



Determinación de la actividad antimalárica de cloroquina con extracto acuoso *Azadirachta indica A.* Juss en ratones infectados con *Plasmodium berghei*

Determination of the antimalarial activity of chloroquine with aqueous extract of the leaf of *Azadirachta indica A.* Juss in mice infected with *Plasmodium berghei*

MARÍA E ACOSTA^{*1}, NEIRA GIAMBOA DE DOMÍNGUEZ^{*2}, MARÍA A OSUNA^{**3}

Resumen

La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda la administración de combinaciones entre antimaláricos convencionales entre sí, con otros de distinta indicación terapéutica, y con plantas medicinales por sus efectos pleiotrópicos. En virtud de tal contexto, en este trabajo, se propone evaluar el potencial antimalárico de la Cloroquina (CQ), quinolina usada en el tratamiento de la malaria, y su combinación con el extracto acuoso de la hoja de *Azadirachta indica A.* Juss (NEEM), con la finalidad de potenciar la actividad antimalárica de la CQ. A tales efectos, utilizando el modelo de infección no patente de ratones de la cepa INH con *Plasmodium berghei*, se ensayaron las distintas combinaciones CQ20 mg/Kg + EAN 10mg/Kg (CQ20+EAN10) y la CQ 20mg/Kg + EAN 20mg/Kg (CQ20+EAN20) utilizando la Prueba de Peter, según la cual los ratones infectados con *Plasmodium berghei* (10^6 parásitos por ratón, vía i.p.), se trataron con las combinaciones en estudio durante 5 días (1 dosis diaria, por 5 días, vía i.p.), iniciando el tratamiento 2 horas post infección. Se determinó el porcentaje de parasitemia al 5^º día post infección, y se registró los días de sobrevivencia de los animales infectados y tratados (DSP), comparados con los controles infectados y no tratados, durante 30 días. Las combinaciones (CQ20+EAN10) y (CQ20+EAN20) resultaron igual de efectivas que la CQ20 de forma individual, para disminuir la parasitemia y aumentar la sobrevivencia de los animales infectados con *Plasmodium berghei*, lo que sugiere que el EAN no posee actividad antimalárica ni potencia el efecto de la CQ.

Palabras clave: *Plasmodium berghei*, Cloroquina, Extracto acuoso, *Azadirachta indica A.* Juss, Neem, Actividad Antimalárica

Abstract

The World Health Organization (WHO) recommends the administration of combinations of conventional antimalarials with each other, with other drugs with different therapeutic indications, and with medicinal plants due to their pleiotropic effects. In this context, this study aims to evaluate the antimalarial potential of chloroquine (CQ), a quinoline used in the treatment of malaria, and its combination with the aqueous extract of the leaf of *Azadirachta indica A.* Juss (NEEM), to enhance the antimalarial activity of CQ. For these purposes, using the non-patent infection model of mice of the INH strain with *Plasmodium berghei*, the different combinations CQ20 mg/Kg+EAN 10mg/Kg (CQ20+EAN10) and CQ 20mg/Kg +EAN 20mg/Kg (CQ20+EAN20) were tested using the Peter test, according to which mice infected with *Plasmodium berghei* (10^6 parasites per mice, i.p.), were treated with the combinations under study for 5 days (1 daily dose, for 5 days, i.p.), starting treatment 2 hours post infection. The percentage of parasitemia was determined on the fifth day post-infection, and the days of survival of the infected and treated animals (DSP) were recorded and compared with the infected and untreated controls, for 30 days. The combinations (CQ20+EAN10) and (CQ20+EAN20) were equally effective as CQ20 individually in reducing parasitemia and increasing the survival of animals infected with *Plasmodium berghei*, suggesting that EAN does not have antimalarial activity, nor does it enhance the effect of CQ.

Keywords: *Plasmodium berghei*, chloroquine, aqueous extract, *Azadirachta indica A.* Juss, Neem, antimalarial activity

*Unidad de Bioquímica. Facultad de Farmacia. UCV; **Escuela José María Vargas Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela . Correspondencia: mariuacosta0103@gmail.com

Orcid: ¹[0000-0003-0721-0046](https://orcid.org/0000-0003-0721-0046)

²[0000-0002-9918-0413](https://orcid.org/0000-0002-9918-0413)

³[0009-0007-7077-7658](https://orcid.org/0009-0007-7077-7658)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2025.88.1-2.2](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2025.88.1-2.2)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 09/04/2025

Aprobación: 20/04/2025

Introducción

La malaria es una enfermedad infecciosa aguda y crónica de carácter endemico-epidémica, causada por un parásito del género *Plasmodium* spp., de los cuales existen más de 175 especies y sólo cinco de ellas infectan al hombre: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*, siendo el *Plasmodium falciparum* el causante de la forma más severa de la enfermedad (Oghenesuvwe y col., 2021).

