

## Evaluación *in vitro* de la actividad antiplasmodial y citotóxica de plantas del sur pacífico colombiano (Tumaco, Nariño)

### *In vitro* antiplasmodial and cytotoxic activity assessment of plants from the colombian southern pacific region (Tumaco, Nariño)

### Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica antiplasmódica e plantas colombiano pacífico sul (Tumaco, Nariño)

ANDRÉS FELIPE VARGAS-SINISTERRA<sup>1</sup>, ADRIANA PABON<sup>2</sup>-VIDAL,  
ALEXANDRA RIOS<sup>2</sup>-ORREGO, GUSTAVO RAMIREZ<sup>2</sup>, ENA PATRICIA LÓPEZ- BARRIOS<sup>2</sup>

#### RESUMEN

*La malaria es una enfermedad parasitaria con impacto negativo para la salud humana mundial, lo que motiva la búsqueda de nuevos antimaláricos a partir de plantas medicinales que han mostrado gran potencial en experimentos in vivo e in vitro. Este estudio tuvo por objetivo la evaluación in vitro de la actividad antimalárica y la citotoxicidad de nueve extractos crudos preparados a partir de las hojas de las plantas: Piper tricuspe, Plantago major, Solanum nudum, Gliricidia sepium del sur pacífico colombiano Tumaco Nariño. La actividad antiplasmódica se evaluó en las cepas 3D7 Y FCR3 de Plasmodium falciparum y se encontró que los extractos preparados con*

Recibido para evaluación: 26 de Enero de 2017.

Aprobado para publicación: 11 de Abril de 2018.

- 1 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Licenciatura en Biología y Química, cuarto piso Edificio Orlando Sierra Hernández Universidad de Caldas, Manizales-Colombia
- 2 Grupo malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia

Correspondencia: [andres.201121724@ucaldas.edu.co](mailto:andres.201121724@ucaldas.edu.co)

etanol de *P. tricuspe* y *S. nudum* tuvieron una  $CI_{50}$  24,41 y 16,59 mg/mL para la cepa FCR3 y 27,1 y 23,26 mg/mL para la cepa 3D7 respectivamente; la actividad citotóxica se valoró en la línea celular HepG2, siendo ambos extractos bajamente tóxico. Cabe resaltar la importancia de la intención por encontrar nuevos medicamentos antipalúdicos a partir de las plantas informadas por las comunidades del sur de Colombia

## ABSTRACT

Malaria is a parasite disease with negative impact for the worldwide human health. This motivates research in new anti-malaric natural medicine, which have proved high potential in in vitro and in vivo experiments. The objective of this research in the in vitro evaluation is: taking into account the antimalaric activity, its cytotoxicity with 9 raw extracts are prepared after some of this plant leaves: *Piper tricuspe*, *Plantago major*, *Solanum nudum*, *Gliricidia sepium* found in the Colombian south Pacific in Tumaco, Nariño. The antiplasmodic activity was evaluated for the 3D7 Y FCR3 strains prepared with *P. tricuspe* y *S. nudum*. Ethanol had a  $CI_{50}$  24,41 y 16,59mg/mL for the strain FCR3 and 27,1 y 23,26 mg/mL for the strain 3D7, this, The cytotoxic activity valued in the cell line HepG2, bot extracts being low toxic. It should be noted also, the importance in the intention to find new antimalaric from the plants found in the communities in south Colombia.

## RESUMO

A malária é uma doença parasitária com impacto negativo para a saúde humana global, o que motiva a busca por novos medicamentos antimaláricos a partir de plantas medicinais têm mostrado grande potencial in vivo e experimentos in vitro. Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade in vitro contra a malária e citotoxicidade nove extratos preparados a partir de folhas de plantas: *Piper tricuspe*, *Plantago major*, *Solanum nudum*, *Gliricidia Pacífico Sul colombiano Tumaco Nariño*. A atividade foi avaliada em antiplasmódica as estirpes *falciparum* 3D7 e FCR3 *Plasmodium*. Verificou-se que os extractos de etanol preparada a partir de *S. nudum* *P. tricuspe* e tinha um  $IC_{50}$  24,41 e 16,59mg / mL e 27,1 para a estirpe FCR3 e 23,26 mg / mL para a estirpe 3D7, respectivamente; A atividade citotóxica foi avaliada na linha celular HepG2, ambos os extratos são baixos tóxicos. Deve destacar a importância da intenção de encontrar novas drogas antimaláricas de plantas relatados pelas comunidades do sul da Colômbia

## INTRODUCCIÓN

La Malaria ha sido clasificada como una enfermedad de control epidemiológico, causada por un protozooario parásito del género *Plasmodium*; los miembros de esta especie que infectan al hombre son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie*, destacándose los dos primeras en salud pública, por ser *P. falciparum* el más letal y *P. vivax* la de mayor prevalencia [1].

