

Actividad antiplasmodial in vitro de *Calophyllum inophyllum*

Ana M. Mesa-Vanegas, Adriana L. Pabon, Silvia Blair-Trujillo.

Grupo Malaria. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia.

* Autor para Correspondencia: Ana María Mesa Vanegas

Grupo Malaria. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia. A.A 1226.

Calle 62 N° 52-59, Laboratorio 610-611. Medellín, Colombia.

Tel: (574) 219-64-86 - Fax: (574)219-64-87

anammv@gmail.com

Recibido el 13/05/2011

Aceptado el 17/05/2011

Resumen

Introducción: Debido a la falla terapéutica y a la resistencia de *Plasmodium falciparum* a varios antimaláricos existe la necesidad de buscar nuevos candidatos antimaláricos. Dado sus promisorios resultados químicos y biológicos, el género *Calophyllum* (Guttiferae, Clusiaceae) es de interés en el área de desarrollo de nuevos fármacos por ello, la especie *Calophyllum inophyllum* puede ser una alternativa para el control de la morbi-mortalidad por malaria. En este trabajo se evaluó la actividad antiplasmodial in vitro de extractos y del ácido ursólico obtenidos a partir de hojas de *Calophyllum inophyllum*. **Métodos:** El material vegetal seco y molido de *C. inophyllum* se extrajo por percolación con solventes de diferente polaridad. A partir de los extractos se aisló mediante procesos cromatográficos, un metabolito mayoritario que fue caracterizado mediante técnicas espectroscópicas de RMN. La actividad antiplasmodial in vitro de las muestras se evaluó en la cepa resistente FCB2 de *P. falciparum* mediante la incorporación de hipoxantina radiomarcada y la detección de la proteína HRP-2. **Resultados:** Se obtuvieron cuatro extractos de diferente polaridad, se aisló y caracterizó el triterpeno ácido ursólico. Se encontró que los extractos y el ácido ursólico presentan actividad antiplasmodial por ambos métodos, algunos con IC₅₀ de 6,33 µg/mL y 13,34 µg/mL para el extracto de metanol (ExtM) y IC₅₀ de 24,48 µg/mL y 46,28 µg/mL para el ácido ursólico, con los métodos radioisotópico y HRP-2 respectivamente. **Conclusiones:** Se validó la actividad antiplasmodial del ácido ursólico y del extracto metanólico mediante dos metodologías, sugiriendo la presencia de metabolitos activos contra el parásito, lo que estimula realizar un análisis biodirigido aislando y caracterizando más metabolitos presentes en la planta *C. inophyllum*.

Palabras clave: *P. falciparum* - Clusiaceae - *Calophyllum* - triterpeno - actividad antiplasmodial

Summary

Introduction: Currently, it is necessary to research and development new antimalarial drugs, due to treatment failure and resistance of *P. falciparum* to various antimalarial drugs. The genus *Calophyllum* (Guttiferae, Clusiaceae) is of interest because its promising results of chemical and biological activity, so *Calophyllum inophyllum* could be an alternative for the malaria morbidity and mortality control. This study evaluated antiplasmodial activity in vitro extracts and ursolic acid obtained from the leaves of *Calophyllum inophyllum*. **Methods:** The dried and pulverized vegetal material was extracted by percolation with different polarity solvents until exhaustion. From the extracts was isolated by chromatographic processes a major metabolite, which was characterized by NMR spectroscopic techniques. In vitro antiplasmodial activity of the samples was evaluated on continuous culture of *P. falciparum* strain FCB2, by HRP-2 and radioisotopic methods. **Results:** In this paper we obtained four extracts of different polarity, moreover was isolated and characterized a triterpene ($C_{30}H_{48}O_3$), known as ursolic acid. We found that the extracts and ursolic acid have antiplasmodial activity by two methods evaluated, shown interesting IC₅₀ values: 6,33 µg/mL and 13,34 µg/mL for the methanol extract (ExtM) and 46,28 µg/mL and 24,48 µg/mL for ursolic acid, by HRP-2 and radioisotopic methods, respectively. **Conclusions:** We report interesting antiplasmodial activity whit ursolic acid and methanol extract by both methods, suggesting the presence of active metabolites against *P. falciparum*, which encourages to carry out a bioguide analysis for isolating and characterization of other metabolites.

