

Estudios preliminares de los extractos de especies de *Cassia* y evaluación de la actividad antiparasitaria

Preliminary studied of extras from *Cassia* species and their antiparitic activity

Boris Espinoza¹, Haydee Zainnet², Grace Ruiz Pinell¹, David Gutierrez Yapu¹, Alberto Gimenez Turba¹, Ninoska Flores¹

¹Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

²Faculty of Pharmacy, University of Szeged, 6720 Szeged, Zrínyi u. 9. Hungary.

Dirección para correspondencia: Ninoska Flores Ph D. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra N° 2224, 2do Piso, Miraflores. La Paz, Bolivia.

E mail: ninofq@hotmail.com

Recibido para publicación en 31/07/09

Aceptado en 15/10/09

RESUMEN

Las enfermedades parasitarias como las leishmaniasis, la malaria y el mal de Chagas son endémicas en Bolivia y se vuelve una necesidad encontrar productos nuevos con actividad antiparasitaria, menos tóxicos y de bajo costo en Bolivia.

En el presente estudio se evaluó la actividad leishmanicida, tripanocida y antiplasmódica de dos especies: *Cassia occidentalis* y *Cassia alata*; que en otros trabajos demostraron poseer actividad contra bacterias, hongos y parásitos. Se trabajó con extractos etanólicos de las hojas y raíces, enfrentándolos con tres cepas de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. brasiliensis* y *L. donovani*), *Tripanozoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. La determinación de la actividad se realizó por el método óptico directo, y se reportaron los resultados en términos de CI_{50} . Los extractos presentaron un CI_{50} mayor a 100 $\mu\text{g/ml}$, para *Leishmania* y *T. cruzi*, y mayor a 50 $\mu\text{g/ml}$ para *P. falciparum*, demostrando ser inactivos contra estas cepas.

Palabras Clave. *Cassia*, *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Tripanosoma*.

ABSTRACT

The parasitic diseases as leishmaniasis, malaria and Chagas are endemic in Bolivia, becomes a necessity to find new products with antiparasitic activity, less toxic and of low cost in Bolivia. In the present studied we reported the leishmanicidal, tripanocidal and antiplasmodial activity of two species of *Cassia*: *Cassia occidentalis* and *Cassia alata*; in other research have been demonstrated biological activity against bacteria, mushrooms and parasites. We studied ethanolic extracts from leaves and roots, and have been tested antiparasitic activity against the promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* and *L. donovani*, *Tripanozoma cruzi* and *Plasmodium falciparum*, the determination of the activity was carried out for the direct optic method, and the results were reported in terms of IC_{50} . All the extracts were inactive with $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$, for *Leishmania* and *T. cruzi*, and $>$ to 10 $\mu\text{g/ml}$ for *P. falciparum*.

Key Words. *Cassia*, *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Tripanosoma cruzi*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales continúan siendo un problema de salud pública mundial en países que se encuentran en zonas tropicales, como en el caso de regiones amazónicas de Loreto en Perú¹, Beni y Pando en Bolivia y en otras regiones de América Latina. Las patologías como la malaria, la enfermedad de Chagas y las leishmaniasis, son enfermedades ligadas a la pobreza y relacionadas con las condiciones higiénico-sanitarias, socio-económicas y ambientales con una considerable morbilidad y mortalidad².

El elevado costo del tratamiento, los efectos secundarios, la generación de resistencia a los medicamentos circulantes, nos lleva a la necesidad de buscar agentes terapéuticos más económicos, más accesibles, con baja toxicidad y con mayor eficacia para el tratamiento de estas enfermedades³. Un ejemplo de la utilidad de nuestras plantas, es el tratamiento de las leishmaniasis realizado por los pueblos Tacanas⁴, Chimanes y Mozetenes, utilizando la planta denominada Evanta (*Galipea longiflora*).

Con este conocimiento, y como parte de la búsqueda de nuevos y mejores medicamentos de fácil disponibilidad y baja toxicidad, la OMS dentro del Programa de Enfermedades Tropicales ha considerado la investigación de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades parasitarias como esenciales y de alta prioridad⁵.

