UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO CRUDO DE *Azadirachta indica* A. JUSS. DE SUSPENSIÓN DE CÉLULAS SOBRE HONGOS DERMATOFITOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES PATÓGENAS AL HOMBRE

Daniel Iván Ospina Salazar

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2012

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO CRUDO DE *Azadirachta indica* A. JUSS. DE SUSPENSIÓN DE CÉLULAS SOBRE HONGOS DERMATOFITOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES PATÓGENAS AL HOMBRE

Daniel Iván Ospina Salazar

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director:

Ph.D. Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez

Codirector:

Ph.D Fernando Orozco Sánchez

Línea de Investigación:

Biotecnología Vegetal

Grupo de Investigación:

Biotecnología Vegetal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2012

A quienes nunca dejaron de creer en mí…

Agradecimientos

A quienes con su desinteresado e incondicional apoyo contribuyeron a la culminación de este trabajo.

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

CATALINA DE BEDOUT GÓMEZ. Bacterióloga. Corporación Para Investigaciones Biológicas CIB.

CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CIB.

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín - DIME.

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

ISABEL CRISTINA ZAPATA. Laboratorio de Ciencia de los Alimentos. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

JHON DIEGO RÍOS SALAZAR. Químico. Estudiante Maestría Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

LABORATORIO DE BIOCONVERSIONES. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

LABORATORIO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

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

LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

MARIA IBONE GALEANO MONSALVE. Asistente Académica-Administrativa. Posgrado en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

NANCY BEATRIZ VANEGAS BLANDÓN. Químico Farmaceuta. Laboratorio de Productos Naturales. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

ORLANDO SIMÓN RUIZ VILLADIEGO. Químico, M. Sc. Profesor Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

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

El autor expresa un especial agradecimiento al equipo del LABORATORIO DE MICOLOGÍA MÉDICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, especialmente a:

LUISA FERNANDA GÓMEZ LONDOÑO. Microbióloga Bioanalista.

LUZ MARIA DEL PILAR GUERRA. Auxiliar de laboratorio.

MARLENY GALLEGO. Auxiliar de laboratorio.

MYRTHA ARANGO ARTEAGA. Licenciada, Ph. D. Docente Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia.

SOFÍA ZAPATA. Auxiliar de laboratorio.

Resumen

Se determinó mediante un método de referencia *in vitro* la actividad antifúngica del extracto crudo de biomasa celular de *Azadirachta indica* A. Juss., sobre cinco especies de hongos dermatofitos, así como la de extractos de hojas y semillas de esta misma especie. El extracto de biomasa celular fue fraccionado y analizado por HPLC con el fin de comparar en sus perfiles cromatográfico la presencia de triterpenoides con posible actividad antifúngica. Los resultados mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de los dermatofitos en el siguiente orden: extracto de hojas (CMI: 100µg/mL), semillas (CMI: 625µg/mL) y biomasa celular (CMI: 2500µg/mL). Algunas de las fracciones exhibieron una menor CMI que el extracto crudo en sí. Los extractos con mayor actividad antifúngica revelaron en su perfil cromatográfico una concentración más alta de compuestos triterpenoides, lo cual puede explicar su mayor poder inhibitorio; adicionalmente, estos resultados son un nuevo reporte sobre el potencial antifúngico de extractos de biomasa de suspensiones celulares de neem.

Palabras claves: dermatofitos*, A. indica,* HPLC, sensibilidad *in vitro*, extractos de neem, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), triterpenoides.

Abstract

Objective: To assess antifungal activity of methanolic extracts of *A. indica* against five species of dermatophytes by a reference microdilution method. **Methods**: Antifungal activity of *A. indica* was measured *in vitro* by M38-A2 CLSI method. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of *A. indica* extracts from leaves, seed oil and cellular biomass against five species of clinically isolated dermatophytes were determined. In addition, the cellular biomass extract was fractioned and analized by HPLC to compare their possible antifungal-triterpenoids-like compounds. **Results**: *A. indica* extracts exhibit inhibitory effect against dermatophytes as follows: leaves (MIC = 100µg/mL), seed oil (MIC = 625µg/mL) and cellular biomass (MIC = 2500µg/mL). The HPLC profiles revealed the presence of triterpenoids, and some fraccions exhibit lower MIC than the whole extract. **Conclusions**: *A. indica* possess antifungal activity against dermatophytes, including a novel report of cellular biomass extracts.

Keywords: dermatophytes, *A. indica*, HPLC, *in vitro* susceptibility, neem extracts, Minimal Inhibitory Concentration (MIC), triterpenoids.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XIV**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XV**

Introducción **1**

1. Revisión bibliográfica **3**
1.1 Generalidades 3
1.2 Cultivo de células en suspensión de *A. indica* y producción de metabolitos 5
1.3 Propiedades antifúngicas de extractos vegetales 7
1.4 Actividad antifúngica de extractos de neem 11
1.5 Hongos dermatofitos 13
1.6 Antimicótios empleados para el control de hongos dermatofitos 16

2. Materiales y métodos **19**
2.1 Establecimiento de suspensiones celulares de *A. indica* 19
2.1.1 Material vegetal 19
2.1.2 Selección y desinfección de explantes 19
2.1.3 Iniciación y mantenimiento de callos friables 19
2.1.4 Suspensiones celulares de *A. indica* 20
2.2 Fase extractiva 21
2.2.1 Obtención de extractos 21
2.2.2 Fraccionamiento del extracto crudo de biomasa celular. 22
2.2.3 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de los extractos de *A. indica* 23
2.3 Bioensayos 24
2.3.1 Aislamientos de hongos dermatofitos 24
2.3.2 Obtención del inóculo de suspensión de conidias 26
2.3.3 Ensayos de actividad inhibitoria de extractos de *A. indica* 27
2.3.4 Análisis estadístico 29

3. Resultados y discusión **31**
3.1 Establecimiento de suspensiones celulares de *A. indica* 31
3.2 Obtención y fraccionamiento de los extractos 33
3.3 Análisis por HPLC de los extractos de *A. indica* 36
3.4 Bioensayos 37

4. Conclusiones 51

5. Perspectivas futuras.....53

Bibliografía.....55

Lista de figuras

Figura 1. Esquema de obtención de biomasa celular de *A. indica* 21
Figura 2. Diagrama del procedimiento de extracción de biomasa celular de *A. indica* 23
Figura 3. Cultivo de *T. mentagrophytes* en PDA para la producción de conidias 25
Figura 4. Conteo de viabilidad de conidias del inóculo 27
Figura 5. Distribución de las concentraciones en las placas de 96 pozos 28
Figura 6. Acumulación de biomasa celular en los cultivos en suspensión. 31
Figura 7. Fracciones del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica* y columna empleada ... 34
Figura 8. Cromatogramas de HPLC del extracto de biomasa celular 36
Figura 9. Cromatogramas de HPLC del extracto de aceite de semillas 36
Figura 10. Cromatogramas de HPLC del extracto de hojas 36
Figura 11. Extracto crudo de biomasa celular de *A. indica* 38
Figura 12. Fracción 6.2 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica* 39
Figura 13. Fracción 6.3 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica* 40
Figura 14. Fracción 6.5 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica* 41
Figura 15. Fracción 6.7 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica* 42
Figura 16. Fracción 6.9 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica* 43
Figura 17. Extracto de hojas de *A. indica* 44
Figura 18. Control positivo (Terbinafina) 45
Figura 19. Extracto de aceite de semilla 46

Lista de tablas

Tabla 1. Variables estudiadas para el cultivo de células en suspensión de *A. indica* 6
Tabla 2. Productividad de biomasa y azadirachtina en cultivos de células en suspensión 7
Tabla 3. Actividad antifúngica por especie vegetal, tipo de extracto y método *in vitro* 8
Tabla 4. Actividad antifúngica de *A. indica* por especie de hongo patógeno y tipo de extracto.... 12
Tabla 5. Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico 14
Tabla 6. Características macroscópicas y microscópicas de algunos dermatofitos 15
Tabla 7. Rango de concentraciones de los extractos evaluados 28
Tabla 8. Peso seco de biomasa cosechada de suspensiones celulares 32
Tabla 9. Rendimiento de extracto crudo seco por procedencia del extracto 33
Tabla 10. Peso de las fracciones separadas del extracto crudo de biomasa 35
Tabla 11. Agrupamiento Duncan y diferencias significativas entre tipos de extractos. 46
Tabla 12. Agrupamiento Duncan y diferencias significativas entre especie de hongo 47

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
DMSO	Dimetil Sulfóxido
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrilo
BAP	6-bencil-aminopurina
IBA	Ácido Indol Butírico

Introducción

Hay abundantes reportes en la literatura nacional e internacional acerca de la utilización del árbol del neem, *Azadirachta indica,* en el control de insectos, bacterias, hongos y nematodos. Esta planta es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para aliviar el dolor, la fiebre, las enfermedades de la piel, las heridas, infecciones, úlceras estomacales, etc. Adicionalmente, en los últimos años se ha explorado su uso en investigaciones relacionadas con el control de una gran variedad de microorganismos de importancia médica y veterinaria, incluyendo hongos dermatofitos y mohos ambientales que pueden ser agentes productores de tiñas y onicomicosis en el hombre (Mahmoud *et al.*, 2011; Natarajan *et al.,* 2002 y 2003). En consecuencia, se ha despertado un gran interés científico e investigativo para conocer los compuestos bioactivos de esta planta.

Para la obtención de metabolitos del neem utilizando hojas o semillas se precisa de grandes cantidades de materia prima debido a su poca concentración, por consiguiente de extensas plantaciones de este árbol. Considerando esta limitación a nivel nacional se han buscado alternativas que suplan esa fuente directa de materia prima para realizar las extracciones. En la Universidad Nacional Sede Medellín, se han desarrollado protocolos para el cultivo de células en suspensión de neem a través de investigaciones tanto de pregrado como de posgrado, que han abarcado desde el establecimiento de los cultivos celulares, su mantenimiento y manejo (Muñoz y Vanegas, 2004), hasta los ensayos de actividad biológica (Capataz, 2005). Sin embargo, debido a la carencia de un protocolo confiable para la producción de metabolitos secundarios que sean efectivos en el control de hongos dermatofitos, mediante subcultivos periódicos y escalonados de células en suspensión de *A. indica*, se ha propuesto este estudio para establecer el potencial antifúngico de extractos de biomasa celular contra estos hongos causantes de afecciones cutáneas comunes en el hombre. El objetivo general de la presente investigación es entonces evaluar a través de un método de referencia *in vitro* la actividad antifúngica del extracto crudo de biomasa celular de *Azadirachta indica*, sobre 16 aislamientos de 5 especies de hongos

dermatofitos, a saber: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum.* Para lograrlo se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto crudo de suspensión de células de *A. indica* sobre hongos dermatofitos causantes de afecciones cutáneas comunes en el hombre.
- Evaluar la sensibilidad de los hongos mencionados frente a las fracciones obtenidas del extracto crudo por medio de técnicas cromatográficas.

1. Revisión bibliográfica

1.1 Generalidades

Desde la década del 60, en los albores de la investigación sobre el árbol del neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), gran cantidad de artículos y publicaciones han reportado sus usos tradicionales y potenciales, sus propiedades insecticidas y antimicrobianas y la gran diversidad de metabolitos secundarios con actividad biológica que posee, siendo la *azadirachtina* el más reconocido, con aplicaciones comerciales conocidas en el mercado (David Morgan, 2009). La obtención de estos metabolitos de interés desde el punto de vista farmacológico, a partir de la materia prima del árbol (hojas o semillas) plantea varias dificultades, entre otras: el conflicto con las tierras cultivables para la producción de alimentos, desórdenes ambientales (sequías, inundaciones, heladas), enfermedades, plagas, características de los suelos, variación no controlada de la calidad del cultivo y baja concentración del metabolito en la planta. Al respecto, Sidhu y Behl (1996) comentan que actualmente la azadirachtina se extrae de las semillas de árboles que crecen en su medio natural, pero su disponibilidad depende de un suministro seguro de semillas de calidad. Éstas se producen una vez al año pero debido a problemas de logística y almacenamiento, solo una fracción de estas semillas se emplea para la extracción de azadirachtina. Por otra parte, ocurren grandes variaciones en el contenido de azadirachtina debido a la existencia de diferentes genotipos y la amplia distribución geográfica del árbol de neem (Sidhu y Behl, 1996). Considerando estas dificultades se han buscado alternativas que suplan la fuente directa de materia prima y optimicen la producción de los compuestos activos del neem; es aquí donde cobran relevancia las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica. El cultivo *in vitro* de células vegetales en suspensión en medio líquido se considera como una alternativa potencial para la producción de sustancias útiles y principios activos en donde todos los problemas e inestabilidades presentes en la agricultura convencional pueden ser evitados. El establecimiento de un cultivo de células vegetales en suspensión puede hacerse tanto en matraces individuales

como en biorreactores, cada uno con sus ventajas y desventajas, pero en ambas formas el objetivo es obtener grandes cantidades de biomasa rica en metabolitos secundarios de forma continuada y programática, lo cual se convierte en una excelente opción para la investigación y el desarrollo, ofreciendo un gran potencial a nivel farmacológico, industrial y comercial. En el caso de *A. indica* se cuenta con suficiente literatura al respecto; solamente en la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, se han culminado siete investigaciones con *A. indica* que han permitido el desarrollo y perfeccionamiento de protocolos para el crecimiento de suspensiones celulares de esta especie.

Por otro lado, el empleo de métodos alternativos para el manejo de afecciones comunes en el hombre, ha venido incrementándose sostenidamente debido al auge y redescubrimiento de la medicina tradicional, donde se trabaja directamente con las plantas – fuente de compuestos bioactivos, en reemplazo de medicamentos de síntesis química. Desde el punto de vista biotecnológico se plantean varios desafíos para hacer de los productos naturales bioactivos una opción competitiva a nivel farmacéutico:

- Identificar los compuestos bioactivos de las plantas
- Aislar y purificar dichos compuestos
- Optimizar la producción de los compuestos bioactivos

Dentro de la gama de medicamentos para controlar las afecciones cutáneas debidas a hongos dermatofitos, conocidas vulgarmente como *tiñas*, los productos antimicóticos tópicos y orales de síntesis química son los más aceptados, en contraposición a los productos de origen natural de uso mucho menos extendido. Estas afecciones son unas de las más comunes, si se considera que más de la mitad de la población mundial en algún momento de su vida las padecerá en mayor o menor severidad. Sin embargo, existen reportes prometedores sobre el uso de extractos vegetales para el control de hongos dermatofitos *in vitro*, lo cual conduce a perseverar en su investigación y aún más allá, en la formulación de antimicóticos de origen natural para el mercado.

A continuación se hará una revisión general sobre los hitos más importantes en la investigación sobre *A. indica,* en particular lo relativo al cultivo *in vitro* de suspensiones celulares, el estado del

arte en cuanto al conocimiento de su actividad antifúngica, lo relativo a los hongos dermatofitos, su incidencia y control.

1.2 Cultivo de células en suspensión de *A. indica* y producción de metabolitos

Los primeros trabajos en cultivos *in vitro* de *A. indica* se dan hacia la década de los 80, donde se publicaron estudios sobre micropropagación, morfogénesis y embriogénesis de esta especie (Ramesh y Padhya, 1980). Estos trabajos pioneros sentaron las bases para el desarrollo de técnicas de cultivos en suspensión de células de *A. indica*. El establecimiento de suspensiones celulares de neem se reporta hacia la década de los 90 (Allan *et al.,* 1994; Wewetzer, 1998), orientado hacia la producción de azadirachtina. El cultivo de suspensiones celulares de neem en biorreactores de tipo tanque agitado se ha implementado desde los trabajos de Muñoz *et al.* (2006) y Prakash & Srivastava (2006 y 2007).

Por otra parte, es conocido que la producción de triterpenoides en *A. indica* presenta diferencias entre los órganos vegetales; estos compuestos se han encontrado principalmente en semillas, lo que indica que las estructuras sintetizadoras de terpenoides son más abundantes en este órgano vegetal (Dayanandan y Ponsamuel 2000). Sin embargo, se han empleado explantes de corteza, hojas, flores y semillas de neem para inducir la formación de callos friables que serán la fuente para los cultivos de células en suspensión (Prakash *et al*., 2002). En estos cultivos se ha reportado la producción de azadirachtina, estigmasterol, sitosterol, salanina, vilasinina, y azadirachtol (Orozco, 2009). No obstante lo anterior, el grueso de la literatura se enfoca hacia la producción de azadirachtina debido a su importancia como agente antialimentario en contra de insectos.

Los medios de cultivo se han formulado mayormente con el objetivo de incrementar la producción de azadirachtina. En general, los cultivos *in vitro* de *A. indica* se inician en medio MS suplementado con 20-30g/L de sacarosa y una o dos auxinas y citoquininas. La concentración de auxinas varía de 4 mg/L a 8 mg/mL para el ácido indol butírico (IBA); 0.2 mg/L para el ácido indol acético (AIA), y 1 mg/L para el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Las citoquininas más usadas son bencilaminopurina (BAP) y kinetina (Kn) en concentraciones que van de 0.1 a 4.0 mg/L y 0.5 mg/L respectivamente (Prakash *et al.,* 2002).

Una vez crecido el callo friable, se transfiere asépticamente a un medio líquido de composición semejante a la del medio sólido. Esto puede hacerse tanto en matraces Erlenmeyer individuales o en biorreactores. En cuanto al cultivo en uno u otro, los reportes se centran en comparar la producción de biomasa y azadirachtina, con la modificación de otras variables para optimizar dichos parámetros. Dentro de dichas variables se pueden citar: velocidad de agitación, temperatura, luz, composición del medio de cultivo, reología, oferta y demanda de oxígeno, y factores de elicitación. En las siguientes tablas se resumen los principales reportes al respecto.

Tabla 1. Variables estudiadas para el cultivo de células en suspensión de *A. indica* (Orozco & Monroy, 2007)

Sistema de cultivo	Variable	Descripción	Biomasa máxima ($g\ L^{-1}$)	Aza máxima ($mg\ L^{-1}$)	Referencia
Matraz	Agente Permeabilizante	Triton X-100	NR[1]	10	Kuruvilla et al., 1999
Matraz	Precursor	Acetato sodio	NR[1]	64.94	Balaji et al., 2003
		Esqualeno		72.81	
		Isopentenil pirofosfato		51.63	
Matraz	Etapas de cultivo	Una etapa/crecimiento	6,5	2.5[2]	Raval et al., 2003
		Dos etapas/ crecimiento y producción	16	4.5	
Matraz	Medio cultivo	Optimización N, P y C	15.02	45	Prakash y Srivastava, 2005b
Matraz	Luz y temperatura	Oscuridad 15 ºC	20.2	27.4	Capataz, 2005
		Luz 35 ºC	24.6	4.4	
Biorreactor	Tipo biorreactor	Columna burbujeo 2-4L	17.8	81.3	Prakash y Srivastava, 2005a
		Tanque agitado 3 L	15.5	50	
Tanque agitado 3 L	Modo de cultivo	Lote	15.52	45	Prakash y Srivastava, 2006a
		Lote alimentado	20.06	82	
Tanque agitado 3 L	Tipo de impulsor	Setric[2]	15.0	45	Prakash y Srivastava, 2006b
		Centrífugo[2]	18.7	71	

[1] NR. No reportado. [2] Impulsores de flujo axial. Aza, azadiractina.

Tabla 2. Productividad de biomasa y azadirachtina en cultivos de células en suspensión (Orozco & Monroy, 2007).

Sistema de cultivo	T (°C)	Luz	Q bio (g cel/ L/d)	Q prod mg Az/L/d	Referencia
Matraz una etapa	25	16 h luz	0.20	0.25	Raval *y col.*, (2005)
Matraz 2 etapas			0.82	0.32	
Matraz medio optimizado	25	Oscuridad	0.84	3.75	Prakash y Srivastava, (2005b)
Matraz	15	Oscuridad	0.70	3.04	Capataz, (2005)
	35	Luz	0.99	0.49	
Columna burbujeo 2,4 L	27	Oscuridad	1.07	6.7	Prakash y Srivastava, (2005a)
Tanque agitado 3 L,			1.05	5.0	
Tanque agitado 3 L - Lote	27	Oscuridad	0.75	3.2	Prakash y Srivastava, (2006)
Tanque agitado 3 L Lote alimentado			1.08	5.8	
Tanque agitado 3 L impulsor Setric	27	Oscuridad	0.83	3.7	Prakash y Srivastava, (2007)
Tanque agitado 3 L Impulsor centrífugo	27	Oscuridad	1.37	7.1	

Una variable considerada importante para el cultivo de células en suspensión de *A. indica* es la oferta de oxígeno, debido a que los compuestos activos del neem (principalmente de la familia de los limonoides, como la azadirachtina) poseen gran cantidad de grupos funcionales con oxígeno y puede también favorecer el crecimiento y división celular. Orozco (2009) señala que la velocidad de consumo de oxígeno de células en suspensión de *A. indica* es alta (0.1Kg O_2/Kg materia seca por día) y por lo tanto la velocidad de transferencia de oxígeno debe suplir esta demanda para conservar la viabilidad celular. No obstante, en otras especies como *Beta vulgaris y Catharantus roseus* se ha observado que una limitación en la oferta de oxígeno por el tipo de tapón empleado en matraces Erlenmeyer no afecta la viabilidad celular e incluso favorece la producción de metabolitos (Rodríguez-Monroy *et al.* 2004; Lee y Shuler 1991). Estos resultados sugieren que el metabolismo del oxígeno de células vegetales en suspensión varía interespecíficamente y debe por lo tanto caracterizarse en función del metabolito de interés.

1.3 Propiedades antifúngicas de extractos vegetales

Actualmente es de gran interés y preocupación entre la comunidad científica, la industria farmacéutica y las autoridades sanitarias, la creciente resistencia de los hongos patógenos a los

agentes antifúngicos comerciales. Debido a ello se ha incrementado la necesidad de encontrar nuevos compuestos con propiedades antifúngicas, en particular aquellos provenientes de fuentes naturales. Teniendo en cuenta que las plantas son por naturaleza las mejores fábricas de compuestos químicos, la investigación ha conducido hacia la determinación de la actividad biológica de un gran número de especies vegetales.

Cáceres et al. (1991) reportan por revisión de literatura que por lo menos 100 especies vegetales son empleadas para el tratamiento de dermatomicosis, circunscribiéndose al área de Guatemala. Mediante la evaluación in vitro de extractos acuosos, hexánicos y etanólicos, amén de muchos otros, se han determinado las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) en las que el crecimiento de hongos dermatofitos es inhibido en por lo menos un 80%. De igual forma se han obtenido las fracciones y compuestos aislados de los extractos crudos (flavonoides, cumarinas y terpenoides, entre otros). Es importante señalar que existen diferentes métodos in vitro para llevar a cabo estas evaluaciones; no obstante, el método de microdilución en caldo M38-A2 es de referencia estandarizada, por cuanto es consensuado entre grupos interdisciplinarios en micología médica y publicado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

En la siguiente tabla se muestran los hallazgos más relevantes y actuales en lo relativo al potencial antifúngico de extractos vegetales, sin pretender abarcar toda la investigación al respecto.

Tabla 3. Actividad antifúngica por especie vegetal, tipo de extracto y método *in vitro*

Especie	Tipo de extracto	Resultados	Método	Referencia
Psoralea corylifolia	Metanólico	Diferentes niveles de actividad antifúngica sobre *T. rubrum*, *T. mentagrophytes, E. floccosum* y *M. gypseum.* Máxima inhibición a 250 µg	Difusión en disco y dilución en tubo	Rajendra-Prasad *et al.,* 2004

Tabla 3. (Continuación)

Especie	Tipo de extracto	Resultados	Método	Referencia
Aegle marmelos	Etanólico, acuoso, metanólico	CMI = 200µg/mL del extracto metanólico sobre *T. rubrum*, *T. mentagrophytes, E. floccosum M. canis* y *M. gypseum*	Microdilución en caldo	Balakumar *et al.,* 2011
Croton urucurana	NR	CMI = 1.25–2.5mg/ml sobre dermatofitos	Difusión en disco y dilución en tubo	Gurgel *et al.,* 2005
Piper regnellii	Acuoso-etanólico y fracciones	Fuerte actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes, T. rubrum*, *M. Canis* y *M. gypseum.* CMI de 15.62, 15.62, 15.62 y 62.5µg/ml respectivamente	Microdilución en caldo	Koroishi *et al.,* 2008
Allium cepa y *Allium sativum*	Acuoso	Inhibición del 100% del crecimiento sobre *Malassezia sp., Candida sp.* y 35 aislamientos de dermatofitos	Dilución en agar	Ghahfarokhi *et al.,* 2006
Xyris pterygoblephara	Dihidroisocumarina aislada del extracto	Potente actividad antifúngica sobre E. floccosum, T. mentagrophytes y T. rubrum.	NR	Guimarães et al., 2008
Nigella sativa	Etéreo y thymoquinona aislada	CMI del extracto etéreo y thymoquinona entre 10 -40 y 0.125 - 0.25mg/ml, respectivamente sobre T. rubrum, T. interdigitale, T. mentagrophytes, E. floccosum y M. canis	Dilución en agar	Aljabre et al., 2005

Tabla 3. (Continuación)

Especie	Tipo de extracto	Resultados	Método	Referencia
Wrightia tinctoria	Hexánico, clorofórmico, metanólico y etanólico. Indirubina aislada	Clorofórmico = 0.5mg/ml sobre *T. rubrum*, *E. floccosum*, *A. niger* y *S. brevicaulis*. Indirubina = 6.25 - 50µg/ml sobre *E. floccosum, T. rubrum*, *T. tonsurans, T. mentagrophytes* y *T. simii*	Microdilución en caldo	Ponnusamy *et al.,* 2010
44 especies vegetales	Acuoso	22 especies inhibieron por los menos uno de los dermatofitos evaluados: *E. floccosum* (43.2%), *T. rubrum* (36.0%), *T. mentagrophytes* (31.8%), *M. canis* (22.7%) y *M. gypseum* (24.0%)	NR	Cáceres *et al.,* 1991
Ocimum sanctum	Acuoso, etanólico y fracciones	CMI = 200µg/ml del extracto acuoso sobre *T. rubrum*, *T. mentagrophytes, E. floccosum M. nanum* y *M. gypseum*	Microdilución en caldo	Balakumar *et al.,* 2011

NR. No reportado

Si bien se conoce el mecanismo de acción de los antimicóticos de uso comercial, mención aparte merece la elucidación del mecanismo por el cual los extractos vegetales inhiben el crecimiento de hongos dermatofitos. Balakumar *et al.,* (2011) mencionan que la actividad fungicida de *Ocimum sanctum* se atribuye a los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las hojas, como alcaloides, glucósidos, aceites esenciales y sapogeninas. Sin embargo, el mecanismo *in vitro* es aún incierto. Khan *et al.* (1987) señalan que algunos extractos de hojas de neem tienen un efecto característico sobre los dermatofitos, en particular los de baja polaridad. Esto puede ser debido a los flavonoides y quercetina presentes en dichos extractos.

Lyer and Williamson (1991) atribuyeron las propiedades antifúngicas de los extractos orgánicos de neem a la inhibición en la actividad proteasa en dermatofitos. Maoz & Neeman (2000) reportan una inhibición en la síntesis de quitina debido al tratamiento *in vitro* de *Candida* y dermatofitos con extractos de hojas de *Inula viscosa*. Queda para elucidar si el efecto es debido a la inhibición de la enzima quitina sintasa o si se debe a la destrucción en sí de la membrana celular. Okemo *et al.* (2001) sostienen que la cinética de acción de ciertos extractos de *A. indica* frente a microorganismos como *Candida albicans, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* es dependiente de la concentración y el tiempo, y está relacionada con la pared celular. Extractos acuosos de hojas de neem incrementaron la hidrofobicidad superficial de las células de *Candida albicans,* así como la formación de una biopelícula en esta levadura (Polaquini *et al.,* 2006).

Evidentemente, la literatura es abundante en cuanto al conocimiento de las propiedades antifúngicas de numerosas especies vegetales, aunque no se hayan dilucidado del todo los mecanismos de acción de dichos extractos. Sin embargo, son escasos o nulos los reportes acerca del empleo de extractos provenientes de suspensiones celulares para el control de hongos en general, debido posiblemente a que la evidencia de sinergismo entre los compuestos limita la producción de un solo metabolito bioactivo, que es lo buscado preferiblemente en cultivos de células en suspensión.

1.4 Actividad antifúngica de extractos de neem

Los extractos de neem son de los más poderosos que se pueden encontrar en la farmacopea de la India para combatir muchas dolencias. Tan es así que antiguamente era denominado *Sarva roga nivarini* o “curador de todas las enfermedades” en sánscrito (Orozco, 2009). Dos investigadores que basaron sus estudios en las tradiciones antiguas de la utilización de esta planta encontraron que el humo de Neem presentó una suspensión total en el crecimiento y esporulación de los hongos en pacientes enfermos (Biswas *et al*, 2002).

