinó mediante el conteo microscópico de 2 000 células rojas. La inhibición del crecimiento parasitario se determinó por comparación con el grupo tratado con el vehículo. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Mann Whitney, empleando el programa GraphPad Prism 5.0 (versión 5,00 para Windows, GraphPad Software Inc., EE UU) y se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Para establecer un criterio de actividad *in vitro*, se siguió lo descrito por Fernández-Callienes y otros⁵ y Al-Musayeib y otros³⁰ para *P. falciparum*: se consideró inactivo el extracto que mostró un valor de CI₅₀ superior a 100 µg/mL; un valor de IS < 3 se consideró bajo. En la evaluación *in vivo* se clasificó como inactivo el extracto de planta que no inhibe la parasitemia de los animales al ser administrado por vía intraperitoneal a la dosis de 1 000 mg/kg.

RESULTADOS

Los dos extractos fraccionados enriquecidos en lactonas, de la raíz y de la parte aérea, de *P. hysterothorus*, el extracto crudo y el extracto enriquecido en alcaloides de *A. mexicana* mostraron inhibición mayor del 50 % del desarrollo de la esquizogonia de *P. berghei* a la concentración de 100 mg/mL. El extracto fraccionado enriquecido en alcaloides fue el más activo. Por su parte, las fracciones sin lactonas y sin alcaloides no exhibieron actividad (tabla 1). Los valores de CI₅₀ mostrados por la cloroquina para cada experimento se mantuvieron en el rango esperado (15-18 ng/mL), muy inferior al de los extractos evaluados.

La citotoxicidad frente a células humanas (fibroblastos de la línea MRC-5) se examinó igualmente para los extractos activos. El extracto enriquecido en lactonas preparado a partir de la parte aérea de *P. hysterophorus* exhibió el menor valor de

concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad (IS < 1); esto indica que sus componentes son muy citotóxicos y que su acción antiplasmodial es inespecífica. El extracto enriquecido en lactonas, preparado a partir de la raíz, mostró mejor índice de selectividad (IS = 3,1). El extracto con mayor especificidad en su acción antiplasmodial fue el de alcaloides (tabla 1). Aunque dicho extracto se mostró cinco veces más citotóxico que el crudo, ambos exhibieron índices de selectividad similares (3,7 y 3,0).

Tabla 1. Actividad antiplasmodial *in vitro* de los extractos y su citotoxicidad frente a una línea celular humana

Especie	Parte u órgano	Extracto	CI ₅₀ <i>P. berghei</i> (µg/mL)	CC ₅₀ MRC-5 (µg/mL)	Índice de selectividad
<i>Argemone mexicana</i> L.	Parte aérea	Crudo	44,4 ± 4,1	135,2 ± 12,2	3,0
		Alcaloides	8,4 ± 3,8	31,2 ± 5,2	3,7
		Sin alcaloides	> 100	-	-
<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	Parte aérea	Lactonas	23,2 ± 7,0	7,2 ± 3,0	< 1
		Sin lactonas	> 100	-	-
	Raíz	Lactonas	55,4 ± 8,5	171,9 ± 6,1	3,1
		Sin lactonas	> 100	-	-

En la tabla 2 se muestran los resultados de la evaluación de los extractos de *A. mexicana* en el modelo *in vivo* de malaria. El extracto crudo redujo significativamente la parasitemia de los animales a la dosis de 500 mg/kg, aunque causó la muerte de un animal. El extracto enriquecido en alcaloides se administró a las dosis de 200 mg/kg, 150 mg/kg y 100 mg/kg. La dosis más alta provocó la muerte de todos los animales tratados después de la primera administración. Las dosis inferiores no causaron mortalidad ni reducción del peso corporal al final del tratamiento pero no redujeron significativamente la parasitemia de los animales tratados.

