



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE
Azadirachta indica A. Juss PARA LA PRODUCCIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD
ANTIPLASMODIAL**

***Azadirachta indica* A. Juss CELL CULTURES TO PRODUCE
SECONDARY METABOLITES WITH ANTIPLASMODIAL ACTIVITY**

Leidy Carolina Zuleta Castro

Universidad Nacional de Colombia

Sede Medellín

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2019

CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE
***Azadirachta indica* A. Juss PARA LA PRODUCCIÓN DE**
METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD
ANTIPLASMODIAL

Leidy Carolina Zuleta Castro

Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de:

Doctor en Biotecnología

Director

Ph. D Fernando Orozco Sánchez

Codirector

Ph. D Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez

Asesores

Ph. D Adriana Pabón Vidal

Ph. D Diego Luis Durango Restrepo

Universidad Nacional de Colombia

Sede Medellín

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2019

A mi, por tanta paciencia...

“Je n'ai pas de robe sauf celle que je porte tous les jours. Si vous devez avoir la gentillesse de m'en donner une, qu'elle soit s'il vous plaît pratique et sombre afin que je puisse la porter après pour aller au laboratoire”

“No tengo más vestido que el que me pongo todos los días. Si usted, en un arrebato de gentileza, quisiese obsequiarme uno, que sea por favor práctico y oscuro, para que pueda usarlo luego en el laboratorio”

Marie Curie

Agradecimientos

De la manera más profunda y sincera a todas las personas que de una u otra forma compartieron desinteresadamente su tiempo y conocimiento en pro de la culminación exitosa de esta investigación.

ADRIANA PABÓN VIDAL. Bacterióloga. Ph. D. Investigadora Senior del Grupo Malaria. Universidad de Antioquia.

ALEXANDRA MARCELA RÍOS. Microbióloga. M. Sc. Microbiología. Investigadora del Grupo Malaria. Universidad de Antioquia.

GRUPO MALARIA. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia.

LEONARDO BONILLA RAMIREZ. Biólogo, Ph. D. En Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia.

AIDA MARÍA HURTADO MOSQUERA. Auxiliar de laboratorio. Laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

CESAR RAMÍREZ PELAYO. Químico. M. Sc. Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

DIEGO LUIS DURANGO RESTREPO. Químico. Ph. D Profesor Asociado Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

EDISON CAMILO GARATEJO VARGAS. Estudiante de Estadística. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

FERNANDO OROZCO SÁNCHEZ. Ingeniero Químico. Ph.D Profesor Asociado Escuela de Biociencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

GRUPO DE MEDICAMENTOS MICROBIANOS (MWIS GROUP). Centro para la Investigación de Infecciones. Braunschweig, Alemania.

JAIME LEÓN ALZATE ARIAS. Técnico operativo. Laboratorio de Química Orgánica. Universidad. Nacional de Colombia Sede Medellín.

JUAN DAVID LOPEZ TABORDA. Ingeniero Biológico e Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

LABORATORIO DE BIOCONVERSIONES. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

LABORATORIO DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

PABLO ENRIQUE MURILLO VILLANUEVA. Estudiante de Ingeniería Biológica. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

RAFAEL GUILLERMO PEREIRA CARVAJAL. Ingeniero Biológico. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

RODRIGO ALBERTO HOYOS SÁNCHEZ. Biólogo, Ph. D. Profesor Asociado Departamento de Ciencias Agronómicas. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

LILLIBETH CHAVERRA MUÑOZ. Ingeniera Biológica. M. Sc Ciencias-Biotecnología. Investigadora en el Grupo de Medicamentos Microbianos del Centro para la Investigación de Infecciones. Braunschweig, Alemania.

STEPHAN HÜTTEL. Ingeniero en Biotecnología. Ph. D. Coordinador de la Plataforma de Fermentaciones del Centro para la Investigación de Infecciones. Braunschweig, Alemania.

DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN – Colciencias. Programa Doctoral Becas Colciencia. Convocatoria 6172 de 2014.

YOHANNETH PAOLA REYES TORRES. Ingeniera Biológica. M. Sc. Ciencias-Biotecnología.

Adicionalmente, agradezco muy especialmente a Alejandro Navia Álvarez (El Peque), Claudia Álvarez García (La Bruja), Paola Reyes Torres (Polita) y María Isabel Rodríguez Torres (La Costeñita) por haber contribuido desde su apoyo incondicional, sus palabras de aliento y las tazas de café (sin las cuales hubiese terminado la tesis años antes) a que el ánimo y deseo de hacer realidad semejante locura, no se fueran al piso en los momentos más difíciles. También, para el amiguis, la mami y la Chula por siempre estar ahí sin importar las circunstancias y creer en la Nani más de lo que ella misma podría. Finalmente, es menester agradecer a ese elemento de la naturaleza que me enseñó una parte de mi misma que no conocía y que ahora amo profundamente, ese mismo que se convirtió en mi refugio y salvación... ¡El agua!

Contenido

Lista de Figuras.....	i
Lista de tablas.....	iii
Resumen	1
Abstract.....	3
1. Introducción	4
2. Marco teórico.....	7
2.1. El árbol del neem y sus propiedades.....	7
2.2. Cultivo de células en suspensión de <i>A. indica</i> y producción <i>in vitro</i> de sus metabolitos secundarios	10
2.3. Estrés hidrodinámico y elicitación en cultivos de células vegetales en suspensión 12	
2.4.1. Generalidades	14
2.4.2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i>	15
2.4.3. La malaria	16
2.4.4. Breve panorama actual de la búsqueda de tratamientos contra la malaria basada en productos naturales	18
3. Metodología.....	21
3.1. Material vegetal	21
3.1.1. Cultivo de callos de <i>Azadirachta indica</i>	21
3.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares de <i>Azadirachta indica</i> en matraz Erlenmeyer	22

3.2.	Evaluación de condiciones de cultivo que promuevan la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> a nivel de matraz Erlenmeyer	22
3.3.	Evaluación de condiciones de cultivo que promuevan la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> en biorreactor de tanque agitado	26
3.4.	Estimación de los diferentes niveles de energía de disipación en matraz y biorreactor de tanque agitado	26
3.5.	Ensayos de actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> sobre la cepa FCR3 de <i>Plasmodium falciparum</i>	29
3.5.1.	Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	29
3.5.2.	Valoración de la actividad antiplasmodial estadio específico sobre la cepa FCR3 de <i>Plasmodium falciparum</i>	30
3.6.	Extracciones químicas	31
3.6.1.	Extractos etanólicos obtenidos a partir los cultivos celulares de <i>Azadirachta indica</i> a nivel de matraz Erlenmeyer	31
3.6.2.	Extracción y cuantificación de limonoides relacionados con azadiractina (AZRL), producidos a partir de los cultivos celulares de <i>Azadirachta indica</i> en biorreactor de tanque agitado	32
3.6.3.	Fraccionamiento de extractos crudos	33
3.7.	Análisis de fracciones por HPLC y UPLC-ESI-Qtof-MS.....	33
3.8.	Actividad enzimática no específica de la guayacol peroxidasa (GPX)	35
4.	Resultados y discusión	36
4.1.	Actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> a nivel de matraz Erlenmeyer	36
4.2.	Actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> en biorreactor de tanque agitado.....	47
4.3.	Valoración de la actividad antiplasmodial estadio específico sobre la cepa FCR3 de <i>Plasmodium falciparum</i>	63
4.4.	Análisis de fracciones por UPLC-ESI-Qtof-MS.....	68

5. Conclusiones	77
Perspectivas futuras.....	79
Bibliografía	80
Anexos.....	95

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida (<i>Plasmodium</i> spp.)	16
Figura 2. Cultivo de células en suspensión de <i>A. indica</i> usados en la actual investigación. 21	
Figura 3. Efecto de la temperatura, medio de cultivo, elicitores y precursor sobre la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> de los cultivos de celulares de <i>A. indica</i> a nivel de matraz Erlenmeyer.	37
Figura 4. Efecto de las interacciones entre la temperatura, los elicitores y el precursor sobre la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> de células en suspensión de <i>A. indica</i> cultivadas en matraz Erlenmeyer.....	39
Figura 5. Efecto de la temperatura, los baffles, el peróxido de hidrógeno y la concentración de sacarosa sobre la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> de los cultivos celulares de <i>A. indica</i> a nivel de matraz Erlenmeyer. B: presencia de baffles, P: adición de peróxido de hidrógeno.	43
Figura 6. Efecto de las interacciones entre la temperatura, los baffles y la concentración de sacarosa sobre la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> de células en suspensión de <i>A. indica</i> cultivadas en matraz Erlenmeyer.....	44
Figura 7. Parámetros evaluados para las células en suspensión de <i>A. indica</i> cultivadas en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm y 600 rpm.....	49
Figura 8. Variación de la biomasa, la viabilidad celular y la actividad antiplasmodial de los cultivos celulares de <i>A. indica</i> respecto a la energía de disipación.....	50
Figura 9. Esquema simplificado de la ruta biosintética de los limonoides del neem.....	55
Figura 10. Valores máximos obtenidos para los parámetros monitoreados en los cultivos celulares de <i>A. indica</i> respecto a la velocidad de agitación en biorreactor de tanque agitado.	56
Figura 11. Actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> de células en suspensión de <i>A. indica</i> cultivadas en diferentes condiciones.	60

Figura 12. Ciclo eritrocitario de <i>P. falciparum</i> . Estadío específico de acción del extracto proveniente de las células en suspensión de <i>A. indica</i>	64
Figura 13. Estadíos de sensibilidad de <i>P. falciparum</i> al extracto proveniente de las células en suspensión de <i>A. indica</i> y al control cloroquina.	65
Figura 14. Cromatograma UPLC de los compuestos presentes en la fracción de hexano proveniente de las células en suspensión de <i>A. indica</i> cultivadas en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm	69
Figura 15. Espectro de masa del compuesto 1 (m/z 303.8912) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof-MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.	73
Figura 16. Espectro de masa del compuesto 2 (m/z 415.2531) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof-MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.	74

Lista de tablas

Tabla 1. Variación en la composición de los medios basales evaluados en el experimento de producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> a nivel de matraz Erlenmeyer.....	23
Tabla 2. Tratamientos evaluados en el experimento de producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> a nivel de matraz Erlenmeyer.	24
Tabla 3. Tratamientos evaluados en el segundo experimento de producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> a nivel de matraz Erlenmeyer.	25
Tabla 4. Análisis de varianza efectuado para determinar la significancia de las interacciones entre la temperatura, el medio de cultivo, los elicitores y el precursor.	36
Tabla 5. Análisis de varianza efectuado para determinar la significancia de las interacciones entre la temperatura, la presencia de baffles en los matraces, la presencia de peróxido de hidrógeno y la concentración de sacarosa.	42
Tabla 6. Análisis de varianza efectuado para determinar la significancia de las interacciones entre los parámetros evaluados para las células en suspensión de <i>A. indica</i> cultivadas en biorreactor de tanque agitado.	48
Tabla 7. Resumen de los valores de los parámetros evaluados para los cultivos celulares de <i>A. indica</i> en biorreactor de tanque agitado respecto al mayor valor obtenido de la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i>	59
Tabla 8. Identificación tentativa de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de hexano proveniente de las células en suspensión de <i>A. indica</i> , mediante UPLC-ESI-Qtof-MS.	70

Resumen

La malaria causa alrededor de 500.000 muertes anuales en el mundo. El parásito causante de la enfermedad (*Plasmodium sp*) ha adquirido resistencia a los medicamentos actuales lo que obliga a la continua búsqueda de nuevas sustancias bioactivas para su control. En esta investigación, se establecieron condiciones de cultivo para células de *Azadirachta indica* que favorecieran la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro* sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*. A partir de la biomasa cultivada bajo tales condiciones, se obtuvieron extractos y con ellos se realizaron ensayos de actividad sobre el parásito. Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio de actividad biológica para determinar el estadio específico sobre el cual actuaba el extracto más activo y posteriormente, este mismo fue analizado mediante UPLC-ESI-Qtof-MS con el fin de identificar tentativamente algunos compuestos que pudiesen estar implicados en la actividad antiplasmodial. Las mejores combinaciones a nivel de matraz Erlenmeyer fueron: 25°C, 40 gSac/L, sin adición de peróxido de hidrógeno y empleando matraces Erlenmeyer sin baffles ($IC_{50} = 26.16 \mu\text{g/mL}$) y 15 °C, empleando medio MS, en presencia del precursor acetato de sodio, sin adición de elicitores y 30 gSac/L ($IC_{50} = 18.72 \mu\text{g/mL}$, mejor actividad a escala de matraz). Sin embargo, la actividad antiplasmodial *in vitro* fue principalmente promovida en biorreactor de tanque agitado operado a una velocidad de 400 rpm, 30% OD, 30 gSac/L, en oscuridad continua y a 25 °C. Bajo estas condiciones se registró la mejor actividad antiplasmodial de toda la investigación e incluso, se considera promisoría ($IC_{50} = 10.67 \mu\text{g/mL}$). Además, este extracto inhibe el parásito en el estadio trofozoíto inmaduro temprano. Finalmente, se identificaron tentativamente 16 metabolitos dentro del extracto, entre limonoides, diterpenoides y derivados de ácidos grasos. De esta forma, se logró establecer condiciones adecuadas para los cultivos celulares de *Azadirachta indica* que promueven la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro* sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*, siendo dicha actividad promisoría y permitiendo perfilar el cultivo de células en suspensión de neem como una nueva alternativa de producción de antimaláricos.

Palabras clave: antimalárico, biorreactor de tanque agitado, concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) limonoides, malaria, neem, *Plasmodium falciparum*.

Abstract

Malaria causes around 500,000 deaths worldwide each year. It is caused by parasites of the Plasmodium genus, such as *Plasmodium falciparum*, that has acquired resistance to current medications; thus, forcing a continuous search for new bioactive substances to achieve its control. In this research, conditions for *Azadirachta indica* cell cultures were established to stimulate the production of secondary metabolites with *in vitro* antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* (FCR3 strain). Extracts were obtained from the biomass cultivated under those conditions and bioactivity assays were carried out. Additionally, the most active extract was evaluated in a Stage-Specific Timing and also analyzed using UPLC-ESI-Qtof-MS in order to detect some compounds probably involved in antiplasmodial activity. The best culture conditions using shake flasks were: 25° C, 40 gSac / L, no addition of hydrogen peroxide and no baffles (IC₅₀ = 26.16 µg / mL), and 15° C, using MS medium, adding sodium acetate precursor, not using elicitors and 30 gSac / L (IC₅₀ = 18.72 µg / mL, the best activity in this scale). However, *in vitro* antiplasmodial activity was mainly promoted in a stirred tank bioreactor operated at 400 rpm, 30% DO, 30 gSac / L, in continuous darkness and 25° C. The best antiplasmodial activity was enriched under these conditions and is even considered as promising (IC₅₀ = 10.67 µg / mL). Furthermore, this extract inhibits the parasite in the early immature trophozoite stage. Finally, 16 metabolites were tentatively identified within the extract, including limonoids, diterpenoids, and fatty acid derivatives. In this way, it was possible to establish conditions for *Azadirachta indica* cell cultures that promote the production of secondary metabolites with *in vitro* antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum* (FCR3 strain). This activity is promising and sets the cells suspension cultures of neem as a new alternative to the production of antimalarials.

Keywords: antimalarial, half maximal inhibitory concentration (IC₅₀), limonoids, malaria, neem, *Plasmodium falciparum*, stirred tank bioreactor.

1. Introducción

La malaria, también conocida como paludismo es una enfermedad causada por parásitos del Phylum Apicomplexa, como *Plasmodium falciparum*. Para el año 2018, se estimaron cerca de 228 millones de casos a nivel mundial y 405.000 personas muertas a causa de la malaria (World Health Organization, 2019). El Instituto Nacional de Salud, asevera que esta enfermedad representa un grave problema de salud pública en Colombia, debido a que cerca de 85% del territorio rural colombiano está situado por debajo de los 1.600 m.s.n.m y presenta condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para su transmisión. Adicionalmente, lo más preocupante es el hecho de que el control y tratamiento de la enfermedad es cada vez más difícil, pues el parásito causante ha desarrollado resistencia a los medicamentos comúnmente utilizados y es escaso el número de antimaláricos efectivos desarrollados en las últimas décadas. Sin embargo, muchas investigaciones están siendo orientadas a la búsqueda de nuevas alternativas para controlar la malaria, porque inevitablemente, el problema de la resistencia a los medicamentos antimaláricos actuales requiere nuevas alternativas de tratamiento para esta afección.

Innumerables reportes en la literatura dan cuenta de que los extractos provenientes de plantas son una alternativa farmacéutica para tratar la malaria y resaltan la importancia de la búsqueda de nuevas fuentes de medicamentos a partir de los productos naturales (García et al., 2013 ; Mesa et al., 2011 ; Suleman et al., 2017). Simultáneamente, el árbol del neem (*Azadirachta indica*) ha sido catalogado como una especie vegetal productora de compuestos con actividad antiplasmodial, que podrían contribuir significativamente en el control de la malaria (Dhar et al., 1998 ; Somsak et al., 2015 ; Udeinya et al., 2003). Sin embargo, la obtención de dichos compuestos es difícil porque depende de la producción de semillas, ya que la fuente principal de estas sustancias es el aceite que se extrae de ellas. Adicionalmente, la producción de estos órganos es anual y sólo una pequeña porción de ellos es realmente destinada a la extracción de agentes como la azadiractina (compuesto más conocido producido por el neem). Por otra parte, la complejidad estructural de los

compuestos producidos durante el metabolismo secundario del neem dificulta en gran medida su síntesis química y acrecienta los costos de su fabricación. De esta forma y considerando la importancia de los compuestos producidos por *A. indica* y su reducida oferta, se ha implementado el uso de herramientas biotecnológicas para lograr su producción. En los grupos de investigación de Biotecnología Industrial y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín han establecido protocolos para la desinfección de semillas y hojas de neem y para el establecimiento de callos y suspensiones celulares (a nivel de matraz Erlenmeyer y en biorreactores de tanque agitado). Además, se han estudiado algunas condiciones de crecimiento para dichos cultivos, así como su respuesta a diversos factores de estrés y la producción de limonoides con actividad antialimentaria sobre insectos (Vásquez et al., 2015; Villegas et al., 2017).

Problema de investigación: Actualmente y a nivel mundial existe una gran problemática a causa de la deficiencia de tratamientos para controlar la malaria, esto a raíz de la gran capacidad adaptativa del parásito que la causa. Sin embargo, en el presente trabajo se abordará un problema más específico que está ligado al anterior. El árbol del neem (*A. indica*) es una especie vegetal conocida por producir compuestos con actividad antiplasmodial. No obstante, la obtención de estas sustancias es complicada puesto que depende del ciclo de vida del árbol y su síntesis química es muy compleja. Para contribuir a la solución de dicho problema se implementaron algunas estrategias basadas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, con miras a favorecer la actividad antiplasmodial *in vitro* de los extractos provenientes de cultivos celulares de *A. indica*.

Como **hipótesis de investigación** se plantea que el uso de determinado medio de cultivo para las células en suspensión (precursores, elicitores, etc) y las condiciones del cultivo (como la temperatura y la agitación) incrementan la actividad antiplasmodial *in vitro* de los extractos obtenidos a partir de las células en suspensión de *Azadirachta indica*, sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*.

Fundamentado en lo anterior, en este trabajo se planteó como **objetivo principal** establecer condiciones de cultivo para las células en suspensión de *Azadirachta indica* que favorezcan la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro* y describir el efecto de las fracciones bioactivas, provenientes del extracto crudo de dichas células sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*.

Para alcanzarlo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar condiciones de cultivo para las células en suspensión de *Azadirachta indica* que favorezcan la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial en matraces Erlenmeyer.
2. Evaluar la actividad biológica sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum* de los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo celular de *Azadirachta indica* en biorreactor de tanque agitado.
3. Describir el efecto causado sobre la cepa FCR3 *Plasmodium falciparum* por las fracciones bioactivas obtenidas a partir del extracto con mayor actividad biológica.

El cumplimiento de los objetivos específicos 1 y 2 se ve reflejado en las secciones 4.1 y 4.2 del presente manuscrito. El objetivo 3 se resuelve en la sección 4.3. Adicionalmente, se efectuó un análisis químico mediante la técnica UPLC-ESI-Qtof-MS a una de las fracciones de extracto que presentó actividad antiplasmodial *in vitro* sobre la cepa FCR3 de *P. falciparum*. Si bien esta última actividad no hacía parte de los objetivos del presente trabajo, se llevó a cabo con la intención de profundizar un poco en la composición química del extracto obtenido y sentar las bases para futuras investigaciones que puedan encaminarse en esa dirección. Así pues, el análisis químico presentado en la sección 4.4 fue un procedimiento que se desarrolló en adición y cuyos resultados fortalecen significativamente el trabajo aquí presentado.

2. Marco teórico

2.1. El árbol del neem y sus propiedades

El neem (*Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae)) es un árbol vernáculo de la India y Birmania que sólo crece en regiones tropicales y subtropicales. Su crecimiento es rápido y puede alcanzar entre 15 y 20 m de altura. Presenta abundante follaje durante todas las temporadas del año, produce flores de color blanco con fragancia notoria y sus semillas, similares a las aceitunas, describen una forma de ovalo alargado. Gupta et al., (2017) afirman que esta planta es ampliamente reconocida ya que exhibe una gran variedad de propiedades entre ellas medicinales y alimenticias. También que ha sido ampliamente usada en los continentes africano y asiático durante miles de años y que diferentes partes de esta especie vegetal como las hojas, las semillas, las flores y el tallo han sido empleadas para tratar enfermedades tanto agudas como crónicas. De esta forma, el neem ha sido empleado como agente antimicrobiano, insecticida, larvicida, antimalárico, antiviral y espermicida (Gupta et al., 2017). Por otra parte, Figueroa (s.f) asegura que más de 800 reportes en todo el mundo dan cuenta de las capacidades nematocidas de esta especie sin igual y de su potencial antialimentario sobre diversas especies de insectos. Se ha reportado que el neem controla más de 400 plagas de forma segura, perfilándose así, como la alternativa más efectiva para reemplazar los insecticidas químicos que suelen ser extremadamente tóxicos (Saxena, 1998 ; Prakash y Srivastava, 2007). El gusano cogollero del maíz (*Sopodoptera frugiperda*) es un insecto cuyas larvas se alimentan de las hojas tiernas del maíz, del arroz y del algodón ocasionando innumerables pérdidas en el sector agrícola y es una de las especies que puede ser controlada con el neem. Wandscheer et al., (2004) determinaron que el extracto etanólico de semillas de neem ocasionaba la muerte a larvas del tercer y cuarto instar de *Aedes aegypti* (agente transmisor del dengue) y de la misma forma Batabyal et al., (2007) evaluaron un extracto metanólico de semillas de neem y comprobaron que tenía gran efecto larvicida sobre *Anopheles stephensi* (agente transmisor de la malaria).

De otro modo, numerosos estudios se han llevado a cabo con el fin de establecer si el árbol del neem tiene efecto sobre otros sistemas biológicos como el cáncer, parásitos causantes de enfermedades en humanos, virus, bacterias y hongos, siendo los resultados obtenidos muy alentadores y promisorios. Por ejemplo, en la India se encontró que el extracto de neem es un potente inductor de la apoptosis en células de cáncer cervical (Vasenwala et al., 2012); que la azadiractina (principal metabolito secundario producido por la planta) logra disminuir la proliferación celular y la formación de micronúcleos en líneas celulares de glioblastoma humano (Akudugu et al., 2001) y que en combinación con un pH alcalino el extracto de neem causa una alta mortalidad en células de cáncer de mama (Trivedi et al., 2018). Además, Thakurta et al., (2007) evaluaron el efecto antibacterial, antisecretorio y antihemorrágico de un extracto metanólico de hojas de neem sobre *Vibrio cholerae* obteniendo buenos resultados al ensayar sobre una sepa resistente a los medicamentos habituales. Kumar et al., (2018) reportaron para un extracto metanólico de hojas de *A. indica* una alta actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Bhatnagar y McCormick (1998) por su parte, concluyeron que un extracto de hojas de neem redujo en un 98 % la síntesis de aflatoxinas por parte de *Aspergillus parasiticus*. En cuanto a virus se refiere, el Dengue tipo 2 logró ser inhibido por el extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta indica* (Parida et al., 2001).

El efecto ejercido por esta planta sobre parásitos de los géneros *Tripanosoma*, *Plasmodium* y *Leishmania* también ha sido objeto de numerosas investigaciones. Por ejemplo, Cesa et al., (2019) reportan el efecto antiplasmodial y antileishmanial del aceite de semillas de neem. Para el caso de *Plasmodium falciparum* (agente causante de la malaria), Dhar et al., (1998) evaluaron fracciones polares y no polares obtenidas a partir del extracto de semillas de neem tanto en la fase sexual como la asexual de este microorganismo. Encontraron que las fracciones inhibían los trofozoítos, los esquizontes y detenía la maduración de los gametocitos. Además, el estudio se llevó a cabo sobre parásitos que presentaban resistencia a las drogas convencionales empleadas en el tratamiento de la malaria, tales como cloroquina y pirimetamina sugiriendo diferentes modos de acción por parte de las fracciones. También se observó que la azadiractina y algunos de sus derivados semi-

sintéticos bloquean el desarrollo de gametos masculinos móviles de *Plasmodium berghei in vitro* (Jones et al., 1994). En otra investigación más reciente se evaluó y comprobó el potencial antiplasmodial de compuestos derivados del aceite de neem sobre cepas de *P. falciparum* resistentes y sensibles a cloroquina (Yadav et al., 2017). Dahiya et al., (2016) analizaron el potencial de la azadiractina A y del producto comercial NeemAzal® para inhibir la formación de microgametos de *P. berghei* en ratones y la transmisión de *P. berghei* a los mosquitos *Anopheles stephensi* cuando se administra a ratones gametocitémicos antes de la exposición a los mosquitos, respectivamente.

Por su parte, Gupta et al., (2017) relatan que en Nigeria y la India se ha recurrido al neem para tratar la malaria y hacen referencia a su potente actividad antiplasmodial. Priyanka et al., (2013) sugieren que el neem debe ser estudiado más a fondo, pues exhibe una alta y potente propiedad antimalárica que lo perfila como un candidato para nuevos tratamientos de esta enfermedad. En otro estudio se encontró que el extracto etanólico de corteza de *Azadirachta indica* tiene efecto sobre *Trypanosoma brucei* (agente causante de la enfermedad del sueño). Diferentes concentraciones del extracto fueron evaluadas *in vitro* sobre el parásito e *in vivo* sobre ratones infectados y adicionalmente se determinó su toxicidad sobre ratones no infectados. Los experimentos *in vitro* mostraron que las diferentes concentraciones evaluadas del extracto tenían una notable actividad sobre *T. brucei brucei*, con tan solo segundos de inoculación. Aun así, los investigadores a cargo sugieren a la comunidad científica trabajar más profundamente en el potenciamiento de tal efecto (Wulari Mbaya et al., 2010).

Por todas las propiedades expuestas anteriormente, por el hecho de que es una de las primeras plantas mencionadas en el *Siddha medicine* (el sistema médico más antiguo conocido por la humanidad) y debido a su amplio rango de actividad biológica, el neem ha sido llamado: la farmacia de la aldea, la farmacia de la naturaleza, la cura de todo y panacea para todas las enfermedades. No en vano, también se ha citado al neem como “El árbol milagroso de la india” (Gupta et al., (2017).

2.2. Cultivo de células en suspensión de *A. indica* y producción *in vitro* de sus metabolitos secundarios

El significado del término metabolito secundario es basto y extenso, pero en este caso bastará con decir que se trata de una sustancia orgánica sintetizada por un organismo, la cual no desempeña un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. Los metabolitos secundarios de origen vegetal son sustancias químicas sintetizadas por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma tal que su ausencia no es letal para ellas como si lo sería en el caso de un metabolito primario. Muchas de las funciones de los metabolitos secundarios aun no son bien conocidas, pero se sabe que intervienen en la interacción ecológica entre las plantas y su ambiente (Croteau et al., 2000). La azadiractina es considerada el compuesto más importante producido por el neem, de ahí que cientos de investigaciones alrededor del mundo hayan sido encaminadas a su estudio y obtención. Entre el 70 y 90 % de la actividad biológica de la planta es debida a la azadiractina. Además, causa cerca del 90 % de su efecto sobre insectos (Jaramillo, 1996). La complejidad estructural de los compuestos producidos durante el metabolismo secundario del neem dificulta en gran medida su síntesis química y acrecienta los costos de su fabricación. Estas sustancias se producen principalmente en el fruto de la planta, por tal razón la fuente principal de estos metabolitos es el aceite de las semillas. La producción de estos órganos es anual y sólo una pequeña porción de ellos es realmente destinada a la extracción de agentes como la azadiractina (Sidhu y Behl, 1996). Estos mismos autores relatan que debido a la existencia de diferentes genotipos de la planta y su amplia distribución a nivel mundial, el contenido de metabolitos secundarios en las semillas es variable. Muchas investigaciones han sido encaminadas a desarrollar metodologías que permitan la producción *in vitro* de estos compuestos. El establecimiento de callos friables a partir de explantes del árbol y el cultivo de suspensiones celulares son las metodologías que han esclarecido el panorama de la producción de los metabolitos secundarios de *A. indica*. En la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín se ha logrado establecer cultivos de células en suspensión de neem en matraces Erlenmeyer y en biorreactores de

tanque agitado y se han desarrollado investigaciones con el fin de determinar la bioactividad de los extractos provenientes de dichos cultivos. Como resultado de esos trabajos se logró establecer la Dosis Letal Media (DL_{50}) de los extractos de neem sobre *S. frugiperda* y su actividad antifúngica sobre hongos dermatofitos (Trujillo et al., 2008; Ospina, 2012). Se describió el efecto de elicitores abióticos en la producción *in vitro* de azadiractina e incluso se ha profundizado en metodologías para el escalado de las condiciones de crecimiento y producción en biorreactores de tanque agitado (Capataz, 2005 ; Orozco, 2009 ; Vásquez et al., 2015; Villegas et al., 2017).

