

Actividad Antiplasmódica *In Vitro* e Inhibición de la Formación de la β -Hematina de Plantas Colombianas de la Familia Annonaceae.

Edison OSORIO ¹, Gabriel ARANGO ^{1*}, Edison GARCÍA ¹, Katalina MUÑOZ ¹, Grace RUIZ ²,
David GUTIÉRREZ ², Marco Antonio PACO ² & Alberto GIMÉNEZ ²

¹ Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB). Sede de Investigación Universitaria SIU.
Universidad de Antioquia. Calle 62 No. 52-59, Torre II, Lab 229. Medellín-Colombia.

² Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas,
Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224, La Paz-Bolivia.

RESUMEN. Se evaluó la actividad antiplasmódica *in vitro* de 36 extractos provenientes de especies de la familia Annonaceae sobre las cepas de *Plasmodium falciparum* F32 sensible y W2 resistente a la cloroquina. Igualmente fue evaluada la capacidad de inhibición de la formación de la β -hematina (If β -h) comparando ambas actividades por medio de un estudio de correlación estadístico. Cuatro extractos presentaron una potente actividad contra la cepa F32, y solamente tres mostraron actividad contra la cepa W2, siendo el extracto de hexano de tallos de *Rollinia exsucca* el más activo en el estudio con una CI₅₀ de 3.0 y 4.8 μ g/ml sobre las cepas F32 y W2, respectivamente. Solamente el extracto de acetato de etilo de hojas de *Desmopsis panamensis* mostró actividad If β -h e inhibición del crecimiento de ambas cepas del parásito en cultivo, mientras que el extracto de acetato de etilo de tallos de *Rollinia pittieri* presentó actividad If β -h e inhibición del crecimiento de la cepa F32. Fue observada una baja correlación entre ambas actividades.

SUMMARY. "In Vitro Antiplasmodial Activity and Inhibition of β -Hematin Formation of Colombian Plants of the Family Annonaceae". The antiplasmodial activity of 36 plant extracts related to the Annonaceae family was tested on chloroquine sensitive strain F32 and chloroquine resistant strain W2 of *Plasmodium falciparum*. The capacity of inhibition of β -hematin formation (If β -h) was also evaluated comparing both activities by means of a statistical correlation study. Four extracts presented a potent activity against F32 and three only showed activity against W2, being the hexane stem bark extract of *Rollinia exsucca* the most active with CI50 values of 3.0 and 4.8 μ g/ml against F32 and W2, respectively. Only the ethyl acetate leaves extract of *Desmopsis panamensis* showed If β -h activity and growth inhibition of both strain, while the ethyl acetate stem bark extract of *Rollinia pittieri* presents If β -h activity and growth inhibition of F32. A low correlation was observed among both activities.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium*. Según cálculos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente ocurren entre 300 a 500 millones de casos clínicos de la enfermedad, de los cuales 1,5 a 2,7 millones son mortales, además 2.400 millones de personas viven en regiones de alto riesgo para su transmisión, lo que hace de esta enfermedad la principal causa de morbilidad y mortalidad en 90 países ubicados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, especialmente en la región al sur del Sahara en África, el sudeste de Asia y Latinoamérica ¹.

El tratamiento de la malaria se ha realizado con diversos medicamentos que actúan sobre estadios eritrocíticos del parásito, entre los que se encuentran la quinina, un alcaloide aislado a

partir de especies del género *Cinchona* (Rubiaceae) nativo de Sudamérica y otros derivados sintéticos desarrollados posteriormente que han mostrado ser más efectivos, menos tóxicos y de bajo costo ². El desarrollo de resistencia de *P. falciparum* a los medicamentos disponibles forzó la investigación de nuevos compuestos con actividad antiplasmódica y permitió el descubrimiento de la mefloquina y la cloroquina, esta última aún se utiliza en algunas regiones de África y Sudamérica. El descubrimiento reciente más importante es la artemisinina, una sesquiterpenolactona con un puente endoperóxido obtenida de *Artemisia annua* (Asteraceae) y el desarrollo de sus derivados, el artemeter y el artesunato, los cuales son medicamentos de rápida acción y efectivos contra cepas de *P. falciparum* resistentes a múltiples medicamentos ³. Sin embargo, la actividad de la artemisinina y sus

PALABRAS CLAVE: Actividad antiplasmódica, Annonaceae, β -hematina.

KEY WORDS: Annonaceae, Antiplasmodial activity, β -hematin.

* Autor a quien se debe de dirigir la correspondencia: E-mail: gjarango@quimbaya.udea.edu.co.

derivados se ve afectada por su baja solubilidad y pobre biodisponibilidad. Además, aunque los derivados presentan una mejor absorción, rápida acción y mayor efectividad contra *P. falciparum* multirresistente, presentan citotoxicidad y efectos adversos importantes ^{4,5}.

No obstante, el tratamiento de la malaria continúa como uno de los mayores retos para los programas de control, debido al fenómeno de resistencia del parásito contra los medicamentos. Esta resistencia se debe a la capacidad del parásito para mutar genes específicos ⁶, a la alta frecuencia de recombinación génica que da origen a poblaciones de parásitos con nuevos determinantes antigénicos y con modificaciones en los sitios blanco para la acción de medicamentos ⁷, a los sistemas de transporte activo específicos para compuestos antimaláricos y a las prácticas clínicas inadecuadas como el uso de antimaláricos profilácticos, tratamientos inconclusos o con dosis sub-terapéuticas ⁸. La mefloquina se utilizó por más de 10 años, pero se registró resistencia en el sudeste de Asia con resistencia cruzada a quinina y con efectos tóxicos considerables. Igualmente durante muchos años la cloroquina fue el tratamiento de elección para la malaria, pero en 1957 se reportaron los primeros casos de resistencia en Sudamérica y desde entonces el fenómeno se expandió a toda América, África y Asia. En algunas regiones se ha informado de resistencia a todos los antimaláricos disponibles con excepción de los derivados de la artemisinina, los cuales aún se reservan para los casos de malaria que no responden a los demás medicamentos ⁸. Esta resistencia a los medicamentos actualmente disponibles ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevos compuestos antimaláricos que permitan mejorar el control de la enfermedad.

El estudio sobre la medicina tradicional como fuente que conduce al descubrimiento de nuevos agentes antiparasitarios, ha encontrado que plantas de la familia Annonaceae han sido utilizadas por comunidades colombianas como antiparasitarias ^{9,10}. Algunas especies de esta gran familia, la cual comprende alrededor de 120 géneros y más de 2000 especies, presentan interesantes metabolitos con actividad biológica: polifenoles, aceites esenciales, terpenos, compuestos aromáticos ¹¹, siendo particularmente activos las acetogeninas ¹², moléculas con amplio espectro de acción anticancerígena ¹³, antiparasitaria ^{14,15} e insecticida ¹⁶ y los alcaloides de tipo bisbencilisoquinoleicos ^{17,18}, protoberberinas, oxoaporfinicos ^{19,20} y aporfinicos ²¹. En la investigación de nuevos agentes antimaláricos a

partir de plantas colombianas, fueron evaluados 36 extractos provenientes de 6 especies de la familia Annonaceae contra parásitos de *P. falciparum* resistentes y sensibles a cloroquina, igualmente, se evaluó la capacidad de inhibición de la formación de la β -hematina, sustancia sintética idéntica a la hemozoina (pigmento malárico). Una de las hipótesis mayormente aceptada es que la cloroquina y otros antimaláricos quinolínicos actúan inhibiendo la formación de la hemozoina, por lo tanto este proceso permanece como un blanco atractivo para la búsqueda de nuevos compuestos antimaláricos ²². Se muestra estadísticamente la correlación entre ambas actividades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos experimentales generales

El ensayo de inhibición de la formación de la β -hematina fue desarrollado por espectrofotometría ultravioleta-visible utilizando un equipo Spectronic[®] Genesys 2 y una centrífuga 5415 Eppendorf, Brinkmann. Los espectros IR se realizaron en un equipo Perkin-Elmer (FT-IR) utilizando un rango de barrido entre 4000 y 600 cm^{-1} . El pH se determinó con un pHmetro marca Schott handylab 1 pH2000 CII.