Keywords: *P. falciparum* - Clusiaceae - *Calophyllum* - triterpenes - antiplasmodial activity.

Introducción

La malaria es causada por parásitos protozoos, del género *Plasmodium*, que son transmitidos por la hembra del mosquito del género *Anopheles*(1). Desde 1960 se ha informado la aparición y dispersión de la resistencia a los antimaláricos presentado por *P. falciparum* en países de Asia, África y Latinoamérica, lo cual se ha relacionado, principalmente a cambios biológicos en el parásito contribuyendo a la persistencia y letalidad de esta enfermedad, aumentado su prevalencia en los últimos 15 años y disminuyendo la efectividad de los medicamentos en muchos países donde la enfermedad es endémica(2). Todos estos elementos hacen que hoy la malaria sea un problema de Salud Pública a nivel mundial(3). En el año 2007 se registraron 247 millones de casos de malaria en el mundo y aproximadamente un millón de muertes, en su mayoría niños menores de cinco años(4).

Una de las alternativas para el control de las complicaciones y muertes por malaria es la adquisición de quimioterapia efectiva, la cual ha sido posible en gran medida, gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas como la quinina, la cual fue obtenida de la planta del género *Cinchona*, siendo el único antimalárico utilizado durante varios siglos y ha sido modelo para sintetizar nuevos análogos antimaláricos como la cloroquina, mefloquina y amodiaquina(5). Igualmente, de la planta *Artemisia annua* (Asteraceae), una hierba china

conocida popularmente en este país como Qing hao y empleada por la medicina tradicional por más de 1000 años, se aisló la artemisinina, a partir de la cual se han preparado derivados hemisintéticos como la dihidroartemisinina, artemeter, arteeter y artesunato de sodio(6); demostrando que los productos naturales juegan un papel significativo en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Por otra parte, la agencia reguladora en fármacos y alimentos de Estados Unidos (FDA) estima o reporta que aproximadamente el 75% de los fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas tienen origen natural(7).

En la familia Clusiaceae se han aislado compuestos con actividad antiplasmodial, como xantonas y derivados del acilfloroglucinol como por ejemplo en plantas de los géneros *Hypericum*, *Vismia* y *Garcinia*(8). En la misma familia se encuentra el género *Calophyllum* formado por 200 especies y en algunas de ellas se ha reportado la presencia de compuestos de tipo cumarinas, xantonas y triterpenos con actividades antiplasmodial, analgésica, antiviral, antiulcerogénica, anticáncerígena y antibacteriana(9). Por ello, es importante realizar estudios para explorar el potencial uso de las especies de *Calophyllum* hacia la búsqueda de nuevas sustancias que presenten una elevada actividad antiplasmodial. En el tamizaje de las sustancias con actividad antiplasmodial, la utilización inicial de pruebas in vivo presentan restricciones de tipo ético en el uso de animales y elevado costo, y por ello la mayoría de los ensayos iniciales se realizan en cultivos de parásitos in vitro; metodología que permite obtener información confiable con pequeñas cantidades de material biológico, actividad específica sobre el parásito y la posibilidad de evaluar un gran número de muestras(10). Dentro de las técnicas más empleadas para determinar la actividad antiplasmodial in vitro se encuentran el método visual, el micro método radioisotópico(11), los métodos bioquímicos como las pruebas de la lactato deshidrogenasa parasitaria (LDH) y de la proteína rica en Histida II (HRP-2)(12-13), el método fluorométrico y otros métodos particulares que postulan modos de acción como la inhibición de polimerización del grupo Hemo(14). Todos estos métodos determinan la inhibición del crecimiento de los parásitos mediante una medición directa o indirecta cuando éste es sometido a diferentes concentraciones de una muestra problema.

Con base en los hallazgos presentes en el género *Calophyllum* y la necesidad de validar la actividad antiplasmodial, nosotros aislamos y caracterizamos el ácido ursólico a partir de extractos de la planta *C. inophyllum*, evaluamos la actividad antiplasmodial de este compuesto y de cuatro extractos empleando los métodos radioisotópico y HRP-2.