### PALABRAS CLAVES:

Extractos de plantas, Etnobotánica, *Plasmodium falciparum*, Malaria

### KEYWORDS:

Extracts of plants, Ethnobotany, *Plasmodium falciparum*, Malaria

### PALAVRAS-CHAVE:

Extractos de plantas, Etnobotânica, *Plasmodium falciparum*, Malária

Esta enfermedad es endémica en gran parte del territorio nacional, se encuentra localizada en áreas por debajo de los 1500 m.s.n.m [2]. En Colombia se reporta que durante la 31 semana epidemiológica del 2014, se presentaron 295 casos de malaria, de estos 166 por *P. falciparum*, 123 por *P. vivax* [3], mostrando así una alta morbilidad en las poblaciones humanas afectadas. Un factor que impide el control de la malaria es la resistencia a drogas antimaláricas, que es comúnmente vista en infecciones por *P. falciparum* aunque constantemente han sido reportados casos de resistencia en *P. vivax*, motivo por el cual la cloroquina permanece como la droga seleccionada para el tratamiento de la malaria, resistencia que también se ha extendido a otras drogas antimaláricas [4, 5, 6, 7].

El artesunato, entre otros medicamentos para la cura de la malaria, es un derivado de la artemisinina; un compuesto extraído de la planta *Artemisia annua*, la cual ha permitido la nueva búsqueda de antipalúdicos partiendo de los conocimientos de la medicina ancestral y todo lo relacionado con la curación por medio de plantas medicinales, las cuales son una de las valiosas tradiciones de muchas comunidades [8, 9, 10].

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), el 80% de la población mundial, principalmente de países en vía de desarrollo, utilizan las plantas para el cuidado de su salud y más del 50% de los fármacos, actualmente utilizados en el mundo, tienen su origen en los productos naturales y sus derivados. Además, existe un gran potencial para encontrar nuevos medicamentos, debido a que solo el 1 % de las especies tropicales han sido estudiadas para valorar su potencial farmacéutico y la proporción es mucho menor para las especies nativas de zonas lluviosas tropicales; representando una gran reserva de posibles fármacos [11]. Éstas son una fuente de recursos terapéuticos para la obtención de compuestos utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades parasitarias como la malaria, contribuyendo en su quimioterapia, ya sea como agentes antipalúdicos o como cabezas de serie o plantillas para el desarrollo de antimaláricos más potentes [12, 13].

Tumaco es un municipio que cuenta con una gran diversidad de plantas medicinales, las cuales han sido usadas por los ancestros durante muchos años para tratar sus enfermedades. De estas plantas se han reportado estudios de actividad antiplasmodial *in vitro* en *P. falciparum*, *P. vivax*; e *in vivo* en *P. berghei*

[14,15]. En el presente trabajo, se evaluó la actividad citotóxica y antiplasmodica *in vitro* de extractos crudos preparados con solventes de diferente polaridad (etanol, metanol, diclorometano, acetato de etilo y hexano), a partir de las plantas *Piper tricuspe*, *Plantago major*, *Solanum nudum*, *Gliricidia sepium* usadas en la medicina tradicional de Tumaco- Nariño, para el tratamiento de malaria y fiebre relacionada a esta y lo reportado por Blair *et al* 2005 en su libro plantas antimaláricas de Tumaco costa pacífica colombiana.

