

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“Actividad antiinflamatoria de extractos de *Azadirachta indica in vitro*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

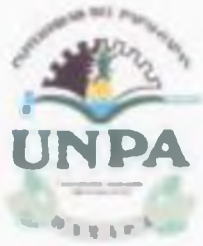
PRESENTA:

MAYRA SANTIAGO VELASCO

Director: Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 20 de septiembre de 2018 a las 18 Hr. los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Actividad antiinflamatoria de extractos de *Azadirachta indica in vitro*" presentada por la alumna **Mayra Santiago Velasco**, con número de matrícula 12090240, aspirante al título de Licenciatura.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 20 de septiembre de 2018

ATENTAMENTE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

Dra. Jacqueline Cápatz Tafur
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Edgar García López
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Omar Viñas Bravo
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtpec, Oaxaca, a 24 de septiembre de 2018
Oficio No. JCIB/020/09/2018

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Mayra Santiago Velasco** titulado "Actividad antiinflamatoria de extractos de *Azadirachta indica* *in vitro*". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dra. Jacqueline Capataz Tafur (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dra. Edgar García López (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dr. Omar Viñas Bravo (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bau Lo-tama, chí jí jú



SECRETARÍA DE INGENIERÍA
EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan



Vo.Bo. M.C. Héctor López Alfaro
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan

c.c. Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c. Mayra Santiago Velasco, Alumna, Para su conocimiento
c.c. Archivo

HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Paul M. Sanchez Ocampo, a quien agradezco infinitamente por haberme aceptado para la realización de este proyecto, por toda la confianza, atenciones, por todo el apoyo y paciencia.

A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur por haberme proporcionado los materiales y el espacio de trabajo, por toda la ayuda y asesoramiento durante la realización del proyecto.

A los doctores quienes fueron revisores de la tesis, a la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dr. Miguel A. Peña Rico, Dr. Edgar García López, Dr. Omar Viñas Bravo y el Dr. Oscar A. Ramírez Marroquín, les agradezco por sus observaciones y consejos proporcionados.

Al Laboratorio de Cultivo de Células vegetales y Bioterio de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec.

La investigación fue realizada bajo el financiamiento del proyecto CB-CONACyT N° 18395 e INFRA 255514 y al proyecto 3212 de cátedras CONACyT asignado a la Universidad del Papaloapan.

DEDICATORIA

Dedico este triunfo a mi familia. Principalmente a mis padres, porque me permitieron continuar con mis estudios, por darme su apoyo incondicional en todos los sentidos, por sus consejos, paciencia y sobre todo por creer en mí siempre. A todos mis hermanos, Rubén y Tania por su apoyo y palabras de ánimo y a mis hermanos pequeños por darme alegría desde lejos, especialmente a mi Montse, son mi motivación. Los amo inmensamente.

A mis abuelos, que si de algo estoy segura, partieron deseando verme cumpliendo este objetivo, sé que estarían orgullosos, siempre tendré presente sus palabras. No los olvido.

A todos aquellos compañeros y amigos verdaderos, principalmente a Nuria, Edith y Frank, Sosa, y todos quienes hicieron que mi estancia en la Universidad fuera más fácil, les agradezco su amistad, compañía, cariño y calidez.

A mis compañeros del laboratorio, quienes me proporcionaron su ayuda y consejos durante la realización de este trabajo.

A todas aquellas personas quienes me ayudaron de una u otra forma para que esto fuera posible.

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este tiempo.

“Debo estar dispuesto a renunciar a lo que soy para convertirme en lo que seré”. –

Albert Einstein

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Definición de la inflamación.....	2
2.2. Clasificación y tipos.....	2
2.3. Mecanismos de inflamación aguda y crónica.....	3
2.4. Fármacos antiinflamatorios actuales.....	4
2.4.1. Antiinflamatorios esteroideos.....	5
2.4.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	5
2.5. Problemática de la inflamación.....	7
2.5.1. Toxicidad de los fármacos antiinflamatorios sintéticos.....	7
2.5.2. Inflamación y enfermedades.....	8
2.6. Valoración de la actividad antiinflamatoria.....	8
2.6.1. Modelo auricular inducido por TPA.....	9
2.7. Potencial medicinal de las plantas.....	10
2.7.1. Metabolitos de plantas con actividad antiinflamatoria.....	10
2.7.2. Compuestos inhibidores de lipoxigenasas.....	13
2.8. Generalidades sobre <i>Azadirachta indica</i>	14
2.8.1. Composición química.....	15
2.8.2. Propiedades medicinales.....	17
2.8.3. Metabolitos secundarios.....	17
2.8.4. Actividad antiinflamatoria de <i>Azadirachta indica</i>	19
2.8.5. Cultivo <i>In vitro</i> de <i>Azadirachta indica</i>	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivos específicos.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Estrategia experimental.....	25
6.2. Material vegetal.....	26
6.2.1. Obtención de plantas <i>in vitro</i>	26
6.2.2. Obtención de los extractos.....	26

6.3.	Análisis fitoquímico de los extractos	27
6.3.1.	Cuantificación de Fenoles totales.....	27
6.3.2.	Cuantificación de Flavonoides totales.....	27
6.3.3.	Cuantificación de Limonoides relacionados con AZA.....	28
6.3.4.	Cromatografía en capa fina	28
6.3.5.	Análisis por HPLC de los extractos.....	29
6.4.	Animales de experimentación	30
6.5.	Actividad antiinflamatoria	30
6.5.1.	Edema auricular inducido por TPA en ratones CD-1	30
6.5.2.	Dosis respuesta del extracto activo.....	31
6.6.	Ensayo de inhibición de la enzima lipoxigenasa	32
6.7.	Análisis estadístico	32
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7.1.	Material vegetal	33
7.2.	Rendimientos de extracción	34
7.3.	Análisis fitoquímico de los extractos	35
7.3.1.	Cuantificación de Fenoles totales.....	36
7.3.2.	Cuantificación de Flavonoides.....	37
7.3.3.	Cuantificación de Limonoides relacionados con AZA.....	39
7.3.4.	Análisis por cromatografía de capa fina.....	40
7.3.5.	Análisis por HPLC de los extractos.....	41
7.4.	Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	42
7.4.1.	Efecto antiinflamatorio de los extractos de <i>Azadirachta indica</i>	42
7.5.	Inhibición de la enzima lipoxigenasa	46
8.	CONCLUSIONES	48
9.	PERSPECTIVAS	49
10.	REFERENCIAS	50
11.	ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso inflamatorio agudo	3
Figura 2. Mecanismo de acción de fármacos antiinflamatorios	6
Figura 3. Metabolitos con actividad antiinflamatoria presentes en plantas	11
Figura 4. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico	13
Figura 5. A) Árbol, B) Flores, C) Hojas de <i>Azadirachta indica</i>	14
Figura 6. Estructura de limonoides de <i>Azadirachta indica</i>	16
Figura 7. Diagrama de la estrategia experimental realizada	25
Figura 8. Plántulas de <i>Azadirachta indica</i> generadas por cultivo <i>in vitro</i>	33
Figura 9. Plántulas generadas por segmentos nodales de <i>Azadirachta indica</i> en medio MS.	34
Figura 10. Placa cromatografía de los extractos de <i>Azadirachta indica</i> con diferentes reveladores: A) UV 254 nm, b) UV 365 nm	40
Figura 11. Placa cromatográfica de los extractos de <i>Azadirachta indica</i> con el revelador vainillina: metanol: H ₂ SO ₄	41
Figura 12. Cromatograma de estándares y extractos de <i>Azadirachta indica</i>	42
Figura 13. Porcentajes de inhibición de la enzima LOX	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos adversos de algunos fármacos antiinflamatorios y analgésicos comunes.....	7
Tabla 2. Especies de plantas con actividad antiinflamatoria.....	12
Tabla 3. Usos medicinales de <i>Azadirachta indica</i> en la medicina tradicional.....	17
Tabla 4. Metabolitos secundarios de <i>Azadirachta indica</i> y su actividad biológica.....	18
Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de extractos de <i>Azadirachta indica</i>	20
Tabla 6. Grupos experimentales.....	31
Tabla 7. Rendimiento de la extracción.....	35
Tabla 8. Concentración de compuestos fenólicos en los extractos.....	36
Tabla 9. Concentración de flavonoides en los extractos.....	37
Tabla 10. Concentración de Limonoides Relacionados con Azadiractina.....	39
Tabla 11. Actividad antiinflamatoria de extractos de <i>Azadirachta indica in vitro</i> en el modelo de edema de oreja de ratón.....	43
Tabla 12. Dosis respuesta del extracto activo.....	44

ABREVIATURAS

AZRL	Limonoides Relacionados con Azadiractina
TPA	12-O-Tetradecanoil-Forbol-13-Acetato
LOX	Lipoxigenasa
Rf	Factor de retención
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
COX-1	Ciclooxigenasa-1
5-LOX	5-lipoxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa-2
PGs	Prostaglandinas
TXA₂	Tromboxanos
LTs	Leucotrienos
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
PCR	Proteína C reactiva
NF-κB	Factor de Transcripción Nuclear kappa B
CCF	Cromatografía de capa fina
DE₅₀	Dosis efectiva 50
DMSO	Dimetil sulfóxido
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
U	Unidad de actividad enzimática
μg	Microgramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
μL	Microlitro
Min	Minuto
s	Segundo
MS	Murashigue y Skoog
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
AZA	Azadiractina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia

RESUMEN

Azadirachta indica es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional debido a que produce una gran variedad de compuestos con propiedades farmacológicas. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos de diferente polaridad obtenidos de plántulas *in vitro* de *A. indica* en ratones CD-1, a través del modelo de edema auricular inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (2.5 µg/oreja). Se utilizó dexametasona (1 mg/mL) como fármaco de referencia. El TPA, la dexametasona y los extractos se aplicaron en la oreja derecha, la oreja izquierda sirvió como control con la aplicación de acetona como vehículo. Todos los extractos se aplicaron a una dosis de 80 mg/mL. Una vez obtenido el extracto activo se realizó un análisis de dosis respuesta por medio de diferentes concentraciones del mismo (40, 30, 20, 10 y 2.5 mg/mL), para determinar la dosis efectiva 50. Para explicar el posible mecanismo de acción de los extractos se realizó un ensayo de inhibición de la enzima lipoxigenasa (LOX), enzima clave en la respuesta inflamatoria. Previo al ensayo de la actividad biológica, se realizó la cuantificación de fenoles y flavonoides totales, así como una cuantificación de limonoides relacionados con azadiractina (AZRL), además de un análisis fitoquímico por cromatografía de capa fina, para elucidar la presencia de los compuestos que posiblemente son los responsables de la actividad antiinflamatoria y por último, el análisis de los extractos activos por HPLC. Los resultados indicaron que el extracto hexano fue el que mostró mayor actividad antiinflamatoria (81.94%), mayor que el fármaco de referencia (49.4%), seguido por el extracto acuoso (52.7 %), siendo este último quien presentó una significativa inhibición de la enzima LOX. Aunque el contenido de metabolitos secundarios en el extracto hexano fue bajo en comparación con los otros extractos, mostró la presencia de bandas de gran intensidad en la cromatografía de capa fina (CCF), con factor de retención (Rf) similar a nimbina, compuesto al que se le atribuye la actividad antiinflamatoria. Los extractos de las plántulas cultivadas *in vitro* de *A. indica* presentaron efecto antiinflamatorio al igual que la planta silvestre.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, Medicina tradicional, Actividad antiinflamatoria, Metabolitos secundarios.

ABSTRACT

Azadirachta indica is a plant widely used in traditional medicine, because it produces a wide variety of compounds with pharmacological properties. The main objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory activity of extracts obtained from *in vitro* cultured seedlings of *A. indica* in CD-1 mice, through the model mouse ear edema induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (2.5 µg / ear). Dexamethasone (1 mg / mL) was used as the reference drug. TPA, dexamethasone and extracts were applied to the right ear, the left ear served as a control with the application acetone as a vehicle. All extracts were applied at a dose of 80 mg/mL. Once the active extract was obtained, a dose-response analysis was carried out using different concentrations (40, 30, 20, 10 and 2.5 mg / mL) to determine the effective dose 50. To explain the possible mechanism of action of the extracts, an inhibition assay was carried out on the enzyme lipoxygenase (LOX), a key enzyme in the inflammatory response. Before the assay of biological activity, quantification of phenols and total flavonoids was carried out, as well as a quantification of azadirachtin related limonoids (AZRL), in addition to a chemical analysis by thin layer chromatography, to elucidate the presence of compounds that possibly are responsible for the anti-inflammatory activity, and finally the HPLC analysis of the active extracts. The results indicated that the hexane extract was the one that showed the highest anti-inflammatory activity (81.94%), greater than the reference drug (49.4%), followed by the aqueous extract (52.7%), the latter having significant inhibition of the LOX enzyme. Although the content of secondary metabolites in the hexane extract was low compared to the other extracts, it showed the presence of high intensity bands in thin layer chromatography, with retention factor (Rf) similar to nimbin, composed of which is attributed the anti-inflammatory activity. The extracts of the *in vitro* cultivated seedlings of *A. indica* showed anti-inflammatory effect as well as the wild plant.

Keywords: *Azadirachta indica*, Traditional medicine, Anti-inflammatory activity, Secondary metabolites.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años han aumentado las incidencias de enfermedades en la que su primera causa o manifestaciones son reacciones inflamatorias, como las enfermedades crónicas y autoinmunes. Actualmente, los fármacos disponibles para el tratamiento de la inflamación provocan en el organismo varios efectos secundarios y reacciones adversas que alteran el desarrollo de la enfermedad, además de tener un costo elevado y en ocasiones difícil acceso (Beg *et al.*, 2011; Yattoo *et al.*, 2018).

Ante la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios los estudios científicos sobre plantas medicinales han tenido un gran avance en los últimos años, que además de corroborar el conocimiento de la medicina popular el objetivo es la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, ya que se conoce una gran variedad de especies vegetales que desde tiempos antiguos han sido utilizados para tratar el dolor y la inflamación (Maione *et al.*, 2015; Kumar-Shakya, 2016), mismos que se busca posean menos toxicidad y mayor efectividad que los fármacos convencionales (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018).

Azadirachta indica mejor conocida como neem, es una especie ampliamente utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas. De acuerdo a reportes bibliográficos se sabe que la planta produce compuestos que son los responsables de distintas actividades biológicas, entre ellas la hipoglucemiante y antiinflamatoria. Pero debido a su alta demanda es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de obtención de material vegetal, para no desplazarla de su hábitat natural, por lo que el cultivo *in vitro* de plantas es usada como herramienta biotecnológica para la obtención de material vegetal de manera sustentable.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos de *A. indica in vitro*, como alternativa para la producción de compuestos biológicamente activos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Definición de la inflamación

La inflamación comprende una serie de respuestas patológicas protectoras del sistema inmune en tejidos vivos, cuya función principal es actuar como mecanismo de defensa ante diversos estímulos nocivos (daños físicos, químicos, biológicos) Scott *et al.*, 1994; Stankov, 2012), así como al daño o lesión tisular, y es absolutamente necesaria para el mantenimiento de la salud en humanos y animales (Medzhitov, 2008).

En una reacción inflamatoria clásica las respuestas fisiológicas observadas a nivel macroscópico son tumefacción (edema), calor, dolor, rubor, y pérdida o disminución de la función, esto permitirá el aislamiento del agente dañino, removerá el tejido dañado y generará una regeneración celular o cicatrización (Gómez *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2009; Stankov, 2012).

2.2. Clasificación y tipos

La clasificación más común es de acuerdo al tiempo de duración del proceso, donde los factores causantes, los mecanismos desencadenados y la intensidad de la reacción influyen en el tiempo que duración y curación (Stankov, 2012), de acuerdo a esto, existen dos tipos: aguda (local o sistémica) y crónica (Vega, 2008).

La inflamación aguda se caracteriza por un corto tiempo de duración (minutos, horas o pocos días), provocada por agentes patógenos y tejidos lesionados, cuyos síntomas principales son la sensación de calor, enrojecimiento y la formación del edema (Feghali *et al.*, 1997), por otra parte, la inflamación crónica se desarrolla después de la inflamación aguda, ya que se prolonga más tiempo (meses incluso años) debido a patógenos que no son fácilmente degradados, por cuerpos foráneos persistentes y reacciones autoinmunes severas (Beg *et al.*, 2011).

De manera general la reacción inflamatoria ocurre en tres fases (Gómez *et al.*, 2010):

- a) Fase aguda: vasodilatación local e incremento de la permeabilidad vascular
- b) Fase aguda tardía: infiltración de leucocitos y células fagocíticas

c) Fase proliferativa crónica: deterioro de tejidos y fibrosis

2.3. Mecanismos de inflamación aguda y crónica

Las lesiones en tejidos celulares implica la activación de enzimas, la liberación de mediadores inflamatorios, la migración celular, la descomposición del tejido y la reparación, creando un ambiente que permite la señalización entre distintas moléculas por la producción de rutas químicas y eventos contra el estímulo agresor (Figura 1) (Toledo, 2014).

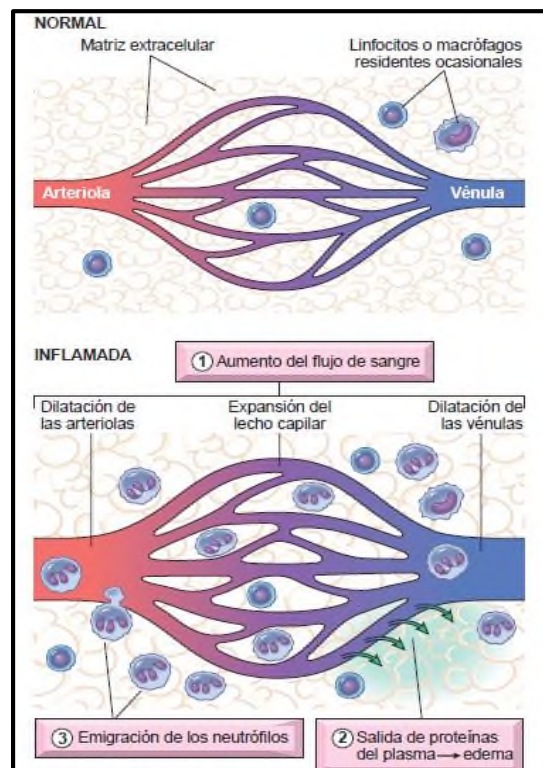


Figura 1. Proceso inflamatorio agudo (Tomado de Kumar *et al.*, 2009, Robbins y Cotran Patología estructural y funcional)

Entre las moléculas involucradas se encuentran las citoquinas secretadas por leucocitos, (interleucinas, quimiocinas, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferones), mediadores lipídicos como las prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), prostaciclina y tromboxanos (TxA₂) (Libby *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2011), también existe producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno, todos estos causan daños oxidativos y pueden dar pie al desarrollo de enfermedades crónicas.