Materiales y métodos

Preparación de extractos y aislamiento del compuesto: Las hojas de *C. inophyllum* se colectaron en el municipio San Alberto, situado en el departamento del Cesar (Colombia), a 200 m.s.n.m (15). Un espécimen de esta planta se encuentra depositado en el Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe de Medellín con Voucher número 7310A. El material vegetal fue secado a temperatura ambiente, posteriormente 1,103 Kg se molieron y se depositaron en un percolador con Hexano (ExtH, 17,64g), diclorometano (ExtD, 30,67g), acetato de etilo (ExtAE,

14,98g) y metanol (ExtM, 82,45g), previamente destilados. Los extractos obtenidos fueron concentrados a presión reducida en un rotaevaporador, se monitorearon por cromatografía de capa delgada con fase estacionaria de Sílica-gel 60 GF254 Merck® empleando diferentes sistemas de elusión y revelando con lámpara ultravioleta UVGL-58 a 254 y 366 nm y revelador universal. El extracto de diclorometano se sometió a cromatografía en columna flash con fase estacionaria de Sílica-gel 60 GF254 Merck® empleando gradientes de concentración hexano: acetato de etilo y acetato de etilo: metanol y realizando un monitoreo continuo mediante cromatografía de capa delgada. Posteriormente, se realizó cromatografía en capa preparativa con fase estacionaria de Sílica-gel 60 GF254 Merck® para purificar un compuesto mayoritario presente en este extracto denominado CLEDJS9 (135 mg).

Análisis espectroscópico: Los espectros infrarrojo (IR) se obtuvieron en un equipo Perkin-Elmer RX/FT-IR system. Para el análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear se utilizó un espectrómetro Bruker (300 y 250 MHz para ^1H), 75 MHz para ^{13}C utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como solvente. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) tomando como referencia el TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Herzios (Hz). Además se realizó espectrometría de masas electrospray con tiempo de vuelo (TOF ESI-MS) en un equipo Nermag-Sidar R-10-10C.

Ensayos de actividad antiplasmodial

Plasmodium falciparum: Los ensayos de actividad antiplasmodial in vitro se realizaron con la cepa cloroquino-resistente FCB-2 de *Plasmodium falciparum* la cual es mantenida en cultivo continuo con la metodología de Trager & Jensen (1976) modificada en eritrocitos A+. Los cultivos son mantenidos a 37°C en una atmósfera de mezcla de gases de 5% de O_2 , 6% de CO_2 y N_2 balanceado .(16)

Evaluación de la actividad antiplasmodial

Método radioisotópico: Para evaluación de la actividad antiplasmodial in vitro de los extractos y del compuesto aislado de la planta *C. inophyllum*, se siguió la metodología descrita por Bravo J et al., 1999, Desjardins R et al., 1979 con algunas modificaciones. Este método realiza una medición indirecta de la actividad metabólica del parásito, por medio de la incorporación de un precursor de ácidos nucleicos marcado radiactivamente, así: de cada extracto y del compuesto se preparó una solución madre de 10 mg/mL, tomando 2 mg de cada uno y 200 μL de DMSO. A partir de esta se tomaron 50 μL y se ajustaron hasta 1000 μL con RPMI completo sin hipoxantina obteniendo una concentración final de 0,5 mg/mL.

Los ensayos de actividad se realizaron en placas de 96 pozos de fondo plano marca Falcon®, se evaluaron siete concentraciones de cada compuesto en un rango entre 100 $\mu\text{g/mL}$ a 1,56 $\mu\text{g/mL}$, cada concentración se evaluó por triplicado y se prepararon a partir de diluciones seriadas de la solución madre de 0,5mg/mL. La concentración de DMSO en la primera dilución fue de 1% que se ha demostrado no ser tóxica para el parásito, en las siguientes diluciones la concentración de DMSO fue menor. Como control de tratamiento se utilizó la cloroquina, que fue evaluada también sobre siete diluciones seriadas en un rango entre 1,94 $\mu\text{g/mL}$ y 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (3,75 μM y 0,06 μM). Como control de crecimiento se empleó medio de cultivo. Se

preparó una suspensión de glóbulos rojos parasitados con un hematocrito del 2% y una parasitemia del 1%. La concentración final de la hipoxantina tritiada por pozo fue de 0,8 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. El cultivo con los tratamientos se incubó a 37 °C durante 48 horas en atmósfera de 5% CO_2 , 5% O_2 y nitrógeno. El plato se congeló a -20 °C para provocar la hemólisis de los eritrocitos y al día siguiente se descongeló. Los ácidos nucleicos fueron depositados en un filtro de fibra de vidrio con ayuda de un colector semi-automático y fueron leídos en un contador beta. La lectura se expresó en cpm.