## MÉTODO

### Recolección y secado de las plantas

Tomando como base los saberes etnobotánicos de algunos curanderos de Tumaco-Nariño y según lo reportado por algunos autores [16, 17, 18, 19], fueron seleccionadas cuatro especies de plantas; distribuidas en las siguientes familias botánicas: Fabaceae: *Gliricidia sepium*, Plantaginaceae: *Plantago major*, Piperaceae: *Piper tricuspe*, Solanaceae: *Solanum nudum*. Las cuales fueron recolectadas en el corregimiento de Tangareal (Latitud: 1.73333 Longitud: -78.5), zona rural del municipio de Tumaco-Nariño, Posteriormente, el material vegetal (hojas y tallos) fue sometido a un proceso de lavado y secado en horno a una temperatura de 40°C durante 48 horas, para luego ser molido con ayuda de una licuadora.

### Preparación de extractos

Para la obtención de los extractos, se tomaron 20 g del material vegetal seco y molido y se sometieron a extracción por Soxhlet [20, 21], durante cuatro horas, empleando 250 mL de solvente (etanol, metanol, Diclorometano, acetato de etilo y hexano), con el fin de garantizar la mayor extracción de todos los metabolitos de interés presentes en la planta. Posteriormente, se concentraron los diferentes extractos a presión reducida en un rotaevaporador para obtener cada uno de los extractos crudos; luego se procedió a rotular cada uno de los extractos obtenidos *P. tricuspe* (PT), *P. major* (PM) *S. nudum* (SN), *G.sepium* (GS<sub>1</sub>, GS<sub>2</sub>, GS<sub>3</sub>, GS<sub>4</sub>, GS<sub>5</sub>, GS).

### Análisis cualitativo

Se hizo una marcha fitoquímica de los extractos por CPF (Cromatografía en Capa Fina), con fase estacio-

narria de silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck®. Las placas cromatográficas se eluyeron en diferentes sistemas de eluciones tales como (Diclorometano–Metanol 20:1, Diclorometano–Metanol 20:2, Hexano–Acetato de Etilo 7:3 y Hexano–Acetato de Etilo 9:1). Consecutivamente, las placas fueron reveladas con lámpara ultravioleta UVGL-58 a 254 nm y con el revelador universal (ácido sulfúrico, ácido acético y agua 50:30:20), reactivo Dragendorff y Yodo [22].

Para completar la detección de los metabolitos de los extractos, se realizaron pruebas cualitativas en tubos con Magnesio en limaduras y gotas de HCl, el cual nos permite la identificación de flavonoides, Cloruro férrico para la identificación de fenoles y reactivo Dragendorff el cual permite la identificación de alcaloides [23, 24, 25,26].

### Evaluación *in vitro* de los extractos

**Ensayos de citotoxicidad.** Con el fin de evaluar la actividad citotóxica de los extractos, se utilizaron las células HepG2 las cuales son una de las líneas celulares más usadas para la evaluación de la citotoxicidad [27, 28]. Estas células se cultivaron en medio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, mantenidas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% [29, 30].

En cámara de Neubauer se contaron las células HepG2, y se procedió a su siembra en placas de 96 pozos de fondo plano (Falcon®) 200.000 células/mL, adicionando 100µL a cada pozo [31], haciendo uso de un control para cada uno de los ensayos. Para lo anterior se evaluó una concentración de 200 mg/mL de cada extracto, por duplicado, de la cual se realizaron diluciones seriadas.

Seguidamente, fue analizada la viabilidad celular siguiendo el método MTT (Este método se fundamenta en la reducción del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), descrito por (Mosmann, 1983) con algunas modificaciones [32, 33]. El método MTT pretende medir células viables en relativo, observar su alto rendimiento (en placas 96); determinado de esta manera la citotoxicidad de medicamentos o extractos en varias concentraciones, además de la actividad mitocondrial de las células, convirtiendo el MTT en formaciones de cristales, la cual es una reacción de oxidación del MTT mediante la actividad metabólica que realiza la mitocondria [34].

Las placas microtituladoras de 96 pozos fueron medidas en un lector de Elisa, el cual expresa la cuantificación óptica de cada pozo; estas mediciones fueron usadas para determinar la CT<sub>50</sub> de los extractos.

En aras de clasificar la citotoxicidad de los extractos, el Grupo de Malaria de la Universidad de Antioquia estableció un consenso para las muestras evaluadas: altamente toxico ≤ 5, promisorio 6-15 µg/mL, moderadamente toxico 16-30 µg/mL, baja toxicidad 31-50 µg/mL y no toxico ≥ 50.