El tratamiento de la malaria descansa fundamentalmente en el uso de un número limitado de fármacos; que presentan en su mayoría restricciones desde el punto de vista farmacológico, toxicológico y a los cuales, el *Plasmodium* ha desarrollado resistencia. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2023) reportó que en las zonas tropicales existe una prevalencia de la enfermedad de más de 219 millones de casos sintomáticos y se proyecta unas 435.000 muertes, siendo, la población más susceptible los menores de cinco años y las mujeres embarazadas. En América, hubo 568.000 casos de malaria y cerca de 220 muertes y se considera que cerca de 132 millones de personas viven en áreas de riesgo de contraer malaria. Actualmente, se abren nuevas expectativas para el desarrollo de antimaláricos, como el descubrimiento del genoma, la biología molecular, el modelaje molecular, el reposicionamiento de fármacos y las combinaciones farmacológicas (Acosta y Gamboa, 2017).

Los fármacos más usados para el tratamiento antimalárico son: las 4-aminoquinolinas (quinina, cloroquina (CQ), amodiaquina, tafenoquina), las 8-amino-

quinolinas (Primaquina, mefloquina, halofantrina), los inhibidores del metabolismo del folato (Sulfonamidas y sulfonas, pirimetamina, proguanil), antibióticos (quinolonas, macrólidos), endoperóxidos relacionados con artemisinina (Artesunato, artemeter, dihidroartemisina, artemisina), y la hidroxinaftoquinona (Atovaquona) (Oghenesuvwe y col., 2021).

Entre los compuestos quinolínicos usados actualmente, de cuyo núcleo farmacofórico se tienen referencias que datan de hace más de dos siglos, se encuentran la cloroquina, amodiaquina y la mefloquina. La OMS recomienda el uso combinado de fármacos para el tratamiento de la malaria no complicada por *Plasmodium falciparum*, con la finalidad de incrementar la eficacia terapéutica.

Las combinaciones de fármacos más utilizadas de comprobada efectividad son: Sulfadoxina+pirimetamina, sulfadoxina + pirimetamina+amodiaquina, artesunato + amodiaquina, artesunato+mefloquina (Artequin®), artesunato + amodiaquina (Arsucam®), artemeter + lumefantrina (Coartem®), artesunato+sulfadoxina+pirimetamina (Oghenesuvwe y col., 2021; OMS, 2023).

Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha planteado a través de la Estrategia Antimalárica 2016-2030, aplicar nuevas directrices de control, entre las que se incluyen el desarrollo de vacunas, el control vectorial y la síntesis de fármacos antimaláricos efectivos y seguros, así como mejorar la eficacia terapéutica de los fármacos antimaláricos convencionales ya existentes, encontrar nuevos blancos de acción y el uso de combinaciones de fármacos a fin de garantizar sinergismo y

potenciación antimalárica, con la finalidad de destruir los parásitos resistentes o retardar el desarrollo de resistencia, debido a mecanismos moleculares que han puesto en marcha los parásitos del género *Plasmodium* (OMS, 2023).

En este sentido se han evaluado las combinaciones entre antimaláricos convencionales entre sí, o con fármacos que presenten una indicación terapéutica distinta, tales como antibióticos (Siribhadra y col., 2022), antihistamínicos (George y col., 2022), bloqueantes de los canales de calcio (Martiney, 1995), antipiréticos (Deharo y col., 2003; Acosta y Gamboa, 2017) y el uso de plantas medicinales con propiedades antioxidantes (Dkhil, 2021); todo ello con la finalidad de revertir la resistencia a las aminoquinolinas, fundamentalmente, o potenciar el efecto antimalárico empleado en la combinación. Además de ser más accesibles y con menor costo.