Las especies vegetales *Cassia alata* y *Cassia occidentalis*, son especies que presentan una gran variedad de metabolitos secundarios, tales como taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides y antraquinonas⁶. Además los extractos de sus hojas demostraron tener elevada actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Echerichia. coli*⁷ y actividad antifúngica contra *Candida albicans* en cultivos. También son utilizados en forma de jabones o ungüentos aplicados en infecciones tópicas^{8,9}. La *C. occidentalis* presentó actividad antiplasmódica inhibiendo el desarrollo de cultivos in vitro de *Plasmodium falciparum*¹⁰.

La presencia de especies de *Cassia* en Bolivia y los pocos estudios químicos biológicos de las mismas, nos han encaminado a realizar estudios químicos biodirigidos, en la búsqueda de especies

con actividad antiparasitaria, centrándonos en la actividad leishmanicida, tripanocida y antiplasmódica. Así, de las plantas recolectadas de *C. occidentalis* y *C. alata*, se obtuvieron los extractos etanólicos; posteriormente se realizó la evaluación de la actividad antiparasitaria, sobre cultivos in vitro de *Leishmania*, *Tripanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. Las hojas y raíces de las especies de *C. occidentalis* (HZ09CO) y *C. alata* (HZ09CA) fueron recolectadas en la comunidad de Porvenir, Bajo Paraguá, Departamento de Santa Cruz, en octubre de 2008. La recolección e identificación fue realizado por la Lic. Haydee Zainnet. Muestras de herbario han sido depositadas en el Herbario del Oriente Boliviano, Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado, Santa Cruz, Bolivia.

Preparación de los Extractos Etanólicos. Las hojas y raíces de las plantas recolectadas *C. occidentalis* y *C. alata*, se separaron y desmenuzaron finamente, para realizar una maceración con etanol al 96%, durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente el residuo etanólico se filtró, y se evaporó el disolvente obteniendo el residuo etanólico seco.

Evaluación de la actividad antiparasitaria in vitro. Evaluación de la actividad leishmanicida. Las formas de promastigotes de *Leishmania*: *L. donovani* (cepa PP75), *L. braziliensis* (cepa M 2903) y *L. amazonensis* (cepa PH8), fueron cultivada a 26°C en medio Schneider suplementado al 5% con suero bovino fetal inactivo (56°C por 30 minutos). Los parásitos en fase de crecimiento logarítmico fueron distribuidos en una microplaca de 96 pozos a una concentración de 1 x 10⁶ parásitos/ml y cada pozo fue tratado con diferentes concentraciones de los extractos o fracciones durante 72 horas. La actividad se evaluó mediante conteo óptico en microscopio, comparándose con el control positivo y negativo. Pentamidina fue utilizado como fármaco control. Se evaluaron concentraciones de los extractos de 100, 50 y 25 µg/ml; en caso de que los productos presentasen actividad, se disminuyeron las concentraciones

hasta obtener la CI_{50} ; la prueba se realizó por triplicado¹¹.

Evaluación de la actividad tripanocida. Las formas de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen, fueron cultivadas a 26°C en medio Liver Infusión Tryptose (LIT) suplementado al 5% con suero bovino fetal inactivado (56°C por 30 minutos). Los parásitos en fase de crecimiento logarítmico se distribuyeron en placa de 96 pozos a una concentración de 1×10^6 parásitos/ml. Cada pozo fue tratado con diferentes concentraciones de los extractos 100, 50 y 25 $\mu\text{g/ml}$, durante 72 horas. El vehículo utilizado para la disolución de los extractos fue DMSO, en una concentración no superior al 1%. La prueba se realizó por triplicado. La actividad fue medida por conteo óptico con la utilización de un microscopio invertido y comparándose con pozos control. Anfoterecina B fue utilizada como fármaco de referencia¹¹.

En cada modelo experimental la CI_{50} del extracto fue determinada mediante análisis de regresión lineal (porcentaje de inhibición vs logaritmo de la concentración del extracto).

Evaluación de la actividad antiplamódica in vitro por el Método del Cultivo directo. El método de cultivo continuo in vitro empleado, fue desarrollado en 1976 por Trager y Jensen¹². De acuerdo a esta técnica las formas parasitarias de *Plasmodium falciparum* cepa FCR3 resistente a la cloroquina, fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementada con suero al 10% y un hematocrito del 4% que se obtuvo añadiendo 200 μl de glóbulos rojos totales (O Rh⁺) en 4,5 ml de

RPMI 1640 suplementado con 0,5 ml de suero o plasma (del mismo tipo de sangre) incubados a 37°C en un medio anaeróbico. Los extractos fueron disueltos en DMSO y la cloroquina en agua para luego ser diluidos con el mismo medio obteniéndose las concentraciones requeridas (0,10, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$). Los cultivos fueron sincronizados de acuerdo al método descrito por Lambros y Vanderberg, en 1979; con una parasitemia y un hematocrito del 1 y 2% respectivamente. Se alícuota un volumen de 100 μl además de 100 μl de los extractos en placas de 96 pozos, e incubados a 37°C por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se eliminó completamente la fase superior al cultivo, para realizar un frotis del sedimento de cada alveolo, fijando luego con metanol y realizando la tinción con Giemsa. Estas placas fueron observadas al microscopio, con lente de inmersión x 100, contando glóbulos rojos no infectados (GRL) y glóbulos rojos infectados (GRI), para obtener el porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ Inh.} = \frac{(\text{GRL} - \text{GRI})}{\text{GRL}} \times 100$$

El cálculo de la Concentración Inhibitoria del 50% en la maduración de los esquizontes (CI_{50}), se realizó por un método gráfico, programa Críquet Graph 1.3, considerándose como activos aquellos que presentaron CI_{50} menor a 10 $\mu\text{g/ml}$ ^{2,13}.

RESULTADOS

Los porcentajes de rendimiento obtenidos del

extracto crudo etanólico de hojas y raíces de cada planta, se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento de la extracción etanólica de especies de Cassia

| Especie | Parte | Peso (g) | Extracto seco (g) | Rendimiento (%) |
|------------------------|----------------|----------|-------------------|-----------------|
| <i>C. occidentalis</i> | Hojas | 15.0 | 2.0734 g | 13.8 % |
| | Raíces | 43.0 | 2.1727 g | 5.1 % |
| <i>C. alata</i> | Hojas grandes | 12.5 | 2.1257 g | 17,1 % |
| | Hojas pequeñas | 6.1 | 0.6525 g | 10.7 % |
| | Raíces | 15.8 | 0.8049 g | 5.10 % |

Se observó que existe un mayor rendimiento en extracto seco de las hojas de las plantas que de las raíces.

Los extractos de *C. occidentalis* y *C. alata* fueron evaluados frente a promastigotes de 3 especies de

Leishmania, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. Los resultados de las actividades de cada extracto se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad antiparasitaria de los extractos etanólicos de *C. occidentalis* y *C. alata*

| Especie | Parte | Extracto | Leishmaniasis CI ₅₀ µg/mL ^a | | | Mal de Chagas CI ₅₀ µg/mL ^b | Malaria CI ₅₀ µg/mL ^c |
|----------------------------|----------------|----------|--|------------------------|--------------------|--|--|
| | | | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. braziliensis</i> | <i>L. donovani</i> | <i>T. cruzi</i> | <i>P. falciparum</i> |
| <i>Cassia occidentalis</i> | Hoja | EtOH | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 10 |
| | Raíz | EtOH | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 10 |
| <i>Cassia alata</i> | Hojas grandes | EtOH | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 10 |
| | Hojas pequeñas | EtOH | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 10 |
| | Raíces | EtOH | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 | > 10 |

Droga de referencia ^a Anfotericina CI₅₀ 0.2µg/mL, ^b Pentamidina CI₅₀ 10µg/mL, ^c Cloroquina

Los extractos etanólicos de hojas y de raíces, de ambas plantas, no presentaron actividad sobre las tres especies parasitarias de *Leishmania*, sobre los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con una CI₅₀ > 100 µg/ml, y tampoco sobre la cepa de *Plasmodium falciparum* con una CI₅₀ > 10 µg/ml.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se trabajaron con extractos etanólicos de hojas y raíces de dos especies de: *C. occidentalis* y *C. alata*. Trabajos previos⁶ de extractos etanólicos de las hojas *C. alata*, mostraron la presencia de taninos, saponinas, glucósidos y aceites esenciales como estudios preliminares de su composición. También reportaron la existencia de alcaloides, flavonoides y antraquinonas⁷.

Se tiene referencia de que el extracto acuoso de las hojas de *C. alata* se reportó inactivo contra *P. falciparum*, también se tiene que extractos etanólicos de las flores, tallo y hojas de

C. occidentalis presentaron un 77% de inhibición frente a *P. falciparum*¹⁰. En este trabajo esta especie no presentó actividad leishmanicida, tripanocida ni antiplasmódica como se hubiera supuesto por los trabajos previos.

Al comparar los resultados de este trabajo con los observados en investigaciones previas, donde se devela la actividad antiplasmódica, debemos hacer algunas consideraciones. Por ejemplo la época de colecta no era la más adecuada, las plantas estudiadas pueden tener diferentes metabolitos a los descritos en la bibliografía, la edad de la planta, pudieron haber sido muy jóvenes o que los metabolitos que contenían la actividad no hubieran sido extraídos de la mejor forma.

Tampoco se puede descartar futuros estudios con los diferentes extractos de estas plantas, puesto que aunque no presenten actividad antiparasitaria, sí se reporta en bibliografía que los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos presentan

actividad antibacteriana^{6,7}, antifúngica^{8,9} y antiplasmódica¹⁰.

El estudio realizado es preliminar, por lo cual se propone continuar con los trabajos sobre estas plantas, realizando la extracción en otros disolventes (AcOEt, CH₂Cl₂, Et₂O) o también fraccionar el extracto obtenido y realizar la evaluación de cada fracción.

AGRADECIMIENTOS

Al IRD-Francia, por la beca otorgada en la gestión 2008-2009, para la realización de la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas de la UMSA; a la Lic. Haydee Zainnet, por realizar la colecta; a la comunidad de Porvenir, Bajo Paraguá, Departamento de Santa Cruz por permitirnos colectar las especies vegetales; al Proyecto PCI-Iberoamérica (A/010794/07, AEI); y al proyecto X.5 “Búsqueda, Obtención y Evaluación de Nuevos Agentes Antiparasitarios” del CYTED (Subprogram X).

REFERENCIAS

1. Quispe M. Malaria en la Región de Loreto: Investigación para el proyecto integrado de Malaria en la Región de Loreto. CARE-Perú, Julio 1998.
2. Gutierrez D, Sangama D, Rengifo E, Gimenez A. Evaluación de la actividad antiplasmódica de extractos de *Euterpe olaracea*, *Mycarya dubia*, y *Croton lechneri*. BIOFARBO. 2008; 16: 16-20.
3. Tórrez, J. Dirección de Control y Prevención de enfermedades. Programa Nacional de Leishmaniasis. 2005. Ministerio de Salud y Deporte; Bolivia.
4. FONAMA, IRD, UMSA, CIPTA. Tacana, Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas. 1º ed. Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; 1999.
5. Tropical Disease Research. Fifteenth Programe Report Progress 1999-2000. Geneva: World Helath Organization; 2001.
6. Idu M, Oronsaye FE. Preliminary investigation on the Phytochemistry and antimicrobial activity of *Senna alata* L. Leaves. J Apli Sci. 2006; 6 (11): 2481-2485.
7. Nebedum J, Ajeibe K, Nwobodo E. Comparative study of ethanolic extracts of four nigerian plants against some pathogenic microorganisms. Res J Med Plant. 2009; 3 (1): 23-28.
8. Sakharkar PR, Pati AT. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. Indian J Pharm Sci. 1998; 60 (5): 311-312.
9. Abo KA, Adeyemi AA, Jegede IA. Evaluation of *Cassia sieberiana*, *Cassia alata* and *Cassia occidentalis* for anthraquinone content and antimicrobial activity. Standarization and utilization of herbal medicines. En: Proceedings of 1st International Workshop on Herbal Medicinal Products, 22-24 Noviembre. Ibadan, Nigeria; 1998. .
10. Blair S, Madrigal B. Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa pacífica colombiana, 2005: Universidad de Antioquia. Colombia: 140-142.
11. Giménez A, Gupta M, Deharo E. Manual de Técnicas de laboratorio para la evaluación de sustancias tripanomicidas y leishmanicidas. 1ª. ed. La Paz: Prisa; 2005.
12. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science. 1976; 193: 673-675.
13. Deharo E, Gautret Ph, Muñoz V, Sauvain M. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. CYTED-IRD, 187, 1ª ed. La Paz: Perez.