La producción *in vitro* de los terpenoides del neem comienza con el establecimiento de callos friables mediante condiciones de asepsia. Un callo es un cúmulo de células vegetales desdiferenciadas que crecen en aglomerados. La característica de friable radica en su capacidad de segregarse fácilmente. Los callos pueden establecerse a partir de cualquier explante proveniente de la planta, bien sean segmentos de una hoja, una semilla o una raíz. Estos órganos o tejidos son sometidos a un proceso de desinfección y luego son cultivados en un medio de crecimiento sólido rico en nutrientes que facilitan la producción de los metabolitos de interés (medio MS suplementado como vitaminas y reguladores de crecimiento) (Capataz et al., 2007). Una vez se obtienen callos friables de buen tamaño se procede a cultivarlos en un medio líquido de igual composición al sólido, pero carente de gelificante. Los callos son previamente macerados y puestos luego en matraces Erlenmeyer con el medio de cultivo. Una vez concluido el procedimiento descrito se procede a crecer las suspensiones en condiciones de oscuridad y agitación continua (Capataz et al., 2007). El constante movimiento facilita el mezclado homogéneo de la suspensión y garantiza el acceso por parte de las células a los nutrientes del medio. La oscuridad evita la acción de la luz sobre los metabolitos producidos por las suspensiones celulares durante su crecimiento. Las suspensiones cultivadas a este nivel, constituyen el inóculo para realizar el escalado o cultivo en biorreactores de mayor tamaño como los tanques agitados (Capataz, 2005 ; Orozco, 2009 ; Vásquez et al., 2015; Villegas et al., 2017).

2.3. Estrés hidrodinámico y elicitación en cultivos de células vegetales en suspensión

Las plantas son organismos complejos, altamente especializados y extremadamente sensibles que responden de forma sorprendente, en términos de eficiencia, rapidez y eficacia, a cualquier variación en su entorno (dada su condición de inmovilidad). Tales variaciones, que no son más que desviaciones significativas en las condiciones propicias para la vida, inducen modificaciones a nivel funcional en las plantas. Estas alteraciones reciben el nombre de factores de estrés (Larcher, 1995) y al conjunto de respuestas fisiológicas y bioquímicas que se desencadenan cuando la planta está bajo uno de estos factores, se le conoce como estrés. El estado de estrés es particularmente diferente al estado de desarrollo normal experimentado por las plantas en condiciones óptimas de crecimiento (Benavides, 2002). Entre los factores de estrés más comunes en la naturaleza se encuentran los cambios en la temperatura, la salinidad, la radiación ultravioleta y la disponibilidad de agua. Adicionalmente, las plantas poseen una característica remarcable y es la cantidad inimaginable de sustancias que producen, las cuales el hombre aprovecha desde tiempos inmemoriales. Muchas de ellas se producen naturalmente durante el desarrollo normal de la planta, mientras que otras se originan en respuesta a algún estímulo externo como los factores anteriormente descritos o los elicitores. Estos últimos son en general, productos químicos de diversa procedencia que desencadenan una serie de respuestas fisiológicas y morfológicas, o bien, reacciones de defensa acompañadas de la acumulación de metabolitos secundarios como las fitoalexinas (compuestos antimicrobianos) (Zhao et al, 2005). Los elicitores pueden ser iones metálicos, compuestos inorgánicos, sustancias de origen microbiano o provenientes de depredadores herbívoros. Esto ha sido usado por muchos investigadores con el fin de potenciar la producción de metabolitos secundarios de alto valor agregado en cultivos de células vegetales. Por ejemplo, se ha demostrado que algunos elicitores como el metil jasmonato, el extracto de levadura y el AgNO_3 tienen la facultad de estimular la producción de tanshinona y criptotanshinona en cultivos de raíces adventicias de *Perovskia abrotanoides* Karel (Zaker

et al., 2014). Figueroa y colegas (2014) sugieren la aplicación de ácido salicílico en hojas de *Mentha piperita* para favorecer la producción de compuestos bioactivos y mejorar la capacidad antioxidante de las infusiones a base de menta. Por otra parte, la producción de limonoides con actividad insecticida, como la azadiractina, se ve altamente favorecida en células de *A. indica* cuando son cultivadas en presencia de ácido jasmónico, quitosano y ácido salicílico. Prakash y colegas (2005) lograron aumentar la producción de azadiractina en un 19% cultivando las células de neem en completa oscuridad. Vásquez y colaboradores (2015) confirmaron que el empleo de varios elicitors como el ácido jasmónico, el ácido salicílico y el quitosano también potencian la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares de neem, mediante un cultivo en dos etapas en biorreactor de tanque agitado. En esta última investigación, se observó que la concentración de limonoides producidos aumentaba de 1.03 a 4.32 mg limonoides/g cs (células secas). Otro reporte expone que la producción de azadiractina en matraces Erlenmeyer incrementa desde 2.2 ± 0.13 hasta 7.6 ± 0.35 mg/g después de 24 h de agregar los elicitors al medio de cultivo (quitosano, ácido jasmónico y ácido salicílico) y pasadas 48 h aumenta hasta 17.4 ± 0.01 mg/g (Prakash y Srivastava, 2008). Capataz (2005) por su parte, probó diferentes condiciones de luz y temperatura y evaluó la producción de azadiractina en sus cultivos, estableciendo que la luz y la temperatura baja favorecerían ampliamente la producción del compuesto en matraces Erlenmeyer.

Fuera de esto, las células vegetales suelen estar sometidas a otro tipo de estrés cuando son cultivadas en biorreactores de tanque agitado. Este estrés está relacionado con las condiciones hidrodinámicas del cultivo, las cuales varían con la agitación y la aireación y es conocido como estrés hidrodinámico. Este, acarrea daños a nivel celular que bien podrían ser letales, y conllevar a la muerte por apoptosis o lisis, o subletales, que se reflejarían en alteraciones metabólicas (Trujillo-Roldán y Valdéz-Cruz, 2006). Dichas variaciones podrían ser negativas y manifestarse en la reducción de la viabilidad celular, la liberación de compuestos intracelulares, cambios en el metabolismo (concentraciones de ATP, respiración, contenido total de carbón, composición de la pared celular) y cambios en la morfología o patrones de agregación de las células (Kieran et al., 1997). No obstante,

también podrían acarrear efectos positivos que pueden evidenciarse en el aumento del rendimiento de metabolitos secundarios, de interés comercial, que se estarían produciendo con el fin de cumplir funciones protectoras contra el estrés (Busto, et al., 2007; Namdev y Dunlop, 1995).

2.4. Plasmodium falciparum

2.4.1. Generalidades

Plasmodium falciparum es uno de los parásitos más patógenos del Phylum Apicomplexa y la especie responsable de la forma más severa de malaria humana, una infección recurrente muy grave, aguda y crónica con los índices más altos de complicaciones y mortalidad. Se estiman cerca de 228 millones de casos a nivel mundial y 405.000 personas muertas a causa de esta enfermedad, para el año 2018 (World Health Organization, 2019). El Instituto Nacional de Salud de Colombia, asevera que en América hay transmisión de malaria en nueve países de la región que comparten la selva amazónica, y en ocho países de América Central y el Caribe. En Colombia representa un grave problema de salud pública, debido a que cerca de 85 % del territorio rural colombiano está situado por debajo de los 1.600 m.s.n.m y presenta condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad. Su morbilidad en las últimas tres décadas ha mantenido una tendencia ascendente, y en el nuevo milenio se ha registrado un comportamiento con promedios anuales de 120.000 a 140.000 casos. Desde 1974, los episodios de malaria producidos por *P. vivax* predominan en el país (60 a 65%), aún cuando en regiones como la costa Pacífica la relación favorece a *P. falciparum* (Instituto Nacional de Salud, 2015). En general, este parásito es el causante del 80 % de las infecciones de paludismo, del 90 % de las muertes a causa de esta enfermedad y además es el único capaz de producir malaria cerebral. Es transmitido por dípteros del género *Anopheles* dentro de los cuales se lleva a cabo el ciclo de vida sexual del parásito. Una vez *P. falciparum* ingresa al cuerpo humano infecta los hepatocitos y glóbulos rojos causando la muerte por anemia (Trager and Jensen, 1976 ; Biamonte et al., 2013).

2.4.2. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*

P. falciparum presenta un complejo ciclo de vida que requiere de dos hospederos, uno vertebrado y otro invertebrado. En su hospedero vertebrado, ocurre el ciclo de vida asexual o esquizogónico que comienza con la inyección de esporozoítos mediante la picadura de un mosquito *Anopheles sp.* (Figura 1). Los esporozoítos viajan hasta el hígado donde maduran a estadios conocidos como esquizontes. Después de múltiples replicaciones, éstos dan lugar a 20.000 merozoítos aproximadamente después de sólo 5 días. Los merozoítos al ser liberados al torrente sanguíneo invaden eritrocitos dando inicio al ciclo celular eritrocitario. Los merozoítos se diferencian a anillo y luego a trofozoíto, estadio en el cual incrementan su tamaño, tasa metabólica, síntesis de proteínas e inician la replicación del genoma. Mediante múltiples divisiones nucleares los trofozoítos se transforman en esquizontes, dentro de los cuales se inicia la síntesis de organelos para cada una de las células hijas. Luego de 48 horas, por cada eritrocito infectado se liberan entre 16 a 32 nuevos parásitos que al ser liberados al torrente sanguíneo infectan nuevos eritrocitos. El ciclo sexual o esporogónico es promovido cuando un pequeño porcentaje de parásitos circulantes se diferencia a células sexuales que son transmitidas al mosquito cuando se alimenta de sangre infectada (Grupo de Investigación en Bioquímica de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, 2015; Biamonte et al., 2013). Los gametocitos o células sexuales, son absorbidos por un mosquito hembra durante su ingesta de sangre. Dentro del intestino medio del insecto, los gametocitos masculinos se someten a una división nuclear rápida produciendo ocho microgametos flagelados que fertilizan los macrogametos femeninos originando los ooquistes. Éstos últimos, atraviesan la pared del intestino del mosquito y se enquistan en el exterior de la misma en forma de ooquistes. Pronto, los ooquistes se rompen, liberando cientos de esporozoítos en la cavidad del cuerpo del mosquito, donde eventualmente migran a las glándulas salivales (Medicines for Malaria Venture, 2010).

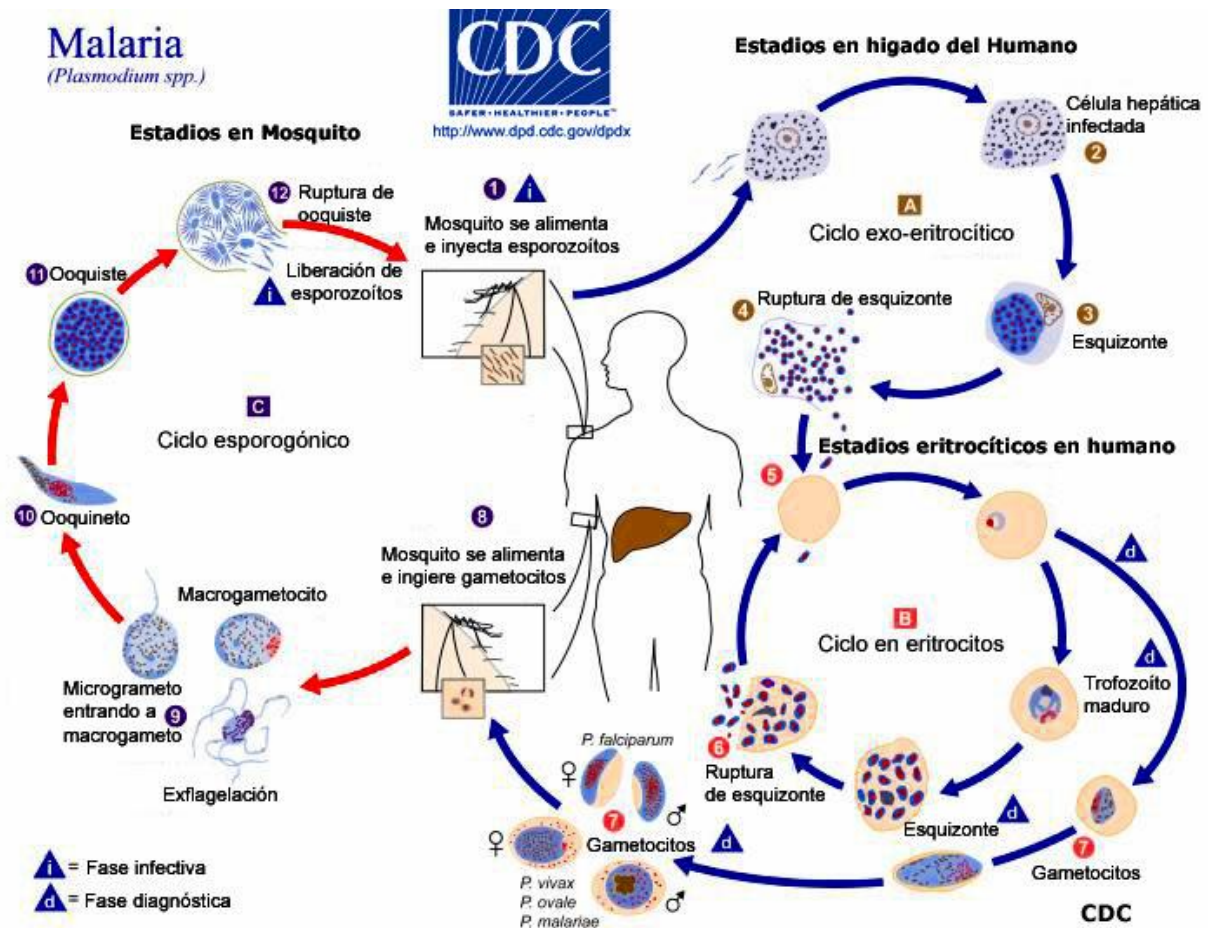


Figura 1. Ciclo de vida (*Plasmodium* spp.)

Tomado de CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2018).

2.4.3. La malaria

La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad caracterizada por paroxismos de fiebre, escalofríos, sudoración, fatiga, anemia y esplenomegalia (aumento considerable en el tamaño del bazo). Después de la infección, los parásitos se desplazan hasta el hígado, donde maduran y posteriormente ingresan en el torrente sanguíneo e infectan los glóbulos rojos. Los parásitos se multiplican dentro de dichas células, las cuales se rompen pasadas de 48 a 72 horas e infectan más glóbulos rojos. Los primeros síntomas se presentan por lo general de 10 días a 4 semanas después de la infección, aunque pueden aparecer incluso a los 8 días o hasta 1 año después de ésta. La mayoría de los síntomas son

causados por la liberación de los parásitos en el torrente sanguíneo, la anemia resultante de la destrucción de glóbulos rojos y las grandes cantidades de hemoglobina libre liberada luego de la ruptura de los eritrocitos. La malaria también se puede transmitir de la madre al feto (de manera congénita) y por transfusiones sanguíneas (Fairhurst y Wellems, 2009). Además, tras la infección por *Plasmodium* la inmunidad no es completa pues previene la enfermedad grave, pero permite futuras infecciones. En algunos casos, los parásitos circulan en bajo número durante mucho tiempo, porque no se les permite multiplicarse rápidamente y causar una infección grave. También se producen episodios repetidos de infección ya que el parásito desarrolla una serie de estrategias de evasión inmunitaria, como la replicación intracelular, la citoadherencia vascular (que evita que los eritrocitos infectados pasen por el bazo), la variación antigénica rápida y la alteración del sistema inmunitario del huésped, que da lugar a una supresión inmunitaria parcial (Nelson, 2013). Lo más preocupante es el hecho que el control y tratamiento de la enfermedad es cada vez más difícil, pues el parásito ha desarrollado resistencia a los medicamentos comúnmente utilizados y es escaso el número de antimaláricos efectivos desarrollados en las últimas décadas. La cloroquina a menudo es empleada como un antipalúdico; sin embargo, las infecciones resistentes a la cloroquina son comunes en muchas partes del mundo. Los posibles tratamientos para las infecciones resistentes a la cloroquina abarcan: combinaciones de derivados de artemisinina (incluyendo artemeter y lumefantrina), atovacuona-proguanil, tratamientos a base de quinina en combinación con doxiciclina o clindamicina y mefloquina en combinación con artesunato o doxiciclina (World Health Organization, 2019 ; Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU, 2015). Siempre se espera que con el tratamiento se obtengan buenos resultados en la mayoría de los casos de malaria, pero el pronóstico es poco alentador ante una infección por *P. falciparum* con complicaciones como la encefalitis, anemia hemolítica, insuficiencia renal y hepática, meningitis, edema pulmonar o ruptura del bazo. También es especialmente preocupante la resistencia emergente a las artemisininas. Si bien los tratamientos basados en combinaciones de diferentes fármacos pueden limitar la resistencia, dicha técnica no es infalible (Biamonte et al., 2013). Estos mismos autores comentan que la proporción de

pacientes que seguía siendo parasitémicos después de algunos días de tratamiento con dihidroartemisinina en combinación con piperquina, aumentó de 26% en 2008 a 45% en 2010, en Camboya.

Es inevitable, el problema de la resistencia a los medicamentos antimaláricos actuales requiere nuevas alternativas de tratamiento para esta afección. Otro desafío es que la resistencia a los medicamentos no es la única característica del parásito. De ahí que sea de gran importancia el desarrollo de nuevas alternativas farmacológicas fundamentadas en el conocimiento básico del agente causante de la enfermedad (Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU, 2015).

2.4.4. Breve panorama actual de la búsqueda de tratamientos contra la malaria basada en productos naturales

Hacia la década del 60 se dan a conocer los primeros casos de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (Carter R y Kamini, 2002). Posterior a los años 80 se da un nuevo descubrimiento, la artemisinina producto de la planta *Artemisia annua* de la familia Asteraceae, conocida comúnmente como qing hao (Haynes, 2006). Ésta fue consumida en forma de té por el pueblo chino durante mil años, para curar la malaria y en 1972 el Gobierno Chino la incluyó en el Programa de Descubrimiento de Nuevos Fármacos. De dicha planta se aisló la dihidroartemisinina (DE_{50} de 9.20 nM) de la cual se derivaron nuevas moléculas como artemeter (CE_{50} de 4.70 nM), arteeter y artesunato de sodio, que hoy en día constituyen los derivados de artemisininas más utilizados para combatir la malaria (Haynes, 2006). Esta nueva sustancia inicia todo su despliegue terapéutico y es la base fundamental sobre la cual descansa la nueva práctica antimalárica (Blair, 2012). Otras especies vegetales como *Calophyllum inophyllum* Linnaeus (Calophyllaceae) y *Solanum nudum* Dunal (Solanaceae) son objeto de estudio pues se perfilan como fuente de nuevas moléculas promisorias en el tratamiento de la malaria. Mesa et al., (2011) determinaron la actividad antiplasmodial *in vitro* de extractos y del ácido ursólico obtenidos a partir de hojas de *C. inophyllum* y los resultados sugieren la presencia de metabolitos activos contra *P.*

falciparum resistente a drogas convencionales. Por su parte García et al., (2013) evaluaron extractos estandarizados de *S. nudum* sobre dos cepas de *P. falciparum*, una sensible (NF54) y la otra resistente (FCB2) a la cloroquina. El pueblo indígena Cubeo de la región amazónica (Vaupés Medio) ha reportado incontables especies vegetales con propiedades medicinales. De ellas, 32 fueron usadas para evaluar actividad antiplasmodial *in vitro* sobre las cepas 3D7 (sensible a cloroquina) y FCR3 (resistente a cloroquina) de *P. falciparum*. 5% de los extractos empleados, provenientes de estas plantas mostraron una actividad antiplasmodial significativa ($IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$) y el 83% de ellos no fueron citotóxicos (Pabón et al., 2016). Suleman et al., (2017) recopilaron información valiosa sobre las especies vegetales medicinales que se emplean en Etiopía para el tratamiento de la malaria y sus síntomas. Determinaron que los conocimientos populares aún desempeñan un rol muy importante en el tratamiento de esta enfermedad. Concluyeron que *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae) *Carica papaya* L. (Caricaceae), *Vernonia amygdalina* Del. (Asteraceae) y *Lepidium sativum* L. (Brassicaceae) son las especies más comúnmente reportadas como plantas antipalúdicas en Etiopía y que su actividad antiplasmodial ya ha sido corroborada de forma experimental. Es de gran importancia retomar en esta sección el trabajo realizado por Dhar y colaboradores (1998), quienes obtuvieron fracciones polares y no polares a partir del extracto de semillas de neem y las evaluaron sobre *P. falciparum* (cepa resistente a la cloroquina y la pirimetamina). Como resultado, encontraron que las fracciones inhibían los trofozoítos, los esquizontes y detenían la maduración de los gametocitos, lo cual sugiere diferentes modos de acción por parte de las fracciones. Además, el efecto anti-hemolítico de un extracto acuoso de hojas de neem fue demostrado por Somsak y colegas (2015), al evaluarlo en ratones infectados previamente con *P. berghei*. En este estudio se evaluó nuevamente el efecto de la pirimetamina, percibiéndose hemólisis en los ratones tratados, pero ésta podía ser contrarrestada si se aplicaba dicho medicamento en combinación con el extracto de hojas de neem. Sumado a lo anterior, investigadores nigerianos en el año 2003 también demostraron la facultad de un extracto (acetona-agua) de hojas de neem, para inhibir la capacidad que tienen los parásitos causantes de la malaria de adherirse a los eritrocitos en el momento de la infección (Udeinya et al., 2003). Finalmente, todas estas

investigaciones permiten pensar en los extractos provenientes de plantas como una alternativa farmacéutica para tratar la malaria y resaltan la importancia de la búsqueda de nuevas fuentes de medicamentos a partir de los productos naturales.

3. Metodología

3.1. Material vegetal

3.1.1. Cultivo de callos de *Azadirachta indica*

La biomasa empleada en las extracciones químicas se obtuvo a partir de suspensiones celulares de neem. Estos cultivos celulares, provinieron a su vez, de callos friables establecidos a partir de semillas de neem. Los callos se cultivaron en un medio compuesto por las sales básicas y vitaminas de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con IBA (ácido indolbutírico) 4.0 mg/L y BAP (bencilamino purina) 1.0 mg/L como hormonas de crecimiento. La fuente de carbono y energía empleada fue sacarosa, suministrada a una concentración de 30 g/L y se agregó phytigel como agente gelificante del medio de cultivo, en una concentración de 1.75 mg/L. El pH del medio se ajustó siempre a 5.8 (Capataz, 2005) (figura 2a). Los medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave a 121 °C, 15 psi y durante 15 min.

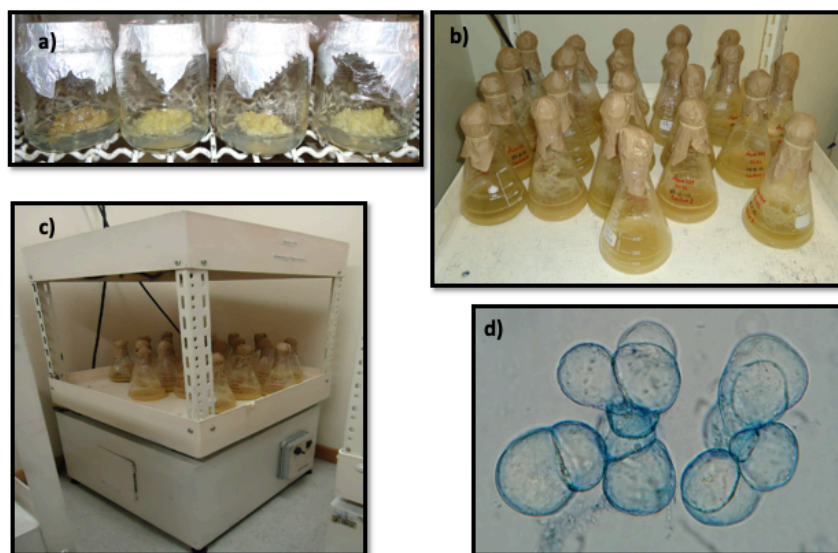


Figura 2. Cultivo de células en suspensión de *A. indica* usados en la actual investigación.

a) Callos de *A. indica*. b) Suspensiones celulares de *A.indica* en matraz Erlenmeyer. c) Sistema de agitación orbital. d) Células de *A.indica* observadas al microscopio (40X)

3.1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares de *Azadirachta indica* en matraz Erlenmeyer

El medio de cultivo empleado para el establecimiento de las suspensiones celulares fue el mismo que se usó en el cultivo de los callos friables; pero sin agente gelificante. Se tomaron matraces Erlenmeyers sin balfes de 500 mL provistos con el medio ya descrito y se inocularon con 1 g de callos friables previamente macerado en condiciones de asepsia. Se incubaron en oscuridad y agitación continua sobre un agitador orbital a 120 rpm (Capataz, 2005). El subcultivo de las suspensiones celulares se llevó a cabo cada 10 días (figura 2b). Estas condiciones de cultivo constituyeron el tratamiento control analizado en esta investigación.

3.2. Evaluación de condiciones de cultivo que promuevan la actividad antiplasmodial *in vitro* a nivel de matraz Erlenmeyer

En otras investigaciones, que preceden a esta, se implementaron diferentes estrategias con el fin de aumentar los rendimientos en producción de biomasa y de metabolitos secundarios por parte de los cultivos celulares de neem. Prakash y Srivastava (2008) y Vásquez (2013), por ejemplo, analizaron el efecto de elicitores como el quitosano, el ácido jasmónico y el ácido salicílico sobre dichas variables. Capataz et al., (2007) estudió el efecto de la temperatura y la Prakash et al. (2005) y Vásquez (2013) modificaron la composición del medio basal (MS) y evaluaron su efecto sobre los cultivos celulares de *A. indica*.

Así pues, para favorecer la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro* a nivel de matraz Erlenmeyer, se evaluó el efecto de la temperatura, del medio de cultivo, de la presencia de elicitores y de un precursor siguiendo las metodologías descritas por Capataz et al., (2007), Prakash et al., (2005) y Vásquez (2013). Estas variables fueron evaluadas en dos niveles diferentes, así:

- Temperatura: 15°C y 25°C.

- Medio de cultivo: se muestra en la tabla 1.
- Elicitores: Quitosano (0.10 g/L), ácido salicílico (137.30 mg/L), ácido jasmónico (2.90 mg/L) y ausencia de los mismos.
- Precursor: acetato de sodio (0.10 g/L y ausencia del mismo).

Tabla 1. Variación en la composición de los medios basales evaluados en el experimento de producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro* a nivel de matraz Erlenmeyer.

Componente	Concentración del medio MS según Murashige y Skoog, 1962. (g/L)	Concentración del medio MS modificado según Prakash et al., 2005. (g/L)
NH ₄ NO ₃	1.65	0.00
KNO ₄	1.90	5.70
KH ₂ PO ₄	0.17	0.094

Las diferentes variables se evaluaron mediante un diseño factorial completo 2⁴ cuyos tratamientos, aplicados por triplicado, se especifican en la tabla 2. Para determinar cuáles de ellos incentivaron la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro*, por parte de las células en suspensión de neem, se obtuvieron extractos crudos y se probó su actividad biológica sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*. Por otra parte, también ha sido reportado un efecto positivo en la producción de metabolitos secundarios en suspensiones de células vegetales debido a la adición de peróxido de hidrógeno a los cultivos (Hao et al., 2014 ; Sahin et al., 2014). De igual forma, el efecto de la concentración de sacarosa en la producción de biomasa para los cultivos en suspensión celular y los cultivos de raíces peludas de *A. indica*, ha sido objeto de estudio en otras investigaciones (Vásquez et al., 2015; Srivastava y Srivastava, 2011).

Tabla 2. Tratamientos evaluados en el experimento de producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro* a nivel de matraz Erlenmeyer.

Tratamiento	Medio de Cultivo	Precursor	Temperatura (°C)	Elicitores
1	MS	Si	15	Si
2				No
3			25	Si
4				No
5		No	15	Si
6				No
7			25	Si
8				No
9	MS modificado	Si	15	Si
10				No
11			25	Si
12				No
13		No	15	Si
14				No
15			25	Si
16				No

Con base en lo anterior, se diseñó un segundo experimento (completamente independiente) en el cual el medio de cultivo MS, los elicitores y el precursor se tomaron como parámetros fijos. La temperatura varió nuevamente y de la misma forma. Se evaluó la actividad antiplasmodial, además, el efecto de la adición de peróxido de hidrógeno, la variación en la concentración de sacarosa y el empleo de baffles en los matraces Erlenmeyer, así:

- Temperatura: 15°C y 25°C.
- Peróxido de hidrógeno: 0.0 nM y 10 nM

- Concentración de sacarosa: 30 g/L y 40 g/L
- Baffles: presencia y ausencia.

De igual forma, las diferentes variables se evaluaron mediante un diseño factorial completo 2^4 cuyos tratamientos, aplicados por triplicado, se especifican en la tabla 3. Para determinar cuáles de ellos incentivaron la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro*, por parte de las células en suspensión de neem, se obtuvieron extractos crudos y se probó su actividad biológica sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*.