**Actividad Antiplasmodial.** La evaluación de la actividad antiplasmodial de los extractos fue efectuada *in vitro* con cepas 3D7 (sensible a cloroquina) y FCR3 (resistente a cloroquina) de *Plasmodium falciparum*, las cuales fueron mantenidas a un cultivo continuo a 37°C en una atmósfera de mezcla de gases de 5% de O<sub>2</sub> 6% de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> balanceado, según lo descrito por Trager W, *et al* 1976 [35], con algunas modificaciones [36, 37].

Los ensayos para la actividad antiplasmodial de los extractos se realizaron en placas de 96 pozos de fondo plano (Falcon®), evaluándose una concentración 500 µg/mL para cada extracto por duplicado, realizándose así diluciones seriadas. A modo de control del ensayo se usó la Cloroquina a una concentración de 150nM para la cepa 3D7 y 2000 nM para la cepa FCR3. Una suspensión de glóbulos rojos parasitados fue preparada con un hematocrito del 2% y una parasitemia del 1%. Con adición final de 22 µL de hipoxantina radio marcada para cada placa [38, 39]. En consecuencia, el cultivo con los tratamientos fue incubado a 37°C durante 48 horas en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>. Las placas de 96 pozos fueron congeladas a -20°C durante 14 horas, generando así la hemólisis de los eritrocitos. La lectura del ensayo se realizó mediante el contador de centelleo. En aras de clasificar la actividad antiplasmodial se considera lo siguiente, un extracto activo cuando la CI<sub>50</sub> fuese <5 µg/mL, promisorio 6-15 µg/mL, moderadamente activo 16-30 µg/mL, baja actividad 31-50 µg/mL e inactivo >50 µg/mL según [40], y modificación realizadas por el grupo Malaria.

**Análisis estadístico.** Los datos de absorbancia de la prueba de citotoxicidad, obtenidas por el lector de Elisa, se analizaron en una hoja de cálculo electrónico para la determinación de los porcentajes de toxicidad, y el programa *GraphPadPrism*<sup>TM</sup>, versión 5.01, para la determinación de la concentración toxica 50(CT<sub>50</sub>).

Los datos arrojados por el contador de centelleo en la evaluación de la actividad antiplasmodial de igual forma se analizaron en una hoja de cálculo electrónico para la determinación de los porcentajes de inhibición, y el programa *GraphPadPrism™*, versión 5.01, para la determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>).

**Cuadro 1.** Marcha fitoquímica para los extractos de las hojas y tallos de las especies vegetales.

Prueba Cualitativa	Prueba Específica	Especies Vegetales			
		<i>Piper tricuspe</i>	<i>Plantago major</i>	<i>Solanum nudum</i>	<i>Gliricidia sepium</i>
Flavonoides	Mg/HCl	++	+	+	+
Compuestos Fenólicos	FeCl3 10% acuoso	+	-	+	-
Alcaloides	Dragendorff	+++	+	++	++
		+: Poco ++ : Moderado +++ : Abundante - : Ausente			

**Cuadro 2.** Actividad citotóxica de los extractos, evaluada en línea celular HepG2.

PLANTA	EXTRACTO	Toxicidad Célula HepG2(mg/mL)		Clasificación Actividad
		CT <sub>50</sub> *	D.S*	
<i>Piper tricuspe</i> (PT)	Etanólico	41,74	0,7	baja toxicidad
<i>Plantago major</i> (PM)	Etanólico			no tóxico
<i>Solanum nudum</i> (SN)	Etanólico	32,18	10,91	baja toxicidad
<i>Gliricidia sepium</i> (GS)	Acetato de etilo(GS1)			no tóxico
	Metanol(GS2)			no tóxico
	Diclorometano(GS3)			no tóxico
	Hexano(GS4)			no tóxico
	Etanólico 1(GS5)			no tóxico
	Etanólico(GS)			no tóxico
*CT concentración inhibitoria 50				
*D.S desviación estándar				

## RESULTADOS

Los resultados de la marcha fitoquímica indican la presencia de flavonoides en los extractos de las cuatro plantas estudiadas, presencia de compuestos fenólicos para *P. tricuspe*, *S. nudum* y *G. sepium*. En cuanto a la presencia de alcaloides, se presentó poca cantidad en *P. major*, para la especie *P. tricuspe*, en la cual se observó una abundancia de estos metabolitos (véase cuadro 1).