Un hecho muy importante que destacar es la existencia de efectos sinérgicos entre los diferentes compuestos presentes en los extractos de neem. Mahmoud *et al.* (2011) reportan una disminución de 50% de actividad antifúngica cuando se extrae el nimonol al extracto orgánico de hojas de neem en evaluaciones con hongos patógenos como *M. canis, C. albicans* y *Aspergillus*

sp., aún cuando el nimonol por sí solo fue inactivo. Previamente, Govindachari *et al.* (1998) habían demostrado que la mezcla de fracciones obtenidas por HPLC de aceite de neem resultó más efectiva en los ensayos de actividad antifúngica contra *Drechslera, Alternaria* y *Fusarium* que los compuestos por separado, como azadiradiona, nimbina y salanina. Lo anterior es indicio de que los triterpenoides purificados pierden actividad, mientras que en conjunto despliegan un efecto sinérgico.

En la misma tónica se expresan Suresh *et al.* (1997), quienes a partir de extractos hexánicos y metanólicos de hojas de neem obtuvieron varias fracciones por HPLC, entre otras los limonoides nimonol e isomeldenina, y evaluaron la formación de pústulas de *Puccinia arachidis* en foliolos de *Arachis hypogaea*. Los resultados mostraron que la formación de pústulas era menor en los tratamientos con limonoides mezclados con pequeñas "impurezas" correspondientes a compuestos análogos.

A continuación, se relacionan los principales trabajos enfocados en la evaluación de extractos de neem frente a hongos, no necesariamente dermatofitos.

Tabla 4. Actividad antifúngica de *A. indica* por especie de hongo patógeno y tipo de extracto

Tipo de extracto	Especie de hongo	Resultados	Referencia
Acetato de etilo, acuoso, etanólico y de hojas	*Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, Candida albicans* y *Microsporum gypseum*	Extracto de acetato de etilo en concentración = 20% exhibió mayor poder antifúngico sobre todos los hongos	Mahmoud *et al.,* 2011
Hexánico, metanólico y fracciones de hojas	*Puccinia arachidis*	Reducción *in vivo* del número de pústulas en foliolos al emplear la fracción polar	Suresh *et al.,* 1997
Metanólico, hexánico, aceite de semillas y sus fracciones	*Drechslera oryzae, Fusarium oxysporum y Alternaria tenuis*	Extracto metanólico redujo hasta 70% el crecimiento, atribuible a la presencia de tetranortritepenoides	Govindachari et al., 1998

Tabla 4. (Continuación)

Tipo de extracto	Especie de hongo	Resultados	Referencia
Acetato de etilo, hexánico y etanólico de hojas. Extracto de semillas por DMSO	*Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes* y *Microsporum nanum*	CMI del extracto de semilla = 31µg/mL para todos los dermatofitos evaluados. El patrón de crecimiento fue distorsionado a una concentración de 15µg/mL	Natarajan *et al.,* 2003
Extractos de hojas y semillas	*T. rubrum, T. mentagrophytes, T. violaceum, M. nanum* y *E. floccosum*	La CMI del extracto de semillas de neem fue menor que la del extracto de hojas.	Natarajan *et al.,* 2002

En cuanto a extractos obtenidos de biomasa de suspensiones celulares de *A. indica,* los escasos reportes apuntan más hacia el control de insectos, debido a la tendencia de estos trabajos hacia la producción de azadirachtina, el metabolito más conocido y estudiado de esta especie.

1.5 Hongos dermatofitos

Los dermatofitos son un grupo de hongos filamentosos taxonómicamente relacionados que tienen la capacidad de producir infecciones en la piel, el pelo y las uñas tanto del ser humano como de los animales. La etimología del término «dermatofito» es muy antigua: proviene de los términos griegos *derm* (que significa piel) y *phyte* (que significa planta). Sin embargo, debido a que los dermatofitos no están filogenéticamente relacionados con las plantas (como se creía antiguamente), este término puede considerarse como no adecuado en la actualidad. Los dermatofitos son hongos queratinolíticos; es decir, tienen la capacidad de digerir y utilizar la queratina como sustrato. Las infecciones producidas por estos hongos se denominan dermatofitosis, aunque comúnmente también son llamadas tiñas, término que procede del latín *tinea* y que significa gusano o polilla. Esta palabra se usa de forma descriptiva dado el aspecto de serpentina o anular que presentan las lesiones cutáneas con una apariencia de gusano enterrado en la piel (Fernández-Torres, 2005). A pesar de que las lesiones se presentan superficialmente en la mayoría de los casos, eventualmente se pueden dar en tejidos subcutáneos no queratinizados, lo que da lugar a los llamados granulomas o pseudomicetomas.

De acuerdo con su hábitat natural, los dermatofitos pueden dividirse en tres grupos ecológicos:

- **geofílicos:** comprenden especies que se encuentran en el suelo actuando como saprobios y que se nutren de la queratina allí existente (pelos, escamas y plumas) y pueden infectar tanto el ser humano como los animales.

- **zoofílicos:** comprenden especies que infectan los animales y éstos, a su vez, pueden infectar el ser humano

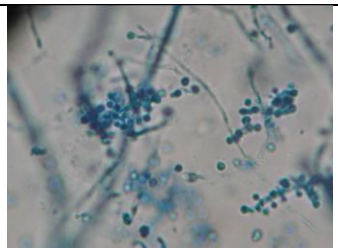
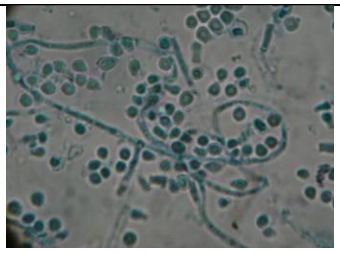
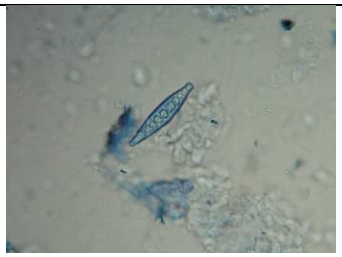
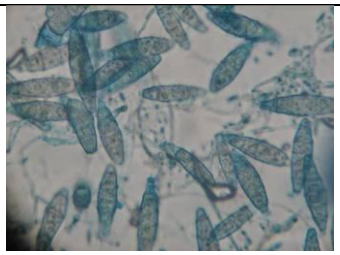
- **antropofílicos:** comprenden aquellas especies que infectan solamente el ser humano y que son transmisibles por contacto directo o indirecto (Spiewak *et al.,* 1998, citado por Fernández-Torres, 2005).

Tabla 5. Clasificación de los dermatofitos según su nicho ecológico (tomado y modificado de Fernández-Torres, 2005).

Antropofílicos	Zoofílicos	Geofílicos
Epidermophyton floccosum	*Microsporum canis*	*Microsporum gypseum*
Microsporum audouinii	*Microsporum gallinae*	*Microsporum nanum*
Trichophyton rubrum	*Trichophyton mentagrophytes*	*Trichophyton terrestre*
Trichophyton schoenleinii		
Trichophyton tonsurans		
Trichophyton interdigitale		

Las características morfológicas macroscópicas y microscópicas son criterios muy aceptados para identificar taxonómicamente una especie, en conjunto con las técnicas de biología molecular. En el caso de los hongos dermatofitos, existen caracteres típicos para cada uno, los cuales se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 6. Características macroscópicas y microscópicas de algunos dermatofitos (fotos: Daniel Ospina)

Especie	Conidias	Aspecto de la colonia
E. floccosum		Aspecto polvoriento a aterciopelado. Pueden aparecer pliegues radiados a partir de un centro elevado. Puede tener aspecto cerebriforme.
T. mentagrophytes		Plana, superficie pulverulenta o granular, con centro elevado
T. rubrum		Planas, con ligera elevación central de aspecto velloso, algodonoso o aterciopelado
M. canis		Planas, discoideas, con micelio aéreo corto, con aspecto radiado.
M. gypseum		Colonia con abundante micelio aéreo, aterciopelado, de color crema

Las micosis causadas por dermatofitos a nivel superficial, reciben nombres clínicos en latín según se presenten en determinada parte del cuerpo, como por ejemplo: *tinea capitis* (cabeza), *tinea*

barbae (barba), *tinea cruris* (en ingle), *tinea manuum* (en manos), *tinea unguium* (en uñas, también llamada onicomicosis), *tinea pedís* (en pies) y *tinea corporis* (en el resto del cuerpo incluyendo cara).

A nivel de salud pública, conocer la epidemiología de las dermatofitosis es muy importante para poder controlar estas infecciones. Entre los factores predisponentes, podemos destacar la ocupación profesional y determinados hábitos y costumbres de los individuos. Las características epidemiológicas para cada tipo de dermatofitosis son diferentes. *Tinea capitis* afecta principalmente a niños entre tres y siete años. Se desconoce la cifra exacta de su incidencia así como los factores que predisponen al huésped a contraer esta infección (Williams *et al*. 1995, citado por Fernández-Torres 2005).

Tinea capitis puede ocasionar brotes epidémicos tanto en áreas urbanas como en colegios, mientras que en otros tipos de dermatofitosis, los brotes epidémicos son muy raros. *Tinea corporis* afecta tanto a niños como adultos; sin embargo, prevalece en personas que viven en climas húmedos y cálidos. Los factores que predisponen a contraerla incluyen: el contacto con animales de compañía (gatos o perros), ganado vacuno o caballos, condiciones de vida insalubres, uso de gimnasios, determinadas ocupaciones (agricultores y jardineros) e individuos con diabetes mellitus o infectados con VIH (Weeks *et al.* 2003, citado por Fernández-Torres 2005).

Tinea unguium afecta a un 15-20% de individuos entre cuarenta y sesenta años alcanzando una incidencia de hasta el 48% entre la población mayor de setenta años (Roseeuw *et al.* 1999). En niños, esta afección es menos frecuente con un rango de prevalencia mundial entre 0-2.6% (Gupta 1997, citado por Fernández-Torres 2005).