Tabla 3. Tratamientos evaluados en el segundo experimento de producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro* a nivel de matraz Erlenmeyer.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Baffles	[H ₂ O ₂] (nM)	[Sacarosa] (g/L)
1	15	Si	10	30
2				40
3			0	30
4				40
5		No	10	30
6				40
7			0	30
8				40
9	25	Si	10	30
10				40
11			0	30
12				40
13		No	10	30
14				40
15			0	30
16				40

3.3. Evaluación de condiciones de cultivo que promuevan la actividad antiplasmodial *in vitro* en biorreactor de tanque agitado

El cultivo de las células en suspensión se llevó a cabo en un biorreactor de tanque agitado de 3 L Applikon Biotechnology® EZ-Control, con un volumen de trabajo de 2 L y un impulsor de seis paletas inclinadas 45°, de flujo ascendente. El medio de cultivo empleado corresponde al descrito previamente para el mantenimiento de los cultivos en matraz Erlenmeyer. Para la aireación de los cultivos, se empleó un difusor poroso de acero inoxidable sinterizado y se controló el oxígeno disuelto en 30% con aire proporcionado por un compresor Schulz® Modelo MS 3. El proceso se llevó a cabo en completa oscuridad y el pH se controló a 5.8 con NaOH 0.3 N.

Para determinar el efecto de la velocidad de agitación en la producción de los metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro*, se evaluaron por duplicado dos velocidades de agitación (400 rpm y 600 rpm). Durante el tiempo de cultivo se tomaron muestras de biomasa y del medio de cultivo para efectuar análisis posteriores de actividad enzimática, presencia de especies reactivas de oxígeno y proteínas totales. Las muestras fueron almacenadas en N_{2(L)} hasta el momento del análisis. La concentración celular de los cultivos fue determinada mediante la estimación del peso seco y la viabilidad celular se midió por tinción de contraste con azul de Evans. Estas variables fueron monitoreadas a lo largo de todos los experimentos. Finalmente, se obtuvieron extractos crudos a partir de la biomasa cultivada en el biorreactor y se probó su actividad biológica sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*.

3.4. Estimación de los diferentes niveles de energía de disipación en matraz y biorreactor de tanque agitado

La velocidad de disipación de la energía máxima, suministrada al cultivo, es uno de los criterios hidrodinámicos más usados para comparar diferentes ambientes a los cuales las

células vegetales en suspensión se puedan ver sometidas bajo diferentes condiciones de operación. Este parámetro ingenieril sirve para caracterizar el estrés hidrodinámico en términos de la dispersión de gases, la ruptura de agregados o pellets y en última instancia, la lisis celular (Henzler, 2000)

Para el cálculo de la energía de disipación máxima suministrada al cultivo en matraces Erlenmeyer se emplearon las correlaciones empíricas reportadas por Büchs et al., (2000), Klöckner y Büchs, (2012) y Peter et al., (2006).

Primero se determinó el régimen de flujo en el que se encontraba el cultivo en matraz agitado según su número de Reynolds.

$$Re = \frac{\rho \times n \times d^2}{\mu} \quad \text{Ec. 1}$$

Siendo ρ la densidad del cultivo (Kg/m^3), n la velocidad de agitación ($1/\text{s}$), d el diámetro mayor del matraz Erlenmeyer (m) y μ la viscosidad dinámica del cultivo ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).

Una vez establecido el valor de Re , se calculó la energía de disipación (ε , W/kg) de la siguiente manera

$$Re < 60000: \varepsilon = P/(V \times \rho) \quad \text{Ec. 2}$$

$$Re > 60000: \varepsilon = \frac{0.1 \times (\pi \times n \times d)^3}{h_1} \quad \text{Ec. 3}$$

En dichas ecuaciones, P representa la potencia (W); V , el volumen de medio en el matraz (m^3); d , el diámetro mayor del matraz (m) y h_1 , la longitud característica de turbulencia, la cual fue determinada en función del número de Froude, el cual relaciona las fuerzas inerciales y gravitacionales en el matraz.

$$Fr = \left(\frac{(2\pi n)^2 \times d_0}{2g} \right) \quad \text{Ec. 4}$$

$$Fr > 0.4: h_1 = 1.11 \times d_0^{0.18} \times d^{-0.11} \times n^{0.44} \times V_L^{0.34} \quad \text{Ec. 5}$$

$$Fr < 0.4: h_1 = 1.31 \times d_0^{0.28} \times d^{0.02} \times n^{0.9} \times V_L^{0.35} \quad \text{Ec. 6}$$

En las ecuaciones 4, 5 y 6, d_0 corresponde al diámetro de órbita del agitador (m); g a la aceleración de la gravedad (m/s^2). Las variables restantes fueron definidas previamente. Para determinar la potencia (P) a nivel de matraz Erlenmeyer y poder usar la ecuación 2, se usó el número de Newton modificado. Este está dado por la siguiente expresión:

$$Ne' = 70Re^{-1} + 25Re^{-0.6} + 1.5Re^{-0.2} = \frac{P}{\rho \times n^3 \times d^4 \times V_L^{-1/3}} \quad \text{Ec. 7}$$

Para el caso del cultivo en biorreactor de tanque agitado, la potencia se estimó según las correlaciones empíricas del número de potencia (P_o) para un impulsor de paletas inclinadas, proporcionadas por Nienow, (1998) y Doran, (1995) y presentadas a continuación:

$$P_o = 0.78(D/T)^{-0.17} (x/D)^{-0.14} \quad \text{Ec. 8}$$

$$P = P_o \rho n^3 D^5 \quad \text{Ec. 9}$$

Siendo D el diámetro del impulsor (m); T , el diámetro del tanque (m) y x , el espesor de la paleta (m). Por otra parte, se sabe que la potencia consumida por el impulsor disminuye cuando se gasifica el cultivo. Sin embargo, no es posible predecir el valor exacto del número de potencia aireada utilizando una turbina de paletas inclinadas. Esto se debe a la formación de cavidades de gas más grandes en comparación con un impulsor tipo Rushton (Cornelis-Gerardus, 1986). No obstante, las oscilaciones de la demanda de potencia para una turbina de paletas inclinadas de bombeo ascendente oscilan entre dos valores extremos. El límite superior es aproximadamente el de la potencia sin gas, y el límite

inferior corresponde a 0.8P [Chapman et al., (1983); Doran, (1999)]. Entonces, se asumió un consumo promedio de energía gaseada (P_g) de 0.9P.

Con el valor del consumo de energía gaseada, se calcularon las tasas de disipación de energía para el biorreactor, tanto en la región cercana al impulsor (local) como el promedio, de acuerdo con las ecuaciones (j) y (k), reportadas por Doran, (1995); Doran, (1999) y Dunlop et al., (1994).

$$\varepsilon = P_g / \rho D^3 \quad \text{Ec. 10}$$

$$\varepsilon_{avg} = P_g / \rho V_L^3 \quad \text{Ec. 11}$$

3.5. Ensayos de actividad antiplasmodial *in vitro* sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*.

3.5.1. Cultivo de *Plasmodium falciparum*.

Los ensayos de actividad biológica *in vitro* para probar efectividad de los diferentes extractos y fracciones obtenidas a partir de los cultivos celulares de neem sobre *P. falciparum*, fueron llevados a cabo en el grupo de investigación Malaria de la Universidad de Antioquia, siguiendo un protocolo basado en las metodologías descritas por Bravo et al., (1999) y Desjardins et al., (1979). Se evaluaron diferentes concentraciones de las fracciones y de los extractos crudos y se empleó el medio de cultivo como control de crecimiento y cloroquina como control del fenotipo resistente de la cepa. La evaluación se llevó a cabo en dos ensayos independientes, en los cuales las diferentes muestras se evaluaron por duplicado, en platos de 96 pozos. Para las diluciones de los extractos y fracciones se empleó DMSO en concentraciones menores al 1%. La actividad antiplasmodial se evaluó sobre la cepa FCR3 de *P. falciparum*, que es un clon aislado en agosto de 1976 de la sangre de un paciente infectado (en Gambia), resistente a cloroquina y cicloguanil; es sensible a pirimetamina y atovacuona (Trager et al., 1981) y se emplearon suspensiones de glóbulos rojos parasitados con predominio de formas jóvenes a un hematocrito del 2 % y una

parasitemia del 1 %. Los cultivos tratados se incubaron a 37 °C durante 48 horas en atmósfera de CO₂ (5 %), O₂ (5 %) y nitrógeno balanceado. Posterior a las 48 horas de incubación se adicionó Sybr Green 1 a una concentración de 2X en cada pozo y pasados 20 min en incubación a la oscuridad, se procedió a la lectura de los platos en el citómetro de flujo BD Accuri™ C6. En este trabajo, los extractos fueron clasificados según su actividad antiplasmodial *in vitro* (IC₅₀) como: altamente activos, aquellos que presentaron una IC₅₀ < 5.0 µg/mL; promisorios, aquellos cuya IC₅₀ estuvo dentro del rango 6.0 – 15.0 µg/mL; de mediana actividad, si la IC₅₀ variaba entre 16.0 – 30.0 µg/mL; de baja actividad, si la IC₅₀ se encontraba dentro del intervalo 31.0 – 50.0 µg/mL y finalmente, aquellos extractos cuya IC₅₀ > 51.0 µg/mL fueron considerado no activos (Jonville et al., 2008).

3.5.2. Valoración de la actividad antiplasmodial estadio específico sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*

Para realizar esta evaluación, se sincronizaron los cultivos de parásitos de la cepa FCR3 en el estadio anillos mediante el protocolo de lisis con D-sorbitol al 5% (Sigma-Aldrich®). Brevemente, la actividad antiplasmodial del extracto obtenido a partir de la biomasa cultivada en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm, se evaluó durante varios períodos de maduración de los parásitos, aplicando el tratamiento cada 4h y por triplicado (Garavito et al., 2007). Se emplearon platos de 96 pozos de fondo plano (Corning® COSTAR 3599), a los cuales se les adicionaron 200 µL de la solución de parásitos a un hematocrito al 2% y parasitemia al 1% y 50 µL de la dilución del extracto a diferentes concentraciones (100 µg/mL a 1.96 µg/mL) en las tres primeras columnas (tiempo cero). Los platos se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ (5%), O₂ (5%) y N₂ balanceado. Pasado el periodo de incubación (4h), el plato se centrifugó a 839g durante 10 min y se retiró el sobrenadante de las tres primeras columnas. Posteriormente se adicionaron 200 µL de medio RPMI-1640 a cada pozo en dichas columnas, se aplicaron en las tres columnas siguientes el tratamiento con el extracto y el plato se incubó durante 4h más. Pasado este tiempo, se realizó el lavado anteriormente mencionado y se repitió el

mismo proceso cada 4h hasta que el período de maduración de los parásitos (aproximadamente 48 h/ciclo) fue completado. Pasado este tiempo de incubación, se adicionaron a cada pozo, 50 μ L de Sybr Green 1 (2X en cada pozo) y se dejó actuar por 20 min para que el fluorocromo se intercalara en el ADN de los parásitos y poder así, detectar la emisión de fluorescencia (Bianco et al., 1986). Transcurridos estos 10 min, se realizó la detección de la emisión de fluorescencia mediante el citómetro de flujo BD Accuri™ C6, medido a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión (Bianco et al., 1986). Finalmente, los datos obtenidos se analizaron mediante una regresión no lineal, con el programa GraphPad Prism™ versión 5.01, para hallar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀).

3.6. Extracciones químicas

3.6.1. Extractos etanólicos obtenidos a partir los cultivos celulares de *Azadirachta indica* a nivel de matraz Erlenmeyer

La biomasa obtenida durante los experimentos a nivel de matraz Erlenmeyer se liofilizó en un liofilizador SYCLON-18N. Una vez seca, se maceró y se mezcló con etanol (96%) en una proporción de 60 mL etanol : 1 gcs. La mezcla se agitó constantemente a 120 rpm y en oscuridad durante una semana. Después de este tiempo, la biomasa fue separada de los extractos mediante filtración y los extractos concentrados al vacío en un rotavaporador IKA® RV 10 Control (cuidando que la temperatura no excediera los 40°C), hasta obtener un volumen aproximado de 1mL. Luego fueron transferidos a tubos plásticos de 2 mL donde el proceso de secado se completó naturalmente a temperatura ambiente (27°C) y completa oscuridad, dejando los recipientes abiertos para facilitar la evaporación del solvente (Zuleta et al., 2017 modificado).

3.6.2. Extracción y cuantificación de limonoides relacionados con azadiractina (AZRL), producidos a partir de los cultivos celulares de *Azadirachta indica* en biorreactor de tanque agitado

La biomasa liofilizada se mezcló con 10 mL metanol (99,97%) y para promover la lisis celular, se llevó a un baño ultrasonido a 25°C durante 30 min. Pasado este tiempo, se recuperó el extracto metanólico mediante filtración y el proceso se repitió dos veces más. Aproximadamente 30 mL de extracto metanólico fueron concentrados al vacío hasta completa sequedad en un rotavaporador IKA® RV 10 Control (cuidando que la temperatura no excediera los 40°C). El recipiente que contenía el extracto metanólico fue lavado varias veces con diclorometano hasta completar un volumen de 10 mL y se realizó un lavado final con 20 mL de este solvente. La fracción de extracto soluble en diclorometano fue depositada paulatinamente en un embudo de separación en el cual se agregaron también, 10 mL de NaCl (1% p/v) con el fin de remover los compuestos polares restantes que pudieran quedar en la fracción de diclorometano. El recipiente se agitó fuertemente y luego la mezcla se dejó reposar durante 15 min aproximadamente, para facilitar la separación de fases. La fase orgánica (fracción de diclorometano) fue colectada y mezclada con NaSO₄ anhidro para promover la coalescencia de las gotas de agua remanentes en la fracción de diclorometano. Por filtración se separó la sal del extracto y este finalmente se concentró hasta sequedad con ayuda del rotavaporador (Vasquez et al., 2015; Villegas et al., 2017).

Las muestras se analizaron en un HPLC marca Shimadzu®. Para ello, se empleó una columna LichroCART 125-4 LiChrosper 100 RP-18 C-18 (125 mm de alto x 4.6 mm de diámetro) como fase estacionaria. El flujo de la fase móvil fue 1 mL/min y su composición fue controlada mediante un gradiente de acetonitrilo/agua iniciando en 35:65, aumentando a 45:55 a los 10 minutos, a 70:30 a los 11 minutos y regresando a 35:65 a los 14 minutos. El volumen de inyección fue de 50 µL. La absorbancia de los limonoides se midió a 213 nm y se comparó con un estándar de azadiractina (Sigma, USA, número de catálogo A- 7430). Los picos que

tuvieron un espectro de absorción similar al de la azadiractina y con un único máximo entre 200 y 218 nm fueron considerados como terpenoides relacionados con azadiractina (AZRL) (Orozco-Sánchez, 2009; Villegas et al., 2017). La curva de calibración se modela en la ecuación 12 ($r^2= 0.9988$) y se elaboró con soluciones de azadiractina en metanol, en un intervalo entre 0.56 y 625.30 ppm

$$\text{Altura (UA)} = 814.19 * [\text{azadiractina (ppm)}] \quad \text{Ec. 12}$$

3.6.3. Fraccionamiento de extractos crudos

Los extractos etanólicos obtenidos a partir de los cultivos celulares de neem en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm fueron sometidos a lavados sucesivos con diferentes solventes (particiones sucesivas). Primero, se adicionaron 100 mL de agua destilada al recipiente donde se encontraba el extracto seco, se agitó y se depositó el enjuague en un embudo de separación. Posterior a esto, se agregaron 100 mL de hexano al resto del extracto seco que no fue solubilizado por el agua y nuevamente se agitó. Esta nueva solución se mezcló con la acuosa dentro del embudo y luego de agitarlas fueron separadas por decantación. Este procedimiento se llevó a cabo tres veces con cada solvente. Los solventes empleados en las siguientes particiones sucesivas fueron: diclorometano, acetato de etilo y una mezcla de etanol-metanol. Las diferentes fracciones resultantes de este proceso fueron concentradas al vacío en un rotavaporador IKA® RV 10 Control.

3.7. Análisis de fracciones por HPLC y UPLC-ESI-Qtof-MS

Sólo las fracciones que presentaron actividad antiplasmodial *in vitro* sobre la cepa FCR3 de *P. falciparum* fueron tenidas en cuenta en esta parte de la investigación. Así pues, tanto la fracción diclorometano como la fracción hexano fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en ingles: high performance liquid chromatography) en un equipo marca Shimadzu®. Se empleó una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (150 mm de alto x 4.6 mm de diámetro y 5.0 µm de diámetro de poro) como fase estacionaria. El flujo de la fase móvil fue 0.5 mL/min y su composición fue controlada

mediante un gradiente de acetonitrilo/agua iniciando en 15:85, aumentando a 30:70 a los 10 minutos, a 60:40 a los 20 minutos, a 65:35 a los 30 minutos, luego a 75:25 a los 35 minutos, a 100:0 a los 40 minutos y finalmente se mantuvo esta última proporción hasta completar 60 minutos. El volumen de inyección fue de 50 μ L y la temperatura de la columna fue 30°C.

Posteriormente, la fracción de hexano fue analizada mediante UPLC-ESI-Qtof-MS. Se empleó dicha fracción ya que los cromatogramas de HPLC, obtenidos previamente, permitieron determinar que los compuestos de la fracción de diclorometano se encontraban también en la fracción de hexano. Por otra parte, esta fracción lucía mas limpia (picos mejor resueltos). La cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC por sus siglas en ingles: ultra performance liquid chromatography) se llevó a cabo usando un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) equipado con un administrador de suministro de solvente cuaternario, un administrador de muestras acoplado a un Xevo-G2-XS-Q-Tof y espectrómetro de masas equipado con una interfaz de electrospray (Waters Corporation). Las separaciones cromatográficas, para la fracción de hexano, se realizaron en una columna de cromatografía Zorbax Eclipse Plus (150 mm de alto x 4.6 mm de diámetro y 5.0 μ m de diámetro de poro). La temperatura de la columna se mantuvo a 30 ° C. El flujo de la fase móvil y su composición fue controlada de la misma manera que en el análisis por HPLC detallado anteriormente para las fracciones de extracto. El espectrómetro de masas fue operado en modo de ion positivo. La temperatura de desolvatación fue de 486° C, el caudal fue de 1000 l / h, y la temperatura de la fuente fue de 110 ° C. Los voltajes capilar y cono fueron 500V y 30V, respectivamente. Los datos se recopilaron para cada muestra de prueba de 50 a 1200 Da con un tiempo de escaneo de 0.5 s y un retardo entre exploraciones de 0.01 s durante un tiempo de análisis de 70 min.

3.8. Actividad enzimática no específica de la guayacol peroxidasa (GPX)

Este análisis se efectuó sobre las células en suspensión de *Azadirachta indica* cultivadas a diferentes velocidades de agitación (120, 400 y 600 rpm), con la intención de comparar la actividad antiplasmodial *in vitro* registrada en cada caso con la actividad enzimática de la GPX, enzima perteneciente a la maquinaria antioxidante de las plantas. De esta manera, podría especularse sobre la posible relación existente entre la producción de compuestos bioactivos y la acción de esta enzima, involucrada en la respuesta al estrés oxidativo.

Modificando los métodos descritos por Velikova et al., (2000), Goud et al., (2013) y Villegas (2015), para la actividad enzimática no específica intracelular de la GPX, se maceraron 0.15 g de biomasa fresca con $N_2(L)$. Luego se agregó 1 mL de buffer fosfato 10 nM, pH 7.0 con polivinilpirrolidona (PVP) al 4% p/v. La mezcla se centrifugó a 14000 g durante 30 min y a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (extracto crudo) y se almacenó a -20°C hasta el momento del análisis. Para ésto, se tomaron 60 μ L de sobrenadante y se mezclaron con 600 μ L de guayacol (1% p/v), 150 μ L H_2O_2 (30%) y buffer fosfato 10 nM, pH 7.0 hasta completar un volumen de 3 mL. La absorbancia de las muestras se midió a 470 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific® GENESYS 20. La velocidad de reacción inicial lineal se empleó para calcular la actividad enzimática usando un coeficiente de extinción molar de $26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Maehly y Chance, 1954). La actividad enzimática se expresó en unidades de mM Tetraguayacol (TG)/min.

4. Resultados y discusión

4.1. Actividad antiplasmodial *in vitro* a nivel de matraz Erlenmeyer

Se analizó el efecto de la temperatura, del medio de cultivo, de un conjunto de elicitores y de un precursor sobre la actividad antiplasmodial *in vitro*, mediante un diseño factorial completo de efectos fijos 2⁴ (tabla 2 sección 3.2). La tabla 4 resume los resultados del análisis de varianza realizado para determinar la significancia de las interacciones entre los factores estudiados (en el análisis se eliminaron las interacciones no significativas)

Tabla 4. Análisis de varianza efectuado para determinar la significancia de las interacciones entre la temperatura, el medio de cultivo, los elicitores y el precursor.

Factores e interacciones	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Pr(>F)	Significancia de la interacción
T	1	1680.0	0.003552	**
E	1	632.9	0.036825	*
P	1	1680.0	0.003552	**
TE	1	1623.9	0.003907	**
TP	1	3150.3	0.000521	***
EP	1	1623.9	0.003907	**
TEP	1	632.9	0.036825	*

Siendo T, la temperatura (°C); E, los elicitores (quitosano, ácido salicílico y ácido jasmónico) y P, la presencia del precursor (acetato de sodio). El número de (*) es proporcional a la significancia de la interacción

En la figura 3 se pueden apreciar los tratamientos agrupados según las diferencias significativas que existen entre ellos y que fueron establecidas después de someter los datos a un test LSD de Fisher. Los tratamientos que no favorecieron la actividad antiplasmodial se agruparon en una sola barra (Otros) y fueron especificados previamente en la tabla B.

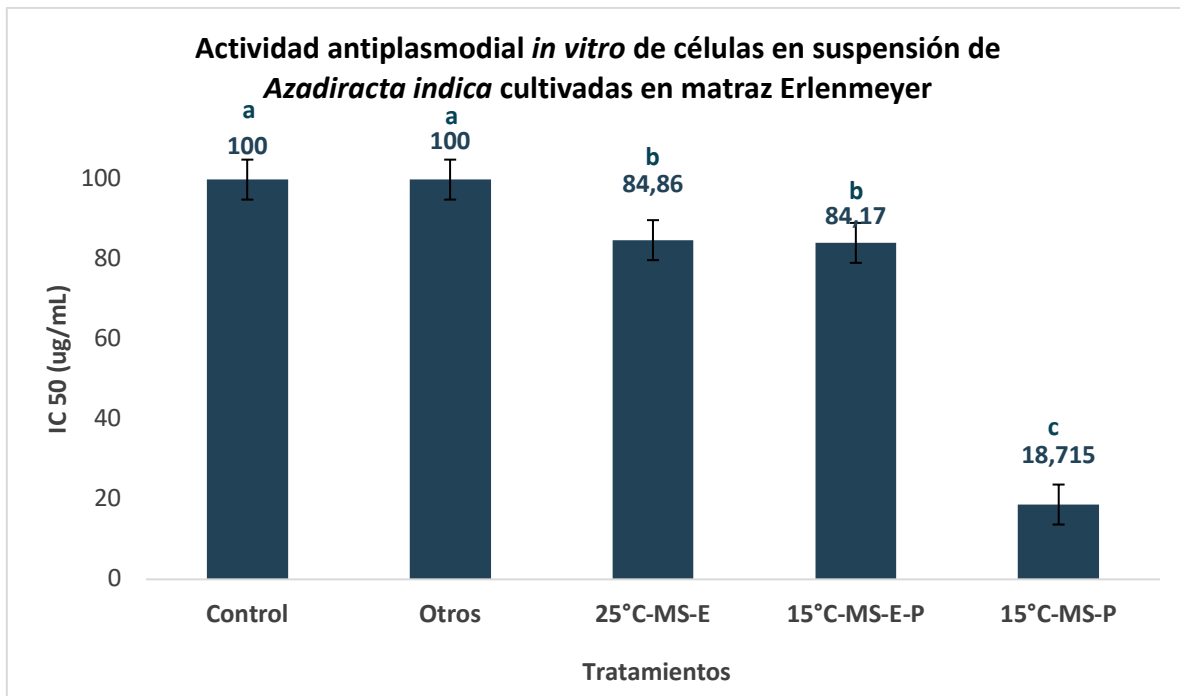


Figura 3. Efecto de la temperatura, medio de cultivo, elicitores y precursor sobre la actividad antiplasmodial *in vitro* de los cultivos de celulares de *A. indica* a nivel de matraz Erlenmeyer.

MS: Medio de cultivo MS, P: adición del precursor, E: adición de elicitores, Otros: demás tratamientos evaluados en el experimento. Tratamientos con la misma letra, no tienen diferencia significativa según el test LSD de Fisher, nivel de significancia del 95%.

La mejor combinación de los factores analizados fue 15°C, medio MS, en presencia del precursor y sin adición de elicitores. La IC₅₀ para el extracto obtenido de la biomasa cultivada bajo estas condiciones fue 18.72 µg/mL y se considera de mediana actividad, según la clasificación hecha por Jonville et al., (2008). Todos los tratamientos en los que se evaluó el medio de cultivo MS modificado, registraron IC₅₀ mayores a 100 µg/mL. Para dicho rango de concentración, cualquier sustancia se considera carente de actividad

antiplasmodial *in vitro*. Por tal razón, para el análisis estadístico de los resultados (en esta fase de la investigación) no se tuvo en cuenta como tal, el factor “medio de cultivo”. Es decir, sólo se analizaron los tratamientos que involucraron el medio de cultivo MS.

Según la revisión realizada en este trabajo, no existen reportes previos sobre la actividad antiplasmodial *in vitro* de extractos obtenidos a partir de cultivos celulares de *Azadirachta indica* y se desconoce, por tanto, la identidad de los compuestos responsables de dicha propiedad en este caso específico. Sin embargo, se ha reportado que, al modificar la fuente de carbono, el nivel de fosfato y las proporciones nitrato/amonio y/o carbono/nitrógeno dentro del medio de cultivo (como en el caso del medio MS modificado), se favorece la producción de azadiractina y otros limonoides relacionados con ese compuesto, por parte de los cultivos celulares de neem (Vásquez et al., 2015; Sujanya et al., 2008; Prakash y Srivastava, 2005). Si bien, en esta fase de la investigación no se analizó la producción de limonoides relacionados con azadiractina, es de esperar que los tratamientos que involucraron el medio MS modificado favorecieran la producción de dichos compuestos. Entonces y dado que la mayor actividad antiplasmodial *in vitro* se obtuvo con el medio de cultivo MS (en contraste con el MS modificado que no favoreció la actividad antiplasmodial en ninguno de los casos en los que fue evaluado), podría suponerse inicialmente que los metabolitos responsables de la actividad biológica sobre *P. falciparum* no son los limonoides relacionados con azadiractina. Estos últimos compuestos, entre otras cosas, son reconocidos por poseer actividad antialimentaria sobre insectos.

La figura 4 muestra cómo interactúan entre sí la temperatura, los elicitores y el precursor (que fueron los otros tres factores estudiados en este experimento) y allí se observa cómo la actividad antiplasmodial *in vitro* de las células en suspensión de *Azadirachta indica* se ve afectada por las interacciones (estadísticamente significativas) entre dichos factores.

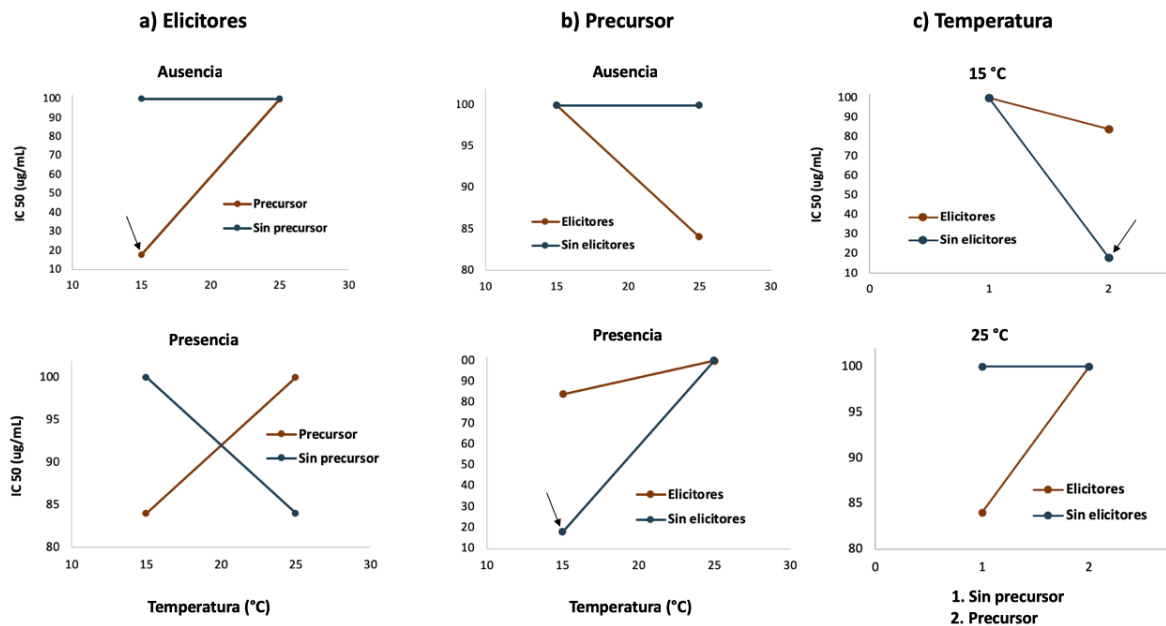


Figura 4. Efecto de las interacciones entre la temperatura, los elicitores y el precursor sobre la actividad antiplasmodial *in vitro* de células en suspensión de *A. indica* cultivadas en matraz Erlenmeyer.

a) Interacción TEP fijo E. b) Interacción TEP fijo P. c) Interacción TEP fijo T. Nivel de significancia del 95%.

