



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica

Jorge Enrique Hernández Carvajal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2022

Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica

Jorge Enrique Hernández Carvajal

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Ph.D. Pilar Ester Luengas Caicedo

Codirector:

Ph.D. Giovanni Garavito Cárdenas

Línea de Investigación:

Farmacognosia y Fitoquímica

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2022

Dedico este producto académico a mis padres: Susana Carvajal R "Q.E.P.D" y Adelmo Hernández B "Q.E.P.D", a mis hijos David y Camilo Hernández y a mi familia por su apoyo incondicional. Además, este trabajo es dedicado al médico tradicional José Octavio García Jitoma Safiama "Q.E.P.D", de la comunidad indígena Ziora Amena -Amazonas Colombia.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

No ha sido necesario obtener el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Jorge Enrique Hernández Carvajal

Nombre

Fecha 7/10/2022

Agradecimientos

A mis padres, Susana Carvajal R “Q.E.P.D” y Adelmo Hernández B “Q.E.P.D”, por estar siempre a mi lado brindándome seguridad y apoyo.

A mis hijos David y Camilo Hernández, que han sido una fuente de energía y entusiasmo en los momentos difíciles.

A mis Hermanos Juan Carlos, Jennifer y Julián que me han llenado de cariño y me han visto como un buen ejemplo.

A la profesora Yoshie Hata por su orientación, enseñanzas y colaboración en el desarrollo de la investigación.

A la profesora Pilar Ester Luengas por su apoyo académico, su profesionalismo y enseñanzas en el transcurso del trabajo de investigación.

Al profesor Giovanni Garavito por poner a disposición de este proyecto sus conocimientos, asesoría y tiempo.

A la profesora Alaíde Braga de Oliveira por su enseñanza, profesionalismo y amabilidad en mi pasantía en la en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia-Universidad Federal de Minas Gerais/UFMG, en Belo Horizonte.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio María H Arias, Zully Rodríguez, Paola Rodríguez, Isabella Quiroz, Daniel R Delgado, Carlos Bernal, Angel.

A los Profesores: Antonio Sanabria, Juan Camilo Marín, Maritza Rojas, Javier Rincón, Fleming Martínez, Javier García, Mary Trujillo, Jaiver Rosas, por sus enseñanzas y buena disposición.

A la comunidad indígena Ziora Amena -Amazonas Colombia por su amabilidad, a Jesús y José por su orientación en la selva.

A los docentes de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, en especial a los profesores del Departamento de Farmacia que participaron en mi formación personal y académica.

A la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo a partir de las becas que ofertó la Facultad de Ciencias y que me permitieron adelantar mis estudios.

A Colciencias por el a porte a partir de la beca apoyo a Doctorados Nacionales 727 de 2015.

A Colciencias por el a porte aprobado mediante la convocatoria 711 de 2015 a proyectos en el Programa nacional de ciencia, tecnología e innovación en salud.

Resumen

Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica

Utilizando el criterio etnofarmacológico se preseleccionaron cinco plantas con reportes de actividad antimalárica: *Cecropia metensis* Cuatrec, *Cecropia membranacea* Trécul, *Verbena littoralis* Kunth, *Ambelania duckey* Mark y *Curarea toxicofera* Wedd Barneby & Krukoff. El material vegetal fue colectado en diferentes departamentos de Colombia, acondicionado y sometidos a extracción etanólica por percolación exhaustiva.

En una primera etapa los extractos etanólicos de las cinco plantas preseleccionadas se evaluaron *in vitro*, frente a *Plasmodium falciparum* cepa FCR-3 (cloroquina resistente). El extracto etanólico de *C. toxicofera* presentó la mejor actividad antiplasmodial ($CI_{50}=7.6 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$) y se detectaron alcaloides. El resultado de actividad antiplasmodial para los extractos etanólicos de las otras especies evaluadas fue de inactivo.

Posteriormente para el extracto etanólico de *C. toxicofera* se realizó un fraccionamiento ácido-base. Los resultados de la actividad antimalárica *in vivo* frente *Plasmodium berghei*, a una dosis de 400 mg/Kg, mostraron para EtOHct un porcentaje de parasitemia de 38.0 ± 3 , del mismo orden que las fracciones alcaloides: FrDCM1 (31 ± 8), FrDCM2 (34 ± 5) y (FrAcB) (39 ± 3). Los porcentajes de parasitemia para cloroquina y el vehículo fueron de 20 ± 7 y 42 ± 3 respectivamente. La similitud en la actividad antimalárica *in vivo* de los tratamientos puede estar asociada con la semejanza química observada en los perfiles cromatográficos de los alcaloides. A partir del ensayo de toxicidad aguda se

XII Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

establecieron las siguientes dosis letales 50: EtOHct (DL₅₀=1000 mg/Kg), FrDCM1 (DL₅₀=5000 mg/Kg) y FrDCM2 (DL₅₀=400 mg/Kg).

La fracción alcaloidal (FrDCM2) se sometió a cromatografía en columna empleando sílica gel hasta obtener un compuesto puro, para el cual se realizó el estudio estructural mediante cromatografía líquida ultraeficiente con detector de arreglo diodos (CLUE-DAD), cromatografía líquida ultraeficiente con detector de arreglo diodos acoplada a espectrometría de masas (CLUE-DAD-EM), ¹H-RMN y los experimentos bidimensionales COSY y HSQC. A partir de estos resultados se estableció que el compuesto aislado era isochondodendrina.

Las CI₅₀ de las muestras evaluadas por el método LDH frente a *P. falciparum* cepa W2 (resistente a cloroquina) fueron: EtOHct (5.25 ± 1.53 µg/mL), FrDCM1 (4.04 ± 0.83 µg/mL) y FrDCM2 (6.28 ± 0.66 µg/mL). Todas las muestras presentaron actividad antiplasmodial, clasificada en rango activo (CI₅₀ = 1 a 15 µg/mL). Las fracciones y el compuesto identificado como isochondodendrina (A1) se clasificaron como moderadamente citotóxicos ya que sus valores de CC₅₀ fueron menores que 50 µg/mL.

Estos resultados mostrarán que las fracciones de alcaloides de *C. toxicofera* presentaron actividad antimalárica que puede estar asociada con los alcaloides bisbenzilisquinolínicos (BBIQS) como el alcaloide isochondodendrina, una sustancia aislada en esta investigación. Las fracciones obtenidas de *C. toxicofera* pueden convertirse en una alternativa para el tratamiento de la malaria.

Palabras claves: *Curarea toxicofera*, antimalárico, pruebas de toxicidad aguda, alcaloides vegetales.

Abstract

Contribution to the standardization of a plant extract with ethnopharmacological antecedents of antimalarial activity, through phytochemical evaluation and biological activity

Using ethnopharmacological criteria, five plants with reports of antimalarial activity were preselected: *Cecropia metensis* Cuatrec., *Cecropia membranacea* Trécul., *Verbena littoralis* Kunth., *Ambelania duckey* Mark, and *Curarea toxicofera* Wedd Barneby & Krukoff. The plant material was collected in different departments of Colombia, conditioned and subjected to ethanolic extraction by exhaustive percolation.

In a first stage, the ethanolic extracts of the five preselected plants were evaluated *in vitro*, against *Plasmodium falciparum* strain FCR-3 (resistant chloroquine), the ethanolic extract of *C. toxicofera* presented the best antiplasmodial activity ($IC_{50}=7.6 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$) and alkaloids are detected. The result of antiplasmodial activity for the ethanolic extracts of the other evaluated species was inactive.

Subsequently, acid-base fractionation was performed. The results of the *in vivo* antimalarial activity against *Plasmodium berghei* showed a percentage of parasitemia of 38.0 ± 3 for EtOHct, in the same order as the alkaloid fractions: FrDCM1 (31 ± 8), FrDCM2 (34 ± 5) and (FrAcB) (39 ± 3). The percentages of parasitemia for chloroquine and the vehicle were 20 ± 7 and 42 ± 3 , respectively. The similarity in the *in vivo* antimalarial activity of the treatments may be associated with the chemical similarity observed in the chromatographic profiles of the alkaloids. From the acute toxicity test, the following lethal doses 50 were established: EtOHct ($LD_{50}=1000 \text{ mg/Kg}$), FrDCM1 ($LD_{50}=5000 \text{ mg/Kg}$) and FrDCM2 ($LD_{50}=400 \text{ mg/Kg}$).

XIV Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

The alkaloidal fraction (FrDCM2) was subjected to column chromatography using silica gel until a pure compound was obtained, for which the structural study was carried out using ultra-efficient liquid chromatography with diode array detector (CLUE-DAD), ultra-efficient liquid chromatography with diode array-mass spectrometry. (CLUE-DAD-MS), ¹H-NMR and the bidimensional COSY and HSQC experiments. From these results it was established that the isolated compound was isochondodendrine.

The IC₅₀ of the samples evaluated by the LDH method against *P. falciparum* strain W2 (chloroquine resistant) were: EtOHct (5.25 ± 1.53 µg/mL), FrDCM1 (4.04 ± 0.83 µg/mL) and FrDCM2 (6.28 ± 0.66 µg /mL). All samples presented antiplasmodial activity, classified in active range (IC₅₀ = 1 to 15 µg/mL). The fractions and the compound identified as isochondodendrin (A1) were classified as moderately cytotoxic since their CC₅₀ values were less than 50 µg/mL.

These results showed that the alkaloid fractions of *C. toxicofera* presented antimalarial activity that may be associated with bisbenzylisoquinoline alkaloids (BBIQS) such as the isochondodendrine alkaloid, a substance isolated in this investigation. The fractions obtained from *C. toxicofera* can become an alternative for the treatment of malaria.

Keywords: *Curarea toxicofera*, antimalarial, acute toxicity tests, vegetable alkaloids

Contenido

PÁG.

RESUMEN	XI
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABLAS	22
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	24
INTRODUCCIÓN.....	26
1. OBJETIVOS	29
1.1 OBJETIVO GENERAL	29
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
2. MARCO TEÓRICO.....	31
2.1 MALARIA.....	31
2.1.1 Generalidades de la Malaria	31
2.1.2 Situación actual de la Malaria	32
2.1.3 El parásito: <i>Plasmodium</i> spp.....	34
2.1.4 Ciclo de vida del parásito	35
2.1.5 Fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria.....	36
2.2 FITOTERAPIA MODERNA	41
2.2.1 Productos fitoterapéuticos.....	41
2.2.2 Extractos estandarizados	43
2.2.3 Marcadores químicos de una droga	44
2.2.4 Productos fitoterapéuticos con actividad antimalárica	47

XVI **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

2.3 PLANTAS ANTIMALÁRICAS (ESPECIES PRE-SELECCIONADAS)	50
2.3.1 <i>Ambelania duckey</i> Mark	50
2.3.2 <i>Cecropia metensis</i> Cuatrec y <i>Cecropia membranacea</i> Trécul	52
2.3.3 <i>Verbena littoralis</i> Kunth.....	54
2.3.4 <i>Curarea toxicofera</i> (Mido.) Barneby & Krukoff.....	56
2.4 ALCALOIDES BISBENCILISOQUINOLINICOS (BBIQS)	58
3. PARTE EXPERIMENTAL	64
3.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES.....	64
3.1.1 Equipos	64
3.1.2 Reactivos y solventes	65
3.1.3 Materiales.....	66
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	67
3.2.1 Selección de la especie para profundización de los estudios fitoquímicos y farmacológicos	67
3.2.2 Recolección e identificación del material vegetal de las cinco especies preseleccionadas	67
3.2.3 Acondicionamiento del material vegetal de las cinco especies preseleccionadas	68
3.3 METODOLOGÍA ENSAYOS FITOQUÍMICOS.....	69
3.3.1 Elaboración y caracterización de extractos de las cinco plantas preseleccionadas	69
3.3.2 Ensayos químicos y generales para <i>Curarea toxicofera</i>	71
3.3.3 Variación química y de actividad antiplasmodial del extracto etanólico de <i>C. toxicofera</i> colectada en época seca y lluviosa.....	72
3.3.4 Fraccionamiento ácido-base del extracto etanólico de <i>C. toxicofera</i>	73
3.3.5 Perfiles cromatográficos por CCD, CLAE-DAD y CLUE-DAD de los extractos y fracciones <i>C. toxicofera</i>	74
3.3.6 Aislamiento y purificación de alcaloides BBIQS a partir de la fracción alcaloidal FrDCM 2.....	76
3.4 METODOLOGÍA ENSAYOS BIOLÓGICOS	80
3.4.1 Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vitro</i>	80
3.4.2 Evaluación antiplasmodial <i>in vitro</i> mediante la valoración en la producción de la enzima lactato deshidrogenasa (ρ LDH).....	81
3.4.3 Actividad hemolítica.....	83
3.4.4 Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vivo</i> de <i>C. toxicofera</i>	83
3.4.5 Evaluación de la toxicidad aguda por vía oral del extracto etanólico y las fracciones obtenidas de <i>C. toxicofera</i>	84

3.4.6 Cultivo de células hepáticas HepG2 y ensayo de citotoxicidad	88
4. RESULTADO Y DISCUSION	90
4.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS PLANTAS PRESELECCIONADAS	90
4.1.1 Preparación de los extractos primarios de las cinco especies preseleccionadas	90
4.1.2. Estudio fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de cinco plantas con antecedentes antimaláricos	92
4.1.3 Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vitro</i> de los extractos etanólicos de cinco plantas con antecedentes antimaláricos	105
4.1.4 Evaluación de la actividad hemolítica de los extractos etanólicos.	107
4.2. ENSAYOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE <i>Curarea toxicofera</i>	108
4.2.1 Material vegetal molido de <i>C. toxicofera</i>	108
4.2.2 Estudio de la variación química y de la actividad antiplasmodial del extracto etanólico de <i>C. toxicofera</i> colectada en las épocas de verano e invierno ecológico. ...	109
4.3 FRACCIONAMIENTO ÁCIDO-BASE DEL EXTRACTO ETANÓLICO	
<i>C. toxicofera</i>.....	116
4.3.1 Caracterización fitoquímica por CCD, CLAE-DAD y CLUE-DAD de los extractos y fracciones <i>C. toxicofera</i>	117
4.3.2 Evaluación de la actividad antimálarica <i>in vivo</i> del extracto primario y fracciones de <i>C. toxicofera</i>	123
4.3.3 Evaluación de la toxicidad aguda del extracto etanólico y las fracciones alcaloidales de <i>C. toxicofera</i>	126
4.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ALCALOIDES BBIQS	136
4.4.1 Fraccionamiento por columna cromatográfica abierta de la fracción FrDCM 2..	136
4.4.2 Fraccionamiento por cromatografía de columna (II) de la fracción alcaloidal FrDCM 2-5.....	143
4.5. ACTIVIDAD ANTIPLASMODIAL FRENTE A <i>P. falciparum</i> CLOROQUINA-RESISTENTE (W2) Y CITOTOXICIDAD FRENTE A CÉLULAS HEPG2 DE <i>C. toxicofera</i>.....	152
4.5.1. Actividad antiplasmodial mediante el método (<i>p</i> LDH) frente a <i>P. falciparum</i> cepa W2 de EtOHct, FrDCM1, FrDCM2, A1= isochondodendrina	152
4.5.2 Citotoxicidad en la línea celular HepG2 A16 e Índice de selectividad (IS).....	156
4.6 PROPUESTA MARCADOR PARA EL EXTRACTO DE <i>C. toxicofera</i>	159
5.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	162
5.1 CONCLUSIONES.....	162
5.2 RECOMENDACIONES	164

XVII Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

BIBLIOGRAFÍA.....	165
A. ANEXO: Fragmento de la respuesta ante el radicado del contrato de acceso al recurso genético.	181
B. ANEXO: Pruebas fitoquímicas preliminares efectuadas a los extractos etanólicos (Galindo, 1983; Hernández Carvajal, 2012).	183
C. ANEXO: Procedimiento para la evaluación <i>in vitro</i> de la inhibición de la invasión y el desarrollo de <i>Plasmodium falciparum</i>	185
D. ANEXO: Procedimiento operacional estándar para el desarrollo de la prueba supresiva de 4 días (test de peters) de actividad antimalárica <i>in vivo</i>	190
E. ANEXO: Aval comité de ética, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá para el desarrollo del proyecto.....	197
F. ANEXO: Procedimiento para la realización de los ensayos de toxicidad <i>in vivo</i> , según la OECD.....	199
G. ANEXO: Manuscrito elaborado a partir de los resultados de la evaluación antiplasmodial y fitoquímica de cinco plantas preseleccionadas	203
H. ANEXO: Espectros UV de los picos seleccionados en el estudio de la variación química del extracto etanólico de <i>C. toxicofera</i>	205
I. ANEXO: Test estadísticos para evaluar la normalidad de los datos correspondientes a resultados del ensayo <i>in vivo</i> de extracto etanólico y fracciones alcaloidales de <i>C. toxicofera</i>	209
J. ANEXO: Seguimiento cromatográfico por CCD del fraccionamiento en columna abierta de la fracción alcaloidal FRDCM 2.	211

Lista de figuras

PÁG.

Figura 2-1: Porcentajes de casos estimados de malaria por país en la Región de las Américas en 2020.	32
Figura 2-2: Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp.....	36
Figura 2-3: Estructuras químicas de los fármacos de uso generalizado en el tratamiento de la malaria.....	38
Figura 2-4: Árbol de <i>Ambelania duckey</i> Mark. - Amazonía colombiana.	52
Figura 2-5: Árboles de <i>Cecropia membranacea</i> Trécul (A) y <i>Cecropia metensis</i> Cuatrec (B) - Llanos orientales colombianos.....	53
Figura 2-6: Planta de <i>Verbena littoralis</i> Kunth. – Cundinamarca, Colombia.....	55
Figura 2-7: A. Liana de <i>Curarea toxicofera</i> (Mido.) Barneby & Krukoff - Amazonía colombiana. B. Anillos parciales, liana de <i>C. toxicofera</i> (corte transversal).....	56
Figura 2-8: Estructura unidad isoquinolinica: isoquinolina “cabeza” y bencilo “cola”.	59
Figura 2-9: Grupo A de alcaloides BBIQS con un enlace difenil éter.	60
Figura 2-10: Biosíntesis de alcaloides BBIQS. (Weber & Opatz, 2019).	62
Figura 3-1: Mapa de ubicación de colecta en dos épocas del año.....	72
Figura 3-2: Fraccionamiento ácido-base del extracto etanólico de <i>C. toxicofera</i>	74
Figura 3-3: Distribución de las muestras obtenidas de <i>C.toxicofera</i> en placa para determinar la CI_{50} de la actividad antiplasmodial mediante el método de lectura LDH... ..	82
Figura 4-1: Cromatogramas por CLAE-DAD de extractos etanólicos de <i>C. metensis</i> (A), <i>C. membranacea</i> (B), <i>V. littoralis</i> (C), <i>A. duckey</i> (D) y <i>C. toxicofera</i> (E), y espectros de los picos mayoritarios a 350 nm.....	96
Figura 4-2: Espectros por 1H -RMN en metanol- d_4 de los extractos etanólicos <i>A. duckey</i> , <i>C. metensis</i> , <i>C. membranacea</i> , <i>C. toxicofera</i> , y <i>V. littoralis</i>	98
Figura 4-3: Cromatogramas CLAE-DAD de extractos etanólicos de: <i>C.metensis</i> (A), <i>C.membranacea</i> (B), <i>V. littoralis</i> (C), <i>A. duckey</i> (D) y <i>C. toxicofera</i> (E) con detección a 210 nm.	102
Figura 4-4: Análisis por CCD de los extractos etanólicos de <i>C.toxicofera</i> colectada en diferente época del año.	111
Figura 4-5: Perfiles cromatográficos por CLAE-DAD del extracto etanólico de lianas de <i>C. toxicofera</i> colectada en diferente época del año. $\lambda=210$ nm.....	113
Figura 4-6: Perfiles cromatográficos por CCD del extracto etanólico de <i>Curarea toxicofera</i> y de las fracciones obtenidas por separación ácido-base.....	117

Figura 4-7: Perfiles cromatográficos por CLAE-DAD del extracto etanólico y fracciones de <i>Curarea toxicofera</i> . A. EtOHct; B. FrDCM1 C. FrDCM2; D. FrAcB.	120
Figura 4-8: Perfiles cromatograficos por CLUE-DAD para: a. FrDCM 1; b. FrDCM 2 y c. tetrandrina.	122
Figura 4-9: Diagrama de cajas para los porcentajes de inhibición de la parasitemia por tratamiento, ensayo <i>in vivo</i> , Test de Peters. cepa <i>P. berghei</i> ANKA. 1=Cloroquina; 2=EtOHct; 3=FrDCM1; 4=FrDCM2; 5=FrAcB.	124
Figura 4-10: Ganancia de peso corporal de ratones ICR hembras, que fueron dosificados con el extracto etanólico de <i>Curarea toxicofera</i> (300 mg/Kg vía oral) administrados en dosis única y su control (vehículo).	132
Figura 4-11: Ganancia de peso corporal de ratones ICR hembras, que fueron dosificados con: FrDCM1 300 mg/Kg (a), FrDCM1 2000 mg/Kg (b) y FrDCM2 a 50 mg/Kg (c), administrados en dosis única y su control (vehículo).	133
Figura 4-12: Esquema de fraccionamiento de la fracción FrDCM 2 por cromatografía en columna.	136
Figura 4-13: Perfiles cromatograficos por CLAE-DAD de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción FrDCM 2 a longitud de onda 210 nm. A=FrDCM 2-1; B= FrDCM 2-2; C= FrDCM 2-3; D= FrDCM 2-4; E= FrDCM 2-5.	138
Figura 4-14: Cromatograma obtenido de la fracción FrDCMF 2-5 empleando CLUE-DAD. Fase móvil agua-ácido fórmico 1%, Longitud de onda 280. Espectro UV pico de Tr=5.4.	141
Figura 4-15: Cromatograma obtenido de la fracción FrDCMF 2-5 empleando CLUE-DAD-EM. Longitud de onda 280.	141
Figura 4-16: Espectro de masas correspondiente a los picos de tiempo de retención de 2.6 (A) y 2.8 (B).	142
Figura 4-17: Esquema de fraccionamiento de la fracción FrDCM 2-5 por cromatografía en columna.	143
Figura 4-18: Cromatogramas de la fracción FrDCMF 2-5-1, empleando CLUE-DAD, longitud de onda 280 nm.	144
Figura 4-19: Cromatograma para la fracción (FrDCM 2-5-1) mediante CLUE-EM-DAD Longitud de onda 280.	144
Figura 4-20: Espectro CLAE-DAD-EM, en tándem (EM/EM) mododo (+), para el pico mayoritario FrDCM 2-5-1 (compuesto A1).	145
Figura 4-21: Proceso de fragmentación, doble ruptura bencílica isochondodendrina.	146
Figura 4-22: Fragmentos característicos de la ruptura de los grupos metoxilo y metilo del sistema de anillos A, B y F.	146
Figura 4-23: Espectro ¹ H-NMR para el compuesto A1: isochondodendrina.	147
Figura 4-24: Espectro HSQC para el compuesto A1, región ampliada del ¹ H-RMN entre 1-5 ppm.	149
Figura 4-25: Espectro HSQC para el compuesto A1, región ampliada del ¹ H-RMN entre 5.5-7.5 ppm.	149
Figura 4-26: Espectro ¹ H- ¹ H COSY para el compuesto A1 isochondodendrina región aromática.	150

Figura 4-27: Espectro ^1H - ^1H COSY para el compuesto A1 isochondodendrina región alifática ampliada.....	150
Figura 4-28: Estructura de (-)-isochondodendrina.	151
Figura 4-29: Relación concentración-respuesta de las sustancias frente a parásitos de <i>P. falciparum</i> (cepa W2) (resistente a cloroquina) empleando el método enzimático pLDH. A=FrDCM2; B=FrDCM1; C= EtOHct; D=isochondodendrina; E=tetrandrina; F= cloroquina.	155

Lista de tablas

PÁG.

Tabla 2-1: Fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria, modo de acción y efectos adversos.	39
Tabla 2-2: Plantas medicinales antimaláricas cuyos extractos son comercializados y registrados por la autoridad regulatoria de alimentos y medicamentos de Ghana.	49
Tabla 2-3: Clasificación de los alcaloides BBIQS, tipos y conexiones.	60
Tabla 3-1: Información correspondiente a la localización del material vegetal colectado.	68
Tabla 3-2: Condiciones extractivas y rendimiento de extracción.	70
Tabla 3-3: Fraccionamiento en columna abierta de la fracción alcaloidal FrDCM 2 de <i>C. toxicofera</i> .	77
Tabla 3-4: Fraccionamiento en columna abierta de la fracción alcaloidal FrDCMF 2-5 de <i>C. toxicofera</i> .	79
Tabla 3-5: Características sobre el protocolo de toxicidad aplicado a cada una de las sustancias evaluadas.	86
Tabla 4-1: Resultados del rendimiento en el proceso de extracción para las especies preseleccionadas.	91
Tabla 4-2: Resultados de la caracterización fitoquímica por CCD ^a para los extractos etanólicos de <i>A. duckey</i> , <i>C. metensis</i> , <i>C. membranacea</i> , <i>C. toxicofera</i> y <i>V. littoralis</i> .	92
Tabla 4-3: Resultados de la caracterización fitoquímica mediante pruebas de coloración y precipitación para <i>A. duckey</i> , <i>C. metensis</i> , <i>C. membranacea</i> , <i>C. toxicofera</i> y <i>V. littoralis</i> .	93
Tabla 4-4: Resultados del estudio antiplasmodial de los extractos etanólicos de las especies seleccionadas frente a <i>P. falciparum</i> FCR-3 CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$), actividad hemolítica <i>in vitro</i> CH_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e índice de selectividad.	106
Tabla 4-5: Evaluación tamaño de partícula del material vegetal molido de <i>C. toxicofera</i> empleando diferentes tamices con diferente grado de apertura de malla.	109
Tabla 4-6: Rendimiento del extracto etanólico de <i>C. toxicofera</i> en diferente época de colecta.	110

Tabla 4-7: Tiempo de retención y porcentaje de área del extracto etanólico de <i>C. toxicofera</i> en diferente época de colecta.	112
Tabla 4-8: Actividad antiplasmodial de los extractos etanólicos de lianas de <i>C. toxicofera</i> colectadas en diferente época del año.	115
Tabla 4-9: Porcentajes de parasitemia ensayo <i>in vivo</i> Test de Peters, cepa <i>P. berghei</i> ANKA.	123
Tabla 4-10: Resultados de mortalidad y clasificación toxicológica de EtOHct, FrDCM1 y FrDCM2.	127
Tabla 4-11: Relación del peso promedio de: EtOHct, FrDCM 1 y FrDCM 2 a las dosis evaluadas y sus vehículos.	132
Tabla 4-12: Comparación desplazamientos químicos de ¹ H-RMN del compuesto A1, respecto a lo reportado para isochondodendrina (Kanyinda et al., 1997; Mambu et al., 2000). Principales correlaciones en ¹ H- ¹ H COSY y ¹³ C-RMN δ del compuesto A1 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).	148
Tabla 4-13: Porcentajes reducción del crecimiento de <i>P. falciparum</i> cloroquina-resistente (W2) para las muestras evaluadas.	152
Tabla 4-14: Concentración inhibitoria cincuenta (CI ₅₀) de las muestras: EtOHct, FrDCM1, FrDCM2, isochondodendrina (A1) y tetrandrina en el ensayo de actividad antiplasmodial frente a <i>P. falciparum</i> cepa W2 (resistente a cloroquina).	153
Tabla 4-15: Concentración que inhibe 50 por ciento del crecimiento (CC ₅₀) de células HepG.	157
Tabla 4-16: Valores de CC ₅₀ , CI ₅₀ e índice de selectividad calculado para las muestras de <i>C. toxicofera</i> .	158

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
ART	Artemisinina
BBIQS	Alcaloides bis-bencil-Isoquinolinico
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDAE	cromatografía en capa delgada de alta resolución
CLAE-EM	cromatografía en capa delgada de alta resolución- Espectrometría de masas
CG-EM	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CH ₅₀	Concentración hemolítica 50
CL ₅₀	Dosis letal 50
CLAE-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
CLUE-DAD	Cromatografía líquida de ultra eficiente con detector de arreglo de diodos
CLUE-DAD-EM	Cromatografía líquida ultra eficiente con detectores de arreglo de diodos y espectrometría de masas
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHPS	Dihidroteroato sintetasa
DMSO/ DMSO- <i>d</i> 6	Dimetil Sulfóxido/ Dimetil Sulfóxido deuterado
Ep	Eritrocitos parasitados
EtOHct	Extracto etanólico de <i>C. toxicofera</i>

FrDCM 1	Fracción diclorometánica 1
FrDCM 2	Fracción diclorometánica 2
FrAcA	Fracción acuosa ácida
FrAcB	Fracción acuosa básica
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
HCOOH	Ácido metanoico
IS	Índice de selectividad
mAU	mili unidades de absorbancia
metanol- <i>d</i> 4	Metanol deuterado
NP-PEG	Reactivo de Productos Naturales (Ácido difenilbórico aminoéster 1%) / Polietilenglicol 4000 (5% en metanol)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
<i>p</i> LDH	Lactato deshidrogenasa de <i>P. falciparum</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RITAM	Research Initiative on Traditional Antimalarial Method
SH	Suero humano
Tr	Tiempo de retención
TCA	Terapias combinadas a base de artemisinina

Introducción

La malaria es una enfermedad parasitaria presente en el trópico, con alta incidencia tanto en morbilidad, como en mortalidad. En el informe mundial sobre malaria 2021, se estimaron 241 millones de casos en el año 2020 y se reportaron 627.000 muertes en todo el mundo. A pesar que en la región de las Américas los casos de malaria se redujeron en un 58% (de 1.5 millones a 0.65 millones) y las muertes en 56% (de 909 a 409), en el año 2020 Brasil, Colombia y la República Bolivariana de Venezuela presentaron más del 77% de todos los casos de esta región (OMS, 2021). Colombia en la semana epidemiológica 38 de 2022 presentó un acumulado de 53826 casos de malaria, de los cuales 52552 son de malaria no complicada y 1274 de malaria complicada (Instituto Nacional de Salud, 2022).

En Colombia y otros países de la región pueden suceder brotes eventuales debido al deterioro ambiental que facilita la reproducción de vectores anofelinos, y la migración de grupos poblacionales portadores del parásito; causada por el aumento de actividades como minería ilegal y la proliferación de cultivos ilícitos en áreas endémicas inestables y de poca transmisión (Padilla et al., 2017). Por ejemplo, en la semana 52 de 2018 se reportó el aumento del número de casos de malaria en los departamentos de Arauca, Caquetá y Norte de Santander, en comparación con el promedio de casos reportados en 2012 a 2017 (Instituto Nacional de Salud, 2018).

En Colombia se presentan zonas endémicas de malaria, en las cuales predominan las infecciones por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) y *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). La prevalencia de la malaria, unido al desarrollo de resistencia del parásito a los fármacos utilizados para su tratamiento soportan la necesidad de disponer nuevas opciones terapéuticas. (Ezenyi & Salawu, 2016; Uzor, 2020; Weathers et al., 2014; Wright, 2005).

Una de las estrategias con mejores resultados para llegar a nuevos ingredientes farmacéuticos activos (drogas o fármacos), es el estudio de especies con antecedentes

etnofarmacológicos. Como ejemplos de plantas utilizadas para el tratamiento de la malaria, que han conducido al desarrollo de fármacos tenemos la corteza de quina (*Cinchona* sp.), especie americana, de la cual se obtuvo la quinina, molécula que sirvió de base para el desarrollo de la cloroquina; de *Artemisia annua*, reportada en la medicina tradicional china, se extrajo artemisinina, fármaco que junto con sus derivados artesunato, artemeter y arteeter, se usan en el tratamiento de la malaria. (Aguiar et al., 2012; Karunamoorthi et al., 2013; Ōmura, 2015; Uzor, 2020; Valadeau et al., 2010).

En Colombia, la biodiversidad y la abundancia de conocimiento tradicional y popular relacionado con el uso de plantas medicinales para el tratamiento de la malaria han permitido la realización de diversas investigaciones que han llevado a la validación de la actividad biológica de numerosas especies vegetales frente a *Plasmodium* spp. y han abierto la puerta a la obtención de extractos primarios, fracciones enriquecidas de un grupo de compuestos o moléculas con actividad antimalárica (Garavito et al., 2006; Hernández Carvajal et al., 2014; Weniger et al., 2001); adicionalmente, no puede desconocerse la oportunidad que este conocimiento representa para la obtención de extractos estandarizados que puedan ser utilizados como ingredientes activos en productos fitoterapéuticos para el tratamiento de la malaria.

Específicamente esta investigación pretendió caracterizar, química y farmacológicamente, extractos y fracciones primarias de especies vegetales que presentaron antecedentes de uso tradicional y reportes en la literatura como antimaláricos. Para alcanzar este propósito se evaluó la actividad antiplasmodial *in vitro*, utilizando *P. falciparum* cepa FCR-3, de extractos etanólicos de las plantas seleccionadas previamente: *Cecropia metensis* Cuatrec, *Cecropia membranacea* Trecul, *Verbena littoralis* Kunth, *Ambelania cf ducky* Markgr y *Curarea toxicofera* (Wedd) Barneby & Krukoff.

Posteriormente se evaluó *in vivo* la actividad antimalárica, mediante la prueba supresiva de cuatro días en *P. berghei* (cepa ANKA) de la especie vegetal seleccionada *C. toxicofera*. Además, se evaluó la toxicidad aguda por vía oral, con lo cual se obtuvo información sobre la seguridad del extracto vegetal. Se propone un compuesto obtenido de la planta seleccionada como marcador químico, útil en la caracterización y control de calidad de materia prima e ingrediente natural, así como en las diferentes etapas conducentes a la estandarización del extracto.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar, química y farmacológicamente, extractos y fracciones primarias de especies vegetales, con el fin de contribuir al desarrollo en la estandarización de un extracto con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar una especie vegetal con potencial actividad antimalárica, a partir de la comparación de composición química y de la actividad antiplasmodial frente a *P. falciparum* de extractos o fracciones primarias obtenidas de diferentes especies vegetales.
- Evaluar la actividad antimalárica *in vivo* frente a *P. bergeri* del extracto o fracción primaria de la especie vegetal con mayor actividad antiplasmodial.
- Proponer al menos un compuesto o clases de metabolitos secundarios que puedan ser considerados como marcadores analíticos o terapéuticos, para el extracto o fracción primaria de la especie vegetal de mejor actividad antimalárica.
- Evaluar, para la especie vegetal seleccionada, el efecto de época de colecta sobre la composición química del material vegetal en el extracto o fracción primaria.
- Determinar, para la especie vegetal seleccionada el índice de selectividad, de extracto o fracción primaria a partir de la actividad antiplasmodial y hemolítica.
- Establecer la toxicidad aguda por vía oral del extracto o fracción primaria para la especie vegetal seleccionada.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MALARIA

2.1.1 Generalidades de la Malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria grave y potencialmente mortal, que ha afectado la humanidad a lo largo de la historia. A pesar de que la morbilidad y mortalidad ha disminuido, la tasa de mortalidad por malaria en 2020 es de 15 muertes por cada 100000 habitantes en riesgo (OMS, 2021). Aproximadamente el 96% de las muertes por malaria se reportan en 29 países, la mayoría de los casos y de las muertes se registran en el África subsahariana; también se ve afectado el Sudeste asiático, Latinoamérica y en menor medida Medio Oriente. Entre los grupos de población que son afectados por la malaria se encuentran: niños, mujeres embarazadas, pacientes con VIH, viajeros internacionales procedentes de zonas no endémicas, emigrantes de zonas endémicas entre otros (OMS, 2021; White et al., 2014).

En el mundo la malaria sigue siendo una enfermedad infecciosa frecuente y su control es difícil debido a la resistencia del parásito a los fármacos antimaláricos y de los mosquitos a los insecticidas, además de las condiciones socioeconómicas y conflictos políticos que obligan a la migración de la población a zonas endémicas (Bannister & Mitchell, 2003; Souza et al., 2018; Deharo et al., 2000).

Se han realizados diferentes estrategias lideradas por la OMS para disminuir el número de infectados y muertes por malaria en regiones endémicas, entre ellas se encuentran el control del vector empleando mosquiteros e insecticidas con piretroides, avances en la realización de pruebas de diagnóstico a pacientes con sospecha de malaria, implementar quimiopprofilaxis para viajeros expuestos a ser infectados con malaria y aumentar la disponibilidad de tratamientos en combinación con artemisinina o derivados como

32 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

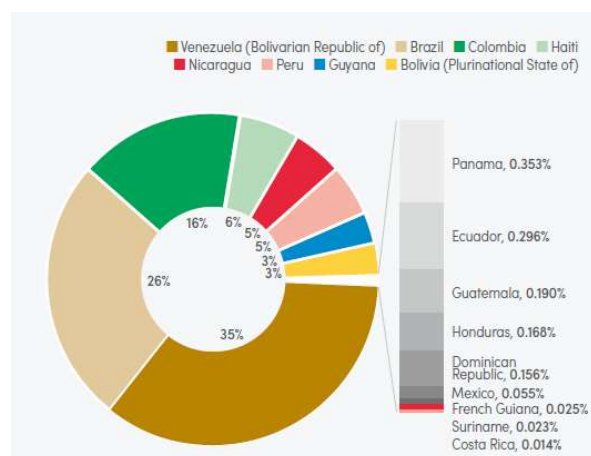
artesunato que reduce la mortalidad por malaria. La implementación de estas estrategias explican en gran medida la disminución de los casos de malaria, tomando como ejemplo la Región de África, entre el 2000 y el 2019 la incidencia de casos se redujo de 368 a 222 por 1000 habitantes en riesgo (OMS, 2021).

2.1.2 Situación actual de la Malaria

La malaria es una enfermedad que tiene incidencia a nivel mundial y continúa siendo una problemática de salud pública en diferentes países. La cantidad de casos de malaria por 1000 habitantes en riesgo se redujo de 81 en el año 2000 a 56 en el año 2019 y aumento en el año 2020 a 59. Este aumento en 2020 se asoció a variaciones en los servicios de prevención, diagnóstico y tratamiento de malaria debido a la pandemia por COVID-19 (OMS, 2021).

En la Región de las Américas, en el año 2020 se notificaron 602476 casos de malaria y 108 muertes de indígenas, disminuyendo un 11% y 43% respectivamente en comparación con los datos notificados en el año 2010. Es importante mencionar que el mayor porcentaje de los casos estimados se reportan en: la República Bolivariana de Venezuela (35%), Brasil (26%) y Colombia (16%) Figura 2-1 (OMS, 2021).

Figura 2-1: Porcentajes de casos estimados de malaria por país en la Región de las Américas en 2020.



Fuente: World Malaria Report 2020 (OMS, 2021).

En Colombia predomina la infección por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) con 59.4 % (31961), seguido de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) con 39.6 % (21311) e infección mixta 1% (554). En la semana epidemiológica 38 de 2022 se han notificado 14 casos probables de muerte por malaria, reportados en los Departamentos de Antioquia, Choco, Córdoba, Nariño, Valle del Cauca y Risaralda (Instituto Nacional de Salud, 2022).

En Colombia la malaria es un problema de salud pública relevante, debido a que cerca del 85% del territorio es rural, con regiones ubicadas por debajo de los 1500 metros sobre el nivel del mar (msnm), presenta condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad. Las características antes mencionadas hacen que se reporte malaria en 85% del país, de estos el 25% está en riesgo alto (Índice Parasitario Anual (IPA) >10) de sufrir la enfermedad. Los departamentos en los cuales se reporta cerca del 70% de los casos de malaria reportados son Chocó, Córdoba, Antioquia, Valle del Cauca y Cauca, lugares que presentan asentamientos afrocolombianos de la Región Pacífica y en los valles interandinos. Los casos notificados de malaria en Amazonas corresponden al 2.7% del registro Nacional. Las regiones en las que se reportan casos de malaria están estrechamente relación con la pobreza (Instituto Nacional de Salud, 2022; Knudson-Ospina et al., 2020; OMS, 2021).

Por lo anterior se requiere un trabajo desde diferentes abordajes: medicina, farmacología epidemiología, ecología con el fin de mejorar los programas de salud pública orientados controlar y erradicar la malaria en Colombia. Otro de los abordajes que pueden contribuir al tratamiento de la malaria es la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimalárica a partir de plantas medicinales con antecedentes de uso en el tratamiento de la malaria, en las regiones afectadas con la enfermedad. Algunos ejemplos de plantas son: *Artemisia annua*, de la cual se obtuvo la artemisinina, *Cinchona succiruba* se reportó la quinina. Otras especies que se han estudiado por sus antecedentes de uso antimalárico son *Simarrouba amara*, *Cryptolepis sanguinolenta*, *Peschiera fuchsiaefolia*, *Teclea gerrardii* (Kaur et al., 2009; Wright, 2005).

2.1.3 El parásito: *Plasmodium* spp.

La malaria es la enfermedad parasitaria con un alto impacto en la humanidad, es causada por parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*, los cuales son transmitidos por las hembras de los mosquitos Anopheles. Cinco especies del género *Plasmodium* causan la malaria infecciosa en los seres humanos, la mayor cantidad de casos reportados son causados por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. Además, se pueden encontrar infecciones en el hombre por *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi* que han sido reportadas como especies comunes al hombre y al mono (Garrido-Cardenas et al., 2019; White et al., 2014).

P. falciparum, es el parásito responsable de la enfermedad de mayor mortalidad en la historia, causa la muerte de millones de personas al año especialmente niños de corta edad. Su distribución se reporta en las regiones de: Asia Sudoriental, Américas, Pacífico Occidental, Mediterráneo y África, esta última es la región más afectada con más del 90% de los casos y el 96% de las muertes en todo el mundo. A pesar de las estrategias implementadas por la OMS para disminuir el contagio de malaria nivel mundial, hubo 241 millones de casos estimados de malaria en 2020 en los países endémicos, lo que representa un aumento en relación con los 227 millones de casos estimados en 2019. Los esfuerzos para controlar la malaria causada por *P. falciparum* son cada vez menos éxitos debido a la resistencia del parásito a los fármacos antimaláricos (Bannister & Mitchell, 2003; OMS, 2021).

P. falciparum, se encuentra en regiones tropicales y subtropicales. El desarrollo de su ciclo en el mosquito requiere temperaturas superiores a 18°C, por tal motivo no se encuentra en las montañas y en las regiones templadas. La biología de *P. falciparum* es particular, es capaz de cambiar su expresión genética para producir una condición adecuada en ambientes diferentes como hígado y glóbulos rojos en humanos; intestino, sistema vascular y glándulas salivales en el mosquito. Además, el parásito en el humano vive y se desarrolla dentro de los eritrocitos y hepatocitos, con lo cual se protege de los anticuerpos circulantes (Bannister & Mitchell, 2003; Deharo et al., 2000; White et al., 2014).

2.1.4 Ciclo de vida del parásito

Durante el desarrollo del ciclo de vida, el parásito pasa por dos hospederos: el humano es el hospedero intermediario donde se desarrolla la multiplicación asexual o esquizogonia del parásito y el mosquito hospedero definitivo donde tiene lugar la multiplicación sexual o esporogonia (Figura 2-2) (Deharo et al., 2000).

Los parásitos son transmitidos cuando se da la picadura de un vector, la hembra del mosquito del género *Anopheles*, la cual es portadora de *Plasmodium spp.* al alimentarse de la sangre de una persona infectada. Los parásitos en estadio de gametocito masculinos producen microgametocitos, el gametocito femenino madura hasta convertirse en un macrogametocito, los cuales se unen para formar cigotos diploides en la luz del tracto digestivo del mosquito (fase sexual o ciclo esporogónico). Posteriormente se desarrolla el cigoto llamado ooquineto, que traspasa la pared intestinal convirtiéndose en un ooquiste (ubicado en el epitelio y la lámina basal del intestino del insecto) hasta la forma asexuada infectante llamada esporozoito, que se desplaza hasta las glándulas salivares del vector para ser transmitidas dentro del hospedador vertebrado (Bannister & Mitchell, 2003; Deharo et al., 2000; Miller et al., 2013).

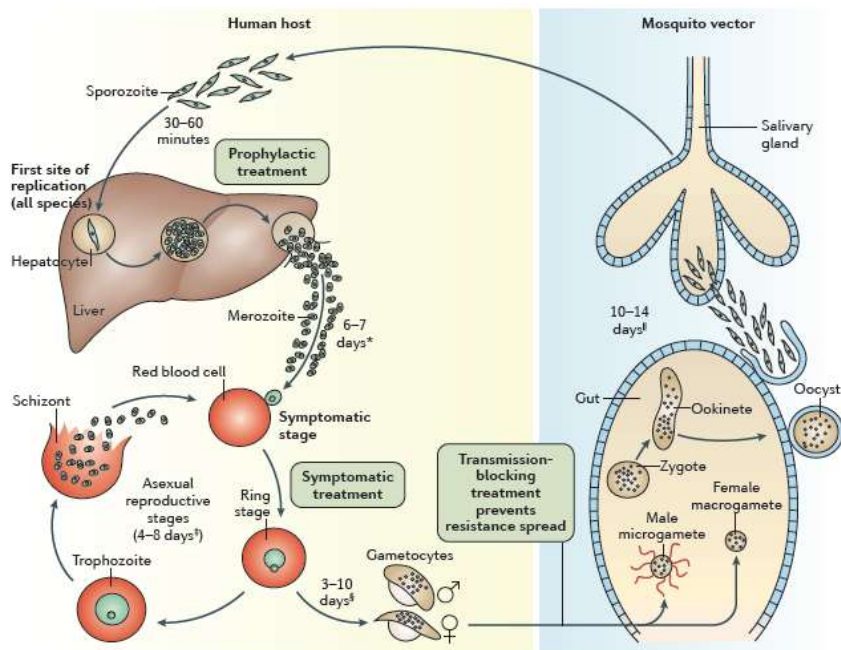
En el humano se presentan dos fases de multiplicación asexuada o esquizogonia. El vector transmite los esporozoitos que se desplazan rápidamente al hígado, donde invaden a los hepatocitos (esquizonte hepático), en esta etapa ocurre la división asexuada, en menos de 48 horas (ciclo extra-eritrocítico), para liberar merozoítos en la sangre, cada célula hepática infectada por esquizontes produce entre de 10.000 y 30.000 los cuales son liberados en la sangre para invadir eritrocitos. (Bannister & Mitchell, 2003; Deharo et al., 2000; Vispo, 2016).

El merozoito liberado al torrente sanguíneo infecta al glóbulo rojo y se genera una segunda división asexual, llamada esquizogonia eritrocítica. El merozoito evoluciona desde anillo a trofozoíto y esquizonte, una forma pluricelular que conduce a nuevos merozoitos. En cada glóbulo rojo infectado se origina una esquizogonia madura, que libera de 4 a 32 nuevos merozoitos en 48-72 horas (según la especie de parásito). Algunos de estos merozoítos presentan un proceso de diferenciación en formas sexuales denominadas gametocitos (no se dividen) que no suelen aparecer hasta el segundo o tercer ciclo eritrocítico. Los gametocitos se liberan al torrente sanguíneo los cuales son ingeridos por el mosquito

36 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

vector al picar al humano infectado, con lo cual se cierra el ciclo del parásito (Bannister & Mitchell, 2003; Deharo et al., 2000; Vispo, 2016).

Figura 2-2: Ciclo de vida de *Plasmodium* spp.



Fuente: (Phillips et al., 2017).

2.1.5 Fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria

Los medicamentos antimaláricos son empleados en dos sentidos, el primero es tratar los pacientes con malaria para eliminar los parásitos de la circulación sanguínea y órganos internos. El segundo sentido es contribuir a la prevención contra la malaria a personas (turistas, personal militar o integrantes de cuerpos de salud) visitantes en zonas endémicas de malaria. Por lo tanto, surge la necesidad de quimiopprofilaxis como opción de tratamiento para la protección contra esta infección potencialmente mortal, más aún en poblaciones susceptibles. Las personas viajan por diversas razones y los viajes han aumentado exponencialmente en los últimos tiempos a áreas palúdicas (Greenwood, 2010; Phillips et al., 2017).

Los medicamentos empleados en el tratamiento antimalárico pueden ser clasificados según el estadio del parásito sobre el cual actúan y el sitio donde atacan al parásito. Según estos criterios, los fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria se dividen en:

esquizonticidas sanguíneos (cloroquina, quinina, quinidina, mefloquina y halofantrina); esquizonticidas sanguíneos de acción lenta (pirimetamina, sulfonamidas, sulfonas y tetraciclinas) y esquizonticidas tisulares (primaquina y la pirimetamina). La artemisinina y sus derivados (artemeter y artesunato de sodio) actúan en las etapas eritrocíticas asexuadas como esquizonticidas sanguíneos (Tabla 2-1) (Greenwood, 2010; Rodríguez Parra, 2015).

En la selección del tratamiento farmacológico para la malaria es importante confirmar la especie de parásito involucrada, una vez que de las especies más invasivas en humanos, *P. falciparum* es de mayor mortalidad que *P. vivax*, pudiendo llegarse a un cuadro de malaria complicada (Chassaingne, 2001; OPS, 2010).

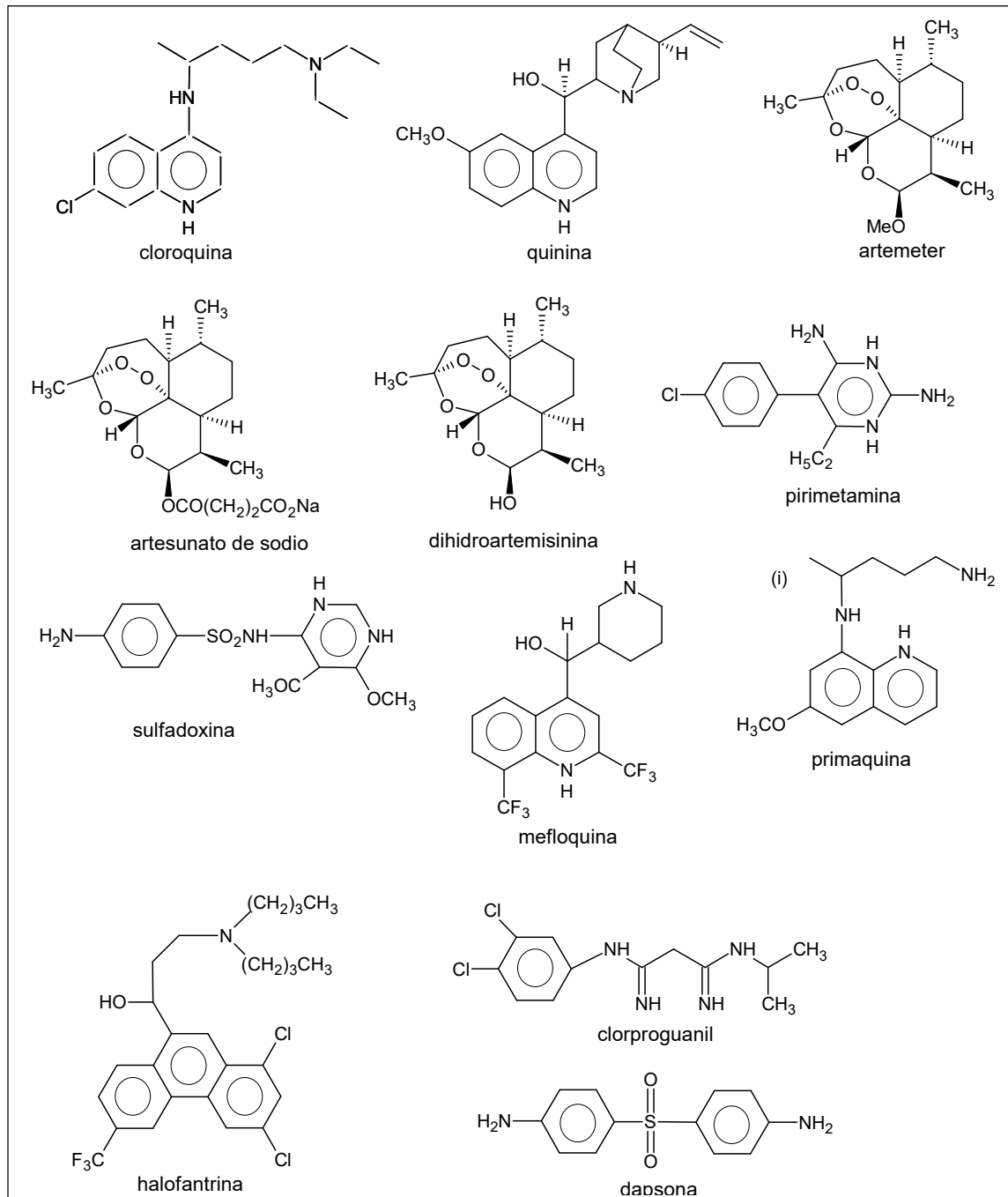
En los países tropicales las personas con malaria no complicada asociada a *P. falciparum* comúnmente reciben tratamiento ambulatorio. En el tratamiento sintomático de la malaria se utilizan medicamentos antipiréticos con paracetamol o ácido acetilsalicílico y medicamentos antiparasitarios orales. En Colombia el esquema de primera línea para tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* consiste en la combinación de artemeter + lumefantrina (AL), artesunato + mefloquina (AS+MQ) y la combinación artesunato + amodiaquina (AS+AQ). En cuanto a la malaria severa el Ministerio de la Protección Social como primera línea suministra el artesunato sódico vía intravenosa y como segunda línea el diclorhidrato de quinina vía intravenosa (OPS, 2010).

La quimioprofilaxis de la malaria está dirigiéndose a los estadios de esquizonte hepático y esquizonte sanguíneo, previniendo la infección eritrocítica, siendo útiles los fármacos de mayor frecuencia para la quimioprofilaxis: atovacuona-proguanil, doxiciclina y mefloquina (Ahmad et al., 2021; Katzung, 2004).

En la Figura 2-3 se muestran las estructuras químicas de algunos fármacos utilizados en el tratamiento de malaria y se complementa con la Tabla 2-1 en la cual se incluyen modo de acción y efectos adversos (Murambiwa et al., 2011; Winstanley, 2000).

38 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Figura 2-3: Estructuras químicas de los fármacos de uso generalizado en el tratamiento de la malaria.



Fuente: Murambiwa et al., 2011; Winstanley, 2000.

Tabla 2-1: Fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria, modo de acción y efectos adversos.

FÁRMACO	MODO DE ACCIÓN	LIMITACIÓN
Derivados de Quinina	Interrumpe la función de la membrana del parásito que resulta en la lisis celular. Modifica el pH de la vacuola alimentaria donde se une a la ferriprotoporfirina IX y bloquea la degradación a hemozoína.	<i>P. falciparum</i> resistente
Quinina	Base monoprótica débil, con actividad esquizonticida y gametocitocida.	Cardiotoxicidad
Mefloquina	Base diprótica débil, con actividad esquizonticida y gametocitocida.	Alteraciones gastrointestinales, desórdenes neuropsiquiátricos.
Cloroquina	Actividad esquizonticida y gametocitocida vía inhibición de la degradación del heme (el cual es tóxico para el parásito).	Cardiotoxicidad, deterioro de la función renal, toxicidad ocular.
Amodiaquina	Similar a cloroquina, actividad esquizonticida y gametocitocida.	Neuropatía periférica y anemia hemolítica. Los efectos adversos incluyen alteraciones gastrointestinales y anemia.
Primaquina	Actividad esquizonticida y gametocitocida hepática vía inhibición del transporte de proteínas.	No hay efectos secundarios importantes, salvo la aparición de úlceras en la boca en algunos pacientes.
Lumefantrina	Actividad esquizonticida y gametocitocida; interfiere con la ruta de detoxificación del parásito.	Trastornos cardiovasculares, náuseas, vómitos, anorexia y diarrea.
Antifolatos	Inhibición de la vía del ácido fólico por lo que interfiere con la síntesis de ADN.	<i>P. falciparum</i> resistente
Sulfadoxina-Pirimetamina	Actividad esquizonticida y gametocitocida.	depresión mental, trastornos gastrointestinales

40 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Tabla 2-1: (Continuación)

FÁRMACO	MODO DE ACCIÓN	LIMITACIÓN
Proguanil	Inhibición de la enzima dehidrofolato reductasa con actividad esquizonticida y gametocitocida.	Mareos, náuseas y anemia
Derivados de Artemisinina	Genera radicales libres con lo cual causa hemólisis y lisis de células infectadas.	
Artesunato	Actividad esquizonticida, reduce la tasa de gametocitos.	Ataxia (descoordinación en el movimiento), neurotoxicidad, disminución de leucocitos y de la concentración de hemoglobina.
Artemeter	Actividad esquizonticida y gametocitocida.	Bradicardia, bloqueo atrioventricular

Fuente: (Murambiwa et al., 2011)

De acuerdo con la información reportada, de resistencia parcial de algunos tratamientos para malaria, los investigadores a nivel mundial están generando nuevas estrategias para encontrar moléculas con posible actividad antimalárica, entre ellas, realizar modificaciones menores de las moléculas existentes y búsqueda de nuevas dianas farmacológicas en el parásito *Plasmodium spp.* Existen cinco terapias combinadas con Artemisinina que fueron aprobadas por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de Norte América (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ya que han demostrado estudios clínicos eficaces y seguros. El tratamiento por dosis presenta un valor comercial de US \$ 1 y son preparaciones estables en climas tropicales (Murambiwa et al., 2011; Phillips et al., 2017).

Los productos naturales de origen vegetal han sido a través de la historia fuentes de moléculas activas utilizadas en el tratamiento de la malaria, estas moléculas se han usado para desarrollar compuestos sintéticos o semisintéticos con mejor eficacia, seguridad y/o perfil farmacocinético. Por ejemplo, quinina obtenida de distintas especies de los géneros Cinchona y Remijia, la cual fue la primera sustancia exitosa frente a la malaria.

A partir de quinina se obtuvieron algunos fármacos análogos como cloroquina, primaquina y mefloquina. De *Artemisia annua* se aisló la artemisinina sustancia antimalárica de rápida acción. Esta sustancia por modificaciones químicas ha originado una serie de fármacos antimaláricos como: arteméter, artesunato y arteeter (Karunamoorthi et al., 2013).

2.2 FITOTERAPIA MODERNA

2.2.1 Productos fitoterapéuticos

Existen reportes de más de 85000 especies de plantas que se han documentado por su uso médico en todo el mundo, aspecto importante que permite fortalecer la búsqueda de nuevas moléculas activas farmacológicamente a partir de plantas medicinales. Este fenómeno se ve reflejado en la rápida expansión del mercado mundial de fitoterapéuticos con lo cual se genera una preocupación en autoridades sanitarias y usuarios por el manejo de aspectos como la eficacia, seguridad y calidad de la materia prima vegetal, los ingredientes naturales y los productos elaborados a partir de éstos (Liu & Wang, 2008; OMS, 2022).

La OMS estima que cerca del 75% de la población a nivel mundial ha usado en cierto momento medicina herbal para el tratamiento de diversas enfermedades. La investigación en productos naturales entre ellos plantas, hongos y bacterias aportó diversas sustancias con actividad farmacológica. En Norte América durante el periodo comprendido entre 1983-1994 aproximadamente el 40% de los nuevos fármacos se derivaron de compuestos naturales (Liu & Wang, 2008). Newman y Gordon en 2007 reportaron en su estudio que entre las fuentes de las nuevas sustancias activas farmacológicamente durante un periodo comprendido entre enero del año 1981 y junio de 2006, fueron los productos naturales (5%) y derivado de un producto natural (23%), con lo cual productos naturales y derivados de semisíntesis son fuente para el descubrimiento de nuevos fármacos (Newman & Cragg, 2007).

La tendencia de regresar a lo natural ha fomentado la comercialización y el consumo de los productos naturales. Se ha calculado que el mercado mundial de productos fitoterapéuticos alcanzó los 27 billones de dólares Americanos en 2014, distribuidos

42 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

principalmente en ventas en Europa (30%), Asia (27%), Estados Unidos de América (18) y otros países (25%) (Dutra et al., 2016).

De acuerdo con la normatividad que rige para cada país y a sus entidades regulatorias, se aceptan para comercialización diferentes categorías de productos:

-USA: en Estados Unidos de América los productos que se obtienen a partir de plantas presentan diferentes categorías; *Botanical drug*: “producto destinado a tratar enfermedades específicas, se requiere aprobación previa a la comercialización etiquetado y promocionado como medicamento”; *Dietary supplement*: “Destinado a complementar la dieta de la población sana, no se requiere aprobación previa a la comercialización; *Medical food*: “Destinado a cubrir la deficiencia en la población enferma. No se requiere aprobación previa a la comercialización. Requiere etiquetado para uso bajo supervisión médica (Liu & Wang, 2008).

-Europa: los productos que se elaboran a partir de plantas se rigen por la Herb Society, la cual los llama “*Botanical drugs*” y se definen como: “Producto que debe contener exclusivamente uno o más ingredientes obtenidos de plantas, se permite la adición de vitaminas o minerales si su seguridad está documentada y no modifican la actividad farmacológica de las plantas medicinales. Además, no son tóxicos para el paciente en las condiciones de administración recomendadas. En algunos casos se respaldan en usos tradicionales, para lo cual debe soportarse el haber sido empleado con fines medicinales durante al menos 30 años, incluidos no menos de 15 años dentro de la Comunidad Europea (Liu & Wang, 2008).

A pesar de que la OMS no es una entidad sanitaria, generó unos conceptos asociados a: “*Finished herbal products*”: Producto que se prepara a partir de una planta o de plantas diferentes. El producto terminado puede contener excipientes y el ingrediente activo. Si un producto medicinal a partir de plantas medicinales presenta compuestos sintetizados, no puede considerarse como producto herbal (OMS, 2022).

En Colombia el ente regulatorio es el INVIMA el cual define el *Producto fitoterapéutico*: como “Es el producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de la planta medicinal o asociaciones de estas. El producto puede presentarse

en estado bruto o en forma farmacéutica, con fines terapéuticos. El producto fitoterapéutico puede provenir de extractos primarios, tinturas o aceites y no podrá contener en su formulación principios activos aislados y químicamente definidos” (Ministerio de la salud y protección social, 2018).