Con respecto a la citotoxicidad, los extractos etanólicos de *P. tricuspe* y *S. nudum* (PT y SN) presentaron una baja toxicidad de 41,74 y 32,18 mg/mL respectivamente, en la línea celular HepG2, según la clasificación dada por el grupo Malaria; los extractos de *P. major* y de *G. cepium*, no tuvieron actividad tóxica sobre la línea celular trabajada a las concentraciones evaluadas, los resultados de estos extractos no se evidencia en el cuadro, debido que los investigadores consideramos no son de relevancia. (Cuadro 2).

Por otro lado, al respecto de la actividad antiplasmodica resumida en el cuadro 3, se encontró que los extractos PT y SN tuvieron actividad antiplasmodial frente a *P. falciparum* en las dos cepas evaluadas (FCR3 Y 3D7), con una concentra-

**Cuadro 3.** Actividad antiplasmodial de los extractos.

PLANTA	EXTRACTO	Actividad cepa FCR-3(mg/mL)			Actividad cepa 3D7(mg/mL)			Clasificación Actividad
		CI <sub>50</sub> *	D.S*	C.V*	CI <sub>50</sub> *	D.S*	C.V*	
<i>Piper tricuspe</i> (PT)	Etanólico	24,41	4,32	18,17	27,1	1,6	5,64	Moderada Actividad
<i>Plantago major</i> (PM)	Etanólico							No activo
<i>Solanum nudum</i> (SN)	Etanólico	16,59	2,37	14,13	23,26	1,40	5,45	Moderada Actividad
<i>Gliricidia sepium</i> (GS)	Acetato de etilo(GS1)							No activo
	Metanol(GS2)							No activo
	Diclorometano(GS3)							No activo
	Hexano(GS4)							No activo
	Etanólico 1(GS5)							No activo
	Etanólico(GS)							No activo
*CI concentración inhibitoria <sub>50</sub>								
*D.S desviación estándar								
*C.V coeficiente de variación								

ción inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ) de 24,41 y 16,59mg/mL en la cepa FCR3. En la cepa 3D7 los extractos PT y SN tuvieron una  $CI_{50}$  de 27,1 y 23,26 y mg/mL respectivamente; mientras que los extractos PM, GS1, GS2, GS3, GS4, GS5 Y GS no presentaron actividad antiplasmodial en ninguna de las cepas trabajadas.

A estas plantas se les ha distinguido por su gran contenido de metabolitos secundarios, como lo presenta la planta *P. tricuspe* de la familia Piperaceae. Las plantas de esta familia se distinguen por su gran contenido de alcaloides y se ha demostrado la actividad de la especie *P. tricuspe* contra *Plasmodium*, con una actividad relativamente alta en cepa FCB-1 de *P. falciparum*, con un  $IC_{50}$  de 1,37mM. De igual forma ya han sido caracterizados tres compuestos de dicha especie vegetal [41], cabe resaltar que este es tercer reporte para esta planta.

Para la especie estudiada en este estudio, el extracto de tallos y hojas presento actividad antiplasmodial frente a las cepas FCR3 Y 3D7 de *P. falciparum*, teniendo una modera actividad con  $CI_{50}$  de 24,41 27,1mg/mL. Estudios realizados por Blair et al 2005 en su libro plantas antimalaricas de Tumaco: costa pacifica Colombiana reportó actividad antiplasmodial para *P. Tricuspe*, en ensayo *in vitro* con cepa (ITG-2) de *P. falciparum*.

Según lo revelan las investigaciones realizadas del grupo Malaria [42, 43, 44], la planta *S. nudum* ha sido altamente estudiada. Estudios químicos de esta especie han demostrado la presencia de esteroides, que son los metabolitos, responsables de la actividad antiplasmodial, dichos esteroides fueron evaluados sobre muestras clínicas de *P falciparum* [45].

Las nuevas observaciones efectuadas para este reporte revelan que el extracto de *S. nudum* se comporta de igual manera que la reportado por el grupo Malaria, obteniendo una  $CI_{50}$  de 16,59 y 23,26 mg/mL en cada una de las cepas, valores muy parecido a muchos de los aportes hechos por el grupo Malaria.