Las interacciones de tercer orden (entre la temperatura, los elicitores y el precursor) plasmadas en la figura 4, permiten analizar el comportamiento de la IC_{50} dependiendo exclusivamente, de la variación de tres de los factores estudiados. Esto es posible ya que se fija uno de estos factores en alguno de sus dos niveles, mientras los demás sí varían entre nivel y nivel. Por otra parte, se dice que existe interacción entre dichos factores cuando las líneas de la gráfica presentan un comportamiento antiparalelo. En la figura 4 entonces, se observa que efectivamente existe interacción entre la temperatura, los elicitores y el precursor evaluados puesto que las líneas de la gráfica no son paralelas y además dicha interacción es estadísticamente significativa ($p\text{-value} = 0.036825$). Adicionalmente, en la figura 4 se señala con una flecha la combinación de niveles, en cada interacción entre factores, que se asocia con la menor IC_{50} . Ahora bien, en cada una de las tres interacciones de tercer orden, la combinación de niveles que más favorece la actividad antiplasmodial *in vitro*, por parte de las células en suspensión de *Azadirachta indica*, es 15 °C, medio MS, en

presencia del precursor y sin adición de elicitores, como ya se había mencionado anteriormente. Por otra parte, este resultado coincide completamente con el obtenido al efectuar el test LSD de Fisher y que se presentó previamente en la figura 3.

Prakash y Srivastava (2011) y Shinde et al., (2009) comentan en sus reportes que suplementar los medios de cultivo con precursores, como el acetato de sodio, aumenta significativamente la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. Dentro de las células, el acetato de sodio se transforma en ácido acético y acetil coenzima A. Un aumento en los niveles intracelulares de acetil coenzima A podría promover el ciclo de los ácidos tricarbónicos y el metabolismo energético en general. De esta manera, la actividad celular (metabolismo celular) podrían mejorarse y esto potenciaría significativamente la producción de metabolitos secundarios (Dongping et al., 2001).

En lo que a la temperatura concierne, la mayor actividad antiplasmodial *in vitro* se alcanzó con las células cultivadas a 15 °C. Si bien, Capataz y colaboradores (2007) enfocaron su investigación en la evaluación del efecto antialimentario de los cultivos celulares de neem, sobre insectos, ellos informan en su reporte que dicha actividad se vio afectada por la temperatura y que fue especialmente potenciada a 15 °C; tal y como sucedió en este trabajo.

En la ecuación 13 se modela la variación estimada de la IC₅₀ dependiendo de la temperatura, los elicitores y el precursor.

$$\widehat{IC50} = 10.247 T + 6.289 E - 10.247 P - 10.074 TE + 14.032 TP \\ + 10.074 EP - 6.289 TEP \quad \text{Ec. 13}$$

Siendo T, la temperatura (°C); E simboliza la presencia de elicitores (quitosano, ácido salicílico y ácido jasmónico) y P, la presencia del precursor (acetato de sodio). Con $r^2 = 0.87$ y $p\text{-value} = 4.45 \times 10^{-4}$.

Según Sato et al., (2001) tanto los procesos celulares (en general) como la regulación y activación de la biosíntesis de un metabolito secundario en las plantas, inician con una señal extracelular o intracelular que es percibida por un receptor en la superficie de la membrana plasmática. De la misma forma, el reconocimiento de un elicitor inicia una red de transducción de señales que conduce a la activación o biosíntesis de novo de los factores de transcripción, que regulan la expresión de genes biosintéticos involucrados en el metabolismo secundario de la planta (Sato et al., 2001). El reconocimiento molecular y la interacción física entre el elicitor y los receptores específicos de la planta son procesos muy complejos, pero se requieren para la transducción de señal de un elicitor específico. Al provocar cambios en la conformación del receptor o la activación de las quinasas receptoras, los elicitores activan de forma indirecta sus correspondientes efectores (canales iónicos, las proteínas G, las lipasas y las quinasas) quienes luego transducen la señal del elicitor a una respuesta de defensa *downstream* (aquella que tiene lugar después de la activación de los receptores de membrana o de los segundos mensajeros) (Zhao et al., 2005). De esta manera, haber añadido quitosano, ácido salicílico y ácido jasmónico al medio de cultivo como elicitores, estarían aumentando significativamente la producción de limonoides en cultivos celulares de neem, según lo reportado por Vásquez et al., (2015). Prakash y Srivastava (2008) también comprobaron que el efecto sinérgico de estos elicitores favoreció la producción de azadiractina en este tipo de cultivo.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y de forma completamente independiente, se llevó a cabo otro experimento donde se evaluó el efecto de la temperatura, de la concentración de sacarosa, de la presencia de baffles en los matraces y de la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo. En esta ocasión, el medio de cultivo empleado fue MS y se suplementó con elicitores y el precursor en todos los casos. Este experimento se llevó a cabo mediante un diseño factorial completo de efectos fijos 2^4 y los datos obtenidos fueron sometidos a un test LSD de Fisher. Nuevamente se analizó la significancia de las interacciones entre factores y dichos resultados se presentan en la tabla 5 (en el análisis se eliminaron las interacciones no significativas).

Tabla 5. Analisis de varianza efectuado para determinar la significancia de las interacciones entre la temperatura, la presencia de baffles en los matraces, la presencia de peróxido de hidrógeno y la concentración de sacarosa.

Factores e interacciones	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Pr(>F)	Significancia de la interacción
P	1	2342.4	0.002968	**
S	1	549.7	0.115438	
T	1	8568.7	3.072x10 ⁻⁶	***
B	1	44.3	0.644981	
PS	1	697.0	0.078783	
TB	1	44.3	0.644981	
PT	1	2342.4	0.002968	**
PB	1	893.0	0.049062	*
ST	1	549.7	0.115438	
SB	1	1316.5	0.019436	*
PTB	1	893.0	0.049062	*
STB	1	1316.5	0.019436	*

Siendo T la temperatura (°C); B, la presencia de baffles; P, la presencia de peróxido de hidrógeno y S, la concentración de sacarosa (g/L). El número de (*) es proporcional a la significancia de la interacción

En la figura 5 se pueden apreciar los tratamientos agrupados según las diferencias significativas que existen entre ellos. En esta ocasión, el análisis estadístico no señaló un tratamiento en particular, como el “mejor”, sino a un grupo de tres posibles candidatos:

- 25°C – B – 40 gSac/L con una IC₅₀ de 38.92 µg/mL, considerado de baja actividad
- 25°C – B – 30 gSac/L con una IC₅₀ de 35.57 µg/mL, considerado de baja actividad.
- 25°C – 40 gSac/L con una IC₅₀ de 26.16 µg/mL, considerado de mediana actividad.

Entre estos tratamientos no existe ninguna diferencia significativa según el test LSD de Fisher.

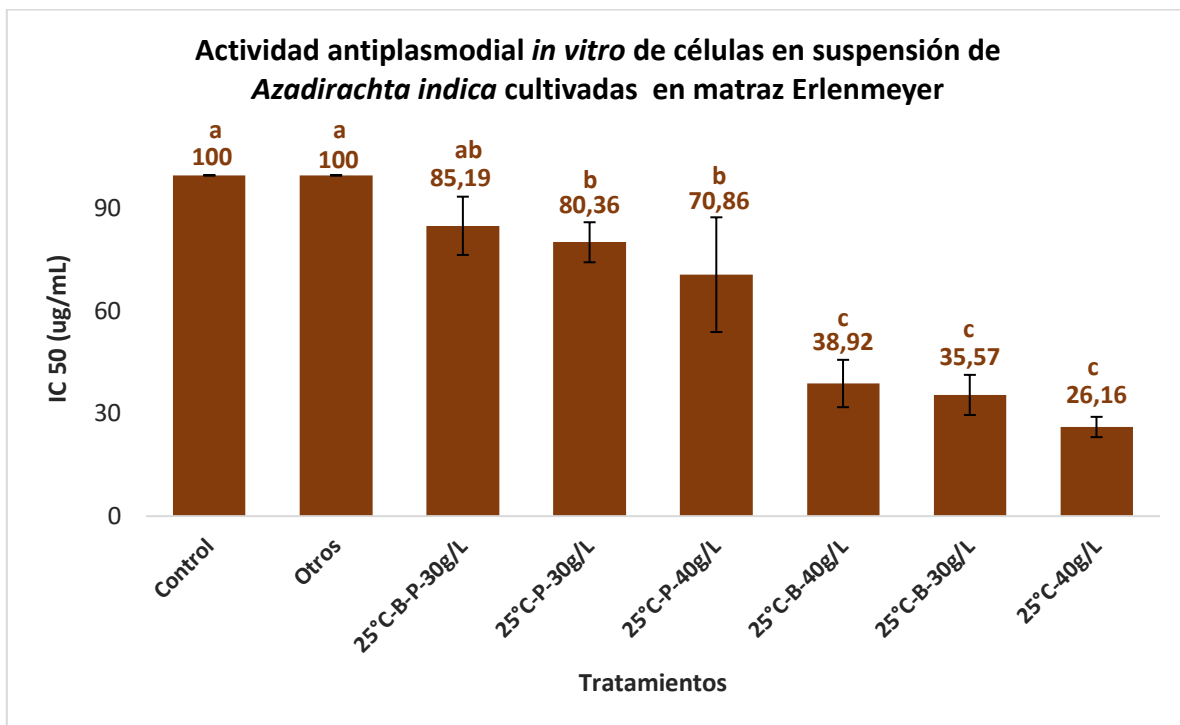


Figura 5. Efecto de la temperatura, los bafles, el peróxido de hidrógeno y la concentración de sacarosa sobre la actividad antiplasmodial *in vitro* de los cultivos celulares de *A. indica* a nivel de matraz Erlenmeyer.

B: presencia de bafles, P: adición de peróxido de hidrógeno. Tratamientos con la misma letra, no tienen diferencia significativa según el test LSD de Fisher, nivel de confianza del 95%.

Para este experimento, también se llevó a cabo un análisis de las interacciones de tercer orden entre la temperatura, la concentración de sacarosa, la presencia de bafles en los matraces y la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo. En la figura 4 se pueden observar dichas interacciones para tres de los cuatro factores analizados.

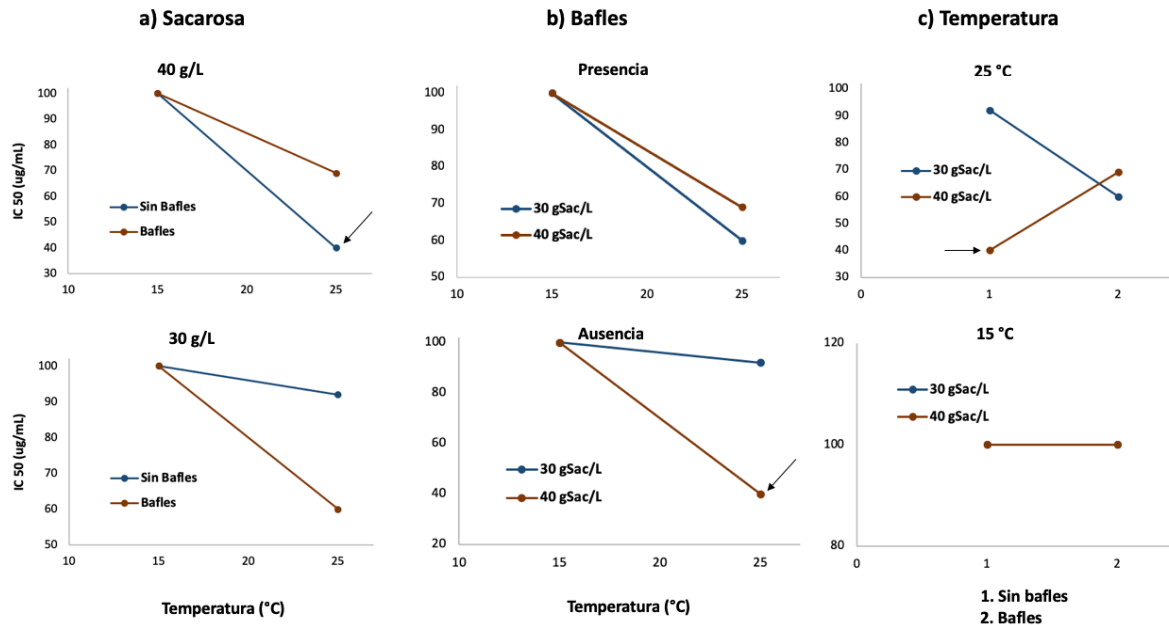


Figura 6. Efecto de las interacciones entre la temperatura, los bafles y la concentración de sacarosa sobre la actividad antiplasmodial *in vitro* de células en suspensión de *A. indica* cultivadas en matraz Erlenmeyer.

a) Interacción TBS fijo S. b) Interacción TBS fijo B. c) Interacción TBS fijo T. Nivel de significancia del 95%.

Las interacciones de tercer orden plasmadas en esta figura permiten analizar el comportamiento de la IC_{50} dependiendo exclusivamente de la variación de tres de los factores estudiados. Esto es posible ya que se fija uno de los factores en alguno de sus dos niveles, mientras los demás sí varían entre nivel y nivel. La figura 6 ilustra la interacción existente entre la temperatura, los bafles, el peróxido de hidrógeno y la concentración de sacarosa, puesto que las líneas de la gráfica no son paralelas y además dicha interacción es estadísticamente significativa ($p\text{-value} = 3.85 \times 10^{-5}$). Adicionalmente, las interacciones apuntan a un grupo de tres tratamientos, como los mejores y cuyas IC_{50} fueron menores de $50 \mu\text{g/mL}$. Esto es consistente con lo presentado en la figura 5 y con los resultados arrojados por el test LSD de Fisher. Sin embargo, el tratamiento que se consideró la mejor combinación de los factores analizados y que se resalta con una flecha en la figura 6, fue: 25°C , 40 gSac/L , sin adición de peróxido de hidrógeno y empleando matraces Erlenmeyer sin bafles. La IC_{50} para el extracto obtenido de la biomasa cultivada bajo estas condiciones

fue 26.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y es la más baja entre las tres mejores. Este extracto, por otro lado, se considera de mediana actividad según el criterio de Jonville et al. (2008).

Es importante resaltar que, en comparación con el primer experimento, en esta ocasión la temperatura baja afectó de manera negativa la actividad antiplasmodial *in vitro*. Esto puede deberse a la presencia de otros factores como los elicitores y el peróxido de hidrógeno. Retomando el primer experimento, la IC_{50} aumentó (de 18.72 a 84.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al aplicar los elicitores al medio de cultivo, aún cuando la temperatura fuera de 15 °C. También se observó un efecto negativo sobre la variable de interés por parte de aquellos tratamientos que involucraron peróxido de hidrógeno. Muchos autores reportan el efecto potenciador de este compuesto sobre el metabolismo secundario en cultivos de células vegetales. Hao et al., (2014) por ejemplo, relacionaron la presencia exógena de H_2O_2 con el aumento de la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasas y la acumulación de ácido rosmárico en cultivos celulares de *Salvia miltiorrhiza*. Para diferentes especies del género *Digitalis*, se determinó que la producción de cardenólidos se potenciaba cuando los cultivos se encontraban en condiciones de estrés oxidativo debido a la adición de peróxido de hidrógeno a los medios de cultivo (Sahin et al., 2014). Aún así, en el presente trabajo se determinó que la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro*, a partir de cultivos celulares de *A. indica*, no estuvo relacionada con la adición de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo y que, al contrario de lo reportado para otras especies vegetales y otras clases de metabolitos, esta se vio influenciada negativamente.

De otro lado, diversos investigadores han confirmado la relación proporcional que existe entre la concentración de sacarosa y la producción de biomasa para los cultivos en suspensión celular y los cultivos de raíces peludas de *A. indica* (Vásquez et al., 2015; Srivastava y Srivastava, 2011). Sin embargo, en cuanto a la relación que existe entre la producción de metabolitos secundarios (como los limonoides) y la concentración de sacarosa, las investigaciones informan que no existe una proporcionalidad entre ellas. Por ejemplo, Vásquez et al., (2015) en su publicación, reportan que el crecimiento celular se vio significativamente beneficiado al emplear sacarosa a 45 y 60 g/L; no obstante, la producción de limonoides no se vio afectada por los cambios en la concentración de dicha fuente de

carbono. En cultivos de suspensiones celulares de neem, Sujanya et al. (2008) tampoco observaron un aumento significativo en la producción de azadiractina al comparar dos concentraciones diferentes de sacarosa y empleando medio MS. Por otro lado, en cultivos de callos de *A. indica*, Wewetzer (1998) encontró que la producción de azadiractina fue tres veces mayor en los medios suplementados con 15 g/L de sacarosa, en comparación con 30 g/L de sacarosa; sin embargo, concluyó que la sacarosa empleada en altas cantidades no era un factor limitante en la producción de azadiractina. De la misma forma, al analizar los tres tratamientos que presentaron la mejor actividad antiplasmodial durante este experimento, se podría afirmar que la concentración de sacarosa, al igual que la presencia de baffles, no afectó la producción de compuestos con actividad antiplasmodial *in vitro* y que, por el contrario, la presencia de peróxido de hidrógeno y la baja temperatura influyeron de forma negativa sobre la producción de metabolitos secundarios activos contra *P. falciparum*, cuando se emplearon en combinación con el medio de cultivo MS, los elicitores y el precursor evaluados.

La ecuación 14 describe la variación estimada de la IC₅₀ dependiendo de la temperatura, la concentración de sacarosa, la presencia de baffles en los matraces y la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo.

$$\widehat{IC}_{50} = -16.364 T - 1.176 B + 8.556 P - 4.145S + 8.556 TP + 5.282 BP + 6.414 SB + 5.283 TBP + 6.414 TBS \quad \text{Ec. 14}$$

Siendo T la temperatura (°C); B, la presencia de baffles; P, la presencia de peróxido de hidrógeno y S, la concentración de sacarosa (g/L). Con $r^2 = 0.73$ y $p\text{-value} = 3.85 \times 10^{-5}$.

4.2. Actividad antiplasmodial *in vitro* en biorreactor de tanque agitado

Con el fin de promover la actividad antiplasmodial *in vitro* por parte de las células en suspensión de neem, estas también fueron cultivadas en biorreactor de tanque agitado, con medio de cultivo MS suplementado con sacarosa (30 g/L), 30% OD, oscuridad continua, pH de 5.8 y 25 °C. Para las dos condiciones de velocidad evaluadas en esta parte de la investigación (400 rpm y 600 rpm) se determinaron diferentes parámetros como la producción de biomasa, la viabilidad celular, la producción de limonoides relacionados con azadiractina, la actividad antiplasmodial *in vitro* y la actividad enzimática no específica intracelular de la guayacol peroxidasa (AENEIC).

La tabla 6 resume los resultados del análisis de varianza realizado para determinar la significancia de las interacciones entre los factores estudiados y la figura 7 ilustra los resultados derivados de los análisis efectuados sobre las células en suspensión de *A. indica* cultivadas en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm y 600 rpm.

Adicionalmente, se calculó la energía de disipación asociada con diferentes condiciones de cultivo (matraz, biorreactor 400, 600 y 800 rpm) y posteriormente se comparó con los parámetros evaluados previamente para los cultivos de neem. Esta última comparación se llevó a cabo entre los datos obtenidos durante el noveno día de cultivo. Es menester aclarar que, para el cálculo de la energía de disipación, en el caso de la condición de agitación más alta (biorreactor 800 rpm), se emplearon los datos obtenidos en nuestro grupo de investigación y que fueron reportados por Villegas et al., (2017). Estos resultados se encuentran esbozados en la figura 8.

Tabla 6. Análisis de varianza efectuado para determinar la significancia de las interacciones entre los parámetros evaluados para las células en suspensión de *A. indica* cultivadas en biorreactor de tanque agitado.

Factores e interacciones	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	p-value	Significancia de la interacción
IC₅₀ / Efectos principales				
N	1	21603.107	0.02976	*
T	5	9747.229	0.58354	
IC₅₀ / Interacción				
tn	5	11920.936	0.0000	
Limonoides / Efectos principales				
N	1	0.02838331	0.31093	
T	5	1.02422976	0.01473	*
Limonoides / Interacción				
tn	5	0.1115277	0.93045	
AENEIC / Efectos principales				
N	1	0.003734184	0.07392	
T	5	0.011490793	0.11805	
AENEIC / Interacción				
tn	5	0.0036753605	0	
Biomasa / Efectos principales				
N	1	28.9568	0.0006	*
T	5	351.74786	0.00737	*
Biomasa / Interacción				
tn	5	27.97168	0.03463	*
Viabilidad / Efectos principales				
N	1	22.17813	0.4736	
T	5	1394.58345	0.02261	*
Viabilidad / Interacción				
tn	5	185.8646	0.79711	

Siendo t, el tiempo de cultivo (días) y n, la velocidad de agitación (rpm). El (*) resalta aquellas interacciones que fueron significativas.

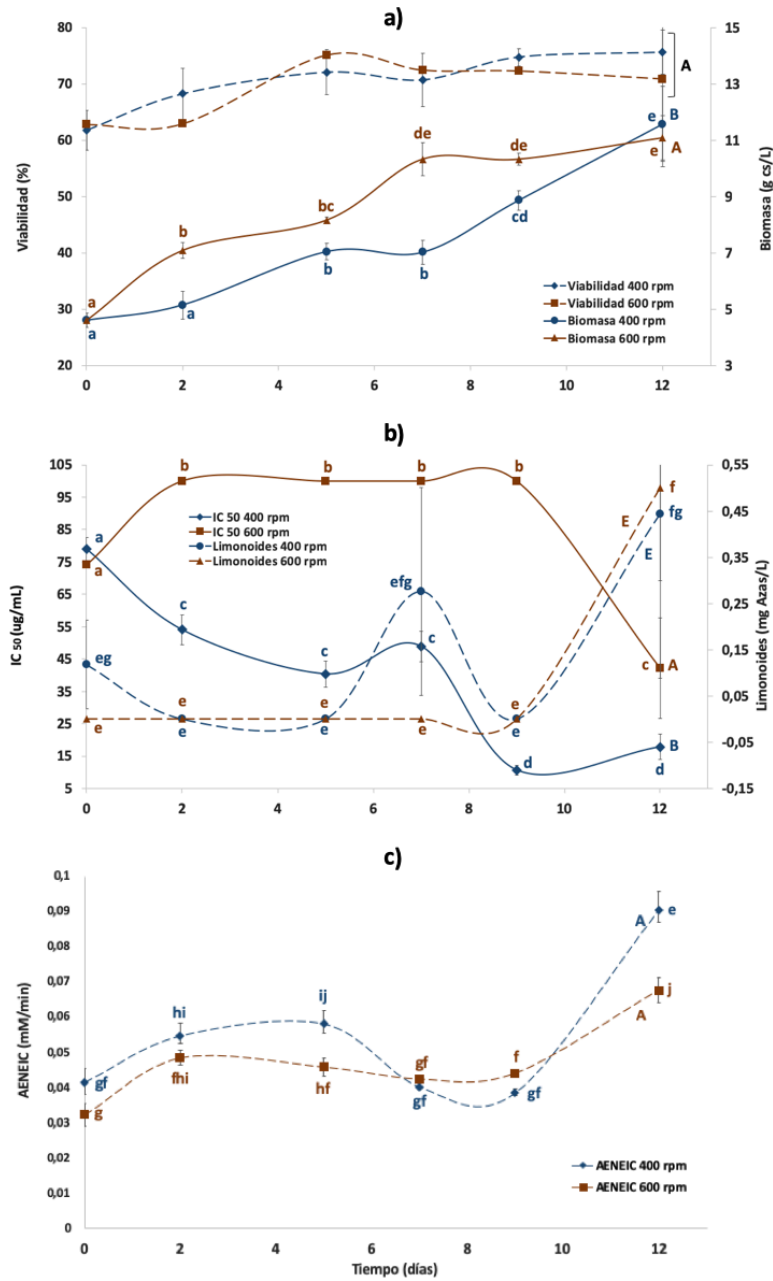


Figura 7. Parámetros evaluados para las células en suspensión de *A. indica* cultivadas en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm y 600 rpm.

a) Viabilidad y Biomasa. b) Actividad antiplasmodial *in vitro* y Limonoides relacionados con azadiractina. c) Actividad Enzimática No Específica Intracelular de la GPX (AENEIC). Tratamientos con la misma letra, no tienen diferencia significativa según el test LSD de Fisher, nivel de significancia del 95%. Las letras mayúsculas marcan las diferencias entre los niveles de la velocidad de agitación y las minúsculas entre los días de cultivo.

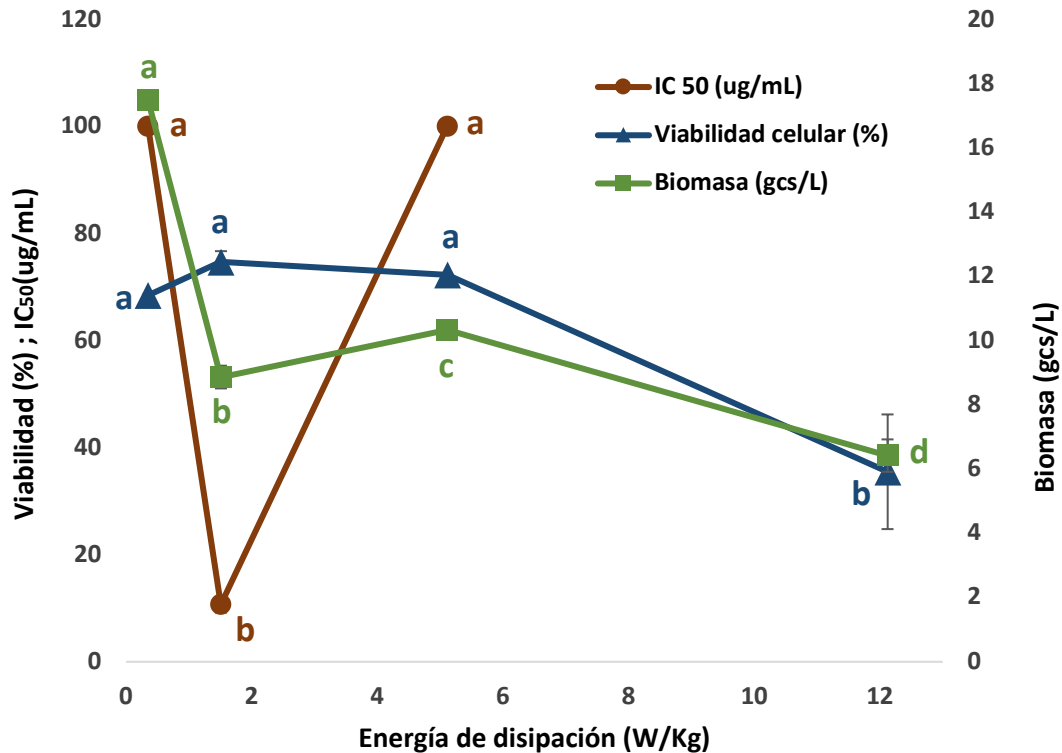


Figura 8. Variación de la biomasa, la viabilidad celular y la actividad antiplasmodial de los cultivos celulares de *A. indica* respecto a la energía de disipación.

Tratamientos con la misma letra, no tienen diferencia significativa según el test LSD de Fisher, nivel de significancia del 95%.

La menor energía de disipación corresponde al matraz Erlenmeyer con agitación orbital a 120 rpm (0.35 W/Kg) y la mayor, a biorreactor de tanque agitado a 800 rpm (12.12 W/Kg). Esto coincide con lo reportado por Villegas (2015). Para los cultivos en biorreactor de tanque agitado a 400 y 600 rpm los valores de energía de disipación fueron respectivamente: 1.51 y 5.11 W/Kg

Dado que la energía de disipación y la velocidad de agitación se relacionaron de forma directa (figura 8), en adelante se empleará este último parámetro para hacer referencia al estado energético correspondiente a cada tratamiento.

En los tres niveles de energía más bajos (120, 400 y 600 rpm), la viabilidad celular no registró diferencias significativas y en promedio, mantuvo un valor de 71.80%. No obstante, la

viabilidad celular registró su menor valor (35.50 %) en el nivel más alto de energía de disipación (800 rpm). Asimismo, el crecimiento celular también estuvo relacionado con la energía de disipación. El mayor valor para este parámetro (17.48 gcs/L) se registró a 120 rpm. A 600 rpm se logró una concentración celular de 10.32 gcs/L, seguido de los 8.87 gcs/L que se obtuvieron a 400 rpm. Finalmente, el menor valor de crecimiento celular se tuvo a 800 rpm, donde la concentración de células alcanzó un valor de 6.42 gcs/L (figura 8a).

En términos generales, no se observaron diferencias significativas entre la viabilidad celular a 400 y 600 rpm (p -value = 0.4736); esto se ilustra en la figura 7a. Sin embargo, el crecimiento celular fue mayor con tratamiento a 600 rpm (p -value = 0.0006). No obstante, hacia el último día de cultivo se alcanzaron las máximas concentraciones celulares para ambas velocidades, sin que fueran significativamente diferentes entre ellas (aproximadamente 11.33 g/L). Tanto a 400 rpm como a 600 rpm la concentración celular final fue 2.5 veces mayor en comparación con la concentración inicial (concentración de inóculo).