El papel de estas moléculas es curar y estimular la proliferación celular pero si se descontrola, en casos de una respuesta inflamatoria crónica sistémica pueden causar daño tisular, lo que originará desórdenes inflamatorios severos (Prasad y Aggarwal, 2014).

2.4. Fármacos antiinflamatorios actuales

Para el tratamiento de la inflamación son necesarios fármacos que sirvan como analgésicos que alivien el dolor y estén involucrados en la respuesta inflamatoria. La acción principal de estos fármacos es actuar sobre la inhibición de enzimas encargadas de la síntesis de mediadores inflamatorios (Dinarello, 2010).

Actualmente, existen dos tipos de fármacos de uso sintéticos muy utilizados alrededor del mundo. Se clasifican en los siguientes grupos: (Rainsford, 2007).

1. Esteroides

- Prednisolona
- Betametasona
- Dexametasona
- Hidrocortisona
- Metilprednisolona

2. No esteroideos (AINEs)

a) Inhibidores de ciclooxigenasa-1 (COX-1)

- Salicilatos
 - Ácido acetilsalicílico
- Derivados del para-amino fenol
 - Paracetamol
- Derivados del ácido acético
 - Indometacina
- Derivados del ácido propiónico
 - Ibuprofeno
- Derivados del ácido enólico
 - Piroxicam
 - Meloxicam

- Nabumetona

b) Inhibidores selectivos de ciclooxigenasa-2 (COX-2)

- Celecoxib
- Rofecoxib

2.4.1. Antiinflamatorios esteroideos

También llamados glucocorticoides, sus efectos fisiológicos y farmacológicos son principalmente antiinflamatorios e inmunosupresores (Córdoba, 2006). Su mecanismo de acción es a través de la disminución de la producción de eicosanoides, por la inhibición de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂), como consecuencia, impide la liberación del ácido araquidónico (AA) de las membranas.

También inhiben la activación del Factor de Transcripción Nuclear kappa B (NF-κB), lo cual inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias como las interleucinas 1 y 2 (IL-1, IL-2) y la expresión de moléculas de adhesión endoteliales y leucocitarias. En la inhibición de la PLA₂, disminuye la respuesta inflamatoria al disminuir la síntesis de PGs y LTs, además de la reducción de la expresión de la COX-2 (Barnes, 2006; Barnes, 2016; Souza *et al.*, 2012).

2.4.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

En general, son medicamentos ampliamente utilizados pues poseen actividades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias. Son conocidos principalmente por la inhibición reversible de la enzima COX, se agrupan en inhibidores de COX-1 y selectivos de COX-2 (Hunter *et al.*, 2012).

Las COX's son responsables de la síntesis de PGs, moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria (básicamente éstas inducen la inflamación), los AINEs provocan una disminución en su producción y como consecuencia una disminución de la hinchazón y el dolor (Rao *et al.*, 2010).

La principal diferencia entre ambas son el sitio de expresión y su forma de regulación. COX-1 se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos y tipos de células, se encarga de promover funciones biológicas como protección de la mucosa gástrica, control del flujo sanguíneo renal, homeostasis, respuestas autoinmunes, etc. (Mendes *et al.*, 2012).

Mientras que la COX-2 se considera una isoenzima inducible y se expresa en determinadas situaciones fisiológicas como en la presencia de dolor y procesos inflamatorios, es regulada por citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α (Fokunan *et al.*, 2018). Los inhibidores selectivos de COX-2 son específicos, no inhiben a la COX-1 pero logran mantener los mismos efectos analgésicos y antiinflamatorios con menos efectos secundarios (Salido *et al.*, 2001).

En general, existen otros mecanismos de acción de los AINEs en la actividad antiinflamatoria, por ejemplo (DeRuiter, 2002):

- Reducción de radicales superóxido
- Inducción de la apoptosis
- Inhibición de la expresión de moléculas de adhesión
- Disminución de la enzima óxido nítrico sintasa
- Disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1)
- Modificación de la actividad de linfocitos
- Alteraciones de la membrana celular

A manera de esquema en la Figura 2 se muestran los principales sitios de inhibición de los dos tipos de fármacos antiinflamatorios mencionados anteriormente.

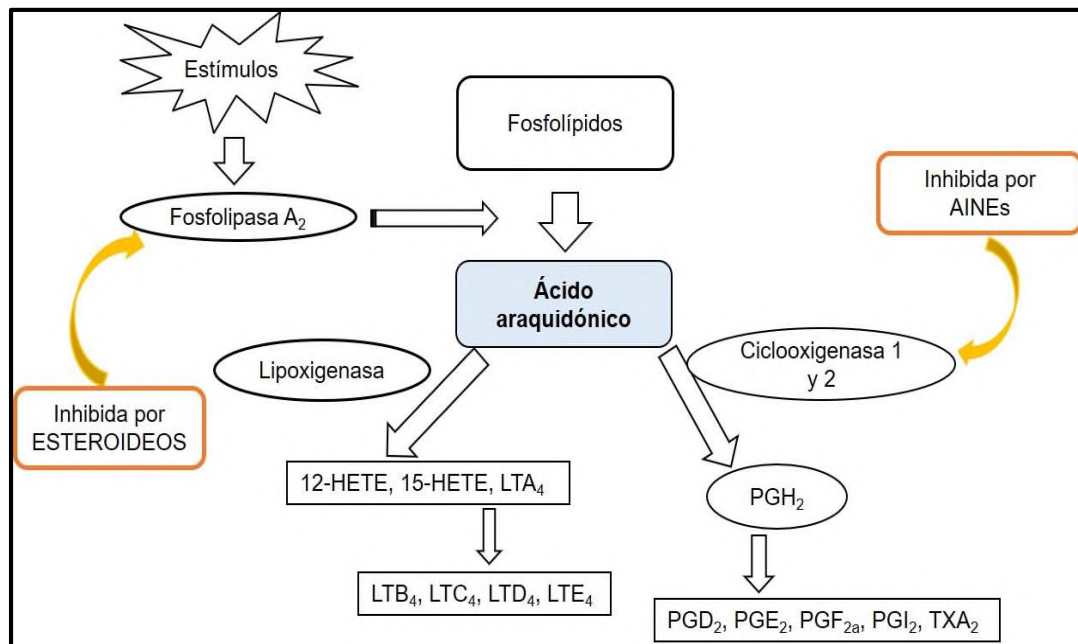


Figura 2. Mecanismo de acción de fármacos antiinflamatorios (Modificado de Pidgeon *et al.*, 2007)

2.5. Problemática de la inflamación

2.5.1. Toxicidad de los fármacos antiinflamatorios sintéticos

Tanto los esteroideos como los AINEs, pueden asociarse a un alto número de efectos adversos y reacciones secundarias, esto depende de la dosis de uso entre otros factores (Edwards y Aronson, 2000).

Algunos de los efectos adversos más importantes de los AINEs se describen a continuación:

- a) Efectos gastrointestinales: debido a la inhibición de la síntesis de PGs, que tienen como función principal proteger a la mucosa gástrica de los efectos corrosivos de los ácidos del estómago, al no ocurrir esto, provoca úlceras gástricas y náuseas (Antman *et al.*, 2007; Prakash y Jacob, 2015).
- b) Efectos cardiovasculares y cerebrovasculares: causadas principalmente por la inhibición de la COX-2, la síntesis de prostaciclina y tromboxanos (TxA₂), esto se refleja en un desequilibrio en la sangre que incrementa el riesgo de eventos trombóticos (Antman *et al.*, 2005; Dinarello, 2010).
- c) Disfunción eréctil: debido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a través del óxido nítrico (Shiri *et al.*, 2006).

Tabla 1. Efectos adversos de algunos fármacos antiinflamatorios y analgésicos comunes

Fármacos	Efectos adversos
Acetaminofén	Erupciones cutáneas, malestar o hemorragia gástrica, urticaria, anemia hemolítica, hepatotoxicidad
Aspirina	Náuseas, vómitos, úlcera péptica, reacciones alérgicas y anafilácticas, alcalosis respiratoria
Indometacina	Náuseas, estreñimiento, formación de úlcera gástrica o duodenal, hemorragia digestiva, cambios hematológicos
Ibuprofeno	Náuseas, mareos, somnolencia, úlcera gástrica o duodenal, hemorragia gastrointestinal, dolor de cabeza
Piroxicam	Náuseas, vómitos, diarrea, somnolencia, úlcera gástrica o duodenal, hemorragia gastrointestinal
Ketorolaco	Dispepsia, náuseas, dolor y hemorragia gastrointestinal y/o perforación del estómago o intestinos
Naproxeno	Mareos, náuseas, vómitos, úlcera gástrica, hemorragia gastrointestinal

Valdecoxib	Dolor de cabeza, náuseas, dolor abdominal, anemia
Celecoxib y rofecoxib	Dolor de cabeza, mareos, somnolencia, insomnio, dispepsia, erupción cutánea, fatiga, dolor abdominal

Modificado de Sen *et al.*, 2010

En la actual búsqueda de nuevas opciones terapéuticas con principios activos más específicos, efectivos y con menos efectos adversos, actualmente varios objetivos están siendo probados, por ejemplo: (Souza, 2005)

- a) Componentes de la transducción de señales
- b) Intervención en las citoquinas proinflamatorias
- c) Inhibición dual COX-2 - 5-LOX

2.5.2. Inflamación y enfermedades

La inflamación es una reacción saludable y necesaria para proteger al organismo de lesiones, pero en estados crónicos provoca daños graves al tejido. Para contrarrestar estos daños son requeridos gastos excesivos de energía metabólica que al no ser satisfechos origina complicaciones severas por la interacción de las moléculas inflamatorias con otras (Serhan, 2017).

Puede propiciar al desarrollo de enfermedades crónicas y autoinmunes (Ribeiro *et al.*, 2018). Enfermedades como la Diabetes tipo 2 y asma, trastornos cardiovasculares (Hotamisligil, 2006), artritis reumatoide, esclerosis múltiple, osteoporosis, osteoartritis, incluso del desarrollo de cáncer, (Singh *et al.*, 2008; Grivennikov *et al.*, 2010; Libby *et al.*, 2002; Gautam y Jachak, 2009) que afectan a la mayoría de la población mundial convirtiéndose en las principales causas de muerte en todo el mundo (Prasad y Aggarwal, 2014).

2.6. Valoración de la actividad antiinflamatoria

En la búsqueda de nuevos candidatos a fármacos son indispensables herramientas de evaluación con base en modelos animales, para lograr el análisis de diferentes tipos de drogas o compuestos examinando su actividad biológica y sus posibles mecanismos de acción, cuyos resultados pueden extrapolarse a humanos (Hand y Hossier, 2003).

Según la intensidad de la reacción estos modelos se clasifican en dos tipos: (Gómez *et al.*, 2011)

- Modelos de inflamación aguda
 - Modelo de edema subplantar por carragenina
 - Protocolo experimental por aceite de crotón
 - Edema auricular de ratón inducido por TPA

- Modelos de inflamación crónica
 - Granulomas inducidos por pellet de algodón
 - Artritis por adyuvante de Freud y carragenina

Algunos agentes irritantes utilizados son:

- TPA
- Aceite de crotón
- Carragenina
- Ácido araquidónico
- Serotonina
- Histamina

2.6.1. Modelo auricular inducido por TPA

El TPA es un potente agente flogógeno y promotor de tumores. La administración tópica de TPA en orejas de ratón induce una reacción inflamatoria aguda que consiste en eritema, edema e infiltración de neutrófilos (Stanley *et al.*, 1991). El TPA activa principalmente (Young *et al.*, 1989; Parra-Delgado *et al.*, 2004):

- La proteína quinasa C, que a su vez activa a otras cascadas enzimáticas como la MAPK y la PLA₂, llevando a cabo la liberación de la activación plaquetaria.
- Estimula la vasodilatación, la permeabilidad vascular, la migración de leucocitos polimorfonucleares, liberación de histamina, serotonina y la síntesis de eicosanoides por las enzimas COX y 5-LOX.

Se produce eritema y vasodilatación entre 1 y 2 horas, pasadas las 3-4 horas aumenta el grosor por la extravasación de líquidos, el edema máximo se observa de las 6-8 horas. Transcurridas 12-14 horas el edema desaparece, aunque la vasodilatación y el eritema persisten hasta las 24-48 horas (Young *et al.*, 1983).

En los últimos años en la intensa búsqueda de compuestos, sustancias o drogas alternativas como opciones terapéuticas y farmacológicas las plantas usadas en la medicina tradicional han sido encontradas como principales productoras, ya que muchas poseen actividad antiinflamatoria atendiendo alguno de los mecanismos mencionados anteriormente.

2.7. Potencial medicinal de las plantas

Las plantas en la actualidad son el foco de la investigación moderna por su gran diversidad química y biológica, por poseer una variedad de compuestos con actividades biológicas prometedoras y por ser la fuente más extensa de compuestos con propósitos farmacológicos, ya que proveen compuestos orgánicos de interés, con fuente de inspiración para nuevos fármacos (Lourenco *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2017).

Actualmente, más del 80% de la población mundial opta por el uso de remedios naturales para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, con expectativa de que en los próximos años incremente a un 95%, debido a la gran aceptabilidad de estas preparaciones. Además de que el 25% de los fármacos de la medicina moderna actual provienen de fuentes naturales (Verma *et al.*, 2006).

2.7.1. Metabolitos de plantas con actividad antiinflamatoria

Las plantas durante su crecimiento y desarrollo producen compuestos mejor conocidos como metabolitos secundarios, son simples o complejos dependiendo de su ruta de biosíntesis, algunos son principios activos, que son los responsables de actividades farmacológicas (Susmitha *et al.*, 2013; Pushpangadan *et al.*, 2017).

En la Figura 3 se mencionan algunos de los más importantes que se han encontrado que poseen actividad antiinflamatoria.

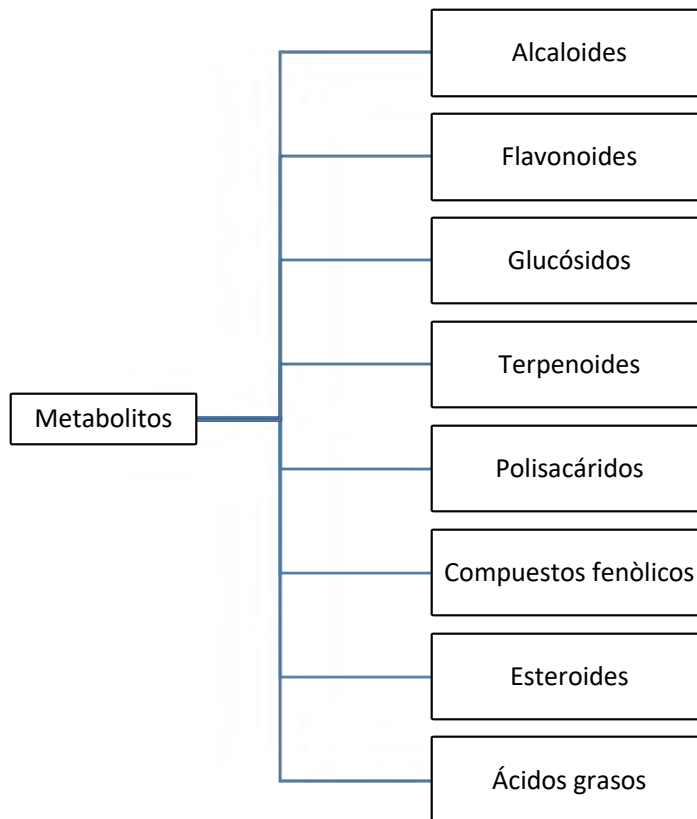


Figura 3. Metabolitos con actividad antiinflamatoria presentes en plantas (Modificado de *Yatoo et al., 2018*)

Las ventajas de las plantas medicinales o de sus constituyentes, es debido a ciertas características tales como su fácil disponibilidad, su bajo costo, con menos o ningún efecto secundario, son más seguros y eficientes en comparación con la medicina sintética (Yuan *et al.*, 2017).

Se han explorado diferentes mecanismos y la búsqueda de objetivos para la acción antiinflamatoria de estos compuestos activos, algunos son los siguientes, muchos de estos actúan en la combinación de varias vías moleculares (Nworu y Akah, 2015).

- a) Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico (PLA₂, COX y LOX, citoquinas proinflamatorias, NOS y NF-kB)
- b) Regulación de la actividad de células inflamatorias (mastocitos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos)

- c) Estabilización de la membrana lisosomal
- d) Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa de las moléculas de señalización intracelular
- e) Antioxidantes y de captación de radicales libres

Como ejemplos de algunas de las principales especies de plantas reportadas con actividad antiinflamatoria se mencionan en la Tabla 2, en los que diferentes extractos o compuestos específicos de las plantas fueron evaluados a través de estudios en modelos inflamatorios *in vivo* e *in vitro*.

Tabla 2. Especies de plantas con actividad antiinflamatoria.