Método HRP-2: se emplearon microplacas de 96 pozos de fondo plano marca Falcon®. Se evaluaron 7 concentraciones dobles seriadas, por duplicado tanto de extractos y el compuesto. Se prepara una solución madre de 2mg/mL en DMSO al 1% y posteriormente se preparan las diluciones dobles seriadas en un rango de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -3,13 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se preparó una suspensión de eritrocitos parasitados con una parasitemia al 0,05% sincronizado en anillos y hematocrito del 1,5%, luego se procedió a distribuir 200 μL de la suspensión de eritrocitos parasitados en cada pozo y posteriormente se adicionaron 25 μL de las concentraciones crecientes de las muestras y como controles de tratamiento 25 μL de agua desionizada esteril. Se incubaron a 37 °C durante 72 h, se realizó un extendido para verificar crecimiento de los parásitos (por microscopía) a las 24h y 72h. Se sometieron los platos a congelación y descongelación por calor a 37°C dos veces para causar hemólisis y luego se almacenaron las cajas a -20°C. Teniendo en cuenta la parasitemia obtenida en los pozos control pasadas las 72h se procedió a diluir con agua destilada los pozos hemolizados para dar una parasitemia de 0.02% en el control. ELISA HRP2: Se cubrieron microplatos de ELISA de 96 pozos con fondo en U y de alta fijación (Greiner Bio-One) con el anticuerpo primario (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se guardaron en bolsa plástica de sello hermético a 4 °C durante 12 h. Se procedió a transferir 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de la muestra del plato de cultivo a los platos de ELISA, que fueron incubados por 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se diluyo el anticuerpo secundario (MPFG-55P, ICL) a 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una solución de PBS al 2% de BSA y 1% de tween-20, se transfirieron 100 μL a cada pozo, se incubó durante 1h en cámara húmeda y luego se lavó nuevamente por triplicado. Se adicionaron 100 μL /pozo de cromógeno 3,3',5,5-Tetrametilbenzidina (TMB single solution Chromogen/Substrate; Zymed Laboratorios, Inc) durante 10 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 50 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de solución de parada (ácido sulfúrico 1M) y se determinó la absorbancia a 450 nm en lector de microplatos Bio-Rad 680. Cuando los parásitos de los pozos sin tratamiento crecieron adecuadamente (control), la absorbancia estuvo entre 0,5-2,0 13.

Las concentraciones inhibitoria 50 ($\text{IC}_{50} \pm \text{IC } 95\%$) fueron calculados para cada compuesto a partir de un modelo de regresión logística no lineal. Se asumió una curva sigmoidea dosis-respuesta con pendiente de Hill (pendiente variable) usando el programa GraphPad Prism 4 for Macintosh versión 4.0b. Los datos fueron analizados y graficados usando GraphPad Prism 4 for Macintosh versión 4.0b (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Resultados y discusión

Caracterización del compuesto ácido ursólico: Del extracto de diclorometano se aisló un sólido, blanco, amorfo, con un punto de fusión de 265° C y fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃, identificado como ácido ursólico (Figura 1).

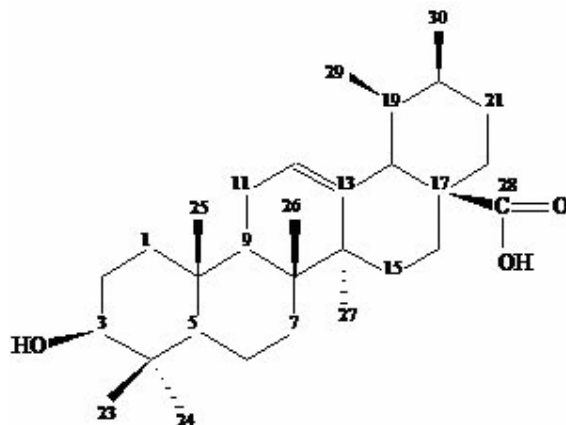


Figura 1: Estructura del ácido ursólico.