Azadirachta indica A. Juss., también conocida como Neem, margosa, nimtree o lila india, es un árbol tropical y perenne originario de la India y Birmania. Es un miembro de la familia de las meliáceas, la misma de la caoba. Recientemente, se ha demostrado que los extractos derivados del Neem funcionan en diversos ámbitos, desde repelente de insectos hasta suplementos para reducir la inflamación, controlar la diabetes e incluso combatir el cáncer. En una revisión exhaustiva reciente acerca de las actividades antimaláricas de varias plantas medicinales africanas se encontró que los extractos de la planta *Azadirachta indica* A. Juss, conocida como Neem, obtuvieron buenos resultados en todos los ensayos realizados (Tajbakshy col., 2021). Los estudios *in vitro* e *in vivo* indican que los extractos acuosos, metanólicos o etanólicos de tallos, hojas o corteza de

Neem presentan una actividad antimalárica significativa contra las cepas de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium berghei*, además de disminuir los efectos tóxicos producidos por la infección (Tepongning y col., 2018). Aunque el área de investigación sobre Neem como antiparasitario está relativamente poco desarrollada, la mayoría de las investigaciones publicadas hasta el momento se han centrado en *Plasmodium* (Rathod y col., 2022).

Además de su uso como antimalárico, la planta posee una serie de efectos pleiotrópicos, entre los que destacan: en enfermedades de la piel, úlceras gástricas y duodenales, constipación, reumatismo, antiinflamatorios, hipolipemiante, anticancerígeno, antiviral, antibacteriano, antiparasitario, antifúngico, nefroprotector y hepatoprotector (Alzohairy y col., 2016; Deshpande y col., 2014; Islas y col., 2020; Sarkar y col., 2022).

Dentro de este contexto, en el presente estudio se evaluó la actividad antimalárica de las combinaciones del extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta indica* A. Juss (EAN) con el fármaco antimalárico cloroquina (CQ). La selección de EAN, se basó en sus efectos antimaláricos, antimicrobianos, antioxidantes, inmunomoduladores, antipiréticos, analgésicos, antiinflamatorios, antidiabéticos, estimulador del apetito y diurético (Iwalewa y col., 1999; Sujarwo y col., 2016; Rathod y col., 2022).

Materiales y Métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones macho con pesos comprendidos entre 18-20 g de la cepa INH, provenientes del Instituto Nacional

de Higiene Rafael Rangel (MPPS, Caracas). Los animales fueron mantenidos en cajas plexiglás en ciclos de 12 horas luz / oscuridad, con agua y alimento (Ratarina®) *ad libitum*. La investigación cumplió con las normas de bioética contenidas en la Guía Principles of Laboratory Animal Care (Principios de cuidados de animales de laboratorio) (Anónimo, 1985).

Se utilizó *Plasmodium berghei* (cepa ANKA) sensible a CQ, la cual fue mantenida, mediante pasajes sucesivos de ratones infectados a ratones sanos.

Como fármaco se usó la Cloroquina (CQ) procedente de la casa comercial SIGMA-Aldrich Chemical Co. Lote 109H1097. La dosis de CQ se seleccionó en base a estudio *in vivo* en ratones (Acosta y col., 2022), en el cual la CQ posee efectos antimaláricos a las dosis de 20 mg/Kg de peso corporal, por vía i.p.

Para los tratamientos, se utilizaron las siguientes combinaciones, CQ 20 mg/Kg; + EAN (10 y 20 mg/Kg). Estos tratamientos se prepararon diluyendo los compuestos apropiadamente en solución NaCl 0,9%. Ambos compuestos fueron administrados a los animales por vía i.p. de forma separada.

Recolección de Plantas NEEM

Las muestras de las plantas *Azadirachta indica* A. Juss "NEEM" fueron recolectadas en la comunidad Provincial, localidad de Puerto Ayacucho, estado Amazonas. Un espécimen testigo reposa en el Herbario Víctor Manuel Ovalles, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Central de Venezuela, bajo el número MYF 29534.

PROCEDIMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LA HOJA DE *Azadirachta indica* A. JUSS

Las hojas frescas (30 g) fueron cortadas en trozos pequeños y sometidas a decocción en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, utilizando 50 mL de agua destilada. El proceso de decocción se mantuvo durante 15 minutos, la solución fue filtrada, enfriada y sometida a un proceso de liofilización para obtener un sólido marrón claro (95 g) que fue reconstituido en agua destilada al momento del experimento. Este extracto fue denominado extracto acuoso de *Azadirachta indica* A. Juss (EAN). Se seleccionaron las dosis de 10 y 20 mg/Kg porque coincide con estudios *in vivo* en ratones a esas dosis por vía i.p. (Akin-Osanaiyay col., 2013).