Nombre de la planta	Parte utilizada	Actividad	Modelo de estudio	Referencia
<i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	Raíces (Ginsenosides)	Antiinflamatoria	<i>In vitro</i> Expresión de mRNA de COXs	Shin <i>et al.</i> , 2005; Kim <i>et al.</i> , 2017
<i>Terminalia chebula</i> (Combretaceae)	Frutos Hojas	Antiinflamatoria Antioxidante	<i>In vivo</i> , Ratas albinas Wistar	Bag <i>et al.</i> , 2013
<i>Uncaria tomentosa</i> (Rubiaceae)	Semillas	Antiinflamatoria	<i>In vivo</i> , inhibición de NF-kB, COX-1 y 2	Aguilar <i>et al.</i> , 2002
<i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)	Parte aérea (Curcuminas)	Antiinflamatoria	<i>In vitro</i> e <i>In vivo</i>	Kim <i>et al.</i> , 2016; Illuri <i>et al.</i> , 2015
<i>Artemisia absinthium</i> (Asteraceae)	Hojas	Antiinflamatoria Analgésico	<i>In vivo</i> Ratones albinos	Hadi <i>et al.</i> , 2014
<i>Kalanchoe crenata</i> Andr. (Crassulaceae)	Hojas	Antiinflamatoria	<i>In vivo</i> Ratones albinos	Sarkar <i>et al.</i> , 2015
<i>Cannabis sativa</i> L. (Cannabinaceae)	Semillas	Antiinflamatoria	<i>In vivo</i> Ratas albinas	Musa <i>et al.</i> , 2011
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Zingiberaceae)	Rizomas	Antiartrítico Antiinflamatoria	Supresión de NOS y PGE ₂	Maged <i>et al.</i> , 2013; Funk <i>et al.</i> , 2016
<i>Citrus sinensis</i> (Rutacea)	Cáscara fresca	Antiinflamatoria	<i>In vivo</i> Ratas Wistar	Osarumwense, 2017
<i>Melia toosendan</i> (Meliaceae)	Frutos	Antiinflamatoria	<i>In vivo</i> Ratones hembras ICR	Xie <i>et al.</i> , 2008

2.7.2. Compuestos inhibidores de lipoxigenasas

La lipoxigenasa (LOX) es una de las enzimas (además de la COX) que están involucradas en el metabolismo del AA, ya que por la acción de estas el AA es transformado en potentes mediadores lipídicos activos (Bisht *et al.*, 2014).

LOX cataliza la reacción de ácidos grasos poliinsaturados a hidroperóxidos por la oxidación de los dobles enlaces (Jacquot *et al.*, 2008). Los productos de la LOX son metabolitos lipídicos biológicamente activos que están involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune, estos son los ácidos hidroxieicosatetraenólicos (HETEs), los LTs y lipoxinas (Eshwarappa *et al.*, 2016). Además esta ruta del metabolismo del ácido AA produce ROS involucrados en la formación de tumores y la inflamación (Sacan *et al.*, 2014).

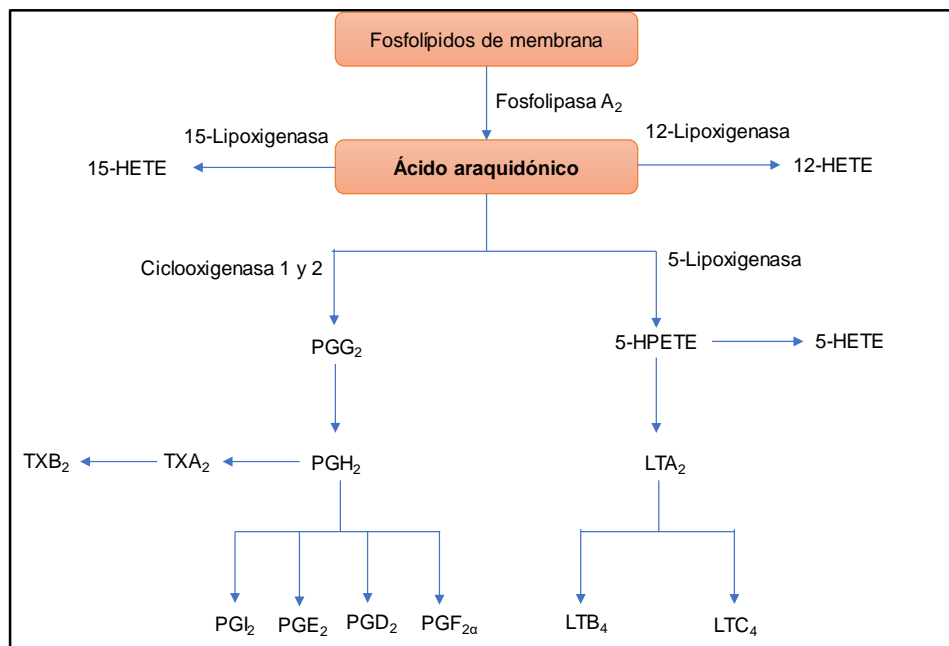


Figura 4. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico (Tomado del Pérez *et al.*, 1998)

Los LTs se encuentran en altos niveles en ciertas enfermedades relacionadas con la inflamación, como la diabetes, artritis, asma, cáncer, psoriasis, rinitis alérgica, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, osteoporosis, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Werz, 2007). La reducción de LTs puede prevenirse mediante la inhibición de la ruta de LOX y sus isomorfos, como objetivos terapéuticos prometedores para tratar un amplio espectro de enfermedades (Pidgeon *et al.*,

2007). Actualmente existen fármacos disponibles para la inhibición de LOX pero han sido prohibidos debido a sus efectos secundarios, por lo que es importante la búsqueda y el desarrollo de nuevos compuestos inhibidores con efectos secundarios mínimos (Tomy *et al.*, 2014).

2.8. Generalidades sobre *Azadirachta indica*

A. indica es un árbol perenne perteneciente a la familia *Meliaceae*, es nativa de las regiones tropicales de India (Kumar y Navaratnam, 2013) y es actualmente encontrada en diferentes regiones del mundo, como el sureste de Asia, oeste de África, y más recientemente en el Caribe y el sur de América central, incluyendo México, (Pankaj *et al.*, 2011) por mencionar algunos.



Figura 5. A) Árbol, B) Flores, C) Hojas de *Azadirachta indica*

Fotografías tomadas por: Mayra Santiago en Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec

Llega a medir hasta 25 m de altura, produce frutos a la edad de 3 a 5 años y a los 10 es altamente productivo (Sabina y Razia, 2017), es conocido por sus nombres comunes como neem, nim, margosa, paraíso, caoba criolla o caoba haitiana (Orozco y Rodríguez, 2007).

Su crecimiento es adaptable a un amplio rango de factores climáticos, topográficos y edafológicos (Sabina y Razia, 2017), adaptándose a áreas con precipitaciones altas y bajas (de 450 a 1200 mm y 150 a 250 mm por año, respectivamente), tolera altas altitudes (1500 msnm) con temperaturas de hasta 49 °C (Parrotta y Chaturvedi, 1994).

Su importancia comercial se resume en que *A. indica* es una especie muy conocida alrededor del mundo por sus diversas aplicaciones y usos (deforestación, combustible, fertilizante, insecticida, antialimentario, pesticida, etc.) (Orozco y Rodríguez, 2007; Jagannathan *et al.*, 2015) y en especial, por su amplio uso en la medicina tradicional, encontrándose con un sin fin de usos en el tratamiento de diversas patologías humanas y diversos extractos obtenidos de la planta presentan actividad biológica, por lo anterior, ha logrado obtener un gran reconocimiento mundial, considerada como la solución a miles de problemas (Biswas *et al.*, 2002; Pankaj *et al.*, 2011).

2.8.1. Composición química

Se han aislado más de 135 compuestos de diferentes órganos de *A. indica*. (Chatterjee y Pakrashi, 1994, Kraus, 1995, Dai *et al.*, 1999), siendo la nimbina el primer compuesto amargo aislado del aceite de neem (Siddiqui, 1942).

Los compuestos encontrados son diversos y de estructura compleja. Se clasifican en dos tipos: los isoprenoides (incluyen diterpenoides, triterpenoides y compuestos del tipo vilasinina y C-secomeliacinas) y los non-isoprenoides (incluyen proteínas (aminoácidos), polisacáridos, compuestos sulfurosos y polifenólicos, como flavonoides y sus glucósidos, cumarinas, taninos, compuestos alifáticos, etc.) (Kraus, 1995; Biswas *et al.*, 2002).

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (5 átomos de carbono) que contienen, así pues, los diterpenos son de 20C, tienen cuatro unidades C5 y los triterpenos son de 30 C, tienen seis unidades C5 (Avalos y Pérez, 2009).

Los triterpenoides, carecen de cuatro de los 30 carbonos provenientes de seis unidades isoterpénicas, ya sea por reoxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, por lo tanto, son compuestos de 26 carbonos modificados en la cabeza de la última unidad de isopentenilo (Caballero, 2004).

Estos compuestos también son conocidos como limonoides (Figura 6), palabra que se deriva a partir de la amargura del limón y otros cítricos. Estos son los compuestos más distinguidos del orden *Rutales* (Champagne *et al.*, 1992), y se presentan principalmente en las familias *Meliaceae* y *Rutaceae*, con 50 géneros y más de 1400 especies (Tan y Luo, 2011).

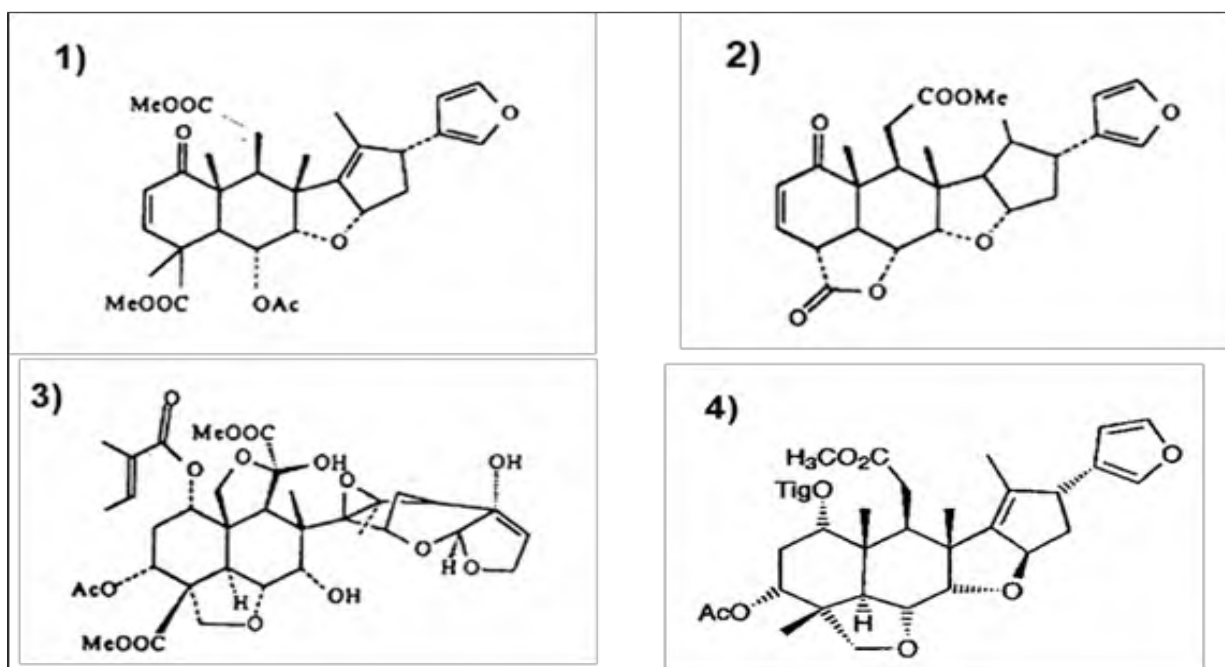


Figura 6. Estructura de limonoides de *Azadirachta indica*. 1) Nimbina, 2) Nimbólido, 3) Azadiractina, 4) Salanina (Tomado de Biswas *et al.*, 2002)

2.8.2. Propiedades medicinales

Todos los órganos de *A. indica* poseen distintas propiedades medicinales y han sido comercial y medicinalmente explotables (Sudhir-Kumar *et al.*, 2010). Podemos mencionar a los tallos, las hojas, frutos y semillas, algunos de sus principales usos en la medicina tradicional se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Usos medicinales de *Azadirachta indica* en la medicina tradicional

Parte utilizada	Uso medicinal
Hoja	Lepra, problemas de los ojos, anorexia, cólicos, úlceras de piel
Corteza	Analgésico, antipirético
Flores	Problemas biliares, eliminación de lombrices intestinales
Frutos	Desórdenes urinarios problemas de ojos, diabetes, heridas y lepra
Ramas	Enfermedades de la piel como tiña, sarna, heridas y úlceras
Pulpa de semilla	Lepra y heridas intestinales
Aceites	Lepra y heridas intestinales
Raíz, corteza, hoja, flores y frutos juntos	Morbilidad en sangre, aflicciones biliares, úlceras de piel, sensación de calor y lepra

Modificado de Biswas *et al.*, 2002

Las hojas son los órganos más utilizados en la medicina tradicional por la facilidad de extracción de los compuestos y además exhiben un amplio rango de actividades farmacológicas y aplicaciones medicinales (Subapriya y Nagini, 2005).

2.8.3. Metabolitos secundarios

Aunque son varios los compuestos que han sido aislados de *A. indica*, muy pocos han sido estudiados para probar alguna actividad biológica (Sudhir-Kumar *et al.*, 2010), en la Tabla 4 se mencionan algunos compuestos activos con sus respectivas actividades biológicas.

Tabla 4. Metabolitos secundarios de *Azadirachta indica* y su actividad biológica

Nombre del compuesto	Fuente	Actividad biológica
Nimbidina	Aceite de semilla	Antiinflamatorio, antiartrítico, antipirético, hipoglucémico, espermicida, antiulcerogénico, antibacterial
Meliacina	Semillas	Insecticida
Nimbidato de sodio	Aceite de semilla	Antiinflamatorio
Azadirona	Cubierta de frutos	Antitumoral, antibacterial
Azadiractina	Aceite de semilla	Antimalárico, anticáncer, antialimentario
Nimbina	Aceite de semilla	Espermicida, insecticida
Nimbólido	Aceite de semilla	Antimalárico, antibacterial, anticancerígeno
Nimocinol	Hojas	Insecticida
Gedunina	Aceite de semilla	Antimalárico, antifúngico
Ácido gálico, catequina y epicatequina	Corteza	Antiinflamatorio, inmunomodulatorio
Polisacáridos	Corteza	Antiinflamatorio
Polisacáridos G1a y G1b	Corteza	Antitumoral
NB-2 peptidoglucano	Corteza	Inmunomodulatorio
Margolona, margolonona e isomargolonona	Corteza	Antibacteriano
Polisacáridos GIIa, GIIIa	Corteza	Antiinflamatorio

Modificado de Kumar *et al.*, 2010; Pankaj *et al.*, 2011, Alzohairy, 2016

El grupo de los tetranortriterpenos (triterpenoides de anillo intacto y los C-seco triterpenoides), son considerados como el grupo más importante de metabolitos secundarios de esta especie (Haldar *et al.*, 2013), ya que estudios han reportado diferentes actividades biológicas relacionadas con este tipo de compuestos (Tan y Luo, 2011; Pandreka *et al.*, 2015). Entre estos triterpenoides se encuentran la azadirona, azadiradiona y gedunina y en los C-secotriterpenoides, la nimbina, salanina y azadiractina. Estos compuestos son los principales responsables de una variedad de importantes actividades biológicas (Atawodi *et al.*, 2009).

La nimbina es un compuesto cercanamente relacionado a compuestos como nimbidina, nimbinina, nimbidinina, ácido nimbídico, y nimbólido, los cuales presentan potentes efectos antiinflamatorios, antipiréticos y antiartríticos (Pillai y Santhakumari, 1981; Biswas *et al.*, 2002; Sidhu *et al.*, 2004).

La nimbina es responsable de gran parte de las actividades biológicas del aceite de neem, ya que además presenta propiedades fungicidas, antihistamínicas y antisépticas (Govindachari *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 2017).

Otro compuesto de importancia es la salanina, un triterpenoide presente especialmente en aceite de semillas, el cual presenta principalmente efecto anti-alimentario contra insectos (Govindachari *et al.*, 1992; Sidhu *et al.*, 2004) y probablemente efecto similar a la azadiractina, que es ampliamente conocido por sus actividades insecticidas y es usado comercialmente en preparados (Champagne *et al.*, 1992).

De aquí que la cuantificación de AZRL de los extractos de *A. indica* resulta interesante ya que la azadiractina y los limonoides relacionados son de gran importancia por ser una fuente importante de moléculas biológicamente activas, principalmente por sus efectos pesticidas (Sidhu *et al.*, 2004). Salanina y nimbina son dos importantes terpenoides, son relativamente estables y son moléculas potenciales para mejorar las propiedades pesticidas de los productos. Por lo tanto, su cuantificación es útil para comprender la propiedad insecticida/plaguicida de esta planta (Ghimeray *et al.*, 2009).

Así mismo *A. indica* es encontrada en una amplia distribución geográfica entre las diferentes zonas tropicales del mundo, por lo que poseen diferencias morfológicas y bioquímicas. Kumar y Parmar (1997), ha reportado una gran variabilidad cuantitativa en el contenido de azadiractina de los granos de semilla de neem de varios ecotipos. De manera similar, se ha informado sobre la gran variabilidad en el contenido de azadiractina dentro de los árboles de una localidad en particular (Kaushik *et al.*, 2007).

2.8.4. Actividad antiinflamatoria de *Azadirachta indica*

Son varios los estudios que se han realizado para evaluar la actividad antiinflamatoria de esta planta. (Tabla 5)

Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de extractos de *Azadirachta indica*.