Tabla 2. Actividad anti-plasmodial *in vivo* de los extractos de *A. mexicana*

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Ratones	Rango de peso inicio/ final (g)	Rango de parasitemia (%)	Mediana de parasitemia
Crudo	500	4	22,1-24,5 / 21,5-24,2	0,9-3,1	2,6**
DMSO	Control	5	22,6-24,4 / 19,8-22,7	4,5-8,0	6,0
Alcaloides	200	5	100 % mortalidad (una dosis)		
Alcaloides	150	5	17,7-20,7 / 16,4-19,4	3,8-6,9	5,5
DMSO	Control	5	17,6-20,5 / 16,7-19,4	3,0-9,2	4,1
Alcaloides	100	4	21,1-24,2 / 20,4-22,1	9,2-12,3	11,0
DMSO	Control	6	21,7-22,9 / 19,8-22,0	9,9-13,6	12,6

***p* < 0,01 (*p* = 0,0079).

El tratamiento intraperitoneal con el extracto crudo de la raíz de *P. hysterothorus* a 500 mg/mL provocó una marcada toxicidad en los animales tratados, mientras la administración del extracto de lactonas a 500, 750 y 1000 mg/kg no produjo mortalidad ni reducción de peso corporal superior a 10 % de los animales durante el esquema de tratamiento. El tratamiento con la dosis superior del extracto enriquecido redujo significativamente la parasitemia en los ratones (tabla 3).

La administración de cloroquina a los animales infectados con *P. berghei* provocó la inhibición completa del desarrollo del parásito (tabla 3).

Tabla 3. Actividad antiplasmodial *in vivo* de los extractos de la raíz de *P. hysterothorus*

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Ratones	Rango de peso inicio/ final (g)	Rango de parasitemia (%)	Mediana de parasitemia
Crudo	500	5	60 % mortalidad (una dosis)		
DMSO	Control	5	17,7-18,4 / 17,6-18,9	1,57-4,86	2,84
Lactonas	500	7	20,1-24,4 / 22,2-25,8	10,1-16,8	12,2
DMSO	Control	7	21,4-24,8 / 24,1-27,3	10,6-17,9	12,2
Lactonas	750	6	26,5-28,9 / 24,6-27,5	5,6-14,1	9,6
DMSO	Control	6	24,5-28,8 / 24,9-29,1	6,2-11,9	8,0
Lactonas	1000	5	23,8-25,6 / 23,5-25,8	1,9-8,4	4,6 *
DMSO	Control	5	22,4-27,0 / 22,3-27,9	8,3-14,8	11,3
Referencia					
Cloroquina	10 mg/kg	5	22,6-24,4 / 23,7-25,4	0	0

*Diferencias significativas con respecto al control. $p < 0,05$ (0,0159).

DISCUSIÓN

La actividad anti-*Plasmodium* de la parte aérea de *A. mexicana* se evidenció anteriormente en estudios con modelos animales a partir de la evaluación de extractos crudos³¹ y en ensayos clínicos al evaluar la decocción de hojas y tallos utilizada por la población en Mali.¹⁸ La actividad antiplasmodial del extracto crudo de la parte aérea de *A. mexicana* presente en Cuba refuerza la utilidad de esta especie como antimalárica. En Mali, la decocción de *A. mexicana* para uso antimalárico contiene alcaloides de protoberberina (berberina, protopina y alocriptopina) con potente actividad antiplasmodial, por lo que se consideran sus principios activos.¹⁹ El extracto enriquecido en alcaloides de esta especie en Cuba exhibió una actividad antiplasmodial *in vitro* más potente que el crudo, a la vez que la fracción sin alcaloides resultó inactiva. De esta forma se confirma la alta implicación de los alcaloides en la actividad antimalárica de *A. mexicana*.

De igual forma se demostró con anterioridad que tanto el extracto etanólico de la parte aérea⁴ como el de la raíz⁵ de *P. hysterothorus* colectada en Cuba, poseen actividad frente a estadios intraeritocitarios de *P. falciparum*. El hallazgo de que solo los extractos enriquecidos en lactonas fueron activos frente a *P. berghei*, sugiere que estos metabolitos son los principios antimaláricos de la Escoba amarga presente en Cuba. Houper y otros¹⁴ demostraron la potente actividad de la lactona sesquiterpénica partenina frente a esta especie de *Plasmodium*. La presencia de esta lactona se evidenció en extractos preparados a partir de la planta completa y se encontró en cantidades significativas en la parte aérea de la Escoba amarga

presente en Cuba.²³ Sin embargo, no hallamos estudios fitoquímicos sobre su abundancia en la raíz. Otras lactonas sesquiterpénicas como ambrosanolidos e himenina se encuentran en *P. hysterothorus*,¹² pero se desconoce si contribuyen a la actividad antimalárica de la planta. Estos resultados pueden sugerir la presencia de lactonas menos citotóxicas o de menos cantidad de las lactonas citotóxicas en la raíz de esta planta en Cuba.

