

Concentración natural de compuestos antimaláricos en artrópodos tropicales (*in vitro*)

Misael Chinchilla-Carmona^{1,3}, Olga Marta Guerrero Bermúdez¹, Giselle Tamayo-Castillo^{2,4}, Ana Sittenfeld Appel^{2,5}, Alberto Jiménez-Somarribas² & Idalia Valerio-Campos³

1 Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica 2060 San José, Costa Rica; abriceno@racsa.co.cr

2 Unidad de Bioprospección, Instituto de Biodiversidad (INBio); gtamayo@inbio.ac.cr

3 Departamento de Investigación, Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED); chinchillacm@ucimed.com

4 Escuela de Química, Universidad de Costa Rica.

5 Centro de Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.

Recibido 17-X-2006. Corregido 06-IX-2007. Aceptado 20-XI-2007.

Abstract: Natural concentration of antimalaric components in Tropical arthropods (*in vitro*). Alcohol, hexane and dichlorometane extracts of 751 samples of Costa Rican arthropods were studied for the presence of antimalaric components. With *Plasmodium berghei* we set an *in vitro* model in which the effect of the extract was determined by staining of the parasites with cresil brilliant blue. Active extracts at concentration of 50 mg or less, were considered positive. Promissory extracts were found in the orders Lepidoptera (24.1%), Coleoptera (32.8%), Hemiptera (38.5%) and Polydesmida (81.3%). Since most of the Lepidoptera samples were in the immature stages, the relation with the host plant was analyzed. Cannaceae, Flacourtiaceae, Crisobalanaceae, Lauraceae, Fagaceae, Ulmaceae, Rosaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Lauraceae and Caprifoliaceae were related with the Lepidoptera larvae, and an antimalaric effect has been reported in most of these families. In the orders Polydesmida, Opiliones and Blattodea, the extract from adults also had some important effect, probably because all of them fed on plants. Polydesmida and Opiliones have chemical substances that probably serve as defensive purposes; these chemicals could also have some antiparasitic effect. Therefore, the detection of antimalaric components in arthropod species led to the identification of plants with promissory antimalaric components. Rev. Biol. Trop. 56 (2): 473-485. Epub 2008 June 30.

Key words: malaria, arthropod extracts, antimalaric activity, treatment.

La malaria es una enfermedad cuya importancia en la salud humana data de hace muchos años y continúa siendo un flagelo de la humanidad (Bioland 2001). La cantidad de muertes debidas a ella, especialmente causadas por la especie *Plasmodium falciparum*, es un motivo de preocupación en los países tropicales (WHO 2000).

En Costa Rica, como consecuencia de la lucha contra esta parasitosis que se llevó a cabo en los años 60, 70 y 80, ésta se consideró prácticamente erradicada (Vargas 2001); sin embargo, después de 1990 se observó un nuevo incremento en el número de casos

probablemente debido a los procesos de inmigración poco controlados. Independientemente de la causa, esta enfermedad todavía permanece en Costa Rica, como en muchas otras partes del mundo (Bioland 2001). Estos hechos mantienen vigente la importancia, no sólo de una vigilancia epidemiológica sostenible, sino de la aplicación de los tratamientos más adecuados.

Dentro de la gran cantidad de drogas que se usan contra la malaria, resaltan la cloroquina, la quinina y los antifolatos sulfas y pirimetamina (Rosenthal 1998, Marquiño *et al.* 2003). Esta situación persiste a pesar de los más recientes intentos de encontrar productos

sintéticos, capaces de actuar a niveles más puntuales de acción, específicamente en la constitución molecular del parásito, así como al proceso metabólico en cuanto a la actividad enzimática se refiere (Nzila *et al.* 2005a, Nzila *et al.* 2005b).

La quinina que es un producto natural, sólo se usa en casos muy especiales debido a sus efectos secundarios, mientras que el parásito ha desarrollado resistencia a la cloroquina y más recientemente a las sulfas (Bioland 2001, Hastings 2004, Hyde 2005). Estas razones han inducido a la búsqueda de medicina alternativa, usando productos naturales obtenidos fundamentalmente de plantas (Murphy 1999, Bodeker 2000, Anthony *et al.* 2005, Basso *et al.* 2005, Kvist *et al.* 2006).

Siguiendo esta línea de pensamiento se aprovechó una intensa recolecta de material entomológico realizado por el Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBio), tendiente especialmente a realizar un inventario de artrópodos de este país y de paso, obtener algunos productos activos de tipo bactericida, antiviral y reguladores inmunológicos, entre otros (Sittenfeld *et al.* 1999, Nielsen *et al.* 2004). Usamos una mínima parte de ese material para estudiarlo en forma experimental por su actividad contra agentes de la malaria, utilizando para ello la especie *Plasmodium berghei* de naturaleza netamente murina.

Basados en estudios previos con extractos de plantas (Castro *et al.* 1996, Chinchilla *et al.* 1998) y con la experiencia obtenida al desarrollar técnicas para el análisis de extractos de artrópodos (Chinchilla *et al.* 1998, Chinchilla *et al.* 2001) se estudiaron gran cantidad de familias y órdenes de artrópodos en busca de principios activos antimaláricos.

El estudio pretende no sólo dar a conocer un trabajo de más de 4 años, sino establecer alguna relación entre el extracto que presente algún efecto promisorio y la planta hospedero del cual se alimenta el artrópodo. La comunicación de los resultados constituye la meta fundamental de esta publicación.