Fuente	Tipo de extracto	Actividad biológica	Modelo de estudio	Referencia
Hojas y corteza	Metanol	Antiinflamatorio Antipirético	<i>In vivo</i>	Okpanyi <i>et al.</i> , 1981
Hojas Raíz Corteza	Acetona	Antiinflamatorio	<i>In vivo</i> (Ratas Swiss)	Manogaran <i>et al.</i> , 1998
Hojas	Acuoso	Antiinflamatorio	<i>In vivo</i>	Mosaddek y Rashid, 2008
Hojas	Metanol	Antiinflamatorio Proapoptótico	<i>In vitro</i>	Schumacher <i>et al.</i> , 2010
Hojas	Éter de petróleo	Antiinflamatorio	<i>In vivo</i>	Haritha <i>et al.</i> , 2012
Hojas	Etanólico	Analgésico Antiinflamatorio	<i>In vivo</i> (Ratas albinas Wistar)	Dinda <i>et al.</i> , 2013
Hojas	Acuoso	Antiinflamatorio Antipirético	<i>In vivo</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2013
Hojas	Etanólico	Antiinflamatorio	<i>In vivo</i> (Ratas Wistar adultas)	Sonika <i>et al.</i> , 2010, Kanagasanthosh <i>et al.</i> , 2015

Los extractos del neem son considerados con importantes papeles terapéuticos debido a sus propiedades antioxidantes y valiosos compuestos activos. Entre los mecanismos de acción antiinflamatorios reportados de los compuestos activos están: (Alzohairy, 2016)

- Poseen una rica fuente de antioxidantes, por lo que desempeñan un papel en la eliminación de radicales libres.
- Tienen un papel importante en la regulación de vías de señalización celular, modulan la actividad de los genes supresores de tumores (como p53), angiogénesis, factores de transcripción (como NF-kB) y apoptosis.
- Juegan un papel importante como antiinflamatorios a través de la regulación de actividades enzimáticas proinflamatorias, como COX y LOX.

2.8.5. Cultivo *In vitro* de *Azadirachta indica*

La actual demanda de productos farmacológicos naturales derivados de plantas ha ocasionado una gran sobreexplotación. Una gran variedad de especies vegetales están en peligro de extinción

o se han extinguido por completo, lo que contribuye a al crecimiento de los problemas ambientales (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

El cultivo *in vitro* ha surgido como alternativa biotecnológica para la producción de plantas que poseen valiosos compuestos activos, a partir de numerosas estrategias que se han implementado con el fin de incrementar la producción de material vegetal, el incremento en la producción de metabolitos secundarios, incluso la producción de nuevos compuestos utilizables principalmente en la industria farmacéutica (Arias-Zabala *et al.*, 2009; Kumar y Loh, 2012).

Son muchas las ventajas del cultivo *in vitro* sobre los cultivos convencionales, empezando con que se cuenta con un sistema de condiciones ambientales controladas, sistemas de producción definidos y automatizados, donde se pueden producir sustancias de gran utilidad, elevando la producción y rendimientos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Esto es posible gracias a una característica principal de las células vegetales, llamada totipotencia celular, el cual a partir de cualquier explante se tiene la capacidad de dar origen a una planta completa, conservando la misma información genética y funcionalidad (Kieran *et al.*, 1997).

Respecto a *A. indica*, numerosos estudios han surgido para llevar a cabo el establecimiento del cultivo *in vitro* y de esta manera la regeneración de plántulas completas y su propagación. Esto surge a partir del cultivo de órganos específicos de la planta en un medio de cultivo definido bajo condiciones controladas.

Los datos bibliográficos muestran una gran cantidad de estudios para el establecimiento y propagación de cultivos *in vitro* de *A. indica*, el explante más comúnmente utilizado son las hojas de árboles maduros (Ramesh y Padya, 1990, Eeswara *et al.*, 1998), la producción de callos embriogénicos para la generación de embriones somáticos a partir de cotiledones maduros (Shirikande *et al.*, 1993) y de hipocotilos (Su *et al.*, 1997), la producción de brotes y raíces a partir de anteras (Gautam *et al.*, 1993) y a partir de diferentes explantes como hipocotilo, epicotilo, nodos cotiledonarios, cotiledones, hojas y raíces (Salvi *et al.*, 2001).

En *A. indica* se ha logrado la producción de metabolitos como: la azadiractina (Prakash *et al.*, 2005) y limonoides relacionados en cultivo de callos y de células en suspensión (Rafiq y Dahot, 2010, Babu *et al.*, 2005).

Méndez-Sánchez, (2015), obtuvo el cultivo *in vitro* de plántulas de *A. indica* mediante la germinación de semillas desinfectadas, metodología de la cual se obtuvo el material vegetal para este trabajo. Además, reportó que los extractos *in vitro* si contienen metabolitos secundarios, donde el extracto hexano tuvo la mayor actividad hipoglucemiante y hace mención de que los posibles compuestos responsables son nimbina y salanina.

Ante la falta de estudios de actividades biológicas y la búsqueda de producción de metabolitos secundarios de plantas completas cultivadas *in vitro* de *A. indica*, se pretende evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Dado a que desde tiempos antiguos las plantas han sido utilizadas como remedios medicinales ante distintos malestares y enfermedades, con la finalidad de validar el conocimiento de la medicina tradicional, se han realizado investigaciones con sustento científico para comprobar la existencia del efecto farmacológico de extractos de plantas en ciertas actividades biológicas, así como identificar, aislar y purificar los metabolitos secundarios activos presentes.

A. indica posee una gran cantidad de compuestos bioactivos a los que se les atribuyen distintas propiedades medicinales y farmacológicas, algunos con actividades hipoglucémicas y antiinflamatorias, por tal motivo, se le considera una fuente importante de compuestos naturales activos. Ante la búsqueda de nuevas alternativas para la obtención de material vegetal, surge la herramienta biotecnológica de cultivo *in vitro*, como estrategia para la obtención de material vegetal de manera sustentable, por lo que es importante investigar si en este modo de cultivo, se producen los metabolitos secundarios de interés.

Así mismo, dado a los múltiples efectos secundarios de la mayoría de los fármacos antiinflamatorios comerciales actuales, un porcentaje significativo de la población mundial utiliza a las plantas como fuente alternativa medicinal y ya que *A. indica* ha sido utilizada como remedio antiinflamatorio natural, es necesario hacer estudios que validen su uso, por lo que la realización de análisis biológicos y fitoquímicos es fundamental.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de plántulas de *Azadirachta indica* cultivadas *in vitro*, presentarán efecto antiinflamatorio en ratones CD-1.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos de *Azadirachta indica in vitro* en ratones CD-1

5.2. Objetivos específicos

- a) Realizar un análisis fitoquímico de los extractos
- b) Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos de *Azadirachta indica* en el modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA
- c) Evaluar la dosis-respuesta de los extractos activos de *Azadirachta indica* en ratones CD-1
- d) Evaluar la inhibición de la enzima lipoxigenasa como un posible mecanismo de acción de los extractos activos

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estrategia experimental

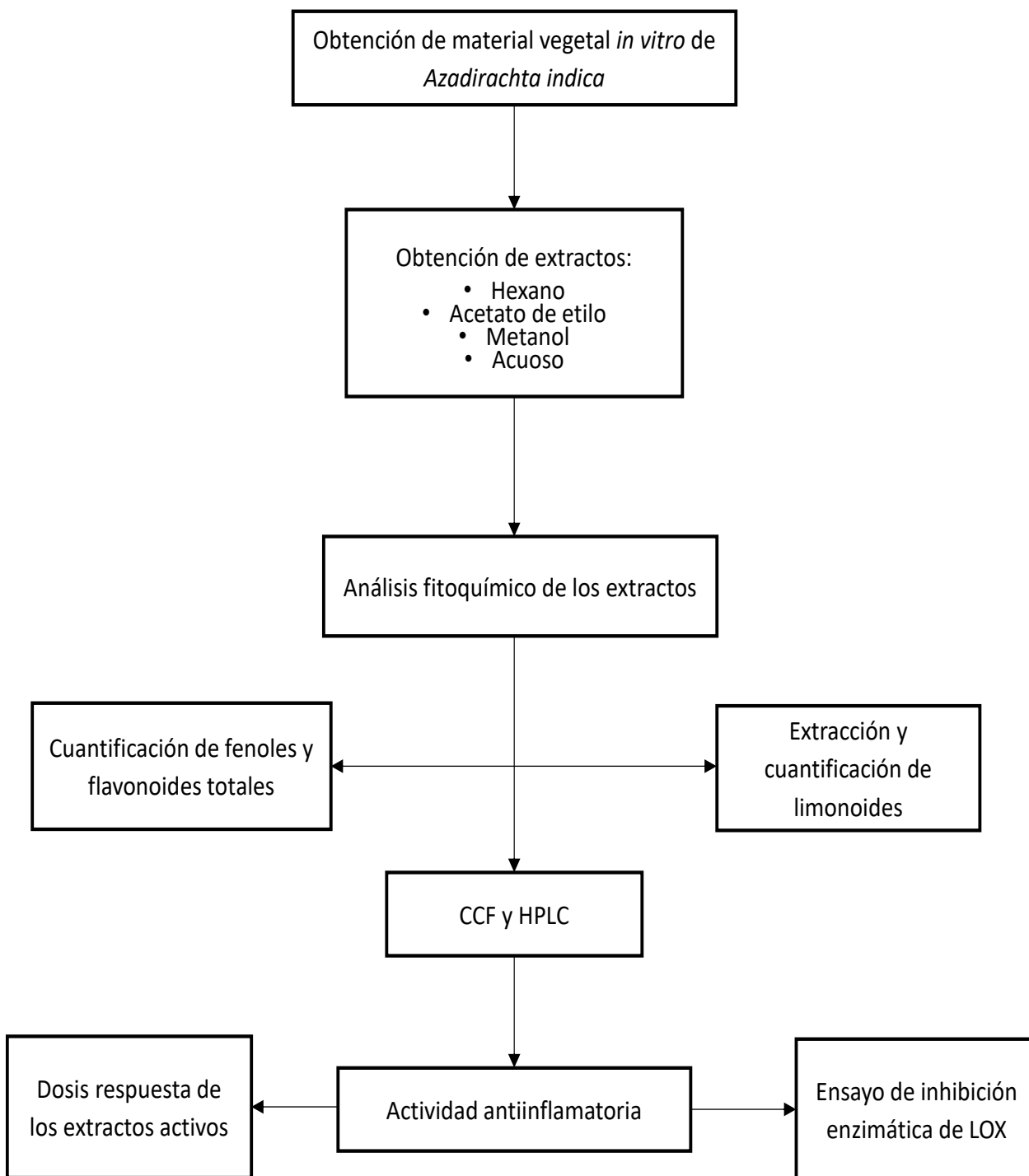


Figura 7. Diagrama de la estrategia experimental realizada

6.2. Material vegetal

Se utilizaron las semillas de *A. indica* como fuente para la obtención del material vegetal, éstas fueron recolectadas de árboles nativos ubicados en la comunidad de El Porvenir, Oaxaca, que se encuentra a una longitud de -95.255556, altitud de 17.475833 y a 100 metros sobre el nivel del mar. La colecta se realizó en el mes de julio del 2017.

6.2.1. Obtención de plantas *in vitro*

Siguiendo la metodología establecida por Méndez-Sánchez (2015), las semillas recolectadas de *A. indica* pasaron por el método de desinfección siguiente: fueron lavadas con detergente líquido durante dos minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, después se sumergieron en microdín comercial durante 15 minutos, seguido por tres enjuagues de agua destilada estéril. Posteriormente se hicieron lavados con etanol al 70 % (v/v) en agua destilada estéril por 2 minutos, y finalmente un lavado con cloro comercial al 80% (v/v) en agua destilada estéril y Tween-20 al 0.1 % (v/v) durante 20 minutos con breves agitaciones constantes, al término se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Se utilizaron frascos Gerber para la germinación de las semillas con 20 ml de medio basal Murashige y Skoog (MS, Marca Sigma) a 4.4 g/L, complementado con sacarosa al 3% (p/v) y fitagel al 0.25 % (p/v) como agente gelificante, el medio se ajustó a un pH de 5.8 antes de la esterilización, la cual se realizó a 120 °C durante 15 minutos. Se sembraron 4 semillas por cada frasco y se incubaron en oscuridad a 25 ± 2 °C por un periodo de 4 días. Al paso de un mes de crecimiento, se cambiaron a vasos de vidrio de mayor capacidad, con 20 ml de medio y se mantuvieron en un cuarto de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 25 ± 2 °C.

6.2.2. Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos de diferente polaridad de *A. indica in vitro*, se utilizaron las plántulas de aproximadamente 3 meses de edad, se cortaron en trozos pequeños, se congelaron y pasaron por un proceso de liofilizado durante tres días. Una vez secas, se molieron en un mortero para obtener el material pulverizado.

Para la obtención de los extractos, el material vegetal pulverizado se colocó en los diferentes disolventes y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 24 horas, después se filtró el disolvente en papel Whatman N° 1 en un matraz Kitasato y con la ayuda de una bomba de vacío para la recuperación del material vegetal. El material vegetal recuperado se resuspendió en un nuevo disolvente de polaridad diferente, en el siguiente orden: hexano, acetato de etilo, metanol y agua, de las cuales se obtuvieron fracciones de distintas polaridades. El disolvente filtrado se evaporó bajo presión reducida en un rotaevaporador a 45 °C y 90 rpm. Los extractos obtenidos después de la evaporación del disolvente se llevaron a peso constante en una estufa para conocer el rendimiento de la extracción, finalmente se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

6.3. Análisis fitoquímico de los extractos

6.3.1. Cuantificación de Fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se realizó de acuerdo a la metodología de Folin-Ciocalteu descrita por Singleton *et al.*, (1999) vía espectrofotometría, con algunas modificaciones, usando como estándar ácido gálico (0-1000 ppm) y los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (GAE) por peso seco. La curva de calibración se obtuvo a partir de una solución de ácido gálico a 1000 ppm (Anexo I).

A 150 µL de agua desionizada, se le adicionó 2.5 µL de una solución de 17 mg/mL de extracto seco al cual se le agregó 10 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reposar durante 10 min antes de adicionar un volumen de 30 µL de carbonato de sodio al 20 % (p/v), posteriormente, se incubó a 37°C durante 15 min, finalmente se enfrió en un baño de hielo y se leyó a una absorbancia de 750 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

6.3.2. Cuantificación de Flavonoides totales

La cantidad de flavonoides se calculó utilizando una curva de calibración de quercetina (1.5 mg/mL) y se expresó en equivalentes de quercetina (EQ) por peso seco (Anexo II).

Para la determinación de flavonoides totales en los extractos, se realizó por el método de tricloruro de aluminio descrito anteriormente por Dewanto *et al.*, (2002), con 20 µL de extracto a

una concentración de 17 mg/mL. A los 20 µL de extracto se le añadió 100 µl de NaNO₂ al 20%. Posteriormente se le añadió 100 µL AlCl₃ al 10%, y se aforó con agua desionizada a un volumen de 5 mL, se dejó reposar 45 min. Finalmente se mezcló y se leyó la absorbancia a 415 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

6.3.3. Cuantificación de Limonoides relacionados con AZA

Según la metodología de Dai *et al.*, (1999) la extracción y cuantificación de limonoides se llevó a cabo de la siguiente manera: para la extracción, 5 mg de cada extracto se disolvieron en metanol (3 x 50 µL), seguido de una sonicación durante 30 min y centrifugado durante 10 min a 3000 rpm, el pellet se recuperó, los extractos metanólicos se combinaron y se les adicionó 50 µl de agua destilada, seguido por diclorometano (3 x 50 µl), donde la fase metanol-agua fue descartada, quedando solo la fracción de diclorometano, la cual fue llevada hasta sequedad y almacenada a -4°C hasta su uso.

Para la cuantificación colorimétrica total de AZRL, los extractos metanólicos se resuspendieron en 1 mL de diclorometano, del que se tomaron 350 µl y se colocaron en un nuevo tubo, se añadieron 100 µL de una solución de vainillina-metanol (20 mg/mL), se agitaron durante 2 min, posteriormente se añadió 150 µL de ácido sulfúrico al 98% (añadiendo de 50 µL en 50 µL), agitando durante 10 segundos durante cada aplicación y finalmente se añadieron 350 µL de metanol, para tener una mezcla homogénea, observando al instante el desarrollo de una coloración azul verdosa. La solución se dejó reposar durante 5 minutos antes de la medición de la absorbancia a 577 nm. La curva de calibración se elaboró con un estándar de azadiractina (Sigma-Aldrich, ≥ 95.0%) de 0-100 µg/ml disueltos en diclorometano y utilizando como muestra blanco diclorometano (Anexo III).

6.3.4. Cromatografía en capa fina

Para la determinación de los principales compuestos activos presentes en los extractos de *A. indica*, se realizó la identificación por cromatografía de capa fina utilizando placas de fase normal (cromatofolios Merck® de aluminio y sílica gel F₂₅₄) de 7 x 5 cm, usando como fase móvil diclorometano-metanol (19.5:0.5 v/v). El revelado se realizó a partir del revelado bajo luz UV (254 y 365 nm, indicadores fluorescentes presentes en la placa) y a partir de una solución de vainillina

acidificada, la cual consiste en una mezcla de vainillina: ácido sulfúrico al 98%: etanol al 96 % (3 g: 1.5 mL: 100 ml) (Sinha *et al.*, 1999). Después de aplicar el revelador con vainillina, las placas se calentaron a 90 °C para observar las bandas de los compuestos presentes. La identificación se realizó usando un estándar de azadiractina, salanina, nimbina y nimbólido obtenidos de Sigma Aldrich, determinando así el Rf de las bandas de los compuestos observados a partir de la siguiente fórmula.

$$R_f = \frac{\textit{Distancia recorrida por el soluto}}{\textit{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

6.3.5. Análisis por HPLC de los extractos

Para el análisis de los extractos por HPLC, se utilizó un equipo marca Waters ACQUITY Arc, equipado con un detector de fotoarreglo de diodos 2998 PDA. Se empleó una columna analítica en fase reversa Kinetex[®] 5µm EVO18 100 A (LC column 150 x 2.1 mm). La longitud de onda utilizada fue de 210 nm. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo usando una fase móvil acetonitrilo-agua (10:90 v/v), iniciando con 5 % de acetonitrilo hasta obtener 95 % a los 20 min y 5 % a los 25.5 min, se utilizó un flujo de 0.5 mL/min con una temperatura de la columna de 40 °C, un volumen de inyección de 10 µL y un tiempo de corrida de 30 min. Partiendo de la extracción metanólica de los extractos (apartado 6.3.3) se llevó a una concentración de 5 mg/mL, resuspendidos en la fase acetonitrilo: agua, los cuales pasaron por un proceso de filtración con el objetivo de obtener el extracto sin impurezas.