*Plantago major* y *Gliricidia sepium* fueron las plantas que no presentaron actividad antiplasmodial ninguna, aunque Carrillo et al, 2005 [15], informó que *P. major* posee flavonoides, esteroides, alcaloides, saponinas, mono-terpenoides, además de la actividad antiplasmodial parcial frente a *P. berghei* en ensayo *in vivo* en ratones; cabe resaltar que las concentraciones usadas por este autor, fueron altas en un rango

de 500 a 1000 mg/kg, disminuyendo el crecimiento de los parásitos en un 46 y 39%; en las observaciones realizadas en el presente estudio *P. major* no presenta valores significativos de actividad antiplasmodial *in vitro*, ni actividad citotóxica; aunque se ha demostrado la actividad citotóxica de *P. major* en línea celular HepG2 con un  $CI_{50}$  de 174,42 a 496,14 mg/mL [46].

*G. sepium* de igual forma no presentó actividad anti-malárica y citotóxica, esta planta fue escogida para este estudio debido a que muchas personas de Tumaco-Nariño la usan como remedio para el tratamiento del dengue, y así mismo lo reporta Ramírez et al, 2010 [17], con los habitantes de Tumaco que usan esta planta como remedio para esta enfermedad, de la cual se puede observar una disminución de los síntomas y del virus después de su uso; el uso de *G. sepium* en la investigación tenía como propósito observar si esta planta podría tener actividad antiplasmodial; en algunos análisis preliminares realizados por Blair et al, 1990, arrojó resultados positivos para alcaloides, flavonoides, de igual manera, estas pruebas fueron positivas para los extractos de *G. sepium* utilizados en este trabajo de investigación. Castro et al, 1996 [47], reporta actividad antiplasmodial de *G. sepium* contra *P. berghei*, de los extractos polares (acetato de etilo, alcohólicos acuosos), y de igual forma corrobora pruebas positivas para flavonoides y cumarinas. En las observaciones de este estudio se encontró que el extracto de acetato etilo (GS1) y ninguno de los otros extractos de *G. sepium*, no presentó actividad antiplasmodial *in vitro*.

## CONCLUSIONES

De manera general se puede concluir que se obtuvo una modera actividad antiplasmodial y baja actividad citotóxica para los extractos de las especies evaluadas del genero *Piper* y *Solanum*. Dada la concentración inhibitoria 50 y la baja citotoxicidad de estas especies vegetales, se amerita seguir estudios fitoquímicos biodirigidos para la caracterización de sus componentes químicos. Con respecto a la planta *P tricuspe*, aunque se han realizado reportes de algunos compuestos químicos identificados en esta planta, se considera seguir realizando avances para la búsqueda de nuevas medicamentos antimalaricos. De igual forma, este estudio permitió validar los saberes etnobotánicos de las personas que usan estas plantas para sintomatología de la Malaria, lo cual per-



mite investigar y promover la búsqueda de nuevos antipalúdicos a partir de los productos naturales.

## AGRADECIMIENTOS

Al grupo Malaria de la Universidad de Antioquia por permitir la realización de la parte experimental del estudio, el profesor Javier Tabora quien tramitó, por medio del convenio de cooperación entre las dos instituciones, la pasantía de investigación.