Villegas (2015) explica que la disminución en la viabilidad celular a 800 rpm es mucho más contundente que en los otros casos y que esto conlleva a que exista una menor cantidad de células con la capacidad de dividirse y aumentar la concentración celular y que en última instancia, esto se ve reflejado en la reducción del crecimiento del cultivo bajo estas condiciones. Por su parte, Namdev y Dunlop (1995) encontraron que la capacidad de formación de agregados celulares, la actividad mitocondrial y la integridad de la membrana celular en cultivos de zanahoria, se vieron afectadas drásticamente al emplear niveles de energía de disipación que eran mucho menores a aquellos que se relacionan con la lisis celular (efectos sublíticos). Lo más alarmante para estos autores fue observar que estas células perdían su capacidad de reproducción al ser sometidas a energías del orden de una millonésima parte de la energía requerida para la lisis celular. A partir de esto, concluían que las células de zanahoria eran casi tan sensibles a la agitación del fluido como lo son las células animales.

La sensibilidad de los cultivos celulares vegetales al estrés por agitación se ha atribuido al gran tamaño celular, la pared rígida que poseen y la vacuola de gran tamaño característica

de las plantas. Asimismo, se ve relacionada con el comportamiento gregario propio de las células vegetales (Kieran et al., 2000). De esta forma, los efectos causados por la agitación en los cultivos celulares de plantas incluyen la reducción de la viabilidad celular, la liberación de componentes intracelulares al medio de cultivo, los cambios en el metabolismo celular (concentraciones de ATP, respiración, contenido total de carbono, composición de la pared celular) y variación en la morfología celular y los patrones de agregación, según reportan Zhong-dong et al., (2002). De la misma manera, otros autores han concluido que la disminución del crecimiento y la viabilidad celular de los cultivos de células vegetales son posibles indicadores de que dichos sistemas biológicos están sometidos a estrés hidrodinámico (aquel asociado a las condiciones de agitación y aireación de los cultivos) (Meijer et al., 1993; Rodríguez-Monroy y Galindo, 2003). El estrés hidrodinámico entonces, genera daños en los cultivos celulares que podrían llegar a ser letales (causando la muerte celular). Otros daños de tipo subletal, que acarrearían cambios metabólicos como los expuestos anteriormente, podrían tener un impacto positivo sobre los cultivos vegetales y que puede evidenciarse en un aumento en el rendimiento de producción de metabolitos de interés comercial y que estarían cumpliendo una función protectora para las células ante el estrés (Busto et al., 2007 ; Kieran et al., 1997; Trujillo-Roldán y Valdéz-Cruz, 2006). Esto sucedería de forma similar a lo que ocurre cuando las plantas están bajo algunas tensiones ambientales. Ante la estimulación mecánica, por ejemplo, las células vegetales activan genes de defensa a través de la vía de transducción de señales que desencadenan una respuesta metabólica en términos de la producción de metabolitos secundarios, como la fitoalexinas y la lignina con los cuales las células de la planta alivian la lesión externa (Zhong-dong et al., 2002).

Por otra parte, la actividad antiplasmodial *in vitro* de las células en suspensión de *A. indica* fue significativamente mayor a 400 rpm (p-value = 0.02976), aumentando gradualmente a lo largo de la corrida y registrando un punto máximo en el noveno día de cultivo (figura 7b). Este comportamiento coincide con el del crecimiento celular. Ambas variables aumentaron paulatinamente hasta alcanzar sus máximos valores durante los últimos días de cultivo. La

IC₅₀ del extracto más activo obtenido a estas condiciones fue 10.67 µg/mL y se considera con actividad promisorio, según Jonville et al., (2008). En el caso de 600 rpm, la actividad antiplasmodial fue nula la mayor parte del tiempo e incrementó en el último día de cultivo (día 12). La IC₅₀ del extracto obtenido en estas condiciones fue 42.24 µg/mL y se considera de baja actividad. Así pues, no se evidenció un patrón similar de comportamiento entre el crecimiento celular y la actividad antiplasmodial. Si bien las células crecieron mejor a 600 que, a 400 rpm, la actividad antiplasmodial no fue promovida bajo estas condiciones.

Por otra parte, la producción de limonoides relacionados con azadiractina no fue significativamente diferente entre 400 y 600 rpm (p-value = 0.31093) y no se evidencia una relación entre este parámetro y el crecimiento celular de los cultivos, en estas condiciones de agitación. Si bien el crecimiento celular fue gradual, tanto a 400 como a 600 rpm, la producción de limonoides en ambos casos se registró únicamente durante el último día de cultivo y la cantidad obtenida fue mínima. Tampoco se estableció un vínculo entre los limonoides relacionados con azadiractina y la actividad antiplasmodial *in vitro* (p-value > 0.05) y a partir de esto, se puede afirmar que dichos metabolitos no son los responsables de la actividad biológica de los extractos obtenidos. Tal y como se observa en la figura 7b, su producción (a 400 rpm) decae en aquellos días de cultivos donde la IC₅₀ de los extractos de neem fue menor (mayor actividad biológica) y tuvo un leve aumento al día 7, en el cual la actividad sobre *P. falciparum* declinó. Sólo durante el día 12 aumentó la producción de dichos limonoides, pero la IC₅₀ registrada resultó ser la segunda más baja de toda la corrida. Aarthy et al., (2018) dilucidaron gran parte de la ruta biosintética de los limonoides producidos por el neem, tanto en el árbol como en líneas celulares, mediante la cuantificación comparativa de dichos compuestos con aquellos producidos naturalmente por la planta. Para ello, realizaron un trazado de la vía biosintética de los limonoides mediante la incorporación de glucosa marcada con ¹³C a los medios de cultivo. Además, quisieron determinar qué contribución hacían las rutas metabólicas del mevalonato y del fosfato metileritritol a la biosíntesis de limonoides. Para ello, llevaron a cabo experimentos de inhibición química de ambas rutas, concluyendo que sólo la ruta del mevalonato

contribuye en este proceso y lo hace aportando las unidades de isopreno requeridas para la síntesis de los limonoides. Estos resultados fueron respaldados y confirmados con los datos que obtuvieron a partir del marcaje con isótopos del carbono. Al revisar la ruta esbozada por Aarthy et al., (2018) (figura 9), se observa una bifurcación a partir del metabolito azadirona el cual origina dos vías de síntesis diferentes. A través de una de ellas, se sintetizan la azadiractina y otros limonoides como el nimbin, el salannin y el 3-deacetylsalannin que están relacionados con ésta. La otra ruta, describe la síntesis de metabolitos como la azadiradiona, la epoxiazadiradiona, y la genudina a los cuales se les atribuye la actividad antiplasmodial de las semillas de neem, según lo descrito por Chianese et al., (2010) y MacKinnon et al., (1997). De lo anterior y en vista de que en el presente estudio no se evidenció la producción de limonoides relacionados con azadiractina y que, sin embargo, se obtuvieron extractos con actividad antiplasmodial *in vitro* a partir de los cultivos celulares de neem cultivados en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm, podría sospecharse que dichas condiciones de cultivo favorecieron o potenciaron la vía de síntesis de metabolitos como el genudina y no aquella, a través de la cual, se sintetiza la azadiractina. Esto soporta la aseveración hecha anteriormente con la cual se afirmó que los metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro*, evaluados en el presente estudio, no son limonoides relacionados con azadiractina.

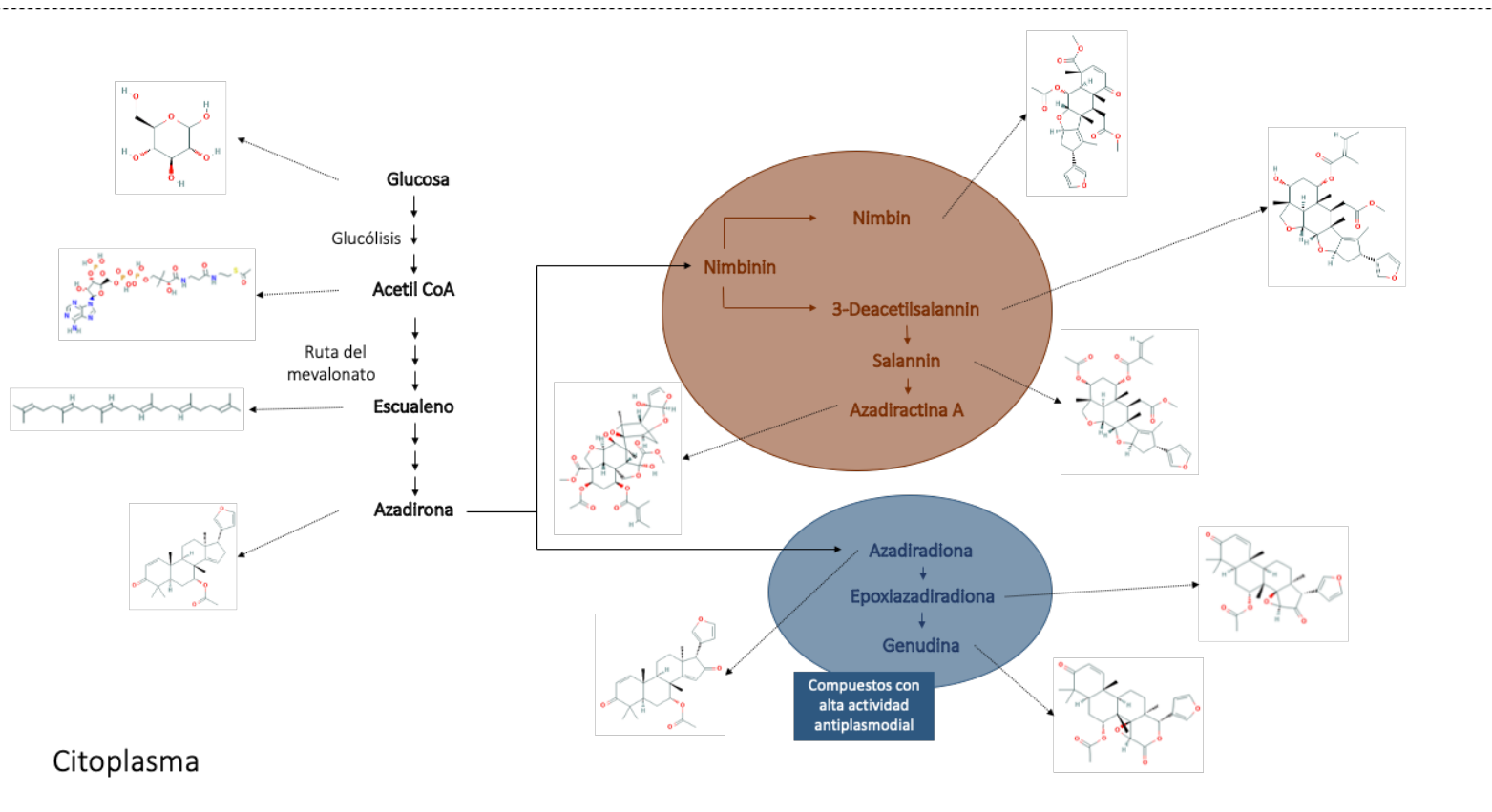


Figura 9. Esquema simplificado de la ruta biosintética de los limonoides del neem.

Las flechas discontinuas representan reacciones sucesivas que no son ilustradas en la figura. Tomado y modificado de Aarthy et al., (2018).

Por otro lado, la guayacol peroxidasa es una enzima perteneciente al grupo de las peroxidases capaz de transformar el peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno molecular, participando activamente en el mecanismo antioxidante de las plantas (Díaz et al., 2010). En lo concerniente a la actividad enzimática no específica intracelular de esta enzima, se observó un aumento paulatino a lo largo de las diferentes corridas tanto a 400 como a 600 rpm, mostrando un comportamiento similar en ambos casos y sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas entre ambas velocidades (p -value = 0.07392). En general, esta presentó un leve aumento hacia el segundo día, luego disminuyó suavemente hasta el séptimo día y posteriormente aumentó hasta el final de los experimentos. Los valores máximos para ambas velocidades de agitación se obtuvieron

durante el día 12 de cultivo (9.03×10^{-2} mM/min a 400 rpm y 6.77×10^{-2} mM/min a 600 rpm) (figura 7c). En este trabajo también fue evaluada la actividad enzimática específica de la guayacol peroxidasa. Sus valores oscilaron entre 0.10 y 0.35 $\mu\text{mol TG/mg prot. min}$ pero no se encontró relación alguna entre dicha actividad y la actividad antiplasmodial *in vitro*.

A continuación, la figura 10 sintetiza el comportamiento global de los parámetros monitoreados para las células en suspensión de neem respecto a las dos velocidades de agitación evaluadas en biorreactor de tanque agitado. En ella se muestran los valores máximos alcanzados para cada variable durante el tiempo que fueron analizados los cultivos.

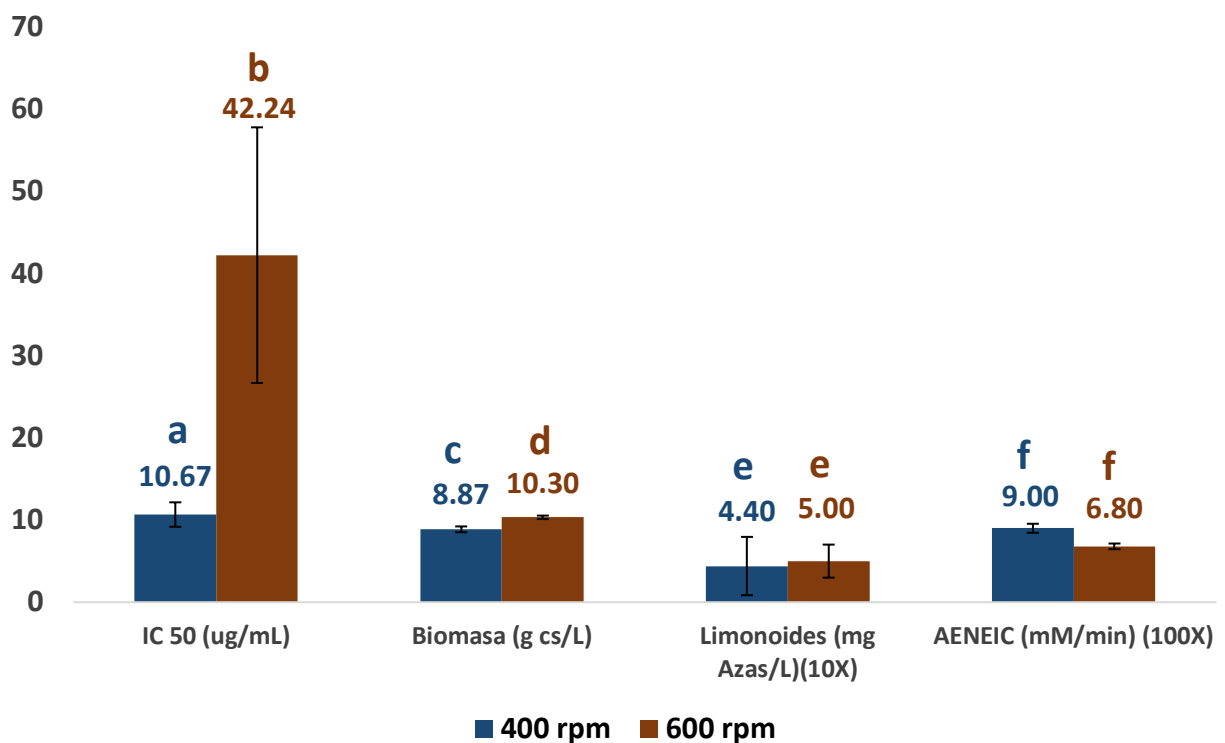


Figura 10. Valores máximos obtenidos para los parámetros monitoreados en los cultivos celulares de *A. indica* respecto a la velocidad de agitación en biorreactor de tanque agitado.

Tratamientos con la misma letra, no tienen diferencia significativa según el test LSD de Fisher, nivel de significancia del 95%.

La grafica resume el efecto de la velocidad sobre diferentes variables analizadas en el presente trabajo, teniendo en cuenta sólo los valores máximos obtenidos en cada caso. Así pues, se puede observar como la actividad antiplasmodial es considerablemente mayor a 400 rpm y como el crecimiento celular se vio favorecido a 600 rpm. Finalmente, se refleja como la producción de limonoides relacionados con azadiractina y la actividad enzimática no específica de la GPX no se vieron afectadas por la velocidad de agitación. Sin embargo, se esperaba que dichas variables exhibieran un comportamiento diferente. Dado que el ambiente hidrodinámico a 600 rpm es, en teoría, más agresivo para las células, se estimaba que el crecimiento celular fuera menor en estas condiciones y que la actividad antiplasmodial se viera favorecida. De igual forma, que tanto la actividad enzimática como la producción de limonoides relacionados con azadiractina también incrementaran a 600 rpm, en comparación con 400 rpm. Todo esto, como una posible manifestación y respuesta de las células a las condiciones de mayor estrés hidrodinámico, que se considera experimentan a media que aumenta la energía de disipación (Trujillo-Roldán y Valdéz-Cruz, 2006). Sin embargo, síntomas como la disminución del crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios (con actividad antiplasmodial, en este caso), que suelen ser un indicativo del estrés, fueron manifestados por los cultivos celulares a 400 rpm y no por los cultivos a 600 rpm.

Retomando la Figura 8, que esboza el comportamiento de los cultivos respecto a la energía de disipación, podría suponerse que la región comprendida entre 400 y 600 rpm corresponde a una región donde el estrés hidrodinámico genera efectos subletales sobre los cultivos celulares de neem. Adicionalmente, parece ser que dichos efectos no son drásticamente diferentes entre los cultivos sometidos a velocidades de agitación comprendidas entre estos valores. Además, existe la posibilidad de que los cultivos de *A. indica* estuvieran desarrollando resistencia al estrés causado por las condiciones hidrodinámicas del cultivo, en este intervalo de velocidad. Esto podría explicar, por ejemplo, el leve aumento del crecimiento celular y la no producción de los metabolitos secundarios analizados (antiplasmodiales) a 600 rpm (figura 8). En cuanto a esta posibilidad, vale la pena profundizar un poco sobre el importante papel que cumplen las

enzimas peroxidadas en el mecanismo de respuesta al estrés en vegetales y cuya actividad fue determinada para los cultivos celulares de neem, tanto a 400 como a 600 rpm, en esta investigación. La actividad de dichas enzimas, en las plantas, se ha estudiado ampliamente y ha logrado relacionarse con la respuesta al estrés causado por el ataque de patógenos, principalmente. Algunos modelos de interacción hospedero-patógeno han aportado evidencias del papel de las peroxidadas como parte de los mecanismos de defensa de las plantas (Valentines et al., 2005). Estos autores comentan que ellas no presentan, por lo general, actividad antimicrobiana por sí mismas, pero que están involucradas en la respuesta a enfermedades de carácter infeccioso ya que catalizan, entre otras, la oxidación de compuestos fenólicos para la formación de lignina. En este estudio, realizado sobre manzanas, encontraron que el aumento de la actividad peroxidasa se relacionaba con el proceso de lignificación, el cual se reflejaba en un aumento de la resistencia del fruto frente a la infección por *Penicillium expansum* (Valentines et al., 2005). En otro estudio, realizado sobre lulo y su respuesta al ataque de *Colletotrichum acutatum*, se registró un aumento de la actividad peroxidasa el cual fue asociado por los investigadores con la respuesta al estrés que produce la infección fúngica (Caicedo et al., 2009). Dicho incremento en la actividad de estas enzimas, suele relacionarse con el incremento en el contenido de compuestos fenólicos y de lignina. Esta respuesta favorece el desarrollo de estructuras de defensa (lignificaciones, reforzamiento de la pared celular y acumulación de calosa) las cuales hacen parte de la defensa pasiva de la planta, puesto que es un mecanismo mediante el cual se fortalece la pared para impedir la infección por parte del patógeno. Por último, también reportan que en todo este proceso están implicadas diversas peroxidadas (Caicedo et al., 2009). Zhong-dong et al., (2002), por su parte y como se mencionó al inicio de esta sesión, reportan que la activación de genes involucrados en la producción de lignina (en el caso de los cultivos de células vegetales en suspensión) obedece al estímulo mecánico que experimentan dichos sistemas durante el proceso de agitación. Ahora bien, para esclarecer el panorama sería menester evaluar los parámetros analizados en el presente trabajo, pero en cultivos de células de neem agitados a velocidades intermedias entre 400 y 600 rpm.

A continuación, la tabla 7 ofrece una síntesis de los parámetros evaluados en el cultivo de células en suspensión de *A. indica* en biorreactor de tanque agitado, tomando como punto de referencia la mayor actividad antiplasmodial *in vitro* obtenida durante las corridas a 400 y a 600 rpm.

Tabla 7. Resumen de los valores de los parámetros evaluados para los cultivos celulares de *A. indica* en biorreactor de tanque agitado respecto al mayor valor obtenido de la actividad antiplasmodial *in vitro*. Tratamientos con la misma letra, no tienen diferencia significativa según el test LSD de Fisher, nivel de significancia del 95%.

Velocidad de agitación (rpm)	IC ₅₀ (µg/mL)	Día de cultivo	Concentración celular (g cs/L)	Viabilidad celular (%)	Limonoides relacionados con azadiractina (mg Azas/L)	AENEIC (mM/min)
400	10.67 ± 1.49 (a)	9	8.87 ± 0.35 (a)	74.71 ± 1.99 (a)	0.00 ± 0.00 (a)	0.04 ± 1.23x10 ⁻³ (a)
600	42.24 ± 15.56 (b)	12	11.08 ± 0.76 (b)	70.88 ± 4.30 (a)	0.50 ± 0.20 (b)	0.07 ± 3.43x10 ⁻³ (b)

La figura 11 ilustra los resultados obtenidos para la actividad antiplasmodial *in vitro* de las células en suspensión de *Azadirachta indica* cultivadas en diferentes condiciones.

Lo primero a resaltar de esta figura es que tanto las condiciones probadas a nivel de matraz Erlenmeyer como las evaluadas a nivel de biorreactor de tanque agitado favorecieron y aumentaron considerablemente la actividad antiplasmodial *in vitro* de las células en suspensión de *A. indica* en comparación con las condiciones de cultivo estándares o control, donde la actividad era nula. Así pues, una IC₅₀ > 100 µg/mL, asociada con una actividad antiplasmodial nula (control), logró disminuir a 18.72 µg/mL (matraz Erlenmeyer) y finalmente a 10.67 µg/mL (biorreactor).

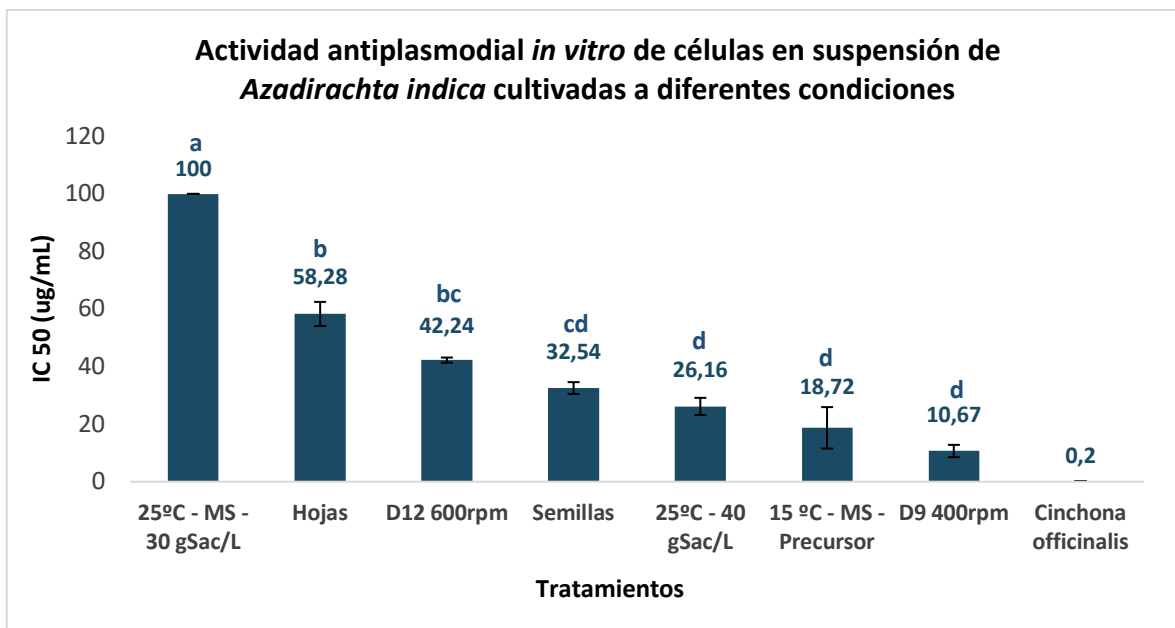


Figura 11. Actividad antiplasmodial *in vitro* de células en suspensión de *A. indica* cultivadas en diferentes condiciones.

Tratamientos con la misma letra, no tienen diferencia significativa según el test LSD de Fisher, nivel de confianza del 95%.

Si bien, el análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre los mejores tratamientos evaluados en matraz Erlenmeyer y biorreactor a 400 rpm, la actividad antiplasmodial en esta última condición es la única considerada promisorias. Por lo anterior, se establece que la actividad antiplasmodial *in vitro* de las células en suspensión de neem se ve favorecida y se incrementa cuando éstas se cultivan en biorreactor de tanque agitado, a 400 rpm, 30% OD, en medio MS, con una concentración de sacarosa de 30 g/L, a 25 °C y oscuridad continua.

La IC₅₀ (10.67 µg/mL) del extracto proveniente de la biomasa de neem obtenida bajo estas condiciones, es comparable con la reportada por Udeinya et al., (2003) para un extracto (acetona-agua) de hojas de neem. Este extracto pudo inhibir la capacidad que tienen los parásitos causantes de la malaria de adherirse a los eritrocitos en el momento de la infección a una concentración de 5.0 µg/mL. Sin embargo, la diferencia es mucho mayor cuando la comparación se hace con el extracto etanólico de hojas que se evaluó en la presente investigación y cuya IC₅₀ fue 58.28 µg/mL. En otras investigaciones más antiguas,

como la de Jones et al., (1994), se determinó que la azadiractina y algunos de sus derivados semi-sintéticos bloquearon el desarrollo de gametos masculinos móviles de *P. berghei in vitro*. Para este compuesto, los autores reportaron una dosis efectiva (ED) de 100 μ M (50 μ g/mL). Por otra parte, el potencial antiplasmodial de compuestos derivados del aceite de neem sobre cepas de *P. falciparum* resistentes y sensibles a cloroquina también fue reportado hace unos años (Yadav et al., 2017). Estos autores relatan que la epoxiazadiradiona y algunos de sus derivados presentaron actividad moderada sobre el parásito causante de la malaria. Las IC_{50} de estos compuestos oscilaron entre 0.60 y 1.40 μ g/mL. Otros estudios de actividad antiplasmodial del neem se han llevado a cabo sobre ratones infectados con parásitos del género *Plasmodium*. De ellos, vale la pena resaltar los resultados obtenidos por Dahiya et al., (2016) quienes analizaron el potencial de la azadiractina A y del producto comercial NeemAzal® para inhibir la formación de microgametos de *P. berghei* en ratones y la transmisión de *P. berghei* a los mosquitos *Anopheles stephensi* cuando se administraron a ratones gametocitémicos antes de la exposición a los mosquitos, respectivamente. Estos autores también llevaron a cabo un ensayo de inhibición del desarrollo de ookinetos el cual mostró un aumento de la actividad del NeemAzal® contra las etapas esporogónicas tempranas en comparación con la azadiractina A. El valor de IC_{50} determinado para el NeemAzal® fue de 6.8 μ g/mL, aproximadamente la mitad de la IC_{50} de la azadiractina A (12.4 μ g/mL). Estas IC_{50} están en el mismo orden de magnitud de la obtenida en el presente trabajo.

También se comprobó que el extracto acuoso de hojas de neem surte un efecto anti-hemolítico sobre ratones infectados previamente con *P. berghei* al aplicarse en dosis de 1000 y 2000 mg/Kg (Somsak et al., 2015). Además de esto, en este estudio los investigadores analizaron el efecto de la pirimetamina y reportaron hemólisis en los ratones tratados. Sin embargo, esta fue contrarrestada si se aplicaba la pirimetamina en combinación con el extracto de hojas de neem. Tapanelli et al., (2016) reportaron la actividad esporontocida del compuesto deacetilnimbin puro que obtuvieron después de la purificación por HPLC de fracciones provenientes de extractos de semillas de neem. Los autores establecieron que a una concentración de 50 μ g/mL (100 μ M) dicho compuesto

inhibía completamente el desarrollo de los parásitos en el estadio esporogónico temprano, confirmando así la actividad esporontocida de la molécula. En el intervalo de 6 a 25 μM (3.0 - 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), los investigadores observaron una actividad inhibitoria de aproximadamente el 50% sobre los parásitos. Esta IC_{50} es comparable con la obtenida en el presente trabajo con el extracto derivado de los cultivos celulares de *A. indica* en biorreactor de tanque agitado (10.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además, vale la pena resaltar que Tapanelli et al., (2016) también mencionan que la actividad esporontocida, de las fracciones a partir de las cuales aislaron el deacetilnimbin, fue menor que la del compuesto puro, sugiriendo que la actividad del metabolito se vería afectada por la presencia de otros componentes dentro de las fracciones y que una vez purificado, dicha actividad se potenciaba. Según esto, la actividad antiplasmodial *in vitro* de los compuestos responsables de la misma, dentro del extracto crudo obtenido en esta investigación también podría aumentar una vez se lleve a cabo su purificación.