2.2.2 Extractos estandarizados

Las plantas medicinales enteras o sus órganos, las preparaciones herbales y los productos fitoterapéuticos son matrices complejas en las cuales, además de los principios activos se encuentra una gran diversidad de compuestos, muchos de ellos desconocidos. Esta complejidad genera retos para el control de calidad y el desarrollo farmacotécnico. Por otro lado, para asegurar eficacia y seguridad reproducibles es necesario controlar tanto la variabilidad asociada a factores intrínsecos y ambientales, como la resultante de los procesos tecnológicos utilizados (Liu & Wang, 2008).

Para reducir la variabilidad en la composición es necesario hacer seguimiento a las diferentes etapas del proceso productivo orientado hacia la estandarización, la cual es definida por la *American Herbal Product Association* como: “el proceso que lleva a coleccionar un conjunto de información y estimar eventos de control, necesarios para generar productos herbales mediante metodologías coherentes y reproducibles. Esto se logra minimizando la variación inherente de la composición del producto natural a través de prácticas de garantía de calidad aplicadas a los procesos agrícolas y de fabricación” (Bijauliya & Alok, 2017).

La reproducibilidad en el proceso de obtención del extracto estandarizado es necesaria para garantizar composición y concentración constante de sus constituyentes (estandarización química). Además, la actividad farmacológica se conserva y es reproducible (estandarización biológica). (Liu & Wang, 2008; Srinivasan, 2006; van Breemen et al., 2007).

Con el fin de lograr la reproducibilidad en la composición y en la actividad terapéutica, en las etapas de investigación y desarrollo se evalúan diferentes parámetros, algunos de los cuales conducen a los ensayos de control de calidad de rutina, tanto del material vegetal como de los extractos obtenidos. Dentro de estos ensayos los más frecuentes están

44 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

relacionados con: **-Evaluación organoléptica:** en esta etapa se evalúan aspectos cualitativos (morfológicos y sensoriales) de la droga como tamaño, forma, color, olor, sabor y textura. **-Evaluación botánica (macroscópica y microscópica):** en la caracterización macroscópica se reporta la forma, tamaño, color y textura de la droga obtenida de la planta medicinal. Además, es necesario realizar análisis microscópico que permita identificar elementos de diagnóstico característicos de tejidos propios de la droga. Un análisis microscópico aporta la identidad del material y se puede utilizar para la detección de impurezas. **-Evaluación física:** se determina cenizas totales, cenizas insolubles en ácido y cenizas solubles en agua. Además, se realiza el análisis de los porcentajes del material extraíble (en agua, alcohol, éter, entre otros). **-Evaluación química:** En este ítem se consideran los estudios fitoquímicos preliminares, evaluaciones químicas cualitativas y cuantitativas de la droga, para lo cual se establecen los perfiles cromatográficos y análisis de compuestos escogidos como marcadores químicos empleando técnicas como CCD, CCDAE (cromatografía en capa delgada de alta resolución), CLAE, CLAE-EM. **-Evaluación biológica:** si no se dispone de un ensayo específico se pueden realizar evaluaciones que dan información sobre la uniformidad de algunas actividades biológicas, entre ellas está el ensayo de actividad hemolítica que permite establecer si el órgano de la planta medicinal presenta compuestos que afectan los glóbulos rojos, como las saponinas. **Otros ensayos:** si la composición de la droga lo justifica, pueden realizarse como parte de caracterización ensayos generales como la determinación del Índice de hinchamiento, del índice de amargor, del índice de formación de espuma. Además, como parte de la evaluación de seguridad pueden realizarse ensayos cualitativos o cuantitativos para pesticidas y metales pesados (Bijauliya & Alok, 2017).

2.2.3 Marcadores químicos de una droga

En los fitoterapéuticos, el ingrediente farmacéutico activo (IFA) es una droga o una combinación de drogas. Estas pueden ser material vegetal (uno o más órganos de la planta, partes de un órgano o exudados) o ingredientes naturales (aceites, extractos, fracciones). La droga es un sistema multicomponente, que incluye además de los principios activos, moduladores de la actividad y sustancias inertes (Cañigüeral, 2002).

Para realizar el control de calidad a materias primas vegetales, ingredientes naturales y productos fitoterapéuticos es necesario contar con sustancias de referencia. Si se conocen

los principios activos y se cuenta con patrones para ellos, serán los compuestos a identificar y cuantificar, de lo contrario es necesario recurrir al uso de marcadores químicos. En ambos casos, principios activos y marcadores, éstos pueden ser compuestos específicos o clases de metabolitos. Los principios activos responden por la mayoría del efecto terapéutico, mientras que los marcadores químicos pueden aportar o no a la actividad terapéutica. Los marcadores terapéuticos o activos tienen demostrada una participación en la actividad terapéutica de la droga, ya los marcadores analíticos no tienen o no se ha demostrado alguna actividad biológica. En drogas muy estudiadas se puede contar además con marcadores negativos, los cuales son compuestos o clases de metabolitos relacionados con efectos tóxicos o alérgicos y para los cuales suelen realizarse ensayos límite. (Pathak, 2017; OMS, 2022).

Clasificación de marcadores químicos:

Los marcadores se pueden clasificar en dos clases:

1. Marcadores de ADN: generan información genética de la especie que no se ve afectada por factores como la edad, condiciones fisiológicas del vegetal o ambientales.
2. Marcadores químicos: son sustancias presentes en la planta que se producen a partir del del metabolismo primario o secundario (Kushwaha et al., 2010).

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) definió los marcadores químicos como sustancias químicas o grupos de constituyentes presentes en una preparación a base de plantas que son de empleados con fines de control de calidad, independientemente de si tienen o no actividad farmacológica. Los marcadores químicos se suelen dividir en dos categorías (Kushwaha et al., 2010):

- Marcadores analíticos: sustancias únicamente con fines analíticos
- Marcadores activos: sustancias con actividad terapéutica

Srinivasan, 2006 propuso cuatro categorías:

- *Principios activos*: constituyente(s) que tienen actividad terapéutica.
 - *Marcador (es) activo (s)*: constituyentes que presentan actividad farmacológica conocida de la preparación. En las monografías de las farmacopeas se suele especificar un contenido o rango para los marcadores considerados activos o con actividad.

46 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

- *Marcadores analíticos*: constituyentes de la materia prima y extractos que no tienen actividad farmacológica comprobada. Estos marcadores son escogidos para adelantar los ensayos de cuantificación. Es importante establecer la concentración mínima o un rango específico para los marcadores analíticos, con lo cual se aporta información necesaria para la estandarización del extracto.
- *Marcadores negativos*: constituyentes que pueden ser alergénicos o tóxicos, que hacen que su presencia en el extracto sea indeseable o se puede especificar una concentración límite estricta para estos marcadores negativos y consignarlas en los documentos (Kushwaha et al., 2010).

Criterios de selección de los marcadores químicos

En 2007, la OMS definió los criterios en la selección de sustancias de referencia o marcadores para el control de calidad de los productos obtenidos a partir de plantas:

- Si se han identificado componentes con actividad terapéutica conocida, deben utilizarse como marcadores.
- Si no se cumple con la condición anterior, pero se conocen componentes con actividad farmacológica reportada, se deben utilizar como marcadores.
- Si los casos anteriores no se cumplen, puede emplearse como marcadores de la preparación herbal sustancias que correspondan a otros constituyentes característicos de la muestra matriz (OMS, 2022).

Teniendo en consideración la complejidad de las preparaciones obtenidas a partir de plantas medicinales como los fitoterapéuticos, los marcadores ofrecen una alternativa para garantizar la calidad, por tal motivo la EMEA decidió proponer algunos criterios de selección de marcadores:

- La selección de marcadores debe estar justificada.
- Los marcadores deben ser apropiados para el propósito previsto (por ejemplo: evaluación cuantitativa, control de calidad, evaluación de actividad, estabilidad).
- Los marcadores deben conectar los pasos del proceso de producción y las medidas de control de calidad.
- Los marcadores se utilizarán con fines cuantitativos y cualitativos.

-
- Los límites de aceptación para el contenido de un marcador propuesto deben especificarse y justificarse.
 - Los marcadores se usan con fines cualitativos y cuantitativo, sin importar si tienen o no actividad farmacológica. Además, permiten hacer un seguimiento desde el inicio del proceso hasta la obtención del producto final.

Únicamente la determinación de la estabilidad del marcador en el fitoterapéutico no será suficiente, ya que el producto es una mezcla multicomponente en la cual están presentes otras sustancias que pueden participar de la actividad y cada uno de los compuestos de este sistema multicomponente puede sufrir procesos de inestabilidad. Para el seguimiento de la droga como un todo se puede realizar perfiles cromatográficos. Es deseable que se identifiquen y cuantifiquen (o semicuantifiquen) la mayor cantidad de compuestos o clases de metabolitos presentes, en especial aquellos asociados con la actividad terapéutica (EMA, 2018).

2.2.4 Productos fitoterapéuticos con actividad antimalárica

Uno de los problemas que presentan los medicamentos utilizados para el tratamiento de la malaria, como los que tienen cloroquina como fármaco, es la resistencia generada por *P. falciparum*. Existen alternativas terapéuticas para contrarrestar esta resistencia, como la terapia combinada con Artemisinina o sus derivados (ACT), sin embargo, esta terapia presenta alto costo y reportes de una resistencia emergente. Por lo tanto, se requiere disponer de otras alternativas de tratamiento para la malaria (*Guidelines for the Treatment of Malaria*, 2010; Komlaga et al., 2015).

Las preparaciones tradicionales a partir de plantas medicinales hacen parte de diferentes sistemas médicos tradicionales como: la medicina tradicional china, medicina Ayurvédica y medicina indígena de Sur América, entre otros. Esta medicina tradicional ha llevado al descubrimiento de distintas moléculas como la morfina a partir del opio, la artemisinina de *Artemisia spp* (Khan, 2006; Liu & Wang, 2008).

Las plantas medicinales, con antecedentes en la medicina tradicional, siguen siendo una fuente de preparaciones tradicionales, extractos crudos, fracciones enriquecidas en una clase de metabolitos secundarios, que pueden ser empleados en el tratamiento de malaria.

48 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

El abordaje para obtener estos tratamientos ha cambiado con el tiempo, ya que se ha pasado del remedio tradicional a un producto fitoterapéutico, que pueda comercializarse. Para tal fin, se inicia con la validación de las preparaciones tradicionales y se genera suficiente información para conseguir la respectiva autorización de comercialización (Affum et al., 2013; Nguta & Mbaria, 2013). La estrategia de obtención de productos fitoterapéuticos es complementaria a la del desarrollo de fármacos.

En Colombia se han adelantado diversas investigaciones orientadas a dar un soporte científico al uso de plantas y remedios en el tratamiento de la malaria. Para ello se ha evaluado la actividad antiplasmodial *in vitro*, la actividad antimalárica *in vivo* y se ha avanzado en la caracterización fitoquímica de extractos y fracciones de diferentes especies, la mayoría con reportes etnofarmacológicos en el tratamiento de la malaria. Entre las especies evaluadas están *Annona muricata*, *Rollinia exsucca*, *Xylopia aromática* (Osorio et al., 2005), *Abuta grandifolia*, *Acacia farnesiana*, *Acnistus arborescens*, *Calea prunifolia*, *Croton leptostachyus*, *Piper cumanense*, *Piper holtonii*, *Cecropia membranacea* y *Cecropia peltata* (Garavito et al., 2006; Hernández Carvajal et al., 2014). En Colombia aún se está en la etapa de investigación por lo que no se dispone de productos fitoterapéuticos para el tratamiento de la malaria, con registro sanitario.

En Ghana, país afectado por malaria, se ha identificado 23 productos terminados que contienen una planta o una mezcla de plantas con antecedentes de uso tradicional frente a malaria, comercializados en farmacias comunitarias, clínicas y otros establecimientos relacionados con productos herbales. Estos productos fueron registrados por la autoridad regulatoria de alimentos y medicamentos de Ghana. En la Tabla 2-2 se mencionan algunos productos con sus números de registro (Komlaga et al., 2015).

Un ejemplo, para establecer los parámetros de estandarización, de un antimalárico eficaz a partir de la medicina tradicional africana, son los estudios químicos y farmacológicos realizados a la corteza de *Annickia polycarpa*. El extracto etanólico de *A. polycarpa* fue estandarizado, estableciendo el contenido total de alcaloides, compuestos fenólicos y saponinas. Además, se estableció el perfil cromatográfico por UPLC-MS (cromatografía líquida ultraeficaz con detector de arreglo diodos acoplada a espectrometría de masas). El análisis químico condujo a la identificación de un alcaloide con núcleo de oxoaporfina y

dos aporfinas, que fueron propuestos como marcadores analíticos. Posteriormente se realizaron los ensayos farmacológicos *in vivo* empleando *Plasmodium berghei*, los cuales permitieron establecer la relación entre los metabolitos secundarios identificados y la actividad antimalárica observada (Kumatia et al., 2021).

Tabla 2-2: Plantas medicinales antimaláricas cuyos extractos son comercializados y registrados por la autoridad regulatoria de alimentos y medicamentos de Ghana.

Número de registro	Plantas medicinales
FDB/HD 02-1007	<i>Khaya senegalensis</i> , <i>Cryptolepis sanguinolenta</i>
FDB/HD 02-7046	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> , <i>Alstonia boonei</i> , <i>Azadirachta indica</i> , <i>Morinda lucida</i> , <i>Xylopiia aethiopica</i>
FDB/HD 05-10083	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>
FDB/HD 05-8060	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>
FDB/HD 05-9075	<i>Cola gigantea</i> , <i>Solanum torvum</i> , <i>Spathodea campanulata</i> , <i>Vernonia amygdalina</i>
FDB/HD 06-7058	<i>Alstonia boonei</i> , <i>Vernonia amygdalina</i> , <i>Xylopiia aethiopica</i>
FDB/HD 07-5054	<i>Alstonia boonei</i> , <i>Azadirachta indica</i>
FDB/HD 07-7096	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>
FDB/HD 09-4071	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> , <i>Momordica charantia</i> , <i>Vernonia amygdalina</i>
FDB/HD 10-5095	<i>Anthocleista nobilis</i> , <i>Phyllanthus fraternus</i>
FDB/HD 11-9128	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> , <i>Morinda lucida</i>
FDB/HD 12-10154	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>
FDB/HD 12-10169	<i>Cola gigantea</i> , <i>Solanum torvum</i> , <i>Spathodea campanulata</i> , <i>Bombax buonopozense</i> , <i>Vernonia amygdalina</i>
FDB/HD 12-12213	<i>Azadirachta indica</i> , <i>Paullinia pinnata</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Tetrapleura tetraptera</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Moringa oleífera</i>
FDB/HD 12-2011	<i>Mangifera indica</i> , <i>Paullinia pinnata</i> , <i>Pycnanthus angolensis</i> , <i>Rauvolfia vomitoria</i>
FDB/HD 12-2018	<i>Morinda lucida</i>
FDB/HD 12-8101	<i>Carica papaya</i> , <i>Xylopiia aethiopica</i> , <i>Alchonea cordifolia</i>
FDB/HD 12-9121	<i>Tetrapleura tetraptera</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Carica papaya</i> , <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Alchonea cordifolia</i> , <i>Senna siamea</i>
FDB/HD 12-9141	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> , <i>Morinda lucida</i>
FDB/HD 13-1020	<i>Azadirachta indica</i> , <i>Cryptolepis sanguinolenta</i> , <i>Vernonia amygdalina</i>
FDB/HD: 10-5092	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i> , <i>Azadirachta indica</i>
FDB/HD: 11-6035	<i>Citrus aurantifolia</i> , <i>Senna siamea</i> , <i>Morinda lucida</i>

Fuente: Komlaga et al., 2015

2.3 PLANTAS ANTIMALÁRICAS (ESPECIES PRE-SELECCIONADAS)

El grupo de investigación Farmacología de la Medicina Tradicional y Popular - FaMeTra ha enfocado parte de su trabajo en la búsqueda de plantas medicinales con actividad antimalárica en colaboración con la comunidad indígena Ziora Amena de la Amazonia Colombiana y con la Universidad Nacional de Colombia - Sede Amazonía. A partir de diálogos con la comunidad en los cuales se socializaron objetivos y alcances de los distintos proyectos, se registraron las plantas reportadas por el medico tradicional José Octavio García o Hitoma Safiama (Luz del Sol) utilizadas en la preparación de remedios para tratar a miembros de la comunidad enfermos de malaria. Entre las plantas reportadas están *Aspidosperma excelsum* (Costillo), *Abuta grandifolia* (A+fo o tres líneas) y *Curarea toxicofera* (Bejuco de llano) (Cárdenas Cuadros, 2011). Los remedios obtenidos de estas plantas han sido evaluados *in vitro* e *in vivo* frente a *P. falciparum* por integrantes del grupo de investigación FaMeTra, con resultados promisorios (Rodríguez Novoa, 2016; Rodríguez Parra, 2015). Además, se inició la caracterización fitoquímica y de actividad antiplasmodial de *Cecropia metensis* Cuatrec y *Cecropia membranacea* Trécul (Hernández Carvajal et al., 2014).

A partir de los antecedentes etnofarmacológicos y los avances en la caracterización fitoquímica y de actividad antiplasmodial, para esta tesis se preseleccionan las plantas que a continuación se describen:

2.3.1 *Ambelania duckey* Mark

La familia Apocynaceae comprende más de 400 géneros y 2000 especies de árboles, arbustos y enredaderas tropicales. Esta familia se caracteriza por producir látex blanco, las hojas son opuestas o en espiral; las flores son grandes, coloridas y ligeramente fragantes con cinco lóbulos retorcidos y los frutos están en pares (Chan et al., 2016; Ya.-Na. Lv et al., 2020).

Las plantas de la familia Apocynaceae presentan metabolitos secundarios de la clase terpenoides: en *Alstonia scholaris* se ha reportado ácido alstónico A y B; de *Nerium adelfa*

se han aislado betulina, ácido betulínico, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido kanérico. Otra clase de metabolitos secundarios son los iridoides, en las especies *Allamanda cathartica* y *Allamanda schottii* se ha determinado la presencia de: allamandina, allamandicina, allamdina, isoallamandicina, allamcina, allamancina, allamcidina, isoplumericina, plumericina y plumierida (Chan et al., 2016).

Los alcaloides son metabolitos secundarios que se han aislado en distintas especies de la familia Apocynaceae y han sido clasificados como alcaloides indólicos simples, bisindóles, quinindolinas y quinindoles. En las hojas, corteza de tallo y raíz de *Alstonia augustifolia* y *Alstonia macrophylla* se reportan los alcaloides macrocarpamina, macralstonina y alstonerina. Otra importante clase de metabolitos secundarios reportados en esta familia son los cardenolidos, en *Calotropis gigantea* se menciona la presencia de calactina, calotoxina, calotropina, frugosidina y gofrusidina (Chan et al., 2016).

Otra clase de metabolitos secundarios reportados en distintas especies de la familia Apocynaceae son los flavonoides. El flavonoide isorhamnetina se han aislado de partes aéreas y látex de *C. gigantea*. En *C. roseus* se aislaron kaempferol, quercetina e isorhamnetina de hojas, flores y corteza. Además, se ha reportado el ácidos fenólicos como el ácido clorogénico en hojas y tallos de *C. roseus*, *Vallaris glabra*, *Dyera costulata*, *A. angustiloba*, *K. fruticosa*, *N. oleander* y *P. obtusa* (Chan et al., 2016; Ya.-Na. Lv et al., 2020).

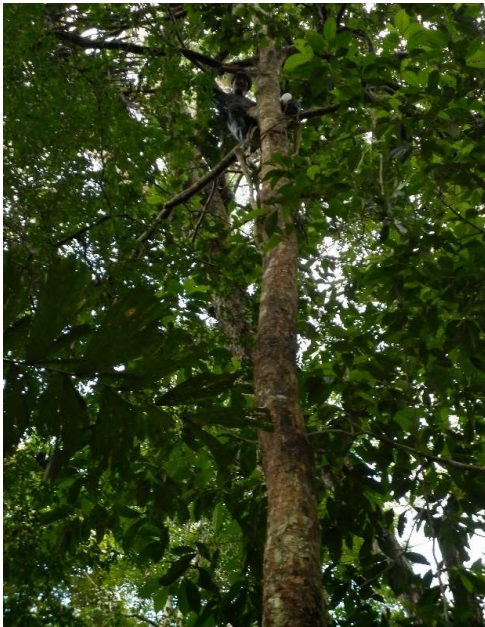
Diversas plantas de la familia Apocynaceae que se encuentran en la región tropical y asiática se utilizan para tratar la fiebre, la malaria, el dolor, la diabetes y las dolencias gastrointestinales, algunas de ellas se utilizan en la medicina tradicional china. Igualmente, extractos crudos y compuestos aislados de plantas de esta familia presentan actividades: antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, anticancerosa, citotóxica, antimicrobiana y cardioprotectora. Un ejemplo es *Catharanthus roseus* de la que se aisló la vincristina y la vinblastina, que presentaron actividad anticancerígena (Chan et al., 2016; Y.N. Lv et al., 2020; Castro et al., 2009).

Las especies del género *Ambelania* (familia Apocynaceae) se encuentran distribuidas en la región tropical de América del Sur, incluida la región amazónica. *Ambelania occidentalis* se utiliza habitualmente en la medicina tradicional para tratar enfermedades tropicales

52 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

parasitarias, como la leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la malaria (Ayyad et al., 2012). En Colombia, el grupo de investigación FaMeTra encontró actividad antiplasmodial de un extracto etanólico de *A. duckey*, utilizando la cepa FCR-3 de *Plasmodium falciparum*, cloroquina-resistente (resultados no publicados). En la Figura 2-4 se observa un individuo de *A. duckey* en la amazonia colombiana.

Figura 2-4: Árbol de *Ambelania duckey* Mark. - Amazonía colombiana.

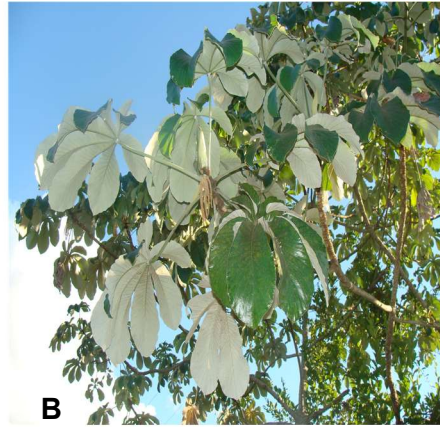


Hernández, JH

2.3.2 *Cecropia metensis* Cuatrec y *Cecropia membranacea* Trécul

La familia Cecropiaceae, antes incluida en la familia Moraceae, comprende seis géneros y 170 especies de distribución pantropical. Los árboles o arbustos de la familia Cecropiaceae se caracterizan por presentar raíces aéreas y látex acuoso o lechos. Sus hojas son alternas, pecioladas, simples o de palmatilobadas a compuestas a veces peltadas, estípulas soldadas. Las inflorescencias son axilares en racimos, capítulos globosos o cimas. Las flores pueden aparecer solitarias, con o sin brácteas. Se presentan flores pequeñas, actinomorfas, unisexuales, con un perianto simple de 2-4 sépalos, libres o connados formando un tubo. Fruto drupáceo, en aquenio rodeado por el perianto acrescente y carnoso o en sincarpo (Arboles ornamentales, 2021) (Ver Figura 2-5).

Figura 2-5: Árboles de *Cecropia membranacea* Trécul (A) y *Cecropia metensis* Cuatrecasas (B) - Llanos orientales colombianos.



Luengas, PE

El género *Cecropia* presenta 60 especies, en las cuales se han reportado metabolitos secundarios como terpenoides, esteroides y compuestos fenólicos (principalmente proantocianidinas y flavonoides). De las especies *C.membranacea*, *C. peltata*, *C. adenopus*, *C. pachystachya*, *C. pupurascens* y *C. palmata* se han reportado compuestos de clase terpenoides como β -sitosterol, β -sitostenona, α -amirina, β -amirina, ácido tormentico y ácido ursólico. Los flavonoides son una clase de metabolitos secundarios presentes en distintas especies del género *Cecropia*. Para *C. glaziovii*, *C. pachystachya*, *C. lyratiloba*, se han reportado orientina, isorientina e isovitexina. Otras especies en las cuales se han detectado la presencia de flavonoides se encuentran *C.membranacea* y *C. peltata*. En algunas especies, como *C. obtusifolia*, se han identificado además alcaloides y saponinas (Hernández & Luengas, 2013; Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Andrade-Cetto & Vázquez, 2010; Costa et al., 2011).

Soportado en investigaciones preclínicas, se han descrito diferentes actividades farmacológicas para especies del género *Cecropia*, entre ellas están las siguientes actividades cardiovascular, actividad hipoglicemiantes, actividad sobre el sistema nervioso central, actividad antiviral, actividad antimalárica y actividad antileishmanicida (Daga et al., 2020; Costa et al., 2011; Andrade-Cetto & Vázquez, 2010). El extracto acuoso de las hojas de *C. glaziovii* presentó distintas actividades farmacológicas *in vitro*: actividad cardiovascular y antiviral sobre virus del herpes HHV1-HHV2. Este mismo extracto, en ensayo *in vivo*, mostró actividad antisecretora de ácido gástrico. El extracto etanólico

54 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

obtenido de hojas y corteza de *C. hololeuca* inhibió *in vitro* la enzima convertidora de angiotensina. El extracto metanólico de las hojas *C. lyratiloba* presentó actividad vasodilatadora. El extracto acuoso, fracción butanólica y ácido clorogénico, obtenidos de *C. obtusifolia* fueron activos como hipoglicemiantes (Andrade-Cetto & Vázquez, 2010; Consolini & Migliori, 2005; Costa et al., 2011).

A partir de las hojas *C. pachystachya* se obtuvo el extracto hexánico y se aisló el β -sitosterol, el extracto apolar presentó actividad antimalárica *in vivo* a una concentración de 200 mg/kg. Otras especies del género *Cecropia* en la Amazonía brasileña, que han presentado actividad antimalárica, son *C. glaziovii* y *C. hololeuca* (Botsaris, 2007; Uchôa et al., 2010). De las especies *C. metensis* y *C. membranacea*, especies recolectadas en la región de los llanos orientales colombianos, se obtuvieron las fracciones acetato de etilo, las cuales presentaron actividad antiplasmodial frente a *P. falciparum* FCB-2 (Hernández Carvajal et al., 2014).

2.3.3 *Verbena littoralis* Kunth

La familia Verbenaceae comprende cerca de 100 géneros, distribuidos en áreas tropicales y subtropicales, entre ellos se encuentra el género *Verbena*, el cual cuenta con 250 especies distribuidas en regiones tropicales templadas de la región Andina desde Chile hasta Guyana Venezolana, incluyendo Colombia y el Sureste de Brasil. *Verbena littoralis* se caracteriza morfológicamente por su tallo cuadrangular, hojas ovadas, opuestas, sésiles o con pecíolos hasta de 1 cm de largo, lámina lanceolada (con base ancha y ápice angosto) a ovada (forma de huevo) u oblanceolada (forma lanceolada invertida), a veces elíptica u oblonga, sus inflorescencias terminales, pedunculadas, espigas básicamente dispuestas en triadas proliferantes, frecuentemente una panícula (Figura 2-6) (O'Leary et al., 2007; Tasso de Souza et al., 2005).

A partir de las distintas investigaciones fitoquímicas en *Verbena littoralis* se ha reportado la presencia de iridoles glicosidados (Gelsemiol 6'-trans-cafeoil-1-glucosa), compuestos antracénicos, saponinas, taninos flavonoides, fenilpropanoides, dihidrochalcona, terpenos y carotenoides (Castro-Gamboa & Castro, 2004; Y. Li, Ishibashi, Chen, et al., 2003; Y. Li, Ishibashi, Satake, et al., 2003; Tasso de Souza et al., 2005; Vestena et al., 2019).

Figura 2-6: Planta de *Verbena littoralis* Kunth. – Cundinamarca, Colombia.



Luengas, PE

En diferentes regiones del mundo, varias especies del género *Verbena* se utilizan en la medicina tradicional como remedios con efectos diuréticos, expectorantes, antiirreumáticos, antiinflamatorios. Algunas especies también se utilizan para el tratamiento de la fiebre, un síntoma común de la malaria (Adams et al., 2011; Calvo, 2006). *Verbena littoralis*, en particular, se utiliza en América Central y del Sur para tratar diarrea y otros trastornos gastrointestinales (Castro-Gamboa & Castro, 2004). En Colombia se emplean decocciones de hojas y tallos de *Verbena littoralis* para tratar estados febriles y gripales (Cadena-González et al., 2013).

En el Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales incluye en los usos tradicionales el tratamiento de la malaria y de la fiebre; reporta además que según Blair y colaboradores (2005), el extracto acuoso de ramas y flores de *Verbena littoralis* fue inactivo en el ensayo de actividad antiplasmodial *in vitro*, frente a *P. falciparum* (Ministerio de la protección Social, 2008).

Diferentes grupos étnicos en América del Sur han utilizado remedios tradicionales con *V. littoralis* para el tratamiento de la malaria. En Perú, los indígenas Loreto, Yanayacu y Chazuta de la Amazonía peruana utilizan decocciones de hojas, estos remedios fueron evaluados en modelos *in vitro* de *P. falciparum* resistente a cloroquina y mostraron una

actividad antiplasmodial prometedora (Céline et al., 2009; Kvist et al., 2006; Ruiz et al., 2011; Sanz-Biset et al., 2009).

2.3.4 *Curarea toxicifera* (Mido.) Barneby & Krukoff

La familia Menispermaceae se encuentra distribuida en la zona tropical a nivel mundial, tiene 70 géneros y 420 especies. 17 géneros están distribuidos en centro y sur América, en los bosques tropicales de las tierras bajas de Venezuela y de la Amazonia de Bolivia, Ecuador, Perú y Colombia. Las distintas especies de la familia Menispermaceae son enredaderas leñosas como lianas trepadoras, arbustos o árboles pequeños. Las plantas de la familia Menispermaceae se caracterizan por la presencia de alcaloides, especialmente del tipo bisbencilisoquinolinico. Estas plantas presentan diversas actividades farmacológicas que ha sido reportadas en la medicina tradicional china, sistema de medicina ayurvédica y en comunidades indígenas en sur América (Hao et al., 2015; Menachery, 1996).

En la familia Menispermaceae, subfamilia Triclisieae, se encuentra el género *Curarea*, en el cual todas las especies son lianas, algunas suspendidas de árboles que alcanzan una altura de 10 m o suelen ser terrestres en bosques de poca iluminación. *C. toxicifera* presenta un tronco de al menos 20 metros con lianas de 2 a 3 cm de grosor y entre 8 cm y 10 cm de ancho (Figura 2-7 A). Las lianas presentan anillos parciales, concéntricos a débilmente excéntricos (Figura 2-7 B) (Ortiz, 2018).

Figura 2-7: A. Liana de *Curarea toxicifera* (Mido.) Barneby & Krukoff - Amazonía colombiana. B. Anillos parciales, liana de *C. toxicifera* (corte transversal).



Las especies del género *Curarea* se ubican en bosques húmedos de América tropical, desde el este de Brasil hasta Costa Rica en América Central. Entre las especies reportadas se encuentran: *C. candicans*, *C. cuatrecasasii*, *C. tecunarium* y *C. toxicofera*. Para *Curarea toxicofera* los alcaloides bisbencilisoquinolínicos reportados son: (-)-tubocurarina, (-)-curina, (+)-isochondodendrina y (-)-toxicoferina (Mezcla 1:1 de (-)-curina y (-)-tubocurina) (Menachery, 1996; Thornber, 1970; Hao et al., 2015; Ortiz, 2018).

Las lianas de *Curarea toxicofera* son empleadas en la preparación del curare por indígenas Yaguas y Orijones de la Amazonia, en Perú, Brasil, Colombia y Ecuador (Ortiz, 2018). El remedio obtenido a partir de lianas del género *Curarea* se utilizan para el tratamiento de la gripe, tos y enfermedades parasitarias en las comunidades indígenas de la región Amazónica de Brasil, Colombia y Perú. En la comunidad indígena de Loreto, en Perú, se emplean preparaciones de *C. tecunarium* en el tratamiento de la malaria, la evaluación del extracto etanólico de esta planta evidenció actividad antiplasmodial con una $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$. *Chondrodendron platiphyllum* es reportado en la farmacopea brasileña para el tratamiento de la fiebre, síntoma de malaria (Brandão et al., 2008; Kvist et al., 2006; Manzali de Sá & Elisabetsky, 2012; Valadeau et al., 2010). Las comunidades de la región amazónica (Brasil-Colombia-Ecuador-Perú) utilizan *C. toxicofera* en el tratamiento de resfriados y parásitos intestinales (Valadeau et al., 2010).

En la Amazonia Colombiana, la comunidad indígena Ziora Amena, prepara un remedio a partir de lianas de *C. toxicofera* que es empleado en el tratamiento de la malaria. (Cárdenas Cuadros, 2011). En el grupo de investigación FAMETRA se han realizado diversas investigaciones sobre este remedio antimalárico. Se realizó la comparación de la actividad antimalárica *in vitro* del remedio ($CI_{50} = 6.6 \mu\text{g/mL}$) y extractos acuosos obtenidos en el laboratorio por dos métodos de extracción: percolación ($CI_{50} = 1.9 \mu\text{g/mL}$) y destilación por reflujo ($CI_{50} = 1.9 \mu\text{g/mL}$), se observó que las tres preparaciones presentaron una actividad de buena a moderada ($CI_{50} = 1.1 - 10 \mu\text{g/mL}$) de acuerdo a los criterios de RITAM (Rodríguez et al., 2020). Además, el remedio empleado por la comunidad indígena Ziora Amena fue evaluado en otra investigación en la cual se reportó su actividad antiplasmodial ($IC_{50} = 7.3 \mu\text{g/mL}$) y su actividad antimalárica *in vivo* ($DE_{50} = 328 \text{ mg/Kg}$). Complementado este trabajo se valoró la interacción de la combinación del remedio con fármacos empleados para el tratamiento de la enfermedad en las regiones endémicas. La combinación entre el remedio y cloroquina, en el ensayo *in vitro*, presentó un índice de

58 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

combinación de 0.390, que confirma el efecto sinérgico entre el remedio empleado por la comunidad y el fármaco: En el ensayo *in vivo* se apreció el mismo comportamiento. Empleando la combinación de artesunato y el remedio, el comportamiento fue aditivo *in vitro* (índice de combinación: 0.94) e *in vivo* (Rodríguez et al., 2018)

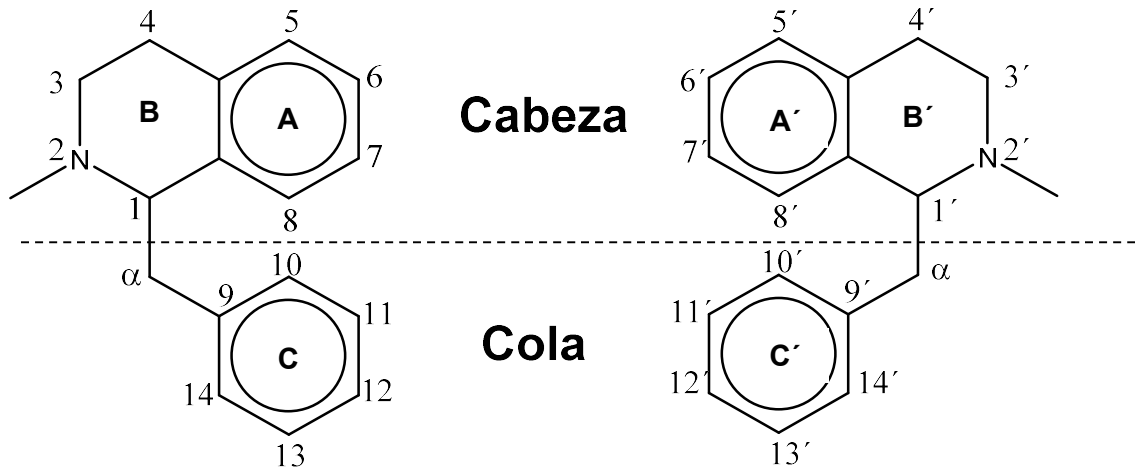
2.4 ALCALOIDES BISBENCILISOQUINOLINICOS (BBIQS)

Los alcaloides bisbencilisoquinolínicos (BBIQS) se encuentran en plantas de las familias: Menispermaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Ranunculaceae, Annonaceae, Hernandiaceae, Magnoliaceae y Nymphaeaceae, las cuales se localizan en regiones tropicales y subtropicales. A partir de estas plantas se obtienen preparaciones tradicionales empleadas por siglos en la medicina tradicional de África Sub-Sahara, India, China, Sur este asiático y Sur América. Se han reportado cerca de 500 alcaloides, dímeros bencilisoquinolínicos, que incluyen alcaloides BBIQS (Weber & Opatz, 2019; Xian-Kai et al., 1993).

Los alcaloides BBIQS hacen parte de la familia de alcaloides isoquinolínicos. Estos alcaloides se caracterizan estructuralmente por presentar dos núcleos de bencilisoquinolina unidos por uno, dos o tres enlaces éter (difencil éter, bencil fenil éter o bifenilo), también se encuentran enlaces bifenilo carbono-carbono directos y enlaces metilenoexi. En la unidad isoquinolínica se pueden considerar dos partes: la “cabeza” que corresponde a la porción de isoquinolina y la “cola” es la porción de bencilo (Figura 2-8) (Schiff, 1985; Weber & Opatz, 2019; Xian-Kai et al., 1993).

Los diferentes tipos de alcaloides BBIQS se establecen según su patrón de oxigenación, así como en el número de enlace éter (uno, dos o tres), tipo de enlace éter (difencil éter, bencil fenil éter o bifenilo), la orientación entre la unión de las dos unidades isoquinolínicas monoméricas (cola con cola, cabeza con cabeza, cabeza con cola y cabeza a cabeza más cola a cola) y los sitios de las dos unidades BI (bencil isoquinolínica) en los que se origina el enlace éter o el enlace carbono-carbono. Los miembros individuales de cada grupo difieren simplemente en la naturaleza de los sustituyentes oxigenados (-OH, -OMe, OCH₂O), la naturaleza de la sustitución de los dos átomos de nitrógeno (NH, XMe, N~Me₂, NO) (Guha et al., 1979; Schiff, 1985).

Figura 2-8: Estructura unidad isoquinolinica: isoquinolina “cabeza” y bencilo “cola”.



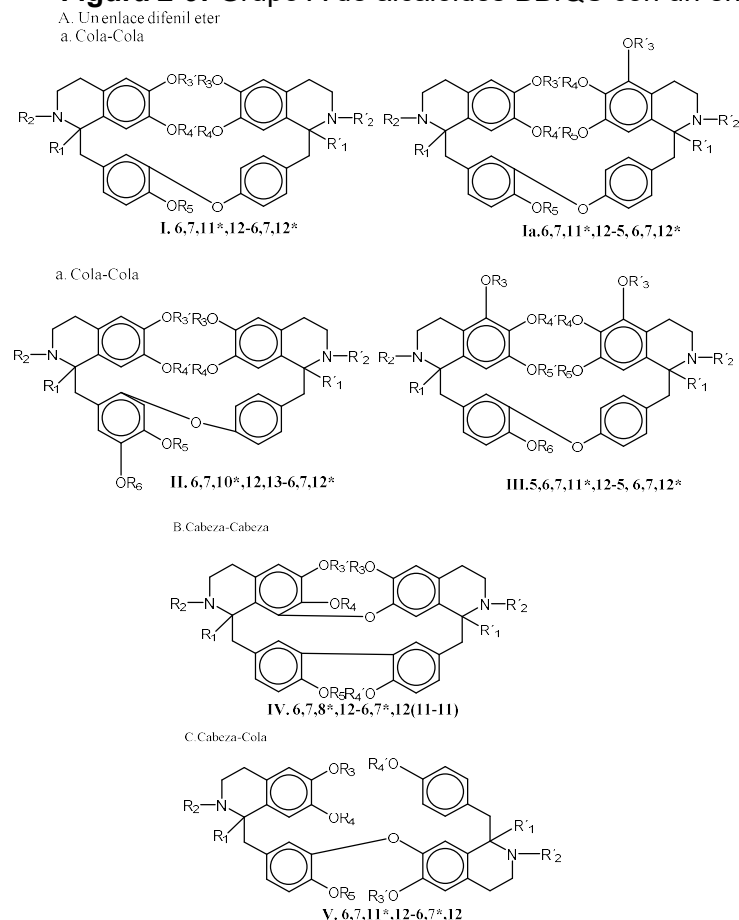
Fuente: Schiff, 1985; Weber & Opatz, 2019; Xian-Kai et al., 1993

Para ubicar las posiciones de los enlaces éter y sustituyentes en los anillos se consideran las posiciones como se muestran en la Figura 2-8. Todas las posiciones oxigenadas se enumeran para ambos monómeros por separado, iniciando con el monómero ubicado a la izquierda. Se numera primero de forma ascendente el patrón de oxigenación de los sustituyentes que se encuentran en los anillos (A-B), el cual está ubicado por encima del anillo aromático (C) y presenta las posiciones más bajas. Si los anillos C de ambos hemisferios tienen el mismo número de sitios oxigenados, se da prioridad a la unidad de bencilisoquinolina, con el mayor recuento total de sustituyentes de oxígeno (Guha et al., 1979; Schiff, 1985).

Los conjuntos de sustituciones para cada unidad isoquinolinica están separados por un guion. Las posiciones de los carbonos que hacen parte de los enlaces diaril éter se indican en la descripción. A modo de ejemplo, en la Figura 2-9 BBIQS del grupo A, los cuales comparten un enlace difenil éter. En la Tabla 2-3 se resumen los grupos y subgrupos de alcaloides BBIQS (Weber & Opatz, 2019).

60 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Figura 2-9: Grupo A de alcaloides BBIQS con un enlace difenil éter.



Fuente: (Guha et al., 1979)

Tabla 2-3: Clasificación de los alcaloides BBIQS, tipos y conexiones.

Tipo	Conexión	Tipo	Conexión
Un enlace difenil éter (cola-cola)			
I	6,7,11*,12-6,7,12*	Ila	6,7,10*,12,13-6,7,11,12*
Ia	*6,7,11*,12-5,6,7,12	IIb	6,7,10*,11,12-6,7,11,12*
Ib	6,7,10,11*,12-6,7,12*	III	5,6,7,11*,12-5,6,7,12*
II	6,7,10*,12,13-6,7,12*		
Un enlace difenil éter (cabeza-cola)			
V	6,7,11*,12-6,7*,12	Vc	6,7,10,12*-6,7*,12
Va	6,7,10*,12,13-6,7*,11,12	Vd	6,7*,8,12-6,7,12*
Vb	6,7,10*,11,12,13-6,7*,11,12		
Un enlace difenil éter (cabeza-cabeza) y un enlace difenil éter (cola-cola)			
VI	6,7*,11+,12-6,7,8*,12+	XII	6,7,8*,11+,12-5*,6,7,12+
VIa	6,7*,10,11+,12-6,7,8*,12+	XIIa	5,6,7,8*,11+,12-5*,6,7,12+
VII	6,7*,11+,12-5,6,7,8*,12+	XIII	5*,6,7,11+12-5,6,7,8*,12+
VIII	6,7,8*,11+,12-6,7*,12+	XIV	6,7*,11,12+-5*,6,7,12+

Tabla 2-3: (Continuación)

Tipo	Conexión	Tipo	Conexión
<i>Un enlace difenil éter (cabeza-cabeza) y un enlace difenil éter (cola-cola)</i>			
IX	5,6,7,8*,11+,12-6,7*,12+	XIVa	5,6,7*,11+,12-5*,6,7,12+
X	6,7,8*,11+,12,13-6,7*,12+	XV	5*,6,7,11+,12-6,7*,12+
Xa	6,7,8*,10,11+,12-6,7*,12+	XVI	5*,6,7,11+,12-6*,7,12+
Xb	6,7*,8,10,11+,12-6,7*,12+	XVII	5,6,7,8*,10,12,13+-6,7*,12+
XI	6,7,8*,11+,12-6*,7,12+		
<i>Un enlace difenil éter (cabeza-cabeza) y un enlace difenil (cola-cola)</i>			
IV	6,7,8*,12-6,7*,12(11-11)		
<i>Dos enlaces difenil éter (cabeza-cabeza) y un enlace difenil éter (cola-cola)</i>			
XXIII	6*,7+,11#,12-6,7*,8+,12#	XXIV	6,7*,8+,11#,12-6,7*,8+,12#
XXIIIa	6*,7+,11#,12-5,6,7*,8+,12#	XXVIII	6,7*,8+,11#,12-6*,7+,12#
XXIIIb	6*,7+,10,11#,12-6,7*,8+,12#		
<i>Dos enlaces difenil éter (cabeza-cabeza) y un enlace difenil (cola-cola)</i>			
XVIII	6,7*,8+,12-6*,7+,12(11-11)	XIXa	5,7*,8+,12-6*,7+,12(11-11)
XIX	5,6,7*,8+,12-6*,7+,12(11-11)	XIXb	6*,7+,12,13-5,6,7*,8+,12 (11-11)
<i>Un enlace difenil (cola-cola) Un enlace difenil (cabeza-cabeza)</i>			
XXVII	6,7,12-6,7,12(11-11)	XXXI	6,7,12-6,7,12(8-11)
<i>Dos enlaces difenil éter (cabeza-cola)</i>			
XX	6,7,8*,12+-6,7,8+,12*	XXI	6,7,8*,11+,12-6,7+,12*
<i>Un enlace difenil éter (cabeza-cola) y un enlace bencil fenil éter (cabeza-cola)</i>			
XXII	6,7,8,12*-6,7,8*[7-12]		XXIIa 6,7,8,11*,12-6,7*[7-12]
<i>un enlace difenil éter, un enlace bencil fenil éter (cabeza-cabeza) y un enlace difenil éter (cola-cola)</i>			
XXV	6,7,8*,11+,12,13-6,7*,12+[8-6]		
<i>un enlace difenil éter, un enlace bencil fenil éter (cabeza-cola) y un enlace difenil éter (cabeza-cola)</i>			
XXVI	6,7,8*,12+-6,7,8+,12*[11-7]	XXX	6,7,8*,11+,12-6,7+,12* [7-11]

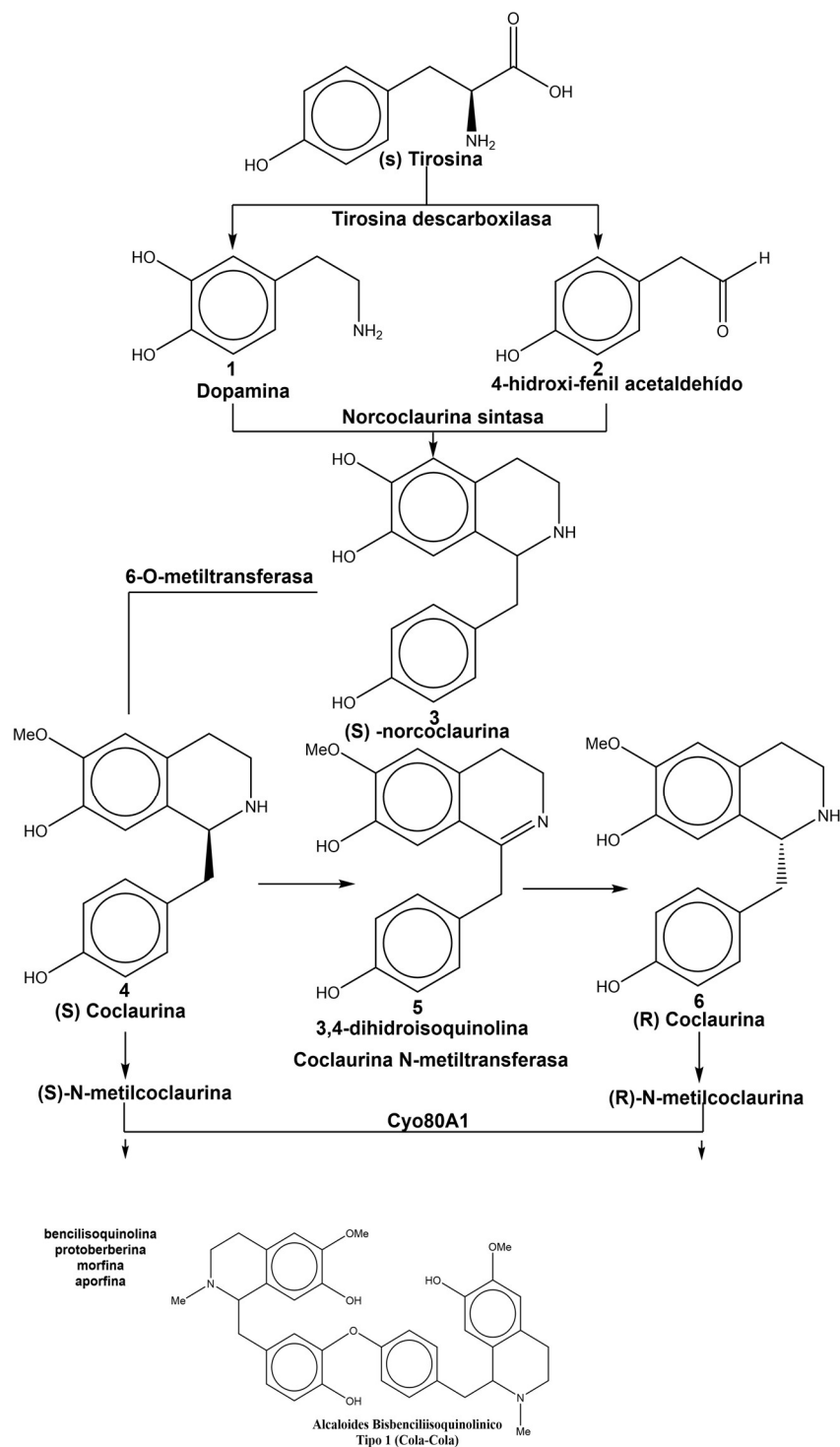
Conexión: se identifica con un asterisco los carbonos de las unidades isoquinolinicas que se enlazan mediante el enlace éter.

Fuente: Weber & Opatz, 2019

Desde otro punto de vista, los alcaloides bencilisoquinolínicos se pueden dividir en dos grupos: Bencil-tetrahydro-isoquinoleinicos (BTHIQ) y Bisbencil-tetrahydro-isoquinoleinicos (BBTHIQ), estos alcaloides, en su biosíntesis tienen como precursor el aminoácido L-tirosina. Cada molécula de bisbencil-tetrahydro-isoquinoleina está formada de cuatro unidades de L-tirosina (Figura 2-10).

62 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

Figura 2-10: Biosíntesis de alcaloides BBIQS. (Weber & Opatz, 2019).



El aminoácido L-tirosina por acción de la tirosina descarboxilasa genera dopamina (1) y 4-hidroxi-fenil acetaldehído (2). Posteriormente la enzima norcoclaurina sintasa cataliza la

síntesis de las unidades 1 y 2 para forma (*S*) norcoclaurina (3) que es metilada en uno de sus grupos OH por la enzima 6-O-metiltransferasa generando la (*S*) coclaurina (4). En reacciones sucesivas, la (*S*) coclaurina puede generar la sustancia 3,4-dihidroisoquinolina (5) intermediario del enantiómero (*R*)-coclaurina (6). Ambos enantiómeros son sustratos de la enzima coclaurina N-metiltransferasa para obtener (*S*)-N-metilcoclaurina o (*R*)-N-metilcoclaurina. Cuando se sintetiza la (*S*)-N-metilcoclaurina da origen a los alcaloides del tipo: bencilisoquinolina, protoberberina, morfina y aporfina. Para la formación de alcaloides bisbencil-tetrahidro-isoquinoleínicos tipo I, dos unidades de N-metilcoclaurina se enlazan por sus restos bencílicos, de forma oxidativa empleando la enzima oxidasa Cyp80A1 (Figura 2-10) (Weber & Opatz, 2019; De-La-Cruz Chacón et al., 2012).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

3.1.1 Equipos

Los equipos empleados para el desarrollo experimental en los ensayos fitoquímicos fueron: estufa de aire circulante (sin marca), estufa de secado al vacío Fisher Isotemp Vacuum Oven modelo 281, molino de cuchillas (sin marca), balanza analítica marca Pioneer OHAUS, capacidad 210 g, sensibilidad 0.0001, balanza de plato externo, marca Pioneer OHAUS, capacidad 3100 g. sensibilidad 0.01 g, rotavapor Büchi R-114, R-110, cámara de luz ultravioleta.UVP CHROMATO-VUE C-706, equipo para obtención de agua Milli-Q, Millipore, baño de ultrasonido Elma, E 60 H Elmasonic, ultracentrífuga Eppendorf Centrifuge 5702 R, 4400 rpm.

Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, Shimadzu 1200 con arreglo de diodos en fase reversa, inyector automático, detector UV/DAD, bomba binaria. Equipo de cromatografía líquida ultraeficiente, Acquity System con arreglo de diodos en fase reversa, inyector automático detector UV/DAD, bomba cuaternaria. Equipo Cromatógrafo líquido ultraeficiente Waters ACQUITY® TQD con analizador cuadrupolo, inyector automático detector UV/DAD. Bomba cuaternaria. Espectrómetro Bruker Avance 400, sonda de 5 mm. Departamento de Química de Universidad Nacional-Sede Bogotá. Equipo de resonancia magnética nuclear Bruker Avance DRX 400 NMR, Departamento de Química de ICEX-UFMG. Los espectros se obtuvieron con una frecuencia de resonancia de 400.13 y gradiente shim Z.

Los equipos para el desarrollo de ensayos biológicos fueron: cabina de flujo laminar Labconco, bioseguridad II (ATCC, 2005), bomba de vacío Büchi, microscopio Olympus, centrífuga Jouan MR-1812, baño de agua termostataado Memmert, autoclave All American, incubadora Jouan IG 150, lector de placa Twinkle LB 90. BERTHOLD Technologies. Equipo espectrofotómetro (Infinite M200Pro - TECAN).

3.1.2 Reactivos y solventes

A continuación, se mencionan los solventes y reactivos empleados en el desarrollo experimental para ensayos fitoquímicos: Solventes R.A: ácido fórmico, Hidróxido de amonio, ácido clorhídrico, metanol, metanol-*d*4, DMSO-*d*6, acetato de etilo, diclorometano, acetona, tolueno, dietilamina, butanol, cloroformo y n-hexano. Solventes CLAE: metanol, acetonitrilo y agua. Reactivos R.A: fosfato de sodio dibásico, sulfato de sodio, cloruro férrico, magnesio, ácido difenilbórico aminoetilester, vainillina, ácido sulfúrico, ácido acético glacial, ácido fórmico, ácido orto-fosfórico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico. Se emplearon solventes y reactivos de las marcas Merck, Sigma y Aldrich. Excipientes grado farmacéutico: etanol 96%, glicerina y polietilenglicol 4000.

Para el desarrollo de los ensayos biológicos se emplearon los solventes R.A y reactivos: ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, dimetilsulfóxido y glicerina. medio RPMI 1640 suplementado con HEPES, hipoxantina, fosfato dibásico de sodio, glucosa, sorbitol, bicarbonato de sodio, glicerina, propilenglicol difosfato de cloroquina, colorante Giemsa, y fosfato de potasio monobásico, Triton X-100, L-lactato de sodio, Tris, dinucleótido de 3-acetilpiridina adenina, cloruro de nitroblue tetrazolium, etosulfato de fenazina, bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, SYBR Green I (INVITROGEN), suero fetal bovino, suero humano, glóbulos rojos del grupo O+, agua desionizada, aceite de inmersión. Se emplearon solventes y reactivos de las marcas Merck, Sigma y Aldrich. El suero humano y los glóbulos rojos fueron suministrados por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS).

Los reactivos biológicos empleados fueron: ratones hembra mantenidos en el Bioterio del Departamento de Farmacia bajo fotoperiodo de ciclos 12 horas luz/12 horas oscuridad, temperatura y humedad controladas, alimento y agua a libre demanda. Se emplearon microorganismos como: *P. falciparum* cepa FCB-2 (resistente a cloroquina), *P. falciparum*

66 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

W2 (resistente a cloroquina), *P. berghei* (cepa ANKA obtenida del Instituto de Inmunología de la Universidad del Valle, San Fernando), Células HepG2 A16.

Los compuestos de referencia fueron de las marcas Merck, Sigma y Aldrich: tetrandrina, ácido clorogénico, ácido protocatéquico, catequina, epicatequina, cloroquina difosfato. Lupeol, β -sitosterol, rutina y quercetina fueron purificados previamente en el grupo de investigación Principios Bioactivos en Plantas Medicinales.

3.1.3 Materiales

El material empleado para los ensayos fitoquímicos fue: percoladores de vidrio, embudos de decantación en vidrio, columnas de vidrio con llave de teflón, aspersores, cromatoplasmas en aluminio de sílica gel 60 GF254 (Merck®), cámaras para cromatografía en capa delgada, capilares de vidrio, papel indicador de pH, aspersor, frascos Eppendorf®, tamices VWR/USA standard testing #20, #30, #40, #60 y #80, ultrasonidos y material de vidrio de uso común en el laboratorio.

En los ensayos biológicos el material empleado fue: portafiltras, membranas de filtración de 0.45 y 0.22 μm , pipetas serológicas, placas de cultivo de 96 pozos, pipetas Pasteur de vidrio, viales de 2 mL, micropipetas (100-1000, 2-20 μL), micropipetas multicanal (20-200 μL), puntas para micropipeta, láminas porta-objeto, matraces de cultivo de 25 mL (Corning Costar Corporation, EE. UU®), cánulas para administración oral de ratones, instrumental quirúrgico, malla de prueba, material de uso común en el laboratorio. Previamente se esterilizó el material que se empleó en el cultivo.

El material empleado en la cromatografía líquida de alta eficiencia fue: Columna FR-18 (Merck, Lichrospher, 250 x 4, tamaño de partícula, 10 μm), precolumna RP-18 (Merck, Lichrospher, 4 x 4, tamaño de partícula, 10 μm), sistema de filtración Millipore, viales para CLAE con insertos y membranas de 0.45 μm .

3.2 MATERIAL VEGETAL

3.2.1 Selección de la especie para profundización de los estudios fitoquímicos y farmacológicos

A partir del análisis crítico de la información bibliográfica y de resultados previos del grupo de investigación FaMeTra “Farmacología de medicina tradicional y popular”, además de ensayos preliminares realizados, bajo un criterio etnofarmacológico se preseleccionaron las siguientes especies vegetales y partes de las mismas a ser estudiadas: *Cecropia metensis* (hojas), *Cecropia membranacea* (hojas), *Verbena littoralis* (partes aéreas), *Ambelania duckey* (bejuco) y *Curarea toxicofera* (bejuco).

3.2.2 Recolección e identificación del material vegetal de las cinco especies preseleccionadas

Se adelantó la colecta del material vegetal en diferentes lugares de Colombia (Tabla 3-1). Las hojas de *Cecropia metensis* Cuatrec (COL 581255) y de *Cecropia membranacea* Trécul (COL 581253) se recolectaron en el departamento del Meta. Las partes aéreas de *Verbena littoralis* Kunth (COL 581259) se colectaron en Cundinamarca. Los tallos (bejucos) de *Ambelania duckey* Mark (COL 570483) y *Curarea toxicofera* (Mido) Barneby & Krukoff (COL 591178) se colectaron en el departamento de Amazonas. Los ejemplares correspondientes a cada especie se encuentran depositados en el Herbario Nacional Colombiano, donde fueron realizadas las respectivas determinaciones taxonómicas. Todas las especies fueron colectadas en la época seca y *C. toxicofera* fue colectada adicionalmente en la época lluviosa.

Este proyecto se encuentra soportado por el contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados: *Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible / Universidad Nacional de Colombia, Contrato N° 161/2017, Resolución 0006/2018 (Anexo A).*

68 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Tabla 3-1: Información correspondiente a la localización del material vegetal colectado.

Nombre de la especie vegetal	Localización (Coordenadas)	Lugar de colecta	Fecha de colecta	Altitud
<i>Ambelania duckey</i> Mark	S 4°07.635'' W 069°55.195''	Amazonas: Leticia, Km 7	17-04-2016	115 msnm
<i>Cecropia membranacea</i> Trecul	N 4°04'01'' W 73°31'48''	Meta: Vía Puerto López – Villavicencio. Entrada vereda la Vigía.	24-03-2014	365 msnm
<i>Cecropia metensis</i> Cuatrec	N 4°03'30'' W 73°03'18''	Meta: Carretera Puerto López – Puerto Gaitán. Municipio Puerto López	24-03-2014	365 msnm
<i>Curarea toxicofera</i> (Wedd.) Barneby & Krukoff	S 04°08'2.92'' W 069°55'167''	Amazonas: Leticia, Km 7	17-04-2016	100 msnm
<i>Verbena littoralis</i> Kunth	N 4°19'49''N W 73° 51' 46''	Cundinamarca: Quetame-Vereda Centro	12-10-2014	1495 msnm

3.2.3 Acondicionamiento del material vegetal de las cinco especies preseleccionadas

El acondicionamiento contempló las etapas de selección, secado y molienda del material vegetal. Los diferentes órganos que constituyen el material vegetal de partida fueron seleccionados, retirándose material en mal estado o extraño (otras plantas, otros órganos vegetativos, restos de suelo, insectos, etc.), posteriormente el material vegetal se secó en el horno de aire circulante, utilizando temperaturas entre 45-50 °C, por 48 a 72 horas, hasta consistencia quebradiza. Posteriormente, se redujo el tamaño de partícula empleando el método de cortado, mediante el uso de una licuadora semi-industrial. El material vegetal obtenido fue almacenado en frascos de vidrio ámbar, protegido de la humedad.

Para *C. toxicofera* se realizó un ensayo preliminar de secado del material vegetal (lianas) empleando 163.5 g a temperatura de 50°C. A este material se le realizó un seguimiento cada 24 horas, durante 96 horas. A partir de esta información, se estableció que el tiempo de secado para tener un peso constante fue de 72 horas. Se consideró una pérdida por secado inferior a 10%, para evitar la proliferación de microorganismos y favorecer la inactivación de enzimas, para así preservar los metabolitos secundarios (Sharapin N, Pinzón RS, et al., 2000).