## REFERENCIAS

- [1] SUIZA. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Word malaria report. Ginebra (Suiza): 2014, p. 2-4.
- [2] COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Guía de atención clínica de malaria. Bogotá (Colombia): 2010, p. 15-23.
- [3] COLOMBIA. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Boletín Epidemiológico Nacional. Bogotá (Colombia): 2015.
- [4] DAILY, J. Antimalarial Drug Therapy: The Role of Parasite Biology and Drug Resistance. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 46(12), 2006, p. 1487-1497.
- [5] SUIZA. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Methods for Surveillance of Antimalarial Drug Efficacy. Ginebra (Suiza): 2009, p. 3-10.
- [6] ARLETTA, A., NAVARRO, D., YUCRA, O., GARNICA, C., MELGAR, V., MOCOSO, M., ARTEAGA, R. y NAKAO, G. Respuesta terapéutica de Plasmodium vivax a la cloroquina, en Riberalta, Guayaramerin y Yacuiba, Bolivia. *Biomedica*, 32(4). 2012, p. 527-535.
- [7] VÁSQUEZ, A. y TOBÓN, A. Mecanismos de patogenia en la malaria por Plasmodium falciparum. *Biomédica*, 32(1), 2012, p. 106-120.
- [8] CHANG, X. Discovery and Development of Artemisinin and Related Compounds. *Chinese Herbal Medicines*, 9(2), 2017, p. 101-114.
- [9] RODRÍGUEZ, J. Uso y manejo tradicional de plantas medicinales y mágicas en el valle de Sibundoy, alto Putumayo, y su relación con procesos locales de construcción ambiental. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 34(132), 2010, p. 309-326.
- [10] ANGULO, A., ROSERO, R. y GONZALES, M: Estudio etnobotánico de las plantas medicinales utilizadas por los habitantes del corregimiento de Genoy, Municipio de Pasto, Colombia. *Revista Universidad y Salud*, 14(2), 2012, p. 168-185.
- [11] GURIB-FAKIN, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 2006, p. 1-93.
- [12] BERMÚDEZ, A., OLIVEIRA, M. y VELÁSQUEZ, D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 2005, p. 453-459.
- [13] SUIZA. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Estrategias de la OMS sobre la medicina tradicional. Ginebra (Suiza): 2013, p. 25-34.
- [14] BLAIR, S. y MADRIGAL, B. Plantas antimaláricas de Tumaco Costa Pacífica colombiana. 1 ed. Medellín (Colombia): Universidad de Antioquia, 2005.
- [15] CARRILO, T. y DIAZ, A. Actividad antimalarica de extractos crudos de plantas en ratones infectados con Plasmodium berghei. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 47(1), 2005, p. 2-9.
- [16] LONDOÑO, B. et al. Effect of Solanum nudum Dunal (Solanaceae) Steroids on Hepatic Trophozoites of plasmodium vivax. *Phytotherapy Research*, 20(1), 2006, p. 267-273.
- [17] RAMÍREZ, I. et al. El matarraton: potente agente antiviral. Evaluación del efecto terapéutico de Gliricidia sepium en el tratamiento del dengue clásico, Tumaco, Nariño 2007-2008. *Revista Nacional de investigación-Memorias*, 8(13), 2010, p. 9-19.
- [18] ÁLVAREZ, G. et al. Evaluation of Clastogenic Potential of the Antimalarial Plant Solanum nudum. *Phytotherapy Research*, 18, 2004, p. 845-848.
- [19] KRISHNAPPA, K., DHANASEKARAN, S. and ELUMALI, K. Larvicidal, ovicidal and pupicidal activities of Gliricidia sepium (Jacq) (Leguminosae) against the malarial vector, Anopheles stephensi Liston (Culicidae:Diptera). *Asian pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(8), 2012, p. 589-604.
- [20] Extracciones con equipo Soxhlet [online]. Disponible en: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>. Citado [12032017].
- [21] GIRALDO, F. et al. Comparación de métodos de extracción de oleorresina de páprika (Capsicum annum L.) convenciones con una tecnología amigable al medio ambiente. *Producción+Limpia*, 4(1), 2009, p. 17-26.
- [22] VERMA, A., SINGH, N. and KUMAR, A. Phytochemical investigation and Thin Layer Chromatography of asparagus racemosus (family-Asparagaceae) Metanolic leaves extract. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio sciences*, 3(1), 2013, p. 15-18.