INFECCIÓN DE RATONES

Los ratones fueron infectados vía i.p., con 1×10^6 eritrocitos parasitados diluidos en solución fisiológica (NaCl 0,9%). El curso temporal de la parasitemia se monitoreó a través del extendido de sangre periférica de animales infectados, coloreados con Giemsa y observados por microscopía de luz. Brevemente, una gota de sangre extraída de una incisión transversal del extremo de la cola del ratón infectado se colocó en una lámina portaobjetos. Con la ayuda de otra lámina, se realizó el extendido fino y uniforme de la sangre a lo largo de la misma, mediante desplazamiento, con una inclinación de 45°. El extendido seco y fijado con metanol y calor, se coloreó con Giemsa (1:1) (Alger, 1999), mediante la técnica de inversión, durante 20 minutos, se lavó con agua destilada para retirar el exceso de colorante y se dejó secar. Las

láminas se observaron por microscopía de luz con un objetivo 100X en aceite de inmersión. Se contaron al menos 5 campos (aproximadamente 500 glóbulos rojos), se determinó la parasitemia y se expresó en términos de porcentaje (eritrocitos infectados por cada 100 eritrocitos).

ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA

El tratamiento de los animales sin infección patente se realizó mediante la prueba de Peter (1975). El diseño experimental incluyó los siguientes grupos:

1. Grupo control sano: Animales sanos que recibieron 0,1 mL de solución fisiológica (NaCl 0,9%) por vía i.p., durante 5 días.
2. Grupos controles infectados: Animales infectados con *Plasmodium berghei* de acuerdo al protocolo, los cuales recibieron 0,1 mL de solución fisiológica (NaCl 0,9%), por vía i.p. El día 5 post-infección se determinó la densidad parasitaria mediante el examen microscópico de extendidos de sangre extraída de la cola del animal. Adicionalmente, se llevó un registro de los días post-infección (DSP).
3. Grupos infectados con tratamiento:

Los subgrupos incluidos y los tratamientos administrados a los ratones infectados fueron los siguientes:

No.	Sub-GRUPO	TRATAMIENTO (i.p / día)
1	CQ20	CQ 20 mg/Kg
2	EAN 20	EAN 20 mg/Kg
3	EAN 10	EAN 10 mg/Kg
4	CQ20 + EAN 20	CQ 20 mg/Kg + EAN 20mg/Kg
5	CQ 20 + EAN 10	CQ 20 mg/Kg + RVT 10 mg/Kg

Cada ratón fue tratado con 0,1 mL del tratamiento indicado. Ratones macho de la cepa INH de peso comprendido entre 18–20 g, se infectaron mediante inoculación por vía i.p. con una densidad parasitaria de 1×10^6 y dos horas después de la infección, se inició el tratamiento de los ratones, de cada sub-grupo, una vez al día, durante 5 días. Cada ratón fue tratado con 0,1 mL del tratamiento indicado. El día 5 post-infección y post-tratamiento, se determinó la densidad parasitaria mediante el examen microscópico de extendidos de sangre extraída de la cola del animal. Adicionalmente, se llevó un registro de los días post-infección (DSPI).

La eficacia de los tratamientos ensayados fue evaluada calculando el porcentaje de reducción de la parasitemia de acuerdo a la ecuación (Cui y col., 2015):

$$\% \text{ Reducción} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

C = % Parasitemia del control infectado
(Control negativo) T= % Parasitemia del grupo tratado

FORMA DE TRATAMIENTO Y SACRIFICO DE LOS ANIMALES

Los animales fueron tratados por vía i.p., una vez al día, durante 5 días consecutivos. En el día 5° de tratamiento, se tomaron al azar 5 ratones de cada uno de los grupos experimentales establecidos. Una vez anestesiados con éter, se procedió a obtener muestras de sangre del plexo axilar para la respectiva separación del suero sanguíneo.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media ± error estándar

de la media (E.E.M), analizados mediante la Prueba t de student de datos no apareados, y el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Los resultados fueron analizados y graficados mediante el uso del programa GraphPad Prism versión 9.0 y programa Excel 2010. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA

La actividad antimalárica de las combinaciones de CQ con EAN a las diferentes concentraciones/dosis, *in vivo*, se realizó mediante el uso de la Prueba de Peters, un modelo de infección no patente en el que se sometieron a estudio los compuestos individuales o sus combinaciones: CQ20, EAN 20, EAN 10, CQ20+EAN20 y CQ20+EAN10.

CURVA DEL CURSO TEMPORAL DE LA INFECCIÓN EN RATONES INH CON *Plasmodium berghei*

Se realizó una curva de parasitemia para observar el curso de la infección experimental por *Plasmodium berghei* y el comportamiento de la cepa de ratones INH, según las condiciones de laboratorio, con la finalidad de obtener valores de referencia para los experimentos subsiguientes.