Recolecta y procesamiento de los artrópodos capturados. De acuerdo con los métodos de campo descritos previamente (Sittenfeld *et al.* 1999, Nielsen *et al.* 2004), se recolectaron ejemplares de los órdenes y familias que se indican en el cuadro 1 para un total de 751 muestras.

Para obtener el material, que luego se probó para demostrar su posible actividad antimalárica, se utilizaron extractos hexánicos y alcohólicos obtenidos con las técnicas descritas previamente (Chinchilla *et al.* 2001).

Análisis de laboratorio. La determinación del efecto antimalárico de cada extracto fue realizado *in vitro* de acuerdo con el procedimiento previamente descrito (Chinchilla *et al.* 2001) y que se explica brevemente. Ratones NGP (20-30 g) fueron inoculados i.p. con glóbulos rojos infectados con *Plasmodium berghei*; 8 días después los animales fueron sangrados de la cola y se preparó una suspensión con 3% a 5% de glóbulos rojos suspendidos en MEM más 10% de suero fetal bovino. El uso de *P. berghei* para este estudio se basa en las recomendaciones hechas por varios autores (Carter y Diggs 1977, Janse y Waters 2006). El extracto liofilizado fue disuelto en DMSO al 10% de manera que se obtuviera una concentración de 1:10 (peso/volumen). Luego se realizaron diluciones dobles de cada extracto, incorporando a 50 µl de cada dilución, 200 µl de la solución de eritrocitos infectados. Las muestras se incubaron a 37 °C por 2 horas usando los controles negativos y positivos correspondientes. La muerte de los parásitos fue determinada usando el colorante azul de cresil brillante al 1%, estableciendo el 50% o más de organismos teñidos como signo de positividad.

Análisis experimental. Para realizar un estudio que cubriera la mayoría de los parámetros considerados, se separaron las muestras de acuerdo con el tipo de extracción (alcohólica

CUADRO 1

Acción antimalárica de extractos de artrópodos de acuerdo con orden y familia. Estudio total

ORDEN	FAMILIA	N° DE MUESTRAS			ORDEN	FAMILIA	N° DE MUESTRAS		
		TOTAL	POSITIVAS	%			TOTAL	POSITIVAS	%
Lepidoptera		324	78	24.1	Coleoptera		58	19	32.8
	Arctiidae	32	5	15.6		Cerambycidae	5	1	20
	Doidae	5	3	60		Curculionidae	8	2	25
	Heliconidae	6	2	33.3		Meloidae	8	4	50
	Lasiocampidae	1	1	100		Passalidae	2	2	100
	Limacodidae	8	2	25		Scarabaeidae	30	9	30
	Lymantriidae	3	1	33.3		N.I. *	5	1	20
	Megalopygidae	5	2	40	Hemiptera		13	5	38.5
	Notodontidae	26	7	26.9		Pentatomidae	13	5	38.5
	Nymphalidae	34	11	32.4	Polydesmida		16	13	81.3
	Papilionidae	8	1	12.5		Rhacodesmidae	16	13	81.3
	Pieridae	12	2	16.7	Homoptera		5	3	60.0
	Pyralidae	14	3	21.4		Cicadidae	5	3	60
	Riodinidae	6	2	33.3	Blattodea		4	1	25.0
	Saturniidae	134	32	23.9		N.I. *	4	1	25
	Sphingidae	30	4	13.3	Phasmatidea		7	2	28.6
Hymenoptera		110	17	15.5		Phasmidae	7	1	14.3
	Apidae	3	2	66.7	Mantodea		5	1	20
	Formicidae	16	3	18.8		Mantidae	5	1	20
	Vespidae	86	10	11.6	Opiliones		4	2	50
	N.I.*	5	2	40		N.I. *	4	2	50
Orthoptera		96	13	13.5	Odonata		3	1	33.3
	Acrididae	18	3	16.7		Libellulidae	1	0	0
	Tettigoniidae	71	7	9.9		N.I. *	2	1	50
	Tridactylidae	2	1	50					
	N.I.*	5	2	40					

* N.I.: No identificado.

o hexánica), los órdenes y familias correspondientes a la actividad de cada extracto y el tipo de estado evolutivo o productos estudiados en cada caso.

Luego se trató de establecer una relación entre de los extractos de artrópodos “promisorios” y las plantas de las cuales se alimentan esos artrópodos.

Se consideraron extractos activos aquellos en que el efecto antimalárico pudo ser demostrado en 5 o menos de 5mg /ml. Extractos que fueron activos en concentraciones de más de 5 y hasta 50 mg/ml, se consideraron parcialmente activos. Para establecer todas las relaciones del caso y ordenar todos los datos obtenidos se usó el programa SPSS-13.0.

RESULTADOS

El cuadro 2 indica los porcentajes de extractos con alguna actividad antimalárica en los diferentes órdenes de artrópodos estudiados, de acuerdo con el tipo de extracción (alcohólica o hexánica y diclorometánica). Como esperado, los porcentajes de positividad son muy bajos,

siendo el más alto el del orden Lepidoptera del que además se estudiaron mayor número de muestras.