Los estándares utilizados fueron azadiractina (sigma A 7430), nimbina, salanina y nimbólido (Sigma SMB00586) los cuales fueron inyectados a una concentración de 10 ppm cada uno, disueltos en 260 µL de fase móvil.

6.4. Animales de experimentación

Los experimentos la actividad antiinflamatoria se realizaron con ratones albinos (*Mus musculus*) hembras y machos, de la cepa ICR CD-1, de tres meses de edad, con un peso promedio de 30-45 g. Los ratones se mantuvieron en el Bioterio de la Universidad del Papaloapan, en un cuarto cerrado y aislado, en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 25 °C, con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y una humedad relativa de 45±5.0 % HR, con agua y alimento *ad libitum*.

Durante la crianza y los ensayos, los animales fueron tratados con estricto apego de acuerdo a los lineamientos descritos en la regulación mexicana del cuidado de animales experimentales NOM-062-ZOO-1999 y a los lineamientos éticos internacionales para el uso y cuidado de los animales experimentales.

6.5. Actividad antiinflamatoria

6.5.1. Edema auricular inducido por TPA en ratones CD-1

Para conocer el efecto antiinflamatorio de los extractos de *A. indica in vitro*, se utilizaron 6 grupos de ratones con 5 integrantes cada uno (Tabla 6). De acuerdo con el método descrito por Payá *et al.*, (1993) todas las aplicaciones se hicieron tópicamente, con la aplicación de 20 µL en las superficies interna y externa de cada oreja, la derecha para los tratamientos y la izquierda sirvió como control, la cual solo recibió acetona como vehículo (20 µL), misma que se utilizó como disolvente para cada tratamiento (Figura 8).

Cada grupo de ratones se colocó en cajas separadas, a todos los grupos se les aplicó TPA (P8139-5MG) (2.5 µg) para inducir el edema, pasados 10 minutos de la inducción se aplicaron los extractos a una dosis inicial única de 80 mg/mL, utilizando acetona como vehículo. El control positivo fue la dexametasona (1 mg/mL), un antiinflamatorio sintético comercial y el control negativo fue el grupo de ratones sin tratamiento.

Tabla 6. Grupos experimentales.

Grupos	Experimento
I. Control negativo	TPA
II. Referencia	Dexametasona
III.	Extracto hexano
IV.	Extracto acetato de etilo
V.	Extracto metanol
VI.	Extracto acuoso

Se permitió que la inflamación se desarrollara durante 4 horas después de las cuales los animales fueron sacrificados, obteniéndose así secciones a través de la porción central de ambas orejas, estas se pesaron, el edema fue medido como la diferencia de peso entre la oreja tratada y la no tratada. Los porcentajes de inhibición se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{I_c - I_t}{I_c} \times 100$$

Dónde:

I_c: Porcentaje de inflamación media del grupo control

I_t: Porcentaje de inflamación media de cada grupo tratado.

6.5.2. Dosis respuesta del extracto activo

Para el caso de la dosis-respuesta se aplicaron diferentes dosis del extracto con mayor actividad antiinflamatoria para evaluar la dosis efectiva 50 (DE₅₀), que es la dosis en la cual se inhibirá el 50 % de la inflamación.

Las dosis elegidas fueron menores a la dosis inicial, 40, 30, 20, 10, 2.5 mg/kg. Se siguió el mismo procedimiento anterior para la medición de la actividad antiinflamatoria.

6.6. Ensayo de inhibición de la enzima lipoxigenasa

El ensayo de inhibición de la enzima LOX (Sigma L7395-15MU, *Glycine max* soybean) se determinó por un método espectrofotométrico reportado por Malterud y Rydland, (2000), con algunas modificaciones. Se utilizó un buffer de borato de sodio (0.2 M, pH 9), formulado con ácido bórico e hidróxido de sodio (Kumari *et al.*, 2011). A una mezcla de solución de buffer borato, se le agregó 50 µL de los extractos a una concentración de 1 mg/mL disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO), la enzima (500 µL, 400 U/mL en buffer borato, concentración final 200 U/mL) y ácido linoleico (sigma L1376-1G) como sustrato (250 µL, 250 µM en buffer borato) para hacer un volumen de reacción del 1 mL. Se utilizó como blanco DMSO solo (50 µL) y como control la enzima sin inhibidor. Como inhibidor estándar se utilizó quercetina (10 mM). En un tubo de reacción, después de la adición de la enzima, se incubaron 5 min a temperatura ambiente y la reacción se comenzó añadiendo ácido linoleico, se dio 5 min de reacción y se leyó a una absorbancia de 234 nm durante 5 min cada 30 s, utilizando celdas de cuarzo. La solución de la enzima permaneció en hielo durante todo el periodo experimental. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{ABc - ABm}{ABc} \times 100$$

Dónde:

ABc: Absorbancia del control

ABm: Absorbancia de la muestra de prueba

6.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico para la actividad antiinflamatoria se realizó con el software estadístico MINITAB, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, los datos se analizaron posteriormente con una post-ANOVA por el método Dunnet, con $p < 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Material vegetal

La germinación *in vitro* de semillas de *A. indica* fue en medio de cultivo MS y se presentó a partir del tercer día, a más tardar al quinto día después de su incubación, observando un porcentaje de germinación mayor al 90%. El 10 % restante de semillas no germinadas correspondió al porcentaje de contaminación por la carga microbiana presente en las mismas, debido a la temporada de lluvias durante la recolección (Méndez-Sanchez, 2015).

A la edad de tres meses la parte aérea de las plántulas fue recolectada para su almacenamiento en refrigeración a 4°C.



Figura 8. Plántulas de *Azadirachta indica* generadas por cultivo *in vitro*

Con el propósito de obtener mayor cantidad de material vegetal también se hizo la micropropagación de las plántulas a partir de segmentos nodales. Cada explante fue resembrado en medios de cultivo MS, sin reguladores de crecimiento vegetal.

Al paso de una semana del cultivo se observó la aparición de entre uno y tres brotes, posiblemente generados por el estrés causado a la planta debido al corte (Figura 9), ya que como

lo menciona Desjardins *et al.*, (2009) durante un cultivo *in vitro*, las plantas están sujetas a muchos factores que pueden alterar su crecimiento (heridas, lesiones mecánicas, entre otros), en este sentido, las plantas modifican su fisiología para poder adaptarse a su entorno, lo que afecta sus procesos bioquímicos y genéticos manifestados en la alteración del metabolismo o desarrollo de la planta y en este caso, en la separación de explantes de la planta madre para ser expuestos a su capacidad de propagación natural dando como resultados la formación de brotes.



Figura 9. Plántulas generadas por segmentos nodales de *Azadirachta indica* en medio MS.

Estos brotes fueron removidos al paso de un mes, para ser sembrados individualmente. A la edad de tres meses fueron retirados del frasco y almacenados a 4 °C para posteriormente realizar la obtención de los extractos.

7.2. Rendimientos de extracción

Después de haber realizado la extracción exhaustiva del extracto seco, del cual a partir de 8.3 g de peso de material vegetal fresco de plántulas de *A. indica in vitro* se obtuvieron 2.04 ± 0.011 g de material vegetal seco.

Los rendimientos de la extracción obtenidos con los solventes de distinta polaridad, se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento de la extracción.

Extracto	Peso Extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	0.0424	2.07
Acetato de etilo	0.0382	1.86
Metanol	0.155	8.59
Acuoso	0.243	11.90

Los porcentajes de rendimientos más altos fueron en los extractos metanólico y acuoso, con 8.59% y 11.90 %, respectivamente. Similares a los reportados por Méndez-Sánchez (2015), quien a partir de 10.17 g de material vegetal seco obtuvo 3.12%, 2.11%, 12.91%, 13.30% para los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso, respectivamente.

Diversos reportes muestran la efectividad de solventes polares como el metanol y el agua, para la obtención de mayores rendimientos de extracción en hojas silvestres así como de plántulas *in vitro* de *A. indica* (Ghimeray *et al.*, 2009; Méndez-Sánchez, 2015) y de otras especies de plantas (Garrido *et al.*, 2013; Stanojević *et al.*, 2009). Esto se debe a que la polaridad del solvente utilizado influye en el rendimiento, ya que el uso de disolventes de alta polaridad rompen más fácilmente la membrana celular y hace posible una mejor extracción y como consecuencia muestran los más altos rendimientos (Garrido *et al.*, 2013).

7.3. Análisis fitoquímico de los extractos

Para conocer el perfil de producción de metabolitos secundarios de los extractos *in vitro* de *A. indica*, se realizaron las cuantificaciones de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y de AZRL en todos los extractos, incluida la cromatografía de capa fina y análisis por HPLC.

Los resultados de las cuantificaciones de metabolitos secundarios obtenidos en este estudio son discutidos en el siguiente apartado.

7.3.1. Cuantificación de Fenoles totales

Los valores de la cuantificación de fenoles totales en los extractos de *A. indica* se expresan como equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración de compuestos fenólicos en los extractos

Extracto	Concentración (mg EAG /g de extracto)
Hexano	5.345 ± 0.003 ^c
Acetato de etilo	4.309 ± 0.007 ^d
Metanol	15.794 ± 0.005 ^a
Acuoso	13.161 ± 0.005 ^b

Los datos se analizaron con ANOVA y post prueba Tukey, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los valores se muestran como media ± desviación estándar (n=3).

El extracto metanólico presentó la mayor concentración de fenoles totales (15.79 mg EAG/ g de extracto), seguido por el extracto acuoso (13.16 mg EAG/ g de extracto), mientras que el extracto de acetato de etilo presentó la menor concentración (4.30 mg EAG/ g de extracto).

La extracción mayoritaria en el extracto metanólico, se debe a que el metanol es considerado como uno de los mejores solventes para la extracción de compuestos fenólicos, debido a la polaridad tanto del solvente como de los compuestos a extraer (Shewale y Rathod, 2018). Sin embargo, ya que el mayor uso de los compuestos fenólicos son en la industria alimentaria y cosmética, se prefieren mezclas de etanol: agua para la extracción de dichos compuestos, por poseer baja toxicidad, bajo costo y es ecológico en comparación con otros solventes (Jokic *et al.*, 2010; Lubomirova *et al.*, 2016).

Méndez-Sánchez, (2015) realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales de plántulas *in vitro* de *A. indica*, sus resultados mostraron una menor acumulación en todos los extractos respecto a los nuestros, siendo la producción en nuestro extracto metanólico 1.05 veces mayor que los obtenidos por Méndez-Sánchez. Respecto al extracto acuoso, hubo 2.87 veces mayor producción en comparación con los mismos. En cuanto a la cuantificación de los extractos de acetato de etilo y hexano, fueron 3.6 y 1.3 veces mayor, respectivamente.

En comparación con los extractos de la planta silvestre de *A. indica*, la cantidad de fenoles extraída con metanol de la parte aérea de plántulas *in vitro* fue 4.9 mg EAG/g mayor que la obtenida por el extracto metanólico de hojas silvestres (10.80 mg/g de extracto) reportados por Shewale y Rathod, (2018) y es mayor por 2.47 mg EAG/g al extracto metanólico de hojas silvestres (13.32 mg EAG/g de extracto) reportados por Irondi *et al.*, (2012).

Sin embargo, es 8.64 veces menor que lo reportado por Abdulkadir *et al.*, (2017) (136.45 mg EAG/g de extracto) en extractos etanólicos (95% v/v) de hojas silvestres, y en comparación con el extracto butanol de hojas silvestres, el extracto *in vitro* tiene una concentración 6.7 veces menor de compuestos fenólicos (107.29 mg EAG/g de extracto) (Al-Jadidi y Hossian, 2015).

7.3.2. Cuantificación de Flavonoides

Los datos obtenidos para la cuantificación de flavonoides se reportan como miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración de flavonoides en los extractos

Extracto	Concentración (mg EQ /g de extracto)
Hexano	1.673 ± 0.005 ^b
Acetato de etilo	2.318 ± 0.017 ^a
Metanol	0.252 ± 0.003 ^d
Acuoso	0.757 ± 0.004 ^c

Los datos se analizaron con ANOVA y post prueba Tukey, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los valores se muestran como media ± desviación estándar (n=3).

El extracto con mayor concentración de flavonoides totales fue el extracto acetato de etilo (2.31 mg EQ/g de extracto), seguido por el extracto hexano (1.67 mg EQ/g de extracto), mientras que el extracto metanol presentó la menor concentración.

Para cuantificaciones de flavonoides de extractos de *A. indica in vitro* reportados, Méndez Sánchez, (2015) observó las cuantificaciones de flavonoides en el orden de: metanol>acetato de etilo>hexano>acuso con 0.07, 0.03, 0.02 y 0.009 mg EQ/g de extracto, respectivamente. Existe

una mayor cuantificación de flavonoides en nuestros extractos, acumulados por el extracto de acetato de etilo, el cual fue 33.1 veces mayor respecto al extracto metanólico y 77.2 veces mayor respecto a extracto de acetato de etilo reportados.

Esta diferencia puede deberse a las variaciones en las condiciones de crecimiento en el cultivo *in vitro*, es decir, a que pudo originarse un cierto periodo de estrés al hacer escisiones internodales para las resiembras y obtención de nuevos brotes, lo que ocasionó que existiera una mayor producción de metabolitos secundarios en respuesta al estrés. Bravo, (1996), menciona que la producción de metabolitos secundarios se ve afectado por factores como la germinación, el procesamiento y almacenamiento de las plantas. Azofeifa, (2009), a su vez menciona que muchos explantes, específicamente de especies leñosas liberan al medio una mezcla compleja de compuestos fenólicos, así como de flavonoides (Cruceriu *et al.*, 2017), debido al daño oxidativo por la producción de ROS que son perjudiciales, pero que son esenciales en primera instancia como vías de señalización de la célula para realizar los ajustes adecuados en respuesta a los cambios ambientales (Cruceriu *et al.*, 2017). Las ROS son controlados y contrarrestados por el sistema antioxidante que protege a la célula mediante la captación de radicales libres (Shao *et al.*, 2008).

Además los flavonoides tienen estructuras químicas variadas, debido a las diferentes modificaciones y adiciones de grupos funcionales, a lo que se le atribuye sus diferentes polaridades (Cartaya y Reynaldo, 2001), así mismo también influye la naturaleza del solvente sobre la solubilidad de los mismos (Chebil *et al.*, 2007).

Respecto a las cuantificaciones reportadas para extractos silvestres, el extracto de acetato de etilo *in vitro* fue 33.3 veces menor al contenido por el extracto etanólico de hojas maduras silvestres (77.01 mg EQ/g) (Abdulkadir *et al.*, 2017). Así mismo el contenido es 2.3 veces menor al contenido en el extracto metanólico de hojas silvestres reportadas (5.29 mg EQ/g) por Al-Jadidi y Hossian, (2015).

7.3.3. Cuantificación de Limonoides relacionados con AZA

La cantidad de AZRL cuantificados en los extractos de *A. indica* se reporta en base a equivalentes de azadiractina por gramo de extracto seco. (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de Limonoides Relacionados con Azadiractina

Extracto	Concentración (mg EAZA/g de extracto)
Hexano	2.1400 ± 0.005 ^b
Acetato de etilo	4.6249 ± 0.006 ^a
Metanol	1.2579 ± 0.001 ^c
Acuoso	0.5979 ± 0.008 ^d

Los datos se analizaron con ANOVA y post prueba Tukey, $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los valores se muestran como media ± desviación estándar (n=3).

El extracto con mayor contenido de AZRL fue el extracto de acetato de etilo (4.62 mg EAZA/ g ES), seguido por el extracto hexano (2.14 mg EAZA/g ES), en los extractos metanólico y acuoso se obtuvieron las menores cantidades (1.25 y 0.59 mg EAZA/g ES, respectivamente). En comparación con lo reportado por Méndez-Sánchez, (2015), obtuvo valores en el orden de acetato de etilo>metanol>hexano>acuoso con 2.8, 0.2, 0.4, 0.1 mg EAZA/g ES, respectivamente.

Al comparar las concentraciones obtenidas de limonoides en el extracto acetato de etilo de plántulas *in vitro* de *A. indica* con lo reportado por Bedoya y Hoyos, (2010) fueron de 5 y 11.8 veces mayor que la obtenida en callos y suspensiones celulares (0.91 y 0.39 mg de AZA/g, respectivamente).

La concentración mayoritaria de limonoides en el extracto de acetato de etilo, puede deberse a que estos compuestos son de baja o mediana polaridad. Siendo el hexano, acetato de etilo o diclorometano, los mayores disolventes de los limonoides (Dubashi *et al.*, 2013), debido a la naturaleza no polar y medianamente polar de los disolventes como la de los compuestos que se extraen (Jarvis *et al.*, 1999; Melwita y Ju, 2010).

7.3.4. Análisis por cromatografía de capa fina

En el análisis por cromatografía de capa fina de los extractos de *A. indica*, se observó la retención de metabolitos secundarios con diferente polaridad.

La fase móvil seleccionada para el análisis por cromatografía en capa fina diclorometano-metanol (9.5:0.5 v/v) es utilizada para el estudio de grupos de compuestos que poseen de mediana a baja polaridad.

Las placas se revelaron bajo luz UV de 254 nm (Figura 10A) (longitud de onda de excitación del indicador presente en la placa), revelando bandas a 254 nm para el extracto de acetato de etilo (color: café oscuro). Estas bandas podrían corresponder a los siguientes compuestos detectables a esta longitud de onda: flavonoides y polifenoles.

A la longitud de 365 nm (Figura 10B), se observaron bandas en dos extractos: hexano y acetato de etilo (colores: magenta, púrpura y azul turquesa). Las bandas observadas podrían corresponder a los siguientes compuestos detectables a 365 nm: terpenoides, principios amargos o flavonoides (Wagner y Bladt, 2001).