Químicos

Los solventes utilizados para la elaboración de los extractos son de grado reactivo suministrados por J.T. Baker. La hemina ($\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{ClFeN}_4\text{O}_4$) y el medicamento control difosfato de cloroquina (CQ) fueron adquiridos en Sigma Chemical Co, St Louis, Mo. Los reactivos hidróxido de sodio, ácido acético, acetato de sodio trihidratado, dimetilsulfóxido (DMSO) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co, St Louis, Mo.

Material vegetal y preparación de extractos

Las especies de la familia Annonaceae *Annona muricata*, *Desmopsis panamensis*, *Pseudomalmea boyacana*, *Rollinia exsucca*, *Rollinia pittieri* y *Xylopia aromática* fueron recolectadas en el corregimiento de Lomas Aisladas del Municipio de Turbo (Antioquia, Colombia) por el biólogo Fernando Alzate e identificado en el Herbario de La Universidad de Antioquia (Vouchers en Tabla 1). El material vegetal (tallos y hojas) fue secado a 40 °C en estufa con circulación de aire, pulverizado y extraído exhaustivamente por percolación con solventes orgánicos de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) hasta agotar el material, el solvente fue removido bajo presión reducida. Para el en-

sayo de inhibición de la formación de la β-hematina, los extractos en metanol fueron disueltos en una solución agua-etanol (30:70) y los de extractos en hexano y acetato de etilo en DMSO.

Actividad antiplasmódica in vitro

La actividad antiplasmódica se realizó por el método de cultivo continuo *in vitro* desarrollado en 1976 por Trager & Jensen ²³. De acuerdo con esta técnica las formas parasitarias de *P. falciparum* cepa F32 sensible a la cloroquina y W2 resistente a la cloroquina, fueron cultivadas en

medio RPMI 1640 suplementada con suero al 10% y un hematocrito del 4% (Grupo sanguíneo 0, Rh+) 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 ; 1.0 y 10.0 µg/ml). Los cultivos fueron sincronizados con una parasitemia y un hematocrito del 1 y 2% respectivamente, estos fueron alicuotados en un volumen de 100 µl en placas de 96 pozos por duplicado, además de 100 µl de los extractos, y finalmente fueron in-