1.6 Antimicótios empleados para el control de hongos dermatofitos

Dentro de la gama de medicamentos comercializados para el manejo y control de las dermatofitosis, se encuentran productos de uso tópico y oral, clasificados en familias químicas (tomado y modificado de Fernández-Torres, 2005).

Azoles

Características: Los azoles constituyen un grupo de compuestos sintéticos formados por anillos heteropentacíclicos con átomos de nitrógeno unidos, a su vez, mediante átomos de hidrógeno a otros anillos aromáticos. Los azoles pueden ser imidazoles o triazoles, según tengan dos o tres atómos de nitrógeno en su anillo respectivamente.

Mecanismo de acción: Los azoles inhiben la actividad de la enzima 14-a-desmetilasa bloqueando la desmetilación de lanosterol a ergosterol, componente principal de la membrana celular de los hongos. Como consecuencia de ello, se altera la membrana celular y se acumulan compuestos no desmetilados que inhiben el crecimiento fúngico.
Ejemplos: clotrimazol, ketoconazol, fluconazol, voriconazol, ravuconazol.

Alilaminas

Características: Son compuestos altamente lipofílicos que alcanzan concentraciones terapéuticas en tejido adiposo, uñas y piel, por lo que están indicados principalmente en el tratamiento de las dermatomicosis (Elewski 1998, citado por Fernández-Torres, 2005). Son compuestos con baja toxicidad.

Mecanismo de acción: El mecanismo de acción de las alilaminas consiste en la inhibición de la actividad de la enzima escualeno-epoxidasa, impidiendo la síntesis del lanosterol (actividad fungistática). Por tanto, la vía enzimática es bloqueada en un paso anterior al inhibido por los azoles. Como resultado de ello, el escualeno acumulado en la célula fúngica provoca la muerte celular (actividad fungicida).
Ejemplos: terbinafina, naftifina.

Derivados de morfolina

Características. Estos compuestos tienen actividad fungistática y fungicida.
Mecanismo de acción. Actúan bloqueando la producción del ergosterol e inhibiendo la enzima 14-alfa-reductasa y la 7-delta-8-isomerasa.

Ejemplos: amorolfina

Otros

Griseofulvina

La griseofulvina fue el primer antifúngico oral utilizado en el tratamiento de las dermatofitosis. Es un antibiótico natural producido por varias especies de *Penicillium*, especialmente *P. griseofulvum*. Su espectro está restringido a dermatofitos y carece de actividad frente a otros hongos patógenos. Su acción es fungistática al interrumpir la metafase de la división celular. Se administra por vía oral en forma de comprimidos.

Ciclopirox olamina

Pertenece a la familia de las hidroxipiridonas. Ciclopirox olamina es un antifúngico sintético dotado de un buen poder de penetración en la dermis. Actúa inhibiendo la absorción de iones de potasio, fosfatos y aminoácidos. Está indicada en el tratamiento de las dermatofitosis de piel y uñas, pitiriasis versicolor y candidiasis vaginal (Gupta *et al.* 2004, citado por Fernández-Torres, 2005). Se comercializa como crema, solución, gel y laca de uñas al 8%.

2. Materiales y métodos

2.1 Establecimiento de suspensiones celulares de *A. indica*

2.1.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Azadirachta indica* A. Juss provenientes del Centro de Producción Cotové del municipio de Santafé de Antioquia, Antioquia, Colombia, y del vivero de la Universidad Nacional en Medellín, Antioquia, Colombia, como fuente de explantes y material vegetal para los cultivos de tejido *in vitro* y las extracciones. Esta parte experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

2.1.2 Selección y desinfección de explantes

Se utilizaron hojas juveniles y tejido cotiledonar de semillas de *A. indica*. Las hojas fueron desinfectadas superficialmente por inmersión en etanol al 70% (v/v) por un minuto y posteriormente en hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 15 minutos, luego se lavaron con abundante agua destilada estéril. Las semillas en primer lugar fueron esterilizadas con endocarpio en etanol al 70% por un minuto, seguidamente en hipoclorito de sodio 5% durante 25 minutos. Las semillas se lavaron con agua destilada estéril y se les removió el endocarpio. Posteriormente, se hizo una nueva desinfección de la semilla desnuda con hipoclorito al 1% por 15 minutos. Toda la operación de desinfección se realizó dentro de una cámara de flujo laminar.

2.1.3 Iniciación y mantenimiento de callos friables

Se empleó un medio semisólido para la formación de callos definido por Kerneay *et al*. (1994). El medio consiste en sales básicas Murashige & Skoog (MS, 1962) con orgánicos mínimos (MS, 1962)

(MSMO, Sigma M 6899), sacarosa 3% (p/v), glicina 2mg/L, ácido nicotínico 0.5mg/L, Piridoxina-HCl 0.5mg/L y tiamina-HCl 0.1mg/L, y suplementado con ácido indol butírico (IBA) 19,7µM (4 mg/L) y 6-benzil amino purina (BAP) 4,44µM (1 mg/L), todo diluido en agua destilada. El pH fue ajustado a 5.8 con NaOH 1M y finalmente se agregó phytagel al 0,175% (p/v) (Sigma, P 8169). El medio preparado fue servido en frascos de compota (20mL por frasco) y esterilizado en autoclave (Estericol, Colombia) a 121 ˚C, 20 lb/pulg^2 durante 20 min.

Se sembraron los explantes de hojas y tejido cotiledonar estériles en el medio de cultivo semisólido en una cabina de flujo horizontal (Compañía Control de Contaminación Colombia, C4) en condiciones asépticas. Luego, se dejaron incubando a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante las 24 horas para inducir la formación de callos friables. Una vez generados los callos, se subcultivaron en medio fresco cada 4 semanas para mantener su viabilidad.

2.1.4 Suspensiones celulares de *A. indica*

Las suspensiones celulares de *A. indica* se iniciaron por transferencia en forma aséptica de una cantidad estimada de 500mg de callo friable de 8 semanas de edad a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio líquido MS con sacarosa 3% (p/v), glicina 2mg/L, ácido nicotínico 0.5mg/L, piridoxina-HCl 0.5mg/L y tiamina-HCl 0.1mg/L, ajustado a un pH de 5.8 y suplementado con los reguladores hormonales IBA 8mg/L y BAP 4mg/L. La producción de biomasa producida en los matraces Erlenmeyer fue evaluada mediante dos sistemas de cultivo:

- Tapados con tapones de algodón
- Tapados con papel aluminio y vinilpel

Las suspensiones fueron incubadas en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente a 120rpm en un agitador orbital (Centricol, Colombia). El crecimiento de las suspensiones fue medido semanalmente marcando el nivel del sedimento celular, dando la pauta para cambiar el medio líquido viejo por uno nuevo. Esta operación se hizo aproximadamente cada 2 semanas, dejando en sedimentación las suspensiones para retirar el medio de cultivo viejo, y agregando un medio líquido fresco y estéril a las células remanentes o sedimentadas (Mordüe *et al.*, 1993).

Figura 1. Esquema de obtención de biomasa celular de *A. indica*

2.2 Fase extractiva

2.2.1 Obtención de extractos

Una vez obtenida una cantidad considerable de biomasa celular en los matraces Erlenmeyer, se procedió a filtrarla en un montaje con papel de filtro, embudo Büchner, matraz Kitasato y bomba de vacío. Posteriormente, esta biomasa fue liofilizada en un equipo Labconco Freezone 6 (USA) durante 24 horas a -36°C y 10^{-3}Mbar para extraer toda el agua, se rotuló y se guardó herméticamente a -20°C en oscuridad hasta su empleo en la fase extractiva. El protocolo para la obtención de los extractos consistió en sucesivas percolaciones hasta agotar la biomasa. La biomasa celular liofilizada (39g) fue sumergida hasta saturación (300mL) en MeOH y reposada durante dos días, sellada y en oscuridad. El extracto resultante se filtró y concentró al vacío en un rotoevaporador R-3000 Büchi a 42°C hasta 50mL. Este procedimiento se repitió varias veces hasta extenuar la biomasa. Los extractos metanólicos resultantes de la continua inmersión de la biomasa fueron concentrados hasta obtener una pasta seca (extracto crudo), la cual fue sellada, rotulada y guardada hasta su empleo en los bioensayos y los procedimientos cromatográficos.

La obtención del extracto de hojas de *A. indica* se realizó siguiendo el protocolo de Suresh *et al.,* (1997). A 24g de hojas frescas de *A. indica* provenientes de un ejemplar del vivero de la UNAL-Medellín se les adicionaron 500mL de hexano, dejándose reposar por 16 horas en oscuridad. El extracto resultante se filtró y se concentró hasta 200mL en rotoevaporador, se extrajo con 100mL de MeOH 95% x 3 y se dividió en un embudo de separación, descartándose la fase hexánica. La fase metanólica fue rotoevaporada hasta sequedad, sellada, rotulada y guardada hasta su empleo en los bioensayos y los procedimientos cromatográficos.

La obtención del extracto de aceite de semillas se realizó siguiendo el protocolo de Govindachari *et al.,* (1998). El aceite de semillas (Biotropical, Colombia) fue sometido a una partición hexano – metanol en un embudo de separación repetidamente hasta extenuar el aceite. La fase hexánica (correspondiente a aceites) fue descartada, y la fase metanólica fue rotoevaporada hasta sequedad, sellada, rotulada y guardada hasta su empleo en los bioensayos y los procedimientos cromatográficos.