Muchos investigadores han reportado que los extractos provenientes de diferentes explantes del árbol del neem tienen actividad específica y baja toxicidad. Por ejemplo, se analizó el potencial citotóxico de compuestos derivados del aceite de neem sobre líneas cancerosas (SIHA, PANC 1, MDA-MB-231 y IMR-3) y determinaron que era muy bajo. Esto fue un indicativo del alto índice de selectividad por parte de dichos compuestos ya que su actividad sobre cepas de *P. falciparum* resistentes y sensibles a cloroquina había sido registrada previamente (Yadav et al., 2017). Tapanelli et al., (2016) efectuaron estudios dirigidos a evaluar la citotoxicidad de varios limonoides del árbol de neem (como el deacetilnimbin, el nimbin y la azadiractina) utilizando líneas celulares de neuroblastoma N1E-115 (ratón), osteosarcoma 143B.TK (humano) y Sf9 (insecto) y concluyeron la falta de toxicidad de estos compuestos en concentraciones de hasta 200 μM ($\approx 100 \mu\text{g}/\text{mL}$). Adicionalmente, evaluaron el nimbin y deacetilnimbin sobre líneas celulares de leucemia (HL60), cáncer de pulmón (A549), estómago (AZ521) y mama (SK-BR-3) revelando que el nimbin no era tóxico para ninguna de estas líneas celulares, mientras que el deacetilnimbin tuvo una actividad selectiva en la línea celular de cáncer de leucemia. En otra investigación

se realizaron pruebas de toxicidad con extractos de hojas de neem inyectados por vía intraperitoneal (300, 500 y 1000 mg/kg) en ratones que posteriormente fueron monitoreados durante 24 horas. Durante este tiempo los investigadores no observaron signos de toxicidad y las observaciones físicas y de comportamiento no revelaron micción involuntaria, debilidad muscular o convulsión y concluyeron que los animales eran físicamente activos (Farhana et al., 2010). Por último, Mackinnon et al., (1997) también reportaron niveles de toxicidad muy bajos para el compuesto gedunina y algunos de sus derivados.

4.3. Valoración de la actividad antiplasmodial estadio específico sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de valoración de la actividad antiplasmodial estadio específico, que se llevó a cabo sobre la cepa FCR3 de *P. falciparum*. Vale la pena recordar que para este experimento los parásitos fueron sincronizados en el estadio anillo maduro. El tiempo de inicio del experimento se señala en las figuras 12 y 13. La concentración del extracto proveniente de las células en suspensión de *A. indica* (cultivadas en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm, 30% OD, 25°C y oscuridad continua) a la cual el crecimiento del parásito se inhibe en un 50% durante las primeras 4 h, fue 20.93 µg/mL. Dada la configuración del experimento y su correspondencia con el ciclo de vida de *P. falciparum*, las cuatro primeras horas corresponden al estadio trofozoíto inmaduro temprano y se infiere que sobre esta forma actúa el extracto. Estos resultados también se ilustran en las figuras 12 y 13.

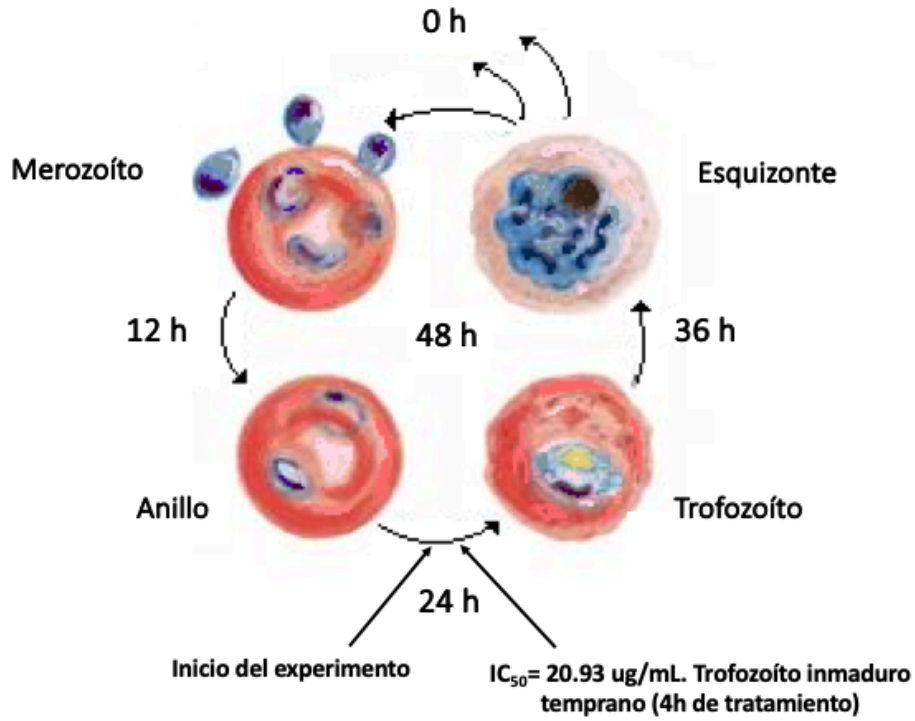


Figura 12. Ciclo eritrocitario de *P. falciparum*. Estadío específico de acción del extracto proveniente de las células en suspensión de *A. indica*. Ilustración adaptada de Bannister et al., (2000).

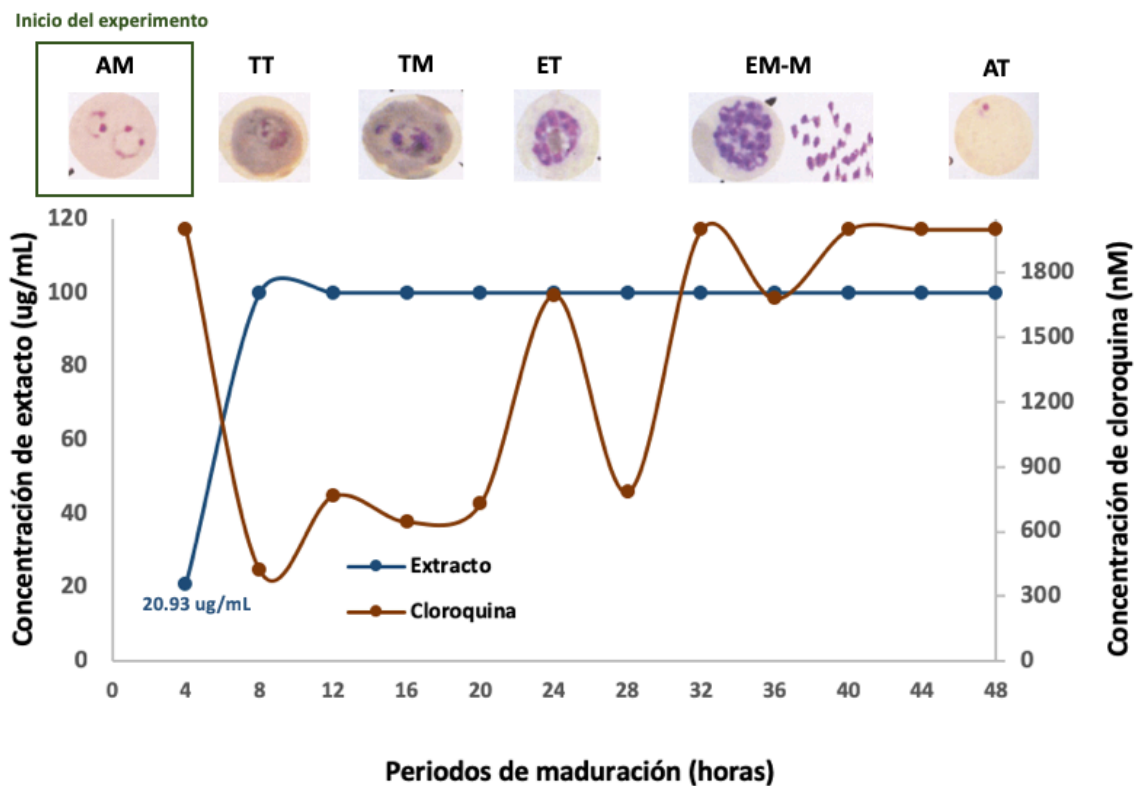


Figura 13. Estadíos de sensibilidad de *P. falciparum* al extracto proveniente de las células en suspensión de *A. indica* y al control cloroquina.

AT: Anillo temprano, AM: Anillo maduro, TT: Trofozoíto temprano, TM: Trofozoíto maduro, ET: Esquizonte temprano, EM-M: Esquizonte maduro y merozoítos.

Esta última figura muestra que el extracto proveniente de las células en suspensión de *A. indica* sólo fue activo en el estadio trofozoíto inmaduro temprano ($IC_{50} = 20.93 \mu\text{g/mL}$) y que sobre los demás estadíos no tuvo ningún efecto ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Esta técnica de evaluación permite determinar sobre cual de los estadíos del ciclo eritrocitario del parásito actúa el extracto. No obstante, dicha metodología no permite dilucidar el mecanismo de acción del extracto. Por esta razón, se emplearán reportes de la literatura en los que se describe el efecto de otras sustancias con actividad antiplasmodial que también actúan sobre el estadio trofozoíto, con miras a exponer algunas posibles opciones de mecanismos de acción y/o efectos causados sobre la cepa FCR3 de *P. falciparum* por el extracto obtenido en el presente trabajo.

Como medida de supervivencia, el parásito debe degradar una gran parte de la hemoglobina dentro del eritrocito (80% aproximadamente). Esto es un paso obligado que garantiza el crecimiento y la replicación asexual durante la fase intra-eritrocítica. Dicho proceso tiene lugar, principalmente, en el estadio de trofozoíto (18 h a 32 h después de la invasión) y está mediado por proteasas contenidas dentro de la vacuola digestiva del parásito, entre ellas la plasmepsina aspártico proteasa y la cisteína falciparum proteasa (Ginsburg, 1990; Francis et al., 1997; Milani et al., 2015).

Hu et al., (2017) explican que la digestión de la hemoglobina también se da con el fin de mantener la estabilidad osmótica y proporcionar suficiente espacio para el parásito dentro de la célula. Por otra parte, éste digiere la hemoglobina y la usa como una fuente de aminoácidos. Como consecuencia de tal digestión, grandes cantidades de hemo son liberadas. El hemo, es un grupo prostético que consiste en un átomo de hierro contenido en el centro de un anillo heterocíclico de porfirina, el cual resulta muy tóxico para las células. Para contrarrestar este efecto, el parásito convierte el hemo en cristales de hemozoína (comúnmente conocida como pigmento palúdico). Durante mucho tiempo se creyó que la

desintoxicación del hemo en hemozoína era el principal objetivo de los antimaláricos derivados de quinolina (como la cloroquina) y era uno de los objetivos del desarrollo de fármacos más atractivos (Hu et al., 2017). De esta manera, la cloroquina, por ejemplo, actúa sobre el parásito bloqueando la formación de los cristales de hemozoína. Así pues, los residuos tóxicos de la hemoglobina salen de la vacuola digestiva y se dirigen al citosol del parásito donde posteriormente inducen daños de tipo oxidativo en la membrana celular (Wang et al., 2014).

Otros reportes indican que el tratamiento basado en inhibidores de la enzima cisteína proteasa favorece la acumulación de hemoglobina no digerida dentro de la vacuola digestiva. Por tanto, se bloquea el desarrollo del parásito y su muerte es inminente (Marques et al., 2015). También se ha hecho alusión al efecto del azul de metileno sobre trofozoítos tempranos. Si bien, no es un compuesto usado actualmente para tratar la enfermedad, se le considera el antimalárico sintético más viejo (Färber et al., 1998). Se sabe que su actividad depende de las defensas antioxidantes de *Plasmodium* (las cuales son altamente activas en este estadio de desarrollo) y se da justo mientras se lleva a cabo la digestión de la hemoglobina. Esto está interrelacionado con la enzima glutatión reductasa plasmodial (PF140192), quien es objetivo específico del azul de metileno y cuyo pico de expresión comienza 8 h después de la invasión y alcanza su máximo a las 24 h del ciclo eritrocitario del parásito (Färber et al., 1998; Garavito et al., 2007).

Con el estudio llevado a cabo por Morita et al., (2015), los autores demostraron que los endoperóxidos N-89 y N-251 son candidatos esperanzadores como medicamentos antipalúdicos y que tienen actividad específica contra el parásito en el estadio trofozoíto. Ellos han demostrado también, que la proteína de unión al calcio (PfERC) del retículo endoplásmico de *P. falciparum* es un posible objetivo de N-89 y N-251 y que el nivel de expresión de la proteína PfERC aumenta a medida que se avanza desde el estadio trofozoíto temprano hasta el trofozoíto tardío. Aunque las funciones de PfERC aún no se conocen a cabalidad, esta proteína parece tener gran importancia para el desarrollo del parásito. Por lo tanto, parece probable que la inhibición de PfERC en la etapa de trofozoíto sea crucial en la acción antiparasitaria de N-89 y N-251. De esta forma, los hallazgos de Morita et al.,

(2015) sugieren que las funciones de las proteínas en el estadio trofozoíto son inhibidas por los endoperóxidos y que estas inhibiciones son letales contra los parásitos de la malaria. A pesar de que sugieren profundizar más en el mecanismo de acción de estos compuestos, explican que los endoperóxidos generan radicales libres en presencia de hierro que podrían ser los causantes del daño a las proteínas como PFERC.

Berthi et al., (2018), por su parte, evaluaron el potencial antiplasmodial de extractos etanólicos de *Pricramnia latifolia*, una especie vegetal latinoamericana perteneciente a la familia *Pricamniaceae* (conocida por sus propiedades medicinales). Como resultado de su investigación estos autores reportan una alta actividad (1.20 µg/mL) sobre la cepa FCR3 de *P. falciparum*, específicamente sobre el estadio trofozoíto.

El extracto proveniente del cultivo de células en suspensión de *Azadirachta indica*, por su parte, actúa sobre sobre *P. falciparum* impidiendo la maduración de los trofozoítos. Así pues, el ciclo de vida asexual del parásito se ve interrumpido por el extracto. Considerando los diferentes mecanismos reportados por los autores citados previamente, podría esperarse que el mecanismo de acción, del extracto evaluado en este trabajo, esté relacionado con la inhibición de la síntesis de proteínas necesarias para los procesos mitóticos que se llevan a cabo en estadios posteriores. También podría suceder que la actividad estuviera relacionada con la inhibición de enzimas como las plasmepsinas y las falcipainas, involucradas en la degradación de la hemoglobina o bien, que actuara bloqueando el mecanismo antioxidante del parásito. Para confirmar estas hipótesis sería necesario que en investigaciones futuras se llevaran a cabo análisis que permitieran estudiar la interacción entre los compuestos activos aislados del extracto y algunas proteínas específicas del parásito. Por ejemplo, se podría implementar la técnica de *docking* molecular. Esta permitiría analizar *in silico* el posible acoplamiento entre los metabolitos bioactivos y algunas proteínas que, de preferencia, sean exclusivas del parásito (como aquellas involucradas en la producción de la hemozoína).

4.4. Análisis de fracciones por UPLC-ESI-Qtof-MS

Del extracto proveniente de los cultivos celulares de neem en biorreactor de tanque agitado, cultivados a 400 rpm, 30% OD, 25°C y oscuridad continua, que fue sometido a lavados sucesivos con diferentes solventes (particiones sucesivas con hexano, diclorometano, acetato de etilo y una mezcla de etanol-metanol), se obtuvieron cuatro fracciones. Dichas fracciones fueron probadas en ensayos de actividad biológica sobre la cepa FCR3 de *P. falciparum*. De ellas, las fracciones de acetato de etilo y etanol-metanol, presentaron IC₅₀ mayores a 100 µg /mL, concluyendo así, que carecían de actividad sobre el parásito. No obstante, las fracciones de hexano y diclorometano mostraron actividades promisorias según lo descrito por Jonville et al., (2008). Así pues, sólo las fracciones que presentaron actividad antiplasmodial *in vitro* sobre la cepa FCR3 de *P. falciparum* fueron tenidas en cuenta en esta parte de la investigación. De esta forma, tanto la fracción diclorometano (IC₅₀ = 9.80 µg /mL) como la fracción hexano (IC₅₀ = 13.66 µg /mL) fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Posteriormente, solo la fracción de hexano proveniente de las células en suspensión de neem fue sometida a análisis mediante UPLC-ESI-Qtof-MS con la intención de detectar y posiblemente, identificar de manera tentativa los compuestos presentes en ella. Solo se analizó esta fracción ya que los cromatogramas de HPLC, obtenidos previamente, permitieron determinar que los compuestos de la fracción de diclorometano se encontraban también en la fracción de hexano. Por otra parte, esta fracción lucía mas limpia (picos mejor resueltos). La figura 14 corresponde al cromatograma de UPLC obtenido para dicha fracción. El procedimiento adoptado permitió una separación y elución eficientes de los analitos vegetales posiblemente presentes en la fracción analizada.

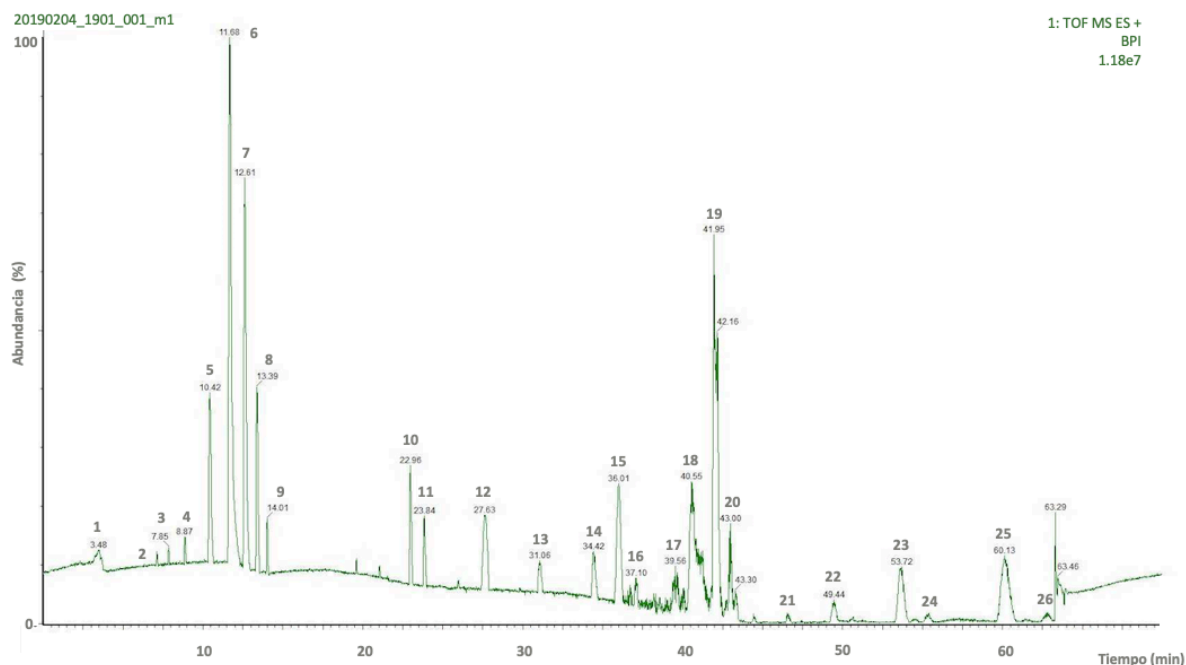
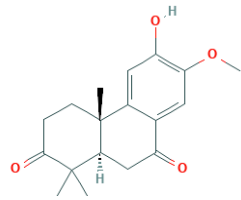
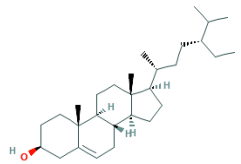
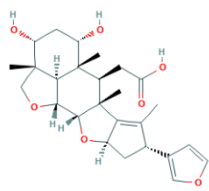
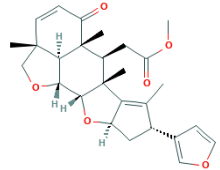
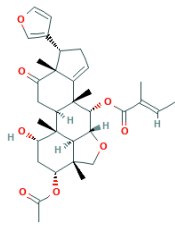
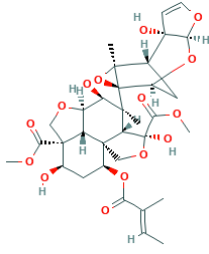


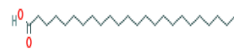
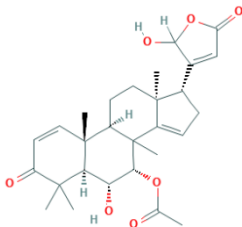
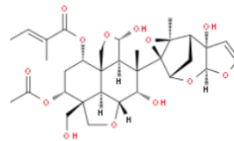
Figura 14. Cromatograma UPLC de los compuestos presentes en la fracción de hexano proveniente de las células en suspensión de *A. indica* cultivadas en biorreactor de tanque agitado a 400 rpm

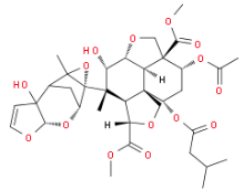
La asignación de metabolitos se llevó a cabo analizando los tiempos de retención y los espectros de masas, junto con el patrón de fragmentación. Adicionalmente, se empleó el *software* ACD/MS Fragmenter con la intención de predecir la fragmentación molecular de los compuestos detectados y de esta manera sustentar y explicar algunas de las estructuras propuestas. También se hizo una comparación con los datos de referencia relacionados con la especie (*Azadirachta indica*) que se encuentran reportados en la literatura y en bases de datos como ChemSpider y PubChem. De esta forma, se identificaron parcialmente 16 metabolitos posibles, entre ellos limonoides, diterpenoides y derivados de ácidos grasos. La identificación tentativa, el tiempo de retención, las fórmulas moleculares, los núcleos estructurales y la posible estructura de los compuestos se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Identificación tentativa de los metabolitos secundarios presentes en la fracción de hexano proveniente de las células en suspensión de *A. indica*, mediante UPLC-ESI-Qtof-MS.

Pico	Tiempo de retención (min)	Fórmula molecular	Masa (uma)	Área	Área relativa	Núcleo estructural	Identificación tentativa y posible estructura	Referencia
1	3.48	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	302.8912	20545.455	nd	Diterpenoide tricíclico	<p>Nimbionona</p> 	Singh et al., 2008
2	7.11	C ₂₉ H ₅₀ O	414.2531	47761.145	nd	Derivado del β-sitosterol	<p>Nimbosterol</p> 	Singh et al., 2008
3	7.85	C ₂₆ H ₃₄ O ₇	458.2822	538500.563	0.17	Limonoide	<p>Ácido nimbídico</p> 	Deepa et al., 2016
4	8.87	C ₂₇ H ₃₂ O ₆	452.3463	2267382.500	0.39	Limonoide	<p>28-Deoxo-nimbolida</p> 	Deepa et al., 2016

5	10.44	C ₃₃ H ₄₂ O ₈	566.4254	1279320.625	4.40	Limonoide	<p>3-Acetil-7-tigloilnimbidina</p> 	Deepa et al., 2016
6	11.68	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₅	678.4908	471826.688	18.54	Limonoide	<p>3-Deacetylazadiractina</p> 	Deepa et al., 2016
7	12.63	nd	nd	91686.594	10.46	nd	nd	
8	13.40	nd	nd	286736.188	3.86	nd	nd	
9	14.03	nd	nd	165111.891	0.75	nd	nd	
10	22.98	C ₁₉ H ₂₆ O	270.3147	444503.469	2.34	Diterpenoide	Azadricina	Deepa et al., 2016
11	23.84	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.2982	123850.102	1.35	Diterpenoide	Nimbionol	Deepa et al., 2016
12	27.64	C ₁₇ H ₂₂ O ₄	290.1958	212454.031	3.63	Diterpenoide derivado del nimbionol	Demetilnimbionol o Demetilnimbionol	Deepa et al., 2016
13	31.08	nd	326.3728	703832.125	1.01	nd	nd	
14	34.42	nd	369.3595	1377728.875	1.74	nd	nd	

15	36.01	C ₂₆ H ₃₄ O ₄	410.0892	2035884.125	5.75	Limonoide	Nimocina	Deepa et al., 2016
16	37.10	C ₂₆ H ₃₄ O ₄	410.1003	455415.500	0.79	Limonoide	Meldenindiol	Deepa et al., 2016
17	39.65	C ₃₂ H ₄₈ O ₈	560.1198	29348.592	1.71	Derivado de meliacina	6,28-Epoxi-14-meliaceno-1,3,7-triol; 20,21,22,23-Tetrahidro, 23-hidroxi,1-(2-metilpropanoilo), 3-Ac	Chapman y Hall, 2018.
18	40.57	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368.4305	114299.320	11.27	Derivado de ácido graso	Ácido lignocérico 	Skellon et al., 1962
19	41.96	C ₂₈ H ₃₆ O ₇	484.1169	452218.406	16.65	Limonoide	Isonimocinolida 	Deepa et al., 2016
20	43.02	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₃	634.1370	51863.113	3.72	Limonoide	Azadiractina M 	Chapman y Hall, 2018.
21	46.57		632.1799	754060.813	0.24		nd	
							Azadiractina O	

22	49.47	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₅	706.1651	97061.898	0.93	Limonoide		Deepa et al., 2016
23	53.65	nd	780.1917	208571.078	3.69	nd	nd	
24	55.38	nd	930.2198	nd	0.42	nd	nd	
25	60.15	nd	854.2173	nd	6.17	nd	nd	
26	62.84	nd	1006.2239	nd	nd	nd	nd	

nd: no disponible

El pico 1 fue identificado tentativamente como un diterpeno tricíclico conocido como nimbionona (C₁₈H₂₂O₄ ; 302.8912 uma) (Singh et al., 2008). La figura 15 ilustra la fragmentación molecular predicha para este compuesto y su posible estructura.

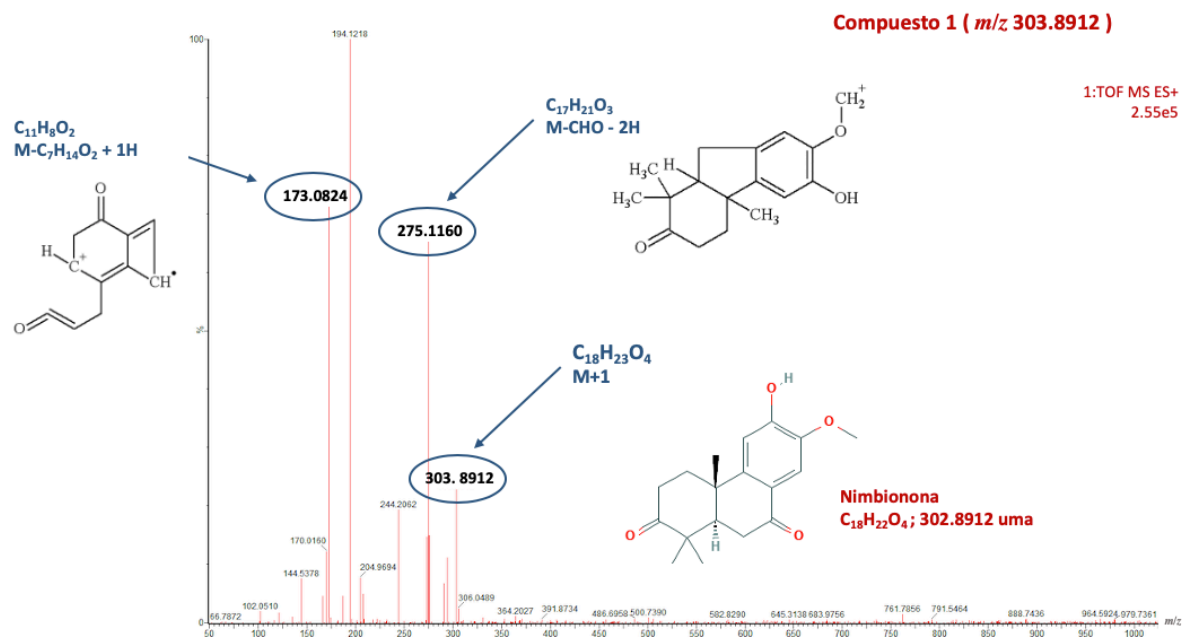


Figura 15. Espectro de masa del compuesto 1 (m/z 303.8912) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof-MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.