Voucher	Nombre científico	Parte	Solvente	<i>P. falciparum</i> ^a		Ifβ-h (%) ^d
				F32 ^b	W2 ^c	
A1042	<i>Annona muricata</i>	Hojas	Hexano	7 ± 0.15	38 ± 1.69	3.31 ± 1.83
			EtOAc	8 ± 1.73	10 ± 0.22	91.23 ± 1.50
			MeOH	9 ± 1.77	36 ± 1.24	72.67 ± 1.75
		Tallos	Hexano	11 ± 2.74	38 ± 1.06	61.27 ± 3.87
			EtOAc	40 ± 4.37	34 ± 4.71	41.39 ± 2.47
			MeOH	32 ± 3.48	26 ± 4.7	23.78 ± 5.09
A1068	<i>Desmopsis panamensis</i>	Hojas	Hexano	29 ± 1.19	51 ± 1.97 (9.5±0.50)	39.51 ± 2.40
			EtOAc	62 ± 3.43 (5.7± 0.46)	71 ± 2.64 (5.0±0.61)	88.34 ± 0.64
			MeOH	21 ± 2.58	45 ± 1.72	79.33 ± 4.44
		Tallos	Hexano	17 ± 3.11	35 ± 4.95	50.59 ± 3.63
			EtOAc	18 ± 2.33	34 ± 4.20	66.00 ± 3.74
			MeOH	16 ± 2.40	2 ± 0.64	66.96 ± 3.88
A1039	<i>Pseudomalmea boyacana</i>	Hojas	Hexano	15 ± 0.96	23 ± 3.48	6.23 ± 5.87
			EtOAc	18 ± 3.50	33 ± 4.56	62.67 ± 5.09
			MeOH	49 ± 3.57	0 ± 0	64.67 ± 7.09
		Tallos	Hexano	41 ± 4.18	29 ± 4.46	35.00 ± 1.73
			EtOAc	51 ± 4.66 (8.0± 1.00)	25 ± 4.47	64.00 ± 0.54
			MeOH	20 ± 3.20	39 ± 3.35	33.43 ± 3.59
A1069	<i>Rollinia exsucca</i>	Hojas	Hexano	16 ± 2.26	35 ± 2.49	18,50 ± 2.99
			EtOAc	10 ± 0.83	22 ± 4.15	24,87 ± 4.20
			MeOH	13 ± 0.83	13 ± 3.43	22,99 ± 1.66
		Tallos	Hexano	79 ± 2.74 (3.0± 0.06)	74 ± 3.82 (4.8±0.15)	26,62 ± 3.83
			EtOAc	14 ± 4.11	14 ± 3.23	8,79 ± 1.03
			MeOH	21 ± 4.11	12 ± 0.49	93,61 ± 0.96
A1072	<i>Rollinia pittieri</i>	Hojas	Hexano	15 ± 0.96	39 ± 3.49	33,47 ± 0.96
			EtOAc	10 ± 1.64	11 ± 1.69	65,41 ± 6.25
			MeOH	18 ± 3.28	37 ± 3.81	64,61 ± 0.91
		Tallos	Hexano	10 ± 2-82	10 ± 0	86,94 ± 0.72
			EtOAc	54 ± 4.8 (8.6± 1.02)	41 ± 0.04	46,81 ± 1.53
			MeOH	18 ± 3.50	31 ± 4.19	53,68 ± 1.99
A1052	<i>Xylopia aromática</i>	Hojas	Hexano	12 ± 4.04	26 ± 3.24	68,04 ± 2.27
			EtOAc	27 ± 0.20	10 ± 0	49,53 ± 3.61
			MeOH	36 ± 3.08	34 ± 4.22	59,59 ± 2.34
		Tallos	Hexano	45 ± 4.82	30 ± 2.23	48,63 ± 1.77
			EtOAc	36 ± 0.07	39 ± 4.21	41,62 ± 3.30
			MeOH	16 ± 2.26	12 ± 4.22	

Tabla 1. Actividad antiplasmódica *in vitro* sobre *P. falciparum* (IC₅₀) y porcentaje de inhibición de la formación de β-hematina (promedio ± SD) de extractos de especies de la familia Annonaceae. ^a Actividad antiplasmódica, % de Inhibición a 10 µg/ml (CI₅₀, µg/ml). ^b F32, cepa de *P. falciparum* sensible a CQ. ^c W2, cepa de *P. falciparum* resistente a CQ. ^d Ifβ-h, porcentaje de inhibición de la formación de β-hematina.

cubados a 37 °C por 48 horas. Pasado este tiempo de incubación, se eliminó completamente la fase superior del cultivo, para realizar un frotis del sedimento de cada alveolo, fijando luego con metanol y realizando la tinción con Giemsa, estas placas fueron observadas en el microscopio, con lente de inmersión 100x, contando glóbulos rojo no infectados (GRL) y glóbulos rojos infectados (GRI), para obtener el % de Inhibición calculado mediante la fórmula [1]:

$$\%Inhibición = \left[\frac{GRL - GRI}{GRL} \right] * 100 \quad [1]$$

El cálculo para hallar la Concentración Inhibitoria del 50% en la maduración de los esquizontes (CI₅₀), se realizó por un método gráfico mediante el programa Cricket Graph 1.3, considerándose como activos aquellos que presentaron un IC₅₀ menor a 10 µg/ml.

Inhibición de la formación de la β-hematina

Para el ensayo de inhibición de la formación de la β-hematina se utilizó el método de Baelmans *et. al.*²⁴ con algunas modificaciones. En resumen, la síntesis de la β-hematina fue realizada con una mezcla de 100 µl de hemina 6,5 mM recién preparada disuelta en una solución de NaOH 0,2 N, 50 µl de ácido acético glacial 17,4 M, 50 µl de H₂O destilada y 200 µl de tampón acetato de sodio trihidratado 3 M, pH final aproximadamente 4,0, fue incubada por 1, h a 60 °C. Posteriormente fue centrifugada a 12000 rpm durante 10 min, luego de descartar el sobrenadante, el precipitado es lavado 3 veces con 200 µl de DMSO para remover la hemina no reaccionante. El sólido β-hematina obtenido fue disuelto en una solución de NaOH 0,1 N de la cual se toma una alícuota para la lectura espectrofotométrica a 386 nm y corresponde al 100% de β-hematina sintetizada. La formación de β-hematina se monitorea por espectroscopía IR-TF. Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos, los 50 µl de H₂O fueron reemplazados por una solución del extracto correspondiente a una concentración final de 2,5 mg/ml y con la lectura espectrofotométrica fue calculado el porcentaje de inhibición mediante la fórmula [2]:

$$\%Inhibición = 100 * \left[1 - \left(\frac{AB_{muestra}}{AB_{control}} \right) \right] \quad [2]$$

Donde $Ab_{muestra}$ y $Ab_{control}$ son la absorbancia de la β-hematina con y sin el uso de extractos, respectivamente. El difosfato de cloroquina

(CQ) fue utilizado como control positivo y su actividad inhibitoria es expresada en términos de CI₅₀, es decir la concentración de CQ necesaria para la inhibición del 50% de la formación de β-hematina, y es calculada mediante el paquete estadístico GraphPad Prism[®] demo, Versión 4.00 para Windows, (GraphPad software, Inc, San Diego CA 2003). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio de actividad antiplasmódica *in vitro* de extractos de especies de la familia Annonaceae son mostrados en la Tabla 1. Los extractos fueron evaluados a una concentración de 10 µg/ml y aquellos que presentaron una inhibición mayor del 50% en el crecimiento de las cepas de *P. falciparum* sensible (F32) y resistente (W2) a CQ, se les calculó la CI₅₀ y fueron considerados como extractos de potente actividad antiplasmódica. Los extractos de hojas (EtOAc) de *D. panamensis*, tallos (EtOAc) de *P. boyacana*, tallos (Hexano) de *R. exsucca* y tallos (EtOAc) de *R. pittieri*, mostraron actividad contra la cepa F32, y solamente los extractos de hojas (Hexano y EtOAc) de *D. panamensis* y tallos (Hexano) de *R. exsucca* mostraron actividad en la cepa W2. Este último extracto resultó ser el más activo en el estudio de actividad antiplasmódica con una CI₅₀ de 3,0 y 4,8 µg/ml en las cepas F32 y W2 de *P. falciparum* respectivamente. La CI₅₀ de la CQ usada como medicamento control en el ensayo fue de 30 nM contra la cepa F32 y 51 nM contra la cepa W2.

Igualmente se evaluó la actividad de inhibición de la formación de la β-hematina (Ifβ-h) a los diferentes extractos (Tabla 1). La relevancia de evaluar dicha actividad se basa en la siguiente observación: Durante su ciclo intraeritrocítico, el parásito de la malaria degrada una gran cantidad de hemoglobina presente en el citoplasma de la célula hospedera (entre el 60-80%)²⁵. Durante el proceso de proteólisis de hemoglobina en su vacuola digestiva ácida es producido heme (Ferriprotoporfirina IX), un compuesto potencialmente tóxico para el parásito. El parásito carece de heme oxigenasa, enzima que dispone del compuesto en otras especies, entonces lo detoxifica en parte por su incorporación en una sustancia cristalina, inerte e insoluble denominada hemozoina (o pigmento malárico)^{26,27} y el resto por procesos de degradación peroxidativos. Esta función especializada hace de la vacuola digestiva un blanco atractivo para la búsqueda de nuevos compuestos antimaláricos, un compuesto capaz de inhibir la formación de he-

mozoina, podría ser potencialmente letal para el parásito. Para muchas sustancias, su habilidad de inhibir esta formación está directamente relacionada con su potencia antimalárica ^{28,29}.

Una sustancia similar a la hemozoina, la β -hematina, puede ser formada *in vitro* a partir de una solución de hemina (hidroxi-ferritoproporfirina IX) bajo ciertas condiciones de pH, temperatura y concentración de sales que simulan el ambiente de la vacuola digestiva ³⁰. La β -hematina sintética es espectrofotométrica y químicamente idéntica a la hemozoina, además conserva las propiedades de solubilidad de la sustancia nativa ³¹, siendo útil en el estudio y diseño de nuevos agentes terapéuticos. La metodología aplicada para la formación de β -hematina se monitoreó por espectroscopía de IR-TF, en donde se distingue inequívocamente hemina de β -hematina ³². El espectro IR de β -hematina mostró bandas a 1662 y 1209 cm^{-1} características de la unión hierro-carboxilato ²⁷, las cuales no están presentes en el espectro IR de la hemina (datos no mostrados).

Entre los 36 extractos examinados por su actividad I β -h (Tabla 1), hojas (EtOAc) de *A. muricata*, hojas (EtOAc) de *D. panamensis*, hojas (Hexano) de *R. exsucca*, hojas (Hexano) y tallos (EtOAc) de *R. pittieri* presentaron porcentajes de inhibición mayores del 85% cuando fueron evaluados a una concentración de 2,5 mg/ml. La CI_{50} de la CQ fue de 1,15 mg/ml (2,24 mM) y estuvo en concordancia con previos reportes en donde se muestra que un exceso molar de CQ sobre la hemina previene la formación de la β -hematina ²⁴. Bajo las condiciones de la presente investigación, (pH 4,0, 60 °C), 1,80 mg/ml (3,5 mM) de CQ inhibió el 96% la formación de la β -hematina. Solamente el extracto de las hojas de *D. panamensis* mostró actividad I β -h e inhibición del crecimiento de ambas cepas del parásito en cultivo, mientras que el extracto de tallos de *R. pittieri* presentó actividad I β -h e inhibición del crecimiento de la cepa F32 sensible a CQ. Para estos 2 últimos extractos, la correlación entre la actividad I β -h y la actividad antiplasmódica es clara, sin embargo, para los demás extractos considerados como extractos de potente actividad antiplasmódica, la correlación con la actividad I β -h no fue evidente. Estos extractos mostraron porcentajes de inhibición menores del 65%, e inclusive extractos como el de tallos de *R. exsucca* presentó una actividad I β -h cercana a 23%. Para estudiar la relación entre estas dos actividades, se realizó un análisis de correlación mediante el método de Pearson utilizando el programa Statgraphics Plus para Win-

dows 4.1 (Statistical Graphics Corp, 1999) (Fig. 1). No hay una significativa correlación entre las actividades antiplasmódica sobre la cepa F32 y W2 con la I β -h con un índice de correlación de 0,09 y 0,11 (p-value 0,5 y 0,6).

La falta de correlación puede deberse a factores relacionados con la incapacidad de los principios activos de los extractos de alcanzar el sitio de formación de la hemozoina y de poder acumularse en la vacuola digestiva ácida del parásito a concentraciones efectivas. Las moléculas deben de penetrar libremente a través de un complejo sistema de membranas: por parte del eritrocito, la membrana celular y la membrana de la vacuola parasitófora y, por parte del parásito, su membrana y la membrana de la vacuola digestiva ²⁴. Así mismo, se ha demostrado la importancia que tiene la acumulación de la droga a nivel de la vacuola digestiva ácida del parásito, en cuanto a la potencia de compuestos antimaláricos y el efecto que ejerce esta acumulación sobre la actividad de inhibición de la formación de la hemozoina ³³. Factores como el pH ácido de la vacuola digestiva y los sitios disponibles en donde la droga tenga la posibilidad de unirse al heme, pueden afectar dicha acumulación. Por supuesto, otra posible alternativa puede deberse a la posibilidad de que los compuestos activos no interfieran con la formación de la hemozoina y su mecanismo de acción sea