2.2.2 Fraccionamiento del extracto crudo de biomasa celular.

El fraccionamiento del extracto crudo de biomasa celular se efectuó con base en la información de Jarvis *et al.,* (1999). Se inició con 2,3g de extracto crudo de biomasa celular, el cual se mezcló homogéneamente con 30g de sílica gel de 63 – 200 micrones (Panreac) para conformar la cabeza de la columna. Posteriormente, se agregaron 60g de sílica gel a una columna cromatográfica de 50cm de altura y 2,5cm de diámetro y encima se depositó la cabeza mezclada con el extracto. Se hizo una programación escalonada de fraccionamiento con solventes de diferente polaridad iniciando con hexano (H), mezcla de hexano – acetato de etilo (Ac), y finalizando con MeOH de la siguiente forma:

1: 350mL Hexano	6: 350mL H:Ac 2:8
2: 450mL H:Ac 7:3	7: 350mL H:Ac 1:9
3: 650mL H:Ac 6:4	8: 300mL Ac
4: 275mL H.Ac 5:5	9: 300mL MeOH
5: 550mL H:Ac 3:7	Fin del fraccionamiento

Las fracciones fueron colectadas en frascos Erlenmeyer y llevadas a sequedad, selladas y guardadas para su uso posterior en los bioensayos y el procedimiento en HPLC.

Figura 2. Diagrama del procedimiento de extracción de biomasa celular de *A. indica*

2.2.3 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de los extractos de *A. indica*

El análisis por HPLC se realizó en un sistema Agilent 1100 para LC y LC/MS equipado con automuestreador AgilentG1313A, una bomba cuaternaria agilent G1311a, un detector de arreglo de diodos (DAD) UV visible Agilent G1311B. Los datos se analizaron con el software LCMS chemStation Rev. A.09.03 [1417]. La separación se realizó con una columna C18 LichroCART 125-4 LiChrosper 100 RP-18 (125 mm x 4.6 mm D.I, diámetro de poro 5 µm) (Merck, Alemania).

El flujo de la fase móvil fue de 1.0mL/ min y la composición se controló mediante un programa de gradiente iniciado en acetonitrilo/agua (ACN/ H_2O) 35:65 v/v incrementado a 45:55 ACN/H_2O

(minuto 10), 70:30 ACN/ H_2O (minuto 11) y retornado a 35:65 ACN/ H_2O (minuto 14 a minuto 25). El volumen de inyección fue de 50 µL, y la concentración de la muestra 4mg/mL. El análisis se registró a una longitud de onda de 213 nm durante 25 min.

2.3 Bioensayos

2.3.1 Aislamientos de hongos dermatofitos

Los aislamientos de hongos dermatofitos fueron obtenidos a partir de pacientes con diferentes dermatofitosis remitidos al Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Estos aislamientos fueron examinados mediante pruebas bioquímicas (como urea y bromocresol) y la observación de sus características macroscópicas (aspecto de las colonias) y microscópicas (tipos de hifas y conidias), siguiendo los criterios de clasificación micológica de Kane *et al.* (1997) y Rebell (1977). Una vez establecida la especie de hongo dermatofito, se consiguieron cultivos puros por repiques sucesivos de las colonias en agar Sabouraud. De esta forma se conformó un cepario de trabajo compuesto así:

Epidermophyton floccosum: tres aislamientos identificados así:

03086: aislado de escamas de planta del pie, lesión pruriginosa, con ardor, compromiso interdigital, fisuras y vesículas
09018: aislado de escamas de plantas del pie e interdigital, lesión descamativa, húmeda y pruriginosa.
10016: aislado de plantas del pie e interdigital, lesión con prurito, descamativa, con ardor.

Trichophyton rubrum: cinco aislamientos identificados así:

03073: aislado de detritos de uña de pie, con compromiso proximal.
06026: aislado de detritos de uña de pie, compromiso distal, onicorrexis, onicocriptosis.
06034: aislado de escamas de ingle y glúteos, lesiones con prurito y descamativas, con borde activo, eritematosa, de tipo moneda.
10016: aislado de escamas de ingle, lesión tipo moneda con borde activo, con prurito.
08071: aislado de detritos de uña de pie, compromiso proximal.

Trichophyton mentagrophytes: cinco aislamientos, identificados así:

03071: aislado de detritos de uña de pie, hipertrofia, engrosada, hiperqueratosis

03072: aislado de detritos de uña de pie, lesión dolorosa y con perionixis.

04015: aislado de bigote, lesión descamativa, con prurito, vesículas y borde activo

11021: aislado de detritos de uña de pie, con engrosamiento de la lámina ungueal, onicorrexis, perionixis.

09063: aislado de barba, lesión descamativa, con prurito.

Microsporum canis: dos aislamientos identificados así:

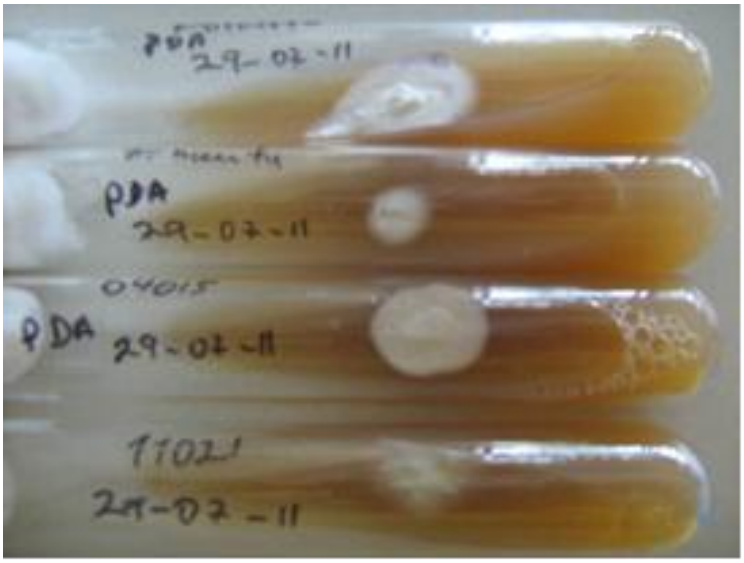
06037: aislado de escamas de cuero cabelludo, alopecia, pruriginosa.

03029: aislado de escamas de cuero cabelludo, lesión descamativa y con alopecia.

Microsporum gypseum: un aislamiento identificado así:

08077: aislado de cuero cabelludo, foliculitis, costras amarillentas.

Figura 3. Cultivo de *T. mentagrophytes* en PDA para la producción de conidias



2.3.2 Obtención del inóculo de suspensión de conidias

Los 16 cultivos puros de dermatofitos fueron repicados en medios de cultivo recomendados para estimular la producción de conidias, según sugerencias del personal del Laboratorio de Micología Médica de la Universidad de Antioquia. De esta forma se determinaron los mejores medios para inducir la producción de conidias así:

E. floccosum: PDA.
T. rubrum: PDA
T. mentagrophytes: PDA
M. canis: arroz
M. gypseum: arroz

Las colonias de 7 días de crecimiento fueron cubiertas con 1 a 3mL de solución salina estéril al 0,85% p/v y suavemente removidas con un asa estéril para liberar las conidias en la solución. Se transfirieron alícuotas de la suspensión de conidias resultante a un volumen conocido de azul de lactofenol para hacer tinción de las conidias y proceder al conteo en cámara de Neubauer. Se aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración en Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

$$UFC/mL = X/4*10000*Fd$$

Fd = factor de dilución
X = número de conidias por cuadrante en la cámara de Neubauer

Conocida la concentración de conidias por unidad de volumen, se verificó su viabilidad depositando 10µL de la suspensión en agar Sabouraud, y se contaron las colonias crecidas al cabo de 4 días. Esto dio lugar a una concentración inicial conocida, que se ajustó a una concentración final de entre 1,0 – 3,0x10^3 UFC/mL.

Figura 4. Conteo de viabilidad de conidias del inóculo (Foto: Daniel Ospina)

2.3.3 Ensayos de actividad inhibitoria de extractos de *A. indica*

El inóculo obtenido anteriormente en conjunto con los extractos a ser evaluados fueron cultivados en placas de 96 pozos de fondo en U (Falcon, USA) a 35ºC durante 7 días en incubadora (Centricol, Colombia), en condiciones de oscuridad y sin agitación, siguiendo la técnica de microdilución en caldo M38-A2 (CLSI, 2008). El medio de cultivo empleado fue RPMI 1640 (GIBCO^{TM}) suplementado con glucosa 2%, HEPES como amortiguador de pH y sin bicarbonato de sodio.

Se prepararon 10 diluciones dobles seriadas a partir de una concentración madre de extracto de biomasa celular a 1x10^6 µg/mL en MeOH. Cada dilución se combinó con DMSO en proporción 1:2 antes de llevarla a volumen final en proporción 1:50 en el medio de cultivo RPMI 1640, con su respectivo control de solvente (MeOH:DMSO 1:2) y de esterilidad. De esta forma se obtuvo un rango de concentraciones del extracto de biomasa de 5000µg/mL a 9,7µg/mL dispensándose 100µL en cada pozo de la placa. Lo propio se hizo con el control positivo (Terbinafina), en un rango de concentraciones entre 1 a 0,0039µg/mL, con el extracto de hojas (200 a 0,39µg/mL) y de aceite de semillas (5000 a 9,7µg/mL). De las 9 fracciones del extracto crudo de biomasa celular, fueron combinadas 6 fracciones debido a su semejanza en cuanto a polaridad; también fueron evaluadas en un rango de concentraciones menor al del extracto crudo debido a la poca cantidad obtenida.