En los espectros de masa de los picos 2, 3, 4, 5 y 6 es posible observar la masa de diferentes aductos del compuesto en cuestión. Por ejemplo, para el pico 2 (figura 16) se observa:

Tiempo de retención	tr = 7.11 min
Masa del compuesto	M = 414.2531 uma
Pico cuasimolecular	M+1 uma = 415.2531 uma
Aducto M+H ₂ O	M+18 uma = 432.2797 uma
Aducto M+Na	M+23 uma = 437.2334 uma
Aducto M+K	M+39 uma = 453.2109 uma

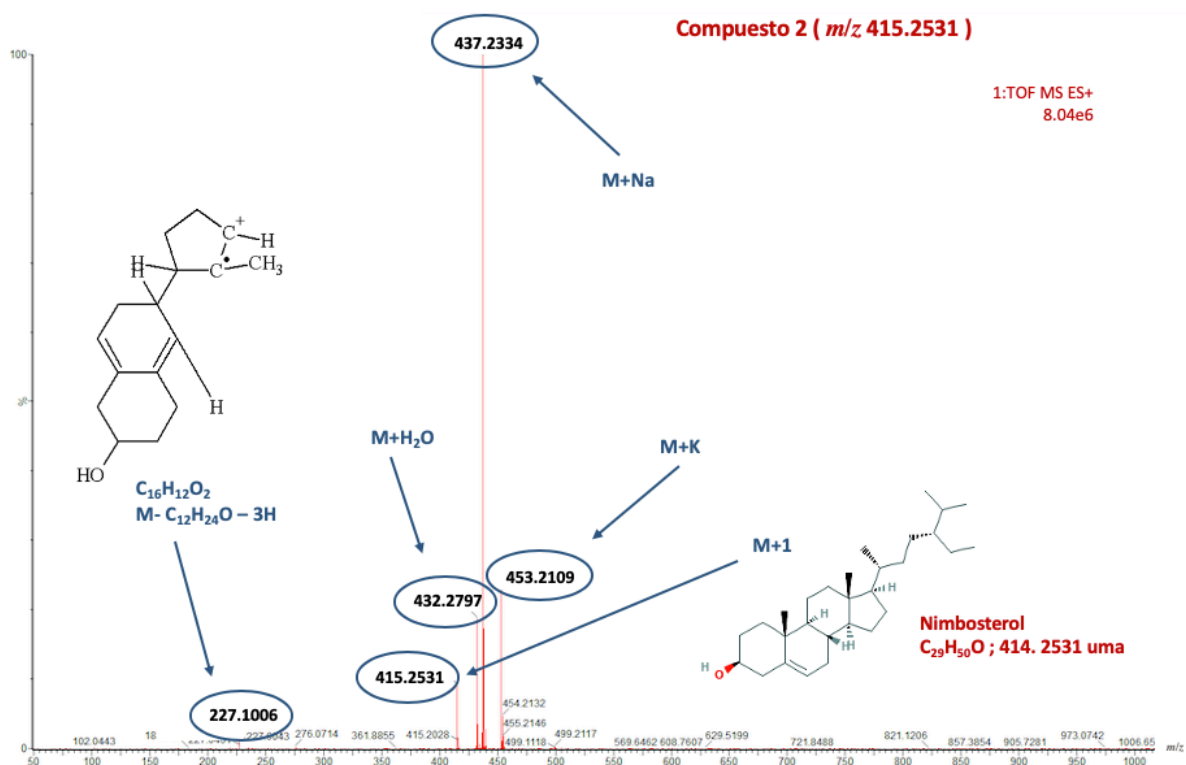


Figura 16. Espectro de masa del compuesto 2 (m/z 415.2531) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof-MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.

Este compuesto sería identificado como nimbosterol ($C_{29}H_{50}O$; 414.2531 uma), un derivado del β -sitosterol (Singh et al., 2008) y los siguientes cuatro picos como los limonoides ácido nimbídico ($C_{26}H_{34}O_7$; 458.2822 uma) (Singh et al., 2008), 28-deoxo-nimbolida ($C_{27}H_{32}O_6$; 452.3463 uma), 3-acetil-7-tigloilnimbidinina ($C_{33}H_{42}O_8$; 566.4254 uma) y 3-deacetilazadiractina ($C_{33}H_{42}O_{15}$; 678.4908 uma) (Deepa et al., 2016). El ácido nimbídico y el 28-deoxo-nimbolida son derivados de otro compuesto del neem conocido como nimbolida y para el cual ha sido reportada una muy buena actividad antiplasmodial *in vitro* (1.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Mackinnon et al., 1997). Los espectros de masa y la fragmentación molecular predicha que corresponde a tales compuestos, se presentan en los anexos del presente trabajo (anexos 2 al 5).

Por su parte, los picos 10 y 11 corresponden a un par de compuestos perteneciente a la familia de los diterpenoides y fueron parcialmente identificados como azadricina ($C_{19}H_{26}O$; 270.3147 uma) (pico 10) y nimbionol ($C_{18}H_{24}O_2$; 304.2982 uma) (pico 11) (Deepa et al., 2016). Por otra parte, el pico 12 se identificó parcialmente como un diterpenoide derivado del nimbionol y existen dos compuestos provenientes de *A. indica* que podrían coincidir con el análisis, el demetilnimbionol o el demetilnimbinol ($C_{17}H_{22}O_4$; 290.1958 uma) (Deepa et al., 2016). Los picos 15, 16, 19, 20 y 22 corresponden a compuestos identificados tentativamente como limonoides. Respectivamente se tienen el nimocina ($C_{26}H_{34}O_4$; 410.0892 uma), meldenindiol ($C_{26}H_{34}O_4$; 410.1003 uma), isonimocinolida ($C_{28}H_{36}O_7$; 484.1169 uma), azadiractina M ($C_{32}H_{42}O_{13}$; 634.1370 uma) y azadiractina O ($C_{35}H_{46}O_{15}$; 706.1651 uma) (Deepa et al., 2016 ; Chapman y Hall, 2018.). Estos dos últimos compuestos están relacionados con la azadiractina. Si bien la azadiractina no tiene una buena actividad sobre los estadios intraeritrocitarios de *P. falciparum*, como si la tiene el extracto obtenido en esta investigación, vale la pena recordar que posee una buena actividad biológica en las fases esporogónicas del parásito (Chianese et al., 2010).

El pico 17, por su parte, concuerda con un derivado de meliacina ($C_{32}H_{48}O_8$; 560.1198 uma) (Chapman y Hall, 2018.) y el pico 18 con un derivado de ácido graso, el ácido lignocérico ($C_{24}H_{48}O_2$; 368.4305 uma) (Skellon et al., 1962). El análisis mediante la predicción de la

fragmentación molecular no fue posible efectuarlo para todos los compuestos detectados en el presente trabajo. No obstante, las gráficas que ilustran los casos en los que si fue posible se presentan en los anexos del presente trabajo (anexo 6 al 10) .

Por último, no fue posible identificar tentativamente los picos 7,8,9,13,14,23,24,25 y 26 detectados mediante UPLC-ESI-Qtof-MS.

5. Conclusiones

En la presente investigación se lograron establecer condiciones adecuadas para los cultivos celulares de *Azadirachta indica*, que promovieron la producción de metabolitos secundarios con actividad antiplasmodial *in vitro* sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*. Dicha actividad se considera promisorio y permite perfilar el cultivo de células en suspensión de neem como una nueva alternativa de producción de antimaláricos.

A nivel de matraz Erlenmeyer varias condiciones de cultivo favorecieron significativamente la actividad biológica. A 25°C, 40 gSac/L, sin adición de peróxido de hidrógeno y empleando matraces Erlenmeyer sin baffles, la IC₅₀ alcanzada (26.16 µg/mL) disminuyó considerablemente respecto a la del tratamiento control (100 µg/mL) y se asocia con una actividad mediana. No obstante, la mejor actividad antiplasmodial *in vitro* en matraces Erlenmeyer se alcanzó a 15 °C, empleando medio MS, en presencia del precursor acetato de sodio, sin adición de elicitores y suplementando con sacarosa en una concentración de 30g/L. La IC₅₀ para el extracto obtenido en este caso fue 18.72 µg/mL y se considera de mediana actividad. Se determinó también, que la actividad antiplasmodial *in vitro*, en matraces Erlenmeyer, se ve significativamente desfavorecida por la adición de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo y la presencia de baffles en los matraces. Sin embargo, la actividad biológica de los cultivos celulares de *A. indica*, es principalmente promovida en biorreactor de tanque agitado cuando este se opera a una velocidad de 400 rpm, 30% OD, sacarosa suministrada en una concentración de 30 g/L, en oscuridad continua y a 25 °C. Bajo estas condiciones se registró la mejor actividad antiplasmodial *in vitro* e incluso, se considera promisorio (IC₅₀ = 10.67 µg/mL). Adicionalmente, este extracto tiene un efecto inhibitorio sobre el estadio trofozoíto inmaduro temprano. Por otra parte, la actividad antiplasmodial *in vitro* a la cual se ha hecho referencia previamente, no pudo asociarse con la producción de limonoides relacionados con azadiractina. Este hecho permite inferir que dichos compuestos no son los responsables de la bioactividad de los extractos obtenidos y posteriormente analizados. Finalmente, en este trabajo se identificaron tentativamente 16 metabolitos posibles (entre limonoides, diterpenoides y derivados de ácidos grasos) en los

extractos obtenidos a partir de los cultivos celulares de neem. Entre ellos se detectaron tentativamente el ácido nimbídico y el 28-deoxo-nimbolida que son derivados de otro compuesto del neem conocido como nimbolida y para el cual ha sido reportada una muy buena actividad antiplasmodial *in vitro*, en trabajos que anteceden la presente investigación.

Perspectivas futuras

Si bien, se ha logrado establecer condiciones adecuadas para los cultivos celulares de *Azadirachta indica* que promueven la actividad antiplasmodial *in vitro*, se hace estrictamente necesario establecer la identidad de los compuestos responsables de dicha propiedad. Para ello, es menester mejorar el proceso de extracción de metabolitos secundarios ya que el protocolo implementado en la presente investigación implica la ruptura completa de la membrana celular vegetal y favorece considerablemente la acumulación de material celular residual, en el extracto crudo. Esto dificulta drásticamente la purificación de dichos compuestos. También es necesario realizar análisis de resonancia magnética nuclear y rayos X, una vez se obtengan metabolitos puros, con el fin de identificarlos y describirlos estructuralmente.

Por otra parte, es de vital importancia que se lleven a cabo análisis de actividad citotóxica con el fin de establecer el carácter tóxico y la selectividad del extracto o los compuestos activos que sean aislados. Asimismo, es necesario profundizar en el estudio del efecto que causan los componentes activos del extracto sobre el parásito causante de la malaria. Para ello, se deben implementar metodologías como el docking molecular (estudio *in silico* de la interacción entre moléculas) que permitan descifrar el mecanismo de acción de estas sustancias. Finalmente, es posible optimizar la producción de los compuestos con actividad antiplasmodial *in vitro* mediante el cultivo de células de neem. Para esto, se recomienda que en futuros trabajos de investigación sea evaluado el efecto de otras velocidades de agitación en el intervalo entre 400 y 600 rpm.

Bibliografía

- Aarthy, T. Mulani, F.A. Pandreka, A. Kumar, A. Nandikol, S.S. Haldar, S. and Thulasiram, H.V. (2018). Tracing the biosynthetic origin of limonoids and their functional groups through stable isotope labeling and inhibition in neem tree (*Azadirachta indica*) cell suspension. *BMC Plant Biology*. 18:230.
- Akudugu, J. Gäde, G. Böhm, L. (2001). Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines. *Life Sciences* 68 (10): 1153–1160.
- Bannister, LH. Hopkins, JM. Fowler, RE. Krishna, S. Mitchell, GH. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today*. 16(10): 427-33.
- Batabyal, L. Sharma, P. Mohan, L. Maurya, P. Srivastava, C.N (2007). Larvicidal efficiency of certain seed extract against *Anopheles stephensi*, with reference to *Azadirachta indica*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 10(3): 251-255.
- Benavides, M. 2002. "Ecofisiología y química del estrés en plantas", Departamento de agricultura. UAAAN.
- Berthi, W. González¹, A. Rios, A. Blair, S. Cogollo, A. Pabón, A. (2018). Anti-plasmodial effect of plant extracts from *Picrolemma huberi* and *Picramnia latifolia*. *Malaria Journal*. 17:151.
- Bhatnagar, D. McCormick, S.P. (1998). The inhibitory effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxina synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 65(7): 1166-1168.
- Biamonte, Marco. A. Wanner, Jutta. Le Roch, Karine G. (2013) Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23 (2013) 2829–2843

Bianco, A. E., Batty, F. L., Brown, G. V. (1986). Plasmodium falciparum: Rapid quantification of parasitemia in fixed malaria cultures by flow cytometry. *Experimental Parasitology*, 62(2), 275–282. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(86\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(86)90032-9).

Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU (Medline Plus). Malaria. Consultado el 26 de febrero de 2019. Disponible en:
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000621.htm>

Blair, S. (2012). Retos para la eliminación de malaria en Colombia. Un problema de saber o de poder Instituto Nacional de Salud, Bogotá Colombia. *Biomédica*. 32(1): 1-51.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248–254.

Bravo, B. Sauvain, T. Gimenez, O. Muñoz, J. Callapa, O. Le Men, G. Massiot and C. Lavaud. (1999). Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*. 50(1): 71-74.

Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., and Zoels, B. (2000). Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(6), 594–601.

Busto, V. D., Rodríguez-Talou, J., Giulietti, A. M., and Merchuk, J. C. (2007). Effect of shear stress on anthraquinones production by *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Biotechnology Progress*, 24(1), 175–81.

Caicedo, O. Higuera, B.I. Martínez, S. (2009). Inducción de actividad peroxidasa y de fenoles totales como respuesta del fruto de lulo (*Solanum quitoense* L.) al patógeno causal de la antracnosis. *Rev. Colomb. Quim.* 38(1): 25-42.

- Capataz, J. T. (2005). Efecto de elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *Azadirachta indica* y su efecto sobre *Spodoptera sp.* Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Capataz, J., Orozco, F., Vergara, R., y Hoyos, R. (2007). Efecto antialimentario de los extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda* J.E.Smith en condiciones de laboratorio. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 60(1): 3703–3715.
- Carter, R. Kamini, NM. (2002). Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev.* 5: 564-94.
- Centers for Disease Control and Prevention (2018). Malaria (*Plasmodium spp.*) Consultado el 3 de marzo de 2019. Disponible en:
<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
- Cesa, S. Sisto, F. Zengin, G. Chimenti, P. Basilio, N. (2019). Phytochemical analyses and pharmacological screening of Neem oil. *South African Journal of Botany* 120: 331-337
- Chapman y Hall. (2018). Dictionary of natural products on DVD. CRC, Boca Ratón, FL.
- Chapman, C.M. Nienow, A.W. Cooke, M. Middleton, J.C. (1983). Particle-Gas-Liquid mixing in stirred vessels part II: gas-liquid mixing, *Chem. Eng. Res. Des.* 61 (2): 82–85.
- Chianese, G. Yerbanga, S.R. Lucantoni, L. Habluetzel, A. Basilio, N. Taramelli, D. Fattorusso, E. and Taglialatela-Scafati. O. (2010). Antiplasmodial Triterpenoids from the Fruits of Neem, *Azadirachta indica*. *Journal of Natural Products.* 73: 1448–1452

- Cornelis-Gerardus, M.M. (1986). Gas-Liquid Dispersing Characteristics of Turbine Agitators, Delft University of Technology.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. y Lewis, N.G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1319.
- Dahiya, N., Chianese, G., Abay, S. M., Taglialatela-Scafati, O., Esposito, F., Lupidi, G., ... Lucantoni, L. (2016). In vitro and ex vivo activity of an *Azadirachta indica* A.Juss. seed kernel extract on early sporogonic development of *Plasmodium* in comparison with azadirachtin A, its most abundant constituent. *Phytomedicine*, 23(14), 1743–1752.
- Deepa, V. Sreekumar, S. Biju, C.K. (2016). Validation of Russell's Viper Venom Detoxification Activity of *Azadirachta indica* through *In Silico* Method. *Journal of Pharmacy and Biological Science*. 11(2): 35-46
- Desjardins, R. Canfield, D. Haynes and J. Chulay. (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 16(6): 710-718.
- Dhar, R. Zhang, K. Talwar, G. Garg, S. Kumar, N. (1998). Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions. *Journal of Ethnopharmacology*. 61: 31–39.
- Díaz, M. Pérez, Y. Cazaña, Y. Prieto, M. Wencomo, H. Lugo, Y. (2010). Determinación de antioxidantes enzimáticos en variedades e híbridos de *Morus alba*. *Pastos y Forrajes*. 33(3).
- Dongping, L. Dexiu, Z. Yan, H. Qiao, Z. (2001). The effect of precursor feeding on flavonoids biosynthesis in cell suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Acta Botanica Yunnanica*, 23(4), 497–503.

- Doran, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier Science & Technology Books.
- Doran, P. (1999). Design of mixing systems of plant cell suspensions in stirred reactors, *Biotechnol. Prog.* 15: 319–335.
- Dunlop, E.H. Namdev, K. Rosenberg, Z. (1994). Effect of fluid shear forces suspensions on plant cell suspensions, *Chem. Eng. Sci.* 49 (14): 2263–2276.
- Fairhurst R.M, Wellem's T.E. (2009). *Plasmodium species (Malaria)*. Mandell G.L, Bennett J.E, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ª edición. Philadelphia. Capítulo 275: 3437-3462
- Farahna, M. Bedri, S. Khalid, S. Idris, M. Pillai, C.R. Khalil, E.A. (2010). Anti-plasmodial effects of *Azadirachta indica* in experimental cerebral malaria: Apoptosis of cerebellar Purkinje cells of mice as a marker. *North American Journal of Medical Sciences.* 2(11): 518-525.
- Färber, P.M. Arscott, I.D. Jr. Williams, C.H. Becker, K. Schirmer, R.H. (1998). Recombinant *Plasmodium falciparum* glutathione reductase is inhibited by the antimalarial dye methylene blue. *FEBS Letters.* 422, 311-314.
- Figueroa, A. El árbol milagroso, sirve para todo. *Ciencia al día*. Consultado el 4 de febrero de 2019. Disponible en:
<http://aupec.univalle.edu.co/informes/mayo97/boletin37/neem.html>
- Francis, SE. Sullivan, DJ.Jr. Goldberg, DE. 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 51: 97–123.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.97>.

- Garavito, G., Bertani, S., Rincón, J., Maurel, S., Monje, M., Landau, I., ... Deharo, E. (2007). Blood schizontocidal activity of methylene blue in combination with antimalarials against *Plasmodium falciparum*. *Parasite*, *14*, 135–140.
- García, P. Pabón, A. Arias, C. Blair, S. (2013). Evaluación del efecto citotóxico y del daño genético de extractos estandarizados de *Solanum nudum* con actividad anti-Plasmodium. *Biomédica*. *33*: 78-87.
- Ginsburg, H. (1990). Some reflections concerning host erythrocyte-malarial parasite interrelationships. *Blood Cells* 16:225–235.
- Goud, B. Harke, S.N. Kachole, M.S. Maharashtra, A. (2013) Changes in peroxidase activity during natural and oxidative stress-induced senescence *Azadirachta indica* A. Juss detached leaves, *Int. J. Current Res.* 5 (6): 1463–1467.
- Gupta, S. C. Prasad, S. Tyagi, A. K. Kunnumakkara, A. B. Aggarwal, B. B (2017). Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytomedicine*, *34*(May), 14–20.
- Haynes R.K. (2006). From artemisinin to new artemisinin antimalarials: biosynthesis, extraction, old and new derivatives, stereochemistry and medicinal chemistry requirements. *Curr Top Med Chem.* 6: 509-37.
- Hao, W. Guo, H. Zhang, J. Hu, G. Yao, Y. Dong, J. (2014). Hydrogen Peroxide Is Involved in Salicylic Acid-Elicited Rosmarinic Acid Production in *Salvia miltiorrhiza* Cell Cultures. *The Scientific World Journal*. ID 843764, 7 pages.
- Henzler, H. J. (2000). Particle stress in bioreactors. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology.* *67*: 35–82.

Instituto Nacional de Salud. Protocolo para la vigilancia en salud pública de malaria. Consultado el 8 de febrero de 2018.

Disponible en:

<https://www.minsalud.gov.co/Documents/Salud%20Pública/Ola%20invernal/Protocolo%20Vigilancia%20MALARIA.pdf>

Jaramillo, L.F. (1996). Algunas generalidades acerca del nim (*Azadirachta indica* A. Juss) segunda parte. Grupo de Recursos vegetales promisorios. Facultad de ciencias agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Jones, I. W., Denholm, a a, Ley, S. V, Lovell, H., Wood, A., & Sinden, R. E. (1994). Sexual development of malaria parasites is inhibited in vitro by the neem extract azadirachtin, and its semi-synthetic analogues. *FEMS Microbiology Letters*, 120(3): 267–73.

Jonville, M.C Kodja, H. Humeau, L. Fournel, J. De Mol P, Cao M. Angenot, L. Frédérick, M. (2008). Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 120(3): 382-6

Kieran, PM. Malone, D.M. MacLoughlin, P.F. (2000). Effects of Hydrodynamic and Interfacial Forces on Plant Cell Suspension Systems. Scheper, T. (2000). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 139- 177.

Klöckner, W., and Büchs, J. (2012). Advances in shaking technologies. *Trends in Biotechnology*, 30(6), 307–14.

Kumar, V. Chakraborty, A. Kaur, M. Pandey, S. Jena, M.K. (2018). Comparative study on antimicrobial activity of tulsi (*Ocimum sanctum*) and neem (*azadirachta indica*) methanol extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 11(12):514-517.

Larcher, W. 1995. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of function groups* (Third edition). Springer Verlag. Berlin-Heidelberg. p. 506

- MacKinnon, S. T. Durst, T. Arnason, J.T. Angerhofer, C. Pezzuto, J. Sanchez-Vindas, P.E. Poveda, L.J. Gbeassor, M. (1997). Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives, *Journal of Natural Products* 60: 336–341.
- Maehly, A.C. Chance, B. (1954). The assay of catalases and peroxidases *Methods of Biochemical Analysis*. 1: 357–424.
- Marques, A. Gomes, P. Oliveira, P. Rosenthal, P. Pascutti, P. Lima, L. (2015). Allosteric regulation of the *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 by heme. *Arch Biochem Biophys*. 573:92–9.
- Martín-Romero, F.J. Miguel-Lasobras, E.M. Domínguez-Arroyo, J.A. González-Carrera, E Álvarez, I.S (2008) Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes, *Reprod. Biomed. Online* 17 (January (5)) 652–661.
- Medicines for Malaria Venture (2010). The lifecycle of the malaria parasite. Consultado el 26 de febrero de 2019. Disponible en:
<http://www.mmv.org/newsroom/film/lifecycle-malaria-parasite>
- Meijer, J. J., ten Hoopen, H. J. G., Luyben, K. C. A. M., & Libbenga, K. R. (1993). Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(3): 234–238.
- Mesa, A. Pabon, A. Blair, S. (2011). Actividad antiplasmodial *in vitro* de *Calophyllum inophyllum*. *Revista Química Viva*. 2: 118-128.
- Milani, K. J. Schneider, T.G. Taraschi, T.F. (2015). Defining the Morphology and Mechanism of the Hemoglobin Transport Pathway in *Plasmodium falciparum* -Infected Erythrocytes. *Journals ASM.Org*, 14(4), 415–426. <https://doi.org/10.1128/EC.00267-14>

- Morita, M. Koyama, T. Sanai, H. Sato, A. Hiramoto, A. Masuyama, A. Nojima, M. Wataya, Y. Kim, H-S. (2015). Stage specific activity of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251, against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int.* 64(Suppl 1):113–7.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15; p. 473- 497.
- Namdev, P.K. and Dunlop, E.H. (1995). Shear sensitivity of plant cells in suspensions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 54: 109-131
- Nelson. (2013). Tratado de pediatría. Chandy, C. J. Peter, J.K. *Malaria (Plasmodium)*, 19.^a edición. Capítulo 280: 1252-1262, y 280-1.
- Nienow, A.W. (1998). Hydrodynamics of stirred bioreactors, *Appl. Mech. Rev.* 51 (1) 4–32.
- Orozco Sánchez, F. (2009). Efecto de la oferta de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de terpenoides con células de *Azadirachta indica* en un biorreactor. Yautepec, Morelos, México. Tesis (Doctorado en Ciencias). Instituto Politécnico Nacional.
- Ospina, I. D. (2012). Actividad antifúngica del extracto crudo de *Azadirachta indica* A. Juss. de suspensión de células sobre hongos dermatofitos causantes de enfermedades patógenas al hombre. Tesis presentada para optar el título de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- Pabón, A. Ramirez, O. Ríos, A. López, E. De las Salas B. Cardona, F. Blair, S. (2016). Antiplasmodial and Cytotoxic Activity of Raw Plant Extracts as Reported by Knowledgeable Indigenous People of the Amazon Region (Vaupés Medio in Colombia). *Planta Med.* DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-104283>.
- Parida, M. Upadhyay, C. Pandya, G. Jana, A. (2002). Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology*. 79:273–278.

- Peter, C. P. Suzuki, Y. and Büchs, J. (2006). Hydromechanical stress in shake flasks: correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6), 1164–1176.
- Prakash, G. Emmanuel, C. J. S. K. Srivastava, A. K (2005) Variability of azadirachtin in *Azadirachta indica* (neem) and batch kinetics studies of cell suspension culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(3): 198–204.
- Prakash, G. & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures. *Process Biochemistry*. 40(12): 3795– 3800.
- Prakash, G. & Srivastava, A. K. (2007). Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. *Process Biochemistry* 42, 42, 93–97.
- Prakash, G. & Srivastava, A. K. (2008). Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. *Biochemical Engineering Journal*. 40(2): 218–226.
- Prakash, G. & Srivastava, A. K. (2011). Integrated yield and productivity enhancement strategy for biotechnological production of azadirachtin by suspension culture of *Azadirachta Indica*. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 129–137.
- Priyanka, J., Hingorani, L., & Nilima, K. (2013). Pharmacodynamic evaluation for antiplasmodial activity of *Holarrhena antidysentrica* (Kutaja) and *Azadirachta indica* (Neemb) in *Plasmodium berghei* infected mice model. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(7), 520–524.
- Rodriguez-Monroy, M., & Galindo, E. (2003). Las células vegetales, ¿frágiles para crecer en biorreactores? *BioTecnología*, 8(2): 6–17.

- Rojano, B.A. Zapata-Acosta, K. Cortes-Correa, F (2012) Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* P (Kunth) L. H. Bailey (curuba), Rev. Cuba. Plantas Med. 17 (4): 408–419.
- Sahin, G. Kumar, S. Gurel, E. (2014). Hydrogen peroxide-induced antioxidant activities and cardiotoxic glycoside accumulation in callus cultures of endemic *Digitalis* species. *Plant Physiology and Biochemistry* 82: 89-94
- Sato, F. Hashimoto, T. Hachiya, A. Tamura, K. Choi, K.B. Morishige, T. et al., (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 367–72.
- Saxena, R. (1998). Neem in sustainable agriculture with special reference to its role in IPM. In *Neem applications in agriculture, health care and environment. Proceedings and extended summaries. International conference on Neem - Setting goals for a global vision. Neem Foundation. Mumbai, India.* 1-17.
- Shinde, A. N., Malpathak, N., & Fulzele, D. P. (2009). Optimized production of isoflavones in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. Using elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(5): 612–618.
- Sidhu, O.P. Behl, H.M. (1996). Seasonal variation in azadirachtins in seeds of *Azadirachta indica*. *Current Science* 70: 1084–1086.
- Singh, K.K. Phogat, S. Dillon, R.S. Tomar, A. (2008). *Neem: a treatise*. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi. India. Pag: 232 – 316
- Skellon, J. H. Thorburn, S. Spence, J. Chatterjee, S. N. (1962). The fatty acids of neem oil and their reduction products *J. Sci. Food. Agric.* Vol 13.