3.3 METODOLOGÍA – ENSAYOS FITOQUÍMICOS

3.3.1 Elaboración y caracterización de extractos de las cinco plantas preseleccionadas

Elaboración de los extractos etanólicos

Inicialmente, el material seco se dejó en contacto con el solvente durante 24 horas para humedecer la muestra e iniciar el proceso de extracción. Se elaboraron extractos etanólicos (etanol 96%) mediante percolación discontinua, hasta agotamiento del material vegetal, evidenciado por CCD. El agotamiento de la muestra se controló evaluando compuestos esteroidales para *A. duckey*, *C. membranacea*, *C. metensis* y *V. littoralis*, utilizando como fase móvil acetato de etilo: hexano (2:8), con revelador de vainillina en ácido ortofosfórico. Para *C. toxicofera*, se detectó la presencia de alcaloides, utilizando una fase móvil de metanol: cloroformo: hidróxido de amonio (95:5:0.1), como revelador se utilizó el reactivo de Dragendorff para CCD.

Las soluciones obtenidas fueron concentradas en rotaevaporador a temperatura inferior a 50°C. El extracto obtenido se llevó a sequedad a baño de maría (40°C), posteriormente se utilizó una estufa de secado al vacío para eliminar restos de solvente y humedad, la temperatura empleada fue de 40°C por 24 horas. La cantidad de material vegetal molido de partida, el volumen de solvente utilizada y la relación droga-solvente, así como la cantidad de extracto seco obtenido, se presentan en la Tabla 3-2.

70 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Tabla 3-2: Condiciones extractivas y rendimiento de extracción.

Nombre de la especie vegetal	Material vegetal molido (g)	Solvente (mL)	Relación material molido-Solvente
<i>Ambelania duckey</i> Mark	150.9	1750	1:12
<i>Cecropia membranacea</i> Trécul	452.9	5000	1:11
<i>Cecropia metensis</i> Cuatrec	452.9	5000	1:11
<i>Curarea toxicofera</i> (Wedd.) Barneby & Krukoff	150.2	1700	1:11
<i>Verbena littoralis</i> Kunth	452.9	5700	1:13

Percolación discontinua. Solvente: Etanol 96%.

Caracterización fitoquímica preliminar de los extractos etanólicos mediante CCD y pruebas de tubo

La caracterización fitoquímica preliminar de los extractos etanólicos se realizó mediante cromatografía en capa delgada (CCD) y pruebas de tubo. Se utilizaron cromatofolios de aluminio, revestidos con silica gel con indicador de fluorescencia F₂₅₄ como fase estacionaria. Las fases móviles y los agentes derivatizantes se seleccionaron basándose en la clase de metabolitos secundarios. Además, se utilizaron pruebas de coloración y precipitación (Anexo B). La cantidad reducida o abundante en las pruebas de precipitación se identifica como (+) y la ausencia de precipitado se indica como (-). La determinación de presencia (+) o ausencia (-) en placas de CCD se evidenció por la aparición de manchas con colores asociados a metabolitos secundarios. Todas las pruebas se realizaron en paralelo para cada uno de los extractos etanólicos de las diferentes plantas. Se utilizaron como patrones de referencia sustancias aisladas y purificadas en trabajos anteriores.

Caracterización fitoquímica preliminar de extractos etanólicos por CLAE-DAD

Para el análisis de los perfiles cromatográficos por CLAE-DAD de los extractos etanólicos de *C. toxicofera*, *A. duckey*, *C. membranacea*, *C. metensis* y *V. littoralis*, se utilizó un equipo

Shimadzu 1200 con un inyector automático, bomba binaria y detector UV-DAD. Las condiciones cromatográficas que se utilizaron se muestra en el Sistema 1 (Hernández & Luengas, 2013)

Sistema 1

- Columna: Lichrospher® RP-18 (250 mm × 4 mm, 10 µm).
- Flujo 1mL/min
- Volumen de inyección 10 µL
- temperatura, 25 °C
- Detector ultravioleta con arreglo de diodos (UV-DAD)
- Longitudes de onda: 210, 220, 254, 280, 350 nm
- Tiempo: 86 min
- Fase móvil: Acetonitrilo (ACN)-Agua
- Programa de gradiente:

Tiempo (min)	0	1	61	71	76	86
% ACN	5	5	95	95	5	5

Los ensayos se realizaron inicialmente con extractos disueltos en metanol a una concentración de 10 mg/mL, donde los perfiles de CLAE-DAD mostraron picos con bajas alturas y áreas. Finalmente, las muestras de cada extracto seco se prepararon en metanol a una concentración de 20 mg/mL. Se utilizaron estándares de ácido clorogénico, ácido protocatéquico, catequina, epicatequina, lupeol, β-sitosterol y tetrandrina.

Caracterización fitoquímica preliminar de extractos etanólicos por ¹H-RMN

En la preparación de las muestras para ¹H-RMN se disolvieron 20 mg de cada uno de los extractos secos en 500 µL de metanol-*d*₄; posteriormente las soluciones fueron transferidas por separado a tubos de RMN de 5 mm. Los espectros de ¹H-RMN se calibraron utilizando la señal de metanol-*d*₄ 3.8 ppm.

3.3.2 Ensayos químicos y generales para *Curarea toxicofera*

Para la droga molida (lianas) de *C. toxicofera* colectada en invierno-ecológico se realizó la determinación de la distribución del tamaño de partícula, empleando el método de retención por tamices. Se emplearon 427.4 g del material vegetal molido, el cual se pasó por el conjunto de tamices de número 20, 30, 40, 60 y 80, los cuales presentan una abertura nominal de 850, 500, 425, 250 y 180 µm, respectivamente. El tiempo de vibración fueron

72 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

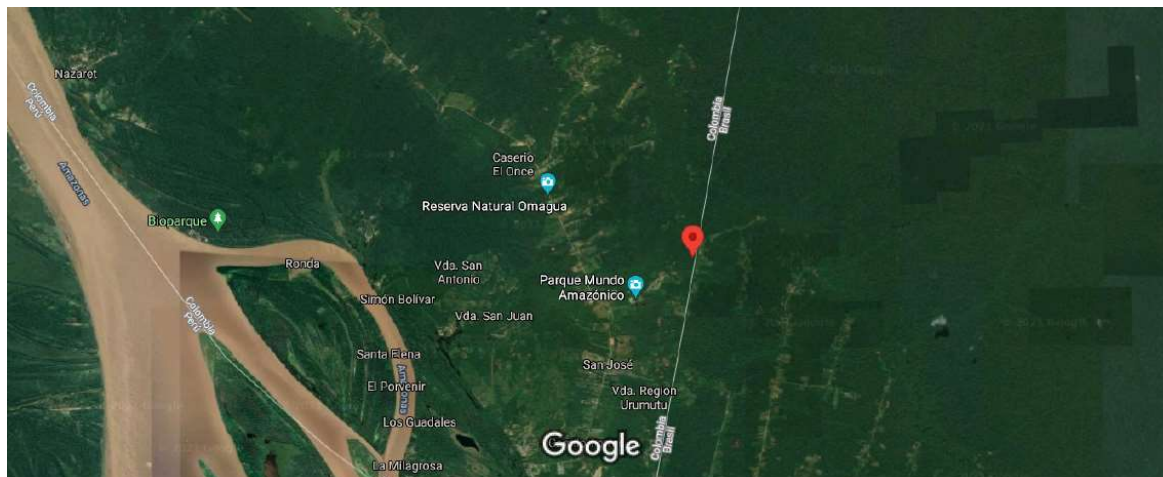
10 minutos. Se estableció el tamaño de partícula de acuerdo con lo descrito en las guías de la OMS. Para la elaboración del extracto etanólico se utilizó el material vegetal retenido entre los tamices 40 y 60 (aproximadamente, moderadamente grueso) (WHO, 2011).

3.3.3 Variación química y de actividad antiplasmodial del extracto etanólico de *C. toxicofera* colectada en época seca y lluviosa

Para realizar el análisis de la variación química y actividad antiplasmodial del extracto etanólico de *C. toxicofera*, el material vegetal que consistió en lianas de *C. toxicofera* fueron colectadas en diferente época del año, una que corresponde a verano-ecológico (noviembre a febrero) cuya temperatura oscila entre 26.5°C-27.1°C y precipitaciones de 280 milímetros aproximadamente y la otra en el invierno-ecológico (abril a junio) en el cual la temperatura que se presenta es 26.0°C-26.1°C y precipitaciones de 340 milímetros aproximadamente (CorpoAmazonia, 2022; IDEAM, 2022).

El lugar de colecta, para ambas épocas, se encuentra entre 90 y 100 m.s.n.m, Las coordenadas específicas determinadas con GPS Garmin Etrex vista® fueron 04°08'2.92" Sur y 069°55'167" Occidente. El mapa del lugar de colecta se observa en la Figura 3-1.

Figura 3-1: Mapa de ubicación de colecta en dos épocas del año.



Fuente Google Maps (Google Maps, 2021).

Se evaluó la presencia de alcaloides por CCD, como parte de la caracterización de los extractos etanólicos de *C. toxicofera* obtenidos del material vegetal colectado en invierno y verano ecológicos. Se aplicaron 5µL, 10µL y 15µL de una solución 20 mg/mL del extracto etanólico seco disuelto en metanol. Se empleó como fase móvil una mezcla de metanol-tolueno-acetato de etilo-dietilamina (4.0-0.5-9.0-0.5) Se finalizó con una derivatización con reactivo de Dragendorff para CCD. Además, se realizaron perfiles cromatográficos por CLAE-DAD, empleando las condiciones cromatográficas mencionadas en el apartado 3.3.1 (perfiles fitoquímicos de extractos etanólicos por CLAE-DAD), las longitudes de onda utilizadas fueron 210 y 280 nm.

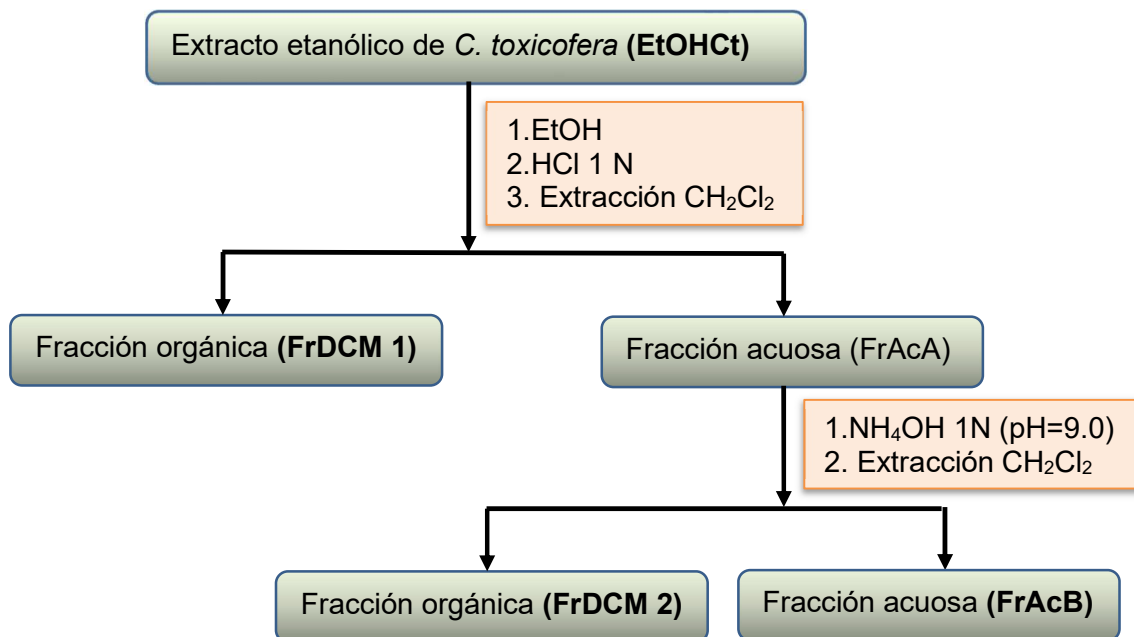
En cuanto a la metodología biológica, que estaba orientada a evaluar la actividad antiplasmodial, se siguió lo reportado en el apartado 3.4.1 (evaluación de la actividad antimalárica *in vitro*).

3.3.4 Fraccionamiento ácido-base del extracto etanólico de *C. toxicofera*

El extracto etanólico de *C. toxicofera* fue fraccionado mediante el método ácido-base orientado a separar alcaloides (Figura 3-2). Diez gramos del extracto etanólico seco fueron re-disueltos en etanol 96% (2-3 mL). Posteriormente se adicionaron 20 a 30 mL de HCl 1N. La mezcla se llevó a un embudo de separación, se realizaron 10 particiones, cada una con 100 mL de diclorometano. Se reunieron las fases diclorometánicas, se secaron con Na₂SO₄, se concentraron en rotaevaporador y se llevaron a sequedad en baño maría, para dar origen a la fracción FrDCM1. Seguidamente la fase acuosa ácida (FrAcA) fue alcalinizada con NH₄OH 1N hasta pH=9, se llevó a un embudo de separación, se realizaron 10 particiones, cada una con 100 mL de diclorometano, las fases orgánicas diclorometánicas, se juntaron y secaron con Na₂SO₄, se concentraron en rotaevaporador y se llevaron a sequedad en baño maría con lo cual se obtuvo la fracción FrDCM2. Además, se obtiene una fracción acuosa básica (FrAcB). Las fracciones fueron conservadas en desecador y protegidas de la luz.

74 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Figura 3-2: Fraccionamiento ácido-base del extracto etanólico de *C. toxicofera*.



3.3.5 Perfiles cromatográficos por CCD, CLAE-DAD y CLUE-DAD de los extractos y fracciones *C. toxicofera*

Perfiles por CCD de las fracciones primarias de *C. toxicofera*

Se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel como fase estacionaria y diferentes fases móviles buscando hasta encontrar aquella en la que se lograra una buena separación de los componentes de cada fracción. Se seleccionó como fase móvil la mezcla metanol-tolueno-acetato de etilo-dietilamina (6.0-9.0-0.5-0.5). Teniendo como precedente que el fraccionamiento del extracto etanólico de *C. toxicofera* está orientado a obtener alcaloides, se realizó el seguimiento a cada fracción obtenida mediante CCD, empleando como revelador el reactivo de Dragendorff. Se aplicaron 40 µL de una solución 20 mg/mL en metanol. Como patrones se empleó una fracción alcaloidal del yagé y tetrandrina, este último es un alcaloide BBIQ. La presencia de alcaloides se corroboró por la aparición de manchas de color naranja, observables al visible.

Perfiles cromatográficos por CLAE DAD de *C. toxicofera*

Para la elaboración de los perfiles de las fracciones obtenidas se empleó el método de CLAE-DAD, para lo cual se utilizó un equipo Shimadzu 1200 con inyector automático, bomba binaria y detector UV-DAD, procesando a 220 nm. Se empleó una columna Lichrospher® RP-18 (250 mm x 4 mm, 10 µm). Flujo de 1 mL/min, volumen de inyección, 10 µL y temperatura 25 °C. Las muestras se prepararon a una concentración de 20 mg/mL en metanol; para favorecer su disolución, se colocaron en un baño de ultrasonido a 30°C, durante 15 minutos, finalmente se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm, justo antes de la inyección en el cromatógrafo. Se evaluaron 18 diferentes fases móviles para escoger la de mejor separación de picos en el perfil CLAE-DAD. La fase móvil elegida fue: A: fosfato de sodio dibásico 0.05 M + dietilamina al 0.1% pH = 8 y B: ACN, 50 minutos en modo isocrático 40 (A): 60 (B).

Perfiles cromatográficos por CLUE-DAD de *C. toxicofera*

Con el fin de complementar el estudio cromatográfico de las fracciones obtenidas, éstas se caracterizaron mediante cromatografía líquida ultraeficiente con arreglo de diodos, en fase reversa, estudios realizados bajo las condiciones establecidas en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Minas Gerais (Brasil). Para lo cual se empleó el equipo Acquity System acoplado a detector UV/DAD, columna utilizada fue Acquity UPLC BEH C18 (100X2.1 mm di 1.7 µm) y precolumna VanGuard C18 (2.1X5 mm, 1.7). El flujo empleado fue de 0.3 mL/min y el horno de columna se mantuvo a 40 ± 5 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 4 µL. La lectura se realizó a 280 nm, se generó un barrido espectral entre 200 a 600 nm. Se utilizó un gradiente lineal. Como fase móvil se utilizó agua grado CLAE la cual se acidificó con ácido fórmico al 0.1% (H₂O-HCOOH 0.1%), además se empleó acetonitrilo grado CLAE acidificado con ácido fórmico al 0.1% (ACN-HCOOH 0.1%). El gradiente cromatográfico utilizado comprendió un período de gradiente lineal (5-95% ACN de 0 a 24 min), luego se mantuvo un corto período de elución isocrática (95% ACN, 24 a 26 min), volviendo a la condición de gradiente inicial, 26 a 28 min (5% ACN). Las muestras fueron preparadas pesando en un tubo Eppendorf entre 1-2 mg de fracción, seguidamente se adicionó 1 mL de una mezcla agua-ácido fórmico al 1%. Las muestras fueron solubilizadas con ayuda de un ultrasonido (10 min) y posteriormente filtradas empleando filtros 0.22 µm.

3.3.6 Aislamiento y purificación de alcaloides BBIQS a partir de la fracción alcaloidal FrDCM 2

Fraccionamiento por cromatografía en columna (I) de la fracción alcaloidal FrDCM 2

La fracción alcaloidal (FrDCM 2) de *C. toxicofera* se sometió a cromatografía en columna abierta (18.7 mm X 400 mm). La cantidad de sílica gel 60 (230-400 mm) empleada fue de 50 g, la cual se suspendió en cloroformo. La columna se estabilizó durante 12 horas, antes de su uso. Se utilizaron 200 mg de la fracción. La fracción fue adsorbida en 1 g de sílica gel 60, antes de ser incorporada a la columna. La columna se eluyó usando una mezcla de cloroformo-metanol en gradiente y se colectaron fracciones de 25 mL. Las fracciones fueron monitoreadas por CCD, empleando Dragendorff para CCD, como revelador. Se obtuvieron 85 sub-fracciones que fueron reunidas en 31 grupos de subfracciones (Tabla 3-3). De acuerdo con el perfil cromatográfico por CLAE y al peso obtenido fueron escogidos 10 sub-fracciones (FrDCM 2-1, FrDCM 2-2, FrDCM 2-3, FrDCM 2-4, FrDCM 2-5, FrDCM 2-6, FrDCM 2-7, FrDCM 2-8, FrDCM 2-9 y FrDCM 2-10) para continuar su análisis por CLUE-DAD y CLUE-DAD-ESI-EM.

Fraccionamiento por cromatografía de columna (II) de la fracción alcaloidal FrDCM 2-5

Teniendo como criterios de selección: la detección de alcaloides por CCD empleando Dragendorff, la presencia en el cromatograma de picos de alta absorbancia con U.V característico para alcaloides BBIQS y la mayor cantidad de la subfracción, de los 10 grupos de sub-fracciones, se escogió la subfracción FrDCM 2-5 (fracciones reunidas 50-53) para continuar el proceso de aislamiento y purificación. En el fraccionamiento de FrDCM 2-5, se empleó una columna para cromatografía abierta (150 mm X 400 mm), la cantidad de sílica gel 60 (230-400 mm) empleada fue de 22.73 g, la cual se suspendió en la mezcla CHCl₃ (89 mL) - MeOH (11mL) - NH₄OH (60 µL). Esta columna se estabilizó por 12 horas. Se utilizaron 20.7 mg de la fracción FrDCM 2-5 la cual fue disuelta en 250 µL de la mezcla CHCl₃-MeOH (89:11).

Tabla 3-3: Fraccionamiento en columna abierta de la fracción alcaloidal FrDCM 2 de *C. toxicofera*.

Solvente/Mezcla de solventes	Fraciones recolectadas	Volumen total	Fraciones reunidas	Grupo de sub-fracciones
CHCl ₃	1–24	500 mL	1-27 28	
CHCl ₃ (45): MeOH (5)	25–35	300 mL	29-32 33-35	
CHCl ₃ (40): MeOH (10)	36–41	300 mL	36-37	
			*38	FrDCM 2-1
			*39-40	FrDCM 2-2
CHCl ₃ (30): MeOH (20)	42-48	300 mL	*41-45	FrDCM 2-3
			46-47 48	
CHCl ₃ (25): MeOH (25)	49-57	300 mL	*49	FrDCM 2-4
			*50-53	FrDCM 2-5
			*54	FrDCM 2-6
			*55-57	FrDCM 2-7
MeOH (100) Hidroxido de amonio pH= 8-9	58-74	500 mL	*58	FrDCM 2-8
			59-60 61-63 64 65-66, 67, 68-70	
			*71-73	FrDCM 2-9
MeOH (100) HCl pH= 3-4	75-85	200 mL	*74-77	FrDCM 2-10
			78, 79, 80, 81,82, 83, 84, 85	

Se colectaron fracciones de 50 mL

*Fraciones seleccionadas para continuar análisis por CLUE-DAD y CLUE-DAD-ESI-EM.

Como sistema de elución se utilizaron mezclas cloroformo-metanol, finalizando con 100% de metanol, ajustado inicialmente a pH 8-9 y luego a pH 3-4. El seguimiento de la columna se realizó por CCD, utilizando como revelador reactivo de Dragendorff para CCD. Se obtuvieron 193 fracciones de 10 mL que fueron reunidas en cinco grupos de fracciones finales (Tabla 3-4), las cuales se caracterizaron mediante perfil cromatográfico por CLUE-DAD.

Una vez que para la subfracción identificada como FrDCM 2-5-1, se obtuvo la mayor cantidad y en su perfil cromatográfico se observó la presencia de un pico con tiempo de

78 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

retención de 5.9 minutos con 94.6 % de área en relación con los otros picos presentes en el cromatograma, se consideró con suficiente pureza para considerarla la realización de análisis mediante $^1\text{H-RMN}$ y experimentos bidimensionales COSY y HSQC, bajo la denominación "Compuesto A1".

Cromatografía líquida ultra eficiente con detector de arreglo diodos acoplada a espectrometría de masas (CLUE-DAD-ESI-EM)

Los espectros de masas para las fracciones evaluadas se obtuvieron con ionización por electro spray, registrándose en modo full-scan y secuencial o tándem (EM/EM), en modo positivo en el equipo Waters ACQUITY® TQD con analizador cuadrupolo. Las condiciones generales de funcionamiento del equipo durante los análisis fueron: voltaje capilar: 35 kV; temperatura capilar: 320 ° C; temperatura de desolvatación: 320 ° C; voltaje del cono: 5 kV; voltaje de ionización: -4kV; Voltaje de pozo: -60 kV. Las muestras se inyectaron mediante bomba de inyección automática con flujo continuo de 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Los espectros ESI/MS/MS se registraron con una energía de 30 eV en el rango de m/z 100 a 2000 μm y un detector UV a 280 nm. Se utilizó un gradiente lineal. Como fase móvil se utilizó agua grado CLAE acidificada con ácido fórmico al 0.1% ($\text{H}_2\text{O-HCOOH}$ al 0.1%) y acetronitrilo grado CLAE acidificado con ácido fórmico al 0.1% (ACN-0.1% HCOOH). La separación se realizó mediante un gradiente lineal (5-95% ACN de 0 a 10 min), luego se mantuvo un corto período de elución isocrática (95% ACN de 10 a 11 min), devolviendo la condición de elución inicial 11 a 13 min (5% ACN). La longitud de onda utilizada fue de 280.

Las muestras (FrDCM 1, FrDCM 2, FrDCM 2-1, FrDCM 2-2, FrDCM 2-3, FrDCM 2-4, FrDCM 2-5, FrDCM 2-6, FrDCM 2-7, FrDCM 2-8) fueron preparadas pesando en un tubo Eppendorf entre 1-5 mg, seguidamente se adicionó 1 mL de una mezcla agua-ácido fórmico al 1%. Las muestras fueron solubilizadas con ayuda de un ultrasonido (10 min) y posteriormente filtradas empleando filtros 0.22 μm .

Tabla 3-4: Fraccionamiento en columna abierta de la fracción alcaloidal FrDCMF 2-5 de *C. toxicofera*.

Solvente/Mezcla de solventes	Fracciones recolectadas	Volumen total	Fracciones reunidas	Grupo de sub-fracciones
CHCl ₃ (89): MeOH (11): NH ₄ OH (1.5)	1-90	500 mL	1-71	FrDCM 2-5-1
			72-81	
CHCl ₃ (87): MeOH (13)	102-111	300 mL	82-88	FrDCM 2-5-2
			89-100	
CHCl ₃ (80): MeOH (20)	112-133	300 mL	101-115	FrDCM 2-5-3
			116-119	
CHCl ₃ (75): MeOH (25)	134-146	300 mL	120	FrDCM 2-5-4
			121-124	
CHCl ₃ (70): MeOH (30)	147-164	500 mL	125-135	FrDCM 2-5-5
			136-145	
CHCl ₃ (50): MeOH (50)	165-181	200 mL	146-149	FrDCM 2-5-5
			150-152	
MeOH	182-193	200 mL	153-160	FrDCM 2-5-5
			161-193	

Experimentos con Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética nuclear de hidrógeno (¹HRMN), los experimentos bidimensionales COSY y HSQC se obtuvieron en el espectrómetro (Bruker Advance DRX 400 NMR), el análisis se realizó en el Departamento de Química de ICEX-UFMG. El solvente usado, acorde con la solubilidad de la muestra fueron DMSO-*d*₆. Los desplazamientos (δ) se midieron en ppm y la constante de acoplamiento (*J*) en (Hz).

3.4 METODOLOGÍA – ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.4.1 Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro*

La actividad antiplasmodial *in vitro* se evaluó mediante el ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo de *P. falciparum*, utilizando la cepa FCR-3 resistente a la cloroquina. Se realizaron dos experimentos independientes para *C. metensis*, *C. membranacea* y *V. littoralis*. En cuanto *A. duckey* se adelantó un experimento. Se finalizaron dos experimentos independientes para *C. toxicofera* con la muestra recolectada en la época lluviosa y un ensayo con material vegetal colectado en época seca.

Los eritrocitos parasitados (Ep) O⁺, se cultivaron en cajas de cultivo de 25 mL (Corning Costar Corporation®, EE. UU.), que contenían 8.1 mL de medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640-Sigma Aldrich®, EE. UU.), 1 mL de suero humano (SH), 0.4 mL de bicarbonato de sodio y 500 µL de glóbulos rojos (GR) (hematocrito = 5%). La parasitemia se mantuvo entre 0.5 y 4% mediante dilución con glóbulos rojos sanos. Los parásitos se incubaron a 37°C en una atmósfera modificada de 90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂. El medio se renovó todos los días y se realizó monitoreo por microscopia (10X100) mediante un frotis de sangre fijado con metanol y teñido con Giemsa. El cultivo de parásitos se sincronizó con sorbitol al 5%. Los extractos se disolvieron en DMSO a una concentración final de entre 0.78 y 100 µg/mL (DMSO<1%). Se añadieron 100 µL de cultivo de Ep (parasitemia al 2.5%) más 100 µL de la solución a evaluar. El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos y se incubó durante 48 h. Se empleó cloroquina difosfato (1 µg/mL) como control positivo y el vehículo (DMSO<1% en RPMI 1640) como control negativo. El ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo del parásito se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Deharo et al., 2000 y adaptado por el grupo de investigación FaMeTra a las condiciones experimentales de Laboratorio en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá (Anexo C).

La densidad de parásitos se cuantificó utilizando un método de lectura optimizado basado en la fluorescencia de SYBR Green I (Arias Marciales et al., 2016). Cada concentración de extractos (100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.12 µg/mL,

1.56 µg/mL y 0.78 µg/mL) se evaluó por triplicado. Los resultados se expresan como concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) utilizando un modelo de regresión logística de respuesta a la concentración (Microsoft Excel 365®).

3.4.2 Evaluación antiplasmodial *in vitro* mediante la valoración en la producción de la enzima lactato deshidrogenasa (pLDH)

La actividad antiplasmodial *in vitro* de las diferentes muestras se evaluó mediante el método de lectura LDH de *P. falciparum* (pLDH). La prueba de actividad enzimática de pLDH se fundamenta en la valoración de la actividad enzimática de LDH de *P. falciparum* la cual se pone junto al lactato y una coenzima 3-acetilpiridina adenina dinucleótido (APAD) semejante a NAD (Nicotinamida adenina dinucleótido) en la reacción, lo que conduce a la formación de piruvato a partir de lactato y APADH. Seguidamente el APADH formado reduce el cromóforo NBT (Nitro Blue Tetrazolium) formando un derivado azul, detectable a 540 nm, con lo cual se hace una correlación entre los niveles de parasitemia y la actividad LDH del parásito (Makler et al., 1993; Nogueira & Rosário, 2010).

Para realizar la prueba, el cultivo de *P. falciparum* W2 (resistente a cloroquina) se sincronizó con sorbitol al 2% de parasitemia en etapa de anillo y 1% de hematocrito. Se transfirieron 180 µL de la suspensión de glóbulos rojos infectados a microplacas de 96 pozos, en cada pozo se adicionaron 20 µL de la muestra correspondiente (diferentes concentraciones). Se utilizaron controles sin fármaco, con glóbulos rojos infectados (control positivo) y glóbulos rojos no infectados (control negativo). Se utilizó cloroquina como fármaco antimalárico de referencia. Cada muestra se analizó por triplicado (Figura 3-3). Las placas se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C durante 48 h. Después de 48 h de incubación, las microplacas se congelaron (-20°C) y se descongelaron a temperatura ambiente este proceso se realizó dos veces.

El lisado celular se transfirió a una placa de 96 pozos a la que se añadieron 100 µL por pozos de reactivo Malstat (preparado solubilizando en 200 mL de agua destilada: 400 µL triton X-100, 4 g de L-lactato de sodio, 1.32 g de tris y 22 mg de 3-acetilpiridina adenina de dinucleótido) y 25 µL de reactivo NBT / PES (compuesto por 160 mg de Nitro Blue Tetrazolium Salt (NBT) y 8 mg de etosulfato de fenazina (PES), en 100 mL de agua destilada. Después de 1 h de incubación, se registró la absorbancia de cada pozo empleando un espectrofotómetro a 540 nm (Nkhoma et al., 2007).

82 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Se realizó un tamizaje inicial para las muestras (EtOHct, FrDCM1, FrDCM2, A1 y tetrandrina) en el cual se emplearon dos concentraciones (50 µg/mL y 25 µg/mL) en dos experimentos independientes, realizados por triplicado. Las muestras que presentaron un porcentaje de reducción de parasitemia igual o superior al 50% a la mayor concentración ensayada fueron seleccionadas para determinar la CI₅₀. Los experimentos para determinar la CI₅₀ de las muestras seleccionadas se realizaron por triplicado, tres experimentos independientes, empleando seis concentraciones distintas, en diluciones seriadas 1:2 (25ug/mL; 12.5ug/mL; 6.25ug/mL; 3,12ug/mL; 1.56ug/mL; 0.78ug/mL). El cálculo de la viabilidad de cada concentración de muestra se realizó siguiendo la ecuación de viabilidad de cada concentración por muestra (ver Figura 3-3).

Figura 3-3: Distribución de las muestras obtenidas de *C.toxicofera* en placa para determinar la CI₅₀ de la actividad antiplasmodial mediante el método de lectura LDH.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control (GRNP)						Control (GRP)					
B	25 µg/mL		25 µg/mL		25 µg/mL		25 µg/mL		25 µg/mL		25 µg/mL	
C	12.5 µg/mL		12.5 µg/mL		12.5 µg/mL		12.5 µg/mL		12.5 µg/mL		12.5 µg/mL	
D	6.5 µg/mL		6.5 µg/mL		6.5 µg/mL		6.5 µg/mL		6.5 µg/mL		6.5 µg/mL	
E	3.12 µg/mL		3.12 µg/mL		3.12 µg/mL		3.12 µg/mL		3.12 µg/mL		3.12 µg/mL	
F	1.56 µg/mL		1.56 µg/mL		1.56 µg/mL		1.56 µg/mL		1.56 µg/mL		1.56 µg/mL	
G	0.78 µg/mL		0.78 µg/mL		0.78 µg/mL		0.78 µg/mL		0.78 µg/mL		0.78 µg/mL	
H	Línea H sin muestra											

 Control (GRNP): Medio completo+globulos rojos no parasitados (6 pozos)
 Control (GRP): Medio completo+globulos rojos parasitados (6 pozos)
 Sustancia 1:cada concentración realizada por triplicado
 Sustancia 2:cada concentración realizada por triplicado
 Sustancia 3:cada concentración realizada por triplicado
 Sustancia 4:cada concentración realizada por triplicado
 Línea H sin muestra

$$\text{Cálculo de la Viabilidad de cada concentración de muestra} = \frac{(\text{media de absorbancia de cada concentración por triplicado}) - (\text{media del control GRNP})}{(\text{media del control GRP}) - (\text{media del control GRNP})}$$

Para los ensayos de evaluación de actividad antiplasmodial *in vitro* se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para cada uno de los ensayos mediante análisis de regresión lineal a partir de la viabilidad y la concentración con la ayuda del software MicroCal Origin Pro versión 8.5. De acuerdo con los resultados, las muestras se pueden clasificar como: muy activa (CI₅₀<1µg/mL), activa (1µg/mL<CI₅₀≤15µg/mL), moderadamente activa (15µg/mL< CI₅₀≤25 µg/mL), poco activa (25µg/mL< CI₅₀≤50 µg/mL) e inactiva CI₅₀>50 µg/mL (De Paula, 2014).

3.4.3 Actividad hemolítica

El ensayo de actividad hemolítica busca evaluar el efecto de las sustancias o extractos sobre la integridad de los eritrocitos. Se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Rocha et al., 2012), el cual fue adaptado a las condiciones de laboratorio del grupo FaMeTra. Las muestras se disolvieron en PBS (Solución salina tamponada de fosfatos, 1X, pH=7.5), se realizó una serie de siete soluciones (1000 µg/mL a 0.001 µg/mL).

Los glóbulos rojos se obtuvieron de sangre recién extraída de voluntarios sanos con Rh O+. La sangre se recogió en una solución de buffer de citrato de sodio, se lavó tres veces con solución salina isotónica y se resuspendió en PBS 1X, pH=7.5. Se mezclaron 100 µL de muestra y una suspensión de GR con 4% de hematocrito en una placa de 96 pozos. Después de la incubación a 37 °C durante 1 hora, las placas se centrifugaron a 500 G durante 10 minutos. La hemoglobina se cuantificó en una alícuota de 50 µL de sobrenadante, mediante un lector de placas Microplate Manager 6 (BIO-RAD), con una longitud de onda de 418 nm. Las muestras se evaluaron por triplicado en tres experimentos independientes. Se utilizó PBS 1X como control negativo y una solución de Triton X-100 estéril al 0.1% como control positivo. La concentración hemolítica 50 (CH₅₀) se calculó usando un modelo de regresión logística.

Se estableció la relación entre la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para *P. falciparum* y concentración hemolítica 50 (CH₅₀) (CH₅₀/CI₅₀), con lo cual se puede establecer la capacidad de una muestra para afectar directamente al parásito, sin que se produzca efecto sobre los glóbulos rojos.

3.4.4 Evaluación de la actividad antimalárica *in vivo* de *C. toxicofera*

Para la evaluación de la actividad antimalárica del extracto etanólico y fracciones primarias obtenidas de *C. toxicofera* se empleó el modelo de malaria murina, con la prueba supresiva de 4 días en *P. berghei* cepa ANKA, descrita por Peters (Peters et al., 1970) y adaptada por Garavito (Rodríguez et al., 2018) (Anexo D). Los ratones albinos ICR del mismo género, de 4 semanas de edad, en un rango de peso de 18 a 22 g, fueron infectados intraperitonealmente con eritrocitos parasitados, ajustando la concentración del inóculo infectante a 1x10⁷ parásitos/100 µL. Dos horas después y durante tres días más, a la

84 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

misma hora, grupos de cinco ratones fueron tratados por vía oral con 400 mg/kg/día, en un volumen de 100 µL. Se cuantificó la parasitemia el día 4 por fluorimetría, utilizando el flurocromo fluorescente SYBRG I (Arias Marciales et al., 2016). El control negativo de los extractos de prueba fue el vehículo (Agua (55)-propilengicol (20)-glicerina (20)-Tween 5) y el control positivo CQ (3 mg / kg / día de cloroquina). El porcentaje de inhibición de la parasitemia se calculó mediante un modelo de regresión logística.

El desarrollo de los ensayos y su evaluación se realizaron siguiendo la normatividad sobre el manejo ético de animales de laboratorio establecido en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, capítulo sexto, que cita el uso de animales vivos en experimentos para investigación en Colombia. Además, se siguió la normatividad establecida por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y los protocolos internos de la Universidad Nacional de Colombia para el manejo y disposición de material biológico. Este proyecto contó con aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias (Anexo E).

Para realizar un análisis comparativo entre los resultados del ensayo *in vivo* de extracto etanólico y las fracciones primarias, se realizaron pruebas para determinar la normalidad de los datos. Se empleó la prueba de hipótesis ANOVA con $\alpha = 0.05$ y posteriormente la prueba de Tukey con $\alpha = 0.05$.

3.4.5 Evaluación de la toxicidad aguda por vía oral del extracto etanólico y las fracciones obtenidas de *C. toxicofera*

Se evaluó la toxicidad aguda del extracto etanólico de lianas de *C. toxicofera* y de sus fracciones alcaloidales, siguiendo los lineamientos de la guía OECD Test N° 423 (OECD, 2002). Para el desarrollo de este ensayo se tenía el aval por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias (Anexo E).

Los animales empleados fueron ratones hembra nulíparas, jóvenes sanas, elegidos al azar. Cada animal, al comienzo de su dosificación tenía entre 11 y 12 semanas de edad y su peso no variaba en más de un 20% del promedio.

Condiciones de alojamiento y alimento

La temperatura promedio del lugar de alojamiento para los animales fue aproximadamente de 22°C (+ 3°C). La humedad relativa fue al menos del 30% y preferiblemente no superior al 70%. Se empleó iluminación artificial, la secuencia es de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación, se utilizó dieta de laboratorio convencional para pequeños roedores (Laboratory Rodent Diet de LabDiet ®) con un suministro ilimitado de agua potable.

Preparación de dosis

Las dosis fueron preparadas considerando que, en roedores, el volumen de administración normalmente no debe exceder de 1 mL/100 g de peso corporal. Para cada sustancia se pesó la cantidad suficiente y se diluyó en el vehículo correspondiente. En el caso del extracto etanólico, fue empleado un vehículo cuya composición constó de glicerina, propilenglicol y agua en proporciones 10:10:80. Para la fracción (FrDCM 2) se preparó un vehículo compuesto por ácido clorhídrico (HCl 2N), con lo cual se mejora la solubilidad en medio acuoso de los alcaloides. Posteriormente se empleó hidróxido de sodio (NaOH 2N) llevando a pH cercano a la neutralidad (ácido clorhídrico, hidróxido de sodio (4-6)). Finalmente, para la fracción FrDCM 1 a partir de ensayos previos en los cuales se encontró las mejores condiciones de solubilidad empleando en relación 50% los vehículos (glicerina, propilenglicol y agua en proporciones (10:10:80) y ácido clorhídrico, hidróxido de sodio (40:60)). Los vehículos fueron evaluados en el ensayo, reportando los resultados como "blanco". Las soluciones fueron preparadas justo antes de la administración.

Administración de los compuestos

La sustancia de ensayo se administró en una dosis única empleando una cánula para administración gástrica forzada. Los animales fueron sometidos a ayuno antes de la dosificación, se retiró la comida y agua tres a cuatro horas antes. Los animales se pesaron, se agruparon y se marcaron para ser administrados con la sustancia de prueba. Después de que la sustancia fue administrada, se observaron los animales por al menos 2 horas. Una vez se evidenciaba que el animal se había recuperado (1 – 2 horas) se les proporcionaba alimento.

86 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

Número de animales y dosis empleadas

Para estimar las dosis iniciales para los ensayos con EtOHct (2000 mg/Kg) y las FrDCM 1 y FrDCM 2 (300 mg/kg) se tuvo en cuenta el estudio de toxicidad del extracto etanólico y fracciones de *Abuta grandifolia*, planta de la familia Menispermaceae y en la cual se han reportado alcaloides BBIQS (Hata, 2005).

Tres animales fueron usados para cada etapa. Se emplearon dosis fijas preestablecidas en la guía OECD Test N° 423. En este caso se trabajó en los tres últimos niveles (50, 300 y 2000 mg/kg), tal como lo indica la Tabla 3-5. Los diagramas del procedimiento que se siguieron para cada una de las dosis iniciales se observan en el Anexo F.

Tabla 3-5: Características sobre el protocolo de toxicidad aplicado a cada una de las sustancias evaluadas.

Sustancia evaluada	Vehículo	Número de Animales empleados	Dosis	Anexo
Extracto etanólico	Glicerina: Propilenglicol: Agua (10:10:80)	3 animales	2000 mg/kg	Anexo 7.3
		6 animales	300 mg/kg	Anexo 7.2
FrDCM1	Vehículo extracto: Vehículo FrDCM2 (50:50)	6 animales	300 mg/kg	Anexo 7.2
		6 animales	2000 mg/kg	Anexo 7.3
FrDCM2	HCl 2N:NaOH 2 N (40:60)	3 animales	300 mg/kg	Anexo 7.2
		6 animales	50 mg/kg	Anexo 7.1

Seguimiento

Los animales fueron observados después de la dosificación, durante los primeros 30 minutos, la primera hora y a las 24 horas. De igual forma se evaluaron de forma diaria durante un total de 14 días. Para las observaciones clínicas fue tenido en cuenta el test de Irwin/Hipocrático y se realizaron sacando los animales de sus cajas y trasladándolos a un corral de observación (Roux et al., 2005). Las observaciones incluyeron cambios en la piel y el pelaje, los ojos y las membranas mucosas, y también los sistemas respiratorio, circulatorio, autónomo y del sistema nervioso central, y la actividad somatomotora y el patrón de comportamiento. La atención se dirigió a la observación de signos como

temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño, coma, piloerección o cualquier otro que pudiera alertar sobre alguna alteración fisiopatológica. Antes de la administración se realizó una evaluación clínica general, con el fin de verificar el estado saludable de los animales.

Finalmente, alrededor de la hora y media de haberlos observado, fueron devueltos a sus cajas, donde se les retornó el suministro de comida y el agua. Siguiendo las recomendaciones de la guía 423, se observaron a las 24 horas y durante el estudio se evaluaron día de por medio por 14 días.

Los animales que se encontraban con signos de dolor intenso o angustia severa fueron sacrificados para evitar la prolongación del sufrimiento.

Peso corporal

Como ya se había mencionado, el peso de cada animal fue determinado poco antes de la administración de la sustancia problema. Los animales sobrevivientes fueron pesados día de por medio durante los 14 días de observación (OECD, 2002).

Para determinar si hay una diferencia estadísticamente significativa entre el comportamiento del peso promedio de los animales tratados y los animales de control (vehículo) se realizaron pruebas de comparación t-Student para dos poblaciones independientes, las cuales fueron implementadas en el paquete estadístico R. Las comparaciones se hicieron por pares entre cada grupo tratado con la sustancia problema y su respectivo vehículo.

Necropsia

Al final del ensayo (día 14), los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical para ser sometidos a una necropsia y evaluación macroscópica y morfológica de los principales órganos blanco para sustancias tóxicas (OECD, 2002). Posteriormente, los órganos fueron recuperados (todos los cambios anatómo-patológicos visibles fueron registrados). Los órganos se conservados en una solución de formol en buffer de fosfato pH 7.4 para finalmente ser sometidos a estudio histopatológico. Posteriormente los órganos fueron embebidos en parafina, a partir de estos bloques se prepararon cortes para la observación de los tejidos a nivel microscópico.

3.4.6 Cultivo de células hepáticas HepG2 y ensayo de citotoxicidad

Para el desarrollo del ensayo de citotoxicidad se empleó una línea de células HepG2 A16, obtenidas de hepatoplastoma primario humano, se cultivó a partir de una ampolla criopreservada de un cultivo proporcionado originalmente por el Dr. Luciana Maria Silva, de la Fundación Ezequiel Dias (FUNED/MG).

Las muestras se analizaron por triplicado en tres experimentos independientes. La línea celular fue mantenida en medio RPMI suplementado con NaHCO_3 y L-glutamina más suero fetal bovino, el medio se reemplazó cada dos días. Se incubó en una atmósfera de CO_2 al 5%, la temperatura fue 37°C durante 17-24 horas para la adhesión celular a la placa (70-80% de confluencia).

Las células con al menos 80% de confluencia se retiraron del recipiente de cultivo para emplearlas en el ensayo, se les adicionó 1 mL de tripsina 0.025% EDTA (Sigma-Aldrich®), se incubaron a 37°C por 5 min, se resuspendieron en 10 mL de medio completo y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. Tras descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en RPMI completo, las células se distribuyeron en microplacas de 96 pozos (4×10^4 células/100 μL por pozo) y se incubaron en estufa de CO_2 a 37°C durante 24h para que se adhirieran a la placa.

Después de este período de incubación, 100 μL de las muestras: extracto etanólico, fracciones alcaloides de *C. toxicifera* y tetrandrina a diferentes concentraciones (1, 10, 100, 1000 en $\mu\text{g/mL}$), inicialmente disueltas en DMSO (0.02%, v/v), esta solución se diluyó, en medio de cultivo RPMI y posteriormente puestos en contacto con el cultivo celular. Después de 24 h de incubación se eliminó el sobrenadante, se añadieron 28 μL / pozo de MTT (2,0 mg/mL). Se incubó con MTT por 1 h y 30 minutos (Mosmann, 1983). Luego se añadió 100 μL DMSO por pozo. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Infinite M200Pro - TECAN) a 540 nm por 90 min. La concentración citotóxica que inhibe el crecimiento de las células en un 50 % en presencia de las muestras de prueba se determinó en comparación con las células cultivadas sin las muestras de prueba, considerada como un crecimiento del 100 % (de Pilla Varotti et al., 2008)

Los resultados se evaluaron utilizando el programa Origin Pro 8.5.0 SR1 (2010) con la determinación de las curvas de respuesta a las concentraciones establecidas con ajuste sigmoïdal. Los resultados se expresaron como la concentración inhibitoria 50 (CC₅₀). Las muestras se clasificaron de acuerdo a rangos de citotoxicidad en: altamente tóxico (CC₅₀<10 µg/mL), tóxico (10 µg/mL <CC₅₀<100 µg/mL), moderadamente tóxico (100 µg/mL <CC₅₀<1000 µg/mL) y potencialmente no tóxico (CC₅₀> 1000 µg/mL) (Osorio et al., 2007).

4. RESULTADO Y DISCUSION

4.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS PLANTAS PRESELECCIONADAS

4.1.1 Preparación de los extractos primarios de las cinco especies preseleccionadas

Se elaboraron extractos en etanol 96%, una vez que con este solvente se logra extraer una alta diversidad de metabolitos secundarios (Hernández-Carvajal et al., 2022). El material vegetal de las distintas plantas preseleccionadas se secó en estufa de aire circulante por 48 a 72 horas, con el fin de reducir el porcentaje de humedad, evitándose de esta manera la proliferación de microorganismos y detener la acción enzimática, con lo cual se conservan los metabolitos secundarios (Sharapin, 2000).

En la Tabla 4-1 se presentan los rendimientos obtenidos en el proceso de extracción para las especies preseleccionadas. Se obtuvieron porcentajes en el rendimiento para las especies estudiadas entre 2.7 y 17.3 %, los mayores porcentajes probablemente se debieron a la capacidad del solvente de extracción (etanol) para disolver metabolitos primarios y secundarios de diferente polaridad.

Los rendimientos para hojas de *C. membranacea* y *C. metensis* fueron 13.8% y 9.7%, respectivamente, siendo mayores a los reportados previamente por Uchôa et al., 2010 y Hernández Carvajal et al., 2014, quienes obtuvieron rendimientos de 4.1% para *C. membranacea* y 3.5% para *C. metensis*. Estas diferencias pueden estar asociadas a la época de colecta, una vez que las hojas para esta investigación fueron obtenidas en época

seca y los menores rendimientos corresponden a extractos obtenidos a partir de material vegetal colectado en época lluviosa. Sin embargo, también pueden estar asociadas con otros factores intrínsecos y extrínsecos (Sharapin, 2000).

Tabla 4-1: Resultados del rendimiento en el proceso de extracción para las especies preseleccionadas.

Nombre de la especie vegetal	Material vegetal molido (g)	Peso extracto seco (g)	Rendimiento (%)
<i>Ambelania duckey</i> Mark	150.9	4.1	2.7
<i>Cecropia membranacea</i> Trécul	452.9	62.4	13.8
<i>Cecropia metensis</i> Cuatrec	452.9	44.0	9.7
<i>Curarea toxicofera</i> (Wedd.) Barneby & Krukoff	150.2	17.5	11.6
<i>Verbena littoralis</i> Kunth	452.9	78.2	17.3

En el caso de *V. littoralis* el rendimiento de 17.3% fue mucho mayor que el reportado por Tasso de Souza et al. (2005) de 1.4 %, para un extracto etanólico a partir de material vegetal colectado en Santa María, Rio Grande do Sul, Brasil, en el mes de diciembre de 2001. Esta diferencia en los porcentajes de rendimiento puede estar asociadas al lugar de colecta, época y posiblemente a que en este trabajo se extrajo el material vegetal hasta agotamiento de la muestra.

Para lianas de *A. duckey* el rendimiento fue de 2.7%, un porcentaje menor si se compara con el obtenido para el extracto etanólico de hojas secas de *A. occidentalis* el cual fue de 7.82% (Castro et al., 2009). La diferencia en estos porcentajes, además de la especie, puede estar asociada a el tipo de órgano empleado, además del método de extracción utilizado para obtener el extracto etanólico en *A. occidentalis*, el cual fue maceración dinámica.

Para lianas de *C. toxicofera* el rendimiento fue de 11.6 % empleando como solvente etanol al 96%, porcentaje un poco mayor al reportado en otra investigación empleando

92 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

la misma especie y órgano, utilizando como solvente de extracción agua (8.9%) (Rodríguez Parra, 2015). La diferencia en el rendimiento está asociada al solvente de extracción empleando, ya que con etanol se puede extraer una mayor diversidad de metabolitos en un amplio rango de polaridad.

4.1.2. Estudio fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de cinco plantas con antecedentes antimaláricos

Con el fin de complementar la información fitoquímica reportada para preparaciones tradicionales (Rodríguez Parra, 2015) se llevó a cabo un estudio fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos mediante CCD, pruebas de coloración y precipitación. Como resultado de estas pruebas (Tablas 4-2 y 4-3) se estableció la presencia de polifenoles, flavonoides, esteroides y terpenos, en todos los extractos. *C. toxicofera* fue la única especie donde se detectó la presencia de alcaloides. Adicionalmente, en todas las especies se evidenció la ausencia de glicósidos cardiotónicos, compuestos antracénicos, cumarinas y saponinas. A continuación, se muestra el análisis de los resultados para cada grupo de metabolitos secundarios:

Tabla 4-2: Resultados de la caracterización fitoquímica por CCD^a para los extractos etanólicos de *A. duckey*, *C. metensis*, *C. membranacea*, *C. toxicofera* y *V. littoralis*.

Especie	Metabolitos secundarios				
	Compuestos fenólicos	Flavonoides	Ácidos carboxílicos fenólicos	Compuestos terpenoides y esteroidales	Alcaloides
	<i>Azul oscuro</i> ^b	<i>Amarillo, verde o naranja</i> ^c	<i>Azul</i> ^b	<i>Rosa</i> ^b	<i>Naranja</i> ^b
<i>Ambelania cf duckey</i>	0.25	0.37	0.30	0.25, 0.45	ND
<i>Cecropia metensis</i>	0.20	0.50, 0.60, 0.70	0.30, 0.60	0.25, 0.45, 0.6, 0.7	ND
<i>Cecropia membranacea</i>	0.20	0.50, 0.60, 0.70	0.30, 0.60	0.25, 0.45, 0.6, 0.7	ND
<i>Curarea toxicofera</i>	0.22	0.54	0.7	0.25, 0.45	0.19, 0.28, 0.38
<i>Verbena littoralis</i>	0.32	0.74	0.23, 0.83	0.25, 0.45	ND

^a Valores de R_F obtenidos de las medidas de dos pruebas cromatográficas; ^b Coloración al visible. ^c Fluorescencia 365 nm. Estándares: ácido tánico (0.30), Rutina (0.56), Quercetina (0.35), ácido clorogénico (0.42); β-sitosterol: (0.45), sulfato de quinina (0.52). ND: No detectado

Compuestos fenólicos:

Como resultado de las pruebas de coloración (Tabla 4-3) y por CCD (Tabla 4-2), se observaron manchas de color azul oscuro para todas las especies después de la derivatización con cloruro férrico-ferricianuro de potasio, lo que indica la presencia de polifenoles. Para la confirmación de taninos se utilizó la prueba de gelatina-sal, los extractos etanólicos de todas las especies resultaron positivos en esta prueba, indicando la presencia de compuestos fenólicos y taninos. Las proantocianidinas (taninos condensados) se detectaron solo en los extractos etanólicos de *C. metensis* y *C. membranacea*.

Estos resultados son coincidentes con lo reportado para estas dos especies de *Cecropia* colectadas en época lluviosa (Hernández & Luengas, 2013). Además, se observó una pequeña cantidad de precipitado y un color azul débil en los extractos de *C. toxicofera* y *A. duckey*, reflejando un contenido relativamente bajo de taninos.

Tabla 4-3: Resultados de la caracterización fitoquímica mediante pruebas de coloración y precipitación para *A. duckey*, *C. metensis*, *C. membranacea*, *C. toxicofera* y *V. littoralis*.

Clase de metabolito secundario	Pruebas de Coloración y precipitación	Plantas evaluadas				
		<i>Ambelania duckey</i>	<i>Cecropia metensis</i>	<i>Cecropia membranacea</i>	<i>Curarea toxicofera</i>	<i>Verbena littoralis</i>
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	+	-
	Mayer	-	-	-	+	-
	Valser	-	-	-	+	-
	Reineckato de amonio	-	-	-	+	-
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+	+	+	+	+
Flavonoides	Shinoda	-	+	+	-	+
	HCl	-	-	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Ensayo de Kedde	-	-	-	-	-
Glicósidos antracénicos	NaOH 5%/NH ₄ OH 2%	-	-	-	-	-
Taninos	Gelatina-Sal	+	+	+	+	+
Proanto cianidinas	BuOH/HCl	-	+	+	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-	-	-	-
	Hemólisis	-	-	-	-	-

Convenciones: Presencia (+) y Ausencia (-) FeCl₃: cloruro férrico; HCl: ácido clorhídrico; BuOH: n-butanol

94 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Los compuestos fenólicos se caracterizan estructuralmente por tener al menos un anillo fenólico en la misma molécula. Las sustancias fenólicas típicas incluyen fenilpropanoides (cumarinas, flavonoides, proantocianidinas, lignanos, ésteres de fenilpropanoides), ácidos carboxílicos fenólicos y taninos hidrolizables o condensados. Estos compuestos generan grupos fenóxido que forman complejos con Fe^{+3} . Los resultados positivos con las pruebas de $FeCl_3$, tanto por prueba de tubo como por CCD, indican la presencia de compuestos fenólicos, pero no se puede identificar ningún metabolito específico (MacWilliam & Wenn, 1972; Ocampo et al., 2014).

Compuestos fenólicos como ácidos hidroxibenzoicos (C_6-C_1) y ácidos hidroxicinámicos (C_6-C_3), se han reportado para algunas plantas de la familia Apocynaceae a la cual pertenece *A. duckey* (Chan et al., 2016). En cuanto a *C. peltata* y *C. membranacea* se reportó la presencia de taninos hidrolizables y proantocianidinas (Costa et al., 2011; Hernández & Luengas, 2013). En el caso de *V. littoralis* se ha reportado la presencia de taninos específicamente taninos catéquicos (García et al., 1995; Tasso de Souza et al., 2005).

Flavonoides

Para evaluar la presencia de flavonoides se utilizaron pruebas en tubo: Shinoda y leucoantocianidinas (Tabla 4-3) y se confirmaron los resultados mediante CCD. La prueba de Shinoda fue positiva (coloración roja) para los extractos de *C. metensis*, *C. membranacea* y *V. littoralis*, con lo cual se confirma la presencia del núcleo γ -benzopirona. La prueba de leucoantocianidinas fue negativa para todos los extractos analizados. Mediante CCD se observaron manchas fluorescentes amarillas y naranjas a 365 nm después de revelar con NP-PEG (Tabla 4-2) para todos los extractos evaluados, resultado que es característico para flavonoides (Wagner & Bladt, 1996).

Para *C. metensis* y *C. membranacea*, se observaron tres manchas anaranjadas intensas a 365 nm ($R_F= 0.50$; $R_F= 0.60$; $R_F= 0.70$), relacionadas con flavonas, flavonoles y flavanonas (Tabla 4-2). Se observaron manchas de fluorescencia verde intenso para el extracto de *V. littoralis* ($R_F= 0.74$) y el extracto de *C. toxicofera* ($R_F= 0.54$) que pueden corresponder a compuestos fenólicos. En la placa de CCD del extracto etanólico de *A. duckey* se evidenció una mancha de fluorescencia anaranjada ($R_F= 0.37$) característica para flavonoides (Wagner & Bladt, 1996).

Los cromatogramas de CLAE-DAD obtenidos para los extractos de *C. metensis* y *C. membranacea* (Figura 4-1A y 4-1B) exhibieron perfiles semejantes, igualmente a lo observado en los perfiles de CCD. Estas dos especies se caracterizan por mostrar un pico principal en un Tr de 19.2 min, empleando la longitud de onda a 350 nm, este pico exhibe el patrón de absorción característico de los flavonoides con máximos a 269 nm y 349 nm (Figura 4-1A y 4-1B) (Paganga & Rice-Evans, 1997).

Para el extracto de *V. littoralis* se observó un pico mayoritario en la región de polaridad media, con un tiempo de retención de 19.5 minutos y fuerte absorción con dos máximos a 202 nm y 333 nm, junto con un grupo de cinco picos con tiempo de retención entre 7.0 y 11.0 minutos. Estos picos también están asociados con flavonoides (Figura 4-1C).

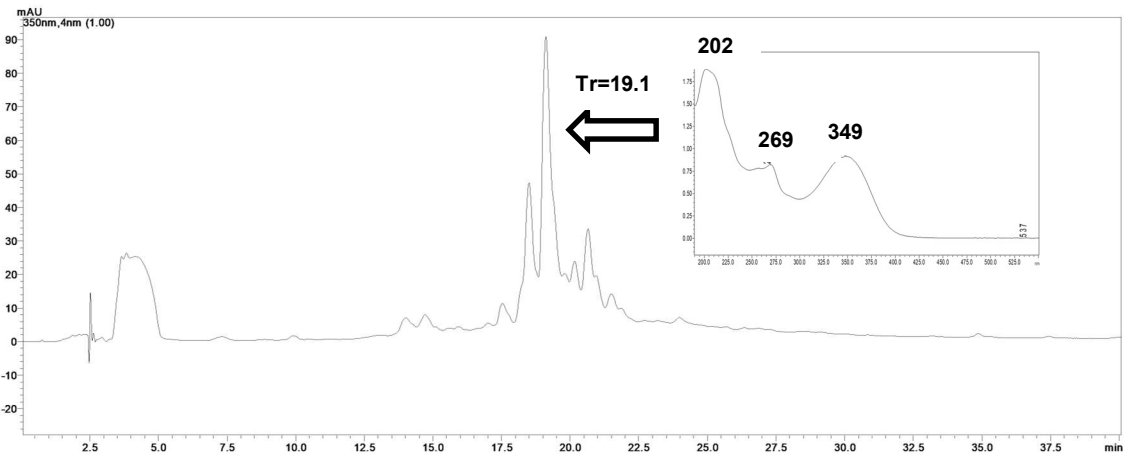
En el cromatograma de *A. duckey* se mostró un pico principal cuyo tiempo de retención de 12.4 minutos (Figura 4-1D) con dos máximos de absorción a 200 nm y 333 nm. Finalmente, en el extracto de *C. toxicifera* no se apreció un pico mayoritario, consistente con lo observado por CCD donde se apreciaron manchas de baja intensidad con los distintos reveladores, pero fue evidente varios picos pequeños con tiempos de retención entre 10.0 y 36.0 minutos. El patrón de absorción de estos picos fue diferente de un patrón asociado con flavonoides. Esta absorción puede estar asociado a los anillos fenólicos presentes en los alcaloides BBIQS (Figura 4-1 E) (Guha et al., 1979).

En los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de cada extracto se evidenció señales en la región a campo bajo correspondientes a los protones aromáticos (6.5 a 7.5 ppm), que están presentes en los compuestos fenólicos, incluidos los flavonoides (Figura 4-2) (Fuloria & Fuloria, 2013).

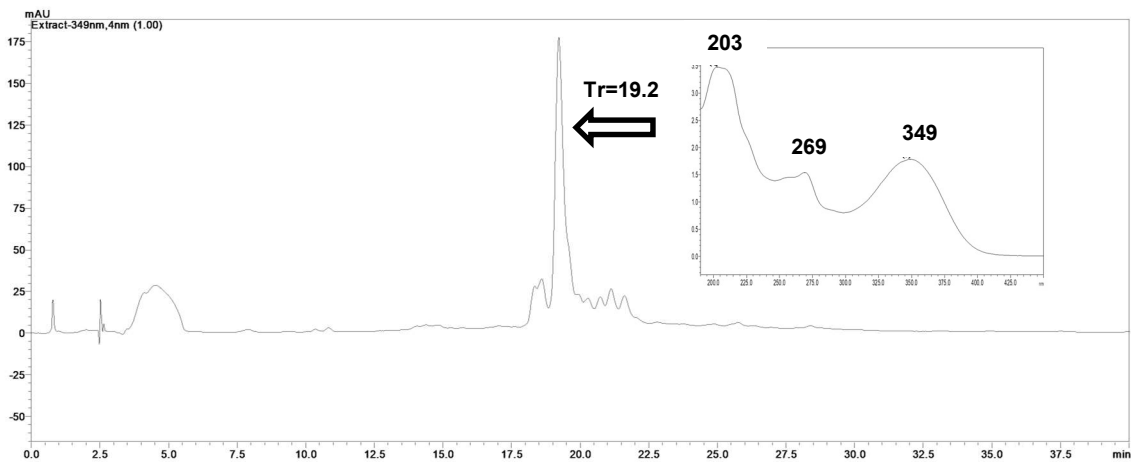
Para *C. metensis* y *C. membranacea* a partir del resultado positivo con Shinoda se estableció la posible presencia de flavonoides con anillo γ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles e isoflavonoides). Este resultado coincide con los reportes en la literatura para diferentes especies del género *Cecropia*, como *C. peltata*, *C. obtusifolia*, *C. glaziovii*, en las que están presentes isoorientina, vitexina, catequina y epicatequina (Andrade-Cetto & Vázquez, 2010; Consolini et al., 2006; Luenga-Caicedo et al., 2007; Pérez-Guerrero et al., 2001; Tanae et al., 2007). En un estudio fitoquímico anterior que utilizó extractos de hojas de *C. metensis* y *C. membranacea*, recolectadas en la temporada de lluvias, se reportó la presencia de compuestos fenólicos, incluidos los flavonoides (Hernández & Luengas, 2013).