Figura 5. Distribución de las concentraciones en las placas de 96 pozos

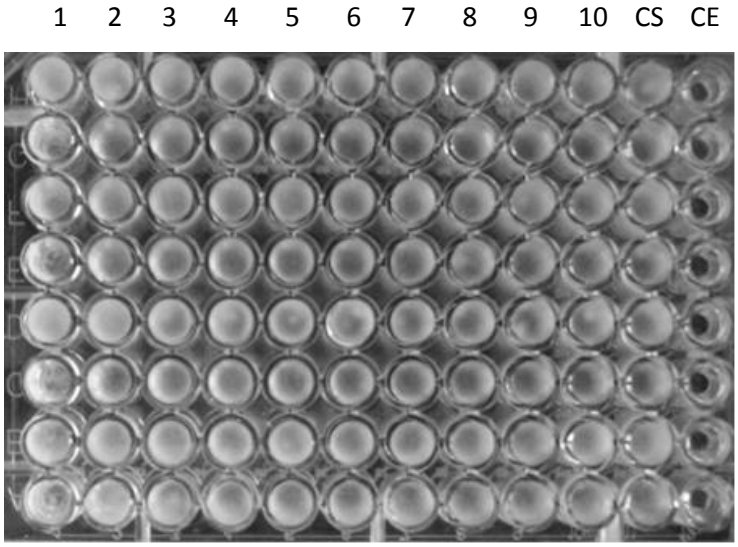


Tabla 7. Rango de concentraciones de los extractos evaluados

Fila	Tipo de extracto (µg/mL)								
	Biomasa Celular	Hojas	Aceite de semillas	Fracción 6.2	Fracción 6.3	Fracción 6.5	Fracción 6.7	Fracción 6.9	Control positivo (Terbinafina)
1	5000	200	5000	3000	1750	2500	1000	3500	1
2	2500	100	2500	1500	875	1250	500	1750	0.5
3	1250	50	1250	750	437	625	250	875	0.25
4	625	25	625	375	218	312	125	437	0.125
5	312	12.5	312	187	109	156	62	218	0.062
6	156	6.25	156	94	54	78	31	109	0.031
7	78	3.12	78	47	27	39	15	54	0.015
8	39	1.56	39	23	13	19	8	27	0.007
9	19	0.78	19	12	7	9	4	13	0.003
10	9	0.39	9	5.8	3	4.5	2	7	0.002
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CE	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenciones: CS. Control Solvente.CE. Control Esterilidad.

Una vez preparadas las placas con el rango de concentraciones de cada extracto y de terbinafina en el medio de cultivo RPMI 1640, se procedió a inocular cada pozo con 100µL de la suspensión de conidias ajustada previamente. Las placas fueron selladas con vinilpel e incubadas como se refirió inicialmente.

El porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos fue estimado visualmente comparando la turbidez del control sin extracto con el del tratamiento, asignándole un valor en porcentaje, adaptando la metodología de Fernández-Torres (2005). La Concentración Mínima Inhibitoria fue establecida como aquella en la que la turbidez fue nula, es decir, igual a la del control sin extracto (crecimiento nulo del hongo).

1. pocillos ópticamente claros, sin crecimiento fúngico (100% de inhibición de crecimiento)
2. escaso crecimiento (75 - 90% de inhibición de crecimiento)
3. moderado crecimiento (50 - 75% de inhibición de crecimiento)
4. abundante crecimiento (15 - 50% de inhibición de crecimiento)
5. crecimiento igual que el pocillo control de crecimiento (0% de inhibición de crecimiento)

2.3.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron con el software SAS (Statistical Analysis System) utilizando la prueba del rango múltiple de Duncan, en un diseño completamente aleatorizado, estableciendo comparaciones entre el tipo de extracto, la concentración y la especie de hongo con base en la variable de respuesta (porcentaje de inhibición).

3. Resultados y discusión

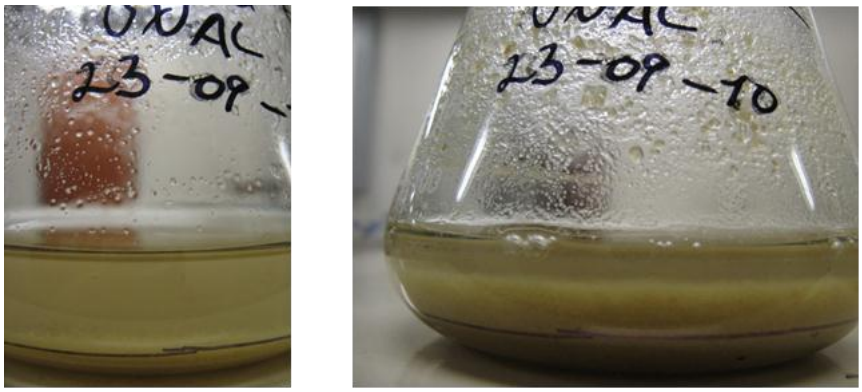
3.1 Establecimiento de suspensiones celulares de *A. indica*

Se emplearon tres tipos de materiales o líneas celulares provenientes de diferentes fuentes para comparar la producción de biomasa:

1. Semillas de plantas maduras de *Azadirachta indica* A. Juss provenientes del Centro de Producción Cotové de la Universidad Nacional, ubicado en el municipio de Santafé de Antioquia (en adelante denominado Cotové).
2. Hojas de vitroplantas de un material proveniente de México cultivadas en el Laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (en adelante denominado México).
3. Hojas de plantas juveniles del vivero de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (en adelante denominado UNAL).

De igual forma, para cada línea celular se aplicaron los dos sistemas de cultivo mencionados anteriormente, es decir, matraces Erlenmeyer tapados con tapones de aluminio y de algodón.

Figura 6. Acumulación de biomasa celular en los cultivos en suspensión.



En la siguiente tabla se muestra la producción de biomasa por matraz según la línea celular y el tipo de tapón empleado.

Tabla 8. Peso seco de biomasa cosechada de suspensiones celulares

UNAL		
	Tapón algodón	**Tapón aluminio**
Numero de matraces	29	7
Biomasa cosechada (g)	25,8	3,64
Producción de biomasa x matraz (g/matraz)	0,88	0,52
México		
Numero de matraces	28	6
Biomasa cosechada (g)	21,67	3,05
Producción de biomasa x matraz (g/matraz)	0,77	0,50
Cotové		
Numero de matraces	19	24
Biomasa cosechada (g)	13,78	14,32
Producción de biomasa x matraz (g/matraz)	0,72	0,61
Promedio biomasa x matraz	**0,79**	**0,54**

La información de la tabla anterior muestra que la cantidad de biomasa obtenida por matraz fue mayor al emplearse el tapón de algodón que al emplearse tapón de aluminio, lo cual es consecuente con reportes anteriores (Orozco 2009). Como señala este autor, a pesar de que algunos cultivos de células en suspensión (*Beta vulgaris, Uncaria tomentosa*) pueden subcultivarse por largo tiempo en matraces con tapón de aluminio, las células en suspensión de *A. indica* exhiben una demanda de oxígeno mayor, por lo cual su viabilidad celular y pH disminuyeron empleando este tipo de tapones. Por el contrario, al emplearse tapones de algodón, la viabilidad celular se mantuvo en un nivel superior al 60% y el pH en 5,4. Los resultados actuales muestran que el empleo de tapones de algodón satisface la demanda de oxígeno de las células en suspensión de *A. indica,* lo cual redunda en una mayor acumulación de biomasa.

Por otra parte, la línea celular UNAL produjo en promedio más biomasa que las otras líneas celulares, indicando una posible diferencia en la cinética de crecimiento de las células según la procedencia del explante (Capataz, 2005). Esto puede tener relación con la expresión genética de las células de las hojas de *A. indica*, que se manifiesta a su vez en los cultivos en suspensión.

3.2 Obtención y fraccionamiento de los extractos

Se compararon los rendimientos de extracto crudo seco a partir de la cantidad de material vegetal o biomasa celular empleada, arrojando los siguientes resultados.

Tabla 9. Rendimiento de extracto crudo seco por procedencia del extracto

	Peso seco material vegetal	**Peso extracto**	**Rendimiento (%p/p)**
Biomasa celular (g)	39	3,84	9.84
Hojas (g)	24	0,094	0.39
	Volumen aceite de semilla	**Peso extracto (g)**	**Rendimiento (%p/v)**
Aceite de semilla (mL)	28	2,13	7.6

El rendimiento relativamente alto de extracto metanólico obtenido a partir de biomasa celular ya había sido reportado por Orozco (2009), quien de células secas de *A. indica* de un biorreactor consiguió 0.283g por gramo de células secas, para un rendimiento de 28.3%. Con base en el metabolismo conocido de *A. indica*, es posible que el extracto obtenido contenga principalmente terpenos, terpenoides y otros fitoesteroles (David y Dayanandan, 1997, citados por Orozco, 2009).

Por otra parte, el rendimiento del extracto de hojas corresponde aproximadamente con el de Suresh *et al.* (1997), quienes a partir de 5kg de hojas frescas obtuvieron 16g de la fracción metanólica, para un rendimiento del 0.32%. No se mencionan datos sobre el rendimiento de la fracción metanólica extraída de aceite de semillas de neem en el artículo de referencia (Govindachari *et al.,* 1998).

El fraccionamiento por cromatografía en columna de sílica gel del extracto crudo de biomasa dio como resultado 9 fracciones, cuya polaridad iba en aumento a medida que variaba la relación Hexano – Acetato de etilo, lo cual explica la variedad de tonalidades encontrada en las fracciones (Figura 7).

Figura 7. Fracciones del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica* y columna empleada. De izquierda a derecha: **1**: Hexano, **2**: H:Ac 7:3, **3**: H:Ac 6:4, **4**: H:Ac 5:5, **5**: H:Ac 3:7, **6**: H:Ac 2:8, **7**: H:Ac 1:9, **8**: Ac etato de etilo, **9**: MeOH. (Foto: Daniel Ospina)

Al secar las fracciones obtenidas por separación cromatográfica en columna de sílica gel, se hallaron los respectivos pesos de fracción seca, los cuales se relacionan en la siguiente tabla.

Tabla 10. Peso de las fracciones separadas del extracto crudo de biomasa

Compuestos posibles (*)	Peso (mg)	Fracción
Ninguno	0	**1**
Fitoesteroles, triterpenos	122	**2**
Fitoesteroles, triterpenos	43.8	**3**
Compuestos polares, terpenoides	21.5	**4**
Compuestos polares, terpenoides	51.3	**5**
Compuestos polares, terpenoides	16.5	**6**
Compuestos polares, terpenoides	24.9	**7**
Compuestos polares, terpenoides	29.4	**8**
Compuestos polares, terpenoides	1881.4	**9**

(*) Adaptado de Orozco, 2009.