Datos espectroscópicos: TOF ESI-MS [M + Na⁺] a m/z 483,2, m/z 479,3, m/z 451,2 (28), m/z 413,2 (38), m/z 393,2 (21), m/z 301,1 (92), m/z 243,2 (58). IR (cm⁻¹) 3440; 2928; 2871; 1691; 1457; 1387; 1253; 1091. ¹H RMN ? (ppm): 1,61 (m, J= Hz, 1H, H-1); 1,49 (m, J= Hz, 1H, H-2); 3,09 (t, J= 8Hz, 1H, H-3); 0,63 (d, J= 11,3Hz, 1H, H-5); 1,41 (m, H-6); 1,38 (m, H-7); 1,40 (m, H-9); 1,81 (m, H-11); 5,14 (t, J= 3,3Hz, 1H, H-12); 0,93 (m, H-15); 1,56 (m, H-16); 2,09 (d, J= 11,5Hz, 1H H-18); 1,35 (m, H-21); 0,90 (m, H-22); 0,88 (s, 3H, H-23); 0,67 (s, 3H, H-24); 0,82 (s, 3H, H-25); 0,71 (s, 3H, H-26); 0,99 (s, 3H, H-27); 0,76 (d, J= 6,5 Hz, 3H, H-29); 0,85 (d, J= 6,2 Hz, 3H, H-30). ¹³C RMN ? (ppm) (DEPT 135): 36,7 (C1); 26,7 (C2); 78,7 (C3); 38,5 (C4); 55,1 (C5); 18,1 (C6); 32,9 (C7); 39,3 (C8); 47,4 (C9); 36,8 (C10); 23,1 (C11); 125,3 (C12); 138,0 (C13); 41,9 (C14); 27,9 (C15); 24,1 (C16); 47,5 (C17); 52,7 (C18); 38,7 (C19); 38,9 (C20); 30,5 (C21); 20,9 (C22); 27,8 (C23); 15,4 (C24); 15,2 (C25); 16,7 (C26); 23,3 (C27); 180,4 (C28); 20,9 (C29); 16,8 (C30).

Actividad antiplasmodial de extractos y del ácido ursólico: Realizando las curvas dosis-respuesta y ajustando el comportamiento de los datos a una ecuación polinomial y resolviendo dicha ecuación, se calcularon las IC₅₀, los intervalos de confianza y los coeficientes de correlación para ambos métodos (radioisotópico y método HRP-2) (Tabla 1). Se realizaron además curvas sigmoideas dosis-respuesta con pendiente variable (Véase Grafico 1 y Grafico 2). La CQ presentó una adecuada relación dosis-respuesta y una IC₅₀ de 0,188 µg/mL (0,36µM) por el método HRP-2 y para el radioisotopico de IC₅₀ = 0,089 µg/mL (0,17µM).

Tabla 1. Actividad antiplasmodial de extractos y del ácido ursólico en la cepa FCB-2 de *P. falciparum* utilizando dos métodos.

Inhibición de crecimiento de <i>P. falciparum</i>						
Cepa FCB-2						
Muestra	Método Radioisotópico			Método HRP2		
	IC50 (µg/mL)	Intervalos de Confianza 95%	R ²	IC50 (µg/mL)	Intervalos de Confianza 95%	R ²
ExtH	23,85	18.62 - 30.54	0,98	ND	ND	ND
ExtD	26,89	24.35 - 29.69	0,99	15,82	13.87 - 18.06	0,99
ExtAE	42,5	37.48 - 48.19	0,99	42,99	39.63 - 46.64	0,99
ExtM	6,33	5.871 - 6.820	0,99	13,34	11.12 - 16.01	0,98
Acido Ursólico	24,48	20.57 - 29.13	0,99	46,28	28.94 - 74.00	0,94
CQ	0,089 (0,17*)			0,188 (0,36*)		