Al establecer las categorías de activo (5 o < 5 mg/ml de actividad) y parcialmente activo (>5 a 50 mg/ml de actividad) los números se reducen totalmente como se observa en el Cuadro 3. Los porcentajes más elevados se

CUADRO 2

Acción antimalárica de extractos de artrópodos de acuerdo con el orden y tipo de extractos en 751 muestras

Orden	Negativos		Positivos							
			Alcohol		Hexánico o dicloromet.		Ambos		Total	
	N°	%	N°	% *	N°	%	N°	%	N°	%
Lepidoptera	265	35.3	10	1.3	53	7.1	15	2.0	78	10.4
Hymenoptera	94	12.5	3	0.4	13	1.7	1	0.1	17	2.3
Orthoptera	88	11.7	4	0.5	8	1.1	1	0.1	13	1.7
Coleoptera	66	8.8	3	0.4	13	1.7	3	0.4	19	2.5
Hemiptera	33	4.4			2	0.3			2	0.3
Polydesmida	14	1.9			1	0.1	1	0.1	2	0.3
Homoptera	11	1.5	1	0.1	2	0.3			3	0.4
Otros	40	5.3	2	0.3	4	0.5			6	0.8
Totales	611	81.4	23	3.1	96	12.8	21	2.8	140	18.6

*Porcentaje del total de muestras estudiadas.

CUADRO 3

Actividad antimalárica (mg/mL) in vitro de extractos de artrópodos de acuerdo con el orden y tipo de extracto

Orden	Total	Alcohólico				Hexánico o diclorometánico			
		0.1 a 5 *		5.1 a 50 *		0.1 a 5 *		5.1 a 50 *	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Lepidoptera	343	2	0.6	23	6.7	6	1.7	62	18.1
Hymenoptera	111	1	0.9	3	2.7	1	0.9	13	11.7
Orthoptera	101	0	0	6	5.9	3	3.0	6	5.9
Coleoptera	86	0	0	6	7.0	0	0	16	18.6
Hemiptera	35	0	0	0	0	0	0	2	5.7
Polydesmida	16	0	0	1	6.3	0	0	2	12.5
Homoptera	14	0	0	1	7.1	0	0	2	14.3
Otros	46	1	2.2	2	4.3	1	2.2	4	8.7
Total	751	4	0.5	42	5.6	11	1.5	107	14.2

* mg/mL mínimo con actividad antimalárica.

observan en Lepidoptera y Coleoptera, ya que la extracción hexánica o diclorometánica arrojó resultados más altos de positividad.

Los cuadros 4 y 5 representan los porcentajes de muestras con alguna actividad (en general) de acuerdo con los materiales estudiados en los diferentes órdenes a saber: formas adultas, estadios inmaduros (larvas, pupas) y algunos productos (heces fundamentalmente). En ambos tipos de extracción se observa que el número mayor de muestras positivas del Orden Lepidoptera fueron estadios inmaduros, 19% para los extractos alcohólicos, 32.2% para los hexánicos. Siguieron los productos (heces) con 17.6% y 18.7% respectivamente y finalmente las muestras de los adultos con 7.9% y 31% de positividad. En los otros órdenes no existió un patrón tan definido.

Al analizar las familias del orden Lepidoptera, se encontró un mayor número de extractos positivos como se muestra en el cuadro 6. El mayor número de extractos positivos se encontró en la familia Saturniidae. Además se observó que un mayor número de extractos

provenientes de heces y estadios larvales y prepupales activas, eran positivos, independientemente de la familia estudiada.

En el cuadro 7 se indican las plantas hospederos de las larvas de Lepidoptera (mariposas) cuyos extractos presentaron alguna actividad antimalárica importante. En este caso se encuentra un gran variedad de familias de plantas asociadas con los insectos en estudio.

Finalmente la relación entre las familias de plantas de hospederos y los materiales provenientes de las mariposas encontrados positivos se establecen en el cuadro 8. De nuevo son los estados inmaduros los que predominan en su relación con casi todas las plantas, siguiéndole las heces de estas larvas. Adultos y pupas estuvieron relacionadas con muy pocas familias.

DISCUSIÓN

El estudio completo del que se originó este trabajo tenía como principal objetivo

CUADRO 4

Acción antimalárica in vitro de extractos alcohólicos de artrópodos de acuerdo con el orden y el material examinado

Orden	Adultos		Estadios inmaduros*			Productos**			Total			
	Total	Positivas	Total	Positivas	Total	Positivas	Total	Positivas	N°	%		
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%			
Lepidoptera	63	5	7.9	142	27	19	85	15	17.6	290	47	16.2
Hymenoptera	46	10	21.7							92	10	10.9
Orthoptera	86	7	8.1	10	1	10				96	8	8.3
Coleoptera	56	10	17.9	20	2	10				76	12	15.8
Hemiptera	29	1	3.4							34	1	2.9
Polydesmida	16	3	18.8							16	3	18.8
Homoptera	12	1	8.3							14	1	7.1
Blattodea	13	4	30.8							13	4	30.8
Otros	29	2	6.9							29	2	6.9
TOTAL	350	43	12.3	172	30	17.4	85	15	17.6	660	88	13.3

* Larvas, ninfas.