En la Figura 1 se muestra la evolución de la parasitemia diaria de los animales inoculados con 10^6 eritrocitos infectados, por vía i.p. La primera fase de la curva, correspondiente a la fase de crecimiento aritmético que tuvo una duración de 4 días. Entre los días 7 y 12 se observa un crecimiento exponencial de la parasitemia a un valor máximo de $(98\% \pm 0,54)$ con la cual se produce la muerte de los ratones a partir el día $7 \pm 0,32$.

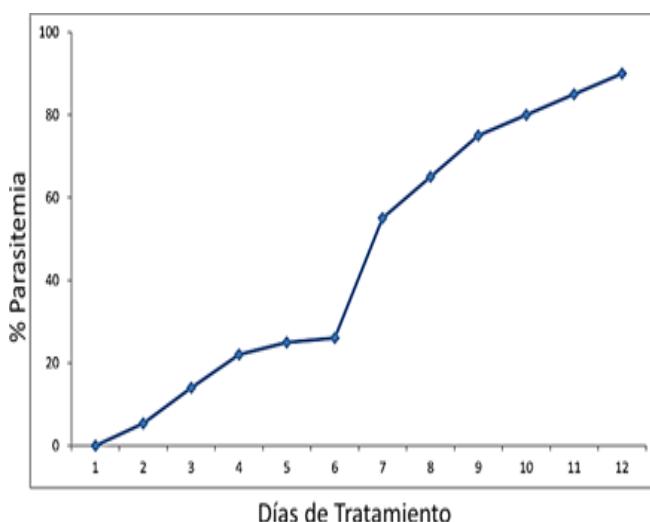


Figura 1. Curso temporal de infección de ratones INH por *Plasmodium berghei*. Los ratones ($n=5$) se inocularon por vía i.p con 10^6 eritrocitos infectados. Los puntos representan la media \pm E.E.M. La parasitemia máxima fue de $95\% \pm 0,75$, dato que será empleado en los siguientes experimentos como porcentaje de parasitemia por ratón fallecido.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMALÁRICO EN MODELO DE INFECCIÓN PATENTE (PRUEBA DE PETER)

En la Tabla I se muestran las modificaciones del porcentaje de parasitemia al 5^{to} día post-infección y de supervivencia de los ratones de los grupos de tratamiento, respecto al grupo control infectado (Tabla I, Figura 2). Como se observa, la CQ sola fue capaz de aumentar significativamente la supervivencia y reducir la parasitemia ($p<0,05$). El tratamiento con EAN 10 y EAN 20 no alteró los valores de parasitemia y supervivencia en los ratones infectados con *Plasmodium berghei*, los cuales fueron comparables a los ratones infectados no tratados. El tratamiento con las combinaciones mostró valores similares y significativos a los observados con la CQ sola ($p<0,05$), ya que redujeron la parasitemia y aumentaron la supervivencia de los ratones infectados con *Plasmodium berghei*, de al menos 14 a 30 días post-infección y post-tratamiento, de forma

Tabla I.

Modificaciones del porcentaje de parasitemia y días de supervivencia post-infección de ratones infectados con *Plasmodium berghei*, tratados con CQ, EAN y combinaciones de CQ y EAN

Tratamientos	Días de supervivencia ± E.E.M	% Parasitemia ± E.E.M
Control Infectado	8,2 ± 0,15	84,54 ± 0,90
CQ 20	29,40 ± 0,51**	0,23 ± 0,02**
EAN 10	8,50 ± 0,29	82,53 ± 0,40
EAN 20	10,24 ± 0,35	79,45 ± 0,20
CQ 20 + EAN 10	29,20 ± 0,40**	0,10 ± 0,04**
CQ 20 + EAN 20	29,60 ± 0,35**	0,08 ± 0,05**

Los resultados se expresan en % de parasitemia ± E.E.M (n=5). CQ 20=Cloroquina 20 mg/Kg; EAN10=Extracto Acuoso Neem 20mg/Kg; EAN20=Extracto Acuoso Neem 20mg/Kg. **p<0,05 con respecto al grupo control infectado