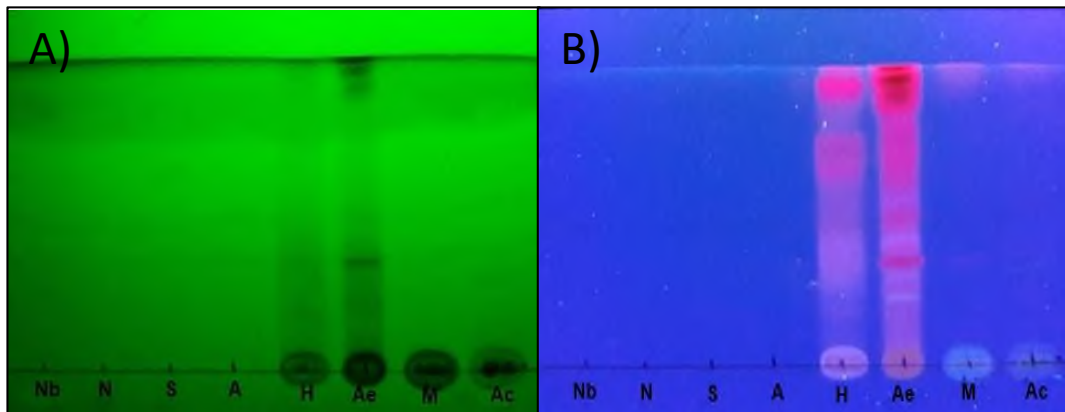


Figura 10. Placa cromatografía de los extractos de *Azadirachta indica* con diferentes reveladores: A) UV 254 nm, b) UV 365 nm

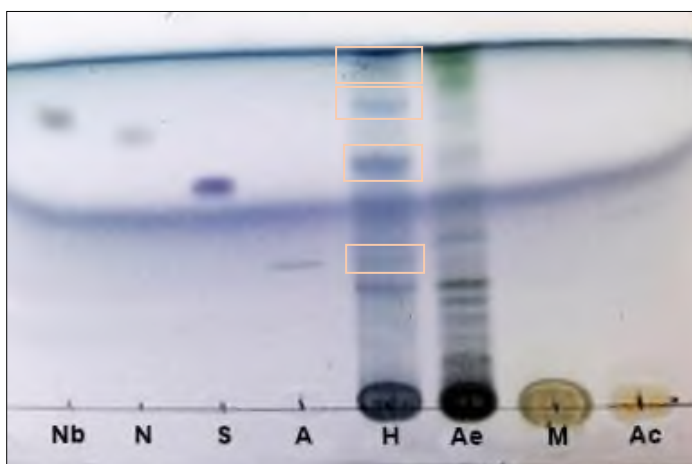


Figura 11. Placa cromatográfica de los extractos de *Azadirachta indica* con el revelador vainillina: metanol: H₂SO₄

Respecto a la Figura 11, los primeros cuatro carriles corresponden a las bandas de los estándares utilizados. En el orden de nimbólido (Nb), nimbina (N), salanina (S) y azadiractina (A), los cuales tienen valores de R_f reportados de: 0.94, 0.84 y 0.54, respectivamente (a excepción de nimbólido) (Babu *et al.*, 2006). Estos compuestos además de las R_f's calculadas fueron identificados por las coloraciones de las bandas detectadas violeta a negro nimbina, azul salanina, verde de azadiractina (Sinha *et al.*, 1999; Babu *et al.*, 2006; Yusuf *et al.*, 2012). Estas coloraciones son típicas de compuestos terpénicos de acuerdo al tipo de revelador usado en este caso, la vainillina.

En el extracto hexano (H) se pueden apreciar distintas bandas siendo cinco las más pronunciadas, en el extracto de acetato de etilo (Ae) fueron apreciadas 8 bandas de gran intensidad, mientras que en el extracto metanol (M) y acuoso (A) no hubo presencia de bandas.

Respecto a las comparaciones con los estándares son de interés las encontradas en el extracto hexano ya que fue el extracto activo para la actividad biológica objetivo. En el extracto hexano puede apreciarse bandas similares a los estándares de AZA con R_f de 0.54, una banda a la misma altura que salanina, con R_f de 0.83 y una banda con R_f de 0.94 semejante al estándar de nimbina.

7.3.5. Análisis por HPLC de los extractos

El análisis por HPLC nos permitió visualizar tanto los estándares de compuestos, como las bandas de cada extracto. En la Figura 12 pueden apreciarse los cromatogramas de los compuestos de

referencia, en los tiempos de retención de 12.6, 14.9, 15.5, y 15.9 min de azadiractina 1), salanina 2), nimbina 3), y nimbólido 4), respectivamente.

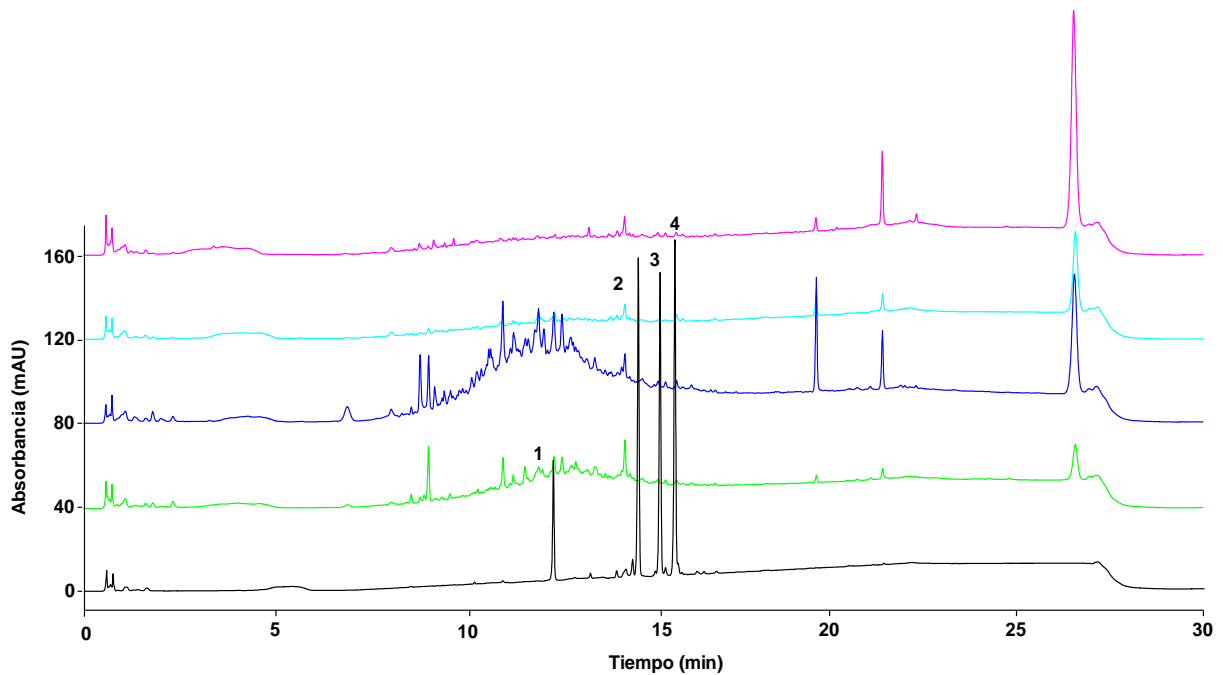


Figura 12. Cromatograma de estándares y extractos de *Azadirachta indica*. 1) azadiractina, 2) salanina, 3) nimbina, 4) nimbólido; EH: Verde, EAe: azul, M: Azul claro, Ac: Rosa

En comparación con los cromatogramas de los extractos de *A. indica*, se puede observar pequeños picos en los extractos que corresponden a los compuestos de referencia azadiractina 1) y nimbina 2), principalmente en el extracto hexano y acetato de etilo. Sin embargo, estos están por debajo del límite de detección para ser cuantificables.

7.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

7.4.1. Efecto antiinflamatorio de los extractos de *Azadirachta indica*

En la Tabla 11 se detallan los resultados obtenidos por la aplicación cutánea de los extractos de *A. indica* a una dosis de 1.6 mg/oreja, también se muestran las dosis correspondientes suministradas para cada tratamiento, los porcentajes de inhibición, así como el peso promedio del edema producido. Un promedio menor en el peso del edema significa que hubo un mayor porcentaje de inhibición inflamatoria en comparación con el control (TPA).

Tabla 11. Actividad antiinflamatoria de extractos de *Azadirachta indica in vitro*, en el modelo de edema de oreja de ratón.

Tratamiento	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	Inhibición del edema (%)
TPA	2.5 µg	7.2 ± 0.735	NA
Dm	1.0	3.64 ± 0.499***	49.44
EH	1.6	1.3 ± 0.200***	81.94
EAEt	1.6	5.2 ± 1.068	27.77
EM	1.6	7 ± 0.837	2.77
EAc	1.6	3.4 ± 0.812***	52.77

Los valores se expresan como medias ± ESM (n=5). Los porcentajes de inflamación fueron analizados con Dunnet $p < 0.05$ en comparación con el grupo TPA, ***mejor tratamiento

TPA: 12-O-Tetradecanoil-Forbol-13-Acetato; Dm: Dexametasona; EH: Extracto Hexano; EAEt: Extracto Acetato de etilo; EM: Extracto Metanol; EAc: Extracto Acuoso; NA: No Aplica

La aplicación tópica de TPA mostró un marcado incremento en el espesor de la oreja, si se compara el peso del TPA (7.2 ± 0.735 mg) respecto al de los tratamientos. Los extractos hexano y acuoso inhibieron significativamente la formación del edema ($p < 0.05$), siendo el extracto hexano el que obtuvo mejores porcentajes de inhibición (81.94%), seguido por el extracto acuoso (52.77%), que fue similar al porcentaje del fármaco de referencia (49.44 %).

Respecto al extracto hexano, este presentó 1.6 veces una mayor inhibición en comparación con la dexametasona y 1.5 veces mayor en comparación con el extracto acuoso. Los extractos de acetato de etilo (27.7%) y metanólico (2.7%) no tuvieron una inhibición significativa, mismo que se puede correlacionar con el peso de los edemas producidos, ya que mostraron pesos semejantes al peso de edema del control negativo.

Debido a la mayor actividad antiinflamatoria del extracto hexano, se realizó un estudio de dosis respuesta con diferentes concentraciones del extracto, para conocer si existe una dosis dependiente. Como resultado de este experimento en la Tabla 12 se muestran los porcentajes de inhibición de la inflamación y se calculó la dosis a la cual se reduce el 50 % de la inflamación (DE_{50}) por medio de la curva dosis respuesta (Anexo IV), la cual fue de 65.5 mg, observando que existe un efecto dosis dependiente del extracto.

Tabla 12. Dosis respuesta del extracto activo.

Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	Inhibición del edema (%)
0.05	6.6 ±0.4	8.33
0.4	6.4 ±0.5	11.11
0.8	5.4 ±0.87	25
1.6	1.3 ± 0.20	81.94

Los valores se expresan como medias ± ESM (n=5).

Estudios previos han reportado el efecto antiinflamatorio de extractos silvestres de *A. indica*. Extractos acuosos, etanólicos y metanólicos fueron ensayados en modelos inflamatorios *in vivo* en ratones a diferentes dosis, 400 mg/kg (Mosaddek y Rashid, 2008), 200 mg/kg (Sonika *et al.*, 2010), mostrando un efecto antiinflamatorio significativo.

Además existen estudios donde comprueban un efecto dosis dependiente, como lo reportado por Kumar *et al.*, (2013) en la evaluación del extracto de hojas de *A. indica* en el modelo de edema de pata en ratas Albinas, a dosis de 62.5, 125 mg, 250 mg, 500 mg/kg, los cuales mostraron un porcentaje de inhibición del edema de 2.7%, 26%, 52.32% y 63.01% respectivamente.

Dinda *et al.*, (2013) evaluaron el extracto hidro-alcohólico y fracciones de acetato de etilo y n-butanol a dosis de 100 mg/kg, en el modelo de edema de pata en ratas Albinas, encontrando porcentajes de inhibición de 37.6, 43.16 y 49.92 % respectivamente, mientras que la indometacina mostró 62.5 % de inhibición.

Comparando los extractos *in vitro* respecto a los de la planta silvestre de *A. indica*, los extractos *in vitro* (hexano y acuoso) resultaron activos, mostrando efecto similar a los extractos acuosos y metanólicos de la planta silvestre, con un porcentaje de inhibición incluso más alto del extracto hexano y a una dosis menor (80 mg/ml). Por otra parte, el extracto acuoso muestra un porcentaje de inhibición similar a los reportados pero a una dosis menor.

Cabe destacar que los modelos de inflamación seguidos son diferentes, lo que justificaría las dosis de los extractos utilizados y los diferentes resultados en los porcentajes de inhibición inflamatoria obtenidos. La presencia de la actividad se debe a los grupos de compuestos encontrados en los extractos, lo cual indica que la planta en cultivo *in vitro* acumula una producción de compuestos similar a la planta silvestre.

También existen estudios donde evalúan el potencial antiinflamatorio específicamente de nimbidina, además de diferentes extractos silvestres de *A. indica* que tienen efecto en la inhibición de células, mediadores inflamatorios y enzimas que están involucrados en la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, Pillai y Shanthakumari, (1981) evaluaron el efecto de nimbidina, un compuesto crudo de extracto de *A. indica* a una dosis de 80 mg/kg y mostró un efecto antiinflamatorio significativo, similar al de la prednisolona (10 mg/kg), también se encontró efectiva en modelos de inflamación aguda, subaguda y crónica. Kaur, (2004), también evaluó la nimbidina a dosis de 5-25 mg/kg, mostrando una inhibición significativa en la supresión de la función de macrófagos y neutrófilos mediante análisis *in vivo* e *in vitro* de la respuesta inflamatoria.

Umar *et al.*, (2014) evaluaron el extracto clorofórmico de hojas a una dosis de 500 mg/kg el cual tuvo efecto inhibitorio en la formación de granulomas y en la inhibición de la formación de IL-1 y TNF- α , mostrando un efecto dosis respuesta, también presentaron inhibición significativa de las enzimas COX-1 y COX-2.

Con respecto al modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA, este es relacionado con la liberación de histamina, serotonina e involucra la activación del metabolismo del ácido araquidónico, en especial las PGs (Young *et al.*, 1989; Parra-Delgado *et al.*, 2004). El efecto inhibitorio de extracto hexano puede ser debido a la presencia de compuestos activos que bloquean alguna de estas rutas inflamatorias, inhibiendo a las enzimas fosfolipasa y a ciclooxigenasas (Alzohairy, 2016).

Respecto al extracto hexánico quien fue mayoritariamente activo, se asume que los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria son los limonoides, entre ellos salanina y nimbina (nimbina es un compuesto cercanamente relacionada a nimbidina y otros) (Pillai y Santhakumari, 1981; Biswas *et al.*, 2002; Sidhu *et al.*, 2004) por lo que pueden tener actividad sinérgica, debido a que en el ensayo cualitativo por CCF el extracto hexánico mostró la presencia de bandas similares a estos compuestos. El extracto hexánico no mostró grandes cantidades de compuestos fenólicos y flavonoides por lo que la actividad antiinflamatoria no se le puede atribuir a este tipo de metabolitos secundarios. Al contrario del extracto acuoso que si pudieran ser los responsables.

7.5. Inhibición de la enzima lipoxigenasa

Como un estudio complementario en un modelo *in vitro* para elucidar el posible mecanismo de acción de los extractos activos de *A. indica*, se realizó el ensayo de inhibición de la enzima LOX. Para este ensayo los extractos se utilizaron a una única concentración de 50 µg, solo para evidenciar si los extractos presentan o no actividad inhibitoria.

Los resultados del ensayo de inhibición de la enzima se muestran en porcentajes de inhibición de los extractos (%) (Figura 13). Encontrándose que el extracto que presentó mayor actividad antiinflamatoria, fue el extracto acuoso con un 29.0 %, comparado con la quercetina que fue de 26.4 % de inhibición.

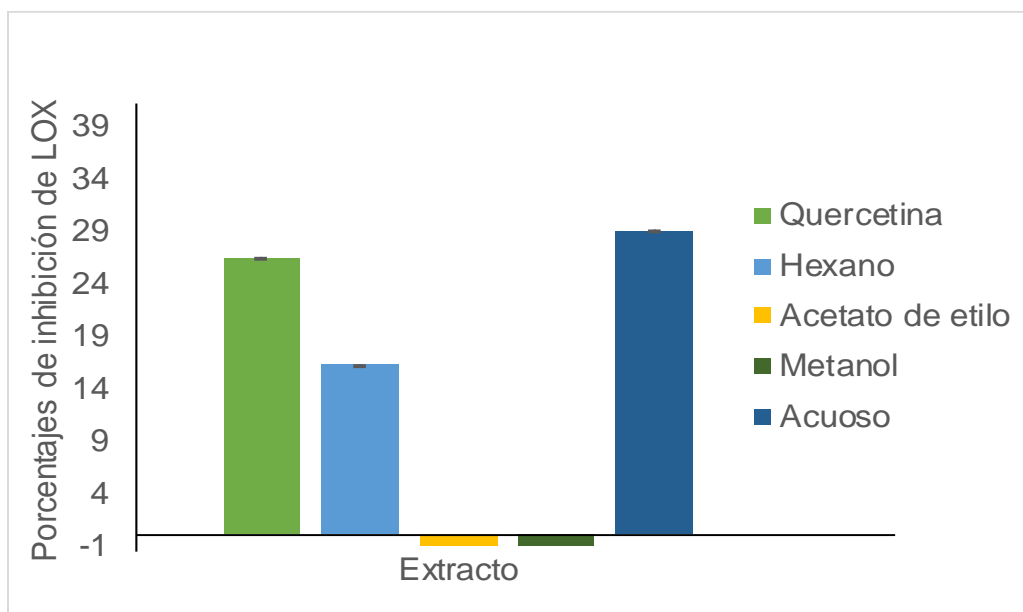


Figura 13. Porcentajes de inhibición de la enzima LOX

De acuerdo a la literatura, la quercetina es uno de los flavonoides más potentes inhibidores de LOX. Los flavonoides en general, pueden contribuir a la inhibición de esta enzima, así como en la captación de los radicales libres (Sadik *et al.*, 2002).