** Heces.

CUADRO 5
Acción antimalárica in vitro de extractos hexánicos de artrópodos de acuerdo con el orden y la procedencia del material examinado

Orden	Adultos			Estadios inmaduros*			Productos**			Totales		
	Total	Positivas		Total	Positivas		Total	Positivas		Total	Positivas	
		N°	%		N°	%		N°	%		N°	%
Lepidoptera	65	2	3.1	171	55	32.2	107	20	18.7	343	77	22.4
Hymenoptera	47	10	21.3	38	4	10.5	26	3	11.5	111	17	15.3
Orthoptera	90	12	13.3	11	1	9.1				101	13	12.9
Coleoptera	69	17	24.6	16	2	12.5				85	19	22.4
Hemiptera	30	1	3.3	5	1	20				35	2	5.7
Polydesmida	16	2	12.5							16	2	12.5
Homoptera	12	1	8.3							12	1	8.3
Otros	43	6	14.0	1	1	100				44	7	15.9
TOTAL	372	51	13.7	242	64	26.4	133	23	17.3	747	138	18.5

* Larvas, ninfas.

** Heces.

CUADRO 6
Extractos de diferentes materiales provenientes de las familias del orden Lepidoptera con actividad antimalárica

Familia	Tipo de material			Total
	Heces	Estadios		
		inmaduros*	avanzados**	
Saturniidae	7***	22	1	30
Doidae		3		3
Hesperiidae			2	2
Notodontidae	1	3		4
Nymphalidae		4	3	7
Riodinidae	2	1		3
Pyalidae	1	1		2
Papilionidae		1		1
Sphingidae		3	1	4
Pieridae		2		2
Limacodidae	1	1		2
TOTAL	12	41	7	60

*Larvas y prepupas.

**Pupas y adultos.

*** % del total de nuestras de Lepidoptera positivas (60).

CUADRO 7
 Relación entre extractos de *Lepidoptera* con actividad antimalárica y las plantas de las cuales se alimentan las formas larvales

Familia	Planta	Familia	Artrópodo	# muestras activas
	Género/especie		Género relacionados con la planta	
Urticaceae	<i>Urera longipes</i>	Saturniidae	<i>Automeris postalbida</i>	2
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia schleshtendaii</i>	Doidae	<i>Doa</i>	3
	<i>Phyllanthus anisolobus</i>	Notodontidae	N.I *	1
Malvaceae	<i>Hampea appendiculata</i>	Saturniidae	<i>Hylesia</i>	1
Cannaceae	<i>Canna</i>	Hesperiidae	<i>Colpodes ethidus</i>	2
Caprifoliaceae	<i>Viburnum costarricanum</i>	Saturniidae	<i>Rothschildia triloba</i>	1
Crisobolanaceae	N.I *	Saturniidae	<i>Automeris postalbida</i>	1
Asteraceae	<i>Liabum bougeani</i>	Nymphalidae	<i>Actinotes teucomelas</i>	1
	<i>Lasiantha fruticosa</i>	Nymphalidae	<i>Eucides procula</i>	0
Fabaceae	<i>Albisia pamanea</i>	Saturniidae	<i>Syssphinx colla</i>	2
	<i>Cassia samanea</i>	Pieridae	<i>Euremia xanthochlora</i>	2
Fabaceae		Saturniidae	<i>Lonomia</i>	1
Lauraceae	<i>Persea americana</i>	Saturniidae	<i>Copaxa moemeri</i>	3
Ulmaceae	<i>Trema micrantha</i>	Saturniidae	<i>Hylesia</i>	1
Anacardiaceae	<i>Tapirira mexicana</i>	Riodinidae		1
	<i>Spondias mombin</i>	Limacodidae	<i>Acharia ophelians</i>	2
Rosaceae	<i>Prunus annularia</i>	Nymphalidae	<i>Opsiphanes cassina</i>	2
		Saturniidae	<i>Hylesia</i>	2
		Notodontidae		1
Solanaceae	<i>Solanum</i>	Nymphalidae	N.I *	2
Fagaceae	<i>Quercus oleoides</i>	Saturniidae	<i>Hylesia</i>	1
		Notodontidae		1
Rubiaceae		Sphingidae	<i>Xylophanes juomila</i>	4
Myrtaceae		Riodinidae		1
	<i>Heliocarpus appendiculatus</i>	Saturniidae	<i>Hylesia</i>	3
	<i>Psidium guayaba</i>	Saturniidae	<i>Hylesia</i>	1
Acanthaceae	<i>Aphelandra scabra</i>	Saturniidae	<i>Rothschildia triloba</i>	1
TOTAL				43

N.I* no identificado.

CUADRO 8

Extractos de diferentes materiales provenientes del orden Lepidoptera activos contra P. berghei de acuerdo con la familia de planta hospedero

Familia de Planta	Tipo de material			Total
	Heces de larvas	Estadios inmaduros*	avanzados**	
Urticaceae	1	1		2
Euphorbiaceae	1	3		4
Malvaceae		1		1
Flacourtiaceae	1	2		3
Cannaceae		2		2
Caprifoliaceae		1		1
Crisobalanaceae		1		1
Asteraceae		1	1	1
Fabaceae	1	3	1	4
Lauraceae		3		3
Ulmaceae		1		1
Anacardiaceae	1	2		3
Rosaceae	1	3	1	4
Rutaceae		1		1
Solanaceae		1	1	1
Rubiaceae		3	1	3
Mirtaceae	2	3		5
Fagaceae	1	1		2
Acanthaceae		1		1
TOTAL	9	34	5	48

* Larvas y prepupas. ** Pupas y adultos.

determinar la presencia de productos activos contra la malaria y otros organismos en un buen número de géneros y especies de artrópodos (Sittenfeld *et al.* 1999, Nielsen *et al.* 2004).

Sin embargo al analizar los resultados se notó una tendencia interesante en el sentido de que el hallazgo de actividad antimalárica encontrada en el artrópodo no era quizá lo más importante. Más bien, la acción clave está en el papel de esos organismos como herramienta de concentración de los productos provenientes de las plantas que ingieren y digieren.

En el cuadro 1 se muestra que los porcentajes más altos de positividad se encontraron en Lepidoptera (24.1%), Coleoptera (32.8%), Hemiptera (38.5%) y Polydesmida (81.3%). Adultos y formas inmaduras de todos estos órdenes basan su alimentación en plantas superiores (Diniz *et al.* 2002) o inferiores (Venkatesha 2005) muchas de las cuales se han relacionado con alguna acción contra organismos infecciosos (Antony *et al.* 2005) e inclusive propiamente contra malaria (Véanse referencias en cuadro 9).

CUADRO 9

Familia y géneros de plantas con actividad antimalárica reportadas en diferentes países, similares a las determinadas en este estudio (Cuadro 7 y 8)

Familia	Género	País	Referencia
Rosaceae	<i>Prunus</i>	Mozambique	Leigh 2000
Malvaceae	<i>Gossypium</i>	Brazil	Hashimoto 2002
	<i>Sida</i>	Burkina Fazo	Karou et al. 2003
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus</i>	India	Usha Devi et al. 2000
	<i>Phyllanthus</i>	Congo	Tona et al. 2001, 2004
	<i>Flueggea</i>	Cambodia	Hout et al. 2006
Anacardiaceae	<i>Anisotes</i>	Yemen	Alí et al. 2004
	<i>Andrographis - Ruellia</i>	Cambodia	Hout et al. 2006
Rutaceae	<i>Citrus</i>	Cambodia	Hout et al. 2006
	<i>Ruta</i>		
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>	Cambodia	Hout et al. 2006
	<i>Eucalyptus</i>	Venezuela	Caraballo et al. 2004
	<i>Pridium</i>	África del Sur	Nundkumar Ojewole 2002
Asteraceae	<i>Pulicaria</i>	Venezuela	Caraballo et al. 2004
	<i>Bideus</i>	Brazil	Brandao et al. 1999
	<i>Pluchea - Vernonia</i>	Cambodia	Hout et al. 2006
	<i>Nuerolaena</i>	Guatemala	Franssen et al. 1997
Solanaceae	<i>Solanum</i>	Colombia	Alvarez et al. 2004
	<i>Solanum</i>	Venezuela	Caraballo et al. 2004
	<i>Enantia</i>	Nigeria	Agbaje et al. 1991
	<i>Hydrangea</i>	Japón	Ishih et al. 2001
Fabaceae	<i>Cassia</i>	Congo	Tona et al. 2001
	<i>Pterocarpus</i>	Burkina Faso	Karou et al. 2003
Urticaceae	<i>Urera</i>	Brazil	Mc Keon 2002
	<i>Urera</i>	Costa Rica	Zamora et al. 2001
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia</i>	Congo	Tona et al. 1999
	<i>Croton</i>	Guatemala	Franssen et al. 1997
Caprifoliaceae	<i>Viburnum</i>	U.S.A	Felter & Lloyd 2006
Anacardiaceae	<i>Spondias</i>	Venezuela	Caraballo et al. 2004
	<i>Spondias</i>	Cambodia	Hout et al. 2006
Rubiaceae	<i>Nauclea</i>	Francia	Benoit-Vical et al. 1998
	<i>Sarcocephalus</i>	Cambodia	Hout et al. 2006
	<i>Hymenocryton</i>		
Rutaceae	<i>Esenbeckia</i>	Brazil	Carvalho & Krettli, 1991
Lauraceae	<i>Nectandra - Licaria</i>	Bolivia	Deharo et al. 2001

Se encontró que los extractos hexánicos o diclorometánicos presentaron mayor actividad antimalárica que los alcohólicos (cuadros 2 y 3) lo cual concuerda con los hallazgos de otros investigadores (Gómez y Witte 2001, Nielsen 2004), probablemente porque un mayor número de componentes químicos activos contra malaria tales como derivados de ácidos grasos y terpenoides se encuentran en los de extractos hexánicos (Murphy 1999, Nielsen 2004) y no en los alcohólicos. Dentro de los extractos de Lepidoptera en que se encontró mayor actividad antimalárica (cuadro 3), se observan aquellos provenientes de estadios inmaduros, fundamentalmente larvas y heces de estas larvas, tal y como se demuestra en los cuadros 4, 5 y 6. Esto se explica porque los estadios larvales son los que se alimentan directamente de hojas de las plantas y entonces la concentración de estos materiales por el insecto serían probablemente los responsables de esta actividad antimalárica (Referencias en cuadro 9); las heces son el producto de la digestión de esas hojas.