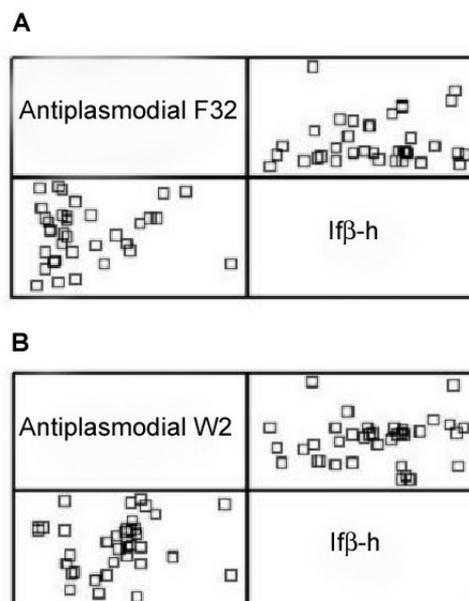


Figura 1. Correlación de la actividad antiplasmódica y la actividad de inhibición de la formación de β -hematina. (A) Actividad antiplasmódica calculada sobre la cepa F32, índice de correlación de 0,09, p-value = 0,60. (B) Actividad antiplasmódica calculada sobre la cepa W2, índice de correlación de 0,11, p-value = 0,51.

totalmente diferente. Al menos esto podría ser el caso de extractos como el de tallos de *R. exsucca* y hojas de *Desmopsis panamensis*, los cuales mostraron potente actividad antiplasmódica y baja actividad I β -h.