No existen reportes respecto a extractos de *A. indica* en la inhibición de esta enzima, pero con el hecho de que el extracto hexánico mostró un porcentaje alto de inhibición de la inflamación el modelo agudo *in vivo* y no mostró inhibición de la enzima, sugiere que los compuestos terpénicos presentes en él tienen un posible mecanismo de acción diferente, sin embargo, el extracto acuso además de presentar actividad inhibitoria de la LOX, también presentó actividad antiinflamatoria *in vivo*, lo que lleva a pensar que los compuestos presentes en este extracto si tienen la capacidad para inhibir a esta enzima.

Comparando la producción de flavonoides de los extractos de acetato de etilo y hexano, quienes tuvieron la mayor producción de estos metabolitos, no tuvieron actividad en la inhibición de la enzima, probablemente debido a la presencia de compuestos terpénicos, lo que sugiere que pueda existir un efecto antagónico.

Algunos inhibidores naturales de LOX incluyen alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos que tienen efecto sobre el metabolismo del AA en la vía de la LOX (Tomy *et al.*, 2014). Extractos de plantas silvestres de diferentes familias tienen la capacidad de inhibir a la LOX debido a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides como quercetina, luteolina, apigenina, entre otros, específicamente en la inhibición de la isomorfa 5-LOX (Schneider y Bucar, 2005; Sacan *et al.*, 2014). Extractos etanólicos de hojas de *Terminalia chebula* tienen un alto porcentaje de inhibición de LOX (52.67%), que lo correlacionan con la alta concentración de fenoles y flavonoides (Eshwarappa *et al.*, 2016).

Nabilah *et al.*, (2017) mencionan que los flavonoides inhiben el proceso inflamatorio al inhibir la liberación del AA, así como las secreciones enzimáticas de la membrana lisosomal de neutrófilos y células endoteliales para bloquear las vías de LOX y COX, lo cual reduce los niveles de PGs y LTs.

8. CONCLUSIONES

Los extractos hexánico y acuoso de las plántulas de *Azadirachta indica in vitro* presentaron efecto antiinflamatorio al igual que los extractos de hojas silvestres reportados.

Se encontró que la dosis efectiva 50 (DE₅₀) del extracto hexánico fue de 65.5 mg/kg de peso.

Los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria posiblemente son salanina y nimbina u otros compuestos limonoides relacionados, que pueden tener una actividad sinérgica en la actividad biológica.

El extracto acuoso presenta inhibición de la enzima lipoxigenasa a una dosis de 50 µg/ml, sin embargo, el extracto hexano aunque presenta actividad antiinflamatoria no tiene la capacidad de inhibir a la misma.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar el monitoreo de las condiciones óptimas para la realización del ensayo con la enzima lipoxigenasa
- Realizar ensayo de inhibición enzimática de la enzima ciclooxigenasa
- Realizar el ensayo de la dosis respuesta de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Azadirachta indica in vitro*

10. REFERENCIAS

- Abdulkadir, A., Mat, N., & Jahan, M. (2017). *In-vitro* Antioxidant Potential in Leaf, Stem and Bark of *Azadirachta indica*. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 40 (4), 497- 506.
- Aguilar, J., Rojas, P., Marcelo, A., Plaza, A., Bauer, R., Reininger, E., & Klaas, C. (2002). Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 81(2), 271- 276.
- Al-Jadidi, H., & Hossai, M. (2015). Studies on total phenolics, total flavonoids and antimicrobial activity from the leaves crude extracts of Neem traditionally used for the treatment of cough and nausea. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 4(2), 93-98.
- Alzohairy, M. (2016). Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.
- Antman, E., DeMets, D., & Loscalzo, J. (2005). Cyclooxygenase Inhibition and Cardiovascular Risk. *Circulation* 112(5), 759-770.
- Arciniegas, A., Pérez-Castorena, A., Nieto-Camacho, A., & Romo de Vivar, A. (2017). Anti-hyperglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities of extracts and metabolites from *Sida acuta* and *Sida rhombifolia*. *Quimica Nova* 40(2), 176-181.
- Arias Zabala, M., Angarita Velásquez, M., Aguirre Cardona, A., & Restrepo Flórez, J. (2009). Estrategias Para Incrementar la Produccion de Metabolitos Secundarios. *Revista Facultad Nalciona de Agronomía de Medellín* 62(1), 4881- 4895.
- Atawodi, S. E., & Atawodi, J. C. (2009). *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. *Phytochemistry Reviews* 8(3), 601- 620.
- Ávalos García, A., & Pérez Urria, E. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal* 2(3), 119-145.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de Oxidacion y Oscurecimiento de Explantes Cultivados *In vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1), 153-175.
- Babu, V., Narasimhan, S., & Nair, G. (2006). Bioproduction of azadirachtin-A, nimbin and salannin in callus and cell suspension cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Current Science* 91(1), 22- 24.
- Bag, A., Bhattacharyya, S., Pal, N., & Chattopadhyay, R. (2013). Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. *Pharmaceutical Biology* 51(12), 1515-20.
- Barnes, P. (2006). How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture. *British Journal of Pharmacology* 148, 245- 254.

- Barnes, P. (2016). Glucocorticosteroids. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 1- 23.
- Bedoya Pérez , J. C., & Hoyos , R. A. (2010). Efecto de la Relación Agitación-Aireación sobre el Crecimiento Celular y la Producción de Azadiractina en Cultivos Celulares de *Azadirachta indica* A. Juss. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 63(1), 5293- 5305.
- Beg, S., Swain, S., Hasan, H., Barkat, M., & Hussain, M. (2011). Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. *Pharmacognosy Reviews* 5(10), 120-137.
- Bisht, R., Bhattacharya, S., & Jaliwala, Y. (2014). COX and LOX inhibitory potential of *Abroma augusta* and *Desmodium gangeticum*. *The Journal of Phytopharmacology* 3(3), 168-175.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R., & Bandyopadhyay, U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science* 82(11), 1336- 1345.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56(11), 317-333.
- Cartaya , O., & Reynaldo, I. (2001). Fllavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales* 22(2), 5-14.
- Champagne, D., Koul, O., & Isman, M. (1992). Biological Activity Of Limonoids From The Rutales . *Phytochemistry* 31(2), 377- 394.
- Chebil , L., Humeau, C., Anthoni, J., Dehez, F., & Engasser, J.-M. (2007). Solubility of Flavonoids in Organic Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data* 52, 1552- 1556.
- Córdova Martínez, A. (2006). Los glucocorticoides y el rendimiento deportivo. *Revista Clínica Española* 206(8), 382-384.
- Dai, J., Yaylayan, V., Raghavan, G., & Pare, J. (1999). Extraction and Colorimetric Determination of Azadirachtin-Related Limonoids in Neem Seed Kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3738- 3742.
- DeRuiter, J. (2002). Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDS). *Principles of Drug Action* 2, 1-10.
- Desjardins, Y., Dubuc , J., & Badr, A. (2009). *In Vitro* Culture of Plants: a Stressful Activity! *Acta Horticulturae-International Society for Horticultural Science* 812, 29-42.
- Dewanto, V., Wu , X., & Kafui K. Adom. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3010- 3014.
- Dinarello, C. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future 140(6). *Cell*, 935- 950.
- Dinda, A., Das, D., Ghosh, G., & Kumar, S. (2013). Analgesic and Anti-inflammatory Activity of Various Fractions of *Azadirachta indica* Leaf in Experimental Animals. *International Journal of PharmTech Research* 5(2), 838- 843.

- Dubhashi, S., Pranay, V., Singaiah, M., & Satwik, J. (2013). Studies on extraction and HPLC Analysis of Azadirachtin from Kernels of Neem Seeds. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 3(1), 27- 30.
- Edrees, H., Elbehiry, A., & Yousif , M. (2017). Hypoglycemic and Anti-Inflammatory Effect of Gold Nanoparticles in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes in Experimental Rats. *International Journal of Diabetes Research* 6(1), 16- 23.
- Edwards, I., & Aronson , J. (2000). Adverse Drug Reactions: Definitions, Diagnosis, and Management. *The Lancet* 356, 55- 59.
- Eeswara, J., Stuchbury , T., Allan, E., & Mordue, A. (1998). A standard procedure for the micropropagation of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). *Plant Cell Reports* 17(3), 215- 219.
- Eshwarappa, R., Ramachandra , Y., Subaramaihha, S., Subbaiah, S., Austin , R., & Dhananjaya, B. (2016). Anti-Lipoxygenase activity of leaf gall extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy Research*, 78- 82.
- Feghali, C., & Wright, T. (1997). Cytokines In Acute and Chronic Inflammation. *Frontiers in Bioscience* 2, 12- 26.
- Fokunang , C., Fokunang , E., Frederick , K., & Ngameni , B. (2018). Overview of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Resource Limited Countries. *MOJ Toxicol* 4(1), 5-14.
- Funk, J., Frye, J., Oyarzo, J., Chen, J., Zhang, H., & Timmermann, B. (2016). Anti-Inflammatory Effects of the Essential Oils of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in Experimental Rheumatoid Arthritis. *Pharma Nutrition* 4(3), 123- 131.
- Garrido, G., Ortiz, M., & Pozo, P. (2013). Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 1(1), 30- 38.
- Gautam , R., & Jachak, S. (2009). Recent Developments in Anti-Infammatory Natural Products. *Medicinal Research Reviews* 29(5), 767- 820.
- Gautam, V., Nanda , K., & Gupt, S. (1993). Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss.- a medicinal tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34, 13-18.
- Ghimeray, A., Jin, C.-W., Ghimire, B., & Cho, D. (2009). Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A. Juss grown in foothills of Nepal. *African Journal of Biotechnology* 8(13), 3084- 3091.
- Gómez Estrada, H., González Ruiz, K., & Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10(3), 182- 217.
- Grivennikov, S., Greten, F., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer 140(6). *Cell*, 883- 899.

- Gupta, S., Prasad, S., Tyagi, A., & Kunnumakkara, A. (2017). Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytomedicine* 34, 14- 20.
- Hadi, A., Hossein, N., Shirin, P., Najmeh, N., & Abolfaz, M. (2014). Anti-inflammatory and Analgesic Activities of *Artemisia absinthium* and Chemical Composition of its Essential Oil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 24(2), 237- 244.
- Haritha Yadav, K., & Venkata Rao, Y. (2012). Evaluation of Topical Antiinflammatory Effect of *Azadirachta indica* leaf extract. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Int* 2(5), 60-64.
- Hotamisligil, G. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860- 867.
- Hunter, L., Wood, D., & Dargan, P. (2011). The patterns of toxicity and management of acute nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) overdose. *Open Access Emergency Medicine* 3, 39- 48.
- Illuri, R., Bethapudi, B., & Anandakumar, S. (2015). Anti-Inflammatory Activity of Polysaccharide Fraction of *Curcuma longa* Extract (NR-INF-02). *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 14, 53-62.
- Irondi, A., Oboh, G., & Akintunde, J. (2012). Comparative and Sinergistic Antioxidant Properties of *Carica papaya* and *Azadirachta indica* Leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review* 3(12), 4773- 4779.
- Iwalewa, E., McGaw, L., Naidoo, V., & Eloff, J. (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology* 6(25), 2868- 2885.
- Jagannathan, R., Venkatraman, K., & Vasuki, R. (2015). A Reviw on Neem Derivatives and Their Agricultural Applications. *International Journal Of Pharmacy & Technology* 6(3), 3010-3016.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal Herbmed Pharmacology*, 1- 7.
- Jarvis, A., Morgan, E., & Edwards, C. (1999). Rapid Separation of Triterpenoids from Neem Seed Extracts. *Phytochemical Analisis* 10, 39- 43.
- Jokic, S., Velić, D., Bilić, M., & Bucić-Kojić, A. (2010). Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Czech Journal of Food Sciences* 28(3), 206-212.
- Kanagasanthosh, K., Shanmugapriyan, S., & Kavira, V. (2015). Evaluation of Acute Toxicity, Anti-inflammatory activity and Phytochemical Screeming of Ethanolic Extract of *Azadirachta indica* Leaves. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences* 4(5), 1737- 1742.

- Kaur, G., Alam, M., & Athar, M. (2004). Nimbidin Suppresses Functions of Macrophages and Neutrophils: Relevance to its Antiinflammatory Mechanisms. *Phytotherapy Research* 18, 419- 424.
- Kaushik, N., Singh, B., Tomar, U., & Naik, S. (2007). Regional and habitat variability in azadirachtin content of Indian neem (*Azadirachta indica* A. Jusieu). *Current Science* 92(10), 1400-1406.
- Kieran, P., Loughlin, M., & Malone, D. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnonology* 59(1-2), 39- 52.
- Kim, D., Lee, S., Woo, H., Park, J.-Y., & Ko, B. (2016). Chemical constituents and anti-inflammatory activity of the aerial parts of *Curcuma longa*. *Journal of Functional Foods* 26, 485- 493.
- Kim, J., Yi, Y.-S., Kim, M.-Y., & Cho, J. (2017). Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. *Journal of Ginseng Research* 41, 435- 443.
- Kiranmai, M., Usha Sri, B., Mohammed, I., & Mahendra Kumar, C. (2012). Antioxidant activity and total flavonoids content of different parts of *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(46), 5737- 5742.
- Ksiksi, T., & Hamza, A. A. (2012). Antioxidant, Lipoxigenase and Histone Deacetylase Inhibitory Activities of *Acridocarpus orientalis* From Al Ain and Oman. *Molecules* 17, 12522-12532.
- Kumar Shakya, A. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine* 4(4), 59- 64.
- Kumar Venugopalan, S., & Navaratnam, V. (2013). Neem (*Azadirachta indica*): Prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(7), 505- 514.
- Kumar, J., & Parmar, B. (1997). Neem oil content and its key chemical constituents in relation to the agro-ecological factors and regions of India. *Pesticide Research*, 216- 225.
- Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. *Elsevier*, 131-138.
- Kumar, S., Kumar Vandana, U., Agrawal, D., & Han, J. (2013). Analgesic, Anti-inflammatory and Anti-Pyretic Effects of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf Extract in Albino Rats. *International Journal of Science and Research* 4(8), 713- 721.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., & Jon, C. (2010). *Patología estructural y funcional 8° edición*. España: Elsevier.
- Kumari, R., Meyyappan, A., Selvamani, P., Mukherjee, J., & Jaisankar, P. (2011). Lipoxigenase inhibitory activity of crude bark extracts and isolated compounds from *Commiphora berryi*. *Journal of Ethnopharmacology* 138, 256- 259.
- Libby, P. (2007). Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews* 65(12), S140- S146.

- Libby, P., Ridker, P., & Maseri, A. (2002). Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-1143.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2, 1- 9.
- Lourenço , A., Ferreira , L., & Branco, P. (2012). Molecules of Natural Origin, Semi-synthesis and Synthesis with Anti-Inflammatory and Anticancer Utilities. *Current Pharmaceutical Design* 18, 3979- 4046.
- Lubomirova, V., Atanassova, M., Hristova, V., & Ahmad, M. (2016). Soild-Liquid Extraction Kinetics of Total Phenolic, Total Flavonoid, Rutin and Tannin Contents in 50% Ethanol Extract of *Cotinus coggygia*. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 7(2), 1466-1472.
- Maged, R., Nordin, N., & Abdulla, M. (2013). Anti-inflammatory effects of *Zingiber officinale* roscoe involve suppression of nitric oxide and prostaglandin E2 production. *Zanco Journal of Medical Sciences* 17(1), 349- 356.
- Maione, F., Russo, R., Khan, H., & Mascolo, N. (2015). Medicinal plants with anti-inflammatory activities. *Natural Product Research*, 1- 10.
- Malterud, K., & Rydland, K. (2000). Inhibitors of 15-Lipoxygenase from *Orange Peel*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(11), 5576- 5580.
- Manogaran , S., Sulochana, N., & Kavimani, S. (1998). Anti-Inflamatory and Antimicrobial Activities of the Root, Bark and Leaves of *Azadirachta indica*. *Ancient Science of Life* 18(1), 29-34.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428- 435.
- Melwita, E., & Ju, Y.-H. (2010). Separation of azadirachtin and other limonoids from crude neem oil via solvent precipitation. *Separation and Purification Technology* 74, 219- 224.
- Mendes, R., Stanczyk, C., Sordi, R., Otuki, M., dos Santos, F., & Fernandes, D. (2012). Selective inhibition of cyclooxygenase-2: risks and benefits. *Revista Brasileira de Reumatologia* 52(5), 767- 782.
- Méndez Sánchez, L. (2015). Actividad hipoglucémica de plántulas *in vitro* de *Azadirachta indica*. *Universidad del Papaloapan*, 1- 66.
- Mosaddek, A., & Rashid, M. (2008). A comparative study of the anti-inflammatory effect of aqueous extract of neem leaf and dexamethasone. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 3, 44- 47.
- Musa , E., Badwi , S., Jah Elnabi, M., & Osman , E. (2011). Anti-inflammatory Activity of the Plant *Cannabis sativa* (L) Petroleum Ether Extract in Albino Rats. *Research in Pharmacy* 1(3), 18-25.
- Nabilah, Elya, B., & Djajadisastra, J. (2017). Lipoxygenase Inhibitory Assay of *Averrhoa carambola* L. Leaves Extract. *International Journal of ChemTech Research* 10(1), 342-347.