Llama la atención la positividad encontrada en los adultos del orden Polydesmida, familia Rhacodesmidae y del orden Opiliones. Los organismos del primer orden, los llamados milpiés, se alimentan de hojas secas o descompuestas de muchas plantas inclusive de la familia Meliaceae, (Cárcamo *et al.* 2000), la cual presenta algunos géneros con actividad antimalárica (Chinchilla *et al.* 1996). Además varias especies de este orden secretan sustancias de defensa (Cárcamo *et al.* 2000) cuya composición química podría ser la causante del efecto indicado. En cuanto a las especies del orden Opiliones, se ha encontrado que estos organismos se alimentan de varias especies de artrópodos dentro de los que se incluye larvas y adultos de lepidópteros, coleópteros y hemípteros fitófagos (Lawrence 1981, Santos *et al.* 2002), por lo cual estos podrían ser la fuente indirecta de productos activos provenientes de plantas. También sabemos que estos organismos producen sustancias de defensa dentro de las que se incluyen alcoholes, cetonas y quinonas (Kerzicnik 2001). Estos datos permiten orientar el trabajo hacia las plantas, de

las que se nutren las formas inmaduras de las mariposas, además de la posibilidad de que las sustancias de defensa de los hospederos sean las causantes del efecto antimalárico. La positividad encontrada para extractos de adultos de Blattodea y Coleoptera (Cuadro 1) y su relación con plantas puede explicarse de la siguiente manera. Las especies de la primera familia (las cucarachas) son omnívoras y dentro de lo que ingieren están materiales provenientes de troncos y hongos en descomposición, lo que de nuevo indicaría que es en las plantas en donde existen compuestos con el efecto estudiado. En cuanto a los abejones (orden Coleoptera) una gran mayoría se alimentan de plantas de las cuales absorben su savia. Específicamente en el Orden Lepidoptera se determinó la relación de sus familias y géneros con diversas familias y especies de plantas hospedero (Cuadro 7) las cuales se relacionan también en mayor grado con larvas y heces de las mariposas (Cuadro 6). El hecho de que la acción antimalárica de estos extractos pueda deberse a la relación alimentaria de los insectos con las plantas hospedero se evidencia en el cuadro 9 en donde se relacionan algunas de esas familias, e inclusive géneros de las mismas, con actividad antimalárica (Referencias en cuadro 9).

Además, en los informes antes mencionados se indica que la actividad antimalárica fue encontrada en extractos de hojas de las familias Malvaceae, Acanthaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Solanaceae, Fabaceae, Urticaceae y Anacardiaceae. En el caso de las familias Euphorbiaceae y Asteraceae la actividad fue encontrada en toda la planta incluyendo las hojas. Éstas son precisamente el alimento de las formas larvales de Lepidoptera.

De esta manera se llega en forma indirecta a descubrir a través de los artrópodos estudiados, familias, géneros y aún especies de plantas con actividad antimalárica. Queda por determinar si los insectos son simples encargados de concentrar los productos activos antimaláricos, si además metabólicamente pueden transformar los componentes químicos de la planta para dar un producto antimalárico, o en última instancia, ocurren ambos fenómenos, dependiendo de las

familias de insectos y de la planta hospedero. En algunas familias de plantas (Cannaceae, Flacourtiaceae, Crisobalanaceae, Lauraceae, Fagaceae, Ulmaceae) a las que llegamos a través de su relación con las larvas de Lepidoptera (Cuadro 7 y 8), no encontramos referencia de actividad antimalárica. En estas plantas debemos enfocar también las investigaciones pues la confirmación de esta actividad podría presentar un nuevo aporte al conocimiento de los productos naturales efectivos contra *Plasmodium*. Además, merecen un estudio más detallado las sustancias de defensa producidas por las especies de los órdenes Polydesmida y Opiliones. Estudios para dilucidar estos aspectos se están iniciando.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias al apoyo económico del Nacional Institute of Health (Fogarty Internacional Center), proyecto N° 5U01TW/CA00312 y de la Vicerectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, proyecto N° 801-96-582.

Toda la actividad secretarial y ordenamiento de los resultados del trabajo fue realizado en el Departamento de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED).

RESUMEN

Extractos alcohólicos, hexánicos y diclorometánicos de 751 muestras de artrópodos fueron estudiados por la presencia de actividad antimalárica. En este trabajo se empleó un modelo murino usando el *Plasmodium berghei*, modelo que es biológicamente similar a la malaria humana. El estudio fue realizado determinando el efecto del extracto sobre el parásito por la inclusión o no del colorante azul de cresil brillante. Estimando como positivos aquellos extractos cuya actividad antimalárica se mostró en concentraciones no mayores de 50 mg, se encontró que los órdenes más promisorios fueron Lepidoptera (24.1%), Polydesmida (81.3%), Blattodea (25%) y Opiliones, entre otros. Las formas inmaduras de Lepidoptera fueron las más positivas, por lo que se analizaron las plantas hospederos de donde se alimentaban dichos organismos. Las familias de estas plantas eran Malvaceae, Acanthaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Solanaceae, Fabaceae, Urticaceae,

Anacardiaceae, Rosaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Lauraceae y Caprifoliaceae. Especies de casi todas estas familias han sido reportadas con actividad antimalárica. En el caso de los órdenes Polydesmida, Opiliones y Blattodea, cuyas formas adultas presentaron alguna actividad contra *P. berghei*, encontramos que todos esos grupos se alimentan también de plantas. En el caso de Opiliones sus especies son predadores de lepidópteros, coleópteros, hemípteros fitófagos y otros artrópodos, además de que producen sustancias de defensas tales como alcoholes, cetonas y quinonas, entre otros, todo lo cual podría explicar la actividad encontrada. Algunas especies del Orden Polydesmida, también secretan ciertas sustancias químicas, las cuales podrían tener un efecto antiparasitario. Así, a través de este trabajo en artrópodos hemos llegado a identificar fuentes vegetales potenciales para componentes antimaláricos.

Palabras claves: malaria, extractos de artrópodos, actividad antimalárica, tratamiento.

REFERENCIAS

- Adjobimey, T., I. Edayé, L. Lagnika, J. Gbenou, M. Moudachirou & A. Sanni. 2004. Activités antiplasmodiales in vitro de quelques plantes antipaludiques de pharmacopée béninoise. C.R. Chimie 7: 1023-1027.
- Agbaje, E.O. & A.O. Onabanjo. 1991. The effects of extracts of *Enantia chlorantha* in malaria. Ann. Trop. Med. Parasitol. 85: 585-590.
- Alvarez, G., A. Pabon, J. Carmona & S. Blair. 2004. Evaluation of clastogenic potencial of the antimalarial plant *Solanum nudum*. Entrez. Pub. Med. 18: 845-848.
- Ali, A.A.N., K. Al-Rahwi & U. Lindequist. 2004. Some medical plants used in Yemen herbal medicine to treat malaria. Afr. J. Trad. CAM. 1: 72-76.
- Anthony, J.P., L. Fyfe & H. Smith. 2005. Plant active components -a resource for antiparasitic agents? Trends. Parasitol. 21: 462-468.
- Basso, L.A., L.H. Pereira da Silva, A.G. Fett-NW, F. de Azevedo, I. Moreira, M.S. Palma, S.A. Filho, R.R. dos Santos, M.B. Soare & D.S. Santos. 2005. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100: 575-606.
- Benoit-Vical, F., A. Valentin, V. Cournac, Y. Pélissier, M. Mallié & J.M. Bastide. 1998. In vitro antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* S.M. (Rubiaceae). J. Ethnopharm. 61: 173-188.

- Bioland, P.B. 2001. Disease incidence and trends. *En* Boland. P.B. Drug resistance in malaria. WHO/CDS/CSRIDRS/2001. World Health Organization. No 20012-11. Ginebra, Suiza.
- Bodeker, G. 2000. Searching for antimalarials in plants. *J. Alternat. Complement. Med.* 6: 127-129.
- Brandão, M.G.L., A.U. Krettli, L.S.R. Soares, C.G.C. Nery & H.C. Marinuzzi. 1999. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *J. Ethnopharm.* 57: 131-138.
- Caraballo, A., B. Caraballo & A. Rodríguez-Acosta. 2004. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. *Rev. Sociedade Brasileira Med. Trop.* 37: 186-188.
- Cárcamo, H.A., T.A. Abe, C.E. Prescott, F.B. Holl & C.P. Chanway. 2000. Influence of millipedes on litter decomposition, N mineralization, and microbial communities in a coastal forest in British Columbia, Canada. *Can. J. For. Res.* 30: 817-826.
- Carter, R. & C.L.C. Diggs. 1977. Rodent malaria parasites as models for human malaria. *En* Kreier (ed.). *Parasitic Protozoa*. Academic, Nueva York, EEUU.
- Carvalho, L.H. & A.U. Krettli. 1991. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86: 181-184.
- Castro, O., M. Barrios, M. Chinchilla & O. Guerrero. 1996. Evaluación química y biológica del efecto de extractos de plantas contra *Plasmodium berghei*. *Rev. Biol. Trop.* 44: 361-367.
- Chinchilla, M., O.M. Guerrero, G. Abarca, M. Barrios & O. Castro. 1998. An in vivo model to study the antimalarial capacity of plant extracts. *Rev. Biol. Trop.* 46: 35-39.
- Chinchilla, M., O.M. Guerrero, G. Tamayo & A. Sittenfeld. 2001. Empleo de técnicas y materiales biológicos en la búsqueda de productos activos contra la malaria. *Información Tecnológica* 12: 187-192.
- Deharo, E., G. Bourdy, C. Quenevo, V. Muñoz, G. Ruiz & M. Sauvain. 2001. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J. Ethnopharm.* 77: 91-98.
- Diniz, I.R. & H.C. Morais. 2002. Local pattern of host plant utilization by lepidopteran larvae in the cerrado vegetation. *Entomotropica* 17: 115-119.
- Franssen, F.F.J., L.J.J.W. Smeijsters, I. Berger & B.E.M. Aldana. 1997. In vivo and in vitro antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1500-1503.
- Gómez, N. & L. Witte. 2001. A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. *J. Chem. Ecol.* 27: 2351-2359.
- Hastings, L.M. 2004. The origins of antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.* 20: 512-518.
- Hout, S., A. Chea, S. Bun, R. Elias, M. Gasquet, P. Tomion-David, G. Balansard & N. Azas. 2006. Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity. *J. Ethnopharm.* 107: 12-18.
- Hyde, J.E. 2005. Drug-resistant malaria. *Trends Parasitol.* 21: 495-498.
- Ishih, A., C. Ikeya, M. Yanoh, H. Takezoe, T. Miyase & M. Terada. 2001. A potent antimalarial activity of *Hydrangea macrophylla* var. *Otaksa* leaf extract against *Plasmodium yoelii* 17XL in mice. *Parasitol. Int.* 50: 33-39.
- Karou, D., M.H. Dicko, S. Sanon, J. Simporé & A.S. Traore. 2003. Antimalarial activity of *Sida acuta* Burm. F. (Malvaceae) and *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *J. Ethnopharm.* 89: 291-294.
- Kvist, L.P., S.B. Christensen, H.B. Rasmussen, K. Mejia & A. Gonzalez. 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J. Ethnopharm.* 106: 390-492.
- Lawrence, R.F. 1981. South African harvest spiders. *Naturalist* 25: 13-27.
- Leigh, E. 2000. Pygeum (*Prunus africana*). Protecting a powerful prostate remedy. *ASNAPP* 1: 1-3.
- Marquiño, W., J.R. Macarthur, L.M. Barat, F.E. Oblitas, M. Arrunátegui, G. Garavito, M.L. Chafloque, B. Pardavé, S. Gutiérrez, N. Arróspide, C. Carrillo, C. Cabezas & T. K. Ruebush. 2003. Efficacy of Chloroquine sulfadoxine-pyrimethamine, and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria on the north coast of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68: 120-123.