Figura 4-1: Cromatogramas por CLAE-DAD de extractos etanólicos de *C. metensis* (A), *C. membranacea* (B), *V. littoralis* (C), *A. duckey* (D) y *C. toxicofera* (E), y espectros UV de los picos mayoritarios a 350 nm.

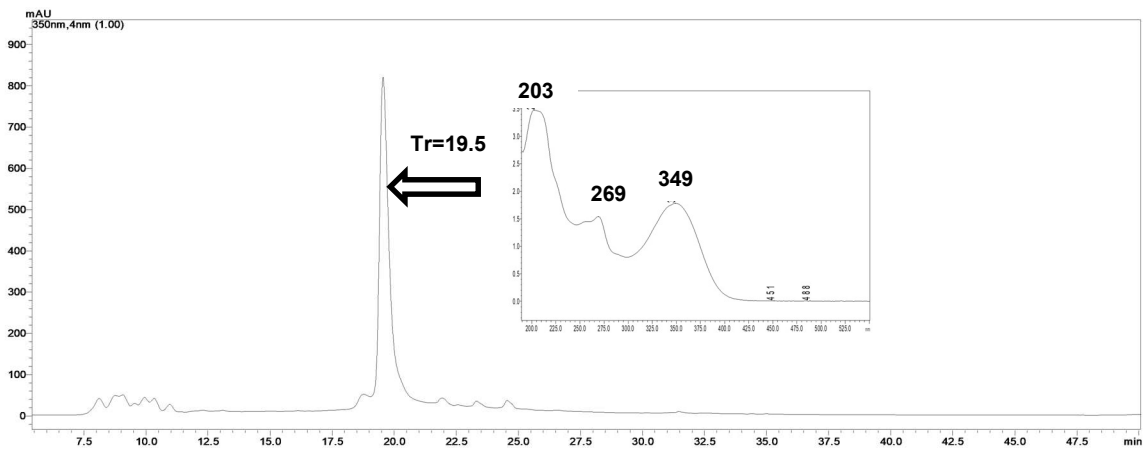
A=C.metensis



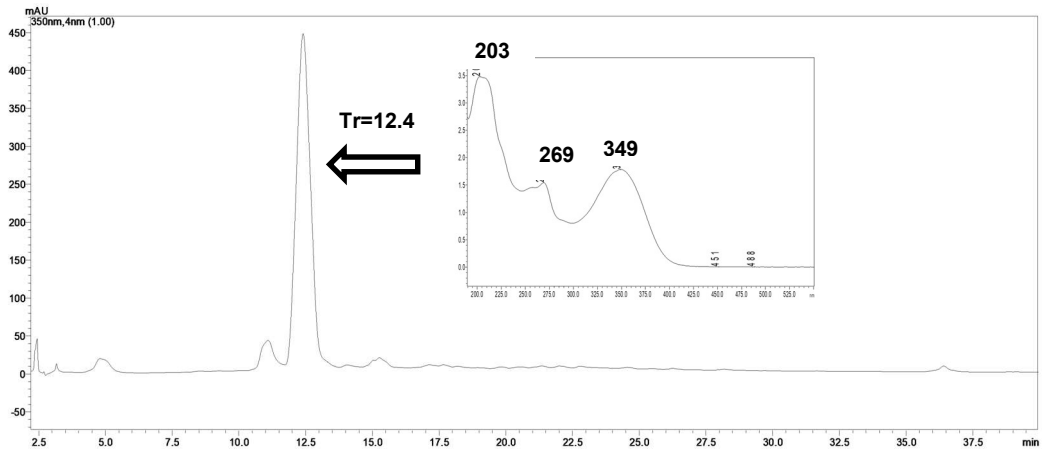
B=C.membranacea



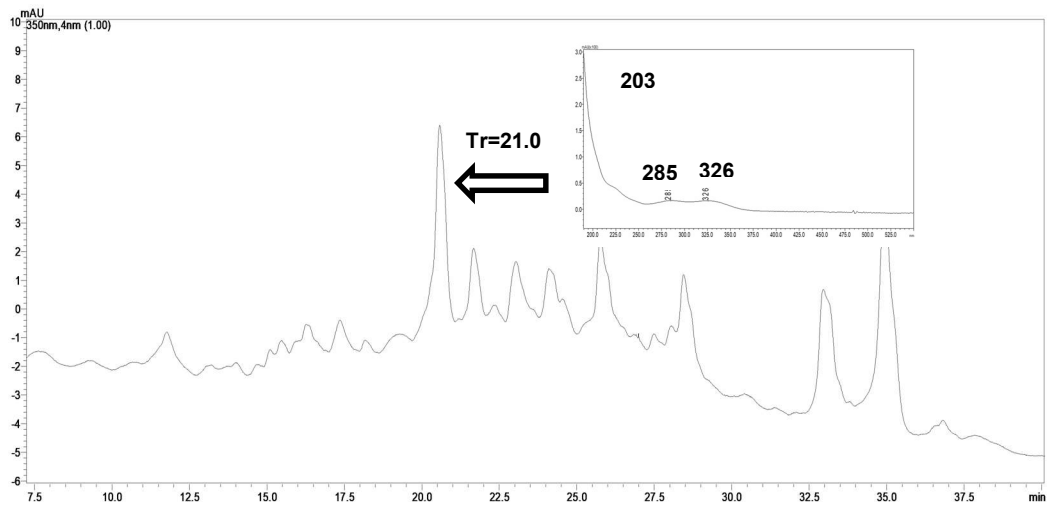
C=V.littoralis



D=A. duckey



E=C. toxicofera

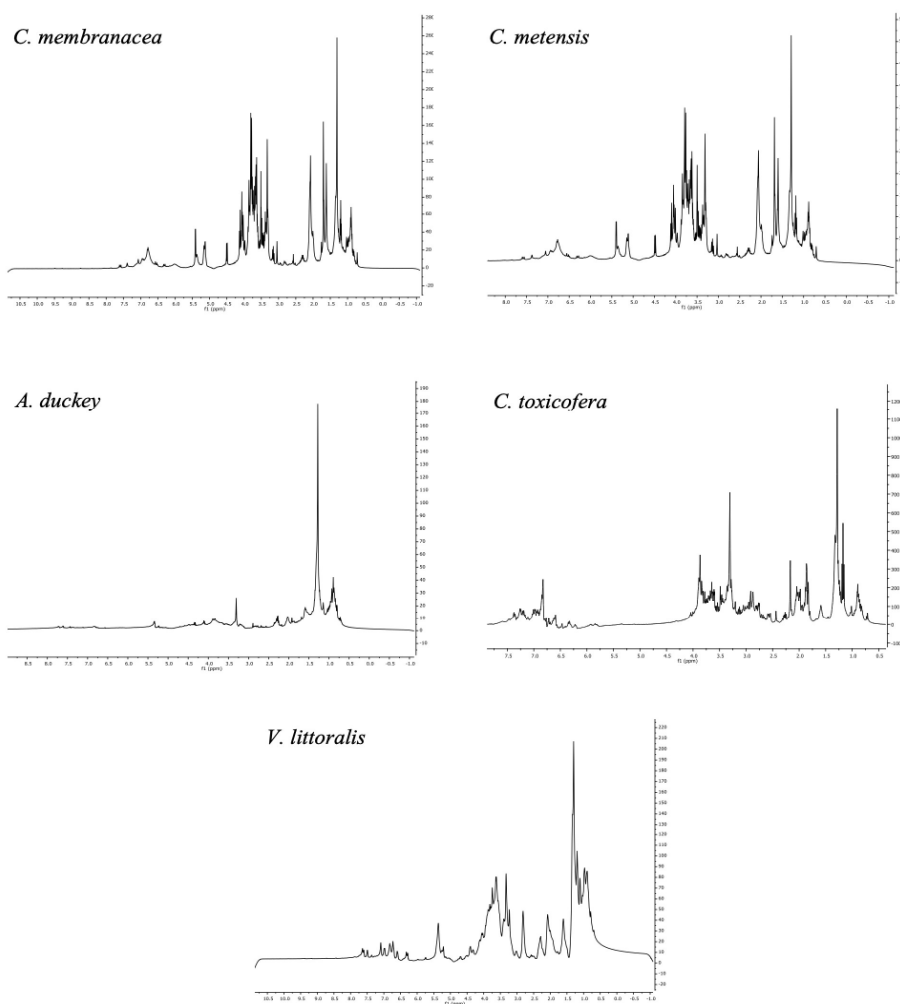


La evaluación del extracto etanólico de *V. littoralis*, mediante la prueba de Shinoda fue positiva, con lo cual se puede predecir la presencia de flavonoides con anillo γ -benzopirona reportados para esta especie como en como 4'-hidroxiwogonina, 8,3'-dimetoxi-5,7,4'-trihidroxiflavona, luteolina, diosmetina, lo cual es coincidente con las manchas observadas para heterosido de flavonoides por CCD (Y. Li, Ishibashi, Chen, et al., 2003; de Lima et al., 2018). Además, se ha reportado la presencia de littorachalcona, verbenechalcona (García et al., 1995; Vestena et al., 2019; Y. Li, Ishibashi, Chen, et al., 2003).

98 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Para *A. duckey* los resultados negativos en la detección de flavonoides empleando pruebas de tubo pueden estar relacionadas con la baja concentración en la muestra. Sin embargo, los resultados negativos en los ensayos en tubo no son coincidentes con el resultado por CCD, ensayo de mayor sensibilidad, en el cual se aprecia una mancha de coloración naranja débil. De acuerdo con lo observado en el cromatograma CLAE-DAD se puede sugerir la presencia de flavonoides en esta especie. Este resultado se puede justificar a partir del reporte de flavonoides para otras especies de la familia Apocynaceae (Chan et al., 2016; Y.-N. Lv et al., 2020).

Figura 4-2: Espectros por ^1H -RMN en metanol- d_4 de los extractos etanólicos *A. duckey*, *C. metensis*, *C. membranacea*, *C. toxicofera*, y *V. littoralis*.



Para el extracto etanólico de *C. toxicofera*, la prueba de Shinoda fue negativa con lo cual se permite establecer la posible ausencia de flavonoides con anillo γ -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles e isoflavonoides). Al emplear CCD y revelar con NP-PEG y UV-365 nm se observó una mancha de color naranja débil. Mediante CLAE-DAD en la zona de mediana polaridad se observaron picos de baja intensidad, con espectros UV cuyas absorciones corresponden a la presencia de anillos aromáticos, no necesariamente de flavonoides. Con los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar se puede concluir la presencia de compuestos fenólicos y la ausencia de flavonoides en el extracto etanólico de *C. toxicofera*.

La ausencia de flavonoides en extractos etanólicos de *C. toxicofera*, puede estar asociada con la baja concentración en la muestra y/o el órgano vegetal empleado (lianas), ya que en otras especies de la familia Menispermaceae como *Cyclea peltata*, planta de la cual se ha obtenido el extracto etanólico de sus hojas y se ha reportado la presencia de flavonoides (Hao et al., 2015).

Ácidos carboxílicos fenólicos

Los ácidos carboxílicos fenólicos como el ácido cafeico o clorogénico, presentan manchas azules o verdes fluorescentes a 365 nm en placas de CCD cuando se revelan con reactivo NP-PEG (Wagner & Bladt, 1996). En estas condiciones, todos los extractos etanólicos evaluados mostraron manchas azules fluorescentes, lo que indica la presencia de ácidos carboxílicos fenólicos.

Los extractos de *C. metensis* y *C. membranacea* exhibieron dos manchas azules fluorescentes a $R_F = 0.30$ y $R_F = 0.60$ (Tabla 4-2). El extracto de *A. duckey* mostró una mancha intensa a $R_F = 0.3$ (Tabla 4-2). *V. littoralis* presentó una mancha débil con $R_F = 0.23$ (Tabla 4-2). Se observaron manchas de baja intensidad para el extracto de *C. toxicofera* con $R_F = 0.7$ (Tabla 4-2). En los perfiles por CLAE-DAD de los extractos etanólicos de *C. metensis* y *C. membranacea* (Figura 4-1A y 4-1B) se apreciaron picos con tiempos de retención entre 3-5 min, correspondientes posiblemente a los ácidos fenólicos. El perfil de absorción es característico para este tipo de compuestos, con una absorción máxima a 325 nm como se reportó para el ácido clorogénico (De Maria & Moreira, 2004).

El perfil del extracto etanólico de *V. littoralis* (Figura 4-1 C) mostró un grupo de picos de baja absorción con tiempos de retención entre 7.5-10 min en la región de alta polaridad,

10C Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

con máximos de UV a 260 nm y 290 nm, entre los cuales puede estar el ácido clorogénico, metabolito secundario reportado en *V. officinalis* (Casanova et al., 2008).

En el cromatograma para el extracto de *A. duckey* (Figura 4-1 D) se aprecia un grupo de picos de baja absorción entre 4 y 5 minutos con máximos de UV a 200 nm y 260 nm asociado a compuestos de alta polaridad, como los ácidos carboxílicos fenólicos. Para distintas especies de la familia Apocynaceae se han reportado algunos ácidos carboxílicos fenólicos C6-C3 como el ácido cafeico. El ácido clorogénico ha sido aislado de las hojas de *V. glabra* (Chan et al., 2016).

Para el extracto etanólico de *C. toxicifera* no se observaron picos de importante intensidad en la región polar (2-5 min), pero se observaron picos con tiempos de retención entre 10.0 min y 18.0 min, caracterizados por una absorción máxima a 200 nm (Figura 4-1 E).

Los extractos en los que se detectaron posiblemente ácidos carboxílicos fenólicos entre ellos ácido clorogénico se apreciaron señales a campo bajo de hidrógenos que corresponden alqueno ($H_2' = 7.59-7.73$ ppm y $H_3' = 6.38-6.54$ ppm). Además, se mostraron señales características en la región de protones aromáticos (6.96-7.21 ppm) (Figura 4-2), que confirma la presencia de anillo aromático en todas las muestras (Berregi et al., 2003; Fuloria & Fuloria, 2013; Tavares & Ferreira, 2006).

Compuestos terpenoides y esteroides

Los compuestos con estructura terpénica o esteroidea se detectaron mediante CCD, empleando como agente derivatizante el reactivo de Libermann-Burchard. Las manchas rosadas y marrones se consideraron positivas para estos compuestos. Los extractos de *C. membranacea* y *C. metensis* mostraron cuatro manchas rosadas débiles a $R_F = 0.25$; $R_F = 0.45$; $R_F = 0.6$; $R_F = 0.7$ (Tabla 4-2). Se observó en los cromatogramas por CCD para estas dos especies una mancha con $R_F = 0.45$, que puede estar asociado con la presencia de compuestos esteroidales como el patrón β -sitosterol ($R_F = 0.45$) (Tabla 4-2). Además, se apreciaron compuestos de baja polaridad, con T_r entre 40 y 60 min, región en la que se pueden encontrar terpenos y/o esteroides, estas sustancias mostraron absorción a 210 (Figura 4-3 A y B).

El extracto de *V. littoralis* muestra manchas rosadas, una con mayor intensidad a $R_F = 0.25$ y otra a $R_F = 0.45$. Los extractos de *A. duckey* y *C. toxicifera* mostraron manchas rosadas

débiles individuales a $R_F = 0.25$ y $R_F = 0.45$, respectivamente. La presencia de compuestos terpénicos y esteroides se confirmó después empleando vainillina/ácido O-fosfórico, apareciendo manchas de varios colores después del calentamiento de las placas. Además, se apreciaron en el cromatograma por CLAE-DAD picos con absorción a 210 nm en la región de baja polaridad con T_r entre 40 y 60 min (Figura 4-3 C).

Los resultados de estos ensayos por CCD soportan la presencia de compuestos terpénicos o esteroidales en los cinco extractos (Chan et al., 2016; Hernández Carvajal, 2012; Rojas et al., 2009).

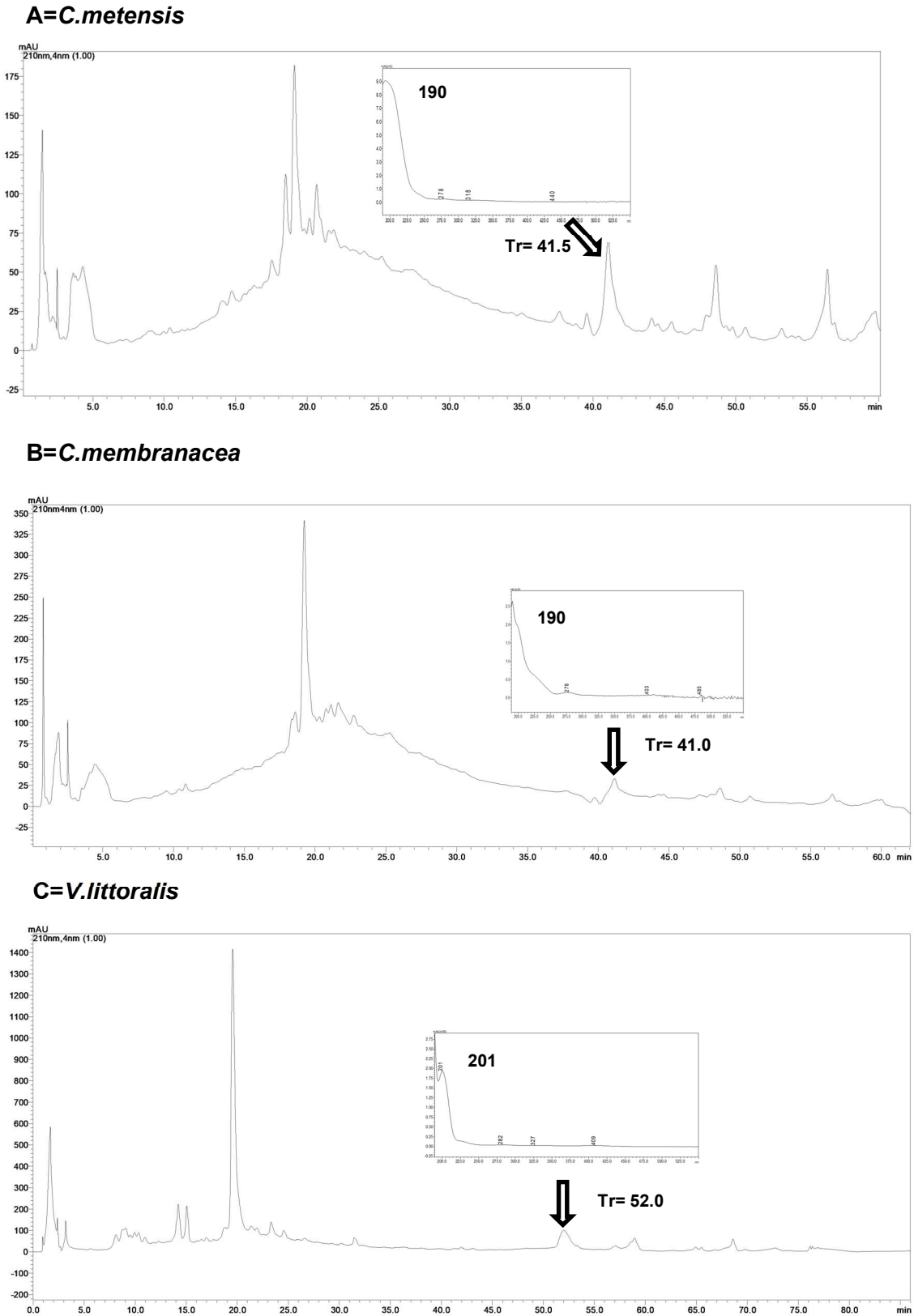
Los extractos etanólicos de *A. duckey* y *C. toxicofera* presentaron picos de baja absorción en la región apolar (60-70 min) del cromatograma (Figura 4-3 D y E), lo que podría explicarse por la baja concentración de los compuestos terpenoides y esteroidales en las muestras y la baja absorción UV de este tipo de compuestos menos polares. Sin embargo, el extracto de *V. littoralis* mostró un pico de intensidad baja con un tiempo de retención de 53.0 min (Figura 4-3 C). Además, se observaron señales en campo alto en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (entre 0 y 3 ppm), correspondientes a hidrógenos alifáticos (Figura 4-2) (Fuloria & Fuloria, 2013).

Se han reportado otros compuestos terpenoides en diferentes especies del género *Cecropia*, como el ácido torméntico (Uchôa et al., 2010). En investigaciones desarrolladas con *C. metensis* y *C. membranaceae* se obtuvieron perfiles de terpenos comparables con las muestras recolectadas en la época seca (Hernández Carvajal, 2012). El β -sitosterol podría estar presente en estas plantas, ya que se observó una mancha con el mismo color de baja intensidad y R_F similar al estándar empleado para CCD.

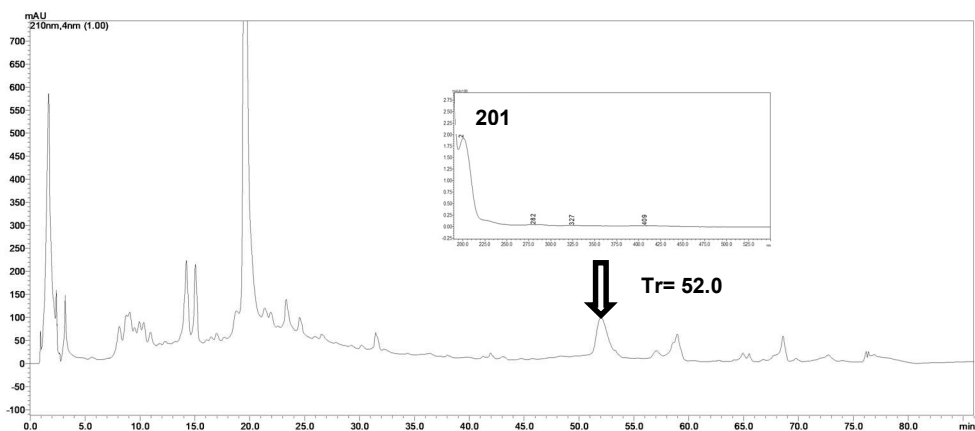
La presencia de compuestos como terpenos y esteroides detectados en esta investigación para *V. littoralis* es comparable a lo reportado para *Verbena sp.* en la que se determinó la presencia de esteroides empleando CCD y utilizando como agente derivatizante Liebermann-Burchard (García et al., 1995; Gutiérrez & Villegas, 2008). Además, se informaron algunos triterpenos en el extracto de *V. officinalis*, como el ácido 3α , 24-dihidroxi-urs-12-en-28-oico (Deepak & Handa, 1998; Shu et al., 2013).

102 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

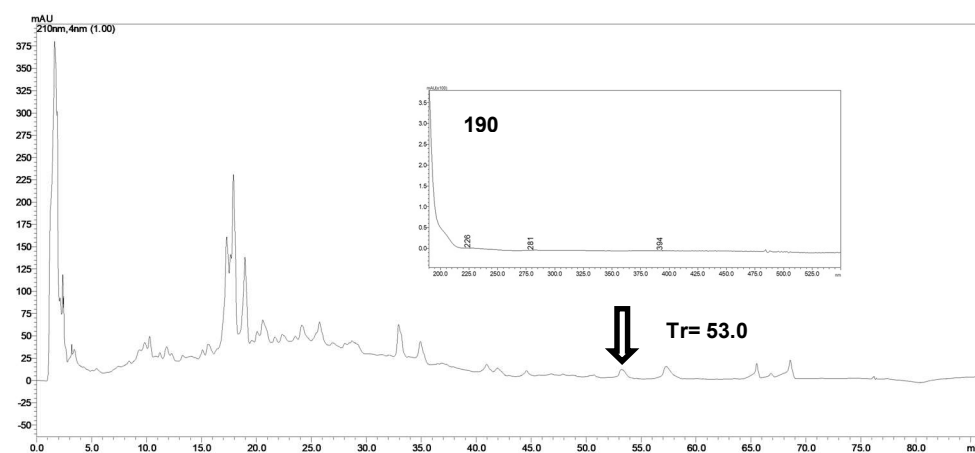
Figura 4-3: Cromatogramas CLAE-DAD de extractos etanólicos de: *C.metensis* (A), *C.membranacea* (B), *V.littoralis* (C), *A.duckey* (D) y *C.toxicofera* (E) con detección a 210 nm.



D = *A. duckey*



E= *C. toxicofera*



Para los extractos etanólicos de *A. duckey* y *C. toxicofera* las manchas de intensidad baja observadas en la placa de CCD empleando como revelador Liebermann-Burchard puede estar asociadas a la baja concentración de estos metabolitos secundarios. Empleando otro revelador vainillina / ácido O-fosfórico, se apreciaron manchas adicionales, pero igualmente, confirma la cantidad baja a moderada de compuestos esteroidales o terpenoides. En la literatura consultada en el momento de realizar el documento, no se encontró ningún informe previo de la presencia de compuestos esteroidales o terpenicos para estas especies.

Alcaloides

Como primer paso para detectar la presencia de alcaloides, se realizaron pruebas de precipitación disolviendo las muestras en ácido clorhídrico y utilizando sales de metales pesados como yoduro de potasio (reactivo de Dragendorff), yoduro de potasio-mercurio

(reactivo de Mayer) y sal de reineckato de amonio, como agentes precipitantes (Rojas et al., 2009).

Se observó abundante formación de precipitado cuando al extracto etanólico de *C. toxicofera* se puso en contacto con los reactivos de precipitación con lo cual se evidencia la presencia de alcaloides (Tabla 4-3). El resultado positivo con la prueba de reineckato de amonio sugiere la presencia de alcaloides de amonio cuaternario, entre los cuales están los alcaloides bisbencilisoquinolínicos, como (+)-tubocurarina y chodrocurarina, reportados para *C. toxicofera* y que presentan dos grupos de amonio cuaternario (Menachery, 1996). Las demás especies no mostraron precipitación, lo que sugiere la ausencia de alcaloides.

El resultado obtenido inicialmente con las pruebas de precipitación, fue confirmado por CCD utilizando reactivo de Dragendorff como agente derivatizante (Uche et al., 2017). El extracto etanólico de *C. toxicofera* mostró tres grupos de manchas anaranjadas intensas a $R_F=0.19$; $R_F=0.28$; $R_F=0.38$ (Tabla 4-2). Los resultados fueron negativos para los extractos de las otras especies. Empleando CLAE-DAD la presencia de alcaloides en *C. toxicofera* puede asociarse al grupo de compuestos con tiempos de retención entre 14.0 y 20.0 min (Figura 4-3E), estos picos mostraron una absorción máxima de 210 y 280 nm, las cuales son comparables con alcaloides BBIQS del tipo XX como (S,S)-12-O-Methyl-6'-O-demethyl-(+)-curina que presentó absorciones al UV:206, 225 y 282, (Weber & Opatz, 2019).

Estos resultados concuerdan con los reportado en la literatura sobre la presencia de alcaloide bisbencilisoquinolina en *C. toxicofera*: curina, isochondodendrina y toxicoferina (Cava et al., 1969; Ortiz, 2018). Además, los espectros de $^1\text{H-RMN}$ muestran señales en la región correspondiente a los hidrógenos de amina primaria (0.5–3.0 ppm) y señales entre (6.5–7.5 ppm) correspondientes a los protones aromáticos (Fuloria & Fuloria, 2013) (Figura 4-2).

Especies de la familia Menispermaceae distribuidas en bosques tropicales de América central y en bosques húmedos como la amazonia colombiana, se caracterizan por la presencia de alcaloides bisbencilisoquinolínicos los cuales son marcadores quimiotaxonómicos, con lo cual se justifica la alta cantidad de precipitado y la intensidad de las manchas de CCD en la evaluación de alcaloides en *C. toxicofera*, sugiere una alta concentración de este tipo de metabolitos (Hao et al., 2015; Menachery, 1996).

Para las especies de la familia Apocynaceae se reportan diversos tipos de alcaloides, son más de 2.664 alcaloides aislados a partir de 400 especies y 76 géneros. Del género *Ambelania*, como *A. occidentalis*, se reporta la presencia de alcaloides indólicos. Sin embargo, en el extracto etanólico de *A. duckey* no se detectó la presencia de alcaloides. Este resultado negativo puede estar asociado con el lugar o época de recolección o con bajas concentraciones de tales metabolitos en el extracto. Hasta el momento de escribir este documento ningún informe anterior sugiere la presencia o ausencia de alcaloides en *A. duckey* (Chan et al., 2016; Lv et al., 2020).

4.1.3 Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de los extractos etanólicos de cinco plantas con antecedentes antimaláricos

Para evaluar la posible actividad antimalárica se inició con la determinación de la actividad antiplasmodial *in vitro* frente a *P. falciparum* cepa FCR-3 en fase eritrocitaria de los extractos etanólicos brutos de las cinco especies pre-seleccionados. Con base en estos resultados y los resultantes de la evaluación de actividad hemolítica de los glóbulos rojos, se seleccionó la especie para profundizar los estudios fitoquímicos y farmacológicos, *C. toxicofera*.

Los resultados obtenidos (Tabla 4-4) evidenciaron que los extractos de *A. duckey*, *C. membranacea*, *C. metensis* y *V. littoralis* no presentaron actividad a las concentraciones evaluadas, con lo cual se estableció que el nivel de actividad es de “no activo” según criterios armonizados por la Iniciativa de Investigación sobre Métodos Antimaláricos Tradicionales (RITAM). Para *C. toxicofera*, después de realizar tres ensayos independientes, la CI_{50} fue de 7.6 ± 3.9 $\mu\text{g/mL}$, resultado que ubica este extracto en el nivel de “buena a moderada actividad” al quedar la CI_{50} en el intervalo de 1.1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Willcox et al., 2004; Hernández Carvajal, 2012; Inbaneson et al., 2012). Por lo anterior se seleccionó a *C. toxicofera* para las demás etapas del proyecto.

El extracto etanólico de *V. littoralis* no mostró actividad antiplasmodial. Este resultado es comparable con el reporte de Ruiz et al. (2011), en el cual la mezcla hidroalcohólica (7:3) de *V. littoralis* empleada por la comunidad Nanay en Loreto, Perú fue evaluado frente a *P. falciparum* cepa FCR-3 y no presentó actividad a la máxima concentración empleada

106 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

(10 µg/mL). Estos resultados no apoyan el uso tradicional de esta especie para el tratamiento de la malaria, pero tal uso podría estar relacionado con otras etapas del ciclo de vida del parásito, diferentes períodos de recolección o tipo de extracción. Estas posibilidades requerirán investigación adicional.

Tabla 4-4: Resultados del estudio antiplasmodial de los extractos etanólicos de las especies seleccionadas frente a *P. falciparum* FCR-3 CI_{50} (µg/mL), actividad hemolítica *in vitro* CH_{50} (µg/mL) e índice de selectividad.

Extractos etanólicos	Actividad Antiplasmodial CI_{50} (µg/mL) $X \pm SD$	Clasificación RITAM	Actividad Hemolítica CH_{50} (µg/mL)	Relación CH_{50}/CI_{50}
<i>C. toxicofera</i>	7.6 ± 3.9***	Bueno a moderado	>1000	> 132
<i>A. duckey</i> Mark	>100*	No activo	259	> 3
<i>V. littoralis</i>	>100**	No activo	>1000	> 10
<i>C. metensis</i>	>100**	No activo	>1000	> 10
<i>C. membranacea</i>	>100**	No activo	>1000	> 10

* Datos de un experimento ** Datos de dos experimentos independientes

*** Datos de tres experimentos independientes

Distintas especies de la familia Apocynaceae como *Ambelania. macrophylla*, *Ambelania. scholaris*, *Ambelania. Occidentalis*, *Catharanthus gigantea*, *Catharanthus procera* y *Catharanthus roseus* presentan estudios que les atribuyen actividad antimalárica, la cual es asociada a metabolitos secundarios como vincamina y 14-epi-vincamina, alcaloides reportados para *Ambelania occidentalis*. Para *A. duckey*, especie vegetal utilizada en esta investigación, no se evidenció actividad antiplasmodial, este resultado puede estar asociado a la ausencia de alcaloides, metabolitos secundarios a los cuales se les atribuye la actividad antiplasmodial para este género (Ayyad et al., 2012; Chan et al., 2016).

Los extractos etanólicos de *C. metensis* y *C. membranacea*, recolectadas en época seca no mostraron actividad antiplasmodial *in vitro* contra *P. falciparum*, cepa FCR-3, en las condiciones evaluadas, cuya concentración máxima fue 100 µg/mL. En trabajos anteriores, se evaluó la actividad antiplasmodial *in vitro* de extractos etanólicos de estas dos especies, recolectados en la época de lluviosa, con resultados similares. Sin embargo, las fracciones

de acetato de etilo obtenidas de los extractos etanólicos de estas dos especies de *Cecropia* colectadas en la época lluviosa, en las que se detectaron flavonoides y terpenos, mostraron actividad antiplasmodial moderada. En otras especies del género *Cecropia* se estableció la actividad antiplasmodial, como en *C. pachystachya*, cuyo resultado está asociada a la presencia del ácido tormentico y al β -sitosterol (Hernández Carvajal, 2012; Uchôa et al., 2010).

El extracto etanólico de *C. toxicofera* mostró actividad antiplasmodial *in vitro*, en un rango de actividad de bueno a moderado, este resultado sugiere que la actividad biológica puede estar asociada a la presencia de alcaloides BBIQS como los detectados para *C. toxicofera* en este trabajo. Alcaloides bisbencilisoquinolina como cycleanina, cycleanina N-oxido curina, isochondodendrina y cocsolina han presentado actividad antimalárica *in vitro* en diferentes investigaciones (Lohombo-Ekomba et al., 2004; Otshudi et al., 2005; Uzor, 2020).

En *C. toxicofera* se han reportado los alcaloides BBIQS: (-) - curina, (+) - isochondodendrina, (-) toxicoferina o una mezcla 1:1 de (-) - curina y (-) - tubocurina. Otros alcaloides BBIQS han sido reportado en distintas especies de la familia Menispermace, tales como norstefasubina, fangquinolina, hernandezina, picnamina, berbamina e isotetrandrina, los cuales han presentado actividad antiplasmodial frente *P. falciparum* (Mambu et al., 2000; Otshudi et al., 2005).

La comunidad indígena Ziora Amena (Amazonas Colombia), utiliza lianas de *C. toxicofera* para preparar un remedio tradicional acuoso, empleado en el tratamiento de la malaria. Este remedio fue evaluado para confirmar la actividad antiplasmodial *in vitro*, registrando una $IC_{50} = 6.56 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ (Rodríguez Parra, 2015). La actividad antiplasmodial reportada para el remedio acuoso es comparable con el resultado obtenido en esta investigación para el extracto etanólico de *C. toxicofera* cuya IC_{50} fue $7.6 \pm 3.9 \text{ Cl}_{50} \mu\text{g/mL}$. Esta información contribuye a la validación de la actividad del remedio antimalárico tradicional.

4.1.4 Evaluación de la actividad hemolítica de los extractos etanólicos.

Los resultados de la actividad hemolítica indican que la mayoría de los extractos presentan una concentración hemolítica (CH_{50}) $>1000 \mu\text{g/mL}$, 10 veces mayor que la concentración

máxima evaluada en los ensayos antiplasmodiales *in vitro* con *P. falciparum* (Tabla 4-4). Por lo tanto, las concentraciones máximas utilizadas en la prueba no afectaron la integridad de las membranas de los eritrocitos parasitados y no parasitados.

Los resultados en la relación entre CH_{50} y CI_{50} fueron superiores a 10 para *C. membranacea*, *C. metensis* y *V. littoralis* y para *A. duckey* la relación fue mayor a tres, expresando el menor riesgo de hemolisis. Estos extractos etanólicos no presentaron actividad antiplasmodial por lo tanto fueron descartados para continuar estudios de profundización. Para el extracto etanólico de *C. toxicofera* la relación fue de 132 lo que permite establecer que el efecto antiplasmodial se debe a la actividad del extracto directo sobre el parásito y no indirecto sobre el glóbulo rojo que alberga al parásito, sin afectar la integridad de los eritrocitos.

Los resultados de la actividad antiplasmodial y actividad hemolítica de los cinco extractos etanólicos, correspondientes a las plantas previamente preseleccionadas, por presentar antecedentes de actividad antimalárica, permitió seleccionar a *C. toxicofera* ya que presentó actividad antiplasmodial y el menor riesgo de hemolisis para continuar con las demás etapas del proyecto, que incluye la evaluación antimalárica *in vivo* y la realización de la caracterización fitoquímica adicional. De esta etapa del proyecto se escribió el manuscrito que se muestra en el Anexo G.

4.2. ENSAYOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE *Curarea toxicofera*

4.2.1 Material vegetal molido de *C. toxicofera*

El material vegetal molido de *C. toxicofera*, planta seleccionada para continuar los estudios químicos y biológicos, presentó olor levemente aromático y sabor amargo. Su color es marrón amarillento y se evidencian fragmentos marrón oscuros, provenientes de la corteza. Como se observa en la Tabla 4-5 el 53.10% del material vegetal previamente molido en licuadora colectada en invierno-ecológico quedó retenido entre los tamices 30 (apertura de malla 500 μ m) y 60 (apertura 250 μ m), por lo tanto, se decidió reunir el contenido de los tres tamices (226.912g), una vez que no tenía ni partículas muy gruesas ni muy finas. La

mezcla del material vegetal en polvo puede ser clasificado como moderadamente grueso (710 μm /250 μm) (Tasso de Souza et al., 2005; WHO, 2011). Este tamaño de partícula es reportado por la farmacopea Brasileira para la producción de extractos primarios a partir de droga vegetal (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brazil) & Fundação Oswaldo Cruz, 2010).

Tabla 4-5: Evaluación tamaño de partícula del material vegetal molido de *C. toxicofera* empleando diferentes tamices con diferente grado de apertura de malla.

Número Tamiz	Abertura en μm	Abertura en pulgadas	material retenido (g)	% de muestra
20	850	0.331	81.153	19.0
30	500	0.023	65.246	11.5
40	425	0.165	49.353	15.3
60	250	0.098	112.313	26.3
80	180	0.070	32.389	7.6
Recolector	-----	-----	70.890	16.6

4.2.2 Estudio de la variación química y de la actividad antiplasmodial del extracto etanólico de *C. toxicofera* colectada en las épocas de verano e invierno ecológico.

La presencia o ausencia de metabolitos secundarios o los cambios en la concentración de estas sustancias, puede estar asociado a distintos factores, como condiciones ambientales (deficiencia en nutrientes o falta de agua), cambios ecológicos o época estacional. Para plantas medicinales es importante determinar la época de colecta, ya que a partir de esta información se puede estimar el tiempo en el cual se debe realizar la colecta del material vegetal, para que presente los metabolitos secundarios de interés farmacológicos con la mejor concentración.

Una vez seleccionada *C. toxicofera* como la especie para continuar la investigación, se consideró conveniente hacer un estudio con material vegetal colectado en dos épocas del año (invierno ecológico y verano-ecológico) con el fin de evaluar la presencia o ausencia

11C Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

de alcaloides, metabolitos secundarios asociados a la actividad antimalárica en distintas especies de género *Curarea* (Menachery, 1996; Weber & Opatz, 2019).

En la Tabla 4-6 se registran los rendimientos obtenidos para el extracto etanólico a partir de lianas de *C. toxicofera* colectadas en invierno ecológico (11.42%) y en verano ecológico (11.65%), la similitud de estos resultados posiblemente está asociada con el hecho que en la región Amazónica se presenta una condición ambiental particular de bosques lluviosos tropicales con un corto período seco y poca entrada de luz para plantas como arbustos y lianas, estos aspectos ecológicos y climáticos hacen que el ambiente de crecimiento de *C. toxicofera* no se modifique drásticamente en el año (Ortiz, 2018; CorpoAmazonia, 2022).

Tabla 4-6: Rendimiento del extracto etanólico de *C. toxicofera* en diferente época de colecta.

Nombre especie vegetal	Época de colecta/Fecha	Peso de material molido (g)	Peso de extracto seco (g)	Rendimiento (%)
<i>Curarea toxicofera</i>	Invierno ecológico (25-06-2016)	150.22	17.15	11.42
	Verano ecológico (11-27-2017)	150.20	17.50	11.65

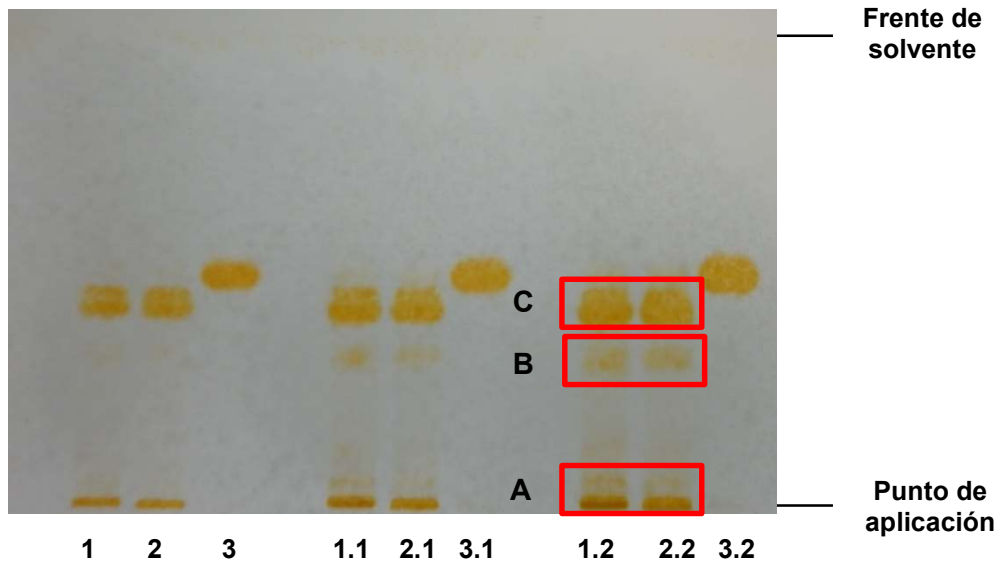
Análisis por CCD de los extractos etanólicos de *C. toxicofera*

El resultado observado en CCD empleando Dragendorff para cromatografía como revelador (Figura 4-4), permitió establecer una similitud en los perfiles cromatográficos en cuanto a la presencia de alcaloides en las dos épocas del año. Las manchas color naranja más intensas se evidencian al emplear volúmenes de 10 y μL 15 μL , las cuales se distribuyen en tres grupos de alcaloides (A= polar ($R_f = 0.02$); B=mediana alta polaridad ($R_f = 0.3$); C= mediana baja polaridad ($R_f = 0.4$)). La aplicación de 5 μL de solución 20 mg/mL genera perfiles en los cuales no se visualizan todas las manchas, por lo que se recomienda aplicar entre 10 y 15 μL de solución de extracto. El tipo de mancha y la coloración son semejantes al patrón utilizado tetrandrina, con lo cual se pueden sugerir la

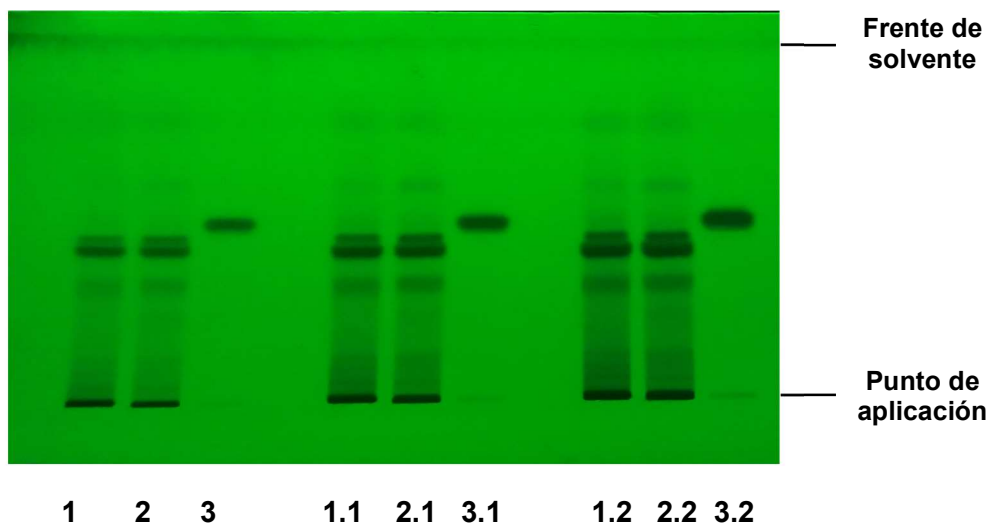
presencia de alcaloides BBIQS en los extractos etanólicos de *C. toxicofera*. La visualización a 365 nm, de las muestras desarrolladas antes de la derivatización, establece un perfil para los compuestos no alcaloidales.

Figura 4-4: Análisis por CCD de los extractos etanólicos de *C. toxicofera* colectada en diferente época del año.

Perfil cromatográfico por CCD de *C. toxicofera*. Observación: visible



Perfil cromatográfico por CCD de *C. toxicofera*. Observación: $\lambda = 366$



1: *C. toxicofera*: época invierno-ecológico 5 μ L; 2: *C. toxicofera* época verano-ecológico 5 μ L 3: Tetandrina 5 μ L
 1.1: *C. toxicofera* época invierno-ecológico 10 μ L; 2.1: *C. toxicofera* época verano-ecológico 10 μ L
 3.1: Tetandrina 10 μ L
 1.2: *C. toxicofera* época invierno-ecológico 15 μ L; 2.2: *C. toxicofera* época verano-ecológico 15 μ L
 3.2: Tetandrina 15 μ L

Fase móvil: Metanol (4)-Tolueno (0.5)-Acetato de etilo (9)-Dietilamina (0.5)

Muestras: 20mg/mL en metanol A: Revelador: Dragendorff para CCD B: Observación a 365 nm.

112 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo diodos (CLAE-DAD)

Los extractos etanólicos obtenidos de lianas de *C. toxicofera* se analizaron empleando CLAE-DAD a dos longitudes de onda 210 y 280 nm. Estas longitudes de onda se escogieron, ya que los alcaloides BBIQS presentan máximos de absorción entre 210-225 y a 280 nm (Guha et al., 1979). Se emplearon las mismas condiciones cromatográficas por CLAE-DAD, utilizadas para obtener los perfiles de extractos etanólicos de *C. toxicofera*. En la Tabla 4-7, se listan los Tr para los 13 picos con mayor intensidad para evaluar el efecto época de colecta del extracto etanólico de *C. toxicofera*, en los perfiles obtenidos a las dos longitudes de onda.

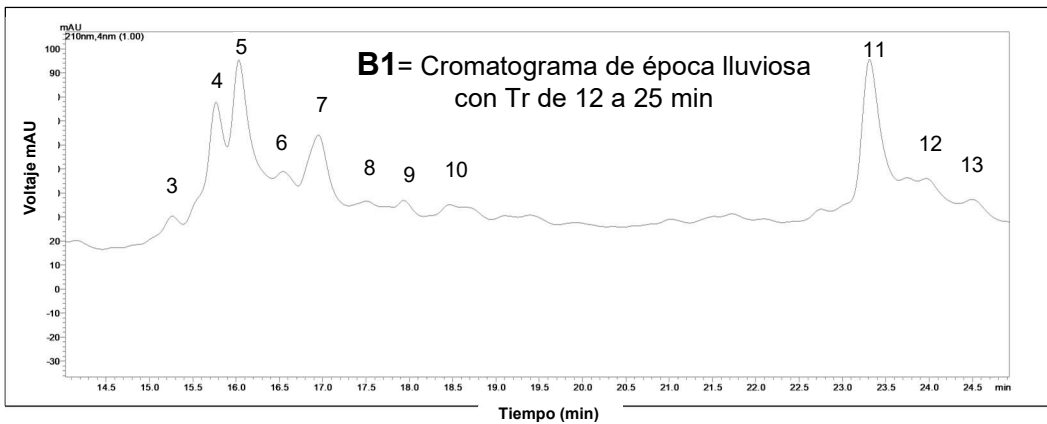
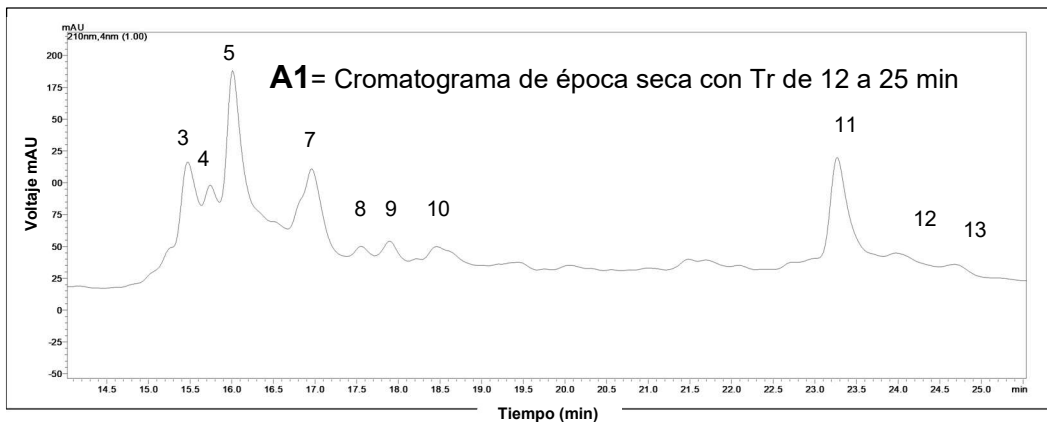
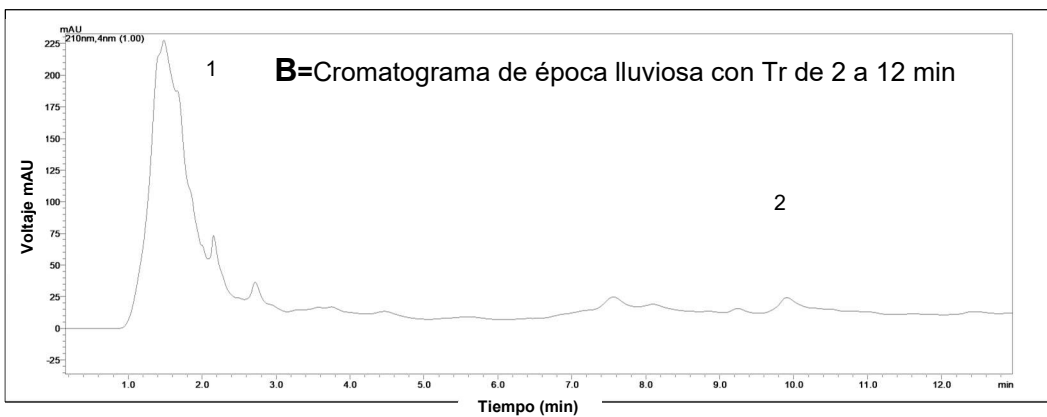
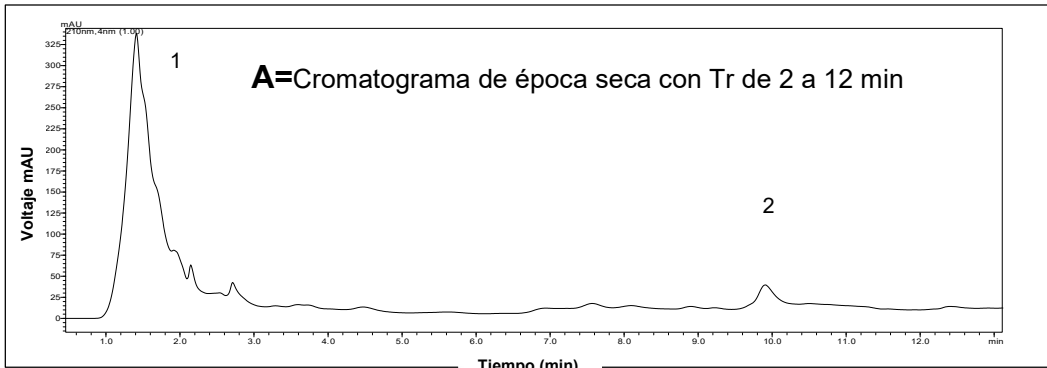
Los resultados permitieron establecer que el pico 6 (P6) de Tr=16.5 min empleando la longitud de onda 210 y 280 nm, se presenta en el extracto etanólico correspondiente al invierno ecológico y está ausente la época de verano ecológico. Además, los picos 12 y 13 a una longitud de onda de 280 nm que se presentan en el extracto etanólico en verano ecológico están ausentes en invierno ecológico, esto puede estar asociado a compuestos de mediana polaridad con mayores sistemas de conjugación. Los picos restantes se conservan en el extracto etanólico de *C. toxicofera*, colectada en las dos épocas del año (Tabla 4-7 y Figura 4-5). Es importante mencionar que la evaluación de cada pico por UV permitió establecer que los espectros de los picos P2 a P11 presentaron absorciones a 210 y 280 nm características para alcaloides BBIQS (Anexo H).

Tabla 4-7: Tiempo de retención y porcentaje de área del extracto etanólico de *C. toxicofera* en diferente época de colecta.

Longitud de onda (nm)	Época de Colecta	Tiempo de retención/Área (%)												
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
210	Época seca	1.4	9.9	15.5	15.7	16.0	*	16.9	17.5	17.8	18.4	23.3	23.9	24.7
		18.0	1.8	4.8	2.1	8.0		5.3	1.4	1.7	2.7	5.75	2.2	1.9
210	Época lluviosa	1.4	9.9	15.3	15.7	16.0	16.5	16.9	17.5	17.9	18.4	23.3	23.9	24.5
		22.5	1.3	1.0	3.0	4.0	1.5	3.0	1.1	1.0	1.0	4.0	1.2	0.7
280	Época seca	1.5	9.9	15.2	15.5	16.0	*	16.9	17.5	17.9	18.4	23.3	24.0	24.7
		6.3	4.0	2.0	3.9	3.0		3.4	1.01	1.1	4.4	16.8	4.0	3.0
280	Época lluviosa	1.5	9.9	15.2	15.7	16.0	16.5	16.9	17.5	17.9	18.4	23.5	*	*
		3.7	2.4	1.3	2.5	2.6	0.8	2.3	1.9	1.8	4.0	27.4		

* No detectado

Figura 4-5: Perfiles cromatográficos por CLAE-DAD del extracto etanólico de lianas de *C. toxicofera* colectada en diferente época del año. $\lambda=210$ nm.



114 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

El pico de mayor intensidad, que eluyó a tiempo de retención de 1.4 min, no presentó el espectro UV característicos para los alcaloides BBIQS (Figura 4-5). Las similitudes entre los perfiles por CLAE para los extractos obtenidos a partir de material vegetal colectado en época de verano e invierno ecológico, (Figura 4-5) concuerdan con lo encontrado en CCD (Figura 4-4).

El pico (P2) de $T_r = 9.9$ min que aparece en la región de mayor polaridad del cromatograma puede corresponder a los alcaloides con $R_f = 0.1$ en CCD (grupo A). Los picos (P5-P10) de $T_r = 16.0-18.4$ min son alcaloides de polaridad intermedia, que presentan una mayor absorción en CLAE-DAD, estos alcaloides son comparables con lo observado por CCD a $R_f = 0.3$ (grupo B). Los picos (P11-P13) que aparecen en la región del cromatograma con $T_r = 23.3-24.7$ corresponden a los alcaloides de menor polaridad pudiendo asociarse en el perfil por CCD con las manchas con $R_f = 0.5$ (grupo C).

Algunos estudios reportan la importancia de establecer la incidencia de la fitofenología en la época de colecta. Para *Hydrastis canadensis* L., planta que presenta alcaloides BBIQS como berberina, hydrastina y canadina, se recomienda hacer su colecta a fines del verano o del invierno ya que en esta época en plantas cultivadas de cinco años se apreció los mayores rendimientos y contenidos de alcaloides (Douglas et al., 2010; Zuiderveen et al., 2021). Otra investigación en la que se estudia el efecto de época de colecta sobre la concentración de metabolitos secundarios como alcaloides empleó las hojas de *Catharanthus roseus*, que presenta alcaloides indólicos, vinblastina y vincristina, el contenido de estos alcaloides es mayor en época de verano en el mes de junio y disminuye en los otros meses en el año especialmente en invierno y primavera (Mall et al., 2019).

El estudio cromatográfico por CLAE para el extracto etanólico de *C. toxicifera*, colectada en las dos épocas del año permite establecer que a longitud de onda de 210 y 280 la cantidad de señales y sus intensidades de absorbancia son semejantes, estos resultados muestran concordancia con los datos observados por CCD que indican la presencia de alcaloides BBIQS con diferente polaridad.

Análisis de actividad antiplasmodial de los extractos etanólicos de *C. toxicofera* colectada en diferente época del año.

Los resultados de la actividad antiplasmodial de los extractos etanólicos de *C. toxicofera* obtenidos a partir de material vegetal colectado en época de invierno y verano ecológicos se observan en la Tabla 4-8.

Tabla 4-8: Actividad antiplasmodial de los extractos etanólicos de lianas de *C. toxicofera* colectadas en diferente época del año.

Muestra: Extracto etanólico <i>C. toxicofera</i>	Actividad Antiplasmodial Cl₅₀ (µg/mL)	Clasificación RITAM
Época lluviosa (Invierno ecológico)	7.0* ±5.37	Bueno a moderado (Cl ₅₀ = 1.1 -10 µg/mL)
Época seca (Verano ecológico)	8.65**	Bueno a moderado (Cl ₅₀ = 1.1 -10 µg/mL)

* Datos de dos experimentos independientes; **Dato de un experimento independiente

Estos resultados permitieron establecer que la actividad antiplasmodial no se ve afectada por la época de colecta, lo cual era de esperarse ya que los perfiles cromatográficos por CCD y CLAE fueron semejantes, lo que sugiere que los compuestos del tipo alcaloide BBIQS, que están asociados a la actividad antiplasmodial, están presentes en las dos épocas de colecta y conservan su contenido en la muestra evaluada.

En otras investigaciones se reportan variaciones en la actividad asociada a colectas en diferentes meses del año. Como ejemplo de ello está el caso de *Cyrtanthus contractus*, especie para la cual se evidenció que el extracto etanólico obtenido de los bulbos colectados en los diferentes meses del año, mostró buena actividad antibacteriana en los meses de mayo y julio, resultado asociado con el alto contenido de alcaloides. Además, se evaluó la propiedad citotóxica de los extractos etanólicos mes a mes y se concluyó que los extractos correspondientes a las colectas de junio y noviembre evidenciaron el menor contenido de alcaloides y fueron los menos tóxicos frente a todas las líneas de cáncer evaluadas (Ncube et al., 2015).

Los resultados obtenidos en esta investigación con el extracto etanólico de lianas de *C. toxicofera* colectadas en época seca y lluviosa, permiten proponer que la época de colecta no afecta la actividad antimalárica, porque la composición en cuanto a los metabolitos secundarios, alcaloides BBIQS, posiblemente responsables de la actividad antimalárica, es similar.

4.3 FRACCIONAMIENTO ÁCIDO-BASE DEL EXTRACTO ETANÓLICO *C. toxicofera*

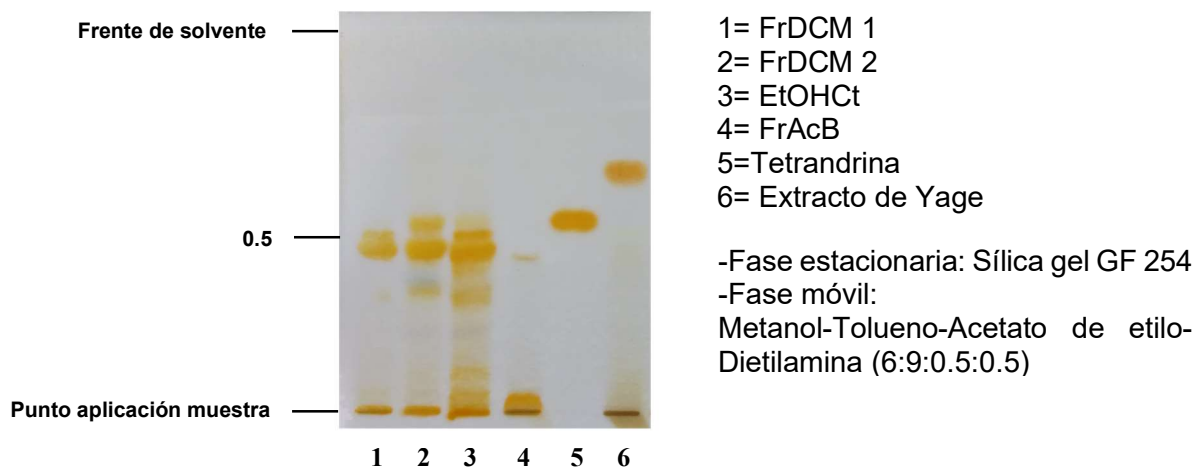
El extracto etanólico de *C. toxicofera* se fraccionó mediante el método ácido-base, orientado a separar alcaloides. Inicialmente se observa una mezcla compleja de alcaloides en el EtOH_{Ct}, que de acuerdo con la CCD (Figura 4-6), incluye tres grupos de alcaloides de diferentes polaridades: unos de alta polaridad, otros de mediana y finalmente un grupo de menor polaridad.

En el fraccionamiento se emplea una solución de HCl 0.1N, con lo cual se espera que los alcaloides alcancen su forma de sal y sean solubles en medio acuoso (FrAcA), sin embargo, los alcaloides BBIQS, aunque poseen nitrógeno como amina terciaria, tienen varios hidroxilos fenólicos, por lo que estos alcaloides se pueden presentar en el extracto etanólico como fenóxidos. En medio ácido, la mayoría de las aminas alcanzan la forma de sal del alcaloide, pero según su pKa algunos alcaloides se mantiene como fenóxido y otros como fenol, por lo cual estos compuestos se dividen entre la fracción acuosa y la fracción en solventes orgánicos como el diclorometano (Galindo, 1983). En el fraccionamiento ácido – base del extracto etanólico de *C. toxicofera*, los alcaloides se dividieron entre las fracciones FrDCM1, FrDCM2 y FrAcB.