- Somsak, V. Chachiyo, S. Jaihan, U. (2015). Anti-hemolysis of Aqueous Crude Extract of Siamese Neem Tree (*Azadirachta indica*) during *Plasmodium berghei* Infection in Mice. *Malaria Control & Elimination* 2015, 4(1): 129.
- Srivastava, S. & Srivastava, A. K. (2011). Statistical medium optimization for enhanced azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 48(1): 73–84.
- Sujanya, S. Devi, B. P. & Sai, I. (2008). In vitro production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Biosciences*. 33(1): 113–20.
- Suleman, S. Beyene, T. Kebebe, D. Belew, S. (2017). Treatment of malaria and related symptoms using traditional herbal medicine in Ethiopia. *Journal of Ethnopharmacology Journal*, 213 (Junio), 262–279.
- Tapanelli, S. Chianese, G. Lucantoni, L. Yerbanga, R. S. Habluetzel, A. Tagliatela-Scafati, O. (2016). Transmission blocking effects of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel limonoids on *Plasmodium berghei* early sporogonic development. *Fitoterapia* 114: 122–126
- Thakurta, P. Bhowmik, P. Mukherjee, S. (2007). Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 607–612.
- Trager, W. Tershakovec, M. Lyandvert, I. Stanley, H. Lanners, N y Gubert, E. (1981). Clones of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* obtained by microscopic selection: Their characterization with regard to knobs, chloroquine sensitivity, and formation of gametocytes. *Proc. Natd Acad. Sci. USA*. Vol. 78, No. 10, pp. 6527-6530,
- Trivedi, A. Ahmad, R. Sahabjada, M.A. (2018). Effect of alkaline pH on cytotoxicity profile of neem (*Azadirachta indica*) ethanolic extract against human breast cancer cell line MDA-MB-231 *European Journal of Integrative Medicine* 24: 1-7

- Trujillo-Roldán, M. A., & Valdéz-Cruz, N. A. (2006). El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(3-4), 269–280.
- Trujillo, P. A. Zapata, L. Hoyos, R. Yepes, F. Capataz, J. Orozco, F. (2008). Determinación de la DL 50 y TL 50 de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 61(2): 4564–4575.
- Udeinya, I. J. Mbah, A. U. Chijioke, C. P. Shu, E. N. (2004). An antimalarial extract from neem leaves is antiretroviral. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 435–437.
- Valentines, M. Vilaplana, R. Torres, R. Usall, J. Larrigaudiere, C. (2005). Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*. 36: 227-234
- Vasenwala, S. Seth, R. Haider, N. Islam, N. Khan, T. Maheshwari, V. Ur Rehman, S (2012). A study on antioxidant and apoptotic effect of *Azadirachta indica*(neem) in cases of cervical cancer. *Archives of gynecology and obstetrics* 286 (5): 1255-9.
- Vásquez-Rivera A, Chicaiza-Finley D, Hoyos R and Orozco-Sánchez F. (2015). Production of Limonoids with Insect Antifeedant Activity in a Two-Stage Bioreactor Process with Cell Suspension Culture of *Azadirachta indica*. *App Biochem Biotechnol* 177: 334–45
- Velikova, V. Yordanov, I. Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines, *Plant Sci*. 151: 59–66.
- Villegas-Velásquez, S. (2015) Estrés hidrodinámico en la producción de compuestos insecticidas a partir de células de *Azadirachta indica* Tesis presentada para optar por el título de Magíster en Ciencias – Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

- Villegas-Velásquez, S. Martínez-Mira, A.D. Hoyos, R. Rojano, B. and Orozco-sánchez, F. (2017) Hydrodynamic stress and limonoid production in *Azadirachta indica* cell culture. *Biochem Eng J* 122: 75–84
- Wandscheer, C. Duque, J. da Silva, M. Fukuyama, Y. Wohlke, J. Adelman, J. Fontana, J. (2004). Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 44: 829–835
- Wang, N. Wicht, K.J. Shaban, E. Ngoc, T.A. Wang, M.Q. Hayashi, I. Hossain, M.I. Takemasa, Y. Kaiser, M. Sayed, I.E.T.E. Egan, T.J. Inokuchi, T. (2014). Synthesis and evaluation of artesunate–indoloquinoline hybrids as antimalarial drug candidates. *Med. Chem. Commun.* 5:927-931.
- Wewetzer, A. (1998). Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of Azadirachtin. *Phytoparasitica*, 26(1): 47–52.
- World Health Organization; 2019. World Malaria Report 2019. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wulari, A. Isah, U. Thank, O. Ladi, S. (2010). Toxicity and potential anti-trypanosomal activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* (Maliacea) stem bark: An in vivo and in vitro approach using *Trypanosoma brucei*. *Journal of Ethnopharmacology* 128 (2): 495–500.
- Yadav, P. A., Pavan, C., Siva, B., Babu, K. S., Devi, A., Singh, P., ... Rao, A. V. (2017). European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and evaluation of anti-plasmodial and cytotoxic activities of epoxyazadiradione derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 134, 242–257.
- Zaker, A. Sykora, C. Gössnitzer, F. Abrishamchi, P. Asili, J. Mousavi, S-H. Wawrosch, C. 2014. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. *Industrial Crops and Products*. 67: 97–102

Zhong-dong shi, Ying-Jin Yuan, Jin-Chuan Wu, and Gui-Min Shang. (2003). Biological Responses of Suspension Cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* to Shear Stresses in the Short Term. *Biochemistry and Biotechnology*. 110: 61-74

Zhao, J. Davis, L. Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23: 283 – 333

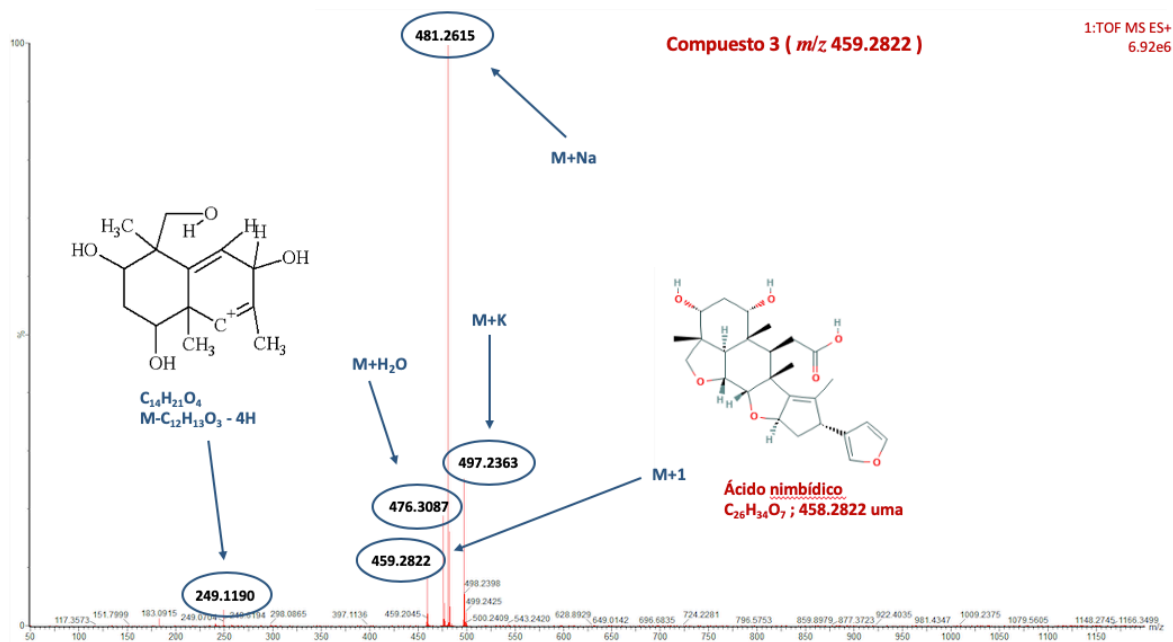
Zuleta-Castro C, Rios D, Hoyos R and Orozco-Sánchez F (2017) First formulation of a botanical active substance extracted from neem cell culture for controlling the armyworm. *Agron Sustain Dev* 37:40

Anexos

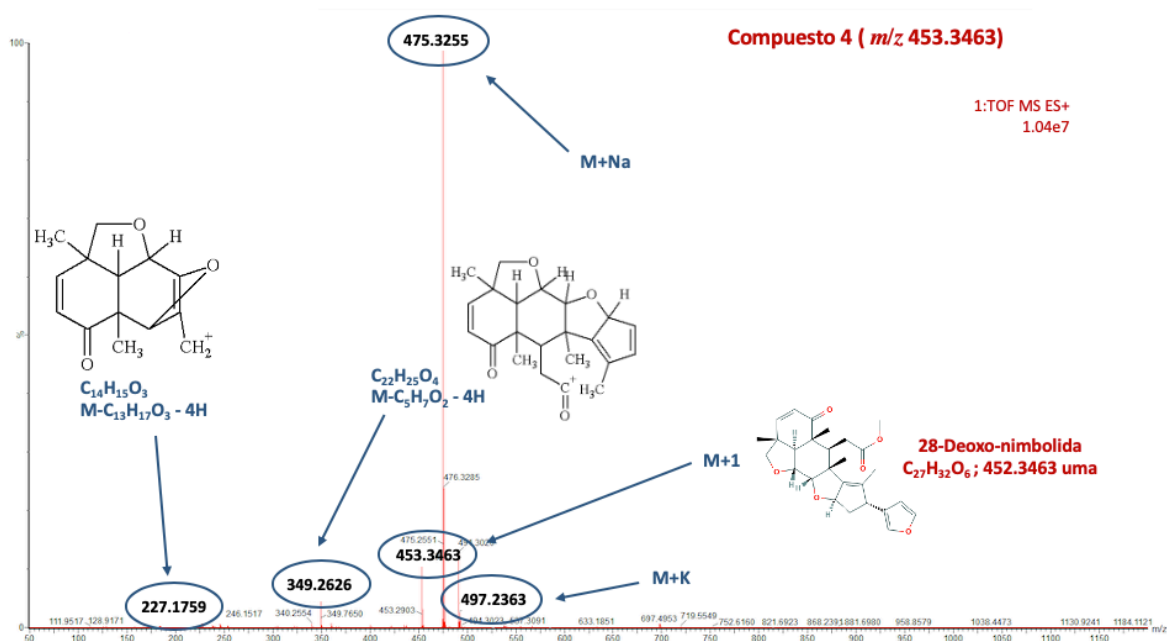
Anexo 1. Porcentajes de parasitemia obtenidos durante la valoración de la actividad antiplasmodial estadio específico sobre la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*.

Extracto (ug/mL)	Porcentaje de parasitemia 0h-4h		Porcentaje de parasitemia 4h-8h		Porcentaje de parasitemia 8h-12h		Cloroquina (nM)
	Extracto	Cq	Extracto	Cq	Extracto	Cq	
0	1,35%	2,26%	5,20%	5,51%	1,90%	2,57%	0
1,5	1,25%	2,32%	5,26%	5,28%	2,35%	2,59%	31,125
3,25	2,14%	1,85%	5,11%	4,80%	1,66%	2,24%	62,25
6,25	1,27%	1,87%	4,74%	4,74%	1,72%	1,81%	125
12,5	1,13%	1,88%	4,44%	4,04%	1,88%	1,76%	250
25	1,04%	1,82%	4,27%	3,40%	1,60%	1,98%	500
50	0,75%	1,13%	3,42%	1,39%	1,18%	1,40%	1000
100	0,62%	0,49%	2,42%	1,17%	0,97%	0,74%	2000
Extracto (ug/mL)	Porcentaje de parasitemia 12h-16h		Porcentaje de parasitemia 16h-20h		Porcentaje de parasitemia 20h-24h		Cloroquina (nM)
	Extracto	Cq	Extracto	Cq	Extracto	Cq	
0	5,46%	5,71%	3,37%	3,45%	3,26%	3,01%	0
1,5	5,13%	5,56%	3,81%	3,48%	3,45%	3,34%	31,125
3,25	4,94%	5,33%	3,41%	3,69%	3,48%	3,05%	62,25
6,25	4,48%	5,25%	3,12%	3,57%	3,35%	3,12%	125
12,5	4,71%	5,30%	2,88%	3,26%	2,88%	2,67%	250
25	4,52%	3,49%	2,09%	1,67%	1,33%	1,89%	500
50	4,27%	2,61%	0,53%	0,80%	1,15%	1,63%	1000
100	2,99%	1,34%	0,45%	0,51%	0,47%	0,79%	2000
Extracto (ug/mL)	Porcentaje de parasitemia 24h-28h		Porcentaje de parasitemia 28h-32h		Porcentaje de parasitemia 32h-36h		Cloroquina (nM)
	Extracto	Cq	Extracto	Cq	Extracto	Cq	
0	4,92%	4,93%	2,94%	3,54%	3,51%	3,36%	0
1,5	5,04%	5,29%	3,37%	3,99%	3,76%	3,22%	31,125
3,25	4,01%	4,17%	3,35%	4,00%	3,61%	3,12%	62,25
6,25	3,65%	4,40%	3,47%	3,88%	3,86%	2,98%	125
12,5	3,77%	3,95%	3,84%	3,96%	3,85%	2,94%	250
25	3,36%	3,05%	3,70%	3,66%	3,49%	2,82%	500
50	3,03%	2,18%	3,01%	3,51%	3,34%	2,52%	1000

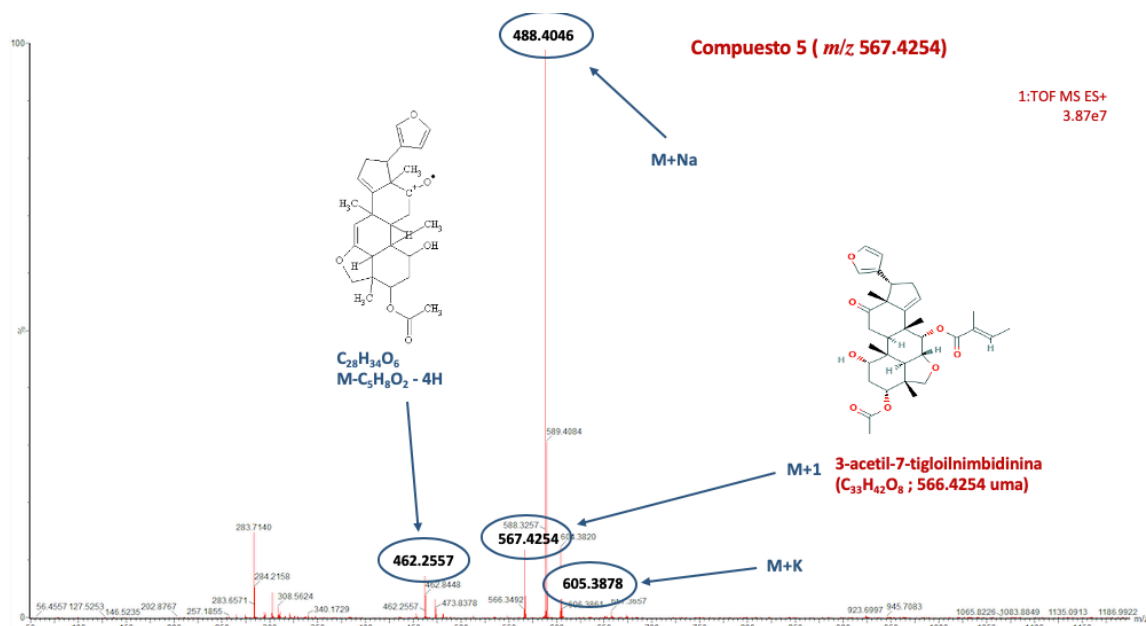
Extracto (ug/mL)	Porcentaje de parasitemia 36h-40h		Porcentaje de parasitemia 40h-44h		Porcentaje de parasitemia 44h-48h		Cloroquina (nM)
	Extracto	Cq	Extracto	Cq	Extracto	Cq	
0	3,99%	4,05%	2,82%	2,81%	3,68%	3,69%	0
1,5	4,32%	4,35%	2,77%	3,03%	3,49%	3,81%	31,125
3,25	4,42%	4,14%	2,93%	3,30%	3,58%	3,62%	62,25
6,25	4,63%	3,98%	2,91%	3,35%	3,59%	3,55%	125
12,5	4,15%	3,56%	3,24%	3,41%	3,79%	3,77%	250
25	4,09%	3,28%	2,98%	3,07%	3,72%	3,49%	500
50	3,92%	3,41%	3,17%	3,07%	3,72%	3,54%	1000
100	3,70%	2,73%	2,55%	2,52%	3,28%	3,30%	2000



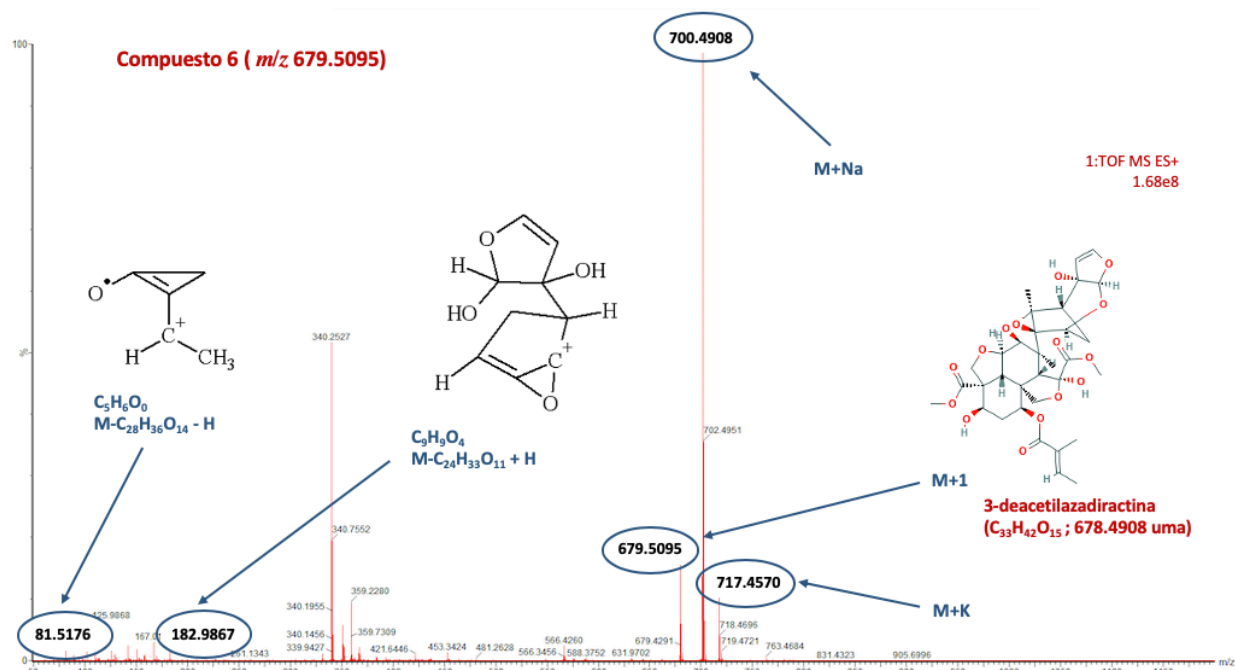
Anexo 2. Espectro de masa del compuesto 3 (m/z 459.2822) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.



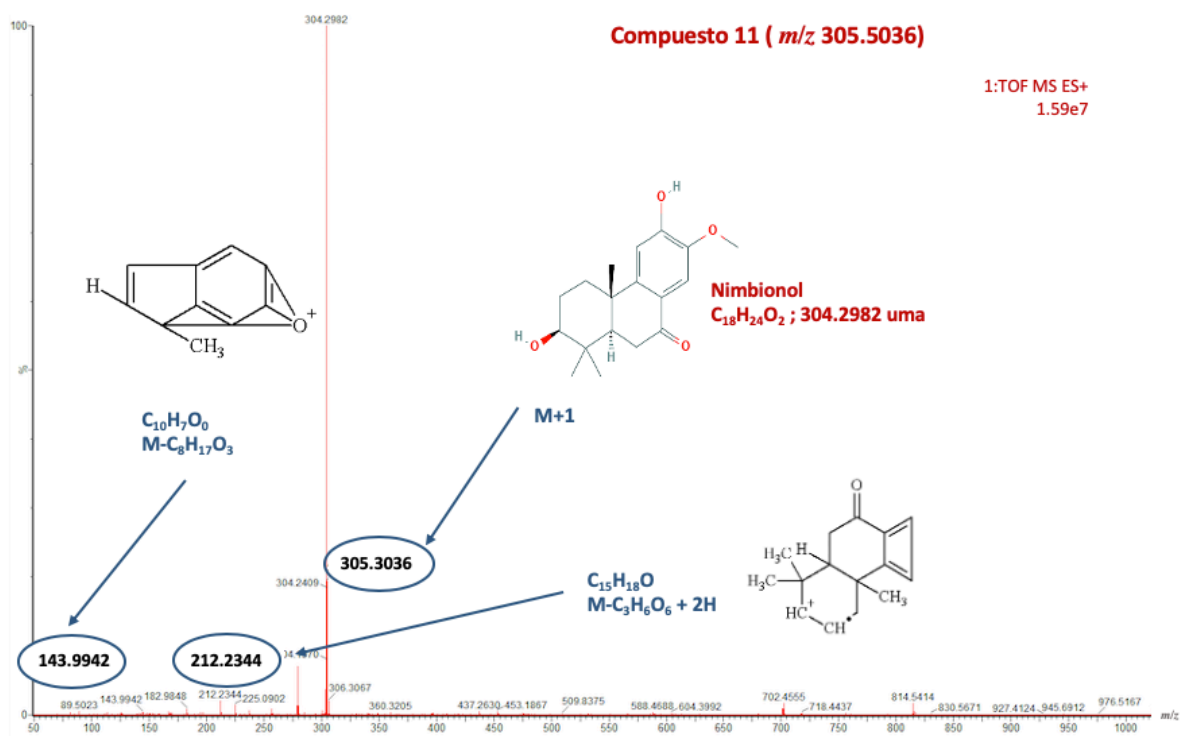
Anexo 3. Espectro de masa del compuesto 4 (m/z 453.3463) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.



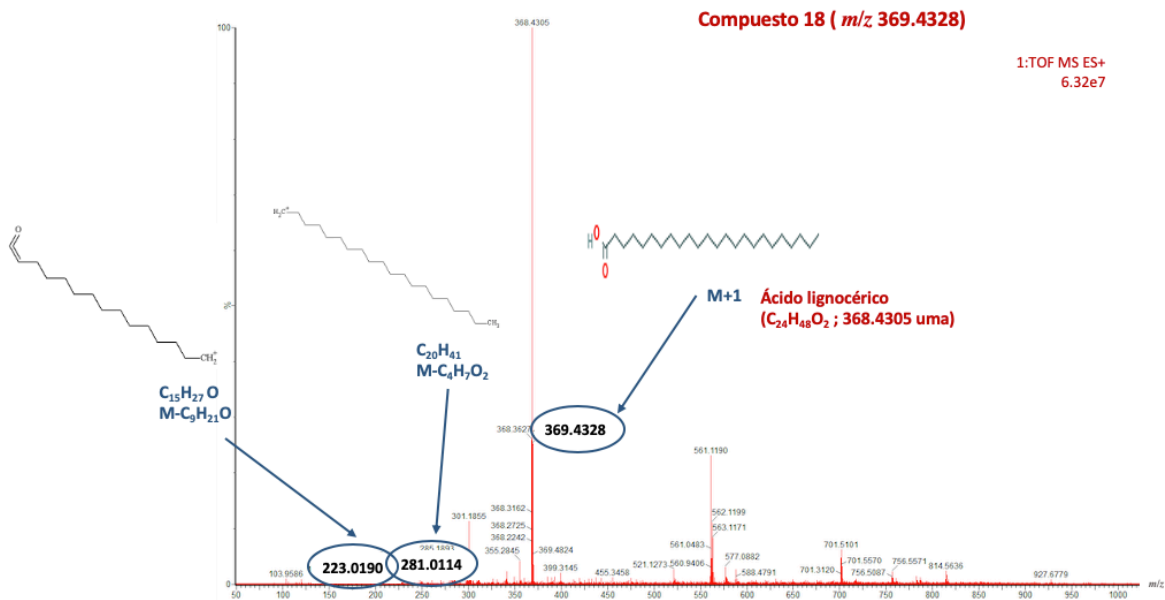
Anexo 4. Espectro de masa del compuesto 5 (m/z 567.4254) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.



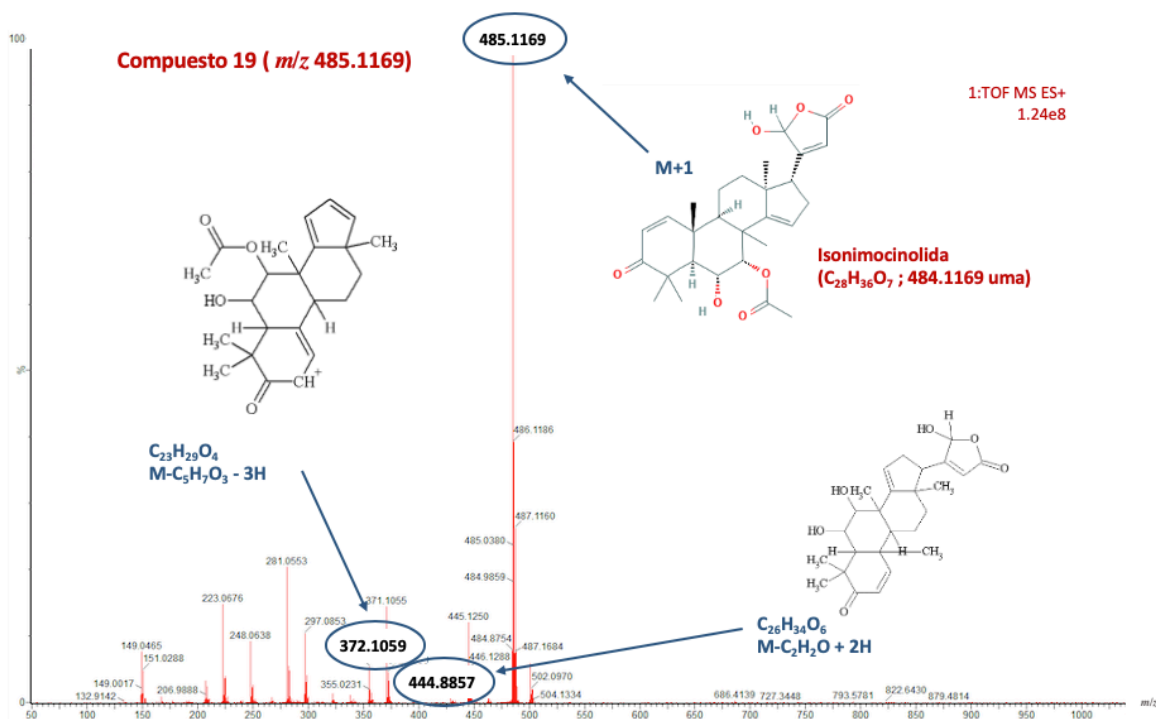
Anexo 5. Espectro de masa del compuesto 6 (m/z 679.5095) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.



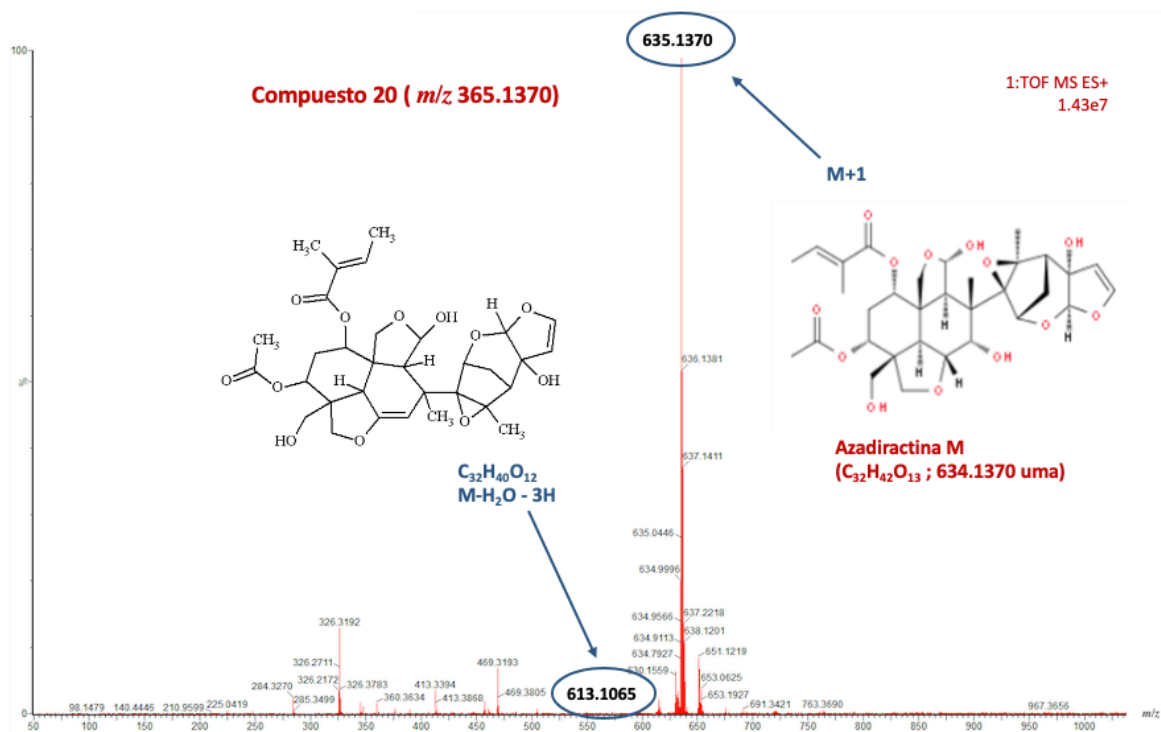
Anexo 6. Espectro de masa del compuesto 11 (m/z 305.5036) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.



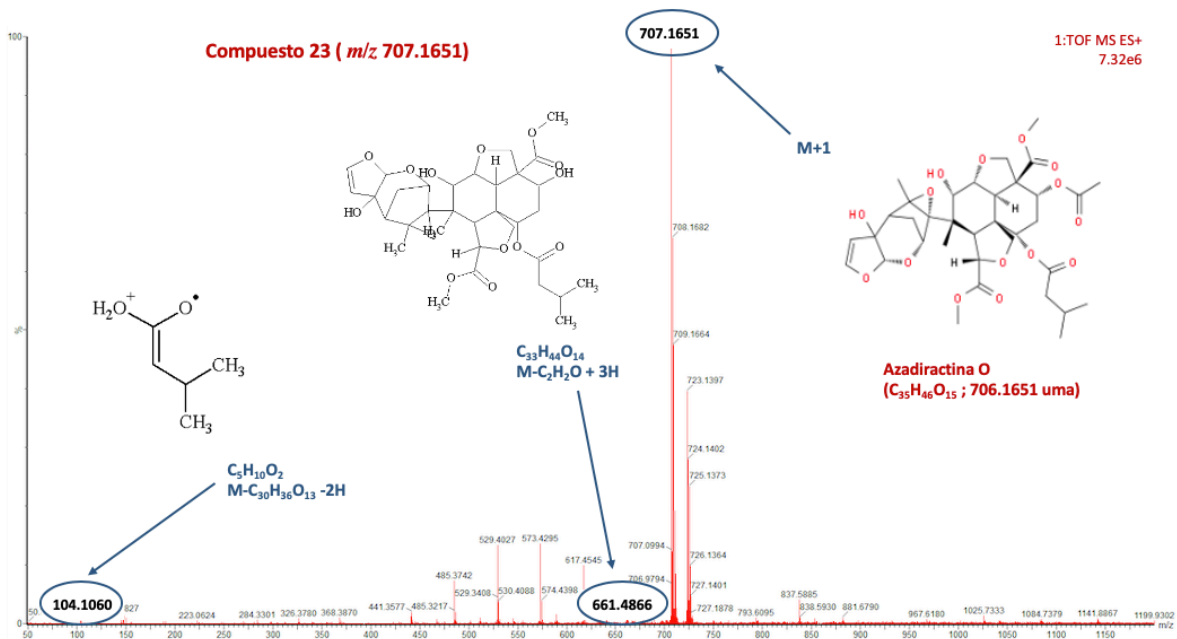
Anexo 7. Espectro de masa del compuesto 18 (m/z 369.4328) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.



Anexo 8. Espectro de masa del compuesto 19 (m/z 485.1169) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter



Anexo 9. Espectro de masa del compuesto 20 (m/z 365.1370) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.



Anexo 10. Espectro de masa del compuesto 23 (m/z 707.1651) detectado mediante UPLC-ESI-Qtof MS y la fragmentación molecular predicha con el software ACD/MS Fragmenter.