- McKeon, B. 1995. A Ribereno's Medical Garden. J. Am. Bot. Council. 33: 38.
- Murphy, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12: 564-582.
- Nielsen, V., P. Hurtado, D.H. Janzel, G. Tamayo & A. Sittenfeld. 2004. Recolecta de artrópodos para prospección de la biodiversidad en el Área de Conservación Guanacaste, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 52: 119-132.
- Nundkumar, N. & J.A.O. Ojewole. 2002. Studies on the antiplasmodial properties of some south African medical plants used as antimalarial remedies in zulu folk medicine. Methods Findings 24: 397-401.
- Nzila, A., S.A. Ward, K. Marsh, P.F. Sims & J.E. Hyde. 2005a. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. Trends Parasitol. 21: 292-298.
- Nzila, A., S.A. Ward, K. Marsh, P.F. Sims & J.E. Hyde. 2005b. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargeted or specific to *Plasmodium*. Trends Parasitol. 21: 334-339.
- Rosenthal, L.P.L. 1998. Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. Emerging Infect. Dis. 4: 49-57.
- Santos, F.H. & P. Gnaspini. 2002. Notes on the foraging behavior of the Brazilian cave harvestman *Goniosoma spelaenum* (Opiliones, Gonyleptidae). J. Arachnol. 30: 177-180.
- Sittenfeld, A., G. Tamayo, V. Nielsen, A. Jiménez, P. Hurtado, M. Chinchilla, O. Guerrero, M.A. Mora, M. Rojas, R. Blanco, E. Alvarado, J.M. Gutiérrez & D.H. Janzen. 1999. Costa Rican International cooperative biodiversity group: Using insects and other arthropods in biodiversity prospecting. Pharmaceut. Biol. 37 (Supp.): 55-68.
- Tona, L., K. Mesia, N.P. Ngimbi, B. Chrimwami, A. Okond, K. Cimanga, T. de Bruyne, S. Apes, N. Hermans, J. Totte, L. Pieters & A.J. Vlietinck. 2001. *In vivo* antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus niruri*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 95: 47-57. (También disponible en línea, <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=A>)
- Tona, L., N.P. Ngimbi, M. Tsakala, K. Mesia, K. Cimanga, S. Apes, T. De Bruyne, L. Pieters, J. Totte & A.J. Vlietinck. 1999. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. J. Ethnopharm. 68: 193-203.
- Tona, L., R.K. Cimanga, K. Mesia, C.T. Musuamba, T. De Bruyne, S. Apes, N. Hernans, S. Van Miert, L. Pieters, J. Totté & A.J. Vlietinck. 2004. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. J. Ethnopharm. 93: 27-32.
- Usha, D., N. Valecha, P.K. Atul & C.P. Pillai. 2001. Antiplasmodial effect of three medicinal plants: A preliminary study. Curr. Sc. 80: 917-919.
- Venkatesha, M.G. 2005. Why is homopterophagous butterfly, *Spalgis epius* (Westwood) (Lepidoptera: Lycaenidae) amyrmecophilous?. Curr. Sc. 89: 245-246.
- Vargas, M. 2001. Diagnóstico situacional de la malaria y el uso del DDT en Costa Rica. OPS/OMS, Lara Segura & Asoc., Costa Rica.
- WHO. 2000. Severe falciparum malaria. (Severe and complicated malaria third edition) Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 94 (Supp. 1): 90.

REFERENCIAS DE INTERNET

- Felter, H.W & J.U. Lloyd. 2006. Viburnum prunifolium (U.S.P.)-Black Haw. Kings American Dispensatory. Henriette's Hebal Homepage. (Consultado 19 octubre 2007, <http://www.henriettesherbal.com/eclectic/kings/viburnum-prum.html>).
- Hashimoto, G. 2002. Data base-Brazilian Plants. (Consultado 19 octubre 2007, Info_e@brazilian-plants.com. <http://www.brazilian-plants.com/en/database.cfm>).
- Janse, C. & A. Waters. 2006. The Plasmodium berghei research model of malaria. Leiden University Medical Center. (Consultado 19 octubre 2007, <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model.html>).
- Kerzicnik, F. 2001. Defenses of harvestmen (Arachnida: Opiliones): The reasons behind their survival success. Dept. Bioag. Sci. Pest Manag. (Consultado 19 octubre 2007, http://www.colostate.edu/Depts/Euntomology/courses/en507/papers_2001/Kerzicnik.html).
- Zamora, N. 2001. Inflorescencia de *Urera baccifera*. INBio (Consultado 19 octubre 2007. <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WedAll&-Format=ubi/detail.html&-Op=bw&id=1470&>).