- Nworu, C., & Akah, P. (2015). Anti-inflammatory Medicinal Plants and the Molecular Mechanisms Underlying their Activities. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine* 12 , 52-61.
- Okpanyi , S., & Ezeukwu, G. (1981). Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of *Azadirachta indica*. *Journal of Medicinal Plant Research* 41, 34- 39.
- Osarumwense, P. (2017). Anti-inflammatory Activity of Methanoilc and Ethanolic Extracts of *Citrus sinensis* peel (L) Osbeck on Carrageenan induced Paw Oedema in Wistar rats. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 21(6), 1223- 1225.
- Pandreka, A., Dandekar, D., Haldar, S., Uttara, V., Vijayshree, S., & Mulani, F. (2015). Triterpenoid profiling and functional characterization of the initial genes involved in isoprenoid biosynthesis in neem (*Azadirachta indica*). *BMC Plant Biology* 15, 1- 15.
- Pankaj, S., Lokeshwar, T., Mukesh, B., & Vishnu, B. (2011). Review on neem (*Azadirachta indica*) thousand problems one solution. *International Research Journal of Pharmacy* 2(12), 97-102.
- Parra-Delgado, H., García Ruiz, G., Nieto Camacho, A., & Martínez-Vázquez, M. (2004). Anti-inflammatory Activity of Some Extracts and Isolates from *Leonotis nepetaefolia* on TPA-induced Edema Model. *Revista de la Sociedad Química de México* 48(4), 293- 295.
- Parrotta, J., & Chaturvedi, A. (1994). *Azadirachta indica* A. Juss. *Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station*, 1- 15.
- Paya, M., FerrAndiz, M., Sanz, M., Bustos, G., Blasco, R., Rios, J., & Alcaraz, M. (1993). Study of the Antioedema Activity of some Seaweed and Sponge Extracts from the Mediterranean-Coast in Mice. *Phytotherapy research* 7, 159-162.
- Pérez Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el Cultivo *In vitro*. *Bioteconología Vegetal* 11, 195- 211.
- Pérez Ruiz, A. O., Cartaya Pad, L., Valencia Fernández, V., & Sanjurjo, V. (1998). Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Rev Cubana Estomatol* 35(2), 56-61.
- Pidgeon , G., Lysaght, J., Krishnamoorthy , S., Reynolds, J., O'Byrne , K., Nie, D., & Honn, K. (2007). Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Review* 26, 503- 524.
- Pillai, N., & Santhakumari, G. (1981). Anti-Arthritic and Anti-Inflammatory Actions of Nimbidin. *Journal of Plant medicinal Research* 43, 59- 63.
- Pitchaon, M., Suttajit, M., & Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 100, 1409-1418.

- Prakash, G., Emmanuel, C., & Srivastava, A. (2005). Variability of Azadirachtin in *Azadirachta indica* (nemm) and Batch Kinetics Studies of Cell Suspension Cultures. *Bitechology and Bioprocess Engineering* 10, 198- 204.
- Prasad, S., & Aggarwal, B. (2014). Chronic Diseases Caused by Chronic Inflammation Require Chronic Treatment: Anti-inflammatory Role of Dietary Spices. *Journal Clin Cell Immunol* 5, 2- 11.
- Pushpangadan, P., Ijnu, T., & George, V. (2015). Plant based anti-inflammatory secondary metabolites. *Annals of Phytomedicine* 4(1), 17- 36.
- Rafiq, M., & Dahot, M. (2010). Callus and azadirachtin related limonoids production through in vitro culture of neem (*Azadirachta indica*). *African Journal of Biotechnology* 9(4), 449- 453.
- Rainsford, K. (2007). Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Springer*, 3- 27.
- Ramesh , K., & Padhya, M. (1990). *In vitro* propagation of neem, *Azadirachta indica* A. Juss) from leaf discs. *Indian Journal of Experimental Biology* 28(10), 932- 935.
- Sabina, Y., & Razia , S. (2017). Neem (*Azadirachta Indica*): A Potential Medicinal Plant. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 19788- 19794.
- Sacan, O., & Turhan, E. (2014). Lipoxygenase Inhibitory Activities of Some Plant Extracts and Chemical Compounds. *IUFS Journal of Biology* 73(2), 47-52.
- Sacan, O., & Turhan, E. (2014). Lipoxygenase Inhibitory Activities of Some Plant Extracts and Chemical Compounds. *IUFS Journal of Biology* 73(2), 47-52.
- Sadik, C., Sies, H., & Schewe, T. (2003). Inhibicion of 15-Lipoxygenases by flavonoids: structure activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology* 65, 773-781.
- Salido, M., Abásolo, L., & Bañares, A. (2001). Revisión de los antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 25(2), 46- 52.
- Salvi, N., Singh, H., Tivarekar, S., & Eapen, S. (2001). Plant regeneration from different explants of neem. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65, 159-162.
- Sarkar, R., Roy, R., & Chaudhuri, A. (2015). Anti-inflammatory Effect of *Kalanchoe crenata* Extract in Mice with Experimentally Induced Inflammation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 4(6), 95-102.
- Schneider, I., & Bucar , F. (2005). Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase[*sol*]cyclooxygenase. *Phytother Research* 19(2), 81-102.
- Schumacher , M., Cerella, C., Reuter , S., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Anti-inflammatory, pro-apoptotic, and anti-proliferative effects of a methanolic neem (*Azadirachta indica*)

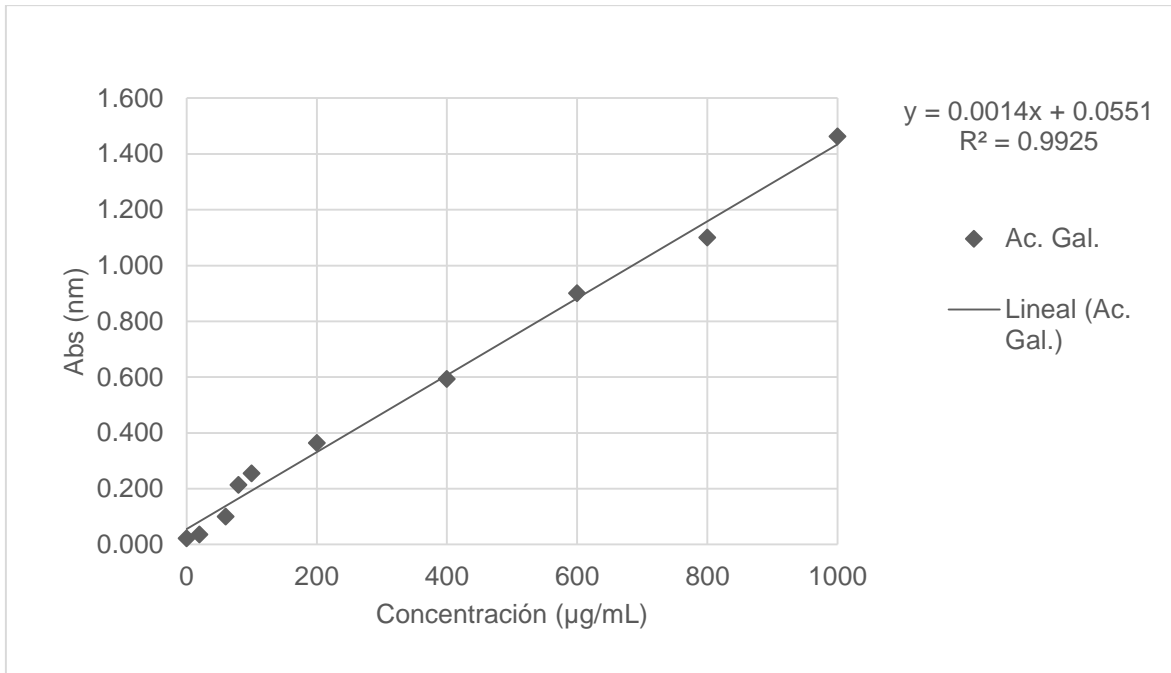
- leaf extract are mediated via modulation of the nuclear factor-kB pathway. *Genes Nutr* 6, 149-160.
- Sen, S., Chakraborty, R., De, B., & Ganesh, T. (2010). Analgesic and Anti-inflammatory Herbs: a Potential Source of Modern Medicine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* (11), 32- 44.
- Serhan, C. (2017). Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *The FASEB Journal* 31(4), 1273- 1288.
- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., & Lu, Z.-H. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* 4(1), 8-14.
- Shewale, S., & Rathod, V. K. (2018). Extraction of total phenolic content from *Azadirachta Indica* or (Neem) leaves: Kinetics study. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 48(4), 312-320.
- Shin, Y.-W., Bae, E.-A., Kim, S.-S., Lee, Y.-C., & Kim, D.-H. (2005). Effect of ginsenoside Rb1 and compound K in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis. *International Immunopharmacology* 5, 1183 - 1191.
- Shiri, R., Koskimäki, J., Häkkinen, T., & Hakama, M. (2006). Effect of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use on the Incidence of Erectile Dysfunction. *The Journal of Urology* 175, 1812-1816.
- Shrikhande, M., Thengane, S., & Mascarenhas, A. (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Azadirachta indica* A. Juss. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 29(1), 38- 42.
- Siddiqui, S. (1942). A note on the isolation on three new bitter principles form the nim oil. *Current Science*, 278- 279.
- Sidhu, O., Kumar, V., & Behl, H. (2004). Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India. *Industrial Crops and Products* 19, 69- 75.
- Singh , A., Malhotra , S., & Subban , R. (2008). Anti-inflammatory and analgesic agents from Indian medicinal plants. *International Journal of Integrative Biology* 3(1), 57- 72.
- Singleton, V., & Orthofer, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *American Journal Enology and Viticulture* 25, 152-178.
- Sinha, S., Murthy, P., Rao, C., Ramaprasad, G., & Kumar , D. (1999). Simple Method for Enrichment of Azadirachtin from Neem Seeds. *Journal of Scientific and Industrial Research* 58, 990-994.
- Sonika, G., Manubala , R., & Deepak, J. (2010). Comparative Studies on Anti- Inflammatory Activity of *Coriandrum Sativum*, *Datura Stramonium* and *Azadirachta Indica*. *Asian Journal Experimental Biological Scienses* 1(1) , 151-154.

- Souza Couto de Lima, T., Marques, G., Vieira, A., & Freitas, J. (2012). State of the Art of Anti-Inflammatory Drugs. *Pharmacotherapy*, 115- 140.
- Stankov, S. (2012). Definition of Inflammation, Causes of Inflammation and Possible Anti-inflammatory Strategies. *The Open Inflammation Journal* 5, 1- 9.
- Stanley , P., Steiner, S., Havens, M., & Tramposch , K. (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacology* 4(4), 262-276.
- Stanojević , L., Stanković, M., Nikolić , V., Nikolić, L., Ristić , D., & Tumbas, V. (2009). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors* 9(7), 5702- 5714.
- Su, W., Hwang, W.-I., Kim, S., & Sagawa, Y. (1997). Induction of somatic embryogenesis in *Azadirachta indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91- 95.
- Subapriya, R., & Nagini, S. (2005). Medicinal Properties of Neem Leaves: A Review. *Current Medicinal Chem* 5, 149-156.
- Sudhir Kumar, P., Mishra, D., Ghosh, G., & Panda, C. (2010). Biological action and medicinal properties of various constituent of *Azadirachta indica* (Meliaceae)" an Overview. *Annals of Biological Research* 1(3), 24- 34.
- Susmitha, S., Vidyamol, K., Ranganayaki , P., & Vijayaragavan, R. (2013). Phytochemical Extraction and Antimicrobial Properties of *Azadirachta indica* (Neem). *Global Journal of Pharmacology* 7(3), 316- 320.
- Tan, Q.-G., & Luo, X.-D. (2011). Meliaceous Limonoids: Chemistry and Biological Activities. *Chemical Reviews* 111(11), 7437- 7522.
- Toledo Yupanqui , C. L. (2014). Inflamacion: Mediadores quimicos. *Revista de Actualización Clínica* 43, 2266- 2270.
- Tomy, M., Sharanya, C., Dileep, K., & Prasanth, S. (2014). Derivatives Form Better Lipoxygenase Inhibitors than Piperine: *In Vitro* and *In Silico* Study. *Chemical Biology & Drug Design*, 1-7.
- Umar, M., Asmawi, M., Sadikun, A., & Ahamed, M. (2014). Multi-constituent synergism is responsible for anti-inflammatory effect of *Azadirachta indica* leaf extract. *Pharmaceutical Biology* 52(11), 1411-1422.
- Vega Robledo, G. (2008). Inflamación. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 51(5), 220- 222.
- Verma, S., & Singh , S. (2006). Current and future status of herbal medicines, *Veterinary World*. *Veterinary World* 1(11), 347- 350.
- Wagner , H., & Blatt, S. (2001). Plant Drug Analysis A Thin-Layer Chromatography Atlas. *Springuer*, 2nd Ed.

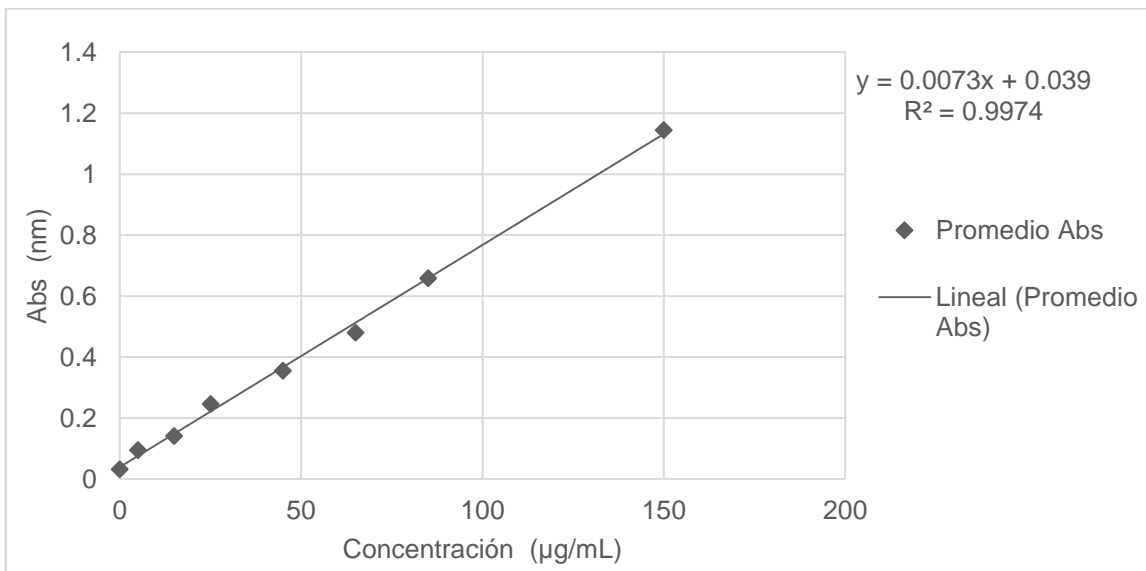
- Werz, O. (2007). Inhibition of 5-Lipoxygenase Product Synthesis by Natural Compounds of Plants Origin. *Plant Medicine* 73(13), 1331- 1357.
- Xie, F., Zhanga, M., & Zhang, C.-F. (2008). Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from *Melia toosendan* fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 463- 466.
- Yang, R., Yuan, B.-C., Yong-Sheng, M., & Zhou, S. (2017). The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. *Pharmaceuticals Biology* 55(1), 5-18.
- Yattoo, M., Gopalakrishnan, A., Saxena, A., Parray, O., Tufani, A., Chakraborty, S., & Tiwari, R. (2018). Anti-Inflammatory Drugs and Herbs with Special Emphasis on Herbal Medicines for Countering Inflammatory Diseases and Disorders - A Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.*, 45-67.
- Young, J., Wagner, B., & Spires, D. (1983). Tachyphylaxis in 12-0-Tetradecanoylphorbol Acetate- and Arachidonic Acid-Induced Ear Edema. *The Journal Investigative Dermatology* 80(1), 48- 52.
- Young, L., Kheifets, J., Ballaron, S., & Young, J. (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions* 26, 335- 341.
- Yuan, H., Ma, Q., Cui, H., Liu, G., Zhao, X., & Li, W. (2017). How Can Synergism of Traditional Medicines Benefit from Network Pharmacology? *Molecules* 22, 2- 9.
- Yusuf, H., Ulfa Mazaya, S., & Risti, A. (2012). Antimalarial Activity of Hexane Extract of Neem Leaves (*Azadirachta indica* A.Juss) on Mice. *International Research Journal of Pharmacy* 2(1), 1-10.

11. ANEXOS

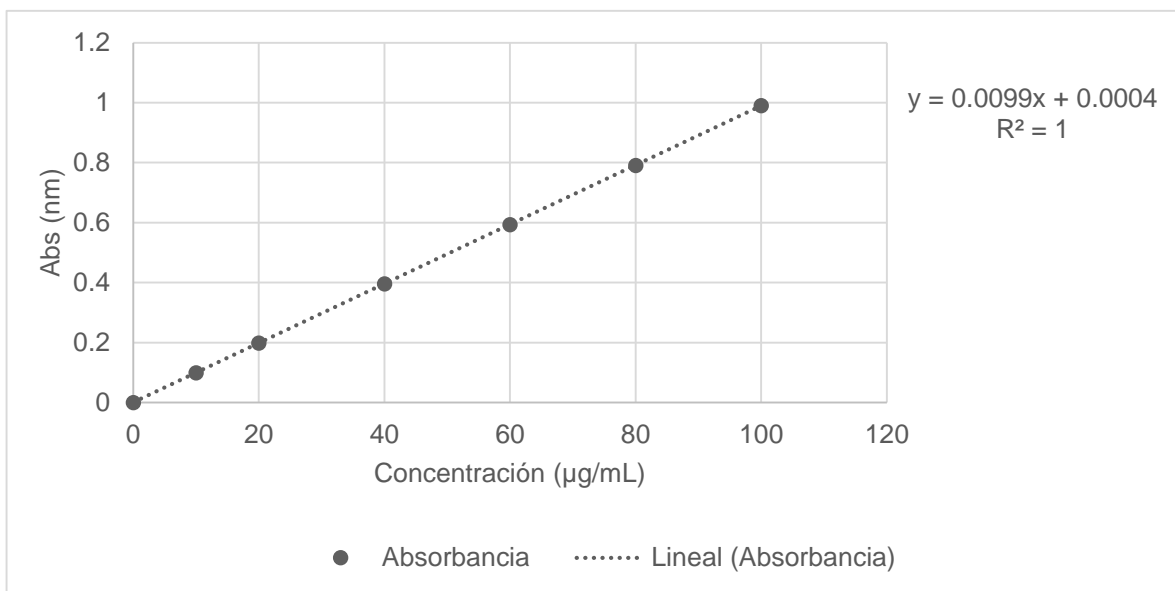
Anexo I. Curva de calibración de Fenoles totales



Anexo II. Curva de calibración de Flavonoides totales



Anexo III. Curva de calibración de limonoides



Anexo IV. Curva Dosis-Respuesta del extracto activo