La fracción FrDCM1, con peso de 0.712 g (7.1% p/p), mostró por análisis cromatográfico en CCD (Figura 4-6) una mezcla de alcaloides de mediana polaridad, con relación a los grupos observados en el extracto etanólico que presentaron manchas de color naranja intenso al ser derivatizadas con reactivo de Dragendorff. La fracción FrDCM2 presentó un peso de 1.18 g (11.8% p/p). En esta fracción se aprecian tres grupos de alcaloides: de alta, mediana y baja polaridad (Figura 4-6). Finalmente, la FrAcB con peso de 7.97 g (79.8% p/p), fue la de mayor rendimiento. Como se esperaba, el grupo de alcaloides de esta fracción fueron los más polares (Figura 4-6). Es importante reportar que en el fraccionamiento se recuperó 98.6% p/p de la muestra.

En las CCD se empleó el extracto de Yage como patrón para confirmar la aparición de la coloración naranja en las condiciones de derivatización utilizada. En cuando la tetrandrina se empleó con el objetivo de observar el comportamiento colorimétrico y desplazamiento en la placa a partir de su estructura como alcaloide BBIQ.

Figura 4-6: Perfiles cromatográficos por CCD del extracto etanólico de *Curarea toxicofera* y de las fracciones obtenidas por separación ácido-base.



4.3.1 Caracterización fitoquímica por CCD, CLAE-DAD y CLUE-DAD de los extractos y fracciones *C. toxicofera*

Para adelantar la caracterización fitoquímica por CCD, CLAE y CLUE-DAD se partió de las condiciones reportadas en la literatura, las cuales fueron modificadas has obtener adecuados sistemas de elución para establecer los perfiles cromatográficos. Estas condiciones se describen en el numeral 3.3.5.

El extracto etanólico y todas las fracciones alcaloides obtenidas de *C. toxicofera*, fueron evaluadas mediante CCD, utilizando el revelador Dragendorff mostrando manchas anaranjadas intensas y visibles para CCD (Figura 4-6), este revelador ha sido utilizado en otras investigaciones en la detección de alcaloides BBIQS (Garcia et al., 2015). Para el extracto etanólico de *C. toxicofera* se observan grupos de alcaloides de alta a mediana polaridad con $R_f=0.10, 0.30, 0.40, 0.45$ y 0.50 . La fracción orgánica FrDCM 1 presentó dos grupos de alcaloides de mediana polaridad de $R_f=0.45$ y 0.50 . Para la fracción FrDCM 2 se observan tres grupos de alcaloides principalmente de $R_f=0.30, 0.45$ y 0.50 En la fracción acuosa básica residual (FrAcB) se evidenció principalmente un grupo de alcaloides polares con $R_f=0.10$. Esta fracción presentó la menor cantidad de grupos de alcaloides BBIQS (Figura 4-6). Se empleó un extracto de Yagé con el objetivo de realizar un control de la coloración en CCD ya que este el extracto presenta alcaloides con nitrógeno heterocíclico

118 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

como harmalina y harmina. El alcaloide tetrandrina es un alcaloide BBIQ, con el cual se puede estimar la coloración y el desplazamiento en la placa de CCD.

Los perfiles cromatográficos por CLAE-DAD para el extracto etanólico y fracciones alcaloidales de *C. toxicofera* se presentan en la Figura 4-7. Para su análisis fueron tenidos en cuenta los tiempos de retención, la absorción a las longitudes de onda trabajadas (220, 254 y 280 nm) y los espectros UV con absorción de 210-220 y 280 características de alcaloides BBIQS (Omole et al., 2014; Garcia et al., 2015), además de los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar.

En los perfiles cromatográficos por CLAE-DAD del EtOHct se observaron dos grupos de compuestos, principalmente en la región de alta polaridad, el P1 y P2 con $Tr=2.4$ min y $Tr=2.7$ min respectivamente, de buena absorción a 220 nm (Figura 4-7A). Estos picos coinciden con las manchas observadas en CCD para alcaloides polares de $R_f= 0.1$ (Figura 4-6). En la región de mediana polaridad se evidenció el P3 de base ancha de $Tr=7.5$ min, (Figura 4-7A), el cual puede corresponder a un grupo de alcaloides de tiempo de retención cercanos que hacen que se solapen entre sí, así como a los compuestos de manchas naranja de $R_f= 0.30, 0.40$ y 0.50 .

Para la fracción FrDCM1 se observaron dos picos con la mayor absorción, uno de ellos el P1 en la región polar de $Tr = 2.7$ min y el P2 en la región de mediana polaridad $Tr = 7.2$ min (Figura 4-7B), este último pico puede corresponder a las manchas de $R_f= 0.45$ y 0.50 en CCD. Esta fracción es de menor complejidad en comparación con el extracto.

En la fracción FrDCM2 se apreciaron principalmente compuestos de alta polaridad con Tr entre 1.5 y 4.0 min. En la región de media-alta polaridad, se observaron dos picos importantes por su simetría y absorción, el P1 con $Tr=7.0$ min y P2 con $Tr=10.0$ min (Figura 4-7C). Estos picos pueden corresponder respectivamente a las manchas de $R_f= 0.45$ y 0.50 en CCD. En esta fracción se aprecia una mejor separación de los picos en la región de mediana polaridad. Los P3 ($Tr=15$ min) y P4 ($Tr=19.4$ min) pueden estar asociados al grupo de compuestos en CCD de $R_f=0.5$.

La fracción FrAcB presentó los picos en la región de mayor polaridad (P1 y P2) con $Tr=2.4$ y 2.7 min, que puede corresponder a los alcaloides BBIQS polares. Este grupo de

alcaloides corresponde a los compuestos en CCD con $R_f=0.1$. En la región de mediana polaridad se apreció el P3 con $T_r= 7.9$ min (Figura 4-7D).

El espectro UV de los picos seleccionados para el análisis de los cromatogramas en las regiones de alta y mediana polaridad, en las fracciones evaluadas, corresponden a lo reportado para los alcaloides BBIQS con una absorción máxima de 210 a 220 y 280 nm (Guha et al., 1979).

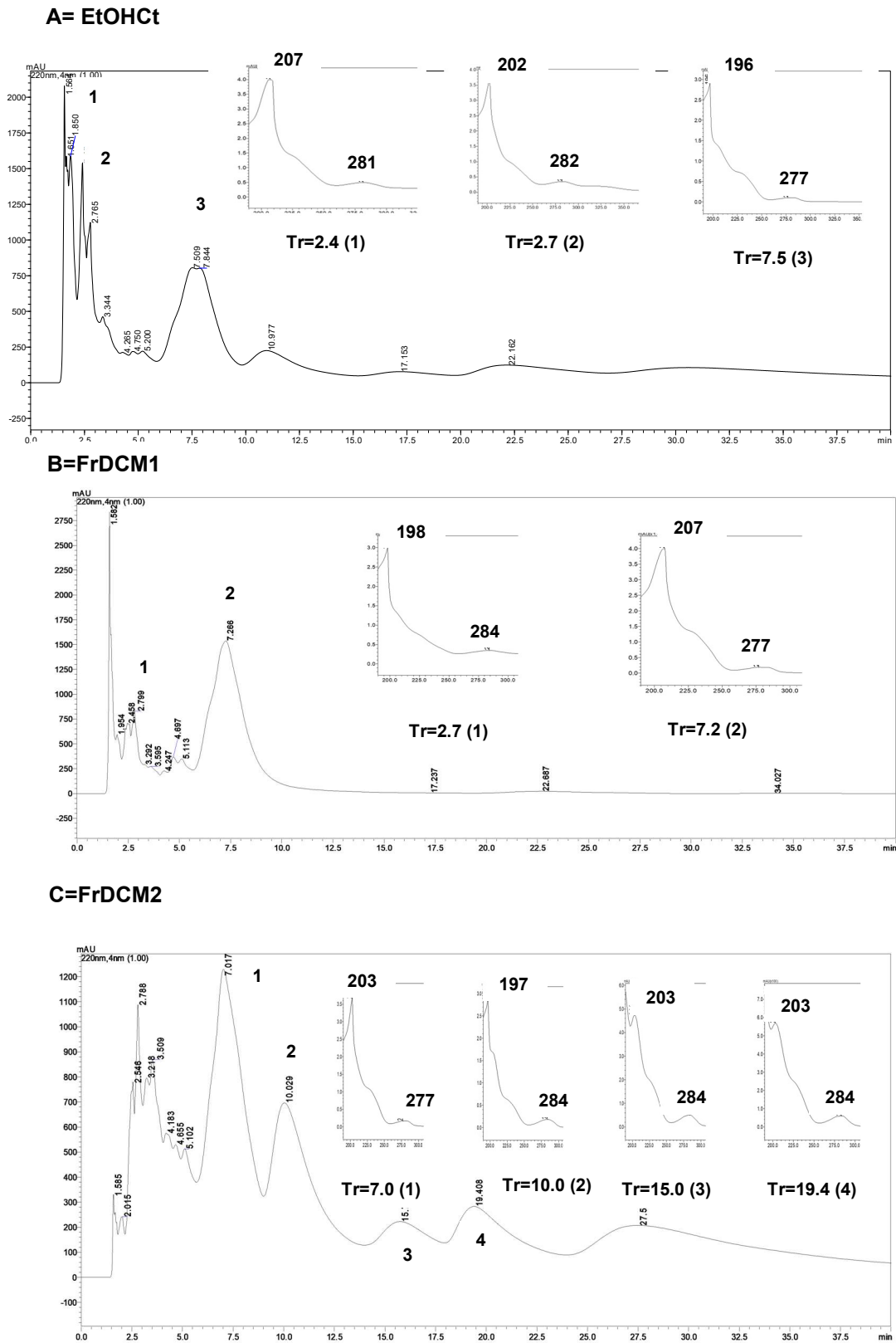
Este comportamiento en el perfil cromatográfico por CLAE-DAD es coincidente a lo observado en CCD. La presencia de compuestos con tiempos de retención cercanos se puede entender a partir de la estructura de los alcaloides BBIQS, ya que se conserva la estructura fundamental (dos núcleos de bencilisoquinolina unidas por enlaces éter) que difieren en el patrón de sustituyentes oxigenados (OH, OMe, OCH_2O), con lo cual se cambiaría ligeramente el grado de polaridad de los alcaloides BBIQS. Por ejemplo al comparar dos alcaloides BBISQ, isochondodendrina cuyos sustituyentes en posición 6=OMe;7=OH; 11'=OH y 12''=OMe y ciclianina cuyos sustituyentes son 6=OMe;7= OMe; 11'= OMe y 12''=OMe, lo que hace que ciclianina sea un alcaloide BBISQ menos polar (Guha et al., 1979; Menachery, 1996; Schiff, 1985).

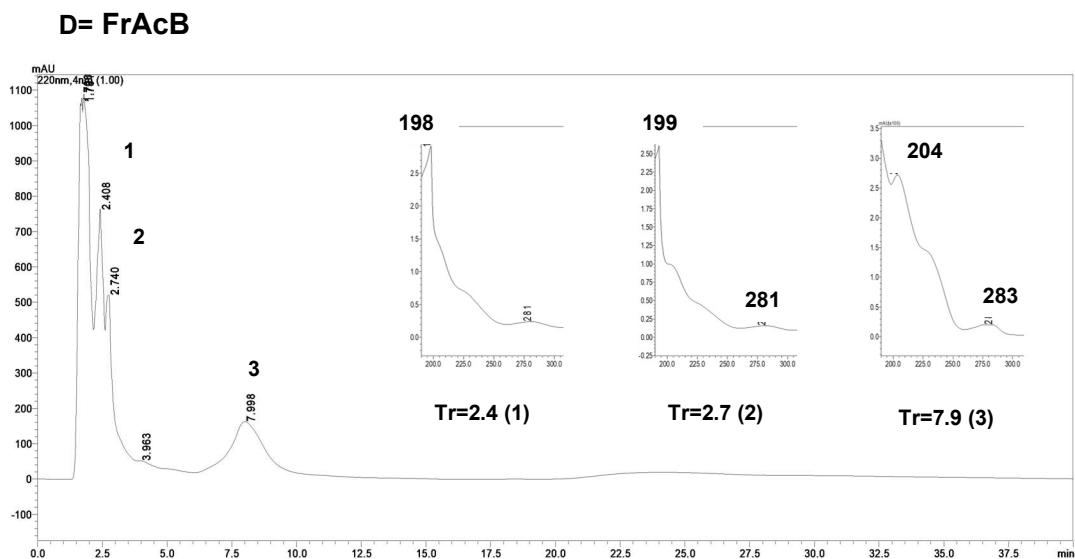
Los resultados en los perfiles cromatográficos permiten predecir la presencia de alcaloides de amina secundarios y terciarios, como son los alcaloides reportados para distintas especies del género *Curarea*, entre ellos, curina, tubocurarina, coclaurina, lindoldhamina (Malca Garcia et al., 2015; Menachery, 1996; Ortiz, 2018).

Complementando el estudio cromatográfico del extracto etanólico y las fracciones alcaloidales obtenidas de *C.toxicofera*, se empleó CLUE-DAD para analizar las fracciones FrDCM1 (Figura 4-8a) y FrDCM2 (Figura 4-8b) a una longitud de 280 nm, característica de alcaloides BBIQS y una fase móvil con ácido buscando estabilidad de los grupos fenólicos presentes en los alcaloides BBIQS (Sun et al., 1998). Además, se empleó a tetrandrina, alcaloide BBIQ, como patrón de referencia para realizar las comparaciones (Figura 4-8c). Para la fracción FrDCM1 se observaron picos de mayor absorción en la región polar con $T_r= 2.2$ y picos de mediana polaridad con T_r de 4.6 y 8.9 min.

12C Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

Figura 4-7: Perfiles cromatográficos por CLAE-DAD del extracto etanólico y fracciones de *Curarea toxicifera*. A. EtOHct; B. FrDCM1 C. FrDCM2; D. FrAcB.



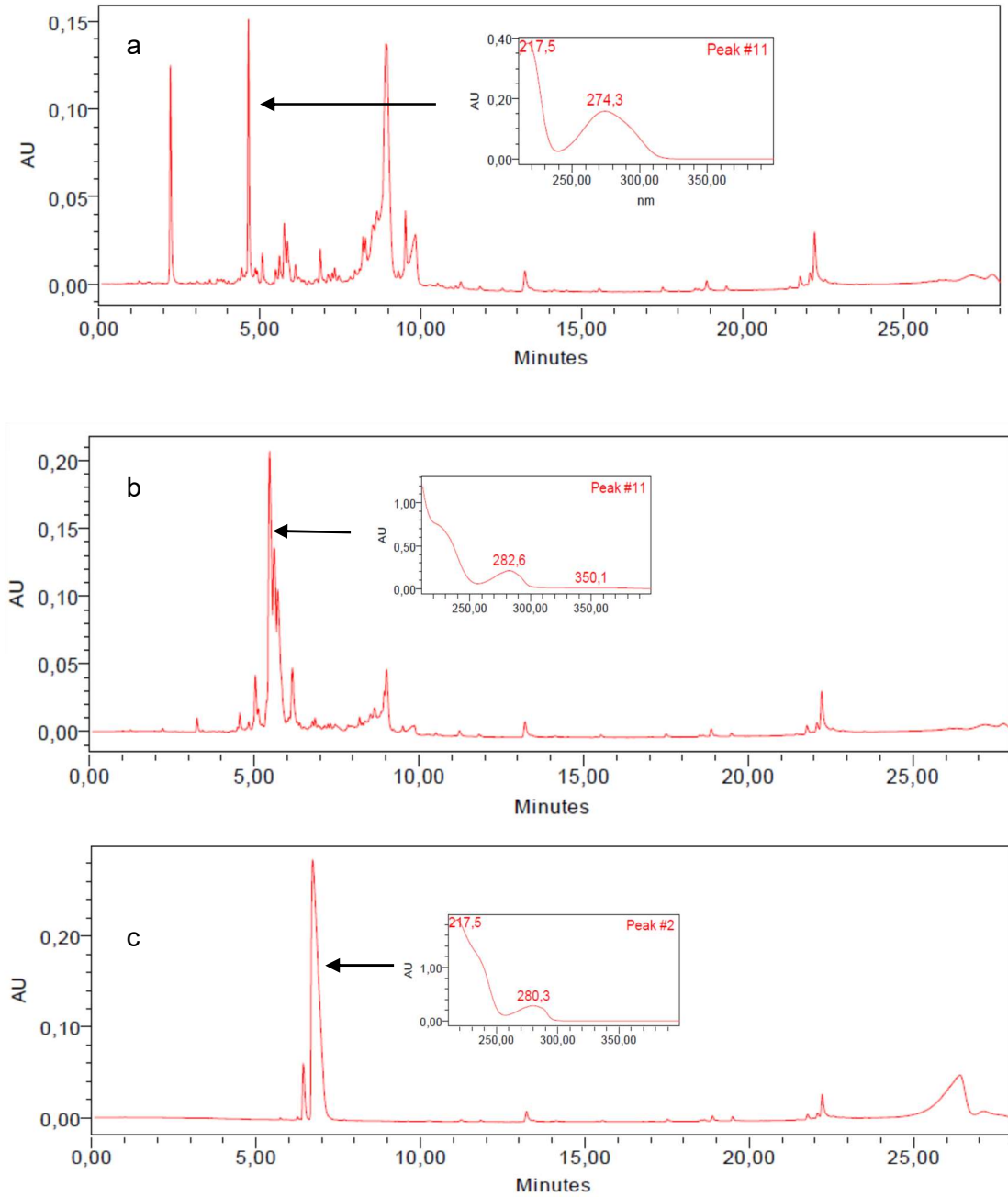


En cuanto la fracción FrDCM2 los picos de mayor absorción se apreciaron en la región de mediana polaridad con Tr de 5.0, 5.5, 5.6, 5.7, 6.2 y 9.0 min. En el cromatograma de la tetrandrina se apreció un pico de Tr (7.0 min) y su espectro UV (217 y 280), coincide con lo observado para las fracciones FrDCM1 y FrDCM2.

A pesar que no se obtuvieron los mismos tiempos de retención en los cromatogramas CLAE-DAD y CLUE-DAD, ya que las condiciones de análisis no fueron similares, se conservó el comportamiento en la ubicación de los alcaloides BBIQS en las regiones de alta y mediana polaridad (Garcia et al., 2015; Omole et al., 2014; Xian-Kai et al., 1993).

122 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Figura 4-8: Perfiles cromatograficos por CLUE-DAD para: a. FrDCM 1; b. FrDCM 2 y c. tetrandrina.



4.3.2 Evaluación de la actividad antimalárica *in vivo* del extracto primario y fracciones de *C. toxicofera*

Se realizó la evaluación de la actividad antimalárica del extracto etanólico de *C. toxicofera* y las fracciones alcaloidales obtenidas, en el modelo *in vivo* en ratones, mediante la prueba supresiva de cuatro días, frente a *Plasmodium berghei* cepa ANKA, empleando una dosis de 400 mg/Kg/día. Los porcentajes de parasitemia postratamiento (D+4) para EtOHct, FrDCM1, FrDCM2 y FrAcB, al igual que el vehículo (Agua (55)-propilengicol (20)-glicerina (20)-Tween 5) y el control positivo (difosfato de cloroquina) se observan en Tabla 4-9.

Tabla 4-9: Porcentajes de parasitemia ensayo *in vivo* Test de Peters, cepa *P. berghei* ANKA.

Muestra (Extractos/Fracciones)	Actividad antimalárica <i>in vivo</i> (400 mg/kg/día) porcentaje de parasitemia Media \pm DE
Extracto etanólico EtOHct	38.0 \pm 3.0
Fracción alcaloidal (FrDCM1)	31.0 \pm 9.0
Fracción alcaloidal (FrDCM2)	34.0 \pm 5.0
Fracción acuosa básica (FrAcB)	39.0 \pm 3.0
Difosfato de cloroquina	20.0 \pm 7.0
Vehículo	42.0 \pm 5.0

DE: desviación estándar; n=5

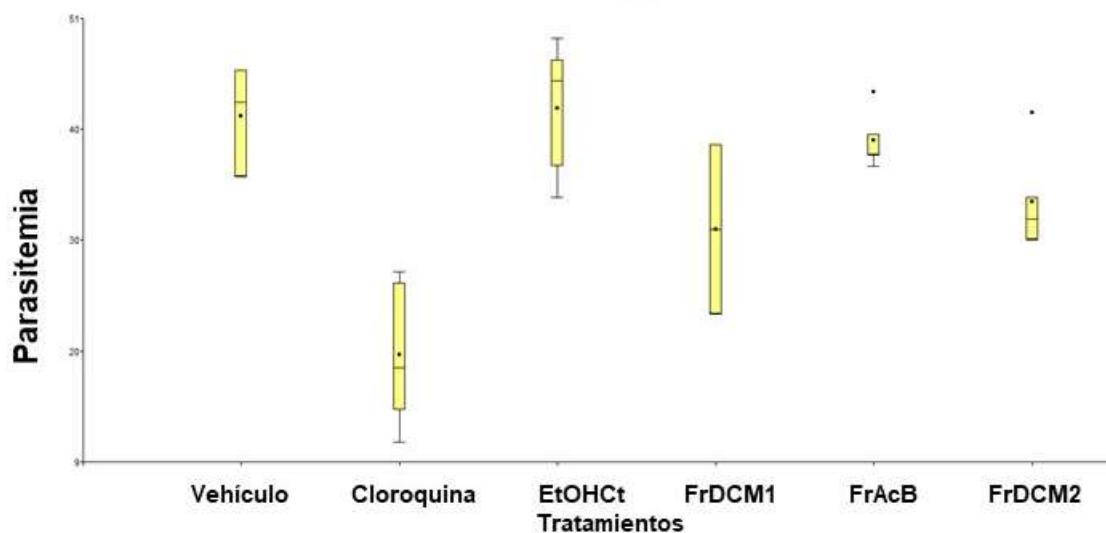
Para realizar un análisis comparativo de los diferentes tratamientos en los ensayos *in vivo*, se evaluó la normalidad de los datos, mediante la prueba de Shapiro-Wilk (se acepta la hipótesis H_0 : residuos son normales), además en la prueba gráfica Q-Q plot, se observó que los residuales presentan un comportamiento lineal. Con estos dos parámetros estadísticos se acepta el supuesto de la normalidad de los datos (Anexo I).

Seguidamente se realizó un análisis de varianza ANOVA (Anexo I), que permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas, en al menos un tratamiento con una significancia de ($p < 0.05$).

Posteriormente, se realizó una prueba de comparaciones múltiples entre extracto etanólico y fracciones alcaloides, no se mostró una diferencia estadísticamente significativa (prueba

de Tukey ($p > 0.05$). Los tratamientos FrDCM1 y FrDCM2 son los que presentan un comportamiento más cercano a cloroquina y entre ellos no se presenta diferencia estadísticamente significativa. Al comparar los tratamientos y la cloroquina se presenta diferencia estadísticamente significativa (Figura 4-9).

Figura 4-9: Diagrama de cajas para los porcentajes de inhibición de la parasitemia por tratamiento, ensayo *in vivo*, Test de Peters. cepa *P. berghei* ANKA. 1=Cloroquina; 2=EtOHct; 3=FrDCM1; 4=FrDCM2; 5=FrAcB



La similitud en la actividad antimalarica *in vivo* de los tratamientos (extracto primario y fracciones de alcaloides) puede estar asociada a la semejanza química observada en los perfiles cromatográficos para alcaloides, en los que se observaron un grupo de compuestos de mediana polaridad con valores de $R_f = 0.4$ y 0.5 en CCD y los picos en CLAE-DAD de T_r entre 7.0-7.2 min (Figura 4-6 y 4-7).

La actividad *in vivo*, para el extracto etanólico (EtOHct) y las fracciones (FrDCM1, FrDCM2, FrAcB) obtenidas de *C. toxicofera*, puede estar asociada con la presencia de alcaloides BBIQS reportados para esta especie ((-) - curina, (+) - isochondodendrina (-) - toxicoferina y (-) -tubocurina) (Garcia et al., 2015; Menachery, 1996). Como es reportado en la literatura los alcaloides BBIQS presentan actividad antimalárica (Mambu et al., 2000; Otshudi et al., 2005).

Este resultado coincide con lo reportado para el remedio tradicional de la comunidad indígena Ziora Amena -Amazonas Colombia, evaluado con el mismo método *in vivo*, el cual presentó una dosis efectiva 50 (DE₅₀) de 328.6 µg/mL. El remedio tradicional de la comunidad indígena “indígena Ziora Amena” contiene lianas de *C. toxicofera* y se utiliza en el tratamiento de la malaria (Rodríguez et al., 2018).

Además, el resultado obtenido en esta investigación es comparable al reportado en distintos trabajos en los cuales se evalúan extractos primarios, fracciones alcaloidales o compuestos en modelos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* para malaria, en los cuales se utilizan diferentes plantas de la familia Menispermaceae entre ellas *C. toxicofera* (Hata, 2005; Cárdenas Cuadros, 2011; Rodríguez et al., 2018; Hernández-Carvajal et al., 2022). Estas especies se encuentran en Sur América, incluida la Amazonía Colombiana y otros lugares en la región tropical. En estas especies vegetales se han identificado alcaloides bisbencilisoquinolínicos que muestran efectos antimaláricos, los cuales han sido evaluados frente a cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina, uno de ellos es la tetrandrina presente en las raíces de *Stephania tetrandra* utilizada en la medicina tradicional china (Weber & Opatz, 2019).

Entre los estudios en los cuales se reporta la actividad antimalárica de alcaloides BBIQS obtenidos de extractos primarios o fracciones alcaloidales se encuentra el estudio de la fracción alcaloidal de la corteza del tallo de *Isolona guessquiereina*, de la cual se aislaron los alcaloides BBIQS curina e isocondodendrina, que mostraron buena actividad antimalárica *in vivo* mediante la prueba supresiva de cuatro días usando a *P. yoelii* N67 empleando una dosis de 10 mg/kg su porcentaje en la inhibición de la parasitemia fue de 51.1 ±17.2. De las hojas de *Stephania abyssinica* se obtuvo una fracción en diclorometano de la cual se aislaron dos alcaloides BBIQS pseudocurina y pseudoisocurina, los cuales presentaron actividad antiplasmodial frente a las cepas *P. falciparum* D6 (CQ-susceptible) y W2 (CQ-resistente), empleando como método para evaluar la densidad parasitaria la incorporación de hipoxantina, con CI₅₀ entre 0.29-10.25 (µg/mL). A partir de la fracción alcalina de raíces de *Epinetrum villosum* se aislaron varios alcaloides BBIQS con actividad antiplasmodial frente a *P. falciparum* (FcB1-Colombia, cepa resistente a la cloroquina), cicleanina: CI₅₀ = 2.8±1.6 µg/mL, ciclenina N-óxido CI₅₀ = 8.6±2.2 µg/mL, isochondodendrina: CI₅₀ = 0.10±0.01 µg/mL, cocsolina: CI₅₀ = 0.30±0.02 µg/mL. Para el extracto acuoso se reporta una CI₅₀ = 0.20 µg/mL. (Mambu et al., 2000; Omole et al., 2014; Otshudi et al., 2005).

126 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

En esta investigación se avanza en evaluar la actividad antimalárica *in vivo* de fracciones alcaloidales menos complejas que el extracto. Este resultado soporta continuar con los estudios fitoquímicos y de actividad antimalárica, en búsqueda de fracciones menos complejas que las fracciones iniciales o alcaloides BBIQS de mejor actividad.

Selección de la fracción a purificar

En el presente trabajo se estimaron tres criterios para elegir una de las fracciones activas y continuar el proceso de purificación por cromatografía en columna: 1. bioactividad; 2. perfil cromatográfico de CCD y CLAE-DAD y 3. masa de la fracción. Partiendo de la información obtenida en la cual el extracto etanólico y las fracciones (FrDCM1, FrDCM2 y FrAcB) evaluadas no presentaron diferencia estadísticamente significativa en cuanto la actividad antimalárica, el criterio fundamental para continuar con un fraccionamiento biodirigido fue el número dos, por lo tanto se decidió escoger la fracción alcaloidal FrDCM2, ya que ésta presenta un perfil cromatográfico por CCD y CLAE-DAD en el cual se observa una mejor separación de los picos en la región de mediana polaridad con $T_r=7.0$ y 12.5 min, con buena absorción; para estos picos el UV es característico para alcaloides BBIQS (Figura 4-7C), además en el fraccionamiento ácido-base del extracto el rendimiento fue el segundo más alto para esta fracción.

4.3.3 Evaluación de la toxicidad aguda del extracto etanólico y las fracciones alcaloidales de *C. toxicofera*

En el estudio con plantas medicinales es necesario evaluar la actividad farmacológica y toxicológica. La toxicidad aguda puede ser evaluada por el método alternativo de clases de toxicidad aguda por vía oral, de acuerdo con la guía No. 423 de la OECD, el cual previene el uso indiscriminado de animales de experimentación cumpliendo con el principio de las tres R (reducción, refinamiento y reemplazo). A pesar de que esta guía se utiliza en la evaluación de sustancias puras, distintas investigación con extractos etanólicos y fracciones primarias obtenidas de plantas medicinales emplean este método ya que cumple con el buen uso del animal de experimentación, se puede estimar el nivel de toxicidad y evaluar las características de toxicidad por vía oral (Torres-Rodríguez et al., 2016; Paixao et al., 2017)

Para el desarrollo de la evaluación de toxicidad aguda en roedores se siguió el protocolo establecido en la guía de OECD y la información obtenida permitió analizar los resultados de: mortalidad, variación de peso, evaluación del comportamiento, necropsia y estudio histopatológico.

Mortalidad

En la evaluación de la toxicidad aguda se determinó cuántos animales murieron durante el estudio debido a los efectos tóxicos de las sustancias presentes en el extracto etanólico total (EtOHct) y fracciones alcaloidales de *C. toxicofera* (FrDCM1 y FrDCM2). Esta información permitió clasificar las sustancias según el Globally Harmonized System (GHS) y determinar el punto de corte de dosis letal 50 (DL₅₀). Ver Tabla 4-10.

Tabla 4-10: Resultados de mortalidad y clasificación toxicológica de EtOHct, FrDCM1 y FrDCM2.

Extracto/Fracción	Dosis (mg/Kg)	Animales		Categoría (GHS)	Corte DL ₅₀ (mg/Kg)	Anexo
		Muertos	Totales			
EtOHct	2000	2	3	Categoría 4	1000	G 7.3
	300	0	6			
FrDCM1	300	1	6	Categoría 5 o no clasificado	5000 o no clasificado	G 7.2
	2000	0	6			
FrDCM2	300	2	3	Categoría 3	300	G 7.2
	50	0	6			

Para el extracto etanólico se empleó inicialmente una dosis de 2000 mg/Kg, siguiendo la guía, esta dosis fue administrada a tres animales. Como resultado, dos de los tres ratones administrados murieron. Por lo cual, según el protocolo, el siguiente grupo de animales fue administrado con la dosis inferior, de 300 mg/Kg (Anexo F). Inicialmente se administraron tres animales, no se observó mortalidad en ninguno de ellos, razón por la cual se completó el grupo de seis animales, con la administración de otros tres individuos, con la misma dosis (300 mg/Kg); como resultado ningún individuo (0 de 6) presentó mortalidad con esta dosis. Esto permite ubicar el EtOHct en categoría cuatro, lo que equivale a una DL₅₀ de

128 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

corte de 1000 mg/Kg, según la guía OECD 423, es decir a esta concentración no hay mortalidad.

Para la FrDCM1, se empleó una dosis inicial de 300 mg/kg, se administraron tres animales y éstos sobrevivieron (Anexo F). Por tal razón se administraron tres animales más y como no hubo mortalidad, se procedió a administrar tres animales con la dosis superior siguiente, es decir 2000 mg/kg. En este caso no se observó mortalidad, por lo que se administraron tres animales más para completar el experimento. Finalmente, en los seis animales administrados con una dosis de 300 mg/Kg de FrDCM1 no hubo mortalidad. Por lo anterior, la FrDCM1 se ubica, según la guía OECD 423, en la categoría 5 o no clasificado, con una DL₅₀ de corte de 5000 mg/kg.

Para la fracción FrDCM 2, se partió de la dosis de 300 mg/kg, la cual fue administrada a tres animales (Anexo F). Sin embargo, dos de los tres ratones administrados presentaron mortalidad. Según el Anexo F, se procedió a administrar un nuevo grupo de animales con la dosis inferior siguiente, es decir 50 mg/Kg. No hubo mortalidad, por lo que se completó el grupo (seis animales), administrando tres animales adicionales, donde tampoco se presentó muerte. Por lo anterior, la fracción FrDCM 2 se ubicó en categoría 3, con una DL₅₀ de corte de 300 mg/Kg, según la guía OECD 423.

Una vez que, en los ensayos de actividad antimalárica, se administraron dosis de 400 mg/kg, sin observar la muerte de los animales, se realizó un ensayo de toxicidad adicional empleando la dosis de 400 mg/kg, la cual se administró a tres animales, de los cuales ninguno murió. Este ensayo permitió confirmar que a la dosis empleada en el ensayo de actividad antimalárica (400 mg/kg), los animales no experimentan muerte por toxicidad de la fracción FrDCM 2 y que esta fracción presenta una DL₅₀ entre 400 mg/kg y 2000 mg/kg.

La fracción FrDCM1 fue la menos tóxica (categoría 5), seguida del EtOHct (categoría 4) y la más tóxica fue FrDCM2 (categoría 3). Sin embargo, es de tener en cuenta que la guía OECD 423 tiene 6 categorías para clasificar las sustancias según su toxicidad. El extracto y fracciones de *C. toxicofera* fueron ubicadas en las 3 categorías menos tóxicas. Los hallazgos de esta investigación confirman la baja toxicidad de la planta por vía oral, lo cual estaba ya respaldado por el uso etnofarmacológico que se le ha dado y a su vez aporta

información sobre la seguridad del uso de la planta para la comunidad indígena Ziora Amena -Amazonas Colombia.

En relación con la diferencia, en toxicidad, entre las fracciones y el extracto; la fracción FrDCM 2 se ubicó en una categoría más tóxica en relación con EtOHct y FrDCM 1, posiblemente debido al tipo de alcaloide BBIQ que pueda estar presente en las fracciones y extracto y a la concentración de estas sustancias en las mismas.

Al realizar la comparación de los perfiles cromatográficos por CCD y CLAE-DAD, entre las fracciones FrDCM 1 y FrDCM 2, se apreció que la fracción FrDCM 2 es más compleja (Figura 4-6 y Figura 4-7). Empleando CCD se observó una mancha naranja intensa de $R_f=0.6$ ausente en la fracción FrDCM 1. En el cromatograma por CLAE-DAD, para la fracción FrDCM 2 se observaron picos de $T_r=10, 16, 19$ min, los cuales presentaron espectros UV con picos de absorción característicos de alcaloides BBIQS., estos picos no se registran en la fracción FrDCM 1. Estas sustancias ausentes en la fracción FrDCM1 con baja absorción al ultravioleta ($T_r= 16, 19.5$ min) pueden estar asociado a la toxicidad de la fracción FrDCM 2.

Se ha reportado la toxicidad de diferentes alcaloides BBIQS como curina y tetrandrina que han sido encontrados en distintas especies de la familia Menispermaceae (Gong et al., 2017; Zhang et al., 2021).

La fracción FrDCM 1 presentó la menor toxicidad. El resultado obtenido que corresponde a $DL_{50}=5000$ mg/kg, indica que es aproximadamente 7.7 veces menos tóxico que la tetrandrina cuya $DL_{50} = 646$ mg/kg y según la clasificación utilizada por la OECD es moderadamente tóxica. Este resultado es promisorio ya que ubica la fracción FrDCM 1 en el rango de dosis segura para continuar en la investigación básica y posiblemente estudios clínicos (Zhang et al., 2021).

Finalmente, para el caso del EtOHct, éste resultado puede estar asociado a la alta complejidad de los extractos totales, que hace que la concentración de los alcaloides BBIQS no sea tan alta y también a que otras sustancias, presentes en el extracto, pueden contribuir a disminuir la toxicidad (Hernández Carvajal et al., 2014).

13C **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Además de la mortalidad, que permite realmente hacer la clasificación de la toxicidad, de las sustancias en ensayo; parámetros como la evaluación clínica, la necropsia y la histopatología contribuyen a evidenciar potenciales daños causados por los compuestos en evaluación y por tanto, a ahondar en su potencial toxicidad.

Test de Irwin: evaluación comportamental

Como complemento a la evaluación de los efectos tóxicos del extracto y las fracciones de *C. toxicofera* se estableció el efecto sobre el sistema nervioso mediante el test de Irwin (Test Hipocrático) en un ensayo de 15 días de duración del ensayo. En el caso del extracto etanólico, cuando se administraron dosis de 2000 mg/kg, se observaron signos de ataxia y temblores durante los primeros 30 minutos luego de la administración. Sin embargo, en la dosis de 300 mg/kg estas manifestaciones no se presentaron. Con esta última dosis se evidenció que los animales tenían un patrón de actividad motora normal, no se observó parálisis, su reacción de alarma fue buena, conservaban el reflejo de enderezamiento y actividad prensil. Se pudo observar piloerección y algunos comportamientos asociados a hiperactividad. Sin embargo, al transcurrir 2 horas de la administración, los efectos ya no se presentaban.

En el caso de la fracción FrDCM 1, la actividad motora no se vio afectada evidentemente; se presentó piloerección y vocalizaciones espontáneas en los primeros 30 minutos, luego de la administración. A la hora los animales presentaban un patrón de hiperactividad (caminaban más rápido) con algunos movimientos involuntarios, signos que pueden ser asociados con la excitación del sistema nervioso central. Sin embargo, los animales tratados no mostraron anomalías en su comportamiento, en el estado físico o afecciones gastrointestinales, ni diarrea y ni vómito. No se presentaron diferencias en las manifestaciones clínicas de los animales en los diferentes niveles de dosis evaluadas.

En los animales administrados, con la fracción FrDCM 2, se observó una disminución de la actividad motora y ptosis palpebral en la primera hora posterior a la administración. Estos signos se evidenciaron en la mayoría de los animales dosificados con esta fracción. Pasado este tiempo (30 min) se evidenció que persistía la ptosis palpebral. Sin embargo,

no perdió el reflejo de enderezamiento, ni tampoco se vio afectada la actividad prensil, también conservaba la reacción de alarma y su comportamiento natural.

En todos los casos, la sintomatología presentada tuvo un tiempo de duración de aproximadamente 2 horas, siendo la primera hora en la cual los signos fueron más acentuados. En los días posteriores a la administración, los animales presentaban un comportamiento similar al blanco.

Variación de peso

El peso corporal fue empleado como un indicador dentro de la valoración toxicológica aguda del extracto etanólico y las fracciones alcaloidales. Se realizó un registro de cada animal para finalmente realizar una comparación con el individuo control (vehículo). En la Tabla 4-11 se realizó un registro del promedio de los pesos de cada animal durante el periodo de los 14 días, con el objetivo de realizar una comparación entre los tratamientos (Paixao et al., 2017).

Inicialmente la prueba de comparación para el extracto etanólico a 300 mg/Kg arrojó un p-valor inferior a cualquier nivel de significancia, por lo cual se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que el peso promedio de los ratones es diferente entre el grupo control y el grupo tratado con extracto etanólico a 300 mg/Kg (Figura 4-10).

En el análisis para las fracciones evaluadas: FrDCM1 a 300 mg/Kg y FrDCM2 a 50 mg/Kg con relación a su control, los resultados de cada prueba de comparación sugieren que dado que los p-valor calculados son inferiores a cualquier nivel de significancia, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que el peso promedio de los ratones es diferente entre el grupo control y los tratamientos FrDCM1 300 mg/Kg, FrDCM1 2000 mg/Kg y FrDCM2 a 50 mg/Kg (Figura 4-11).

132 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Tabla 4-11: Relación del peso promedio de: EtOHct, FrDCM 1 y FrDCM 2 a las dosis evaluadas y sus vehículos.

Extracto/ Fracción/ Vehículo	Dosis (mg/Kg)		Día 1	Día 3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 11	Día 13
Vehículo EtOHct	-	\bar{x}	28.6	28.5	28.45	28.95	29.6	30.4	30.55
		D.E	0.57	0.0	0.78	0.78	0.57	0.14	0.07
	300	\bar{x}	32.65	32.2	32.3	31.9	32.2 3	32.35	32.62
		D.E	0.99	0.90	1.13	0.67	0.57	0.66	0.57
Vehículo FrDCM 1	-	\bar{x}	28.55	28.35	28.3	28.0	28.5 5	29.05	29.35
		D.E	0.07	0.21	0.85	0.57	1.48	1.20	1.34
FrDCM 1	300	\bar{x}	32.73	33.60	33.68	34.70	34.6 7	34.05	34.33
		D.E	0.84	1.41	2.22	0.82	0.50	1.54	1.54
	2000	\bar{x}	31.70	31.48	30.95	31.03	31.1 3	31.5	31.9
		D.E	0.91	0.79	0.79	0.64	0.35	0.17	0.20
Vehículo FrDCM 2	-	\bar{x}	31.7	29.9	25.5	27.75	28.8 5	29.3	29.85
		D.E	2.83	2.40	4.24	1.77	2.33	2.69	2.62
	50	\bar{x}	33.57	31.43	32.30	32.18	33.2 0	33.02	33.36
		D.E	2.86	1.39	2.21	1.56	2.20	2.09	1.88

Figura 4-10: Ganancia de peso corporal de ratones ICR hembras, que fueron dosificados con el extracto etanólico de *Curarea toxicofera* (300 mg/Kg vía oral) administrados en dosis única y su control (vehículo).

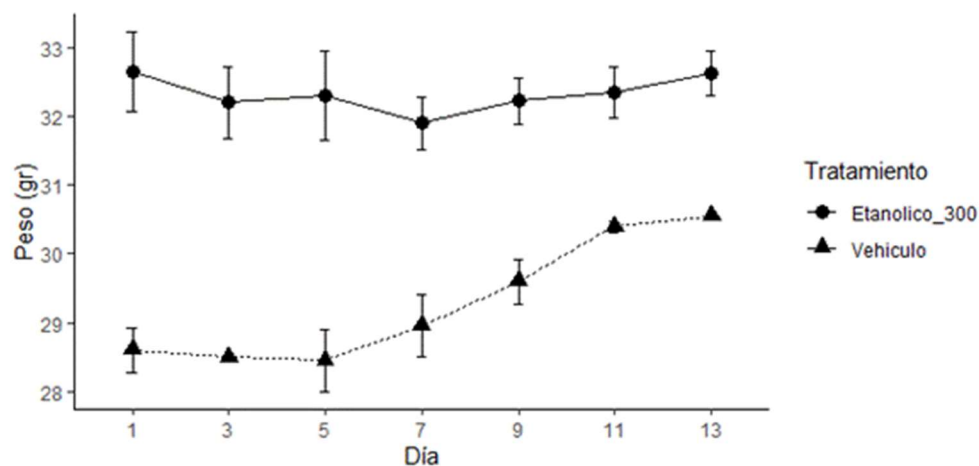
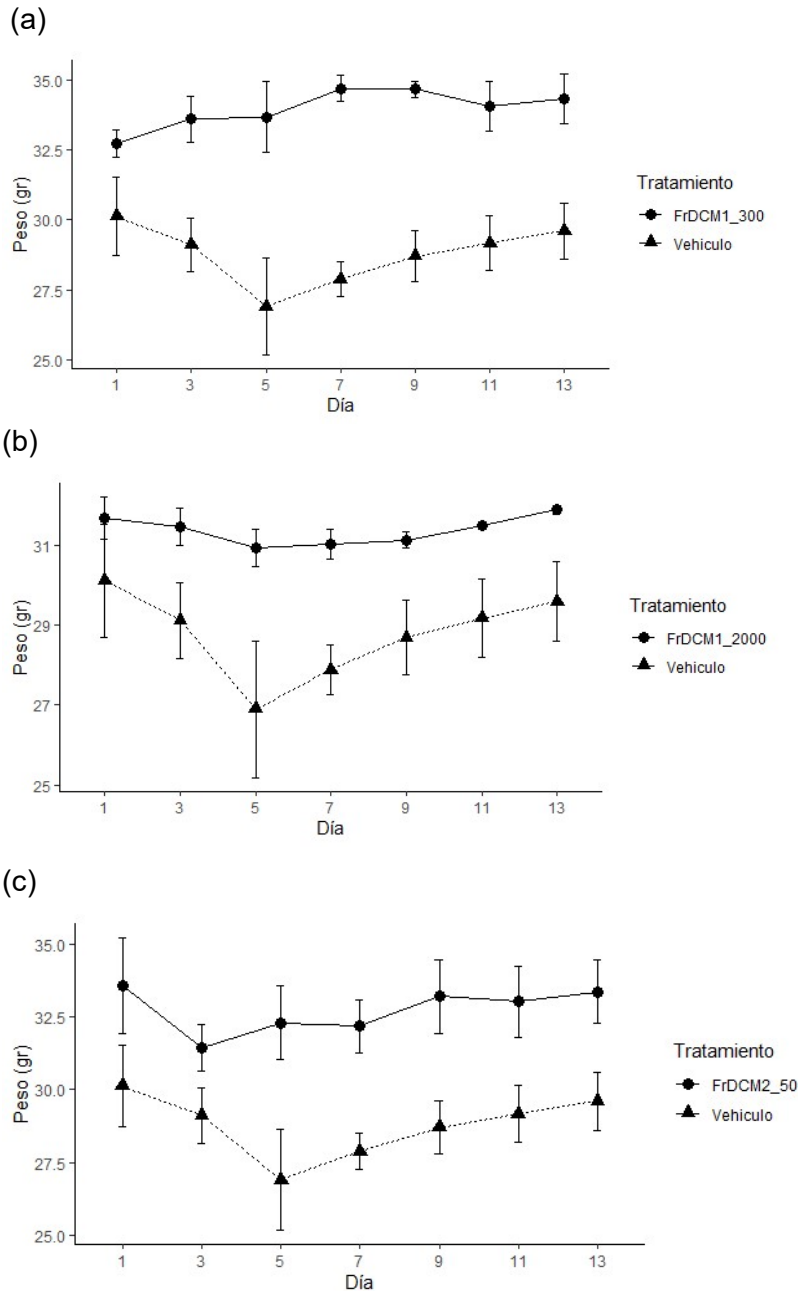


Figura 4-11: Ganancia de peso corporal de ratones ICR hembras, que fueron dosificados con: FrDCM1 300 mg/Kg (a), FrDCM1 2000 mg/Kg (b) y FrDCM2 a 50 mg/Kg (c), administrados en dosis única y su control (vehículo).



A pesar de que el promedio de pesos de los animales de experimentación entre el grupo control y los tratamientos (extracto etanólico a 300 mg/Kg, FrDCM1 300 mg/Kg, FrDCM1 2000 mg/Kg y FrDCM2 a 50 mg/Kg) es diferente (ya que existe una diferencia significativa

134 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

entre los tratamientos y el control), se observa que los ratones expuestos a los tratamientos en las dosis evaluadas en el transcurso del experimento conservaron su peso entre 31 y 33 gramos, sin pérdida de peso considerable.

En cuanto al tratamiento control para el extracto etanólico a 300 mg/Kg los animales de experimentación entre el día uno a cinco conservaron un peso estable el cual a partir del día siete aumentó hasta valores por encima de 30 gramos. Para el control de los tratamientos FrDCM1 300 mg/Kg, FrDCM1 2000 mg/Kg y FrDCM2 a 50 mg/Kg se observó una pérdida de peso de los animales entre el día uno al día cinco que posiblemente puede estar asociados a que el animal fue sometido a una situación de estrés por la administración o sufrió algún daño fisiológico reversible, no evidente derivado de la administración, ya que a partir del día 7 al 13 se observa una ganancia de peso entre 29 y 30 gramos. Este comportamiento es semejante al reportado en el ensayo de toxicidad aguda para extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* Hook (kalembe) en el cual los animales recuperan peso entre el día 7 a 14 (Paixao et al., 2017). Lo anterior permite establecer que los tratamientos evaluados no están generando alteraciones fisiológicas ya que los animales en el transcurso del experimento no presentaron pérdida de peso.

Necropsia

Se realizó el sacrificio de los animales empleando el método de dislocación cervical, debido a que este no implica la administración de sustancias que puedan llegar a interferir en los resultados del estudio histopatológico y tampoco causa estrés o sufrimiento en el animal, al momento de realizar el procedimiento.

En la necropsia se evaluó el estado de los órganos con el fin de identificar si las sustancias habían causado daños macroscópicos observables a simple vista. Los órganos que se evaluaron fueron: pulmones, corazón, estómago, intestino, hígado, riñones y aparato reproductor (ovarios y trompas).

De forma general se puede decir que las sustancias evaluadas no causaron daños a nivel macroscópico en los órganos evaluados, en comparación con el grupo control. Sin embargo, se encontraron algunas situaciones particulares. En el caso del extracto

etanólico, se encontró que en un individuo presentó un color no uniforme en el bazo. Para la fracción FrDCM 1 se encontraron en un animal algunos coágulos en la cavidad torácica y en el hígado. Sin embargo, ninguno de estos hallazgos macroscópicos pudo relacionarse con daños histopatológicos, por lo que se pueden atribuir a particularidades de los animales o al método de sacrificio, particularmente el coágulo de la cavidad torácica.

Estudio histopatológico

El estudio histopatológico para el extracto etanólico y las fracciones FrDCM 1 y FrDCM 2 en los distintos ensayos realizados se observaron animales con: degeneración hepatocelular, mielopoyesis, citomegalia y cariomegalia, hallazgos inespecíficos y que no están asociados a toxicidad hepática por la presencia de alcaloides BBIQS detectados en el extracto etanólico y fracciones.

Se ha reportado que la tetrandrina genera afectación hepática, cuando se administra por vía parenteral. En cultivo primario de hepatocitos se han encontrado reportes de proteínas del tipo caspasas, las cuales intervienen en la transducción y ejecución de la señal apoptótica mitocondrial, este es el mecanismo por el cual se genera el efecto tóxico inducido por tetrandrina (Zhang et al., 2021).

En el estudio realizado a partir de los órganos recolectados en la necropsia, las características macroscópicas y microscópicas de los tejidos, de los órganos de los animales administrados con vehículo, extracto y fracciones no presentaron alteraciones significativas que puedan ser atribuidas a las fracciones y extracto administrados.

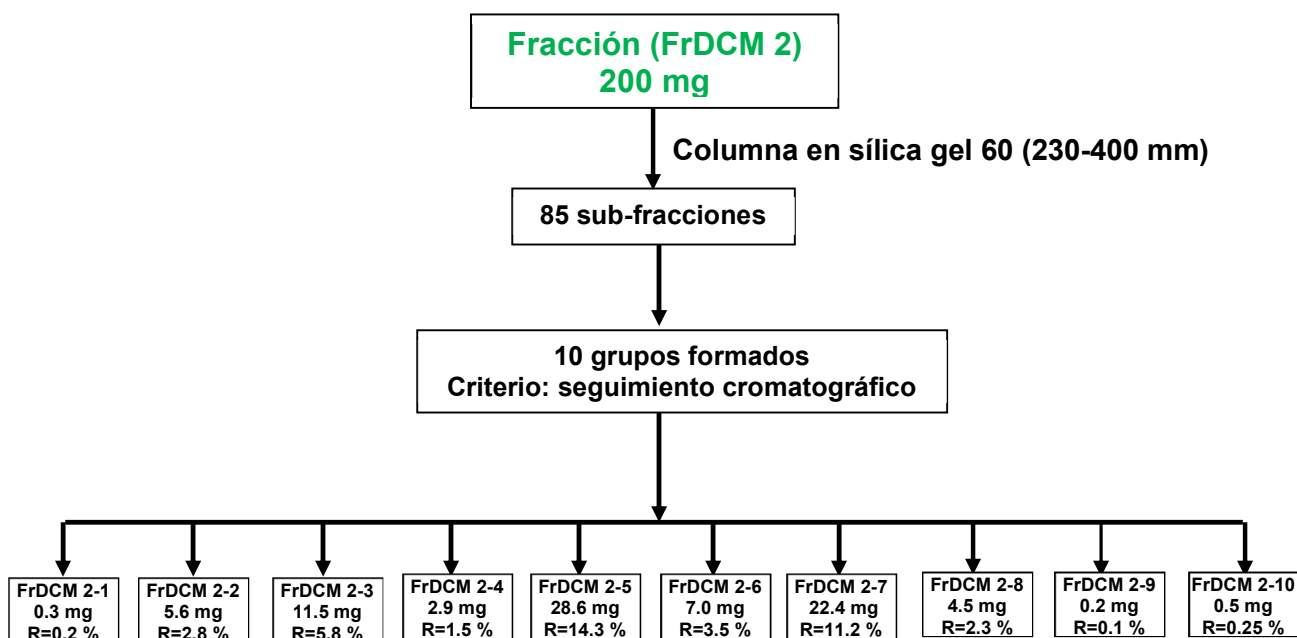
4.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ALCALOIDES BBIQS

4.4.1 Fraccionamiento por columna cromatográfica abierta de la fracción FrDCM 2

A partir de la información mencionada en el numeral 4.3.2 en el cual se consideraron tres criterios para elegir la fracción activa (1. bioactividad; 2. perfil cromatográfico de CCD y CLAE-DAD y 3. masa de la fracción) se escogió la fracción FrDCM 2 para continuar con la separación de constituyentes. Se empleó como fase estacionaria sílica gel 60 (230-400 mm). La columna fue eluída con CHCl_3 , seguido por mezclas de CHCl_3 -MeOH finalizando y con MeOH (numeral 3.3.6).

Se obtuvieron en total 85 sub-fracciones las cuales fueron evaluadas por CCD y reveladas con Dragendorff para placa (Anexo J: A-B). De acuerdo con su semejanza en la composición química, evidenciada en el perfil cromatográfico por CCD las subfracciones fueron agrupadas en 10 grupos (Figura 4-12).

Figura 4-12: Esquema de fraccionamiento de la fracción FrDCM 2 por cromatografía en columna.



Las sub-fracciones analizadas por CLAE-DAD presentaron compuestos de alta y mediana polaridad, con la mayor absorbancia a 210 nm (Figura 4-13). En las subfracciones FrDCM 2-1, FrDCM 2-2 y FrDCM 2-3, que se obtuvieron con la mezcla de solventes CHCl_3 (40): MeOH (10), presentan tres picos mayoritarios similares. El primero se registra en la región polar del cromatograma con $T_r = 3.5$ min, este pico mostró la mayor absorbancia en las subfracciones FrDCM 2-1, FrDCM 2-2. El segundo pico de $T_r = 5.8$ min se ubica en la región de mediana polaridad, se presenta con mayor absorbancia en las fracciones FrDCM 2-2 y FrDCM 2-3. El tercer pico de menor polaridad se caracterizó por presentar un tiempo de retención entre 14-1 min, y ser el de menor absorbancia (Figura 4-13 A, B, C).

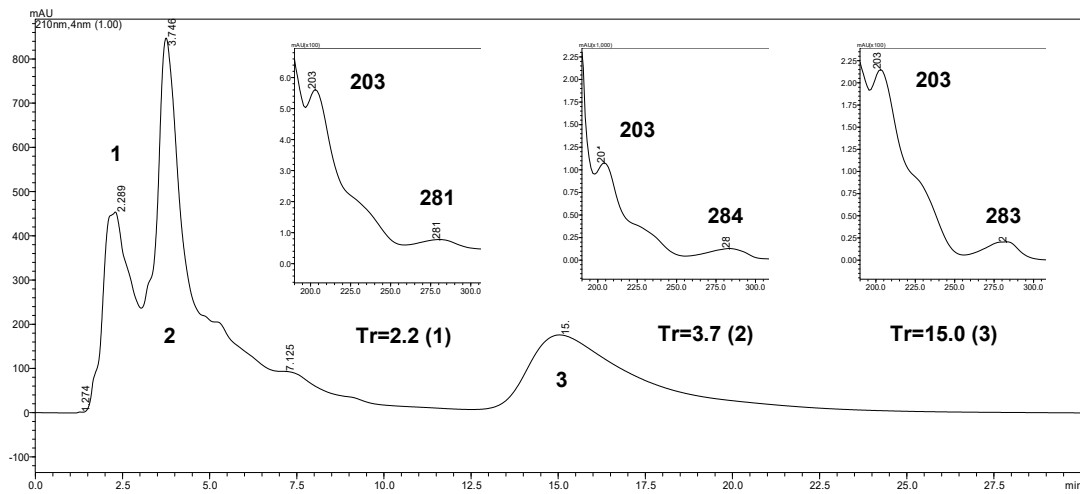
Las sub-fracciones FrDCM 2-4 y FrDCM 2-5 fueron obtenidas con la mezcla CHCl_3 (25): MeOH (25). En estas sub-fracciones se presentó un pico mayoritario de $T_r = 18.7$ min en la región de menor polaridad. En la fracción FrDCM 2-5 se observó un pico mayoritario con $T_r = 7.8$ min, el cual presentó un espectro UV semejante a lo reportado para alcaloides BBIQS. Además, eluye un conjunto de picos con $T_r = 2-5$ min de baja absorción.

En cuanto las sub-fracciones FrDCM 2-6, FrDCM 2-7 y FrDCM 2-8 presentaron un pico de mayor absorbancia con $T_r = 7.6$ min en la región de mediana polaridad. En estas sub-fracciones no se observan picos con T_r mayores a 7.5 min. Los picos de T_r entre 1-5 min presentaron baja absorbancia. Para las sub-fracciones FrDCM 2-9 y FrDCM 2-10, obtenidas empleando MeOH – Hidroxido de amonio (1 mL) pH= 8-9, el pico mayoritario apareció con $T_r = 11$ min, en la región de mediana polaridad. Otros picos entre 2-5 min presentaron baja absorbancia.

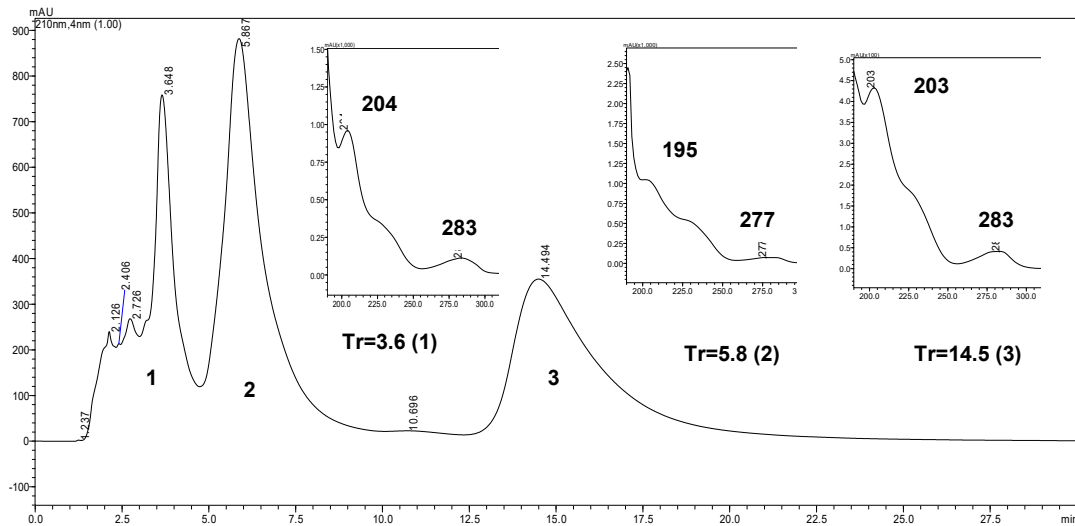
138 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Figura 4-13: Perfiles cromatograficos por CLAE-DAD de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción FrDCM 2 a longitud de onda 210 nm. A=FrDCM 2-1; B= FrDCM 2-2; C= FrDCM 2-3; D= FrDCM 2-4; E= FrDCM 2-5.

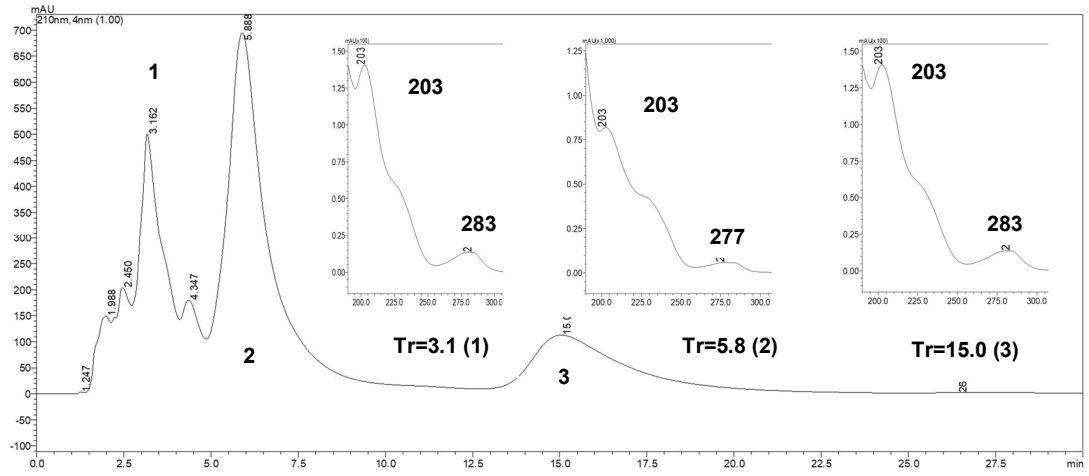
A=FrDCM 2-1



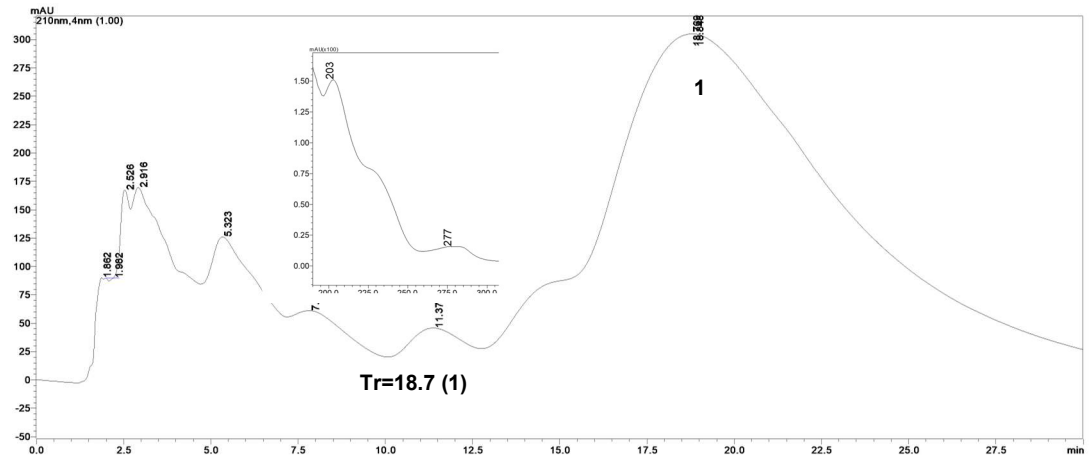
B=FrDCM 2-2



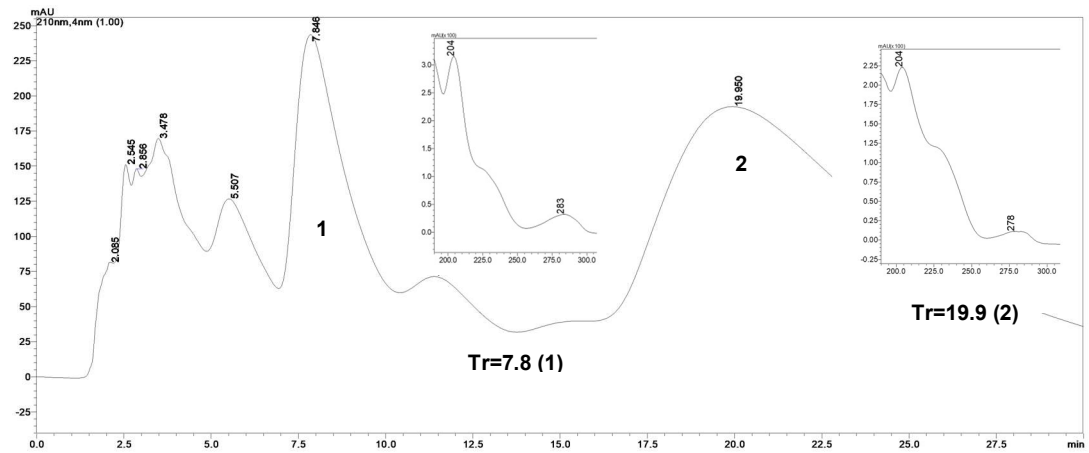
C=FrDCM 2-3



D=FrDCM 2-4



E=FrDCM 2-5



14C **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Los espectros UV de los picos mayoritarios mencionados en las diferentes sub-fracciones son coincidentes con los reportados para alcaloides BBIQS (UV=210-280) (Figura 4-13). El espectro UV fue obtenido del patrón empleado: tetrandrina (Figura 4-8 c) y confirmado con datos en la literatura (Guha et al., 1979). Los ensayos fueron realizados bajo las mismas condiciones cromatográficas, lo que permite la comparación de los tiempos de retención.

La presencia de picos de Tr entre 2-5 min y con absorbancia alta en CLAE-DAD, sugiere la presencia de sustancias polares, que posiblemente se trata de alcaloides BBIQS con grupos hidroxilos fenólicos que hacen que estos compuestos presenten una mayor polaridad, como por ejemplo la berbamina (Guha et al., 1979). Otros picos de Tr entre 11-15 min se observaron en distintas sub-fracciones. Estos compuestos con menor polaridad pueden estar asociados a la presencia de sustituyentes como O-Me y N-Me que se presentan en alcaloides BBIQS como por ejemplo isochondodendrina, toxicoferina, homoaromolina o tubocurarina, alcaloides presentes en *C. toxicifera* (Sun et al., 1998; Menachery, 1996).

Tomando en consideración la masa de cada una de las 10 sub-fracciones obtenidas, la detección de alcaloides por CCD empleando Dragendorff para placa y la presencia de picos de alta absorbancia con UV semejantes al reportado para alcaloides BBIQS, se seleccionó la fracción FrDCM 2-5.

En un análisis posterior de la fracción FrDCM 2-5 se le realizó un cromatograma por CLUE-DAD, empleando condiciones diferentes (ítem 3.3.5). El espectro de absorción UV del pico mayoritario (Tr=5.5 min; % área 79.12), permitió establecer las absorciones de 211 y 281 nm, características de alcaloides BBIQS (Figura 4-14).

A esta misma fracción se le realizó un análisis por CLUE-EM-DAD-ESI empleando un detector UV; las condiciones del análisis se reportan en el numeral 3.3.6. En la Figura 4-15 se registra cromatograma obtenido, en el cual se evidencian dos picos mayoritarios con Tr= 2.60 y 2.84 min. En las Figuras 4-16 A y B se aprecian los espectros de masas de los dos picos mayoritarios, para los que se obtuvieron los valores de m/z 595 $[M-H]^+$, correspondiente a la masa molecular m/z 596 $[M+2H]^+$, propia de los alcaloides BBIQS. Un

ejemplo es curina e isochondodendrina cuya formula molecular es $C_{36}H_{38}O_6N_2$ (594.2731 g/mol) (Guha et al., 1979; Menachery, 1996; Schiff, 1985)

Figura 4-14: Cromatograma obtenido de la fracción FrDCMF 2-5 empleando CLUE-DAD. Fase móvil agua-ácido fórmico 1%, Longitud de onda 280. Espectro UV pico de Tr=5.4.

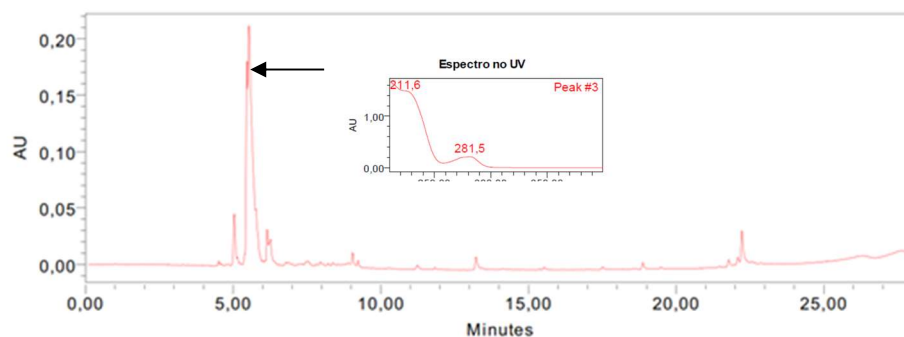
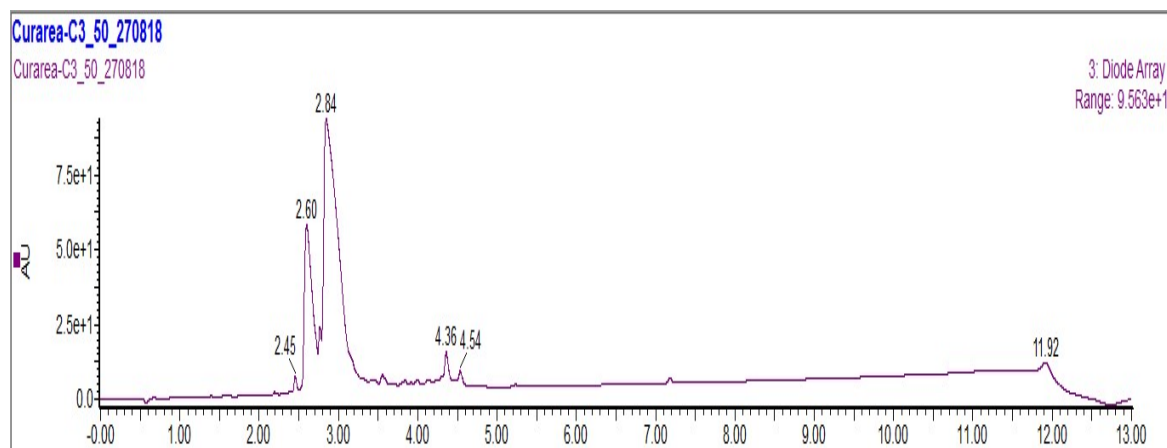


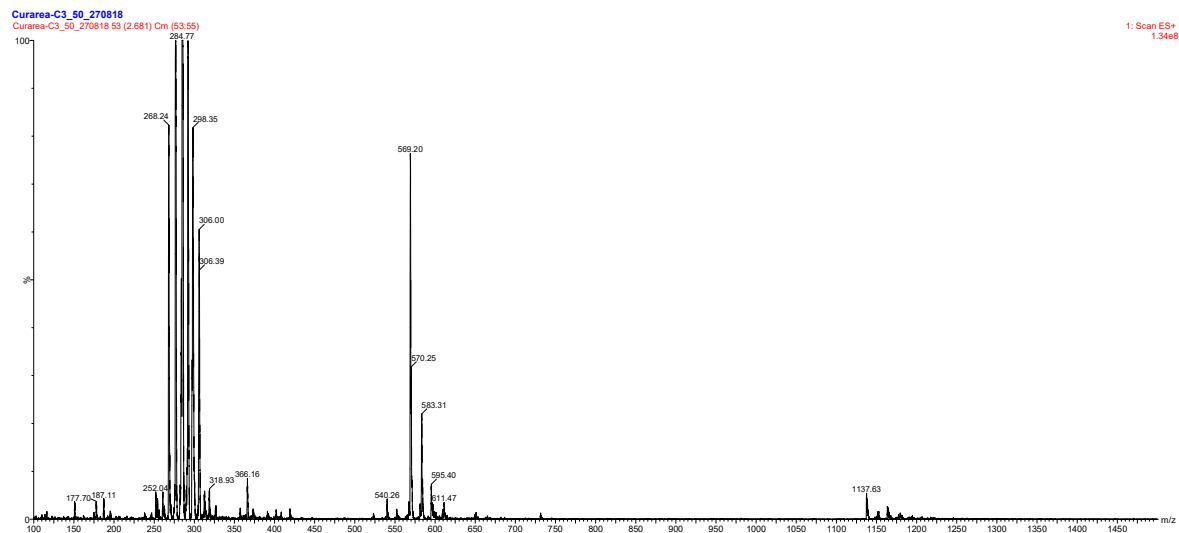
Figura 4-15: Cromatograma obtenido de la fracción FrDCMF 2-5 empleando CLUE-DAD-EM. Longitud de onda 280.



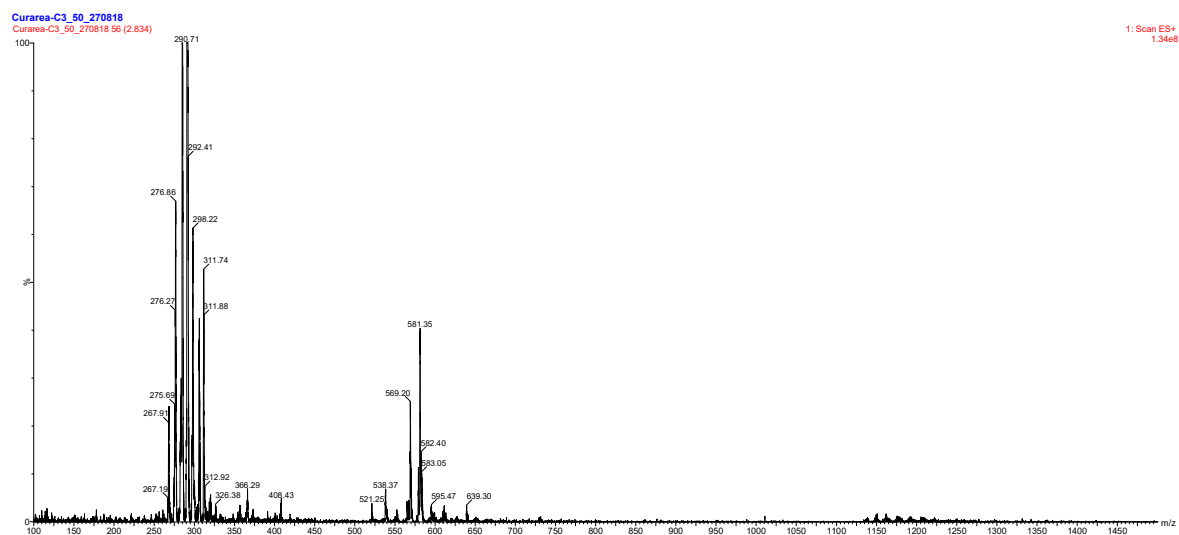
142 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

Figura 4-16: Espectro de masas correspondiente a los picos de tiempo de retención de 2.6 (A) y 2.8 (B).

A.



B.

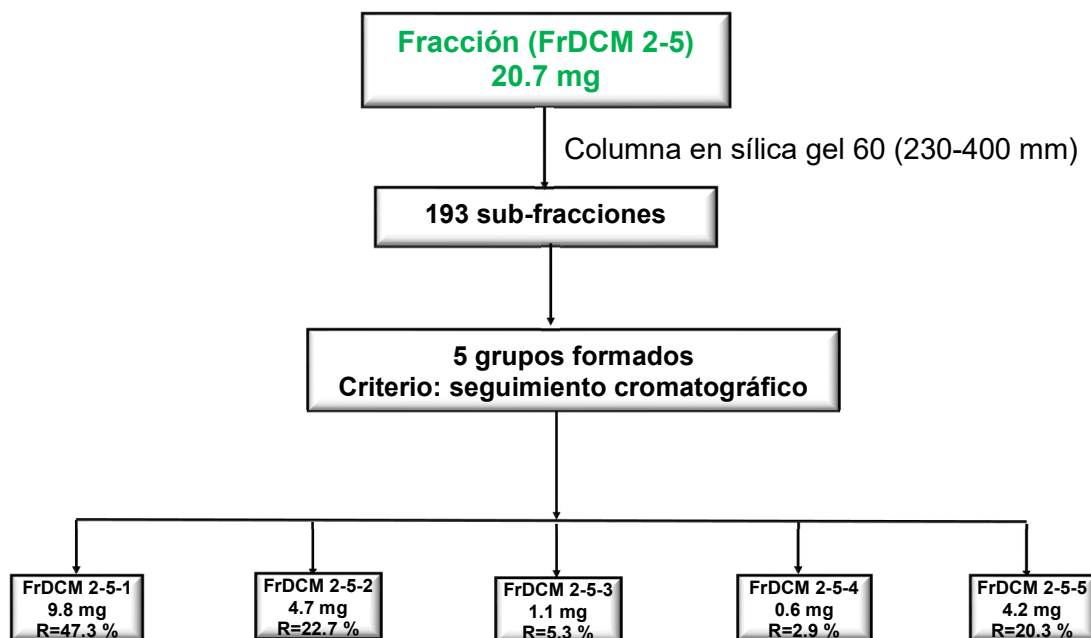


4.4.2 Fraccionamiento por cromatografía de columna (II) de la fracción alcaloidal FrDCM 2-5

En el fraccionamiento por columna abierta de la fracción FrDCM 2-5 se empleó como fase estacionaria sílica gel 60 (230-400 mm), la columna se eluyó empleando como sistema de elución CHCl_3 -MeOH en gradiente hasta un 100% de metanol (ver tabla 3-4). Se obtuvieron 193 sub-fracciones de 10 mL que fueron reunidas en 5 grupos de sub-fracciones finales de acuerdo con la similitud en la composición evaluada por CCD (Figura 4-17). Se obtuvo una fracción purificada identificada como FrDCM 2-5-1, la cual presentó la mayor masa 9.8 mg, que corresponde a un 47.3 % de la masa de la FrDCM 2-5 (Figura 4-17). De acuerdo con su perfil cromatográfico se observa una baja complejidad (Figura 4-18). En el cromatograma CLUE-DAD se observa un pico mayoritario de $T_r=5.9$ min, con % de área de 94.6 cuyo espectro UV presentó dos máximos de absorción (210 y 281 nm) (Figura 4-18). La absorción de 281 nm sugiere un sistema conjugado, como es característico en los alcaloides BBIQS (Guha et al., 1979; Xian-Kai et al., 1993).

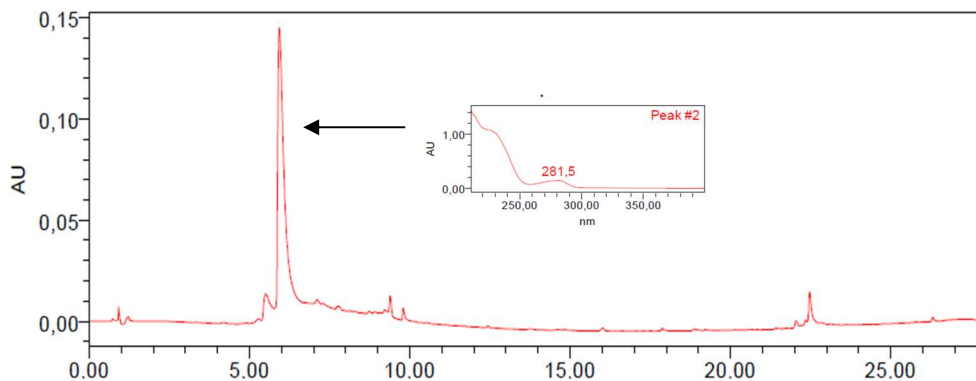
La fracción FrDCM 2-5-1 corresponde a un compuesto mayoritario con área 94.6% que se denominará de ahora en adelante compuesto A1.

Figura 4-17: Esquema de fraccionamiento de la fracción FrDCM 2-5 por cromatografía en columna.



144 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Figura 4-18: Cromatogramas de la fracción FrDCMF 2-5-1, empleando CLUE-DAD, longitud de onda 280 nm.



La sub-fracción FrDCM 2-5-1 (compuesto A1) fue evaluada mediante CLUE-EM-DAD-ESI, el cromatograma presentó un pico mayoritario con $T_r = 2.78$ min (Figura 4-19). El espectro de masas para el pico mayoritario presentó una masa de $m/z = 595$ $[M-H]^+$, correspondiente a la masa molecular de $m/z = 596$ $[M+2H]^+$ (Figura 4-20). La masa obtenida para la fracción FrDCMF 2-5-1 (compuesto A1) es similar a la reportada para alcaloides BBIQS como curina e isochondodendrina cuya fórmula molecular es $C_{36}H_{38}O_6N_2$ (594.2731 g/mol) (Guha et al., 1979; Menachery, 1996a; Schiff, 1999).

Figura 4-19: Cromatograma para la fracción (FrDCM 2-5-1) mediante CLUE-EM-DAD Longitud de onda 280.

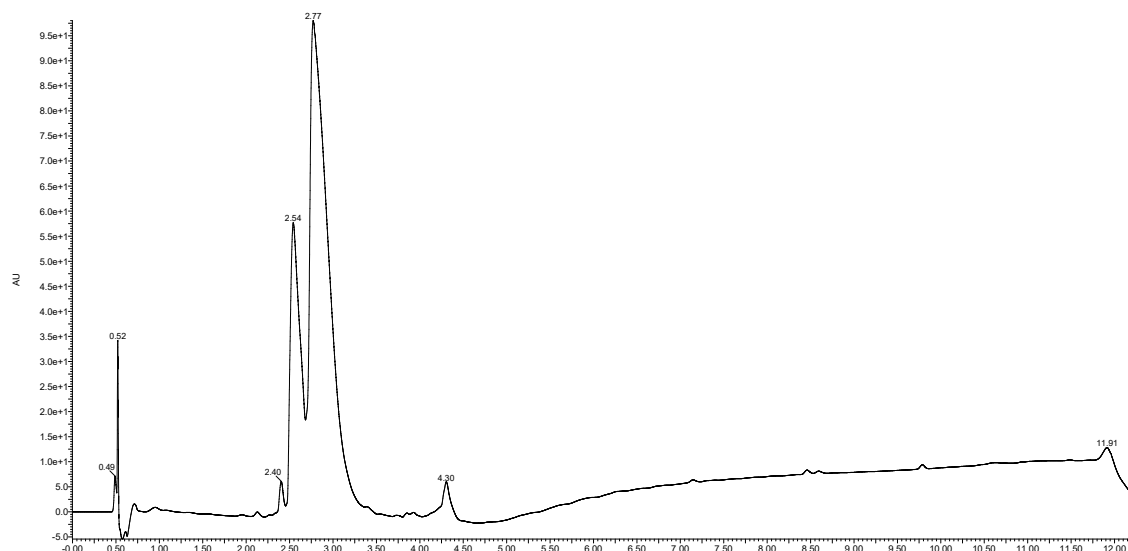
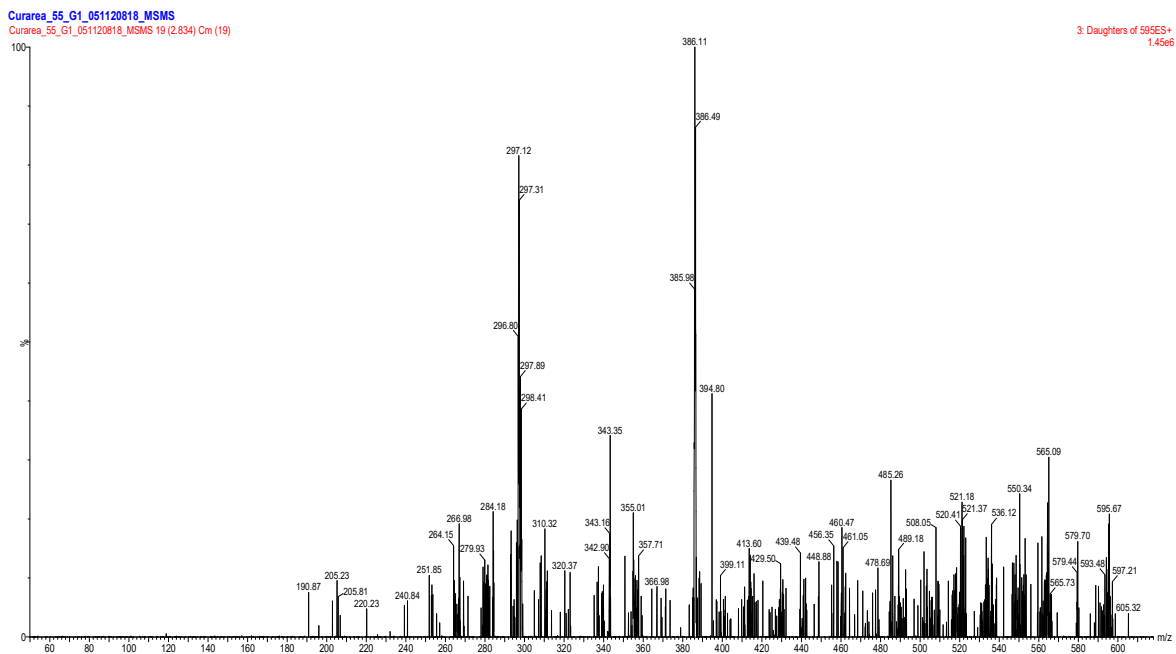


Figura 4-20: Espectro CLAE-DAD-EM, en tándem (EM/EM) modo (+), para el pico mayoritario FrDCM 2-5-1 (compuesto A1).

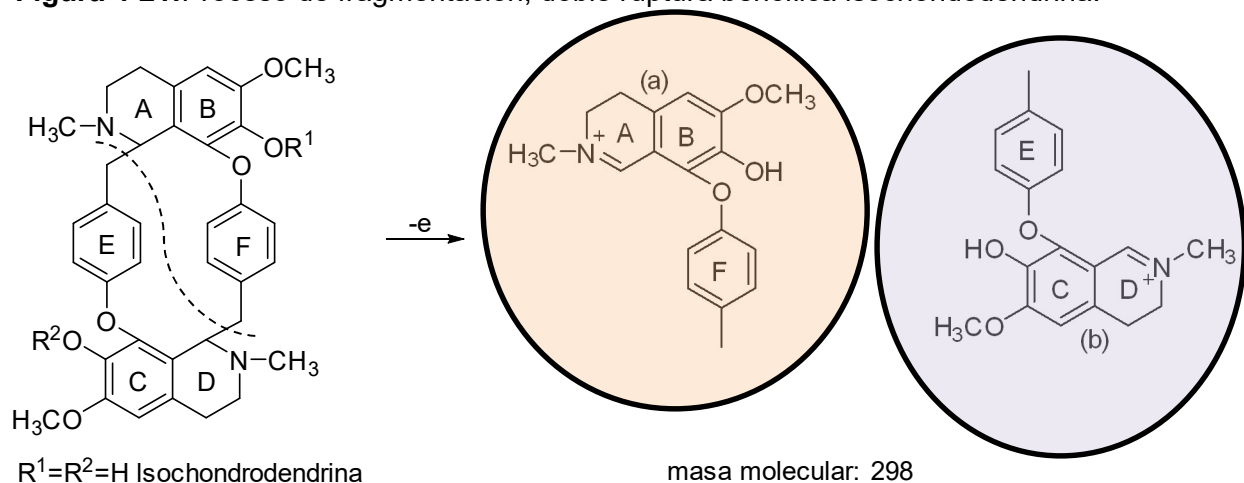


El espectro de masa obtenido para la fracción FrDCM 2-5-1 (compuesto A1) empleando espectrometría de masas en tándem (EM/EM), mostró un fragmento de masa $m/z=298.41$ $[M+2H]^+$ (40%). Según lo reportado por Baldas *et al.*, este fragmento corresponde a la ruptura de los enlaces bencílicos en los alcaloides BBIQS, lo cual origina dos sistemas de anillos ($a= A, B$ y F y $b= C, D$ y E) (Figura 4-21). Este patrón de fragmentación corresponde a la isochondodendrina. Esta ruptura es característica de alcaloides BBIQS enlazados cabeza a cola (Baldas *et al.*, 1972; Mambu *et al.*, 2000).

En la Figura 4-20 el fragmento de masa $m/z=266.98$ (20%), se genera a partir de la pérdida de un metoxilo del sistema de anillo A-B-F. Otro ion característico de masa $m/z=284.18$ (22%), corresponde a la pérdida del metilo del sistema de anillo A-B-F (Figura 4-22). La presencia de los fragmentos obtenidos experimentalmente coincide con los reportados en la literatura para un dímero de alcaloide BBIQ, con puente, lo que implica el acoplamiento cabeza-cola. Estos resultados soportan que el compuesto A1 tenga estas características estructurales y una fórmula molecular de $C_{36}H_{38}O_6N_2$. (Baldas *et al.*, 1972; Schiff, 1999).

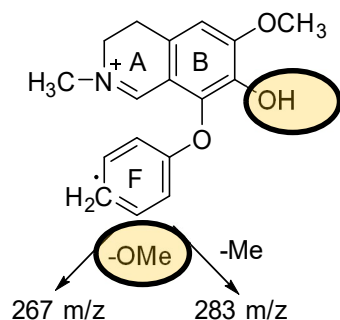
146 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Figura 4-21:Proceso de fragmentación, doble ruptura bencílica isochondodendrina.



Fuente: Baldas et al., 1972

Figura 4-22: Fragmentos característicos de la ruptura de los grupos metoxilo y metilo del sistema de anillos A, B y F



Fuente: Baldas et al., 1972.

Caracterización por RMN de la fracción FrDCM 2-5-1 (Compuesto A1)

El espectro $^1\text{H-RMN}$ para el compuesto A1 se registra en la Figura 4-23 y los desplazamientos químicos fueron resumidos en la Tabla 4-12. En la región entre δ_{H} 5.7 y δ_{H} 7.3 ppm, se observaron cinco señales de protones aromáticos: $\delta=7.15$ (H-10/H-10', d, $J = 8.6$ Hz, 2H), $\delta=6.55$ (H-11/H-11', dd, $J = 8.5, 2.9$ Hz, 2H), $\delta = 5.68$ (H-13/H-13', dd, $J = 8.5, 2.8$ Hz, 2H), $\delta=6.32 - 6.24$ (H-14/H-14', dd, 2H) y la señal de $\delta = 6.80$ (s, 2H), que corresponde al hidrogeno en la posición (H-5/H-5'). Adicionalmente se observó una señal en $\delta=3.80$ que integra para seis hidrógenos característica de grupos metoxilos (6-OCH₃/6'-OCH₃). La señal para los hidrógenos de los N-metilos se presentaron en

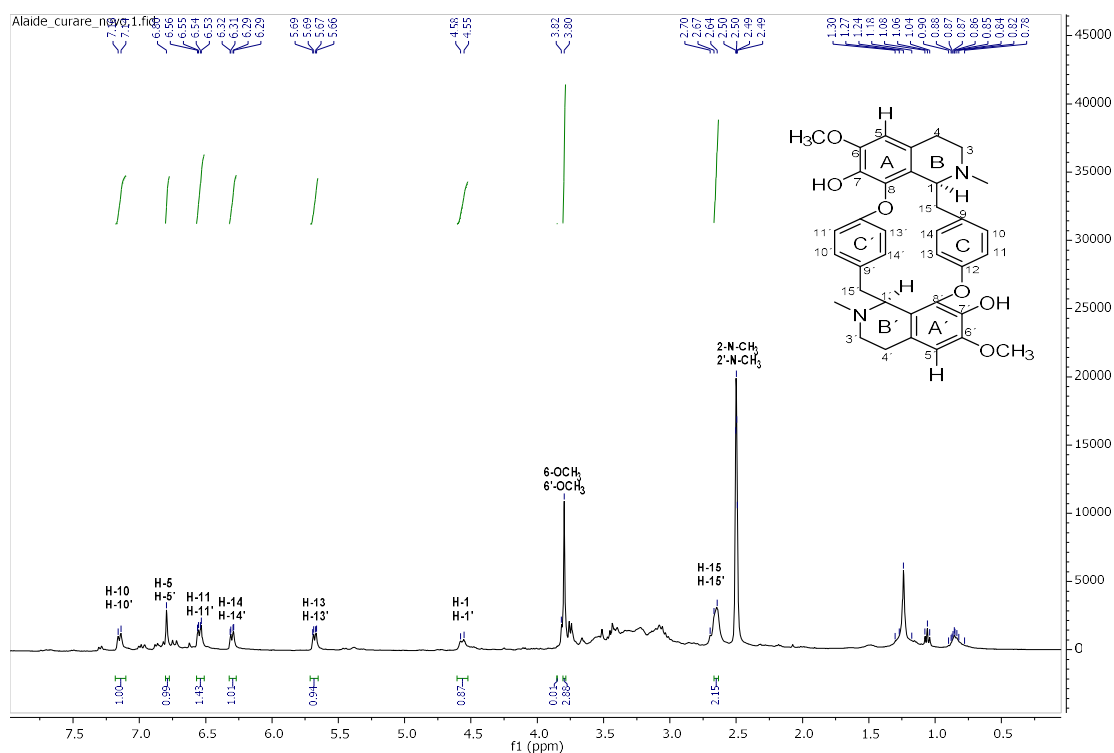
$\delta = 2.49$ (N-CH₃-2/N-CH₃-2'). Estas señales son características del alcaloide BBIQS isochondodendrina (Kanyinda et al., 1997; Mambu et al., 2000; Xian-Kai et al., 1993).

Las señales para los átomos de carbono se asignaron a partir de la interpretación del espectro HSQC (Figura 4-24 y 4-25) y (Tabla 4-12).

Las señales de carbono en los anillos aromáticos (A-A'/C-C') del compuesto A1 son comparables a las reportadas en isochondodendrina, lo que soporta que el compuesto aislado sea este alcaloide BBIQ (Kanyinda et al., 1997; Mambu et al., 2000; Marsaioli et al., 1978).

Del análisis del espectro ¹H-¹H COSY (Figura 4-26 y Tabla 4-12), se observa en la región aromática diversos acoplamientos: el protón en $\delta_H = 7.12$ (H-10/H-10') presenta un acoplamiento con $\delta_H = 6.54$ (H-11/H-11') y $\delta_H = 6.28$ (H-14/H-14'). La señal generada por el protón $\delta_H = 5.63$ (H-13/H-13') acopla con $\delta_H = 6.55$ (H-11/H-11') y $\delta_H = 6.28$ (H-14/H-14'). Además, se observó un acoplamiento entre los dos hidrógenos del grupo metileno a $\delta_H = 3.39$ (H-3/H-3') y con $\delta_H = 1.06$ (H-3/H-4'). Otro acoplamiento entre hidrógenos de grupo metilo corresponden a $\delta_H = 4.61$ (H-1/H-1') y $\delta_H = 1.06$ (H-3/H-4') (Figura 4-27).

Figura 4-23: Espectro ¹H-NMR para el compuesto A1: isochondodendrina.



148 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Tabla 4-12: Comparación desplazamientos químicos de ^1H -RMN del compuesto A1, respecto a lo reportado para isochondodendrina (Kanyinda et al., 1997; Mambu et al., 2000). Principales correlaciones en ^1H - ^1H COSY y ^{13}C -RMN δ del compuesto A1 (400 MHz, DMSO- d_6).

Posición	Datos experimentales ^1H δ (J en Hz)	Datos literatura ^1H δ (J en Hz)*	^{13}C -RMN δ	^1H - ^1H COSY
H-1	4.57 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H)	4.40 d	60.1	H-15
H-1'	4.57 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H)	4.40 d	60.1	H-15'
H-3	3.42 3.44 – 3.37 (t, 2H)	3.25 m	56.6	H-4
H-3'	3.42 3.44 – 3.37 (t, 2H)	2.97 m	56.6	H-4'
H-4	1.02 ($J = 9.1$ Hz, 2H)	2.78 m	29.1	H-3
H-4'	1.02 ($J = 9.1$ Hz, 2H)	2.78 m	29.1	H-3'
H-5	6.80 (s, 1H)	6.60 s	109.2	
H-5'	6.80 (s, 1H)	6.60 s	109.2	
H-10	7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H)	7.10 d	128.7	H-11, H-14
H-10'	7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H)	7.10 d	128.7	H-11', H-14'
H-11	6.55 (dd, $J = 8.5, 2.9$ Hz, 1H)	6.65 dd	117.7	H-10, H-13
H-11'	6.55 (dd, $J = 8.5, 2.9$ Hz, 1H)	6.65 dd	117.7	H-10', H-13'
H-13	5.68 (dd, $J = 8.5, 2.8$ Hz, 1H)	5.82 dd	114.2	H-11, H-14
H-13'	5.68 (dd, $J = 8.5, 2.8$ Hz, 1H)	5.82 dd	114.2	H-11', H-14'
H-14	6.32 (d, 1H)	6.31dd	129.1	H-10, H-13
H-14'	6.32 (d, 1H)	6.31dd	129.1	H-10', H-13'
H-15	2.66 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H)	2.48 m	41.02	H1
H-15'	2.66 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H)	2.50 m	41.8	H-1'
6-OCH3	3.80 (s, 3H)	3.87 s	56.4	
6'-OCH3	3.80 (s, 3H)	3.87 s	56.4	
2-N-CH3	2.49 (s, 3H)	2.48 s		
2'-N-CH3	2.49 (s, 3H)	2.50 s		

Figura 4-24: Espectro HSQC para el compuesto A1, región ampliada del ^1H -RMN entre 1-5 ppm.

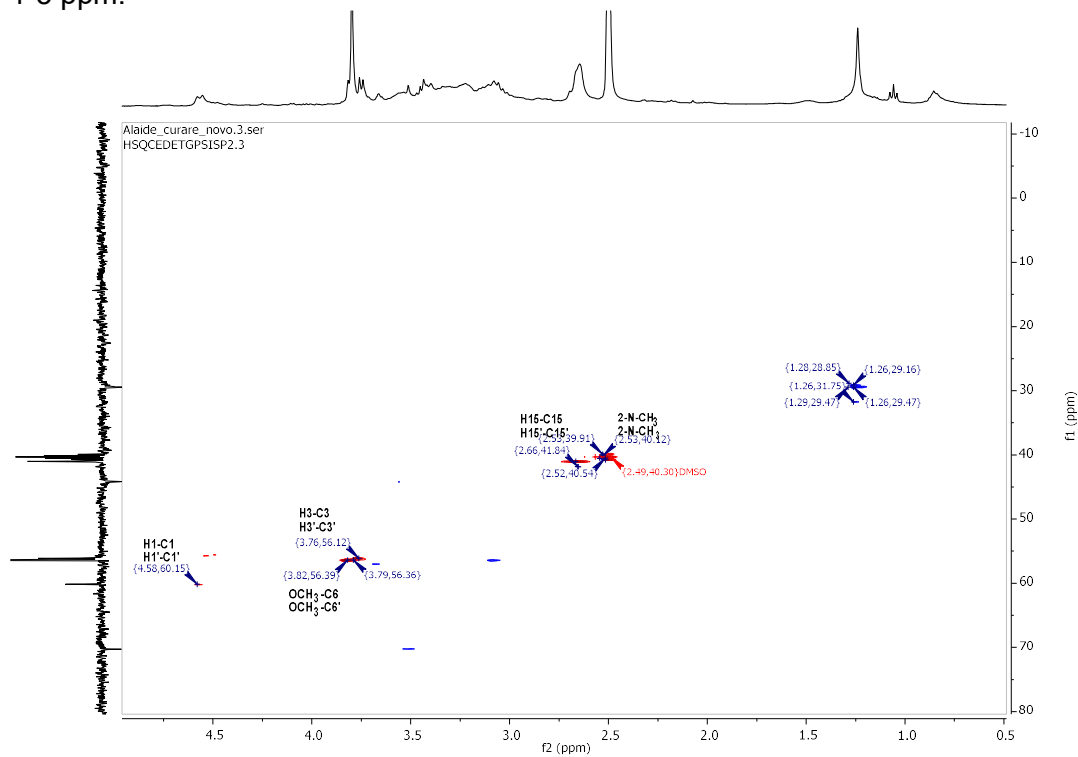
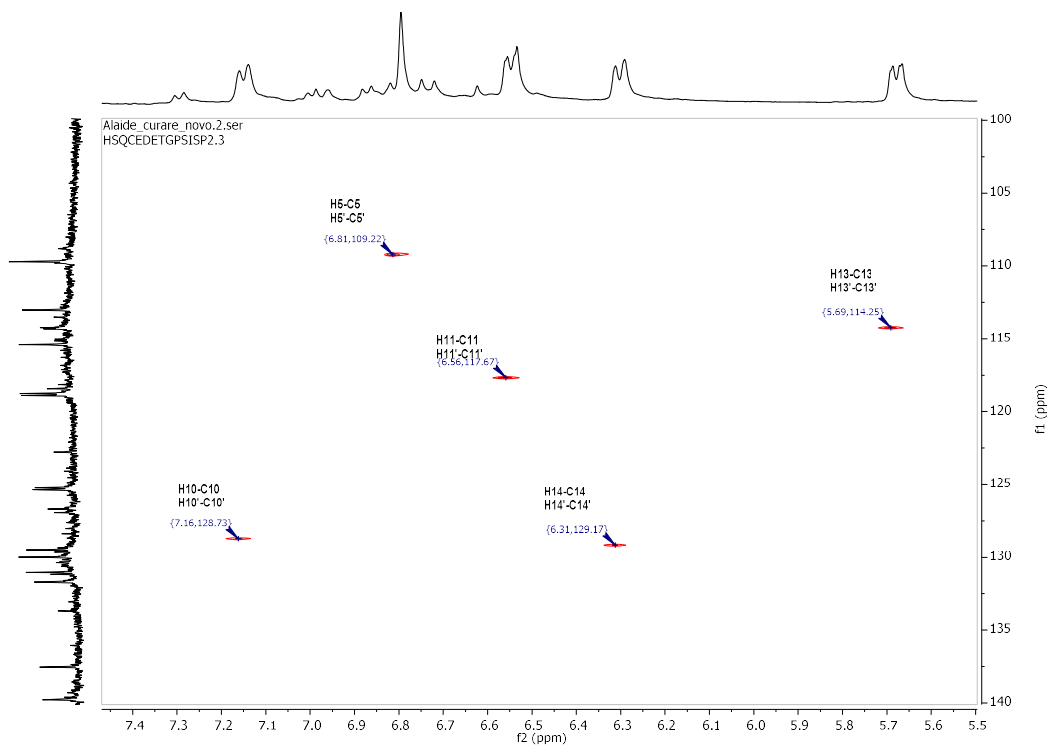


Figura 4-25: Espectro HSQC para el compuesto A1, región ampliada del ^1H -RMN entre 5.5-7.5 ppm.



15C Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

Figura 4-26: Espectro ^1H - ^1H COSY para el compuesto A1 isochondodendrina región aromática.

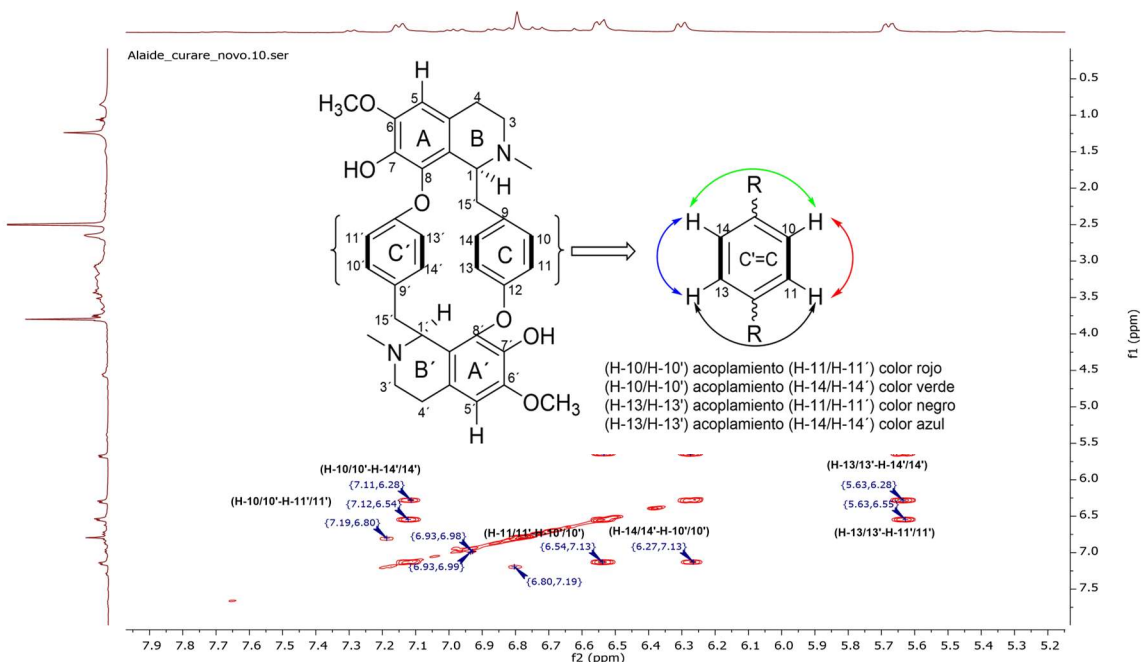
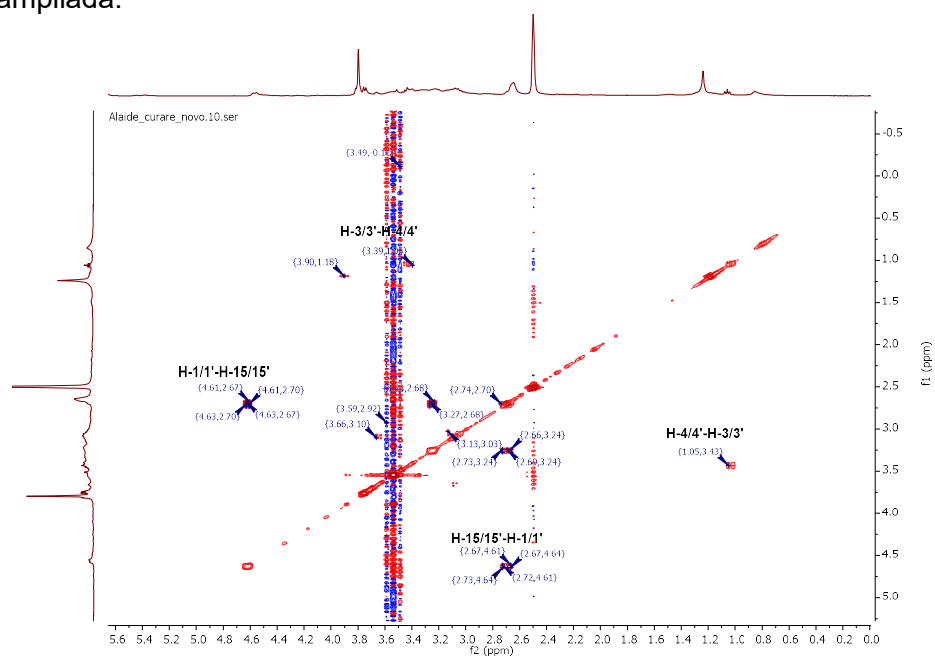
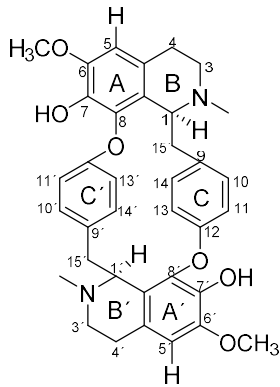


Figura 4-27: Espectro ^1H - ^1H COSY para el compuesto A1 isochondodendrina región alifática ampliada.



Después de realizar el análisis espectroscópico y al comparar las señales con referencias en la literatura, se encontró similitud con el alcaloide isochondodendrina (Figura 4-28), alcaloide BBIQ, presente en diferentes especies de la familia Menispermaceae, como *C. toxicofera* (Menachery, 1996; Schiff, 1999).

Figura 4-28: Estructura de (-)-isochondodendrina.



4.5. ACTIVIDAD ANTIPLASMODIAL FRENTE A *P. falciparum* CLOROQUINA-RESISTENTE (W2) Y CITOTOXICIDAD FRENTE A CÉLULAS HEPG2 DE *C. toxicofera*

4.5.1. Actividad antiplasmodial mediante el método (pLDH) frente a *P. falciparum* cepa W2 de EtOHct, FrDCM1, FrDCM2, A1= isochondodendrina

Como complemento a las pruebas de actividad antiplasmodial ya realizadas al extracto etanólico y a las fracciones primarias de *C. toxicofera* se llevó a cabo un ensayo frente a *P. falciparum* cepa W2 cuantificando la parasitemia mediante el método enzimático pLDH. Además del extracto etanólico y las fracciones FrDCM1 y FrDCM2, se determinó la actividad antiplasmodial frente a esta cepa del compuesto aislado, isochondodendrina (A1) y del patrón de alcaloides BBIQS, tetrandrina. Como control positivo adicional se utilizó cloroquina. El tamizaje inicial realizado a las muestras en las concentraciones de 25 y 50 µg/mL, permitió establecer que todas las muestras presentaron porcentaje de reducción en la parasitemia superiores al 50% a la concentración más baja evaluada (25 µg/mL) (Tabla 4-13).

Tabla 4-13: Porcentajes reducción del crecimiento de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) para las muestras evaluadas.

Muestras	Actividad antiplasmodial (25 µg/mL) porcentaje de parasitemia ± DE	Actividad antiplasmodial (50 µg/mL) porcentaje de parasitemia ± DE
EtOHct	67.0 ± 3.0	73.5 ± 2.5
FrDCM1	60.0 ± 2.0	71.5 ± 1.5
FrDCM2	75.0 ± 3.0	76.5 ± 1.5
isochondodendrina (A1)	76.5 ± 6.5	82.5 ± 2.5
tetrandrina	79.0 ± 1.0	86.0 ± 1.0
cloroquina	Control (+)	Control (+)

Datos de dos experimentos independientes.

A partir del resultado del tamizaje inicial, se estableció un rango de concentraciones empleando a 25 µg/mL como la máxima concentración y mediante diluciones sucesivas hasta y 0.78 µg/mL que permitió establecer la concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀) para cada muestra evaluada (EtOHct, FrDCM1, FrDCM2, isochondodendrina (A1), tetrandrina y cloroquina) por el método pLDH frente a *P. falciparum* cepa W2 (resistente a la cloroquina) (Tabla 4-14). Empleando los rangos de actividad mencionados por De Paula, 2014, en el numeral 3.4.2, todas las muestras presentaron actividad antiplasmodial, clasificada en el rango activo (CI₅₀ = 1µg/mL < CI₅₀ ≤ 15µg/mL). A partir de la clasificación RITAM las muestras (EtOHct, FrDCM1 y FrDCM2) se clasificaron en el rango de bueno a moderado (CI₅₀ = 1.1 a 10 µg/mL), isochondodendrina (A1) se clasificó en el rango de moderada actividad (CI₅₀ = 11 a 25 µg/mL) y tetrandrina se ubico en el rango de actividad de buena (CI₅₀ = 0.1 a 1 µg/mL) (Tabla 4-14). Los valores de CI₅₀, relativamente cercanos entre EtOHct, FrDCM1 y FrDCM2 pueden explicarse por el hecho que los alcaloides BBIQS se distribuyeron entre las fracciones alcaloidales durante el fraccionamiento ácido-base (Dolabela et al., 2015).

Tabla 4-14: Concentración inhibitoria cincuenta (CI₅₀) de las muestras: EtOHct, FrDCM1, FrDCM2, isochondodendrina (A1) y tetrandrina en el ensayo de actividad antiplasmodial frente a *P. falciparum* cepa W2 (resistente a cloroquina).

Tratamiento	CI ₅₀ (µg/mL) Média ± DE	Clasificación (De Paula, 2014)	Clasificación RITAM
EtOHct	5.25 ± 1.53	Activo	Buena a moderada
FrDCM1	4.04 ± 0.83	Activo	Buena a moderada
FrDCM2	6.28 ± 0.66	Activo	Buena a moderada
isochondodendrina	12.59 ± 1.36	Activo	Moderada
tetrandrina	1.00 ± 0.30	Activo	Buena
cloroquina	Control (+)	Control (+)	Control (+)

Tres experimentos independientes.

La sustancia isochondodendrina (A1) presentó una CI₅₀ 12.59±1.36 µg/mL, que lo clasifica en el rango de activo. En comparación con las fracciones alcaloides es el menos activo, esto podría estar asociado al efecto sinérgico de la sustancia aislada con otras moléculas que potencian su actividad antiplasmodial y que están presentes en las fracciones que aún

154 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

incluyen una mezcla de alcaloides BBIQS (Figura 4-6 y 4-7). La disminución de la actividad biológica del compuesto aislado con relación a la fracción que lo originó, es atribuido en diferentes estudios al efecto sinérgico de los compuestos presentes en la fracción (González-Coloma et al., 2012).

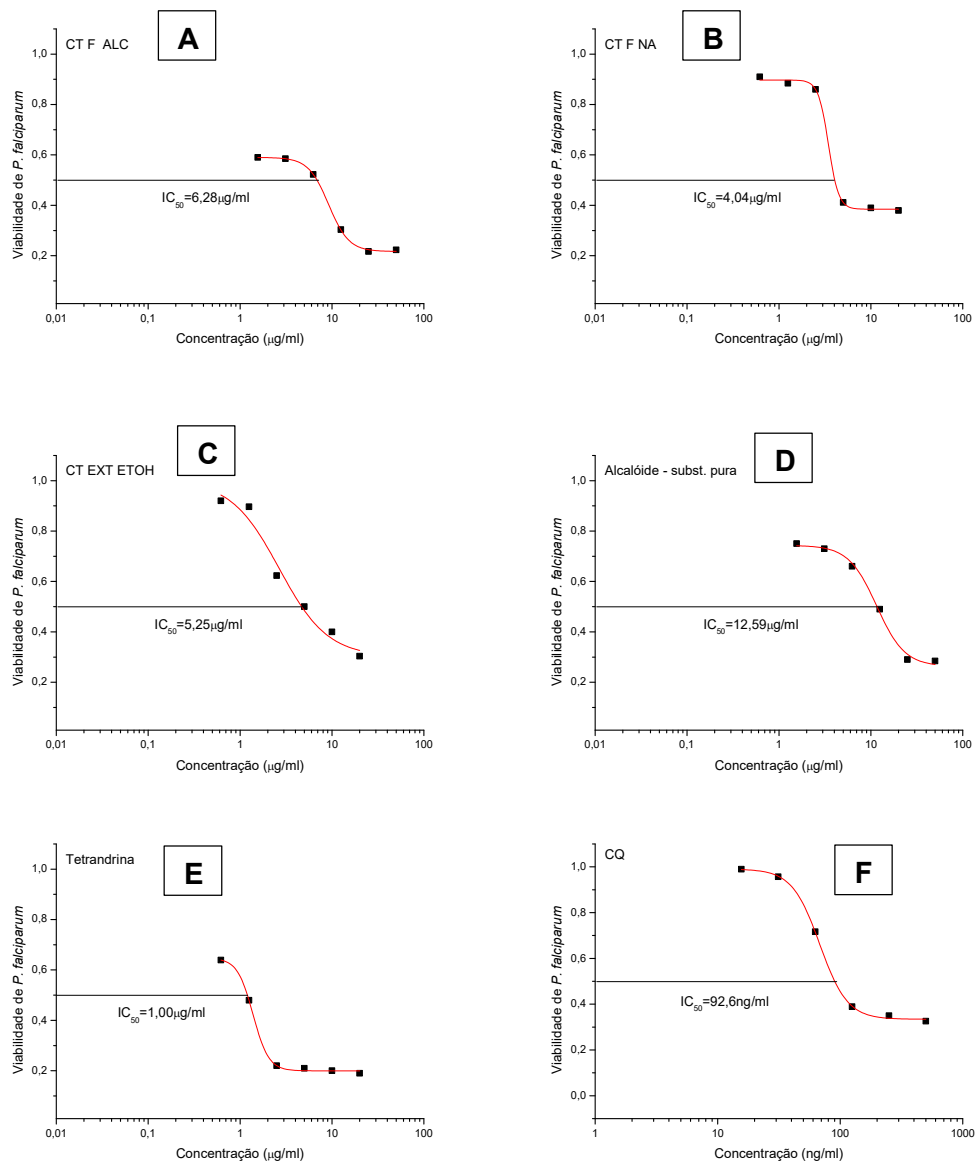
El resultado de la actividad antiplasmodial de EtOHct (5.25±1.53 µg/mL), FrDCM1 (4.04±0.83 µg/mL) y FrDCM2 (6.28±0.66 µg/mL) es comparable al reportado para las fracciones alcaloidales y extracto etanólico de raíces y tallos de *Triclisia sacleuxii* en las cuales se detectaron alcaloides BBIQS (Murebwayire et al., 2008).

Los extractos etanólicos presentaron actividad antiplasmodial evaluada en el método de cuantificación de la parasitemia por *p*LDH frente a *P. falciparum* cepa W2 (resistente a la cloroquina) de activo ($1\mu\text{g/mL} < \text{CI}_{50} \leq 15\mu\text{g/mL}$), al compararse con una preparación tradicional que usa lianas de *C. toxicofera* y en la cual se detectaron alcaloides, evaluada frente a *P. falciparum* FCR3 (7.3 µg/mL) en el modelo de lectura por fluimetría la actividad se sigue conservando en el rango de buena a moderada (Rodríguez et al., 2018).

En la Figura 4-29 se presentan las curvas concentración-respuesta, para la cepa *P. falciparum* cepa W2 (resistente a cloroquina), empleando el método (*p*LDH). La evaluación se realizó en tres ensayos independientes.

El extracto etanólico EtOHct se evaluó frente a dos cepas cloroquino resistente: FCR-3 (método de sonda fluorescente de SYBR Green I) y W2 (*p* LDH), el resultado fue de CI_{50} de $7.6 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$ y $5.25 \pm 1.53 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos resultados ubican al EtOHct en el nivel de actividad de buena a moderada (1.1 a 10 µg/mL) según RITAM y activo ($1\mu\text{g/mL} < \text{CI}_{50} \leq 15\mu\text{g/mL}$), según De Paula, 2014. Es importante resaltar que las pruebas fueron realizadas en laboratorios diferentes, empleando cepas diferentes y dos métodos de análisis distintos, lo cual confirma la estabilidad de la muestra respecto a su actividad y la concordancia entre las dos metodologías.

Figura 4-29: Relación concentración-respuesta de las sustancias frente a parásitos de *P. falciparum* (cepa W2) (resistente a cloroquina) empleando el método enzimático pLDH. A=FrDCM2; B=FrDCM1; C= EtOHct; D=isochondodendrina; E=tetrandrina; F= cloroquina.



4.5.2 Citotoxicidad en la línea celular HepG2 A16 e Índice de selectividad (IS)

La correlación entre CC_{50} y CI_{50} permite establecer el índice de selectividad, el cual es una medida relativa de la actividad antiplasmodial, sin que se produzca efecto citotóxico. Esta determinación es importante en la evaluación de la seguridad de extractos, fracciones enriquecidas y compuestos de síntesis o aislados. Los resultados en estas pruebas direccionan la selección de la sustancia evaluada y evita adelantar estudios costosos con sustancias tóxicas. La citotoxicidad se considera el potencial de un compuesto para inducir la muerte celular, información que es valiosa para establecer una correlación entre la citotoxicidad basal y la posible toxicidad en humanos. Los ensayos de citotoxicidad para las sustancias candidatas emplean líneas celulares de hígado, sangre, riñón, piel y células nerviosas (Nogueira & Rosário, 2010; Souza et al., 2018).

La citotoxicidad *in vitro* de las muestras evaluadas se realizó frente a la línea celular HepG2 A16, derivada de un hepatoblastoma primario humano. Los resultados de la concentración que inhibe 50 por ciento del crecimiento (CC_{50}) se muestra en la Tabla 4-15. En la clasificación de toxicidad propuesta por Osorio et al. (2007), las muestras EtOHct, FrDCM1 y FrDCM2 se clasificaron como citotóxicas, con valores en el rango de $10 \mu\text{g/mL} < CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. Estas muestras con valores de CC_{50} entre $25.98 \pm 2.41 \mu\text{g/mL}$ y $51.92 \pm 0.90 \mu\text{g/mL}$, son menos tóxicas que las fracciones alcaloidales obtenidas de *Cissampelos mucronata*, en las cuales se detectaron alcaloides BBIQS, cuyo valor de CC_{50} se presentaron entre $2.3 \mu\text{g/mL}$ y $20 \mu\text{g/mL}$ (Tshibangu et al., 2003).

El compuesto isochondodendrina (A1) presentó una CC_{50} de $44.61 \pm 2.72 \mu\text{g/mL}$ frente a la línea celular HepG2 A16, la que permite clasificarlo como citotóxico, una vez que está en el rango de $10 \mu\text{g/mL} < CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ (Osorio et al., 2007). Este valor de CC_{50} es comparable con lo reportado para alcaloides BBIQS obtenidos de *Chondodendron tomentosum*: chondrocurina $45.48 \mu\text{g/mL}$ ($37.81\text{--}54.69 \mu\text{g/mL}$), (S,S')-12-O-methyl (+)-curine $41.69 \mu\text{g/mL}$ ($38.15\text{--}45.57 \mu\text{g/mL}$) y cycleanina $51.41 \mu\text{g/mL}$ ($27.62\text{--}57.69 \mu\text{g/mL}$), los cuales fueron evaluados en la línea celular de ovario de hámster (CHO). En otra investigación, empleando la línea celular de adenocarcinoma de colon (HT-29), se evaluó el alcaloide BBIQ curina, cuya CC_{50} fue $51.73 \pm 6.7 \mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos en cuanto a CC_{50} para las fracciones y compuesto aislado de *C. toxicifera* en esta

investigación son semejantes a CC_{50} reportadas en otros trabajos para plantas con alcaloides BBIQS, ya que las características estructurales de estos alcaloides son semejantes (Dantas et al., 2015; J.-J. Lv et al., 2013).

Por otro lado, el alcaloide BBIQ tetrandrina mostró una $CC_{50} = 6.01 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$ con la que se clasifica como una sustancia muy tóxica. El extracto, las fracciones y el compuesto aislado de *C. toxicofera* presentaron valores de CC_{50} asociados con menor o igual toxicidad que la cloroquina ($25.04 \pm 2.48 \mu\text{g/mL}$), fármaco utilizado como antimalárico.

Tabla 4-15: Concentración que inhibe 50 por ciento del crecimiento (CC_{50}) de células HepG.

Muestras	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Clasificación (Osorio et al., 2007)
EtOHCt	51.92 ± 0.90	$10\mu\text{g/mL} < CC_{50} < 100\mu\text{g/mL}$ Rango de Toxico
FrDCM1	49.69 ± 2.27	$10\mu\text{g/mL} < CC_{50} < 100\mu\text{g/mL}$ Rango de Toxico
FrDCM2	25.98 ± 2.41	$10\mu\text{g/mL} < CC_{50} < 100\mu\text{g/mL}$ Rango de Toxico
A1 = Isochondodendrina	44.61 ± 2.72	$10\mu\text{g/mL} < CC_{50} < 100\mu\text{g/mL}$ Rango de Toxico
Tetrandrina	6.01 ± 0.32	$CC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$
Cloroquina	25.04 ± 2.48	-----

Se realizaron tres ensayos independientes para determinar la CC_{50}

Todas las muestras evaluadas mostraron un Índice de selectividad (IS) entre 3.54 y 12.30 (Tabla 4-16), por lo tanto el extracto etanólico, las fracciones alcaloides de *C. toxicofera* así como los alcaloides BBIQ isochondodendrina y tetrandrina pueden considerarse como alternativas promisorias para ser incluidas en preparaciones farmacéuticas antimalaricas. Un valor de IS mayor a dos, unido a los resultados de actividad antiplasmodial sugiere que se presenta actividad antiplasmodial y que no se evidencia citotoxicidad sobre la línea celular evaluada, HepG2 A16 (Nogueira & Rosário, 2010; Souza et al., 2018).

Son pocos los estudios en los que se evalúa la actividad citotóxica como ensayo de seguridad en plantas de la familia Menispermaceae. Algunas investigaciones presentan el resultado de CC_{50} para extractos primarios cómo se reportó para el extracto acuoso de *Epinetrum villosuma*, planta que contiene alcaloides BBIQS, con $CC_{50} = 5.5 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ e $IS = 27.5$, evaluado en línea celular de carcinoma humano HCT-116. De esta misma planta

158 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

se aislaron los alcaloides BBIQS cuyos valores de IS: cycleanine (IS=118), isochondodendrina (IS=175) y cocsoline (IS=9.3), hacen de estos alcaloides sustancias razonablemente seguras para ser utilizadas en distintos estudios biológicos (Otshudi et al., 2005).

Es importante resaltar que las muestras evaluadas en esta investigación, siguiendo el criterio de acuerdo al valor de $IS > 2$ pueden ser utilizadas en distintos estudios biológicos, que busquen encontrar posibles sustancias antimaláricas (Nogueira & Rosário, 2010).