- [23] GARRIDO, G., ORTIZ, M. y POZO, D. Fenoles y Flavonoides totales y actividad antioxidantes de extractos de hojas de *Lampara medicinalis* F. Phil. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 1(1), 2013, p. 30-38.
- [24] GARCÍA, M. et al. Actividad fitotóxica de los extractos de Chila Manzano (*Capsicum pubescens* R&P). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 19(4), 2013, p. 23-33.
- [25] BARRÓN, R. et al. Flavonoides y actividad antioxidante de extractos de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovler. *Revista Fitotecnia mexicana*, 34(3), 2011, p. 151-167.
- [26] HERNÁNDEZ, J.E. Análisis fitoquímico y de actividad antimalarica de dos especies del genero *Cecropia* [Tesis Master Pharmaceutical Sciences]. Bogota (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, 2012, 131 p.
- [27] GOMEZ, M.J., CASTELL, J. and DONATO, M. Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. *Chimico-Biologica-Interactios*, 168(1), 2007, p. 30-50.
- [28] CASTAÑEDA, B., IBÁÑEZ, L. y RAMOS, E. Evaluación de la actividad citotóxica in vitro de cinco plantas medicinales peruanas (*Abuta*, *Ajo sacha*, *Moena*, *Murure* y *Tahuari*). *Cultura*, 22, 2008, p. 141-167.
- [29] HUERTAS, P., PABÓN, A., ARIAS, C. Y BLAIR, S. Evaluación del efecto citotóxico y del daño genético de extractos estandarizados de *Solanum nudum* con actividad anti-*Plasmodium*. *Biomedica*, 33(1), 2013, p. 78-87.
- [30] QUISPE, F. et al. Efecto citotóxico selectivo in vitro de *muricinh* (acetogenina de *annonamuricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 23(4), 2006, p. 265-269.
- [31] OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian *Annonaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 2007, p. 630-635.
- [32] LONDOÑO, B. et al. Effect of *Solanum nudum* Dunal (*Solanaceae*) Steroids on Hepatic Trophozoites of *plasmodium vivax*. *Phytotherapy Research*, 20(1), 2006, p. 267-273.
- [33] HUERTAS, P. et al. Evaluación del efecto citotóxico y del daño genético de extractos estandarizados de *Solanum nudum* con actividad anti-*Plasmodium*. *Biomedica*, 33(1), 2013, p. 78-87.
- [34] ESCOBAR, L., RIVERA, A. y ARISTIZABAL, F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Revista de la Facultad de Química Farmaceutica*, 17(1), 2010, p. 67-74.
- [35] TRAGER, W. and JENSEN, J. Human parasites in continuous culture. *Science*, 193(1), 1976, p. 673- 675.
- [36] MESA, A., PABÓN, A. y BLAIR, S. Actividad antiplasmodial in vitro de *Calphyllum*. *Revista Química viva*, 2(1), 2011, p. 118-128.
- [37] ARANGO, E., CARMONA, J. y BLAIR, S. Susceptibilidad in vitro de aislamientos colombianos de *Plasmodium falciparum* a diferentes antipalúdicos. *Biomedica*, 28(2), 2008, p. 213-223.
- [38] CHAPARRO, J. y WASSERMAN, M. Adecuación de una prueba radiométrica para la detección de resistencia múltiple de *Plasmodium falciparum* a diferentes antimalaricos. *Biomédica*, 28(2), 1999, p. 213-223.
- [39] RADA, A., MORENO, C. y BLAIR, S. Exitoso cultivo in vitro de gametocitos de *Plasmodium falciparum*. *Biomedica*, 28(4), 2008, p. 607-615.
- [40] JOVILLE, M. et al. and FRÉDÉRICH, M. Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. *International Society for Ethnopharmacology* 120(3), 2008, p. 382-386.
- [41] SÁEZ, A. et al. Antimalarials and antioxidants compounds from *Piper tricuspe* (*Piperaceae*). *Pharmacology online*, 1, 2008, p. 1-8.
- [42] LOPEZ, M. et al. Induction of cell death on *plasmodium falciparum* asexual blood stages by *Solanum nudum* Steroids. *Parasitology International*, 59(1), 2010, p. 217-225.
- [43] LOPEZ, M. et al. Effect of *Solanum nudum* steroids on uninfected and *plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5), 2009, p. 683-688.
- [44] PABON, A. et al. Inhibition of *P. falciparum* by Steroids Isolated from *Solanum nudum*. *Phytotherapy Research*, 16(1), 2002, p. 59-62.



- 
- [45] ARANGO, E., CARMONA, J. y BLAIR, S. Susceptibilidad in vitro de muestras clínicas colombianas de Plasmodium falciparum a tres esteroides de la plantas Solanum nudum Dunal (Solana-ceae). VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmaceutica, 15(1), 2008, p. 150-156
- [46] KARTINI, et al. HPTLC simultaneous quantification of triterpene acids for qualitycontrol of Plantago major L. and evaluation of their cyto-toxic and antioxidant activities. Industrial Crops and Products, 60, 2014, p. 239-246.
- [47] CASTRO, O. et al. Evaluacion química y biológica del efecto de extractos de plantas contra Plasmodium berghei. Revista Biología Tropical, 44(2), 1996, p. 361-367.