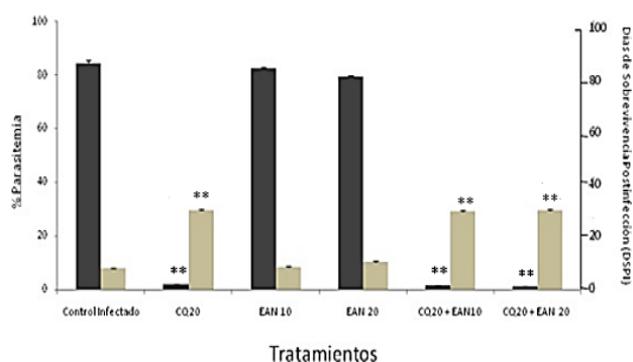


Figura 2. Curso temporal de infección de ratones INH por *Plasmodium berghei*. Los ratones (n=5) se inocularon por vía i.p con 10^6 eritrocitos infectados. Los puntos representan la media ± E.E.M. La parasitemia máxima fue de $95\% \pm 0,75$, dato que será empleado en los siguientes experimentos como porcentaje de parasitemia por ratón fallecido.

similar a cuando la CQ se ensaya de manera individual. Estos hallazgos sugieren que EAN no es un potencial antimalárico.

Para determinar la eficacia de los tratamientos ensayados se calculó el porcentaje de reducción de la parasitemia de acuerdo a la siguiente ecuación (Cui y col., 2015) (Tabla II).

$$\% \text{ Reducción} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

C = % Parasitemia del control infectado (Control negativo) T= % Parasitemia del grupo tratado

CQ 20=Cloroquina 20 mg/Kg; EAN10=extracto acuoso Neem 10 mg/Kg; EAN 20=Extracto acuoso Neem 20 mg/Kg.

Tabla II.
Porcentaje de Reducción (Eficacia) de los tratamientos ensayados solos o en combinaciones

Tratamientos	% Reducción
CQ20	99,72
EAN 10	2,37
EAN 20	6,02
CQ20 +EAN 10	99,88
CQ20 +EAN20	99,90

Los resultados confirman que las combinaciones CQ20+EAN10 y CQ20+EAN20 presentan un porcentaje de eficacia elevada similar al de la CQ20. Uno de los objetivos que se persigue al combinar fármacos es mejorar los efectos terapéuticos y reducir la toxicidad del tratamiento. En este caso, la disminución de la dosis de EAN a 10 mg/Kg combinado con CQ20 mg/Kg muestra un porcentaje de reducción de la parasitemia similar a la obtenida con CQ20+EAN 20 y CQ20, lo que sugiere que las combinaciones no mejoran la eficacia antimalárica de la CQ (Tabla II).

Discusión

Los resultados del presente estudio en los que se evalúan los efectos antimaláricos de los compuestos CQ20, EAN20 y EAN10,

solos o combinados, (CQ20+EAN20 y CQ20+EAN10), sugieren que el EAN, *per se*, no es un agente antimalárico potencial, ya que administrados solos no altera la supervivencia ni el grado de parasitemia. Aún más, el tratamiento de los ratones infectados con *Plasmodium berghei* con las combinaciones mostraron resultados similares en magnitud con los obtenidos con CQ20, ya que las combinaciones fueron capaces de reducir la parasitemia y producir la cura parasitológica de los animales a los 30 días de observación; además de producir un aumento de los días de sobrevida post-infección (aproximadamente en un 80%), de manera similar a la CQ20. Además de ello, la combinación CQ20+EAN10 tiene una eficacia de 99,88% muy similar a la presentada por CQ20 (99,72%) y la combinación CQ20+EAN20 (99,90%). Estos hallazgos parecen indicar que EAN no genera una potenciación del efecto antimalárico de la CQ. Estos resultados difieren de lo reflejado en diversos estudios *in vivo* con extractos de hojas (Aka-Osanaiya y col., 2013; Afolabi y col., 2021) e *in vitro* en cultivos con *Plasmodium falciparum*, donde el EAN (tanto en forma de extracto como sintetizado en nanopartículas de nitrato de plata-Neem) potencia el efecto antimalárico de la CQ al inducir no solo la cura parasitológica en cepas sensibles y resistentes a CQ sino también en la reducción de la transmisión (Udeinya y col., 2006; Ghazali y col., 2022).

Esto podría deberse a que no se utilizó solventes orgánicos, como el cloroformo, acetona y etanol, para el aislamiento de compuestos químicos como alcaloides, terpenoides y sus derivados, con propiedades antioxidantes (Mbugi y col., 2021; Udeinya y col., 2008), pudiendo ser efectivos como antimalárico. En este

caso, el uso del extracto acuoso de la hoja fue debido a su extrapolación a las infusiones, las cuales son acuosas y se preparan por extracción con aplicación de calor, obteniendo tanto sus principios activos como sus componentes tóxicos, siendo útiles para el estudio farmacológico y toxicológico.