Por otra parte, es notable el incremento tanto de la acción antiplasmodial como de la citotoxicidad a partir de extraer los alcaloides de *A. mexicana*. La similitud entre los valores de selectividad, obtenidos a partir de la relación entre la citotoxicidad y la actividad antiplasmodial del extracto crudo y del enriquecido en alcaloides, soporta fuertemente la hipótesis de que dichos compuestos son los responsables de ambas actividades biológicas. Adicionalmente, los valores de IS indican que la acción antiplasmodial de los alcaloides de *A. mexicana* presente en Cuba es poco específica. El extracto enriquecido en alcaloides también exhibe un incremento de la toxicidad en el modelo *in vivo* con respecto al crudo. Los resultados de los ensayos clínicos de la decocción de la parte aérea de *A. mexicana* revelaron la baja toxicidad de la preparación, y los estudios de sus alcaloides demostraron baja citotoxicidad y buena selectividad de la acción antiplasmodial para la protopina y la alocriptopina.¹⁹ Estas evidencias pudieran sugerir la ausencia o la baja representación de dichos alcaloides en los extractos de la especie presente en Cuba. El extracto crudo muestra acción antimalárica en el modelo *in vivo*, sin embargo, es posible que en el proceso de fraccionamiento se pierdan componentes potenciadores de la biodisponibilidad de los alcaloides, lo cual pudiera justificar la inactividad del extracto enriquecido. En general, el extracto enriquecido en alcaloides no supera al extracto crudo de *A. mexicana* en cuanto a la seguridad.

De la misma forma que apreciamos una marcada diferencia en cuanto a la selectividad de la actividad entre las lactonas de la parte aérea y las de la raíz de escoba amarga, observamos un contraste en los resultados de las evaluaciones *in vivo* pues se apreció elevada mortalidad después del tratamiento de los animales tanto con el extracto crudo de la raíz como el de la parte aérea de *P. hysterothorus* a 500 mg/kg;⁴ sin embargo, la administración de 1 000 mg/kg del extracto de lactonas de la raíz no provocó toxicidad en los ratones durante los 4 días de experimento. En la literatura consultada no aparece información fitoquímica que nos permita explicar este resultado, pero podemos sugerir la pérdida de compuestos tóxicos durante el proceso de extracción de las lactonas de la raíz. De esta manera se reafirma la acción antiplasmodial de la raíz de *P. hysterothorus*, se demuestra la implicación de las lactonas en esta actividad y la mayor potencialidad de la fracción enriquecida sobre el extracto crudo.

Con estos resultados se descarta al extracto enriquecido en alcaloides de *A. mexicana* como base para un futuro fitomedicamento y se demuestra la potencialidad del extracto enriquecido en lactonas de la raíz de *P. hysterothorus* para este propósito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre el paludismo. Prefacio de la Directora General Dra. Margaret Chan. Ginebra: OMS; 2011. [citado 15 Jun 2014]. Disponible en: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/wmr2011_foreword_spanish.pdf