CQ= Cloroquina *Unidades micromolar µM

ND = No determinado

Actividad antiplasmodial metodo Radioisotopico

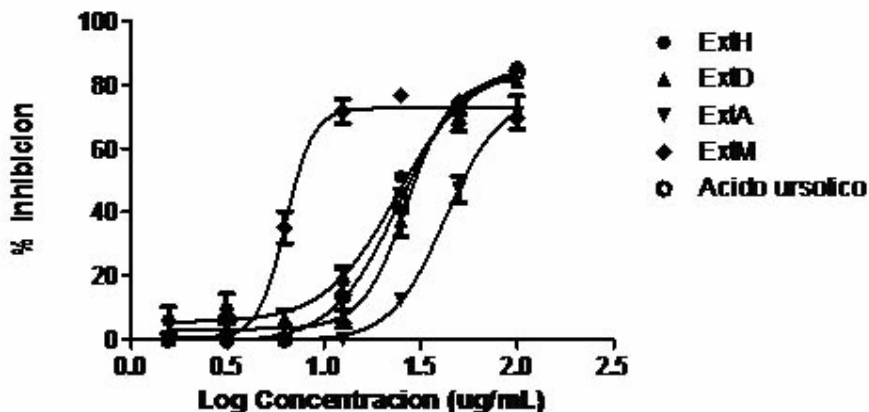


Gráfico 2: Curva sigmoidea dosis-respuesta con pendiente de Hill (pendiente variable), Log Concentración Vs % Inhibición mediante el método HRP-2.

La actividad antiplasmodial de los extractos será clasificada según Jonville M, et al (2008)(21) con modificación hecha por nosotros. En este trabajo se obtuvieron coeficientes de correlación (R^2) estadísticamente significativos para todas las muestras evaluadas encontrándose una relación lineal entre las dos variables cuantitativas analizadas para los cuatro extractos de diferente polaridad y para el ácido ursólico. El extracto metanólico presentó una promisorio actividad con IC_{50} entre 6-15 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} = 6,33 $\mu\text{g/mL}$ 13,34 $\mu\text{g/mL}$ para el método radioisotópico y HRP-2 respectivamente) lo que sugiere la presencia metabolitos activos. El extracto de diclorometano presentó moderada actividad antiplasmodial (16-30 $\mu\text{g/mL}$) IC_{50} = 26,89 $\mu\text{g/mL}$ en Radioisotopico IC_{50} = 15,82 $\mu\text{g/mL}$ en HRP-2, igualmente para el extracto de Hexano con IC_{50} = 23,85 $\mu\text{g/mL}$ en radioisotopico pese a que no se determinó el valor de IC_{50} por el método HRP-2. El extracto de acetato de etilo presentó baja actividad antiplasmodial (31-50 $\mu\text{g/mL}$). Por otra parte se aisló y caracterizó un compuesto de fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ de naturaleza triterpénica pentacíclica con esqueleto tipo ursano caracterizado por la orientación ecuatorial (?) del grupo hidroxilo en posición 3 y un grupo carboxilo en posición 28, conocido como ácido ursólico, para este compuesto la actividad antiplasmodial fue moderada actividad antiplasmodial IC_{50} = 24,84 $\mu\text{g/mL}$ en radioisotopico; IC_{50} = 46,28 $\mu\text{g/mL}$ en HRP-2, encontrándose una correlación con los datos reportados en la literatura, el ácido ursólico puede ser empleado como un potencial fármacoforo en el diseño de nuevos candidatos antimaláricos, donde las hojas de *C. inophyllum* son una fuente de obtención de este compuesto(17-18). Este tipo de triterpenos y sus derivados han sido reportados con actividad anti-HIV(19) y han presentado citotoxicidad en líneas celulares tumorales(20). Sin embargo, otros compuestos de naturaleza triterpénica pentacíclica de tipo ursano y oleano aislados de *Gardenia saxatilis* como el ácido messagenico A, y ácido