Otra posible explicación es que varias partes de la planta (hojas, corteza, raíces y semillas) presentan diferentes sustancias con distintas propiedades terapéuticas y que son propias de cada parte de la misma (Subapriya y col., 2005), lo que concuerda con los resultados contrastantes de los estudios de validación realizados con extractos de hojas y corteza de Neem (Tapanelli y col., 2016). Adicional a ello, está el uso de la vía oral como ruta de administración en la mayoría de los estudios de investigación para evaluar actividad antimalárica, contraria a la vía i.p. utilizada en este trabajo (Afolabi y col., 2021).

Este estudio es preliminar, representa una alternativa que debe ser profundizada con la finalidad contribuir a la prolongación de la vida útil de los recursos farmacoterapéuticos disponibles, retardar la expansión de la resistencia, y/o reducir la toxicidad generada por los mismos.

Conclusiones

Las combinaciones CQ20+EAN10 y CQ20+EAN20 resultaron ser efectiva para disminuir la parasitemia y aumentar la sobrevida de los animales infectados con *Plasmodium berghei*, de manera similar a la obtenida con el tratamiento con CQ20. Por lo tanto, la combinación CQ+EAN

actúa como un antimalárico similar a la CQ, lo que sugiere que el EAN no posee actividad antimalárica ni potencia el efecto de la CQ.

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCYT) por el financiamiento del Proyecto 2024PGP117.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Acosta ME, Gamboa de Domínguez, N. 2017. Potenciación del efecto antimalárico de combinaciones de cloroquina y melfloquina con acetaminofeno *in vivo* y niveles de glutatión total hepático. Revista de La Facultad de Farmacia 80(1 y 2):68-82.
- Acosta ME, Gotopo L, Gamboa N, Rodrigues JR, Henriques GC, Cabrera G, Romero AH. 2022. Antimalarial activity of highly coordinative fused heterocycles targeting β-hematin crystallization. ACS Omega 7(9):7499-7514.
- Akin-Osanaïya BC, Nok AJ, Ibrahim S, Inuwa HM, Onyike E, Amlabu E, Haruna E. 2013. Antimalarial effect of neem leaf and neem stem bark extracts on *Plasmodium berghei* infected in the pathology and treatment of malaria. International Journal of Research in Biochemistry and Biophysics 3(1):7-14.
- Afolabi OJ, Simon-Oke IA, Oladokun OI. 2021. Antiplasmodial activity of ethanolic extract of neem leaf (*Azadirachta indica*) in albino mice infected with *Plasmodium berghei*. Int Arch Clin Pharmacol 7:024.
- Alaribe SC, Oladipupo AR, Uche GC, Onumba MU, Ota D, Awodele O, Oyibo WA. 2021. Suppressive, Curative, and Prophylactic Potentials of an Antimalarial Polyherbal Mixture and its Individual Components in *Plasmodium berghei*-Infected Mice. J Ethnopharmacol 277:114105.
- Alger J. 1999. Diagnóstico microscópico de la malaria: gota gruesa y extendido fino. Rev Med Hond 67:216-8.
- Amadi PU, Agomuo EN, Ukaga CN, Njoku UC, Amadi JA, Nwaeke CG. 2021. Preclinical Trial of Traditional Plant Remedies for the Treatment of Complications of Gestational Malaria. Med (Basel) 8(12):79.
- Alzohairy M. 2016. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine 1:7382506-06.
- Deharo E, Barhkan D, Krugliak M, Golenser J, Ginsburg H. 2003. Potentiation of the malarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. Biochemical Pharmacology 66:809-817.
- Deshpande PK, Gothwal R, Pathak AK. 2014. Phytochemical analysis and evaluation of antimalarial activity of *Azadirachta indica*. The Pharma Innovation 3(9:Part A):12.
- Dkhil MA, Al-Quraishi S, Al-Shaebi EM, Abdel-Gaber R, Thagfan FA, Qasem M. A. 2021. Medicinal plants as a fight against murine blood-stage malaria. Saudi Journal of Biological Sciences 28(3):1723-1738.
- Ghazali SZ, Mohamed Noor NR, Mustaffa KMF. 2022. Anti-plasmodial activity of aqueous neem leaf extract mediated green synthesis-based silver nitrate nanoparticles. Preparative Biochemistry & Biotechnology 52(1):99-107.
- George UO, Ebong N, Adikwu E. 2022. Antiplasmodial activity of desloratadine-dihydroartemisinin-piperaquine on *Plasmodium berghei* infected mice. Journal of Applied Biology and Biotechnology 9(2):169-173.
- Iwalewa EO, Mohammed K, Omotola OO. 1999. Contributory Pharmacological Effects of *Azadirachta indica* leaf in the treatment of malaria. Nigerian Journal of Natural Products and Medicine 3:42-46.
- Islas JF, Acosta E, Zuca G, Delgado-Gallegos JL, Moreno-Treviño MG, Escalante B, Moreno-Cuevas JE. 2020. An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. Journal of Functional Foods 74:104171.
- Igwenyi I, Eze A, Aja P, Elom S, Uraku A, Awoke J, Obasi NA. 2017. Cholesterol-lowering and hepatoprotective effect of fruit juice extract of *Azadirachta indica* on *Plasmodium berghei* infected mice. Int J Curr Microbiol App Sci 6(9):3367-3375.
- Martiney JA, Cerami A, Slater AF. 1995. Verapamil reversal of chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for