Tabla 4-16: Valores de CC_{50} , CI_{50} e índice de selectividad calculado para las muestras de *C. toxicofera*.

Muestra	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$ **	IS
EtOHct	51.92 ± 0.90	5.25 ± 1.53	9.89
FrDCM1	49.69 ± 2.27	4.04 ± 0.83	12.30
FrDCM2	25.98 ± 2.41	6.28 ± 0.66	4.14
A1 = isochondodendrina	44.61 ± 2.72	12.59 ± 1.36	3.54
tetrandrina	6.01 ± 0.32	1.00 ± 0.30	6.01
cloroquina	25.04 ± 2.48	0.09 ± 0.02	270.41

* CC_{50} : línea celular HepG2 A16; ** CI_{50} : *P. falciparum* cepa W2

4.6 PROPUESTA MARCADOR PARA EL EXTRACTO DE *C. toxicofera*

Como parte de los objetivos de este trabajo se contempló el proponer al menos un marcador químico para *C. toxicofera*, para ser utilizado a futuro en la caracterización y control de calidad de la materia prima vegetal, extractos y fracciones, remedios y productos fitoterapéuticos, además de guiar la estandarización de extractos y la optimización de las diferentes etapas involucradas.

El compuesto A1 aislado de la fracción alcaloidal FrDCM2 obtenida del extracto etanólico de *C. toxicofera* se identificó como isochondodendrina, el cual puede proponerse como marcador activo presente en la planta medicinal. Esta sustancia se ubica en esta categoría de marcador activo al presentar actividad farmacológica antiplasmodial en el modelo (ρ LDH) cepa W2 (resistente a la cloroquina) con una CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) = 12.59 ± 1.36 que lo ubica en el rango de actividad como una sustancia activa (Busse, 2000; Kushwaha et al., 2010; Souza et al., 2018).

De acuerdo al concepto de Pathak, 2017 isochondodendrina, puede proponerse como un marcador de calidad (Marcador Q), ya que cumple con las condiciones básicas:

- es un compuesto propio o característico de las lianas de *C. toxicofera* como alcaloide BBIQ.

- posee una propiedad farmacológica evidenciada en esta investigación, como sustancia antiplasmodial.

Para plantas de la familia Menispermaceae como *C. toxicofera* se han desarrollados pocos estudios fitoquímicos, en ellos se han reportado alcaloides BBIQS como curina, isochondodendrina, toxicoferina, mezcla curina y tubocurarina que han si evaluados en modelos farmacológicos frente a cepas de *P.falciparum* (Cava et al., 1969; Menachery, 1996; Otshudi et al., 2005). En esta investigación a partir de los estudios de actividad farmacológica *in vitro* e *in vivo*, evaluación de la citotoxicidad orientada a generar información de seguridad y estudios químicos de aislamiento, purificación y elucidación se propone el compuesto isochondodendrina como marcador activo, para lianas de *C. toxicofera* con actividad antiplasmodial. El proponer un marcador activo a partir de los

16C **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

estudios químicos y farmacológicos es información que aún no ha sido reportado en la literatura consultada, lo cual se constituye en un aporte relevante de esta investigación.

El alcaloide BBIQ tetrandrina, aunque no ha sido reportado en *C. toxicofera*, presenta el núcleo básico de este tipo de alcaloides: dos unidades de bencilisoquinolina unidas por dos o enlaces difenil éter. Este alcaloide BBIQ ha sido sintetizado y está disponible comercialmente por lo que fue utilizado en esta investigación como referente en los análisis de CLAE-DAD y CLUE-DAD. Teniendo en cuenta lo anterior se propone a la tetrandrina como un marcador químico alternativo o complementario a la isochondodendrina.

La tetrandrina puede ser propuesta como un marcador químico en la categoría de componentes generales, ya que al ser un compuesto presente en distintos géneros y especies de la familia Menispermaceae se puede utilizar como patrón en los perfiles cromatográficos y en diferentes ensayos analíticos orientados a la identificación o cuantificación de alcaloides BBIQ que compartan el mismo núcleo estructural (S. Li et al., 2008). Por otro lado, como se demostró su actividad antiplasmodial de la tetrandrina, también puede considerarse como marcador activo, recordando que al no estar presente en *C. toxicofera* los resultados deben considerarse contemplando esta situación.

Consideraciones finales

Atendiendo a las necesidades de proponer nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la malaria, enfermedad que afecta principalmente a los habitantes en países del trópico, esta investigación adelantó una serie de estudios que empezó con la preselección de cinco especies de plantas con antecedentes de uso en el tratamiento de la malaria, posteriormente se realizaron estudios de actividad antiplasmodial *in vitro* frente a cepas de *P. falciparum* FCR-3 (resistente a la cloroquina), y ensayos de actividad antimalárica *in vivo* frente a *P. berghei* (cepa ANKA). Además, se realizaron estudios de toxicidad aguda siguiendo la guía OECD. El abordaje complementario fue el aislamiento, purificación y elucidación estructural que permitió obtener un alcaloide BBIQS isochondodendrina, que finalmente fue propuesto como marcador activo.

Este estudio establece la pertinencia de seguir ampliando el conocimiento sobre *Curarea toxicofera* tanto en los aspectos farmacológicos y toxicológicos, como en su composición. Para ello es conveniente continuar con la identificación y purificación de otros compuestos,

en especial alcaloides BBIQ, y el desarrollo o adaptación de metodologías analíticas que permitan la caracterización de material vegetal, extractos, fracciones y productos terminados desde una perspectiva cualitativa y cuantitativa. Disponer de estas metodologías permitirán, entre otros, establecer la abundancia relativa de alcaloides BBIQS y en especial de isochondodendrina en muestras de diferentes orígenes hacer correlaciones composición / actividad, así como disponer de protocolos para el control de calidad y para los estudios de estabilidad. Desde lo biológico es conveniente adelantar ensayos en otras cepas y considerar modelos basados en otras etapas del ciclo parasitario, así como ampliar el perfil de citotoxicidad.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- El extracto etanólico obtenido de *Curarea toxicofera* se seleccionó a partir de cinco especies sometidas a tamizaje farmacológico y químico. El extracto etanólico de *C. toxicofera* presentó la mejor actividad antiplasmodial empleando el método de lectura por fluorescencia de SYBR Green I, ubicándose en el rango de moderada a buena frente *P. falciparum*, cepa FCR-3 ($CI_{50} = 7.6 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$), así como la mejor relación CH_{50}/CI_{50} (mayor a 132) y metabolitos secundarios con antecedentes de actividad antimalárica, específicamente alcaloides BBIQS.
- La evaluación de la actividad antiplasmódial *in vitro* frente a *P. falciparum* cepa W2 por el método enzimático $pLDH$, permitió establecer la CI_{50} para EtOHct= $5.25 \pm 1.53 \mu\text{g/mL}$ y las fracciones FrDCM1= $4.04 \pm 0.83 \mu\text{g/mL}$ y FrDCM2= $6.28 \pm 0.66 \mu\text{g/mL}$. Todas las muestras presentaron actividad antiplasmodial, clasificada en el rango de activo. El índice de selectividad calculado para estas muestras se encuentra en un rango entre 4.14 y 12.30.
- El extracto etanólico de *C. toxicofera* y sus fracciones alcaloidales presentaron actividad antimalárica *in vivo* frente a *Plasmodium berghei* cepa ANKA.
- Se estableció que la época de colecta (invierno y verano ecológico) de las lianas de *C. toxicofera* no incidió ni en la composición, evaluada mediante perfiles cromatográficos (CCD y CLAE-DAD), ni en la actividad antiplasmodial frente *P. falciparum* cepa FCR-3, de los extractos etanólicos obtenidos.

-
- Se determinó la categoría toxicológica, de acuerdo con el Globally Harmonized System (GHS), para el extracto etanólico de *C. toxicofera* y dos de las fracciones alcaloidales: fracción FrDCM 1 y FrDCM 2, obtenidas a partir de este, la cual fue Categoría 4 (LD₅₀ de 1000 mg/kg), Categoría 5 (LD₅₀ mayor a 5000 mg/kg) y Categoría 3 (LD₅₀ de 300 mg/kg), respectivamente

 - Se aisló y purificó el compuesto isochondodendrina (A1), alcaloide BBIQ, asociado a la actividad antiplasmodial, con CI₅₀ = 12.59±1.36 µg/mL, frente a la cepa W2 de *P. falciparum*, y con un IS de 3.5. Este compuesto fue seleccionado como marcador terapéutico para el extracto de *C. toxicofera*.

 - La información química, farmacológica y toxicológica, así como de la incidencia de factores climáticos en la expresión de metabolitos secundarios, se constituye en resultados que respaldan el uso tradicional de la Comunidad Ziora-Amena, de la familia lingüística Uitoto, en la Amazonia Colombiana, para el tratamiento de la malaria y sienta las bases para el desarrollo de un producto fitoterapéutico con actividad antimalárica.

5.2 RECOMENDACIONES

A partir de los ensayos de actividad biológica y estudios químicos se proponen las siguientes recomendaciones:

- Realizar el fraccionamiento biomonitorado de la fracción FrDCM-1 y la FrAcB para identificar distintos alcaloides BBIQS presentes en estas fracciones, que puedan contribuir a la actividad antiplasmodial.

- Estudiar la actividad antimalárica *in vivo*, empleando el modelo de malaria murina de *P. berghei* (cepa ANKA), al compuesto aislado isochondodendrina (A1).
- Llevar a cabo ensayos orientados a la evaluación del mecanismo de acción de la isochondodendrina.

- Buscar otras sustancias en el extracto, que puedan ser propuestas como marcadores analíticos del extracto etanólico de *C. toxicofera* y que puedan encontrarse a nivel comercial.

- Establecer protocolos optimizados para su purificación de alcaloides BBIQ a partir de especies de la familia Menispermaceae, que puedan ser utilizados como patrones.

- Continuar con las investigaciones que permitan disponer de extractos estandarizados de *C. toxicofera*

Bibliografía

Adams, M., Alther, W., Kessler, M., Kluge, M., & Hamburger, M. (2011). Malaria in the renaissance: Remedies from European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 278-288. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.060>

Affum, A. O., Shiloh, D. O., & Adomako, D. (2013). Monitoring of arsenic levels in some ready-to-use anti-malaria herbal products from drug sales outlets in the Madina area of Accra, Ghana. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 131-135. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.049>

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brazil) & Fundação Oswaldo Cruz. (2010). *Farmacopeia brasileira*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Fundação Oswaldo Cruz. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/8031json-file-1>

Aguiar, A. C. C., Rocha, E. M. M. da, Souza, N. B. de, França, T. C. C., & Krettli, A. U. (2012). New approaches in antimalarial drug discovery and development: A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7), 831-845. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000700001>

Ahmad, S. S., Rahi, M., Ranjan, V., & Sharma, A. (2021). Mefloquine as a prophylaxis for malaria needs to be revisited. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 17, 23-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.06.003>

Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325-348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>

Andrade-Cetto, A., & Vázquez, R. C. (2010). Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.016>

Arboles ornamentales. (2021). *Arboles ornamentales*. <https://www.arbolesornamentales.es/Cecropiaceae.htm>

166 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Arias Marciales, M. H., Rodríguez Novoa, Y. V., & Garavito Cárdenas, G. (2016). Adaptación y optimización de un método de lectura por fluorometría en el modelo farmacológico *in vitro* de cultivo de *Plasmodium falciparum*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 45(1), 127-146. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n1.58024>

Ayyad, S.-E. N., Basaif, S. A., Al-Saggaf, A. T., & Alarif, W. M. (2012). Vincamine and 14-epi-vincamine indole alkaloids from *Ambelania occidentalis*. *Journal of Saudi Chemical Society*, 16(4), 419-422. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.02.008>

Baldas, J., Bick, I. R., Ibuka, T., Kapil, R. S., & Porter, Q. N. (1972). Mass spectrometry of bisbenzylisoquinoline alkaloids. 3. Alkaloids derived from coclaurine units joined head-to-tail. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1*, 4, 599-601. <https://doi.org/10.1039/p19720000599>

Bannister, L., & Mitchell, G. (2003). The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends in Parasitology*, 19(5), 209-213. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00086-2)

Berregi, I., Santos, J. I., Campo, G. del, Miranda, J. I., & Aizpurua, J. M. (2003). Quantitation determination of chlorogenic acid in cider apple juices by ¹H NMR spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 486(2), 269-274. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00496-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00496-3)

Bijauliya, R. K., & Alok, S. (2017). A comprehensive review on standardization of herbal drugs. *International journal of pharmaceutical sciences and research*. <https://ijpsr.com/bft-article/a-comprehensive-review-on-standardization-of-herbal-drugs/>

Botsaris, A. S. (2007). Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: The archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 18. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-18>

Brandão, M. G. L., Zanetti, N. N. S., Oliveira, P., Graef, C. F. F., Santos, A. C. P., & Monte-Mór, R. L. M. (2008). Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.004>

Busse, W. (2000). The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug Information Journal*, 34(1), 15-23. Scopus. <https://doi.org/10.1177/009286150003400102>

Cadena-González, A. L., Sørensen, M., & Theilade, I. (2013). Use and evaluation of native and introduced medicinal plant species in Campo Hermoso and Zetaquira, Boyacá, Colombia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9, 23. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-23>

Calvo, M. I. (2006). Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 380-382. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.037>

Cañigüeral, S. (2002). La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? https://www.researchgate.net/publication/228863288_La_Fitoterapia_una_terapeutica_para_el_tercer_milenio

Cárdenas Cuadros, P. A. (2011). Evaluación de la actividad antimalárica de preparaciones tradicionales obtenidas de dos especies promisorias usadas por una comunidad en zona endémica y profundización en el estudio de su actividad farmacológica. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/7721>

Casanova, E., García-Mina, J. M., & Calvo, M. I. (2008). Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena officinalis* L. Leaves. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(3), 93-97. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0073-0>

Castro, L. S., Perazzo, F. F., & Maistro, E. L. (2009). Genotoxicity testing of *Ambelania occidentalis* (Apocynaceae) leaf extract *in vivo*. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 8(2), 440-447. <https://doi.org/10.4238/vol8-2gmr588>

Castro-Gamboa, I., & Castro, O. (2004). Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). *Phytochemistry*, 65(16), 2369-2372. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.07.008>

Cava, M. P., Kunitomo, J., & DaRocha, A. I. (1969). The alkaloids of *Chondodendron toxicoferum*. *Phytochemistry*, 8(12), 2341-2343. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88152-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88152-2)

Céline, V., Adriana, P., Eric, D., Joaquina, A., Yannick, E., Augusto, L. F., Rosario, R., Dionicia, G., Michel, S., Denis, C., & Geneviève, B. (2009). Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 413-422. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.041>

Chan, E. W. C., Wong, S. K., & Chan, H. T. (2016). Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties: A review of ten genera. *Journal of Integrative Medicine*, 14(4), 269-284. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(16\)60261-3](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(16)60261-3)

Chassaigne, J. A. (2001). Malaria y fármacos antimaláricos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(2), 85-88.

Consolini, A. E., & Migliori, G. N. (2005). Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 417-422. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.030>

168 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Consolini, A. E., Ragone, M. I., Migliori, G. N., Conforti, P., & Volonté, M. G. (2006). Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (Ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.006>

CorpoAmazonia. (2022, junio 10). *Clima*. https://www.corpoamazonia.gov.co/region/Jur_Clima.htm

Costa, G. M., Schenkel, E. P., & Reginatto, F. H. (2011). Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus *Cecropia*. *Natural Product Communications*, 6(6), 1934578X1100600637. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600637>

Daga, M. A., Ayala, T. S., & Menolli, R. A. (2020). A review of the anti-inflammatory and antimicrobial activities of the components of the *Cecropia* genus. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 13-20. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i8.38031>

Dantas, B. B., Faheina-Martins, G. V., Coulidiati, T. H., Bomfim, C. C. B., da Silva Dias, C., Barbosa-Filho, J. M., & Araújo, D. A. M. (2015). Effects of curine in HL-60 leukemic cells: Cell cycle arrest and apoptosis induction. *Journal of Natural Medicines*, 69(2), 218-223. <https://doi.org/10.1007/s11418-014-0881-5>

De Lima, R., Guex, C. G., da Silva, A. R. H., Lhamas, C. L., Dos Santos Moreira, K. L., Casoti, R., Dornelles, R. C., da Rocha, M. I. U. M., da Veiga, M. L., de Freitas Bauermann, L., & Manfron, M. P. (2018). Acute and subacute toxicity and chemical constituents of the hydroethanolic extract of *Verbena litoralis* Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.012>

De Maria, C. A. B., & Moreira, R. F. A. (2004). Métodos para análisis de ácido clorogênico. *Química Nova*, 27(4), 586-592. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400013>

De Paula, R. C. (2014). Atividade antimalárica de *aspidosperma subincanum* mart. biomonitorada por testes *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, *in vivo* contra *P. berghei* e efeito da uleína no retículo endoplasmático de *P. falciparum*. Universidade Federal de Minas Gerais. https://www.researchgate.net/profile/Alaide_De_Oliveira3/publication/279911567_Aspidosperma_species_Apocynaceae_as_sources_of_antimalarials_from_the_in_vitro_antiplasmodial_activity_of_extracts_to_preclinical_toxicologica.

De Pilla Varotti, F., Botelho, A. C. C., Andrade, A. A., de Paula, R. C., Fagundes, E. M. S., Valverde, A., Mayer, L. M. U., Mendonça, J. S., de Souza, M. V. N., Boechat, N., & Krettli, A. U. (2008). Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 3868-3874. <https://doi.org/10.1128/AAC.00510-08>

-
- Deepak, M., & Handa, S. S. (1998). 3 α ,24-dihydroxy-urs-12-en-28-oic acid from *Verbena officinalis* fn1fn1RRL communication No. 2251. *Phytochemistry*, 49(1), 269-271. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01004-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01004-2)
- Deharo, E., Gautret, P., Muñoz, V., & Sauvain, M. (2000). Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. En CYTED – IRD (p. 24-80). La Paz, Bolivia
- De-La-Cruz Chacón, I., González-Esquinca, A. R., & Riley-Saldaña, C. A. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*, 17(2), 189-202.
- Dolabela, M. F., Póvoa, M. M., Brandão, G. C., Rocha, F. D., Soares, L. F., de Paula, R. C., & de Oliveira, A. B. (2015). *Aspidosperma* species as sources of anti-malarials: Uleine is the major anti-malarial indole alkaloid from *Aspidosperma parvifolium* (Apocynaceae). *Malaria Journal*, 13 Suppl 1, 498. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0997-4>
- Douglas, J. A., Follett, J. M., Parmenter, G. A., Sansom, C. E., Perry, N. B., & Littler, R. A. (2010). Seasonal variation of biomass and bioactive alkaloid content of goldenseal, *Hydrastis canadensis*. *Fitoterapia*, 81(7), 925-928. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.06.006>
- Dutra, R. C., Campos, M. M., Santos, A. R. S., & Calixto, J. B. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 112, 4-29. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- EMA. (2018, septiembre 17). Markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products traditional [Text]. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/markers-used-quantitative-qualitative-analysis-herbal-medicinal-products-traditional-herbal>
- Ezenyi, I. C., & Salawu, O. A. (2016). Approaches, Challenges and Prospects of Antimalarial Drug Discovery from Plant Sources. *Current Topics in Malaria*. <https://doi.org/10.5772/65658>
- Fuloria, N. K., & Fuloria, S. (2013). Structural Elucidation of Small Organic Molecules by 1D, 2D and Multi Dimensional-Solution NMR Spectroscopy. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, s11. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.S11-001>
- Galindo, A. S. (1983). Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia compositae. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CO20000009717>
- Garavito, G., Rincón, J., Arteaga, L., Hata, Y., Bourdy, G., Gimenez, A., Pinzón, R., & Deharo, E. (2006). Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 460-462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.033>

170 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

García, C. L. G. de, A, E. C., & C, N. R. (1995). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 23(1), Article 1. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56492>

Garcia, G. R. M., Hennig, L., Shelukhina, I. V., Kudryavtsev, D. S., Bussmann, R. W., Tsetlin, V. I., & Giannis, A. (2015, octubre 23). Curare Alkaloids: Constituents of a Matis Dart Poison (world) [Review-article]. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00457>

Garrido-Cardenas, J. A., González-Cerón, L., Manzano-Agugliaro, F., & Mesa-Valle, C. (2019). Plasmodium genomics: An approach for learning about and ending human malaria. *Parasitology Research*, 118(1), 1-27. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6127-9>

Gong, S., Xu, D., Zou, F., & Peng, R. (2017). (-)-Curine induces cell cycle arrest and cell death in hepatocellular carcinoma cells in a p53-independent way. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 89, 894-901. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.148>

González-Coloma, A., Reina, M., Sáenz, C., Lacret, R., Ruiz-Mesia, L., Arán, V. J., Sanz, J., & Martínez-Díaz, R. A. (2012). Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. *Parasitology Research*, 110(4), 1381-1392. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2638-3>

Google Maps. (2021). Google Maps. <https://www.google.com/maps/place/4%C2%B008'17.5%22S+69%C2%B055'10.0%22W/@-4.0615861,-69.8977975,95200m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0x018m2!3d-4.1381944!4d-69.9194444?hl=es>

Greenwood, B. (2010). Anti-malarial drugs and the prevention of malaria in the population of malaria endemic areas. *Malaria Journal*, 9 Suppl 3, S2. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-S3-S2>

Guha, K. P., Mukherjee, B., & Mukherjee, R. (1979). Bisbenzylisoquinoline Alkaloids—A Review. *Journal of Natural Products*, 42(1), 1-84. <https://doi.org/10.1021/np50001a001>

Guidelines for the Treatment of Malaria (2nd ed.). (2010). World Health Organization. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK254223/>

Gutiérrez, G. P. A., & Villegas, M. C. V. (2008). Efecto tóxico de *Verbena officinalis* (familia verbenaceae) en *Sitophilus granarius* (coleoptera: Curculionidae). *Revista Lasallista de Investigación*, 5(2), 74-82.

Hao, D.-C., Xiao, P.-G., Ma, H.-Y., Peng, Y., & He, C.-N. (2015). Mining chemodiversity from biodiversity: Pharmacophylogeny of medicinal plants of Ranunculaceae. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(7), 507-520. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30045-5](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30045-5)

Hata, Yoshie. (2005). Contribución a la estandarización de un extracto con base en *Abuta grandifolia* [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.

Hernández Carvajal. (2012). Análisis fitoquímico y de actividad antimalárica de dos especies del género *Cecropia* / Phytochemical analysis and antimalarial activity of two species of *Cecropia* genus. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10796>

Hernández Carvajal, J. E., Luengas Caicedo, P. E., Otero Jiménez, V., & Garavito Cárdenas, G. (2014). Actividad antiplasmódica y hemolítica de extractos etanólicos y fracciones obtenidas de *Cecropia membranacea* Trécul. Y *Cecropia metensis* Cuatrec. (Sin. *Cecropia peltata* var. *Candida* Velásquez). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(1), 58-70.

Hernández, J. E. H., & Luengas, P. E. L. (2013). Estudio fitoquímico preliminar de *Cecropia membranacea* Trécul. y *Cecropia metensis* Cuatrec. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 586-595.

Hernández-Carvajal, J. E., Arias-Marciales, M. H., García, J. O., Hata-Uribe, Y. A., Garavito-Cárdenas, G., & Caicedo, P. E. L. (2022). Phytochemical and antiplasmodial evaluation of five Colombian plants with ethnopharmacological background of antimalarial use. *Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.34172/PS.2022.16>

IDEAM. (2022, junio 10). *Amazonia Temperatura—REGIÓN AMAZONIA TEMPERATURA* - IDEAM. Tiempo y Clima. <http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/region-amazonia-temperatura>

Inbaneson, S. J., Sundaram, R., & Suganthi, P. (2012). *In vitro* antiplasmodial effect of ethanolic extracts of traditional medicinal plant *Ocimum* species against *Plasmodium falciparum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(2), 103-106. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60004-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60004-2)

Instituto Nacional de Salud. (2018). Boletín Epidemiológico. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemilogico.aspx>

Instituto Nacional de Salud. (2022, septiembre 18). *Boletín Epidemiológico*. Boletín Epidemiológico. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemilogico.aspx>

Kanyinda, B., Vanhaelen-Fastré, R., Vanhaelen, M., & Ottinger, R. (1997). Two New Isochondrodendrine-Type Alkaloids from the Roots of *Anisocycla jollyana*. *Journal of Natural Products*, 60(11), 1121-1124. <https://doi.org/10.1021/np970257j>

172 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

- Karunamoorthi, K., Sabesan, S., Jegajeevanram, K., & Vijayalakshmi, J. (2013). Role of Traditional Antimalarial Plants in the Battle Against the Global Malaria Burden. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(8), 521-544. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0946>
- Katzung. (2004). *Farmacología: Medicamentos antiprotozoales*. (13.^a ed.). Mcgraw Hill (ED), (p.1239-1243) New York, USA.
- Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., & Jain, R. (2009). Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(9), 3229-3256. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.050>.
- Khan, I. A. (2006). Issues related to botanicals. *Life Sciences*, 78(18), 2033-2038. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.019>.
- Knudson-Ospina, A., Barreto-Zorza, Y. M., Castillo, C. F., Y. Mosquera, L., Apráez-Ippolito, G., Olaya-Másmela, L. A., Piamba, A. H., & Sanchez, R. (2020). Estrategias para la eliminación de malaria: Una perspectiva afro-colombiana. *Revista de Salud Pública*, 21, 9-16. <https://doi.org/10.15446/rsap.v21n1.76210>
- Komlaga, G., Agyare, C., Dickson, R. A., Mensah, M. L. K., Annan, K., Loiseau, P. M., & Champy, P. (2015). Medicinal plants and finished marketed herbal products used in the treatment of malaria in the Ashanti region, Ghana. *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 333-346. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.041>
- Kumatia, E. K., Ayertey, F., Appiah-Opong, R., Bagyour, G. K., Asare, K. O., Mbatcho, V. C., & Dabo, J. (2021). Intervention of standardized ethanol leaf extract of *Annickia polycarpa*, (DC.) Setten and Maas ex I.M. Turner. (Annonaceae), in *Plasmodium berghei* infested mice produced anti-malaria action and normalized gross hematological indices. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113449. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113449>
- Kushwaha, S., Kushwaha, N., Maurya, N., & Rai, A. (2010). Role of Markers in the Standardization of Herbal Drugs: A Review. *Archives of Applied Science Research*, 2. <https://www.researchgate.net/profile/Swa>
- Kvist, L. P., Christensen, S. B., Rasmussen, H. B., Mejia, K., & Gonzalez, A. (2006). Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 390-402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.020>
- Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Lung Cheng, C., & Xu, H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: An overview. *Chinese Medicine*, 3, 7. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-3-7>
- Li, Y., Ishibashi, M., Chen, X., & Ohizumi, Y. (2003). Littorachalcone, a new enhancer of NGF-mediated neurite outgrowth, from *Verbena littoralis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51(7), 872-874. <https://doi.org/10.1248/cpb.51.872>

-
- Li, Y., Ishibashi, M., Satake, M., Oshima, Y., & Ohizumi, Y. (2003). A new iridoid glycoside with nerve growth factor-potentiating activity, gelsemiol 6'-trans-caffeoyl-1-glucoside, from *Verbena littoralis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51(9), 1103-1105. <https://doi.org/10.1248/cpb.51.1103>
- Liu, Y., & Wang, M.-W. (2008). Botanical drugs: Challenges and opportunities: Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. *Life Sciences*, 82(9), 445-449. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.11.007>
- Lohombo-Ekomba, M.-L., Okusa, P. N., Penge, O., Kabongo, C., Choudhary, M. I., & Kasende, O. E. (2004). Antibacterial, antifungal, antiplasmodial, and cytotoxic activities of *Albertisia villosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3), 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.04.006>
- Luenga-Caicedo, P. E., Braga, F. C., Brandão, G. C., & Braga de Oliveira, A. (2007). Seasonal and intraspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovii* sneth. Leaves from native and cultivated specimens. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 62(9-10), 701-709. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-9-1013>
- Lv, J.-J., Xu, M., Wang, D., Zhu, H.-T., Yang, C.-R., Wang, Y.-F., Li, Y., & Zhang, Y.-J. (2013). Cytotoxic bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania epigaea*. *Journal of Natural Products*, 76(5), 926-932. <https://doi.org/10.1021/np400084t>
- Lv, Y.-N., Yang, C.-Y., Shi, L.-C., Zhang, Z.-L., Xu, A.-S., Zhang, L.-X., Li, X.-L., & Li, H.-T. (2020). Identification of medicinal plants within the Apocynaceae family using ITS2 and psbA-trnH barcodes. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 18(8), 594-605. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)30071-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(20)30071-6)
- MacWilliam, I. C., & Wenn, R. V. (1972). Interpretation of colour tests for polyphenols and melanoidins. *Journal of the Institute of Brewing*, 78(4), 309-309. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1972.tb03452.x>
- Makler, M. T., Ries, J. M., Williams, J. A., Bancroft, J. E., Piper, R. C., Gibbins, B. L., & Hinrichs, D. J. (1993). Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(6), 739-741. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.739>
- Malca Garcia, G. R., Hennig, L., Shelukhina, I. V., Kudryavtsev, D. S., Bussmann, R. W., Tsetlin, V. I., & Giannis, A. (2015). Curare Alkaloids: Constituents of a Matis Dart Poison. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2537-2544. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00457>
- Mall, M., Verma, R. K., Gupta, M. M., Shasany, A. K., Khanuja, S. P. S., & Shukla, A. K. (2019). Influence of seasonal and ontogenic parameters on the pattern of key terpenoid indole alkaloids biosynthesized in the leaves of *Catharanthus roseus*. *South African Journal of Botany*, 123, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.032>

174 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Mambu, L., Martin, M. T., Razafimahefa, D., Ramanitrahambola, D., Rasoanaivo, P., & Frappier, F. (2000). Spectral characterisation and antiplasmodial activity of bisbenzylisoquinolines from *Isolona ghesquiereina*. *Planta Medica*, 66(6), 537-540. <https://doi.org/10.1055/s-2000-8610>

Manzali de Sá, I., & Elisabetsky, E. (2012). Medical knowledge exchanges between Brazil and Portugal: An ethnopharmacological perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 762-768. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.058>

Marsaioli, A. J., Rúveda, E. A., & Reis, F. de A. M. (1978). ¹³C NMR spectral analysis of some isoquinoline alkaloids. *Phytochemistry*, 17(9), 1655-1658. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94662-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94662-4)

Menachery, M. D. (1996). Chapter Three The alkaloids of south american menispermaceae. En S. W. Pelletier (Ed.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* (Vol. 11, pp. 269-302). Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0735-8210\(96\)80007-0](https://doi.org/10.1016/S0735-8210(96)80007-0)

Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X., & Wellems, T. E. (2013). Malaria biology and disease pathogenesis: Insights for new treatments. *Nature Medicine*, 19(2), 156-167. <https://doi.org/10.1038/nm.3073>

Ministerio de la protección Social, C. M. de la P. (2008). Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales. *Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales*, 241-241. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/vademecum-colombiano-plantas-medicinales.pdf>

Ministerio de la salud y protección social. (2018, junio 6). *Decreto 1156 de 2018*. <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=87281>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Murambiwa, P., Masola, B., Govender, T., Mukaratirwa, S., & Musabayane, C. T. (2011). Anti-malarial drug formulations and novel delivery systems: A review. *Acta Tropica*, 118(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.03.005>

Murebwayire, S., Frédérich, M., Hannaert, V., Jonville, M.-C., & Duez, P. (2008). Antiplasmodial and antitrypanosomal activity of *Triclisia sacleuxii* (Pierre) Diels. *Phytomedicine*, 15(9), 728-733. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.10.005>

Ncube, B., Nair, J. J., Rárová, L., Strnad, M., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2015). Seasonal pharmacological properties and alkaloid content in *Cyrtanthus contractus* N.E. Br. *South African Journal of Botany*, 97, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.12.005>

-
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461-477. <https://doi.org/10.1021/np068054v>
- Nguta, J. M., & Mbaria, J. M. (2013). Brine shrimp toxicity and antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Msambweni district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(3), 988-992. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.053>
- Nkhoma, S., Molyneux, M., & Ward, S. (2007). *In vitro* antimalarial susceptibility profile and prcr/pfmdr-1 genotypes of *Plasmodium falciparum* field isolates from Malawi. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(6), 1107-1112.
- Nogueira, F., & Rosário, V. E. do. (2010). Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(3), 109-124. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232010000300015>
- Ocampo, D. M., Valverde, C. L., Colmenares, A. J., & Isaza, J. H. (2014). Fenoles totales y actividad antioxidante en hojas de dos especies colombianas del género *Meriania* (melastomataceae). *Revista Colombiana de Química*, 43(2), 41-46. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n2.53124>
- OECD. (2002). *OECD (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity—Acute Toxic Class Method*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris [Text]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en
- O'Leary, N., Múlgura, M. E., & Morrone, O. (2007). Revisión taxonómica de las especies del género *verbena* (verbenaceae): serie pachystachyae1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 94(3), 571-621. [https://doi.org/10.3417/0026-6493\(2007\)94\[571:RTDLED\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3417/0026-6493(2007)94[571:RTDLED]2.0.CO;2)
- Omole, R. A., Gathirwa, J., Akala, H., Malebo, H. M., Machocho, A. K., Hassanali, A., & Ndiege, I. O. (2014). Bisbenzylisoquinoline and hasubanane alkaloids from *Stephania abyssinica* (Dillon & A. Rich) (Menispermaceae). *Phytochemistry*, 103, 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.026>
- OMS. (2021, octubre 6). World malaria report 2021. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>
- OMS. (2022, diciembre 22). Expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/norms-and-standards-for-pharmaceuticals/expert-committee-on-specifications-for-pharmaceutical-preparations>

176 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Ōmura, S. (2015). From bacteria and plants to novel anti-parasite therapies. 5. <http://www.nobelprizemedicine.org/wp-content/uploads/2013/10/press.pdf>

OPS. (2010). OPS/OMS Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/search/r?keys=tratamiento+para+malaria#gsc.tab=0&gsc.q=tratamiento%20para%20malaria>

Ortiz, R. del C. (2018). A taxonomic revision of *Curarea Barneby* & Krukoff (Menispermaceae). *PhytoKeys*, 100, 9-89. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.100.21828>

Osorio, E., Arango, G. J., García, E., Muñoz, K., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M. A., & Giménez, A. (2005). Actividad antiplasmódica *in vitro* e inhibición de la formación de la β -Hematina de plantas colombianas de la familia Annonaceae. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24, n.º 4. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6773>

Osorio, E., Arango, G. J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M. A., Giménez, A., & Robledo, S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 630-635. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.015>

Otshudi, A. L., Apers, S., Pieters, L., Claeys, M., Pannecouque, C., De Clercq, E., Van Zeebroeck, A., Lauwers, S., Frédérick, M., & Foriers, A. (2005). Biologically active bisbenzylisoquinoline alkaloids from the root bark of *Epinetrum villosum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1), 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.021>

Padilla, J. C., Lizarazo, F. E., Murillo, O. L., Mendigaña, F. A., Pachón, E., & Vera, M. J. (2017). Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica*, 37, 27. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3769>

Paganga, G., & Rice-Evans, C. A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters*, 401(1), 78-82. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(96\)01442-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01442-1)

Paixao, A., Mancebo, B., Regalado, A. I., Chong, D., & Sánchez, L. M. (2017). Evaluación de la Toxicidad Aguda Oral del extracto etanólico de *Tephrosia vogelii* Hook (kalembe). *Revista de Salud Animal*, 39(2), 00-00.

Pathak, A. (2017). Q-Markers or Chemical Markers: A New Insight towards Quality Control of Herbal Medicines. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 3(2), 62-63.

Pérez-Guerrero, C., Herrera, M. D., Ortiz, R., Alvarez de Sotomayor, M., & Fernández, M. A. (2001). A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(3), 279-284. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00253-7](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00253-7)

-
- Peters, W., Bafort, J., & Ramkaran, A. E. (1970). The chemotherapy of rodent malaria. XI. Cyclically transmitted, chloroquine-resistant variants of the Keyberg 173 strain of *Plasmodium berghei*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 64(1), 41-51.
- Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhis, W. C., & Wells, T. N. C. (2017). Malaria. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17050. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>
- Rocha, T. D., de Brum Vieira, P., Gnoatto, S. C. B., Tasca, T., & Gosmann, G. (2012). Anti-Trichomonas vaginalis activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. *Parasitology Research*, 110(6), 2551-2556. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2798-1>
- Rodríguez Novoa, Y. V. (2016). Actividad antimalárica de una preparación tradicional indígena en combinación con fármacos de uso común en la enfermedad. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/57962>
- Rodríguez Parra, Z. (2015). Evaluación comparativa de la actividad antimalárica de un remedio tradicional frente a un extracto primario; profundización del estudio de su actividad farmacológica. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56695>
- Rodríguez, Y. V., Arias, M. H., García, J. O., Deharo, E., & Garavito, G. (2018). Pharmacological activity of *Curarea toxicifera* in combination with classical antimalarial treatments. *Journal of Ethnopharmacology*, 222, 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.008>
- Rodríguez, Z. J., Rodríguez, Y. V., García, J. O., Arias, M. H., Deharo, E., & Garavito, G. (2020). Comparison of the antimalarial activity of a Colombian traditional Uitoto remedy with laboratory preparations. *Journal of Vector Borne Diseases*, 57(2), 170-175. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.310868>
- Rojas, L. C., Uribe, Y. H., Martínez, N. S., & Niño, D. R. (2009). Análisis Fitoquímico Preliminar De Hojas, Tallos Y Semillas De Cupatá (strych Nos Schultesiana Krukoff). *Colombia Forestal*, 12, 161-170. ISSN 0120-0739
- Roux, S., Sablé, E., & Porsolt, R. D. (2005). Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Current Protocols in Pharmacology, Chapter 10*, Unit 10.10. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1010s27>
- Ruiz, L., Ruiz, L., Maco, M., Cobos, M., Gutierrez-Choquevilca, A.-L., & Roumy, V. (2011). Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 917-921. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.039>
- Sanz-Biset, J., Campos-de-la-Cruz, J., Epiquién-Rivera, M. A., & Cañigueral, S. (2009). A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 333-362. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.009>

178 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Schiff, P. L. (1985). Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. En J. D. Phillipson, M. F. Roberts, & M. H. Zenk (Eds.), *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids* (pp. 126-141). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70128-3_8

Schiff, P. L. (1999). Chapter One—The Bisbenzylisoquinoline Alkaloids – A Tabular Review. En S. W. Pelletier (Ed.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* (Vol. 14, pp. 1-284). Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0735-8210\(99\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0735-8210(99)80004-1)

Sharapin N, Pinzón RS, et al. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos, Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello (CAB)—Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Shu, J.-C., Liu, J.-Q., & Chou, G.-X. (2013). A new triterpenoid from *Verbena officinalis* L. *Natural Product Research*, 27(14), 1293-1297. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.733391>

Souza, J. E. de, Nascimento, M. F. A. do, Borsodi, M. P. G., Almeida, A. P. de, Rossi-Bergmann, B., Oliveira, A. B. de, & Costa, S. S. (2018). Leaves from the Tree *Poincianella pluviosa* as a Renewable Source of Antiplasmodial Compounds against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29, 1318-1327. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170228>

Srinivasan, V. S. (2006). Challenges and scientific issues in the standardization of botanicals and their preparations. United States Pharmacopeia's dietary supplement verification program—A public health program. *Life Sciences*, 78(18), 2039-2043. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.014>

Sun, S.-W., Lee, S.-S., Wu, A.-C., & Chen, C.-K. (1998). Determination of bisbenzylisoquinoline alkaloids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 799(1), 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01065-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01065-0)

Tanae, M. M., Lima-Landman, M. T. R., De Lima, T. C. M., Souccar, C., & Lapa, A. J. (2007). Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14(5), 309-313. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.03.002>

Tasso de Souza, T. J., Manfron, M. P., Zanetti, G. D., Hoelzel, S. C. da S. M., & Pagliarin, V. P. (2005). Análise morfo-histológica y fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24, n.º 2. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6733>

Tavares, L. A., & Ferreira, A. G. (2006). Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. *Química Nova*, 29(5), 911-915. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500005>

-
- Thornber, C. W. (1970). Alkaloids of the menispermaceae. *Phytochemistry*, 9(1), 157-187. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86628-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86628-5)
- Torres-Rodríguez, M. L., García-Chávez, E., Soto-Peña, G. A., Aradillas-García, C., Cubillas-Tejeda, A. C., Torres-Rodríguez, M. L., García-Chávez, E., Soto-Peña, G. A., Aradillas-García, C., & Cubillas-Tejeda, A. C. (2016). Evaluación de la toxicidad aguda *in vivo* del extracto etanólico y acuoso de *Calea urticifolia*. *Botanical Sciences*, 94(1), 133-140. <https://doi.org/10.17129/botsci.191>
- Tshibangu, J. N., Wright, A. D., & König, G. M. (2003). HPLC isolation of the anti-plasmodially active bisbenzylisoquinone alkaloids present in roots of *Cissampelos mucronata*. *Phytochemical Analysis: PCA*, 14(1), 13-22. <https://doi.org/10.1002/pca.673>
- Uche, F. I., Abed, M. N., Abdullah, M. I., Drijfhout, F. P., McCullagh, J., Claridge, T. W. D., Richardson, A., & Li, W.-W. (2017). Isochondrodendrine and 2'-norcocculine: Additional alkaloids from *Triclisia subcordata* induce cytotoxicity and apoptosis in ovarian cancer cell lines. *RSC Advances*, 7(70), 44154-44161. <https://doi.org/10.1039/C7RA08032H>
- Uchôa, V. T., Paula, R. C. de, Krettli, L. G., Santana, A. E. G., & Krettli, A. U. (2010). Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. *Drug Development Research*, 71(1), 82-91. <https://doi.org/10.1002/ddr.20351>
- Uzor, P. F. (2020). Alkaloids from Plants with Antimalarial Activity: A Review of Recent Studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2020, 8749083. <https://doi.org/10.1155/2020/8749083>
- Valadeau, C., Castillo, J. A., Sauvain, M., Lores, A. F., & Bourdy, G. (2010). The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yaneshá (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 175-192. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.024>
- Van Breemen, R. B., Fong, H. H. S., & Farnsworth, N. R. (2007). The role of quality assurance and standardization in the safety of botanical dietary supplements. *Chemical Research in Toxicology*, 20(4), 577-582. <https://doi.org/10.1021/tx7000493>
- Vestena, A., Piton, Y., de Loretto Bordignon, S. A., Garcia, S., Arbo, M. D., Zuanazzi, J. A., & von Poser, G. (2019). Hepatoprotective activity of *Verbena litoralis*, *Verbena montevidensis* and their main iridoid, brasoside. *Journal of Ethnopharmacology*, 239, 111906. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111906>
- Vispo, N. (2016, abril 30). Mecanismos de invasion del esporozoíto y merozoíto de *Plasmodium*. Bionatura. <http://revistabionatura.com/plasmodium.html>
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer Science & Business Media. New York, USA

18C Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

Weathers, P. J., Jordan, N., Lasin, P., & Towler, M. J. (2014). Simulated Digestion of Dried Leaves of *Artemisia annua* Consumed as a Treatment (pACT) for Malaria. *Journal of ethnopharmacology*, 151(2), 858-863. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.043>

Weber, C., & Opatz, T. (2019). Chapter One—Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. En H.-J. Knölker (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 81, pp. 1-114). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2018.07.001>

Weniger, B., Robledo, S., Arango, G. J., Deharo, E., Aragón, R., Muñoz, V., Callapa, J., Lobstein, A., & Anton, R. (2001). Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(2-3), 193-200. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00346-4](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00346-4)

White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., & Dondorp, A. M. (2014). Malaria. *The Lancet*, 383(9918), 723-735. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0)

WHO (Ed.). (2011). Quality control methods for herbal materials (Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials, 1998). World Health Organization.

Willcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo, P., & Addae-Kyereme, J. (2004). *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. CRC Press.

Winstanley, P. A. (2000). Chemotherapy for *falciparum* malaria: The armoury, the problems and the prospects. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 16(4), 146-153. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01622-1](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01622-1)


Wright, C. W. (2005). Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1), 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.012>

Xian-Kai, W., Tong-Fang, Z., Sheng, L., Shizuri, Y., & Yamamura, S. (1993). Head-to-tail bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cyclea sutchuenensis*. *Phytochemistry*, 33(5), 1253-1256. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85060-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85060-5)

Zhang, H., Wang, X., Guo, Y., Liu, X., Zhao, X., Teka, T., Lv, C., Han, L., Huang, Y., & Pan, G. (2021). Thirteen bisbenzylisoquinoline alkaloids in five Chinese medicinal plants: Botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacokinetic and toxicity studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113566. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113566>

Zuiderveen, G. H., Burkhart, E. P., & Lambert, J. D. (2021). Benzylisoquinoline alkaloid content in goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) is influenced by phenological stage, reproductive status, and time-of-day. *Phytochemistry Letters*, 42, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.02.006>

A. Anexo: Fragmento de la respuesta ante el radicado del contrato de acceso al recurso genético.



MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE

RESOLUCIÓN No. **0006**
(**DICETEN**)

"Por la cual se otorga el Acceso a Recursos Genéticos y Producto Derivado para el proyecto denominado: "Alternativas terapéuticas para el tratamiento de la malaria, a partir de plantas con antecedentes etnofarmacológicos: evaluación fitoquímica y valoración preclínica"

EL DIRECTOR DE BOSQUES, BIODIVERSIDAD Y SERVICIOS ECOSISTÉMICOS

En ejercicio de la función establecida en el Numeral 14 del Artículo 16 del Decreto Ley 3570 de 2011, y

CONSIDERANDO

ANTECEDENTES

Que **LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA** identificada con NIT 899.999.063-3, mediante oficio radicado en este Ministerio con el No. E1-2017-009507 del 24 de abril de 2017, presentó solicitud de acceso a recursos genéticos para el proyecto: "Alternativas terapéuticas para el tratamiento de la malaria, a partir de plantas con antecedentes etnofarmacológicos: evaluación fitoquímica y valoración preclínica".

Que la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, mediante Auto No. 229 del 16 de junio de 2017, admitió la solicitud de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados proyecto denominado: "Alternativas terapéuticas para el tratamiento de la malaria, a partir de plantas con antecedentes etnofarmacológicos: evaluación fitoquímica y valoración preclínica", presentada por **LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA** lo anterior en aplicación de lo establecido en el artículo 252 de la Ley 1753 de 2015 y en la Decisión Andina 391 de 1996.

Que, la Dirección de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos emitió Dictamen Técnico Legal No. 95 del 5 de septiembre de 2017; a través del cual recomendó su aceptación y el paso a la etapa de concertación de los términos del contrato y negociación de los beneficios no monetarios y a la eventual firma del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados con **LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**.

Que el Dictamen Técnico Legal fue adoptado por el Director de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos mediante Resolución No. 2020 del 2 de octubre de 2017.

Que dando cumplimiento a lo establecido en el artículo 30 de la Decisión Andina 391 de 1996 este Ministerio realizó la reunión de concertación de los términos del contrato y negociación de los beneficios, el 7 de diciembre de 2017, y su desarrollo se encuentra consignado en el Acta de la misma fecha.

Que el Director de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, debidamente facultado de conformidad con lo establecido en el numeral 14 del Artículo 16 del Decreto Ley 3570 de 2011, suscribió con **LA UNIVERSIDAD**

182 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Resolución No.

0006

del 02 ENE 2018

Hoja No. 4

"Por la cual se otorga el Acceso a Recursos Genéticos y Producto Derivado para el proyecto denominado: "Alternativas terapéuticas para el tratamiento de la malaria, a partir de plantas con antecedentes etnofarmacológicos: evaluación fitoquímica y valoración preclínica"

procedimiento establecido en la Ley 1333 de 2009 y en las disposiciones que la reglamenten o modifiquen.

ARTÍCULO 4. Notificar el contenido del presente acto administrativo a **LA UNIVERSIDAD NACIONAL COLOMBIA** a través de su representante legal o de su apoderado debidamente constituido.

ARTÍCULO 5. Comunicar el contenido de la presente resolución a la Universidad de Antioquia en calidad de Institución Nacional de Apoyo.

ARTÍCULO 6. Dispóngase la publicación del presente Acto Administrativo, junto con un extracto del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 161 del 7 de diciembre de 2017, en la página web del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

ARTÍCULO 7. Contra el presente acto administrativo procede el recurso de reposición el cual podrá ser interpuesto ante este Despacho, personalmente y por escrito dentro de los diez (10) días siguientes a la notificación de la presente providencia y con el lleno de los requisitos legales, de conformidad con lo establecido en el artículo 76 de la Ley 1437 del 18 de enero de 2011 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo.

NOTIFÍQUESE, PUBLÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá, D.C. a los



CÉSAR AUGUSTO REY ANGEL
Director de Bosques, Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos

Exp. RGE0213

Proyectó: Catalina Isoza Velasquez. Abogada Contratista – MADS

Revisó: Paula Rojas G. Coordinadora Grupo de Recursos Genéticos –DBBSE- MADS



B. Anexo: Pruebas fitoquímicas preliminares efectuadas a los extractos etanólicos (Galindo, 1983; Hernández Carvajal, 2012).

Clases de metabolito secundario	Fase móvil/prueba de tubo	Reactivo de derivación para ensayo CCD/ prueba de tubo	Compuesto de referencia
Alcaloides	MeOH-CHCl ₃ /NH ₄ OH (95:5:0.1)	Dragendorff para CCD*	Sulfato de quinina
Alcaloides	Prueba de tubo	Dragendorff Mayer Valser Reineckat de amonio	Fracción alcaloidal de "Yage"
Esteroides y/o triterpenoides	C ₆ H ₁₄ /AcOEt (8:2)	Liebermann-Burchard*	β-sitoserol
Naftoquinonas/ Antraquinona	C ₆ H ₅ CH ₃ / C ₃ H ₆ O /CHCl ₃ (40:15:25).	KOH 10 % en etanol*	Extracto de <i>Cassia</i> sp. Anthrone
Glucósidos cardiotónicos	AcOEt /MeOH/H ₂ O (81:11:8)	Vanillina 1% - Acido o-fosfórico 10%; 105°C (placa 1) * Kedde (placa 2)*	Extracto de <i>Digitalis</i> sp. Digitoxina
Lactonas sesquiterpenos	CHCl ₃ /C ₃ H ₆ O (9:1)	Vanillin 1% - Acido o-fosfórico 10%; 105 °C (placa 1) * Reacción hidroxamato férrico (placa 2)*	β-sitoserol Umbelliferone
Cumarinas	CHCl ₃ /AcOEt (60:40)	Vanillin 1% - Acido o-fosfórico 10%* Reacción hidroxamato férrico* Luz UV (365 y 254 nm)*	β-sitoserol Umbelliferone Cumarina
Polifenoles	AcOEt/ HCO ₂ H /AcOH/H ₂ O (100:11:11:27)	C ₆ N ₆ FeK ₃ 1% - FeCl ₃ 2% (1:1)*	Acido tánico
Ácidos fenólicos	AcOEt/AcOH/HCO ₂ H /H ₂ O (100:11:11:27)	NP-PEG; UV 365 mn*	Ácido clorogénico
Glucósidos de flavonoides	AcOEt/AcOH/HCO ₂ H /H ₂ O (100:11:11:27)	NP-PEG; UV 365 mn *	Rutina
Aglicona de flavonoides	C ₆ H ₅ CH ₃ /C ₃ H ₆ O/CHCl ₃ (40:15:25)	NP-PEG; UV365 mn *	Quercetina
Compuestos fenólicos	Tubo de ensayo	FeCl ₃ 10%	Rutina

184 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Flavonoides	Tubo de ensayo	Shinoda, HCl y calentamiento	Rutina
Taninos	Tubo de ensayo	Gelatina-sal / urea 10M/ FeCl ₃ 10%	NA
Proantocianidinas	Tubo de ensayo	BuOH/HCl (95:5)	NA
Saponinas	Tubo de ensayo	Prueba de la espuma	NA
		Hemólisis	Digitonina

NA: no disponible. *Prueba realizada por CCD.








MeOH: metanol; CHCl₃: cloroformo; C₆H₁₄:hexano; NH₄OH: hidróxido de amonio;
C₆H₅CH₃:tolueno; C₃H₆O: acetona; AcOEt: acetato de etilo; AcOH: ácido acético glacial;
HCO₂H: ácido fórmico; BuOH: n-Butanol; H₂O: agua; NP: reactivo de productos naturales;
PEG: polietilenglicol 4000; EP: éter de petróleo; HCl: ácido clorhídrico concentrado;
C₆N₆FeK₃: Ferricianuro de potasio; FeCl₃: cloruro férrico.

C. Anexo: Procedimiento para la evaluación *in vitro* de la inhibición de la invasión y el desarrollo de *Plasmodium falciparum*

Para la determinación de la CI_{50} de cada extracto o sustancia se empleó un seriado de concentraciones las cuales se siembran por, el presente protocolo permite la evaluación de 1 muestra en cada placa de 96 pozos, teniendo pozos para determinación por microscopia y fluorimetría de manera simultánea.

-Distribución de la placa de 96 pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Ctrl de Cto	GRS	
C		Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Ctrl de Cto	GRS	
D		Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Ctrl de Cto	GRS	
E		Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Ctrl de Cto	CQ	
F		Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Ctrl de Cto	CQ	
G		Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Ctrl de Cto	CQ	
H												

	Muestra en diferentes concentraciones; pozos para lectura por microscopia
	Muestra en diferentes concentraciones; pozos para lectura por fluorimetría
	Control de crecimiento en placa lectura por microscopia
	Control de crecimiento en placa lectura por fluorimetría
	GRS: Glóbulos rojos sanos (Blanco fluorimetría)
	Borde de agua
	Cloroquina 1 µg/ml (Cárdenas., 2011)

Procedimiento

2.1 Preparación de las soluciones de trabajo

Las concentraciones para ensayar se obtienen por dilución seriada las cuales pueden ser preparadas en eppendorf estériles.

18€ **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

4.1.1. Marque 3 tubos falcon de 15 mL. (A, B, C)

4.1.2. **Tubo A:** Pesar 20mg de extracto y diluir en 1mL de vehículo (RPMI). (concentración final 20000µg/mL). Filtrar bajo flujo laminar con poro 0.22.

4.1.3. **Tubo B.** Adicione 900 µL de RPMI y agregue 100 µL de la solución anterior, homogenice (2000µg/mL)

4.1.4. **Tubo C.** Adicione 1800µL de cRPMI y agregue 200µL de la solución anterior, homogenice (200 µg/mL).

4.1.5. Rotular ocho tubos cónicos de 1.5mL como sigue:

Tubo N° 1: 200µg/mL (Solución madre)

Tubo N° 2: 100µg/mL

Tubo N° 3: 50µg/mL

Tubo N° 4: 25µg/mL

Tubo N° 5: 12,5µg/mL

Tubo N° 6: 6,25µg/mL

Tubo N° 7: 3,125µg/mL

Tubo N°8: 1,56 µg/mL

La concentración en placa queda ajustada a la mitad de lo rotulado en el tubo.

4.1.6. Del tubo C transfiera 1500 µL al **tubo N°1** (solución madre)

4.1.7. A cada uno de los tubos desde el **N°2** hasta el **N°8** adicione 750 µL de cRPMI

4.1.8. Realizar diluciones seriadas a partir del **tubo N°1**, tomando en cada caso 750 µL del tubo anterior homogenizando con el cRPMI agregado anteriormente. (cambie de punta cada vez que sirva).

4.2. Siembra de la placa para evaluación de extractos vegetales

4.2.1. Colocar 100 µL de cada una de las diluciones en todos los pozos de las letras B a G del número 2 al 9 según distribución en placa.

4.2.2. Colocar 100 μ L de la suspensión de glóbulos rojos parasitados ajustada al 2% (apéndice 6), en todos los pozos de las letras B a G del número 2 al 9.

4.2.3. Colocar 100 μ L de RPMI + 100 μ L de la suspensión de glóbulos rojos parasitados (apéndice 6), en todos los pozos de la columna 10 como control de crecimiento.

4.2.4. Colocar 100 μ L de cRPMI + 100 μ L de CQ (Solución C - Apéndice 3), en los pozos B11, C11 Y D11 como control positivo.

4.2.5. Adicionar 200 μ L de glóbulos rojos sanos con hematocrito al 2% en los pozos E11, F11 y G11.

4.2.6. Homogenizar toda la placa por agitación durante 60seg.

4.2.7. Tapar las placas, llevar a incubadora con balance de gases N₂, O₂ y CO₂

4.2.8. Incubar a 37°C por 48 horas.

5. Preparación de Patrón (Cloroquina)

5.1. Solución inicial: Preparar en agua destilada una solución 1 mg/mL (Pesar 10 mg y disolver en 10 mL), Solución A (1000 μ g/mL)

5.2. En cabina de flujo realizar las siguientes diluciones:

5.2.1. Tomar 100 μ L de solución A y disolver en 900 μ L de cRPMI (Solución B) (100 μ g/mL)

5.2.2. Tomar 10 μ L de solución B y disolver en 990 μ L de cRPMI (Solución C). (1 μ g/mL)

5.2.3. Transfiera 100 μ L de la solución C, a la placa de 96 pozos según corresponda.

6. Determinación de la densidad parasitaria

6.1. Microscopia

6.1.1. Retirar cuidadosamente de uno de los pozos control de crecimiento (B10 a G10) el medio sobrenadante.

6.1.2. Realizar el frotis del pellet, evaluar la parasitemia y los estadios del cultivo

6.1.3. Verificar que el cultivo se encuentra en estadios jóvenes y la parasitemia es considerablemente superior a la inicial.

188 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

6.1.4. Realizar los frotis de los pozos destinados a determinación por microscopia.

6.1.5. Fijar el frotis con metanol

6.1.6. Realizar coloración de Giemsa

6.2. Determinación por fluorimetría

6.2.1. Centrifugar la placa de 96 pozos a 2000rpm x 5min

6.2.2. Descartar el sobrenadante y re suspender el pellet en 150µl de PBS 1X

6.2.3. Repita pasos 4.4.1 y 4.4.2

6.2.4. Transferir 100 µL de cada pozo a una placa de 96 pozos negra.

6.2.5. Agregar 100 µL de SYBR 2X en buffer de lisis, mezclar para garantizar hemolisis completa.

6.2.6. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas en la oscuridad

6.2.7. Leer en el fluorómetro (Excitación 485nm y emisión 538nm)

7. Cálculo de parasitemia

7.1. Cálculo de la parasitemia por microscopia

7.1.1. Realizar conteo de glóbulos rojos parasitados y no parasitados por el método visual (1000 glóbulos rojos totales)

7.1.2. Realizar cálculo de parasitemia y porcentaje de inhibición de acuerdo con las ecuaciones

$\% \text{ Parasitemia} = (\text{Glóbulos rojos parasitados} / \text{glóbulos rojos totales}) * 100$

7.1.3. Cálculo del porcentaje de inhibición

$\% \text{ de Inhibición} =$

$((\text{parasitemia de blanco} - \text{Parasitemia de muestra}) / \text{parasitemia de blanco}) * 100$

8. Ajuste de hematocrito y parasitemia para montaje en placa

8.1. Tome una muestra de la caja de cultivo a emplear y realice determinación de parasitemia por conteo microscópico.

8.2. En la orden de trabajo anexa a este protocolo (Hoja de Excel), digite en la celda G45 el valor determinado

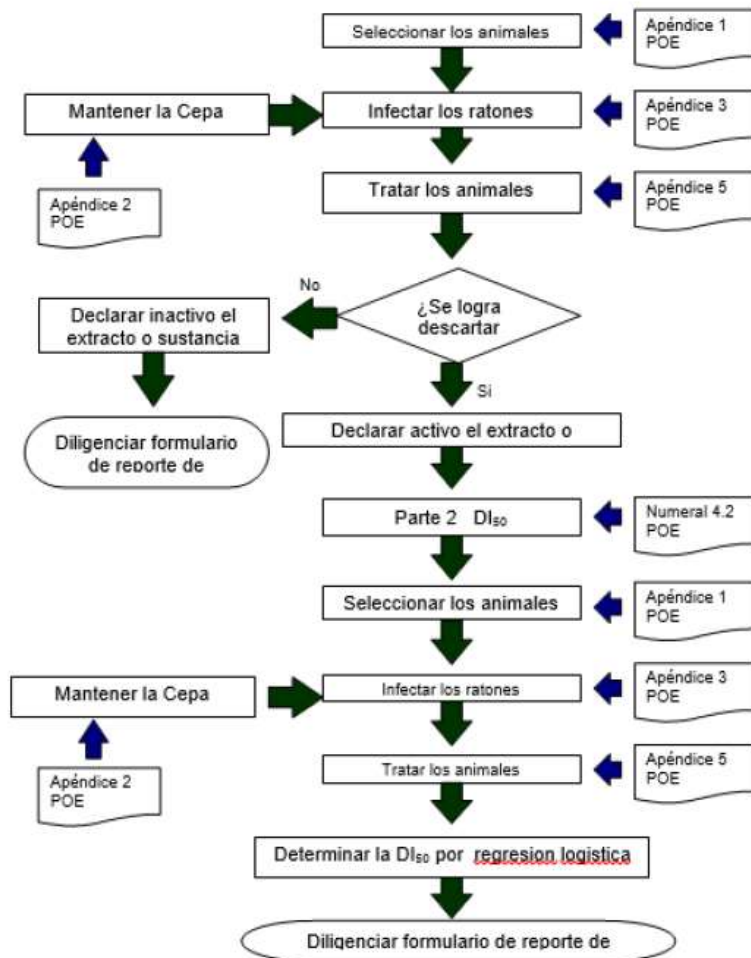
8.3. La hoja de cálculo arroja la cantidad en μl de GRP a emplear (Celda G49) y la cantidad de GRS a emplear (G50).

Prepare lo anterior en cRPMI según corresponda (Celda D50), para lo cual el hematocrito en placa quedará ajustado al 2,5%.