CONCLUSIONES

En anteriores reportes se había estudiado ya la pertinencia de la inhibición de la formación de β -hematina en relación a la detección de potenciales compuestos antimaláricos a partir de extractos ²⁴; sin embargo, se plantea ahora un análisis estadístico que muestra una significativa no correlación entre la actividad antiplasmódica *in vitro* y la inhibición de la formación de β -hematina. A pesar de este resultado, la información suministrada por el ensayo de actividad I β -h es importante en la búsqueda de alternativas terapéuticas contra la enfermedad de la malaria, toda vez que exista la posibilidad de encontrar compuestos que interfieran con la formación de la hemozoina y que además, reúnan las características fisicoquímicas necesarias para el transporte a través de membranas y de acumulación en sitios de bajos pH.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS (Contrato N° RC 108-2003) y CODI-Universidad de Antioquia (Acta No. CPT 0313).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WHO Expert Committee on Malaria (2000) "Technical Report Series, Twentieth Report". World Health Organization, Geneva.
2. Marshall, E. (2000) *Science* **290**: 437-9.
3. Meshnick, S. (1998) *Med. Trop.* **58**: 13-7.
4. Galal, A., M. Ahmad, F. El-Ferally & A. McPhail (1996) *J. Nat. Prod.* **59**: 917-20.
5. Beekman, A., A. Barentsen & Woerdenbag (1997) *J. Nat. Prod.* **60**: 325-30.
6. Marsh, K. (1999) "Genetic approaches to the determinations of drugs pathogenesis and infectivity in *Plasmodium falciparum* malaria", en: "Malaria molecular and clinical aspects", Harwood Academic Publishers, The Netherlands, págs. 217-48.
7. Walliker, D., H. Babiker & L. Cartwright (1998) "Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection", Ed. ASM Press, Washington, D.C., págs. 235-52.
8. Phillips, R.S. (2001) *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 564-82.
9. Blair, S., A. Correa, B. Madrigal, C. Zuluaga & H. Franco (1991) "Plantas antimaláricas, una revisión bibliográfica", Ed. Universidad de Antioquia, Medellín, pág. 214.
10. Weniger, B., S. Robledo, G. Arango, E. Deharo, R. Aragon, V. Munoz, J. Callapa, A. Lobstein & R. Antón (2001) *J. Ethnopharmacol.* **78**: 193-200.
11. Leboeuf, M., A. Cave, P. Bhaumik, B. Mukherjee & R. Mukherjee (1982) *Phytochemistry* **21**: 2783-813.
12. Cave, A., B. Figadere, A. Laurens & D. Cortes (1997) "Acetogeninas from Annonaceae" (W. Herz, G.W. Kirbi, R.E. Moore & W. Steglich, ed.), Tamm, Austria, pág. 288.
13. Oberlies, N.H., V.L., Croy, M.L., Jarrison, & J.L. McLaughlin (1997) *Cancer Lett.* **115**: 73-9.
14. Jaramillo, M.C., G.J. Arango, M.C. González, S.M. Robledo, I.D. Vélez (2000) *Fitoterapia* **71**: 183-6.
15. Février, A., M.E. Ferreira, A. Fournet, G. Yaluff, A. Inchausti, A. Rojas de Arias, R. Hocquemiller & A.I. Waechter (1999) *Planta Med.* **65**: 47-9.
16. Ahammadsahib, K.I., R.M. Hollingworth, J.P. McGovren, Y.H. Hui & J.L. McLaghlin (1993) *Life Sci.* **53**: 1113-20.
17. Mambu, L., M.T. Martin, D. Razafimahefa, D. Ramanitrashasimbola, P. Rasoanaivo & F. Frappier (2000) *Planta Med.* **66**: 537-40.
18. Mahiou, V., F. Roblot, A. Fournet, & R. Hocquemiller (2000) *Phytochemistry* **54**: 709-16.
19. Ferreira, E., F. Roblot, A. Cavé, M.Q. Paulo & A. Fournet (1996) *J. Nat. Prod.* **59**: 438-40.
20. Del Rayo, M., G.C. Kirby, D.C. Warhurst, S.L. Croft & J.D. Phillipson (2000) *Planta Med.* **66**: 478-80.
21. Nkunya, M.H., S.A. Jonker, J.J. Makangara, R. Waibel & H. Achenbach (2000) *Phytochemistry* **53**: 1067-73.
22. Egan, T.J. (2004) *Drug Des. Rev.* **1**: 93-110.
23. Trager, W. & J.B. Jensen (1976) *Natur.* **263**: 767-9.
24. Baelmans, R., E. Deharo, G. Bourdy, V. Muñoz, C. Quenevo, M. Sauvain & H. Ginsburg (2000) *J. Ethnopharmacology* **73**: 271-5.
25. Francis, S., D. Sullivan & D. Goldberg (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 97-123.
26. Slater, A., W. Swiggard, B. Orton, W.D. Flitter, D.E. Goldberg, A. Cerami & G.B. Henderson (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**: 325-9.
27. Goldberg, D. & A. Slater (1992) *Parasitol. Today.* **8**: 280-3.
28. Egan, T.J., D.C. Ross & P.A. Adams (1994) *FEBS Lett.* **352**: 54-7.
29. Egan, T.J. & H.M. Marques (1999) *Coord. Chem. Rev.* **192**: 493-517.
30. Basilico, N., E. Pagani, D. Monti, P. Olliaro & D. Taramellia (1998) *J. Antimicrob. Chemoth.* **42**: 55-60.
31. Pagola, S., P. Stephens, D. Bohle, A. Kosar & S. Madsen (2000) *Nature* **404**: 307-10.
32. Basilico, N., D. Monti, P. Olliaro & D. Taramelli (1997) *FEBS Lett.* **409**: 297-9.
33. Hawley, S.R., P.G. Bray, M. Mungthin, J.D. Atkinson, P.M. O'Neill & S.A. Ward (1998) *Antimicrob Agents Chemother.* **42**: 682-6.