2. Willcox ML, Bodeker G. Traditional herbal medicines for malaria. *BMJ*. 2004;329:1156-9.
3. Ginorio DE, Ortega S, Rojas L, Marín H, Oviedo A. Control de la calidad del diagnóstico de paludismo en la provincia de Cienfuegos, Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. 2004;56:49-53.
4. Rodríguez-Pérez M, Martínez JM, Rivero LR, Alvarez HMH, Valdés AFC, Rodríguez DA, et al. Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. *Rev Cienc Farm Básica Apl*. 2006;27:197-205.
5. 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;52:197-201.
6. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Ed: Editorial Científico-Técnica; 1974.
7. Cabrera L. El Monte. La Habana: Ediciones CR; 1954.
8. Carreras Padrón AA. Remedios empíricos recogidos en la antigua provincia de Camagüey. *Revista Signos*. 1982;29:106-21.
9. Seoane J. El folclor médico de Cuba. La Habana: Ciencias Sociales; 1984.
10. Rasoanaivo P, Petitjean A, Ratsimamanga-Urverg S, Rakoto-Ratsimamanga A. Medicinal plants used to treat malaria in Madagascar. *J Ethnopharmacol*. 1992;37:117-27.
11. Caraballo A, Caraballo B, Rodríguez-Acosta A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37. doi: 10.1590/S00037-86822004000200016.
12. de la Fuente JR, Uriburu ML, Burton G, Sosa VE . Sesquiterpene lactone variability in *Parthenium hysterophorus* L. *Phytochem*. 2000;55:769-72.
13. Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C. Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. *Int J Mol Sci*. 2013;14:12780-805.
14. Houper M, Kirby GC, Kulkarni MM, Nagasampagi BA, O'Neill MJ. Antimalarial activity of parthenin and its derivatives. *Eur J Med Chem*. 1990;25:717-23.
15. Milliken W. Plants for malaria plants for fever. Medicinal species in Latin America- a bibliographic survey. Kew, United Kingdom: Ed. The Royal Botanic Gardens; 1997.
16. Simonsen HT, Nordskjold JB, Smitt UW, Nyman U, Palpu P, Joshi P, Varughese G. In vitro screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol*. 2001;74:195-204.
17. Allabi AC, Busia K, Ekanmian V, Bakiono F. The use of medicinal plants in self-care in the Agonlin region of Benin. *J Ethnopharmacol*. 2011;133:234-43.

18. Willcox ML, Graz B, Falquet J, Sidibé O, Forster M, Diallo D. *Argemone mexicana* decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:1190-98.
19. Willcox ML, Graz B, Falquet J, Diakite C, Giani S, Diallo D. A "reverse pharmacology" approach for developing an anti-malarial phytomedicine. 2011;10(Supl. 1):58.
20. Miranda M, Abreu J, Cuéllar A, Fuentes V, Acosta L, Sánchez LM, et al. La flora medicinal de Cuba. En: *Plantas medicinales*. La Habana: Ed. Abril; 2004. p. 5-7.
21. Ministerio de Salud Pública. Medicamentos de origen vegetal: extractos y tinturas: proceso tecnológico. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 311. La Habana: MINSAP; 1991.
22. Cuéllar A, Scull R, Martínez Y, Fernández-Calienes A, Monzote L. Evaluación preliminar de la composición química de las hojas de *Carica papaya* L. y del efecto antiprotozoario de un extracto enriquecido en alcaloides a partir de la misma. *Rev Colombiana Ciencia Animal.* 2012;4:364-76.
23. Saucedo Y, Mohamad B, González MN, González HM, Bravo LR, Rodríguez EJ, Quintana A, Alba MA. Estabilidad del polvo de *Parthenium hysterophorus* basado en el contenido de partenina mediante cromatografía líquida de alta eficacia. *Rev Cubana Plant Med.* 2009;14:4-13.
24. Miranda MM, Cuéllar AC. *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Ed. Félix Varela; 2001.
25. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
26. Bankowski Z, Howard-Jones N, eds. *Biomedical Research Involving Animals - Proposed International Guiding Principles*. Proceedings of the XVIIth CIOMS Round Table Conference. Switzerland: The Council for International Organisations of Medical Sciences; 1984.
27. Huber W, Koella JC. A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Trop.* 1993;82:257-6.
28. Schlichtherle M, Wahlgren M, Perlmann H, Scherf A. *Methods in malaria research*. 3rd ed. Virginia: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center; 2000.
29. Peters W, Fleck SL, Robinson BL, Stewart LB, Jefford CW. The chemotherapy of rodent malaria. LX. The importance of formulation in evaluating the blood schizontocidal activity of some endoperoxide antimalarials. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96:559-73.
30. Al-Musayeib NM, Mothana RA, Matheussen A, Cos P, Maes L. *In vitro* anti-plasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. *BMC Complement Alternat Med.* 2012;12:49.

31. Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Arrázola S, Callapa J, Ruiz G, et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alteños Indians. J Ethnopharmacol. 2000;71:123-31.

Recibido: 16 de julio de 2015.

Aprobado: 4 de julio de 2016.

Aymé Fernández-Calienes Valdés . Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 61/2. La Habana, Cuba, Apartado postal: 601 Marianao 13. Correo electrónico: fernandezcalienes@infomed.sld.cu