messagenico B, y una mezcla de ácido uncarínico E, ácido 27-O-p-(E)-coumaroiloxioleanólico y ácido 27-O-p-(E)-coumaroiloxiursólico presentaron actividad antiplasmodial $IC_{50} = 1,5; 3,8$ y $2,9 \mu g/mL$, respectivamente¹⁷. Posiblemente la actividad de este tipo de compuestos sea atribuida al grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo pentacíclico y por la función ácida del carbono 28 además de su distribución espacial⁽¹⁹⁾. Lo anterior nos hace pensar que el ácido ursólico, puede ser empleado como una plantilla estructural para el desarrollo de estudios QSAR (Relación estructura - actividad) con el fin de potenciar su actividad. En lo que respecta a las técnicas empleadas para valorar la actividad antiplasmodial, hay una semejanza con los resultados de IC_{50} obtenidos por ambos métodos excepto para el extracto de hexano (ExtH), esta diferencia posiblemente se deba a su pobre solubilidad en sistemas acuosos. Por otra parte el método radioisotópico es una técnica costosa y emplea material radioactivo, pero por su gran sensibilidad es la técnica más recomendada para el análisis de una muestra problema y el método HRP2 es simple, presenta un impacto ambiental bajo y puede ser empleado para evaluaciones preliminares de muestras complejas como un extracto. Ambas técnicas son válidas para determinar la actividad antiplasmodial de tanto de extractos y compuestos de uso natural como de moléculas obtenidas por síntesis.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el ministerio de agricultura de Colombia proyecto (No. 009-2007-V7552-38-07) y a la Universidad de Antioquia. Al profesor Bruno Figadere de la universidad de París por la realización de los espectros. A la Bacterióloga Eliana Arango por la realización de los ensayos de actividad antiplasmodial con la técnica HRP-2.

Referencias:

1. Botero D, Restrepo M, Parasitosis humanas. 3° edición. Medellín CIB. 1998. 159-201.
2. Robert A, Dechy-Cabaret O, Cazelles J, Benoit-Vical F, Meunier B. Recent Advances in Malaria Chemotherapy. Journal of the chinese chemical society. 2002; 49: 301-10.
3. WHO (World Health Organization) guidelines for the treatment of malaria. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data by Dr P. Olumese, 2006.
4. WHO (World Health Organization) report, 2008 Geneva. Páginas 9-11.
5. Vipán K, Mahajan A, Chibale K. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. Bioorganic and medicinal chemistry. 2009; 17: (6), 2236-75
6. Haynes R, Krishna S. Artemisinins: activities and actions. Microbes and infection. 2007; 6: 1339-46.
7. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. Journal Natural Products 2007; 70: 461-77.
8. Hay AE, Helesbeux JJ, Duval O, Labaied M, Grellier P, Richomme P. Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. Life Sciences. 2004; 75: 3077-79.
9. Noldin V, Buffon ID and Cechinel FV. *Calophyllum* Genus: Chemical and pharmacological importance. Quimica Nova. 2006.29 (3): 549-554.
10. Deharo E, Gautret P, Muñoz V, Sauvain M. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. Ciudad, Corporación Iberoamericana CYTED, 2000. Institut de recherche pour le développement IRD, 51-52.
11. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD and Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1979 ; 16 (6) :710-718.
12. Le Bras J, Deloron P. In vitro study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. ,1983 : 32 (3) : 447-51.
13. Noeld H. Malaria drug sensivity testing. <http://malaria.farch.net>. 28 de Septiembre 2009.
14. Parapini S, Basilico N, Pasini E, Egan TJ, Oliaro P, Taramelli D, et al. Standarization of the physicochemical parameters to assess in vitro the γ -hematin inhibitory activity of antimalaria drugs. Experimental parasitology. 2000 ; 96 : 249-6.
15. Brand J, (1779). Abril 18/90 Cesar. San Alberto. Indupalma 200 m.s.n.m.
16. Trager-Jensen JB. Human malaria. Parasites in continuous culture. 1976. Science ; 193:673-5.
17. Suksamrarn A, Tanachatchairatana T, Kanokmedhakul S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 88: 275-77.
18. Gnoatto SC, Susplugas S, Vechia L, Ferreira TB, Dassonville-Klimpt A, Zimmer KR, et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 16 ; 2008. Pag 771-782.

- 19.Kuo-Hsiung L, Morris-Natschke SL. Recent advances in the discovery and development of plant-derived natural products and their analogs as anti-HIV agents. Pure and applied chemistry . 1999; 71 (6):1045-51.
- 20.Ma Chao, Cai Shao, Cui Jing-Rong, Wang R, Peng-Fei Tu, Hattori M, Daneshtalab M. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. 2005; 40: 582-89.
- 21.Huber W, Koella JC. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. Acta Trop 1993; 55, 257-261.
- 22.Jonville MC, Kodja H, Humeau L, Fournel J, De Mol P, Cao M, Angenot L, Frédérick M. Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. Journal of Ethnopharmacology, Volume 120, Issue 3, 8 December 2008, Pages 382-386.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar