

# Actividad antiparasitaria de lipopéptidos producidos por *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Trypanozoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*

Kelly Johana Castillo Cardona<sup>1</sup>, Camila Londoño Barbarán<sup>1</sup>, Valeska Villegas Escobar<sup>2</sup>, and Sara María Robledo Restrepo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudiante Pregrado de Biología. Universidad EAFIT, Medellín-Colombia

<sup>2</sup>PhD en Biotecnología, vvilleg2@eafit.edu.co, Universidad EAFIT, Medellín-Colombia

<sup>3</sup>PhD en Biología Celular y Molecular, sara.robledo@udea.edu.co, Universidad de Antioquia, PECET, Medellín-Colombia

11 de junio de 2020

## Resumen

Tres familias de lipopéptidos fueron aislados de la cepa *B. tequilensis* EA-CB0015 y utilizados para evaluar a nivel *in vitro* su actividad citotóxica sobre macrófagos humanos, su actividad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos (huRBC) y su actividad antiparasitaria contra tres parásitos protozoarios: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Trypanozoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. Se identificó que los lipopéptidos presentan una citotoxicidad moderada o alta y solo las surfactinas ejercen actividad hemolítica. Igualmente, las surfactinas mostraron alta actividad tripanocida, pero una baja selectividad. Las iturinas mostraron actividad leishmanicida y tripanocida, pero un índice de selectividad muy bajo. Finalmente, las fengicinas mostraron actividad tripanocida con un índice de selectividad significativo (IS = 6.95), convirtiéndolo en un compuesto “hit” para continuar estudios que permitan validar su potencial terapéutico.

**Palabras clave** *Bacillus tequilensis*, lipopéptidos, actividad citotóxica, hemolítica, antiprotozoaria

## 1. Introducción

Las enfermedades infecciosas protozoarias son una de las causas más devastadoras de muerte en todo el mundo y afectan principalmente países de medianos y bajos ingresos, donde es común un clima tropical y malas condiciones sanitarias [1-3]. Algunas de las enfermedades más comunes causadas por protozoarios son la malaria, la enfermedad de Chagas y leishmaniasis [4]. La malaria es causada por parásitos del género *Plasmodium*, siendo *Plasmodium falciparum* el causante de la forma más letal y severa de la enfermedad [5], donde un estimado de 228 millones de personas se vieron afectadas por la malaria en el 2018 [6]. La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanozoma cruzi*, el cual es transmitido a través de varias especies de insectos triatominos [7, 8] y, se ha reportado que un estimado de 6 a 7 millones de personas se ven afectadas por esta enfermedad anualmente [9]. La leishmaniasis es causada por 20 especies diferentes de parásitos del género *Leishmania* y es transmitida por dípteros del género *Phlebotomies* [10], de la cual se reportan anualmente de 1 a 3 millones de infecciones [11].

Aunque los avances en salud pública han disminuido el impacto de estas enfermedades, la carga de las infecciones protozoarias se ha visto agravada por la falta de vacunas autorizadas para cualquiera de las enfermedades que estos parásitos causan [1]. Por lo tanto, los tratamientos han dependido de algunos fármacos, muchos de las cuales se han vuelto menos efectivos, presentan múltiples deficiencias, causan diversos efectos secundarios, algunos son altamente tóxicos, en ocasiones requieren un régimen de tratamiento prolongado y, en determinadas áreas endémicas hay indicios de resistencia a algunos de los

medicamentos [1, 2, 12-14]. Por este motivo existe una gran necesidad de desarrollar nuevos medicamentos que sean seguros, eficaces y rentables, especialmente que sean adecuados para los sistemas de salud rurales donde los recursos son limitados [15, 16].

Entre las diversas alternativas que existen para el desarrollo de nuevos medicamentos, se resalta el estudio de diversos compuestos sintetizados por hongos y géneros bacterianos. Dentro de estos compuestos, se resaltan los lipopéptidos, que son pequeños compuestos sintetizados como metabolitos secundarios por hongos, incluidos *Aspergillus*, y varios géneros bacterianos como *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Bacillus* [17, 18]. Están formados por una cadena de ácidos grasos unida a un corto oligopéptido cíclico [19]. Debido a que la longitud y composición de la cadena de ácidos grasos y el número, tipo y configuración de los aminoácidos en el oligopéptido cíclico pueden variar, estos llegan a ser muy diversos tanto estructuralmente como en términos de su actividad biológica [20]. Estos presentan actividades antibacterianas [21, 22], antifúngicas [20, 23-25], antivirales [26, 27] y antitumorales [28-30].

Los lipopéptidos producidos por *Bacillus* son los más ampliamente estudiados y se pueden dividir en tres familias de acuerdo con la estructura de los péptidos cíclicos: surfactinas, fengicinas e iturinas [17, 18]. Para cada familia se ha reportado una variedad de funciones relacionadas con su capacidad de asociarse e interferir las membranas biológicas. La familia de surfactinas son los biosurfactantes más potentes conocidos hasta ahora y se distinguen por sus actividades emulsionantes, hemolíticas, antivirales, antimicoplasmáticas y antibacterianas [31]. Además, Chakrabarty et al. (2008) reportaron que también presenta actividad antiparasitaria al ser un potente inhibidor del crecimiento intraeritrocítico de *P. falciparum* a nivel *in vitro* [32]. Los miembros de la familia iturinas muestran una fuerte acción hemolítica y antifúngica a nivel *in vitro*, basado en sus propiedades de perturbación osmótica, ocasionadas por la formación de poros conductores de iones [33]. Las fengicinas son menos hemolíticas que las iturinas y las surfactinas, pero retienen una fuerte actividad fungitóxica, debido a que alteran la estructura de la membrana celular (empaquetamiento) y la permeabilidad [34].

Teniendo conocimiento de la amplia gama de actividades que ejercen estas biomoléculas y considerando que, las membranas de los protozoos tienen una composición diferente de lípidos y proteínas en contraste con las membranas de las células huésped, se especula que los lipopéptidos de *Bacillus* pueden ser potenciales agentes antiprotozoarios [35, 36, 37]. Por consiguiente, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar si las tres familias de lipopéptidos producidas por la cepa *B. tequilensis* EA-CB0015 generan un efecto citotóxico en células humanas hospederas y si poseen actividad antiparasitaria contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Trypanozoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Microorganismos y parásitos

La cepa de *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 (GenBank No. KC006063) fue aislada de la filosfera de una planta de banano en Urabá, Colombia, la cual se identificó mediante secuenciación del gen de ADN<sub>r</sub> 16S [38], y fue almacenada a -80 °C en TSB (Caldo Soja Triptona, Merck) con 20 % de glicerol. Antes de cualquier uso experimental, la cepa se activó en TSA (Agar Soja Triptona, Merck) al 0.5 % por 48 h a 30 °C. La cepa de *L. (V) braziliensis* MHOM/CO/88/UA301-EGFP fue aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea atendido por el PECET en 1988, y posteriormente fue transfectada con el gen GFP (proteína verde fluorescente) [39]. Los parásitos se almacenaron a 26 °C en medio de cultivo bifásico compuesto por una fase sólida de medio NNN (Novy-MacNeal-Nicholle) y una fase líquida de PBS (solución tampón de fosfato) y glucosa, pH 6.9. La cepa de *T. cruzi* (Tulahuen DTU VI) transfectada con el gen de  $\beta$ -galactosidasa [40] fue almacenada bajo las mismas condiciones que el cultivo de *L. (V) braziliensis*. La cepa de *P. falciparum* 3D7 (NCBI: txid36329) se almacenó en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) [41] enriquecido con FBS al 3 % y eritrocitos al 1 % a 37 °C en atmósfera 5 % de O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de N<sub>2</sub> [42, 43].

### 2.2. Producción, extracción y purificación de los lipopéptidos producidos por *B. tequilensis* EA-CB0015

La producción, extracción y purificación de lipopéptidos de *B. tequilensis* EA-CB0015 se realizó según la metodología descrita por Villegas-Escobar et al. (2013) [38]. Brevemente, el cultivo de *B. tequilensis* se realizó mediante la adición de un preinóculo de 12 h de cultivo a un Erlenmeyer de 1000 mL con 160 mL de medio DRU [44] y se incubó por 12 h a 30 °C y 140 rpm. Transcurrido este tiempo, se adicionó 8 g de resina amberlita XAD16<sup>®</sup> al cultivo y se incubó por 5 d a las mismas condiciones. La resina fue

decantada y lavada con agua desionizada hasta observar el agua translúcida. Los metabolitos adsorbidos en la resina se eluyeron con 200 mL de MeOH 100 %, posteriormente el solvente se evaporó a presión reducida (-50 psig, 50 °C) hasta obtener un residuo sólido el cual fue almacenado a 4 °C. El residuo sólido se suspendió en 9 mL de agua destilada y se aplicó a una columna de extracción en fase solida (SPE) Bond Elut LRC-C18, 500 mg de Agilent Technologies (EE. UU.). Para realizar el fraccionamiento de la muestra, la columna se enjuagó sucesivamente con 80 mL de agua destilada, 80 mL de MeOH al 20 %, 80 mL de MeOH al 40 %, 80 mL de MeOH al 70 % y finalmente 160 mL de MeOH al 100 %. Las fracciones de interés (MeOH al 70 % y 100 %) se evaporaron a presión reducida (-60 psig, 50 °C para el eluido de MeOH al 70 % y -50 psig, 50 °C para el de MeOH al 100 %), los residuos se pesaron y se disolvieron en metanol al 100 % a una concentración final de 50 mg/mL. Las fracciones SPE del 70 % y 100 % de MeOH, se mezclaron y se purificaron por cromatografía líquida de alta presión en fase inversa (RP-HPLC) utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 250x4.6 mm, Agilent). El sistema de fases móviles consistió en 0.1 % de TFA en agua grado HPLC (solvente A) y 0.1 % de TFA en acetonitrilo (solvente C). Se inyectaron 40 µL de la muestra (50 mg/mL) en la columna y los compuestos se eluyeron mediante un programa de gradiente desarrollado a partir del 30-70 % C en 60 min, 70-100 % C en 15 min y 100 % C en 10 min a un caudal de 1 mL/min y detección UV a 214 y 280 nm. De la muestra inyectada, tres grupos de picos entre los tiempos de retención 14-22 min, 30-50 min y 70-83 min (Figura 1S) fueron recolectados, evaporados al vacío en el speedvac y almacenadas a 4 °C. De la muestra inyectada (SPE del 70 % y 100 % de MeOH), los tres grupos de picos corresponden respectivamente a la familia de lipopéptidos iturinas, fengicinas y surfactinas según lo reportado por Villegas-Escobar et al. (2013) y Mosquera, González-Jaramillo, Orduz y Villegas-Escobar (2014) [38, 44].

## 2.3. Actividad antiprotozoaria

### 2.3.1. Preparación de las soluciones

Antes de la evaluación biológica, los compuestos de surfactinas, fengicinas e iturinas se disolvieron en DMSO al 0.1 % hasta una concentración de 50.000 µg/mL y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

### 2.3.2. Actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los lipopéptidos se evaluó sobre la línea celular de promonocitos humanos U-937 (ATCC CRL-1593.2<sup>TM</sup>) en fase exponencial de crecimiento ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/mL en medio RPMI-1640 enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y 1 % de solución de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL-estreptomina 10.000 µg/mL). En una placa de 96 pozos, se adicionó a cada uno de ellos 100 µL de la suspensión celular y, seguidamente, 100 µL de cada lipopéptido o fármaco estándar como cloroquina (malaria), benznidazol (chagas) y anfotericina B (leishmaniasis) a concentraciones de 50, 12.5, 3.125 y 0.7813 µg/mL. Como control negativo se incluyeron células no expuestas a ninguna sustancia diferente al medio de cultivo. Las células expuestas a los lipopéptidos y a los fármacos estándar se incubaron durante 72 h a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se determinó la viabilidad de las células mediante el micro-método enzimático con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), en el que el bromuro se reduce a un producto púrpura llamado formazán por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Para la reacción, se adicionó 10 µL MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se incubaron los platos a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante 3 h. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 10 µL de una solución de isopropanol al 50 % con SDS al 10 %. Pasados 30 min se midió la producción de formazán en un espectrofotómetro (Varioskan, Thermo) a 570 nm [45]. Cada concentración de los lipopéptidos y los controles se evaluaron por duplicado en dos experimentos independientes. La citotoxicidad se determinó de acuerdo con los porcentajes de viabilidad y mortalidad obtenidos para cada condición experimental (diferentes concentraciones de lipopéptidos, cloroquina, benznidazol, anfotericina B y el medio de cultivo). Los resultados se expresaron como la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50 % de muerte celular. La CL<sub>50</sub> se calculó por el análisis Probit (método paramétrico de regresión lineal que permite el análisis de la relación dosis-respuesta) usando el software Prism GraphPad V8 [46]. Los porcentajes de viabilidad se calcularon mediante la ecuación 1, donde la densidad óptica (D.O) del pozo control corresponde al 100 % de la viabilidad:

$$\%Viabilidad = \frac{D.O \text{ células expuestas a los compuestos}}{D.O \text{ células control}} \times 100 \quad (1)$$

A su vez, el porcentaje de mortalidad corresponde al 100 % - % de viabilidad.

La toxicidad se definió según los valores de CL<sub>50</sub>, utilizando la siguiente escala: citotoxicidad alta cuando

los valores de  $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ , citotoxicidad moderada cuando los valores de  $CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  y  $< 200 \mu\text{g/mL}$  y citotoxicidad baja o potencialmente no tóxico cuando los valores de  $CL_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ .

### 2.3.3. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica se evaluó en glóbulos rojos humanos (huRBC) mediante el método de lisis osmótica descrito por Conceição et al. (2006) [47]. Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de huRBC y se preparó una solución al 2% de hematocrito en medio RPMI-1640. Posteriormente, se expusieron contra diferentes diluciones seriadas de cada familia de lipopéptidos (200, 100, 50, 25, 12.5 y 3.5  $\mu\text{g/mL}$ ), junto con un control de hemólisis (huRBC + agua milliQ) y un control negativo (huRBC + PBS). Después de 6 h de incubación a 37 °C, se determinó la concentración de hemoglobina libre de acuerdo con la densidad óptica (D.O) obtenida a 550 nm en un espectrofotómetro (Varioskan, Thermo) [48]. Este procedimiento se realizó por duplicado en dos experimentos independientes.

### 2.3.4. Actividad leishmanicida

La actividad leishmanicida a nivel in vitro de los lipopéptidos se evaluó sobre amastigotes intracelulares de *L. (V) braziliensis* transfectados con el gen GFP (cepa MHOM/CO/88/UA301-EGFP) [39]. Para este propósito, las células U-937 ajustadas a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/mL en medio RPMI-1640 con 0.1  $\mu\text{g/mL}$  de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), se adicionaron en un plato de 24 pozos y se infectaron con promastigotes en fase estacionaria (sexto día de crecimiento) en una proporción 15 parásitos por célula (15:1). Los platos se incubaron por 3 h a 34 °C con 5% de  $\text{CO}_2$  y luego las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar los parásitos no internalizados. Se añadió 1 mL de nuevo RPMI-1640 enriquecido con 10% de SFB y 1% de solución de antibióticos y las placas se incubaron nuevamente para completar el tiempo de infección. Después de 24 h de infección, el medio RPMI-1640 se reemplazó por medio de cultivo fresco que contenía cada lipopéptido a cuatro diluciones en serie (50, 12.5, 3.125 y 0.7813  $\mu\text{g/mL}$ ) y los platos se incubaron a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 72 h. Luego, las células se desprendieron del fondo del plato con una solución de tripsina/EDTA (250 mg). Las células desprendidas se centrifugaron a 1100 rpm por 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con 1 mL de PBS frío y nuevamente se centrifugaron a 1100 rpm por 10 min a 4 °C. De nuevo se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Las células se analizaron por citometría de flujo (Cytomics FC 500MPL) leyendo a 488 nm (excitante) y 525 nm (emitiendo) sobre un láser de argón y contando 10.000 eventos. Las células infectadas expuestas al fármaco estándar anfotericina B se usaron como control interno de la prueba para actividad leishmanicida (control positivo), mientras que las células infectadas incubadas en ausencia de cualquier lipopéptido o fármaco se usaron como control para la infección (control negativo). Cada concentración de los lipopéptidos, así como cada control se evaluó por duplicado en dos experimentos independientes. La actividad leishmanicida se determinó de acuerdo con el porcentaje de células infectadas y la carga de parásitos obtenida para cada condición experimental por el citómetro. El porcentaje de células infectadas se determinó como el número de eventos positivos por fluorescencia doble (verde para parásitos y rojo para células) usando análisis de diagrama de puntos. Por otro lado, la carga parasitaria se determinó mediante el análisis de la intensidad de fluorescencia media (IFM) [45]. La inhibición de la parasitemia se calculó mediante la ecuación 2, donde el IFM en las células infectadas en el pozo de control corresponde al 100% de la infección:

$$Infección(\%) = \frac{IFM \text{ células infectadas expuestas a los compuestos}}{IFM \text{ células control}} \times 100 \quad (2)$$

Luego, se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula 3:

$$Inhibición(\%) = 100 - Infección(\%) \quad (3)$$

### 2.3.5. Actividad plasmocida

La actividad plasmocida se evaluó sobre cultivos asincrónicos de *P. falciparum* (cepa 3D7) en condiciones estándar como se describe en Trager y Jensen (1976) con algunas modificaciones [42, 43]. Para este propósito, los eritrocitos al 1% en medio RPMI-1640 enriquecido con FBS al 3%, se infectarán con parásitos en una proporción de 0.5 parásitos por célula y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de cuatro diluciones en serie de cada compuesto (50, 12.5, 3.125 y 0.7813  $\mu\text{g/mL}$ ) y se incubaron en platos de 96 pozos por 72 h a 37 °C en atmósfera 5% de  $\text{O}_2$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 90% de  $\text{N}_2$ . Las células infectadas incubadas en ausencia de cualquier compuesto se usaron como control para la infección (control negativo) y las expuestas al

fármaco estándar cloroquinina se utilizaron como control interno de la prueba para actividad plasmocida (control positivo). Después de la incubación, los parásitos se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación de 20 min cada uno. Mientras tanto, se adicionaron 100 mL de reactivo de Malstat y 25 mL de solución de NBT/PES a cada pozo de un segundo plato de 96 pozos. Luego de los ciclos de congelación, los parásitos contenidos en cada uno de los pozos del primer plato se resuspendieron mediante pipeteo y se tomaron 15 mL de cada pozo que se agregaran al pozo equivalente del segundo plato y se incubaron durante 1 h protegidos de la luz. Posteriormente, el efecto antiplasmodial se cuantificará basándose en la emisión color, producto de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa parasitaria (LDHp), monitoreada mediante la determinación de densidad óptica (D.O) a 650 nm. Cada concentración de los lipopéptidos y controles se evaluaron por duplicado en dos experimentos independientes [48]. La actividad plasmocida de cada familia de lipopéptidos evaluado, se determinó según la reducción de la absorbancia. El porcentaje de viabilidad se calculó mediante la ecuación 4:

$$Viabilidad(\%) = \frac{(D.O) \text{ de parásitos expuestos a los compuestos} - (D.O) \text{ del medio de cultivo}}{(D.O) \text{ de parásitos no expuestos a los compuestos} - (D.O) \text{ del medio de cultivo}} \quad (4)$$

Luego, el porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó mediante la fórmula 5:

$$Inhibición(\%) = 100 - Viabilidad(\%) \quad (5)$$

### 2.3.6. Actividad tripanocida

La actividad tripanocida se evaluó sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) transfectados con el gen de  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. Para este propósito, las células U-937 ajustadas a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  células/mL en medio RPMI-1640 enriquecido con FBS al 10% y con 0.1  $\mu\text{g/mL}$  de PMA, se adicionaron a un plato de 96 pozos y se infectaron con epimastigotes (24 h de crecimiento) en una proporción 5 parásitos por célula. Los platos se incubaron por 3 h a 34 °C con 5% de  $\text{CO}_2$  y luego las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar los parásitos no internalizados. Se añadió a cada pozo 1 mL de medio RPMI-1640 enriquecido con 10% de SFB y 1% de solución de antibióticos y los platos se incubaron nuevamente para completar el tiempo infección. Después de 24 h de infección, el medio RPMI-1640 se reemplazó por medio de cultivo fresco que contenía cada lipopéptido a cuatro diluciones en serie (50, 12.5, 3.125 y 0.7813  $\mu\text{g/mL}$ ) y los platos se incubaron a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de 72 h de incubación, el efecto de todos los compuestos sobre la viabilidad de los amastigotes intracelulares se determinó midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa por método calorimétrico. Para el ensayo, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de CPRG (clorofenil rojo  $\beta$ -D-galactopiranosido) a una concentración 100  $\mu\text{M}$  y nonidet P-40 al 0,1%, después se incubó por 3 h y se realizó la medición de la densidad óptica (D.O) a 570 nm. Cada concentración de los lipopéptidos, así como cada control de células se evaluaron por duplicado en dos experimentos independientes. Las células infectadas expuestas al fármaco estándar benznidazol se usaron como control interno de prueba para la actividad tripanocida (control positivo) mientras que las células infectadas incubadas en ausencia de cualquier compuesto o fármaco se usaron como control para la infección (control negativo) [48]. Para la actividad tripanocida, el porcentaje de infección e inhibición de la infección se calcularon mediante la ecuación 6 y formula 5:

$$Infección(\%) = \frac{D.O \text{ células infectadas expuestas a los compuestos}}{D.O \text{ células infectadas no expuestas a los compuestos}} \times 100 \quad (6)$$

### 2.3.7. Determinación de los valores de $\text{CE}_{50}$ e IS

Los resultados de la actividad antiparasitaria (leishmanicida, plasmocida y tripanocida) se expresaron como la concentración efectiva 50 ( $\text{CE}_{50}$ ), que corresponde a la concentración efectiva de compuesto que disminuye el 50% del crecimiento del parásito. La  $\text{CE}_{50}$  se calculó por el análisis Probit usando el software Prism GraphPad V8 [46]. La actividad de cada lipopéptido se estableció de acuerdo con los valores de  $\text{CE}_{50}$ , utilizando la siguiente escala: actividad alta cuando los valores de  $\text{CE}_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$ , actividad moderada cuando los valores de  $\text{CE}_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$  y  $< 50 \mu\text{g/mL}$  y actividad baja o potencialmente no activo cuando los valores de  $\text{CE}_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ . La citotoxicidad y la actividad antiparasitaria se correlacionaron para calcular el índice de selectividad (IS), con la fórmula:  $\text{CL}_{50}/\text{CE}_{50}$ . Se considera un IS adecuado cuando es  $> 1$ . Sin embargo, entre mayor sea la relación, la actividad será más selectiva o específica con relación a la citotoxicidad [49].

### 3. Resultados

#### 3.1. Las familias de lipopéptidos difieren en su capacidad hemolítica y poseen citotoxicidad moderada o alta frente a macrófagos humano

La actividad hemolítica evaluada en los extractos fue evidenciada como la cantidad de hemoglobina libre en contenido y expresada en términos de viabilidad celular. Como se observa en la Tabla 1, las iturinas y fengicinas resultan ser compuestos no hemolíticos para glóbulos rojos humanos, dado que presentan valores altos en las concentraciones necesarias para causar una muerte celular mayor al 50 % ( $CL_{50}$ ). En contraste, las surfactinas muestran una alta capacidad hemolítica, lo cual sugiere que estos compuestos anfífilicos permean la membrana celular y generan una lisis celular no selectiva [50].

Tabla 1: Actividad hemolítica *in vitro* para cada familia de lipopéptidos.

Compuesto	$CL_{50}(\mu\text{g/mL})^a$		Interpretación
	X	DS <sup>b</sup>	
Iturinas	>200	N/A	No hemolítico
Fengicinas	>200	N/A	No hemolítico
Surfactinas	100	3.5	Hemolítico

<sup>a</sup>  $CL_{50}$ : concentración a la cual ocurre la lisis del 50% de eritrocitos humanos. Alta capacidad hemolítica cuando  $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ , capacidad moderada cuando  $CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  y  $< 200 \mu\text{g/mL}$  y baja capacidad cuando  $CL_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ .

<sup>b</sup> DS: Desviación estándar.

Por otro lado, al evaluar la citotoxicidad a nivel *in vitro* de los diferentes lipopéptidos sobre células humanas U-937, se encontró que las iturinas y surfactinas son altamente citotóxicas ya que presentan bajos valores de  $CL_{50}$  ( $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) al igual que el del fármaco estándar Doxorubicina ( $CL_{50} = 0.98 \mu\text{g/mL}$ ). Por el contrario, las fengicinas fueron moderadamente citotóxicas con valores de  $CL_{50}$  (159.8  $\mu\text{g/mL}$ ) comparables al del fármaco cloroquina (Tabla 2).

Tabla 2: Actividad citotóxica *in vitro* de los lipopéptidos y fármacos estándar.

Compuesto	$CL_{50}(\mu\text{g/mL})^a$		Interpretación
	X	DS <sup>b</sup>	
Iturinas	7.9	0.7	Citotoxicidad alta
Fengicinas	159.8	31.8	Citotoxicidad moderada
Surfactinas	8.5	1.3	Citotoxicidad alta
Doxorrubicina	0.9	0.2	Citotoxicidad alta
Anfotericina B <sup>c</sup>	36.6	8.0	Citotoxicidad alta
Benznidazol <sup>d</sup>	> 200	N/A	Citotoxicidad baja
Cloroquina <sup>e</sup>	155.2	5.2	Citotoxicidad moderada

<sup>a</sup>  $CL_{50}$ : concentración letal del 50% de la célula humana promonocítica U-937.

<sup>b</sup> DS: Desviación estándar.

<sup>c</sup> Anfotericina B (fármaco estándar leishmaniacida).

<sup>d</sup> Benznidazol (fármaco estándar tripanocida).

<sup>e</sup> Cloroquina (fármaco estándar plasmocida).

Realizar estas dos pruebas (hemólisis y citotoxicidad) es de vital importancia para poder evaluar posteriormente la actividad antiparasitaria y esclarecer los valores bajo los cuales la actividad antiparasitaria, en caso de presentarse, es causada por una especificidad contra el parásito y no por una muerte

celular descontrolada y poco específica.

### 3.2. La actividad antiprotozoaria de los lipopéptidos es dependiente del parásito y de la familia del compuesto evaluado.

La actividad leishmanicida a nivel *in vitro* se evaluó contra amastigotes intracelulares de *L. (V) braziliensis* (cepa MHOM/CO/87/UA140-EGFP) utilizando cuatro disoluciones en serie de los lipopéptidos. Los resultados se resumen en la Tabla 3. Las iturinas evidenciaron una buena actividad contra los amastigotes de *L. (V) braziliensis* con un  $CE_{50}$  de 7.12  $\mu\text{g/mL}$ , para un IS de 1.12, sugiriendo que este compuesto tiene actividad compartida, es decir, contra la célula, pero también contra el parásito, necesitando 0.12 veces menos concentración para lograr la muerte de los parásitos, o lo que es lo mismo, 0.12 veces más concentración de compuesto para producir el 50 % de la muerte de las células. En el caso de la anfotericina B, aunque también es muy citotóxica, la concentración a la cual mata el parásito es mucho más baja y por ello el IS es de 128.

En cuanto a las fengicinas, se observa que poseen una muy baja actividad y selectividad contra el parásito. En el caso de las surfactinas, no fue posible calcular el valor  $CE_{50}$  debido a que la concentración a la cual puede ser activa contra los amastigotes intracelulares, es mucho mayor a la concentración que es tóxica para la célula hospedera. La máxima concentración a la cual se pudo evaluar las surfactinas fue de 4  $\mu\text{g/mL}$ . Para un futuro ensayo se podría intentar realizar un recubrimiento de la molécula, por ejemplo, encapsulándola en nanopartículas de lípidos para disminuir la alta citotoxicidad hacia las células.

Tabla 3: Actividad leishmanicida *in vitro* de los lipopéptidos y fármaco estándar.

Compuesto	$CE_{50}(\mu\text{g/mL})^a$			Interpretación
	X	DS <sup>b</sup>	IS <sup>c</sup>	
Iturinas	7.12	0.49	1.12	Actividad alta
Fengicinas	122.13	28.89	1.31	Actividad baja
Surfactinas	NC (>4) <sup>d</sup>	N/A	<2.35	*
Anfotericina B <sup>e</sup>	0.31	0.04	118.06	Actividad alta

<sup>a</sup>  $CE_{50}$ : concentración efectiva de compuesto que disminuye el 50 % de los parásitos intracelulares de *L. (v) braziliensis*.

<sup>b</sup> DS: Desviación estándar.

<sup>c</sup> IS: Índice de selectividad =  $CL_{50}/CE_{50}$ .

<sup>d</sup> NC: No calculado porque la  $CE_{50}$  no pudo ser determinada.

<sup>e</sup> Anfotericina B (fármaco estándar leishmanicida).

\* Máxima concentración evaluada >4  $\mu\text{g/mL}$

La actividad plasmocida a nivel *in vitro* se evaluó sobre cultivos asincrónicos de *P. falciparum* (cepa 3D7, sensible a cloroquina) de acuerdo con los procedimientos previamente descritos, utilizando cuatro disoluciones en serie de los lipopéptidos. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Ninguno de los compuestos evaluados presentó una actividad efectiva contra *P. falciparum*. Los valores de concentración necesarios para alcanzar una reducción en la infección de al menos 50 % ( $CE_{50}$ ) son muy altos. Adicionalmente, el índice de selectividad presenta valores demasiado bajos, lo cual se relaciona con una actividad contra la célula y no contra el parásito. Dichos resultados presentan una correlación directa con los obtenidos en la prueba de hemólisis, donde se necesitan valores < 200  $\mu\text{g}$  de compuesto para empezar una reacción hemolítica y causar una posterior muerte celular. De hecho, en esta prueba, todas las concentraciones de ( $CE_{50}$ ) superan ese valor (< 200  $\mu\text{g}$ ), indicando probablemente una muerte celular en lugar de una muerte parasitaria.

En estudios previos se ha demostrado que las surfactinas producidas por la cepa *Bacillus licheniformis* BC98, poseen una alta actividad inhibitoria intra-eritrocítica del crecimiento de *P. falciparum* a nivel *in vitro* [32], ya que poseen una alta capacidad de inhibir algunas proteínas reguladoras de información silenciosa (Sir2) que son importantes en el proceso de patogenicidad. Esta actividad fue reportada para surfactinas. Por lo tanto, consideramos importante realizar estudios posteriores a nivel de estructura o interacción parasitaria para definir si se presenta algún tipo de variación que pueda favorecer o incrementar esta actividad antiparasitaria.

Tabla 4: Actividad plasmocida *in vitro* de los lipopéptidos y fármaco estándar.

Compuesto	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>a</sup>			Interpretación
	X	DS <sup>b</sup>	IS <sup>c</sup>	
Iturinas	622.16	150.84	0.01	Actividad baja
Fengicinas	506.46	191.55	0.32	Actividad baja
Surfactinas	463.38	191.72	0.02	Actividad baja
Cloroquina <sup>d</sup>	3.35	0.39	46.33	Actividad alta

<sup>a</sup> CE<sub>50</sub>: concentración efectiva de compuesto que disminuye el 50% de los parásitos intracelulares de *P. falciparum*.

<sup>b</sup> DS: Desviación estándar.

<sup>c</sup> IS: Índice de selectividad =  $CL_{50}/CE_{50}$ .

<sup>d</sup> Cloroquina (fármaco estándar plasmocida).

La actividad tripanocida a nivel *in vitro* se evaluó contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (cepa de Tulahuen) utilizando cuatro disoluciones en serie de los lipopéptidos. Los resultados se resumen en la Tabla 5. Las iturinas y las surfactinas presentan una alta actividad contra *T. cruzi* con CE<sub>50</sub> = 12.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y CE<sub>50</sub> = 13.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, mostrando una mejor actividad que el fármaco estándar benznidazol (CE<sub>50</sub> = 15.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Sin embargo, ambos compuestos presentan un IS muy bajo (IS < 1), indicando que los compuestos son igualmente activos contra las células y los parásitos, a concentraciones muy cercanas. En cuanto a las fengicinas, estas también presenta una buena actividad (CE<sub>50</sub> = 22.99  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y su IS = 6.95 demuestra que ejerce una mayor actividad tripanocida que citotóxica, una propiedad que permite identificarlo como un compuesto “hit” para continuar estudios que permitan validar su potencial terapéutico.

Tabla 5: Actividad tripanocida *in vitro* de los lipopéptidos y fármacos estándar.

Compuesto	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>a</sup>			Interpretación
	X	DS <sup>b</sup>	IS <sup>c</sup>	
Iturinas	12.3	3.1	0.6	Actividad alta
Fengicinas	22.9	2.3	6.9	Actividad alta
Surfactinas	13.3	4.4	0.6	Actividad alta
Benznidazol <sup>d</sup>	15.7	2.6	>12.6	Actividad alta

<sup>a</sup> CE<sub>50</sub>: concentración efectiva de compuesto que disminuye el 50% de los parásitos intracelulares de *T. cruzi*.

<sup>b</sup> DS: Desviación estándar.

<sup>c</sup> IS: Índice de selectividad =  $CL_{50}/CE_{50}$ .

<sup>d</sup> Benznidazol (fármaco estándar tripanocida).

## 4. Conclusiones

Los lipopéptidos producidos por miembros del género *Bacillus* son una novedosa herramienta que pueden ser utilizados para combatir una variedad de enfermedades causadas por parásitos, su capacidad de generar una interacción a nivel celular los posiciona como compuestos importantes para su estudio. Sin embargo, esta misma capacidad les otorga altos niveles de toxicidad que representa un problema a la hora de considerarlos como potenciales fármacos antiparasitarios.

Una vez superada esta barrera de toxicidad vale la pena reconocer que aún a tan bajas concentraciones los lipopéptidos presentan capacidad para actuar sobre los parásitos, *L. (V) braziliensis* y *T. cruzi* lo que da lugar a posteriores estudios que permitan incrementar esta actividad y selectividad a nivel parasitario y no a nivel celular. Para el caso de las fengicinas, los resultados son promisorios y podría continuar haciendo estudios que permitan validar su potencial terapéutico.

## 5. Agradecimientos

Especial agradecimiento a los miembros del programa de estudio y control de enfermedades tropicales PECET por facilitar, el tiempo, equipo y espacio para nuestro aprendizaje. De igual manera a Edgar Darío Arbelaez y otros técnicos de laboratorio por su constante apoyo y finalmente a Yessica Montoya, a todo el cuerpo docente y a la Universidad EAFIT, por brindarnos el conocimiento y las capacidades para llevar a finalidad este trabajo.

## 6. Referencias

1. Andrews, K. T., Fisher, G., & Skinner-Adams, T. S. (2014). Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *4*(2), 95-111.
2. Filardy, A. A., Guimarães-Pinto, K., Nunes, M. P., Zukeram, K., Fliess, L., Pereira, L., Nascimento, D. O., Conde, L., & Morrot, A. (2018). Human kinetoplastid protozoan infections: where are we going next? *Frontiers in immunology*, *9*.
3. Weng, H. B., Chen, H. X., & Wang, M. W. (2018). Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. *Infectious diseases of poverty*, *7*(1), 67.
4. Hotez, P., & Aksoy, S. (2017). PLOS Neglected Tropical Diseases: Ten years of progress in neglected tropical disease control and elimination. . . More or less. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(4), e0005355.
5. Dhingra, S. K., Gabryszewski, S. J., Small-Saunders, J. L., Yeo, T., Henrich, P. P., Mok, S., & Fidock, D. A. (2019). Global spread of mutant PFCRT and its pleiotropic impact on Plasmodium falciparum multidrug resistance and fitness. *mBio*, *10*(2), e02731-18.
6. World malaria report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
7. De Noya, B. A., & González, O. N. (2015). An ecological overview on the factors that drives to Trypanosoma cruzi oral transmission. *Acta tropica*, *151*, 94-102.
8. Marin-Neto, J. A., Romano, M. M. D., Maciel, B. C., Simões, M. V., & Schmidt, A. (2015). Cardiac imaging in latin america: chagas heart disease. *Current cardiovascular imaging reports*, *8*(4), 9.
9. Miranda-Schaeubinger, M., Chakravarti, I., Lidani, K. C. F., Omidian, Z., & Gilman, R. H. (2019). Systematic Review of the Epidemiology of Chagas Disease in the Americas: A Call for Standardized Reporting of Chagas Disease Prevalence. *Current Tropical Medicine Reports*, *6*(1), 23-34.
10. Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one*, *7*(5).
11. Galvao, T. F., Pereira, M. G., & Silva, M. T. (2013). Treatment of American tegumentary leishmaniasis in special populations: a summary of evidence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *46*(6), 669-677.
12. De Macedo-Silva, S., Urbina, J., de Souza, W. & Rodriguez, J. (2013). In Vitro Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against Leishmania amazonensis. *PLoS ONE*, *8*(12), p.e83247.
13. De Rycker, M., Baragaña, B., Duce, S. & Gilbert, I. (2018). Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. *Nature*, *559*(7715), pp.498-506.
14. Khare, S., Nagle, A., Biggart, A., Lai, Y., Liang, F., Davis, L., Barnes, S., Mathison, C., Myburgh, E., Gao, M., Gillespie, J., Liu, X., Tan, J., Stinson, M., Rivera, I., Ballard, J., Yeh, V., Groessl, T., Federe, G., Koh, H., Venable, J., Bursulaya, B., Shapiro, M., Mishra, P., Spraggon, G., Brock, A., Mottram, J., Buckner, F., Rao, S., Wen, B., Walker, J., Tuntland, T., Molteni, V., Glynn, R. & Suppek, F. (2016). Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature*, *537*(7619), pp.229-233
15. Field, M. C., Horn, D., Fairlamb, A. H., Ferguson, M. A., Gray, D. W., Read, K. D., Rycker, M. D., Torrie, L. S., Wyatt, P. G., Wyllie, S., & Gilbert, I. H. (2017). Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(4), 217.
16. Lee, S. M., Kim, M. S., Hayat, F., & Shin, D. (2019). Recent Advances in the Discovery of Novel Antiprotozoal Agents. *Molecules*, *24*(21), 3886.
17. Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, *34*(6), 1037-1062.
18. Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Riaz Rajoka, M.S., Yang, H. & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from Bacillus. *Applied microbiology and biotechnology*, *101*(15),

5951-5960.

19. González-Jaramillo, L. M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Villegas-Escobar, V., & Ortiz, A. (2017). Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *156*, 114-122.
20. Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., & de Kock, M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(7), 699-710.
21. Koomsiri, W., Inahashi, Y., Leetanasaksakul, K., Shiomi, K., Takahashi, Y., Omura, S., Samborsky, M., Leadlay, P. F., Wattana-Amorn, P., & Nakashima, T. (2019). Sarpeptins A and B, Lipopeptides Produced by *Streptomyces* sp. KO-7888 Overexpressing a Specific SARP Regulator. *Journal of natural products*, *82*(8), 2144-2151.
22. Meena, K. R., Tandon, T., Sharma, A., & Kanwar, S. S. (2018). Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *8*(3), 91-98.
23. Zihalirwa Kulimushi, P., Argüelles Arias, A., Franzil, L., Steels, S., & Ongena, M. (2017). Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Frontiers in microbiology*, *8*, 850.
24. Gu, K. B., Zhang, D. J., Cheng, Guan, C., Xu, J. H., Li, S. L., Shen, G. M., Luo, Y. C., & Li, Y. G. (2017). Safe antifungal lipopeptides derived from *Bacillus marinus* B-9987 against grey mold caused by *Botrytis cinerea*. *Journal of integrative agriculture*, *16*(9), 1999-2008.
25. Yáñez-Mendizábal, V., & Falconí, C. E. (2018). Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. *Biological Control*, *122*, 67-75.
26. Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, *97*(3), 1005-1016.
27. Chong, H., Xue, J., Zhu, Y., Cong, Z., Chen, T., Wei, Q., Qin, C., & He, Y. (2019). Monotherapy with a low-dose lipopeptide HIV fusion inhibitor maintains long-term viral suppression in rhesus macaques. *PLoS pathogens*, *15*(2), e1007552.
28. Wu, Y. S., Ngai, S. C., Goh, B. H., Chan, K. G., Lee, L. H., & Chuah, L. H. (2017). Anticancer activities of surfactin and potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 761.
29. Dey, G. (2017). Therapeutic Potential and Pre-Clinical Risk Assessment of Bacterial Lipopeptide 'Iturin A' in Breast Cancer (Doctoral dissertation, IIT, Kharagpur).
30. Routhu, S. R., Chary, R. N., Shaik, A. B., Prabhakar, S., Kumar, C. G., & Kamal, A. (2019). Induction of apoptosis in lung carcinoma cells by antiproliferative cyclic lipopeptides from marine algicolous isolate *Bacillus atrophaeus* strain AKLSR1. *Process biochemistry*, *79*, 142-154.
31. Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied microbiology and biotechnology*, *51*(5), 553-563.
32. Chakrabarty, S. P., Saikumari, Y. K., Bopanna, M. P., & Balaram, H. (2008). Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* Sir2, a NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase. *Molecular and biochemical parasitology*, *158*(2), 139-151.
33. Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed research international*, 2015.
34. Chakrabarty, S. P., Saikumari, Y. K., Bopanna, M. P., & Balaram, H. (2008). Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* Sir2, a NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase. *Molecular and biochemical parasitology*, *158*(2), 139-151.
35. Vial, H. J., Eldin, P., Tielens, A. G., & van Hellemond, J. J. (2003). Phospholipids in parasitic protozoa. *Molecular and biochemical parasitology*, *126*(2), 143-154.
36. Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(8), 604-615.
37. Pavlou, G., Milon, G., & Tardieux, I. (2019). Intracellular protozoan parasites: living probes of the host cell surface molecular repertoire. *Current opinion in microbiology*, *52*, 116-123.
38. Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J. J., Argel, L. E., Orduz Peralta, S., & Romero-Tabarez, M. (2013). Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of natural products*, *76*(4), 503-509.
39. Pulido, S. A., Munoz, D. L., Restrepo, A. M., Mesa, C. V., Alzate, J. F., Vélez, I. D., & Robledo, S. M. (2012). Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. *Acta tropica*, *122*(1), 36-45.
40. Buckner, F. S., Verlinde, C. L., La Flamme, A. C., & Van Voorhis, W. C. (1996). Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase.

- Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(11), 2592-2597.
41. Moore, G. E., Gerner, R. E., & Franklin, H. A. (1967). Culture of normal human leukocytes. *Jama*, 199(8), 519-524.
  42. Arango, E., Carmona-Fonseca, J., & Blair, S. (2008). Susceptibilidad in vitro de aislamientos colombianos de Plasmodium falciparum a diferentes antipalúdicos. *Biomédica*, 28(2), 213-223.
  43. Trager, W., & Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254), 673-675.
  44. Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., Orduz, S., & Villegas-Escobar, V. (2014). Multiple response optimization of Bacillus subtilis EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 378-385.
  45. Otero, E., Vergara, S., Robledo, S. M., Cardona, W., Carda, M., Vélez, I. D., Rojas, C., & Otálvaro, F. (2014). Synthesis, leishmanicidal and cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. *Molecules*, 19(9), 13251-13266.
  46. Finney, D. J. (1978). Statistical method in biological assay (3rd edit.). Charles Griffin & Company Ltd.
  47. Conceição, K., Konno, K., Richardson, M., Antoniazzi, M. M., Jared, C., Daffre, S., Camargo, A. C. M., & Pimenta, D. C. (2006). Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of Phyllomedusa hypochondrialis. *Peptides*, 27(12), 3092-3099.
  48. Insuasty, D., Robledo, S. M., Vélez, I. D., Cuervo, P., Insuasty, B., Quiroga, J., Nogueras, M., Cobo, J., & Abonia, R. (2017). A Schmidt rearrangement-mediated synthesis of novel tetrahydro-benzo [1, 4] diazepin-5-ones as potential anticancer and antiprotozoal agents. *European journal of medicinal chemistry*, 141, 567-583.
  49. Ríos, Y. K., Otero, A. C., Muñoz, D. L., Echeverry, M., Robledo, S. M., & Yepes, M. A. (2008). Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla). *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 37(2).
  50. Dufour, S., Deleu, M., Nott, K., Wathelet, B., Thonart, P., & Paquot, M. (2005). Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1726(1), 87-95.