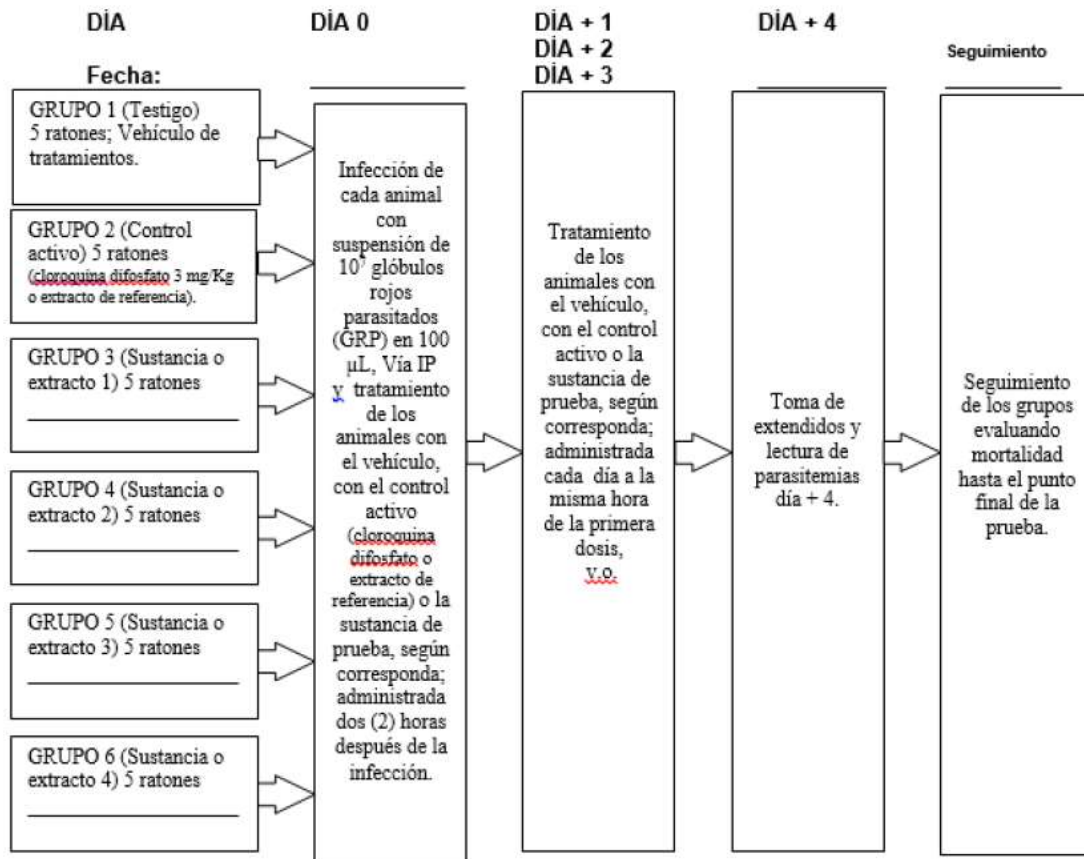
D. Anexo: Procedimiento operacional estándar para el desarrollo de la prueba supresiva de 4 días (Test de Peters) de actividad antimalárica *in vivo*.

GARAVITO G. (2003) Estandarización de dos modelos de actividad antimalárica como herramientas para la evaluación farmacológica de sustancias o extractos de origen vegetal. Tesis de M.Sc., Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia

DIAGRAMA DE FLUJO



El ensayo estándar, de acuerdo con la capacidad instalada, comprende la evaluación de cuatro sustancias o extractos, un grupo testigo con el vehículo de las sustancias y un grupo control tratado con cloroquina difosfato según el siguiente diseño 1.



1.0 Selección de los animales

- El día de la infección se seleccionan 30 ratones del mismo género sanos tipo ICR de cuatro semanas de edad, con peso 20 ± 2 g y se asignan por peso a seis grupos.
- Se asignan al azar los tratamientos a cada uno de los grupos de animales seleccionados según lo establecido en el Apéndice 1.
- Colocar los animales en 6 jaulas, completamente identificadas, con alimento y agua ad libitum.

192 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

FECHA: _____ No. ANIMALES SELECCIONADOS: _____ DÍA NACIMIENTO:

Coloque las etiquetas de las cajas de origen de los animales:

2.0 Infección de los ratones

2.1 Preparación del inoculo

La cepa es mantenida mediante repiques sucesivos en ratones, El DÍA - 4 (4 días previo a la prueba) debe realizarse el último repique con la cepa de *Plasmodium berghei*, de manera que el DÍA 0, de inicio del ensayo, presente una parasitemia aproximadamente del 50 % (ver Apéndice 2)

FECHA DE ÚLTIMA INFECCIÓN: _____ CÓDIGO LOTE SEMILLA:

2.2 Cálculo para preparar la suspensión de Glóbulos Rojos Parasitados (GRP) para infectar los ratones.

Evalúe la parasitemia de los ratones donadores infectados mediante extendido y coloración (Apéndice 3), de manera que se obtenga el porcentaje de parasitemia.

Con el porcentaje de parasitemia obtenido, seleccione el ratón donador y la cantidad de sangre a tomar de este lo mismo que las diluciones necesarias, diligencie el formato del Apéndice 4. ESTOS CÁLCULOS SE ENCUENTRAN PROGRAMADOS EN LA ORDEN DE TRABAJO; HOJA DE MICROSOFT EXCEL® ANEXA A ESTE PROCEDIMIENTO.

2.3 Inoculación de los animales

Con la suspensión de GRP preparada en 2.2, proceda a infectar los ratones mediante la inoculación por vía intraperitoneal (IP) de 100 μ L de la suspensión a cada animal. Tanto la inoculación como el tratamiento administrado a los animales debe ser realizado por personal previamente entrenado en estos procedimientos.

3.0 Tratamiento de los Animales

3.1 Cálculo para preparar la dosis de administración de las sustancias o extractos para el tratamiento de los ratones infectados.

Se deben preparar soluciones o suspensiones que vehiculicen las sustancias o extractos a evaluar, el cálculo debe permitir obtener la cantidad suficiente para la administración de 100 µL cada día durante un periodo de cuatro días. Ver Apéndice 5. ESTOS CÁLCULOS SE ENCUENTRAN PROGRAMADOS EN LA ORDEN DE TRABAJO; HOJA DE MICROSOFT EXCEL® ANEXA A ESTE PROCEDIMIENTO.

3.2 Administración del tratamiento

Dos horas después de la infección administre la primera dosis del tratamiento preparado en 3.1 por vía oral (p.o.)

Administre durante tres días más la dosis del tratamiento a cada animal a la misma hora de la primera dosis.

4.0 Evaluación de la prueba

4.1 Determinación del Porcentaje de Inhibición

El DÍA + 4, de desarrollo de la prueba se procede a la toma de extendidos de sangre, de cada uno de los ratones y coloración (ver Apéndice 3) para su posterior conteo óptico y obtención del porcentaje de inhibición, para cada sustancia o extracto, de acuerdo con la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Parasitemia Grupo Testigo (vehículo)} - \text{Parasitemia Grupo Control Activo}}{\text{Parasitemia Grupo Testigo (vehículo)}}$$

4.2 Punto final de la prueba y Evaluación de posible efecto curativo.

El punto final de la prueba establece el momento de eutanasia, que se relaciona con la inhabilidad del animal para proveer más información dentro del estudio y con el fin de prevenir un mayor sufrimiento. Se hace observación, dos veces al día de los animales, posterior al DÍA + 4, estableciendo un balance, costo ético – beneficio para la prueba (entre síntomas de sufrimiento y el posible efecto curativo). Se programa inmediatamente la eutanasia de los ejemplares cuando estos evidencien síntomas indicativos de afección del SNC o cuando exista un marcado e irreversible deterioro del animal.

En ausencia de las condiciones anteriores se prosigue con el mantenimiento de los animales evaluando la supervivencia, considerando para aquellos animales que

sobrevivan más de 35 días (con evaluaciones posteriores de parasitemia cada 7 días) hacer sangrado e infección de nuevos ratones con esa sangre; si los nuevos animales no desarrollan la enfermedad dentro de 21 días se considera un efecto curativo.

4.3 Riesgo Biológico

Se tendrán en cuenta las recomendaciones internacionales acerca del uso ético de animales así como lo establecido en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, capítulo sexto, la cual hace referencia al uso de animales vivos en experimentos de investigación en Colombia y así como también el estatuto nacional de protección de los animales (ley 84 de 1989). De igual forma, se seguirán las normas establecidas por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia en cuanto al manejo y disposición de material biológico. Los protocolos experimentales empleados en este proyecto cuentan con el aval del comité de ética de la Facultad de Ciencias. Se busca causar el mínimo sufrimiento posible a los animales teniendo en cuenta un punto final adecuado para los fines experimentales evitando al máximo el malestar generado

inevitablemente por la infección así mismo se busca utilizar el menor número de animales por grupo de tratamiento.

4.4 Determinación de la DI_{50}

Esta determinación se hace solo para aquellos extractos o sustancias que presentan un porcentaje de inhibición de la parasitemia superior al 50 % (a una dosis de extractos crudos = 400 mg/Kg., fracciones = 100 mg/Kg) en el ensayo de evaluación inicial y por lo tanto requiere el desarrollo del protocolo señalado como diseño 1

La DI_{50} de una sustancia o extracto se determina a través de un modelo de regresión logística dosis-respuesta.

4.2.1 Parámetros de calidad de la Interpolación

Para la obtención de la DI_{50} de cada extracto o sustancia se deben obtener mínimo cuatro (4) puntos (ubicados entre el 20 y el 80 % de la respuesta) cada uno de los cuales representa el promedio de la respuesta del grupo tratado a una dosis dada.

5.0 Equipos, Materiales y Reactivos

5.1 EQUIPOS

1. Balanza electrónica Shimadzu BP 221S
2. Microscopio Olympus CH2

5.2 MATERIALES

1. Jaulas de mantenimiento de los animales
2. Jeringas de 1 mL y 5 mL
3. Láminas para microscopio
4. Placa de icopor recubierto de papel aluminio
5. Cámara de anestesia
6. Guantes desechables
7. Algodón
8. Tubos de vidrio
9. Tubos de congelación

5.3 REACTIVOS

1. Cloroquina difosfato Boehringer Mannheim GmbH
2. Glóbulos Rojos Parasitados (Lote Semilla)
3. Agua destilada
4. Dimetil sulfoxido DMSO 99.5 % Sigma
5. Metanol p.a. Merck
6. Solución Salina Normal SSN.
7. Solución madre colorante Giemsa
8. Aceite de inmersión Albor

100 Actividad antimalárica de una preparación tradicional indígena en combinación con fármacos de uso común en la enfermedad

196 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

9. Heparina sódica 25000 U / 5 mL o 5000 U / 5 mL

10. Éter o Cloroformo Merck

11. Alcohol desinfectante

6.0 Bibliografía

1. Deharo, E., Gautret, P., Muñoz, V., & Sauvain, M. (2000). Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. *Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas*, 187-187.

2. Oto Zak & Merle A. Sande, "animal models of infection", Academic Press, 1999.

3. Close, Banister. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación, 1986

4. Concepts in animal welfare, euthanasia module 20, WSPA and Bristol University 2003

5. David Morton, Humane endpoint in animal experimentation for biomedical research. Laboratorio animals limited. Birmingham.UK

6. Ley 84 de 1989. Por la cual se adopta el estatuto nacional de protección de los animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Capítulo IV. el congreso de Colombia. Bogotá. . 27 diciembre 1989

7. Resolución N° 008430 de 1993. Título V: LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA CON ANIMALES. Artículo 87. 4 de octubre de 1993 Colombia

8. UNESCO, Declaración Universal de los Derechos de los Animales. 1978

E. Anexo: Aval Comité de Ética Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá Para el desarrollo del proyecto.

El comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional otorgó el aval para el desarrollo de actividad biológica con animales en la evaluación de toxicidad oral aguda y actividad antimalárica *in vivo*. El proyecto se desarrolló en el marco del proyecto "Alternativas terapéuticas para el tratamiento de la malaria, a partir de plantas con antecedentes etnofarmacológicos: evaluación fitoquímica y valoración preclínica" financiado por Colciencias.



Bogotá, Junio 10 de 2014

Profesora
Pilar Ester Luengas Caicedo
Departamento de Farmacia

Respetada Profesora:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 9 de Junio de 2014 (Acta 04), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto: Desarrollo hacia la estandarización de un extracto con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, a partir de la evaluación fitoquímica y de actividad biológica de especies promisorias colombianas.

Responsables: **Pilar Ester Luengas Caicedo** y Jorge Enrique Hernández Carvajal (Grupo TECPRONA), Giovanni Garavito Cárdenas (Grupo FaMeTra), Luis Fernando Ospina Giraldo (Grupo Principios Bioactivos en Plantas Medicinales, COL0014832).

Observaciones:

En esta investigación se pretende hacer una caracterización fitoquímica y farmacológica, así como evaluar la toxicidad aguda, de extractos provenientes de plantas usadas en el tratamiento de la malaria. Se emplearán cultivos de *Plasmodium falciparum* para la evaluación de la actividad antiplasmodial *in vitro*. También, se empleará un modelo *in vivo* de malaria murina. Se asume el compromiso de acoger recomendaciones de la Resolución 8430 de 1993 (Min. Salud Pública) en cuanto a la experimentación preclínica con animales de laboratorio. Además, se establece el compromiso del entrenamiento adecuado del personal participante, el manejo y desecho de residuos biológicos siguiendo protocolos de gestión ambiental.

La colecta de material vegetal estará amparada bajo un permiso marco institucional (según Decreto 1376 de 2013, que reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial).

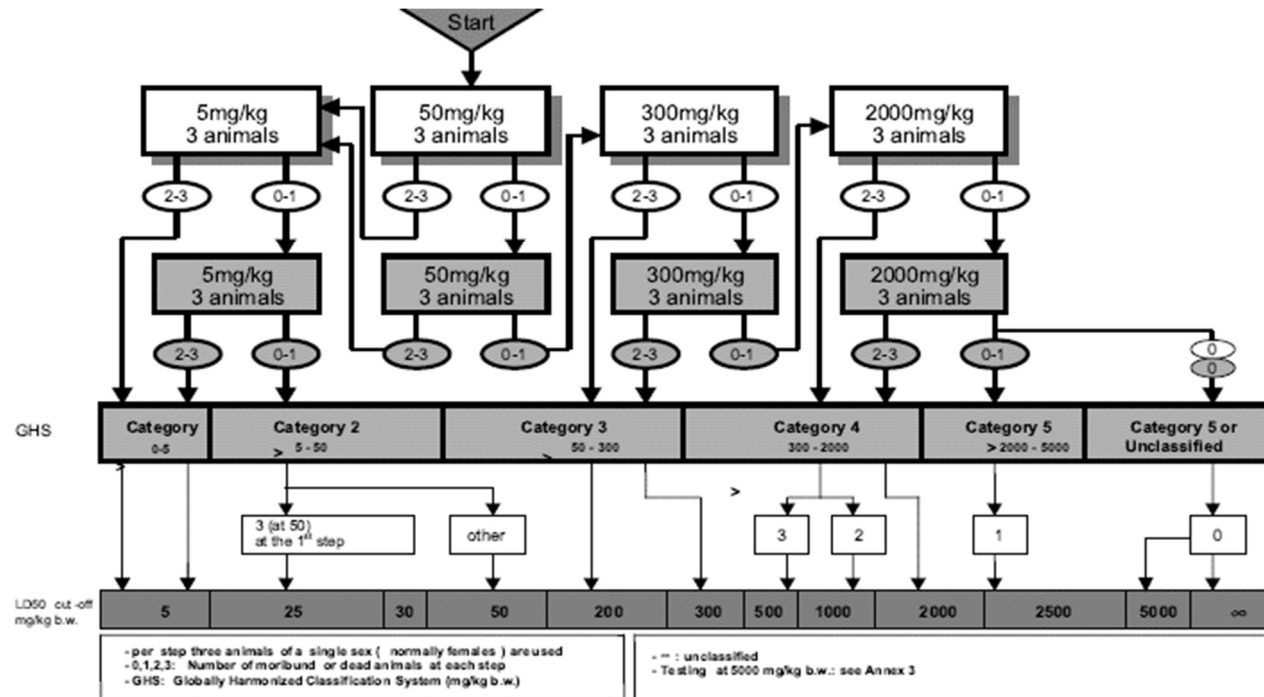
Concepto: Aprobado.


LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador Comité de Ética

F. Anexo: Procedimiento para la realización de los ensayos de toxicidad *in vivo*, según la OECD.

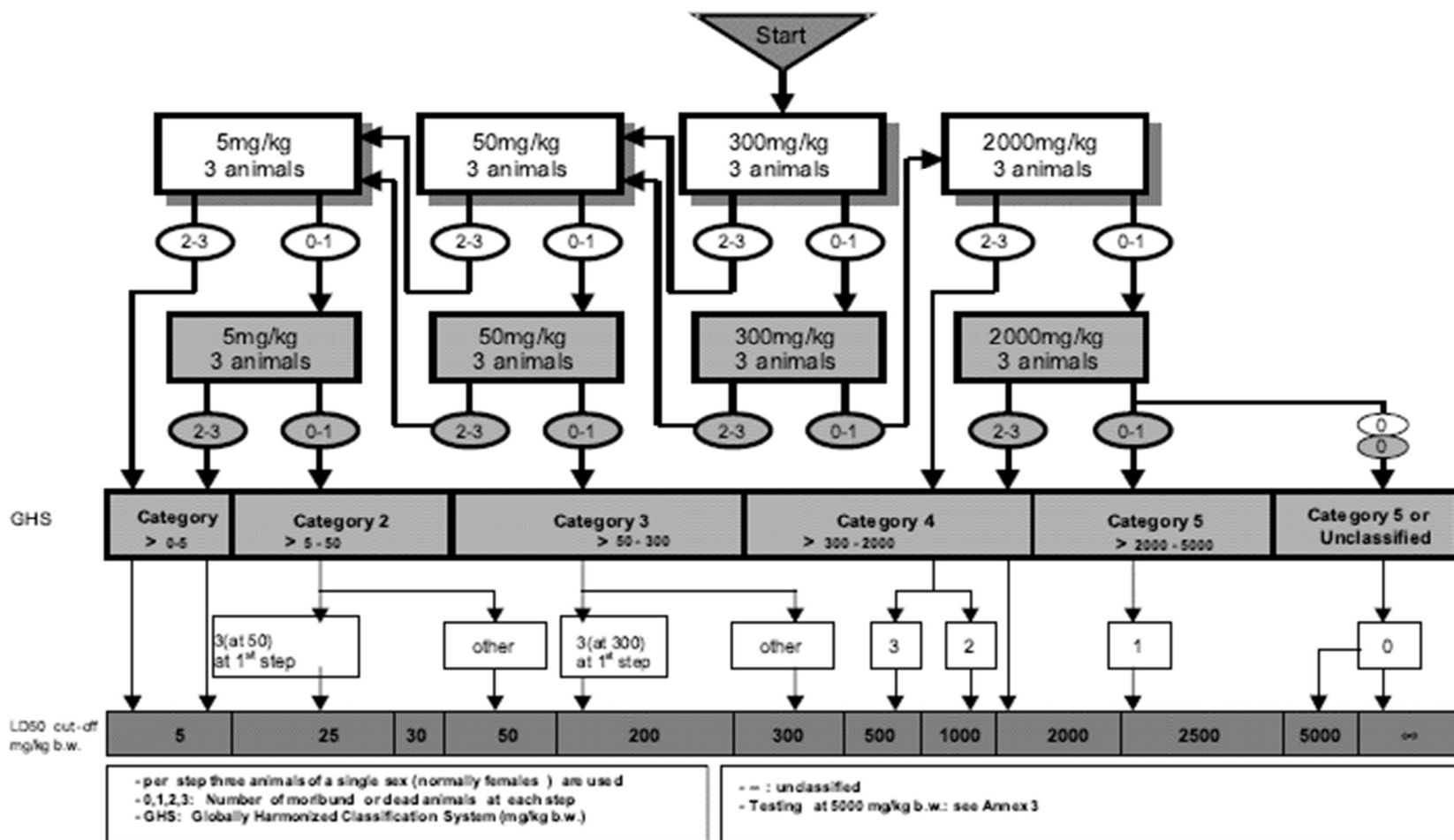
Para la realización de los ensayos de toxicidad aguda por vía oral del extracto etanólico y las fracciones obtenidas de *C. toxicofera* se empleó la guía de la OECD.

✓ Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 50 mg/kg de peso corporal

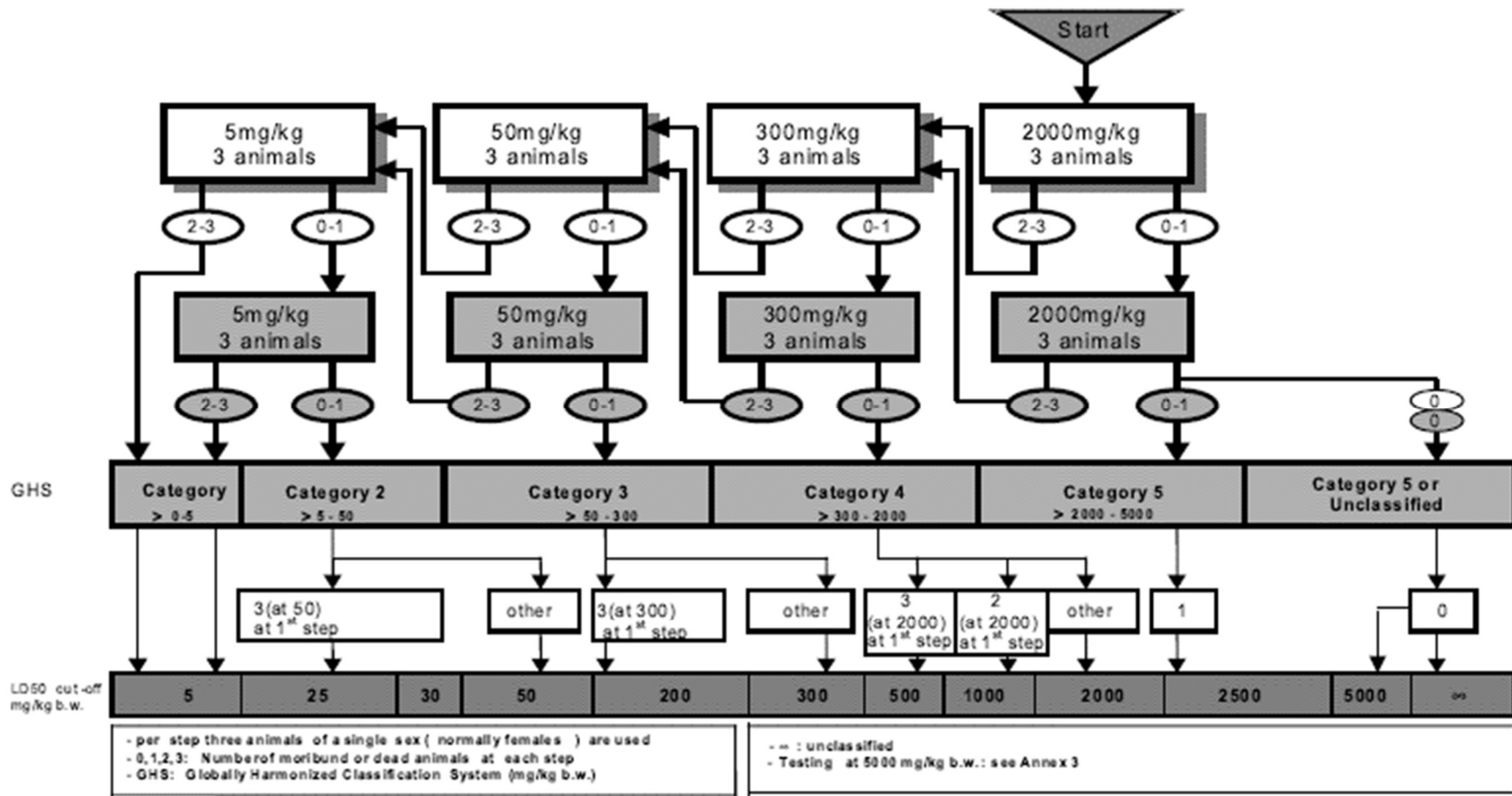


200 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

✓ Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 300 mg/kg de peso corporal



✓ Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 2000 mg/kg de peso corporal



G. Anexo: Manuscrito elaborado a partir de los resultados de la evaluación antiplasmodial y fitoquímica de cinco plantas preseleccionadas



Pharmaceutical Sciences, 2023, 29(1), 123-132
doi:10.34172/PS.2022.16
<https://ps.tbzmed.ac.ir/>



Research Article



Phytochemical and Antiplasmodial Evaluation of Five Colombian Plants with Ethnopharmacological Background of Antimalarial Use

Jorge Enrique Hernández-Carvajal^{1,2}, María Helena Arias-Marciales¹, José Octavio García³, Yoshie Adriana Hata-Uribe², Giovanni Garavito-Cárdenas¹, Pilar Ester Luengas-Caicedo^{1,4*}

¹Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Bogotá D.C., Colombia.

²Universidad Santiago de Cali – Campus Palmira, Facultad de Ciencias, Programa de Farmacia, Cali, Colombia.

³Urbate representativo, Comunidad Ciudad Hilera, Km 7 Via Leticia – Tzipaca, Leticia, Colombia (RIP).

Article Info

Article History

Received: 24 Nov 2021
Accepted: 29 Mar 2022
ePublished: 6 Apr 2022

Keywords

-Antiplasmodial
-Colombian plants
-*Canna toxicifera*
-Ethnopharmacological
-Phytochemicals
-*Plasmodium falciparum*

Abstract

Background: The study of medicinal plants has made it possible to develop products and drugs for the treatment of different diseases. Several plants in Colombia have a history of popular use for the treatment of malaria. The objective of this work was to provide information on the antiplasmodial and phytochemical activity of five neotropical native plants with a folk use for the treatment of malaria.

Methods: The ethanolic extract of each species was obtained by percolation method and characterized by thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), and hydrogen nuclear magnetic resonance (¹H-NMR). The *in vitro* antiplasmodial activity was evaluated against *Plasmodium falciparum* (strain FCR-3, chloroquine-resistant).

Results: Ethanolic extracts of *Asbelania duckeyi*, *Cecropia metensis*, *Cecropia membranacea*, and *Verbena littoralis* showed no activity. However, *Canna toxicifera* extract exhibited an IC₅₀ of 7.6 ± 3.9 µg/mL and was classified as moderately active. Most extracts show hemolytic concentration (CH₅₀) > 1000 µg/mL. A preliminary phytochemical study was carried out using tube analysis, TLC, HPLC, and ¹H-NMR. Steroids or triterpenes, and phenolic compounds were detected by TLC in all extracts. These findings were confirmed by characteristic aliphatic and aromatic signals in ¹H-NMR spectra, corresponding to triterpenes and phenolics, respectively. Additionally, alkaloids were extracted from *C. toxicifera* and detected by aromatic signals in ¹H-NMR spectra.

Conclusion: Ethanolic extract of *C. toxicifera* showed antiplasmodial activity (IC₅₀ of 7.6 ± 3.9 µg/mL); this activity may be due to the bisbenzylisoquinoline alkaloids. The ethanol extracts of *A. duckeyi*, *C. membranacea*, *C. metensis*, and *V. littoralis* did not present antiplasmodial activity.

Introduction

Malaria is a widely distributed infectious disease that exists in the Americas, in tropical, and subtropical regions.¹ This disease is endemic to Colombian Pacific Coast, Amazon, *Llanos Orientales* (eastern plains), and Norte de Santander regions; 3,079,472 malaria cases were registered between 1990 and 2016.² In week 52 of 2019, 941 cases of malaria were reported with an annual total of 78,513.³

Most drugs available to treat malaria have serious drawbacks in efficacy and show severe side effects that cause poor patient compliance. Resistance of infectious organisms (*Plasmodium* spp.) is also a major concern.^{4,5} Hence, additional control measures, including new drugs, are urgently needed.⁶⁻⁸ One important option for identifying new antimalarial compounds is medicinal plants with a history of ethnopharmacological use for the treatment of malaria.⁹

Various studies have sought to validate popular antimalarial use of different plants in Colombia.^{10,11} Five plants species were selected, some with a history of traditional use for the treatment of malaria.¹² Several species of the genus *Cecropia* are reportedly used in folk medicine for the treatment fever, among other illnesses. Additionally, *C. glaziovii* and *C. hololeuca* are used to treat malaria in the Brazilian Amazon.^{12,13} In Colombia, antiplasmodial activity of *C. metensis* and *C. membranacea* is reported from specimens collected in the *Llanos Orientales* (eastern plains) region.¹⁴

Several species of *Verbena*, including *Verbena littoralis*, are used in traditional medicine to treat fever a common symptom of malaria.¹⁵ In Peruvian Amazon, indigenous Loreto, Yanayacu, and Chazuta use leaf decoctions, which, evaluated in *in vitro* models of chloroquine-resistant *P. falciparum*, showed promising antiplasmodial activity.^{16,17}

*Corresponding Author: Pilar Ester Luengas-Caicedo, E-mail: peluca@unal.edu.co

©2023 The Author(s). This is an open access article and applies the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

204 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

Phytochemical and Antiplasmodial Evaluation of Colombian Plants with Antimalarial Use

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary Data

Supporting information is available at <https://doi.org/10.34172/PS.2022.16>.

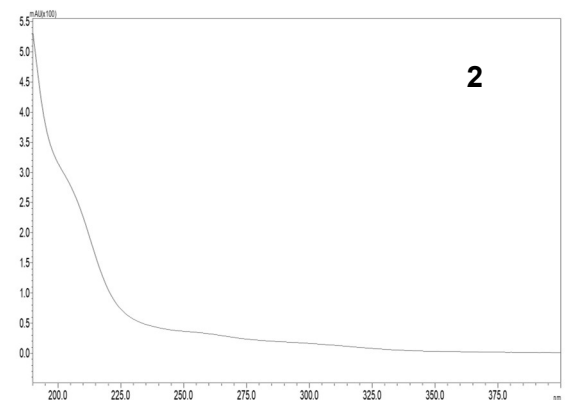
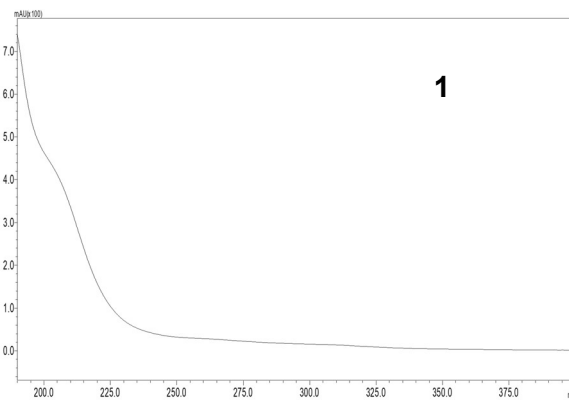
References

1. WHO. World malaria report 2017. Accessed March 17, 2021. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017>
2. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaglia EA, Pachón E, Vera MJ. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomedica*. 2017;37(Suppl 2):27-40. doi:10.7705/biomedica.v37n0.3769
3. Instituto Nacional de Salud. Bogotá D.C: Boletín Epidemiológico semana epidemiológica 52, 2019. Accessed September 19, 2019. https://www.ins.gov.co/buscaoeventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_52.pdf
4. Mäser P, Wintlin S, Rottmann M, Wenzler T, Kaiser M, Brun R. Antiparasitic agents: new drugs on the horizon. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(5):562-6. doi:10.1016/j.coph.2012.05.001
5. Renslo AR, McKerrow JH. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat Chem Biol*. 2006;2(12):701-10. doi:10.1038/nchembio837
6. Ask the Experts: Drug discovery for the treatment of leishmaniasis, african sleeping sickness and chagas disease. *Future Med Chem*. 2013;5(15):1709-18. doi:10.4155/fmc.13.161
7. Hopkins AL, Witry MJ, Nwaka S. Mission possible. *Nature*. 2007; 449(7159):166-9. doi:10.1038/449166a
8. Milliken W. Plant species occurring in northern Latin America used in the treatment of malaria and fevers: A bibliographic survey. Available from: https://www.researchgate.net/publication/265259113_Plants_for_Malaria_Plants_for_Fever_Medicinal_species_in_Latin_America_-_A_bibliographic_survey
9. Ramadani AP, Paloque I, Belda H, Tamhid HA, Masriani, Jumina, et al. Antiprotozoal properties of Indonesian medicinal plant extracts. *J Herb Med*. 2018;31:46-52. doi:10.1016/j.hermed.2017.06.004
10. Garavito G, Rincón J, Arteaga L, Hata Y, Boundy G, Gimenez A, et al. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006;107(3):460-2. doi:10.1016/j.jep.2006.03.033
11. Robledo SM, Upegui Y, Murillo J, Rodríguez B, Caca LE. *in vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of Colombian plants against human malaria *Plasmodium falciparum*. *Planta Med*. 2016;81(5 01):51-5381. doi:10.1055/s-0036-1596964
12. Botsaris AS. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of flora medicinal. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2007;3(1):18. doi:10.1186/1746-4269-3-18
13. Uchôa VT, Paula RCd, Kretzli LG, Santana AEG, Kretzli AU. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. *Drug Dev Res*. 2010;71:82-91. doi:10.1002/ddr.20351
14. Hernández Carvajal JE, Luengas Caicedo PE, Otero Jiménez V, Garavito Cárdenas G. Actividad antiplasmodica y hemolitica de extractos etanolicos y fracciones obtenidas de *Cecropia membranacea* Trécul y *Cecropia stenensis* Cuatrec. (sin. *Cecropia peñón* var. *candida* Velásquez). *Rev Cubana Med Trop*. 2014;66(1):58-70. Spanish
15. Adams M, Alther W, Kessler M, Kluge M, Hamburger M. Malaria in the renaissance: Remedies from European herbals from the 16th and 17th century. *J Ethnopharmacol*. 2011;133(2):278-88. doi:10.1016/j.jep.2010.10.060
16. Ruiz L, Ruiz L, Maco M, Cobos M, Gutierrez-Choquevilca A-L, Roumy V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay river (Peru) for the treatment of malaria. *J Ethnopharmacol*. 2011;133(2):917-21. doi:10.1016/j.jep.2010.10.039
17. Sanz-Biset J, Campos-de-la-Cruz J, Epiquián-Rivera MA, Cañiguera S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *J Ethnopharmacol*. 2009;122(2):333-62. doi:10.1016/j.jep.2008.12.009
18. Chan EWC, Wong SK, Chan HT. Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties: a review of ten genera. *J Integr Med*. 2016;14(4):269-84. doi:10.1016/S2095-4964(16)60261-3
19. Ayyad S-EN, Basaif SA, Al-Saggaf AT, Alarif WM. Vincamine and 14-*epi*-vincamine indole alkaloids from *Ambelania occidentalis*. *J Saudi Chem Soc*. 2012;16(4):419-22. doi:10.1016/j.jscs.2011.02.008
20. Brandão MGL, Zanetti NNS, Oliveira P, Graef CFF, Santos ACP, Monte-Mór RLM. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol*. 2008;120(2):141-8. doi:10.1016/j.jep.2008.08.004
21. Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J Ethnopharmacol*. 2006;106(3):390-402. doi:10.1016/j.jep.2006.01.020
22. Valdean C, Castillo JA, Sarvain M, Lotes AF, Bourdy G. The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanesha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(1):175-92. doi:10.1016/j.jep.2009.09.024
23. Rodríguez YV, Arias MH, García JO, Delano E, Garavito G. Pharmacological activity of *Cuscuta toxicifera* in combination with classical antimalarial treatments. *J Ethnopharmacol*. 2018;222:288-94. doi:10.1016/j.jep.2018.04.008
24. Rodríguez Parra Z. Evaluación comparativa de la actividad antimalárica de un remedio tradicional frente a un extracto primario; profundización del estudio de su actividad farmacológica. 2015. Accessed October 4,

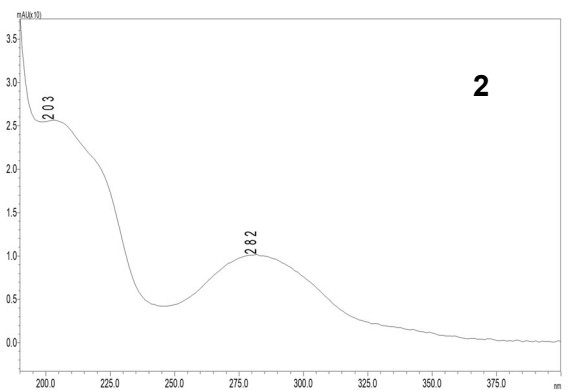
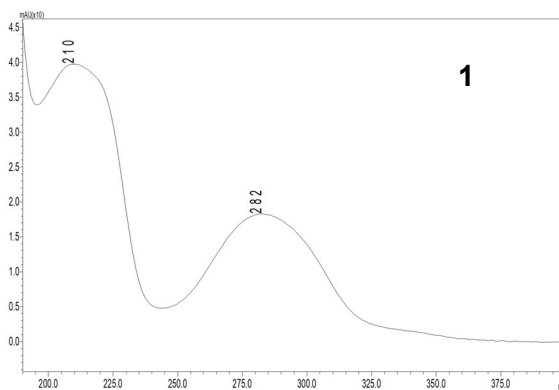
H. Anexo: Espectros UV de los picos seleccionados en el estudio de la variación química del extracto etanólico de *C. toxicofera*.

Espectros UV de los picos seleccionados del extracto etanólico de *C. toxicofera* en época seca (1) y época lluviosa (2).

Tr= 1.5 min

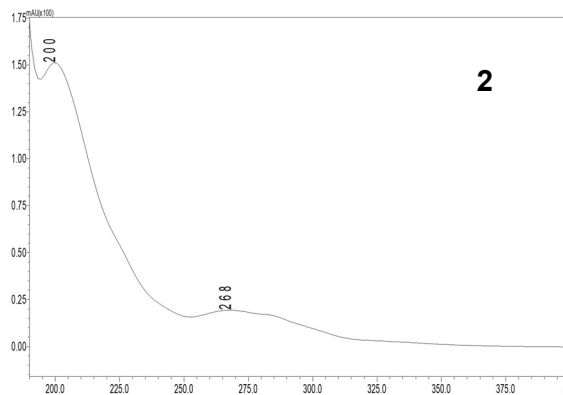
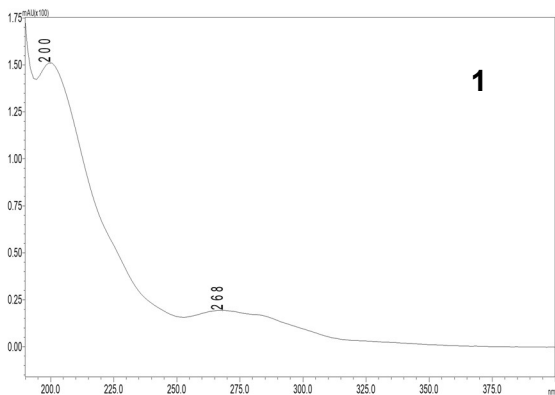


Tr= 9.9 min

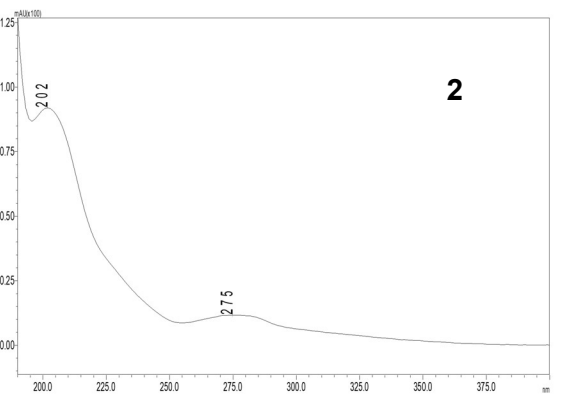
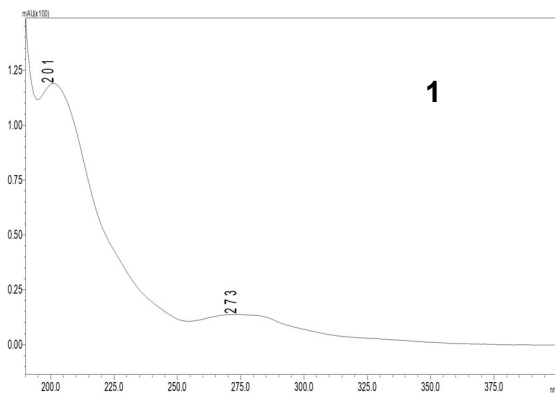


20€ Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

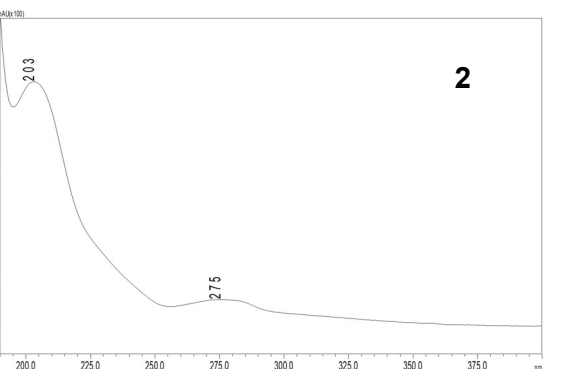
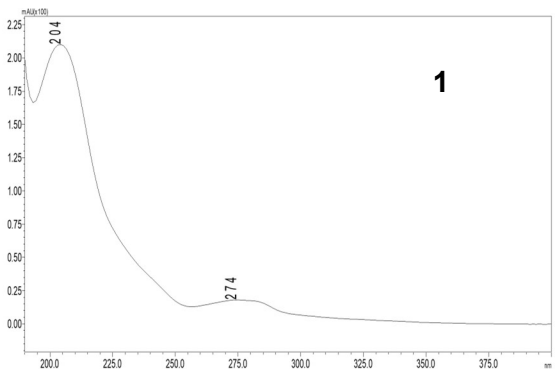
Tr= 15.5 min



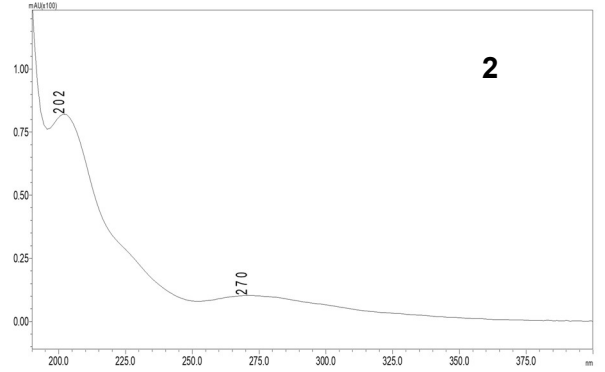
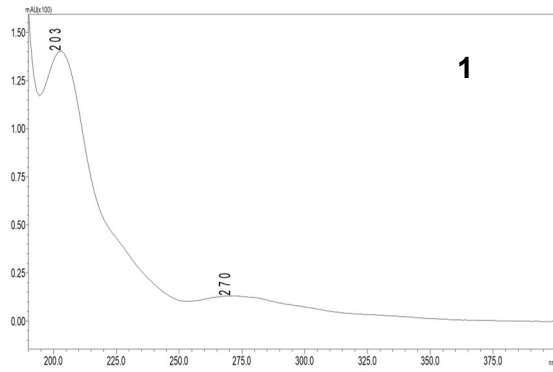
Tr= 15.8 min



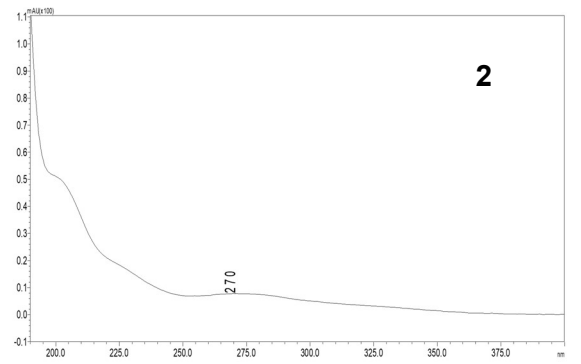
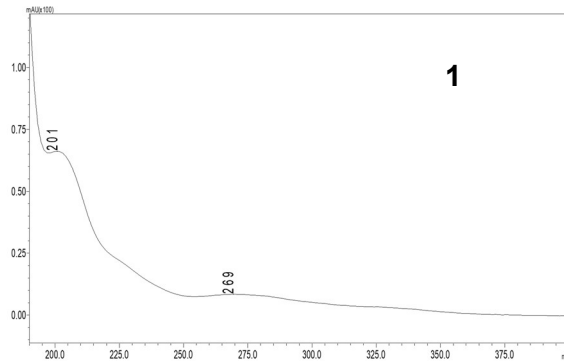
Tr= 16.0



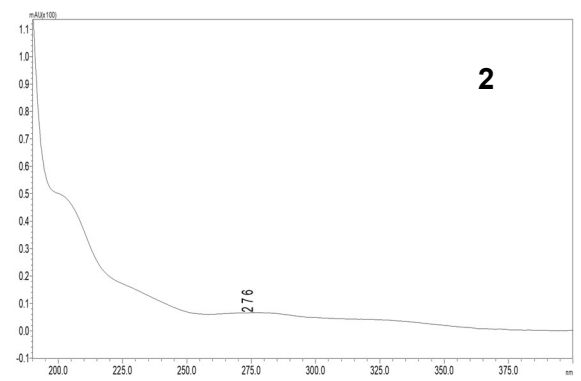
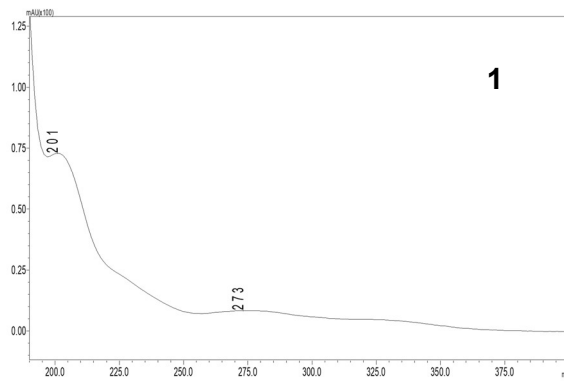
Tr=16.8



Tr=17.4

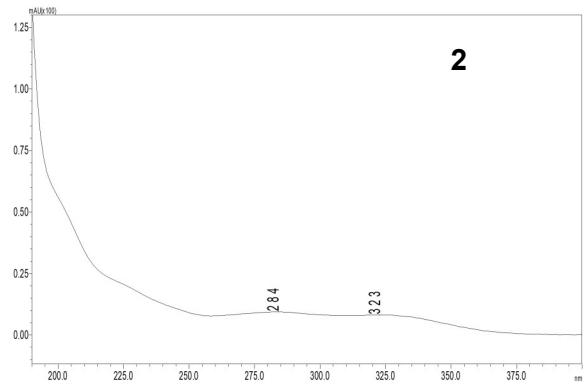
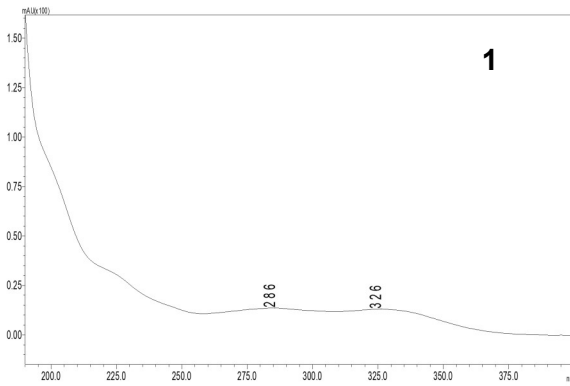


Tr= 17.9

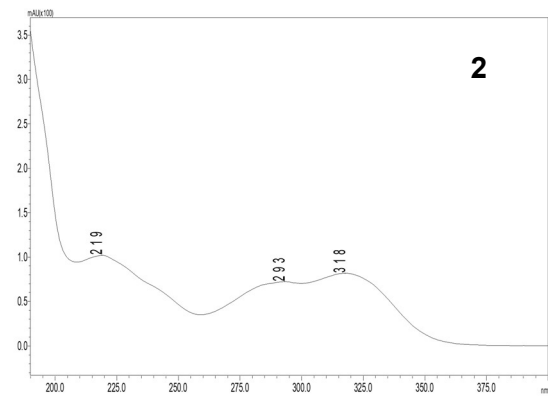
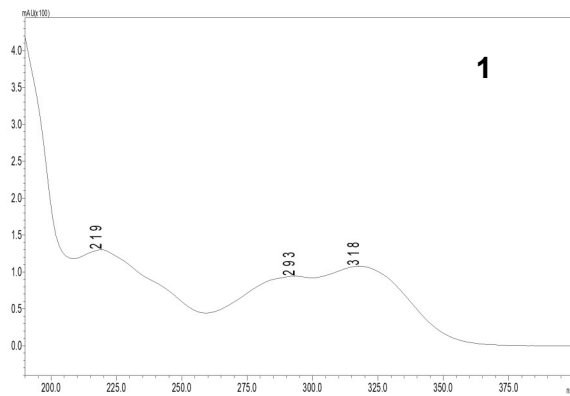


208 Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.

Tr=18.4



Tr=23.5

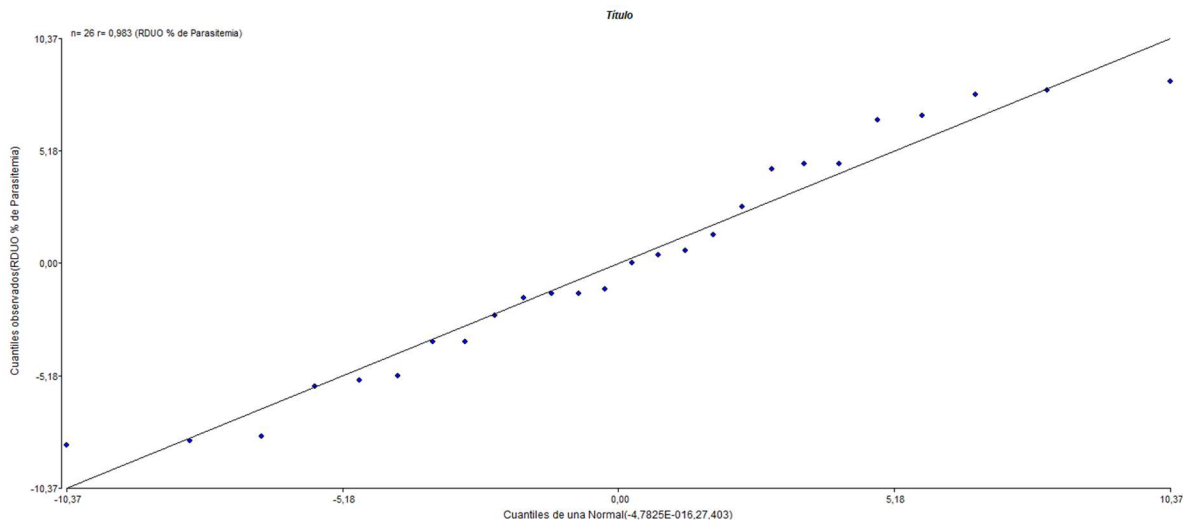


I. Anexo: Test estadísticos para evaluar la normalidad de los datos correspondientes a resultados del ensayo in vivo de extracto etanólico y fracciones alcaloidales de *C. toxicofera*

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO % de Parasitemia	26	0,00	5,23	0,91	0,0977

Método gráfico: grafico Q-Q plot



210 **Contribución a la estandarización de un extracto de plantas con antecedentes etnofarmacológicos de actividad antimalárica, por medio de evaluación fitoquímica y actividad biológica.**

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% de Parasitemia	26	0,72	0,65	17,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1796,05	5	359,21	10,49	<0,0001
Tratamiento	1796,05	5	359,21	10,49	<0,0001
Error	685,07	20	34,25		
Total	2481,12	25			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,86283

Error: 34,2533 gl: 20

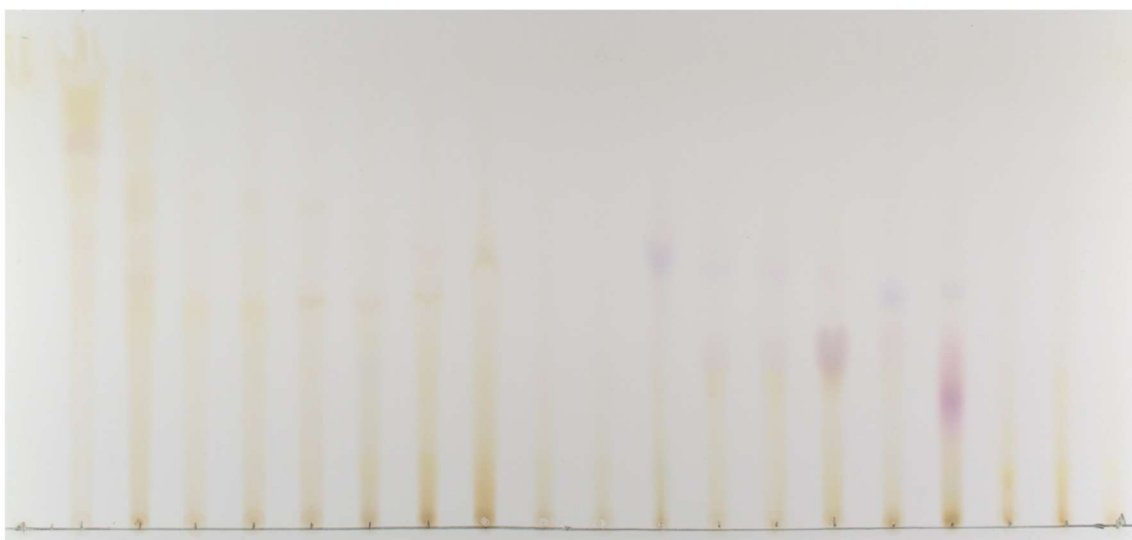
Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Cloroquina	19,20	5	2,62	A
CTFNA	31,00	3	3,38	A B
CTFA	33,60	5	2,62	B
CTFAC	39,40	5	2,62	B
Vehiculo	41,67	3	3,38	B
CTETOHS	42,40	5	2,62	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

J. Anexo: Seguimiento cromatográfico por CCD del fraccionamiento en columna abierta de la fracción alcaloidal FRDCM 2.

A. Observación al visible

1-27 28 29-32 33-35 36-37 38 39-40 41-45 46-47 48 49 50-53 54 55-57 58 59-60 61-63 64 65-66 67

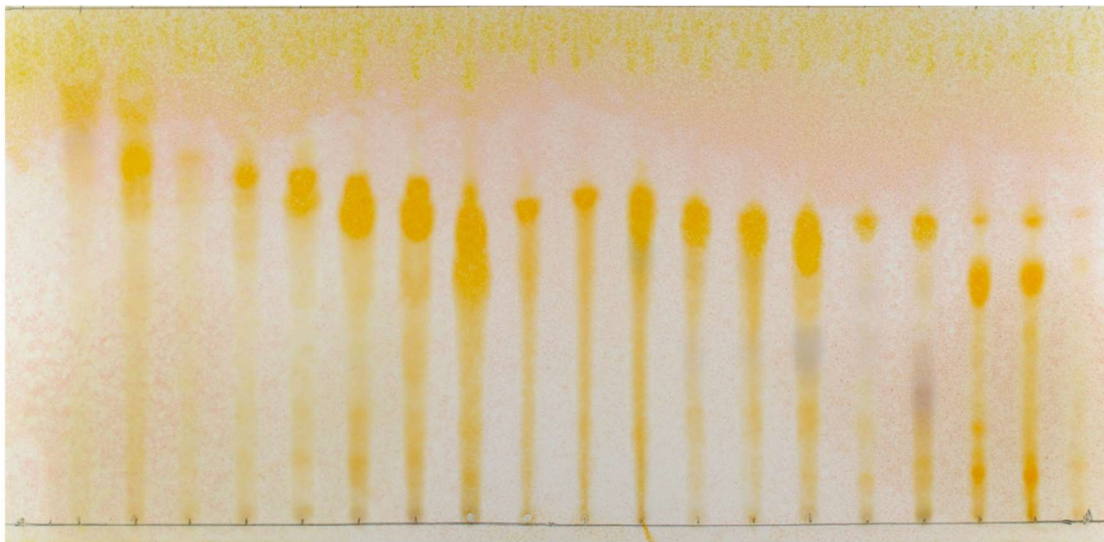


67 68-70 71-73 74-77 78 79 80 81 82 83 84 85

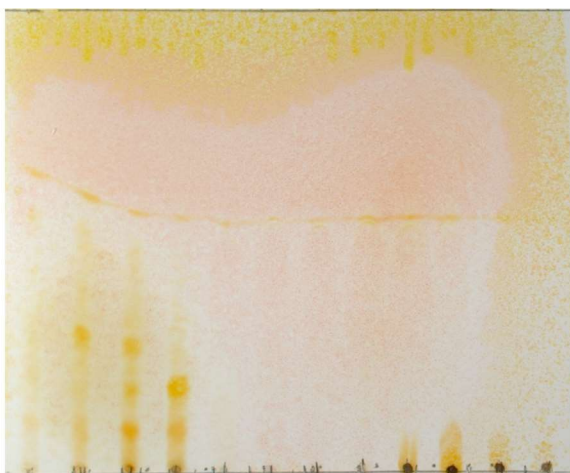


B. Revelador de Dragendorff para placa

1-27 28 29-32 33-35 36-37 38 39-40 41-45 46-47 48 49 50-53 54 55-57 58 59-60 61-63 64 65-66 67

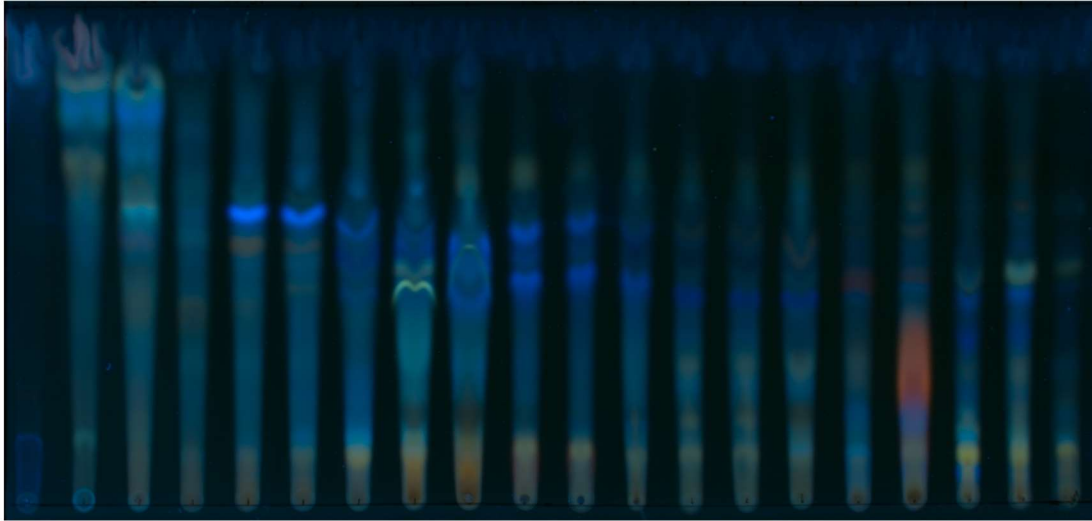


67 68-70 71-73 74-77 78 79 80 81 82 83 84 85

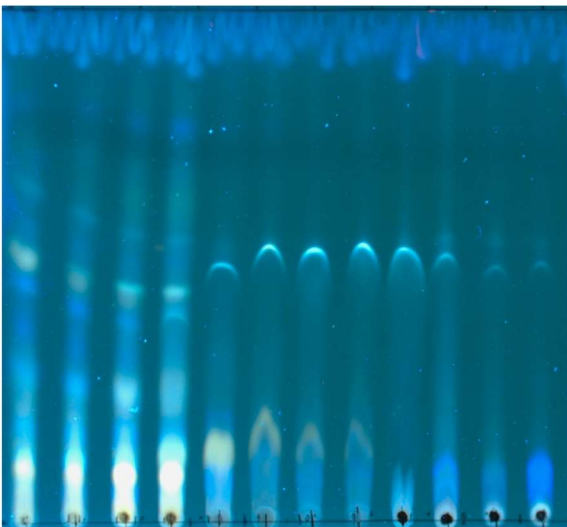


C. Observación UV-366

1-27 28 29-32 33-35 36-37 38 39-40 41-45 46-47 48 49 50-53 54 55-57 58 59-60 61-63 64 65-66 67

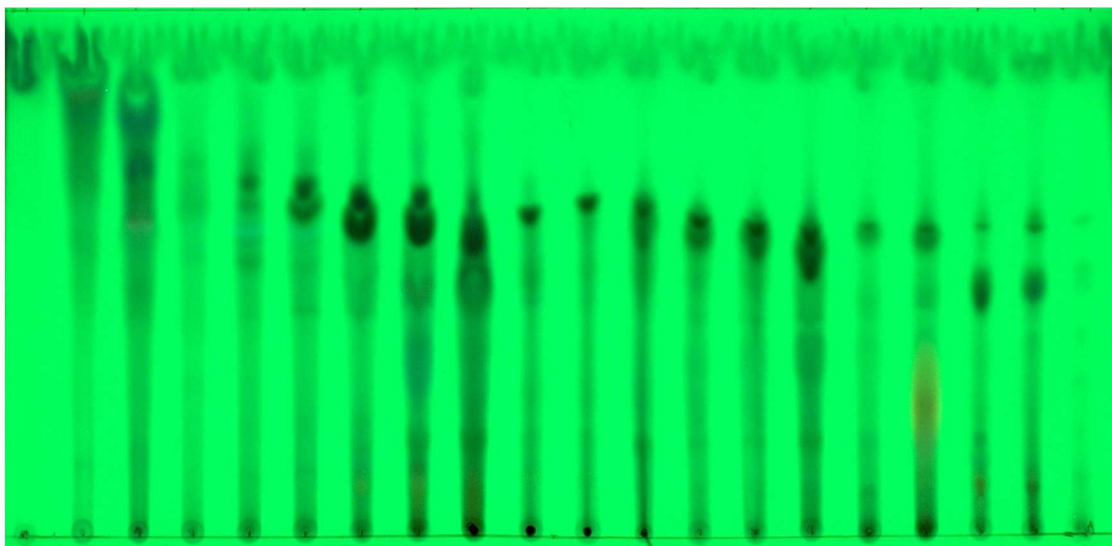


67 68-70 71-73 74-77 78 79 80 81 82 83 84 85



D. Observación UV-254.

1-27 28 29-32 33-35 36-37 38 39-40 41-45 46-47 48 49 50-53 54 55-57 58 59-60 61-63 64 65-66 67



67 68-70 71-73 74-77 78 79 80 81 82 83 84 85