- resistant parasites and independent of the weak base effect. *J Biol Chem* 270(38):22393-22398.
- Mbugi EV, Sife AS, Ruzgea M, Mssoffe GEP, Daniel B, Kabyemela E, Lwoga E. T. 2021. Effectiveness of *Azadirachta indica* (Neem tree) on prevention and treatment of clinical human malaria: a systematic review. *East Africa Science* 3(1):34- 43.
- Oghenesuvwe EE, Chidozie I, Okeke AI, Chukwudike OC, Ukamaka MN, Maryann CU, Okonkwo OB. 2021. Antimalarial herbal drugs: a review of their interactions with conventional antimalarial drugs. *Clinical Phytoscience* 7:4.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) World malaria report. Geneva; 2023. Consultado el 5/8/2023. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/malaria>.
- Peters W, Portus JH, Robinson BL. 1975. The chemotherapy of rodent malaria, XXII: the value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 69(2):155-171.
- Rathod VS, Pawar PS, Gorde AB. 2022. A review on pharmacological importance of *Azadirachta indica*. *World Journal of Pharmaceutical Research* 11(4):412-419.
- Sarkar L, Oko L, Gupta, S, Bubak AN, Das B, Gupta P, Sarma JD. 2022. *Azadirachta indica* A. Juss bark extract and its Nimbin isomers restrict β-coronaviral infection and replication. *Virology* 569:13-28.
- Siribhadra A, Ngamprasertchai T, Rattanaumpawan P, Lawpoolsri S, Luvira V, Pitisuttithum P. 2022. Antimicrobial stewardship in tropical infectious diseases: focusing on dengue and malaria. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 7(8):159.
- Sujarwo W, Keim AP, Caneva,G, Toniolo C, Nicoletti M. 2016. Ethnobotanical uses of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.; Meliaceae) leaves in Bali (Indonesia) and the Indian subcontinent in relation with historical background and phytochemical properties. *Journal of Ethnopharmacology* 189:186-193.
- Subapriya R, Nagini S. 2005. Medicinal Properties of Neem Leaves: A Review. *Curr Med Chem Agents* 5(2):149-56.
- Tajbakhsh E, Kwenti TE, Kheyri P, Nezaratizadeh S, Lindsay DS, Khamesipour F. 2021. Antiplasmodial, antimalarial activities and toxicity of African medicinal plants: a systematic review of literature. *Malaria Journal* 20(1);1-50.
- Tapanelli S, Chianese G, Lucantoni L, Yerbanga RS, Habluetzel A, Taglialatela-Scafati O. 2016. Transmission blocking effects of Neem (*Azadirachta indica*) Seed Kernel Limonoids on *Plasmodium berghei* early sporogonic development. *Fitoterapia* 114:122-126.
- Tepongning RN, Mbah JN, Avoulou FL, Jerme MM, Ndanga EK, Fekam FB. 2018. Hydroethanolic extracts of *Erigeron floribundus* and *Azadirachta indica* reduced *Plasmodium berghei* parasitemia in Balb/c mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 5156710.
- Udeinya IJ, Brown N, Shu EN, Udeinya FI, Quakeyie I. 2006. Fractions of an antimalarial neem-leaf extract have activities superior to chloroquine and are gametocytocidal. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 100(1): 17-22.
- Udeinya JI, Shu EN, Quakyi I, Ajayi FO. 2008. An antimalarial neem leaf extract has both schizontocidal and gametocytocidal activities. *American Journal of Therapeutics* 15(2):108-110.