Los resultados muestran que los compuestos menos polares se obtuvieron en menor cantidad, al punto de que la fracción 1 (Hexano) no arrastró ningún compuesto. Lo anterior puede explicarse desde la naturaleza de las células de *A. indica* en suspensión, las cuales a diferencia de los tejidos de la planta en condiciones medioambientales, no producen el característico aceite que abunda en las semillas. Aunque la planta produce azadirachtina aún en ausencia de un ataque de insectos, en cultivos celulares de *A. indica* también se ha reportado su producción pero no necesariamente asociada a cadenas de ácidos grasos. Obsérvese la diferencia con los resultados de Jarvis *et al.* (1999), quienes en la fracción hexánica obtuvieron 555mg (correspondientes a aceite residual) al realizar la extracción a partir de semillas de neem, fuente tradicional de azadirachtina.

3.3 Análisis por HPLC de los extractos de *A. indica*

El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), reveló un perfil diferente de cada uno de los extractos analizados (biomasa celular, hojas y aceite de semilla). Teniendo en cuenta que la concentración de la muestra inyectada fue igual para cada extracto (4mg/mL), se observan perfiles diferentes en cuanto a la concentración de compuestos.

Figura 8. Cromatogramas de HPLC del extracto de biomasa celular. Izq., 213nm; der., 218nm.

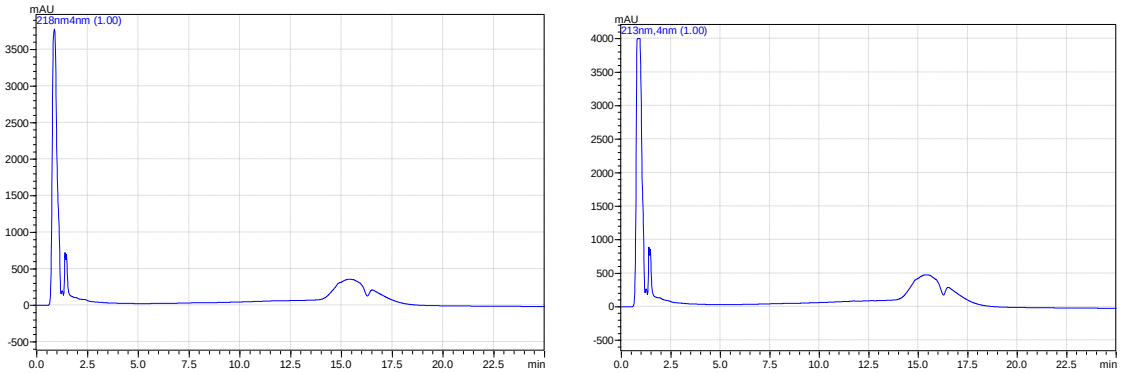


Figura 9. Cromatogramas de HPLC del extracto de aceite de semillas. Izq., 213nm; der., 218nm.

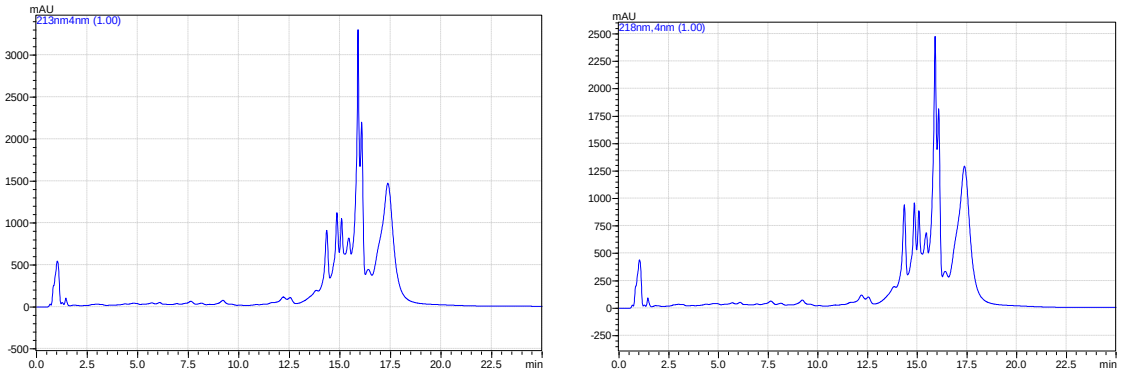
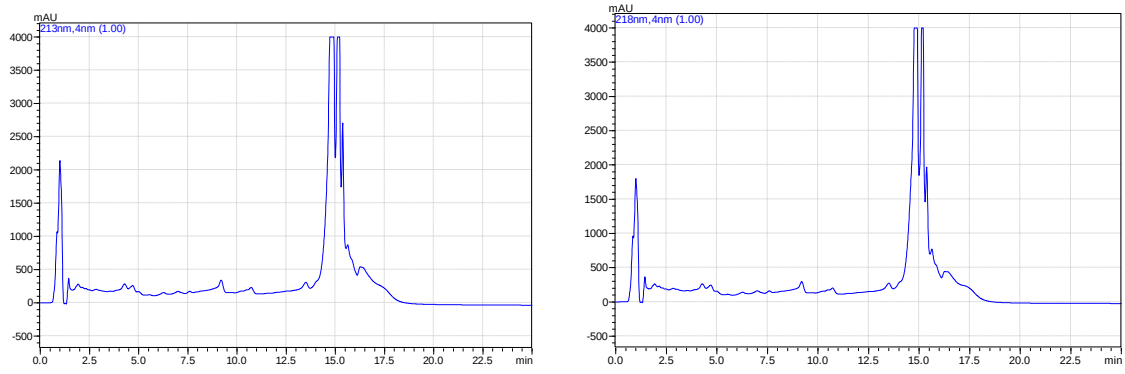


Figura 10. Cromatogramas de HPLC del extracto de hojas. Izq., 213nm; der., 218nm.



Como es apreciable en las figuras anteriores, hubo diferencias notables en los perfiles cromatográficos de cada extracto. Sin embargo, nótese la presencia de un pico hacia los 15 minutos en todos los perfiles, mucho más acentuado en el extracto de hojas y aceite de semillas que en el de biomasa. Según Suresh *et al.* (1997), los picos presentes en este rango de tiempo corresponden a mezclas complejas de compuestos. No obstante, Orozco (2009) y Mahmoud (2011) señalan que los compuestos relacionados a la azadirachtina se presentan en un rango dentro de los primeros 9 minutos. Siendo esto así, podría inferirse que las células en suspensión de *A. indica* no están produciendo compuestos similares a la azadirachtina. La presencia de este pico en común a los 15 minutos en todos los extractos analizados, puede ser señal entonces de la presencia de compuestos mezclados, no identificados aún debido a la poca cantidad obtenida (Mahmoud *et al.,* 2011). Esto se verifica en el trabajo de Jarvis *et al.* (1999).

En cualquier caso, la evidencia actual de la actividad antifúngica de los extractos evaluados se relaciona directamente con su perfil cromatográfico, puesto que el mayor porcentaje de inhibición se presentó con los que poseían la señal más definida en los 15 minutos, es decir, los extractos de hojas y de aceite de semillas, como se ilustra en detalle más adelante.

3.4 Bioensayos

El presente estudio es el primer reporte en cuanto a la determinación de la actividad antifúngica de extractos de biomasa celular de *A. indica* mediante un método de referencia. Ésta técnica de microdilución en caldo fue adecuada para evaluar su actividad antifúngica. Los resultados mostraron en mayor o menor grado un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los 16 aislamientos de dermatofitos, dependiendo del tipo de extracto y la concentración. No hubo diferencias significativas entre la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI, concentración a la cual el desarrollo del hongo fue completamente inhibido) y concentraciones mayores empleadas. Entre las concentraciones por debajo de esta dosis se detectaron algunas diferencias significativas, pero en general el crecimiento fue igual al del control sin extracto. En las siguientes figuras se muestran los ensayos de actividad antifúngica realizados en placas de 96 pozos; turbidez blanquecina corresponde a crecimiento del hongo; pozos claros o traslúcidos corresponden a escaso o nulo crecimiento. Se indica en la segunda columna la CMI (aquella donde no se apreció crecimiento alguno del hongo).

Figura 11. Extracto crudo de biomasa celular de *A. indica*

Aislamiento	CMI	CS	9	19	39	78	156	312	625	1250	2500	5000
03071	2500											
03072	2500											
04015	2500											
11021	2500											
09063	2500											
03073	2500											
06026	2500											
06034	2500											

Aislamiento	CMI	CS	9	19	39	78	156	312	625	1250	2500	5000
10016	5000											
No inoculada	-											
03086	2500											
09018	2500											
12016	2500											
06037	2500											
08077	N.D.											

Figura 12. Fracción 6.2 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica*

Aislamiento	CMI	CS	5.8	12	23	47	94	187	375	750	1500	3000
03071	750											
03072	375											
04015	3000											
11021	3000											
09063	1500											
03073	N.D.											
06026	3000											
06034	750											

Aislamiento	CMI	CS	5.8	12	23	47	94	187	375	750	1500	3000
10016	3000											
No inoculada	-											
03086	3000											
09018	750											
12016	3000											
06037	375											
08077	N.D.											

Figura 13. Fracción 6.3 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica*

Aislamiento	CMI	CS	3	7	13	27	54	109	218	437	875	1750
03071	218											
03072	109											
04015	218											
11021	109											
09063	218											
03073	218											
06026	109											
06034	109											

Aislamiento	CMI	CS	3	7	13	27	54	109	218	437	875	1750
10016	218											
No inoculada	-											
03086	218											
09018	218											
12016	218											
06037	109											
08077	1750											

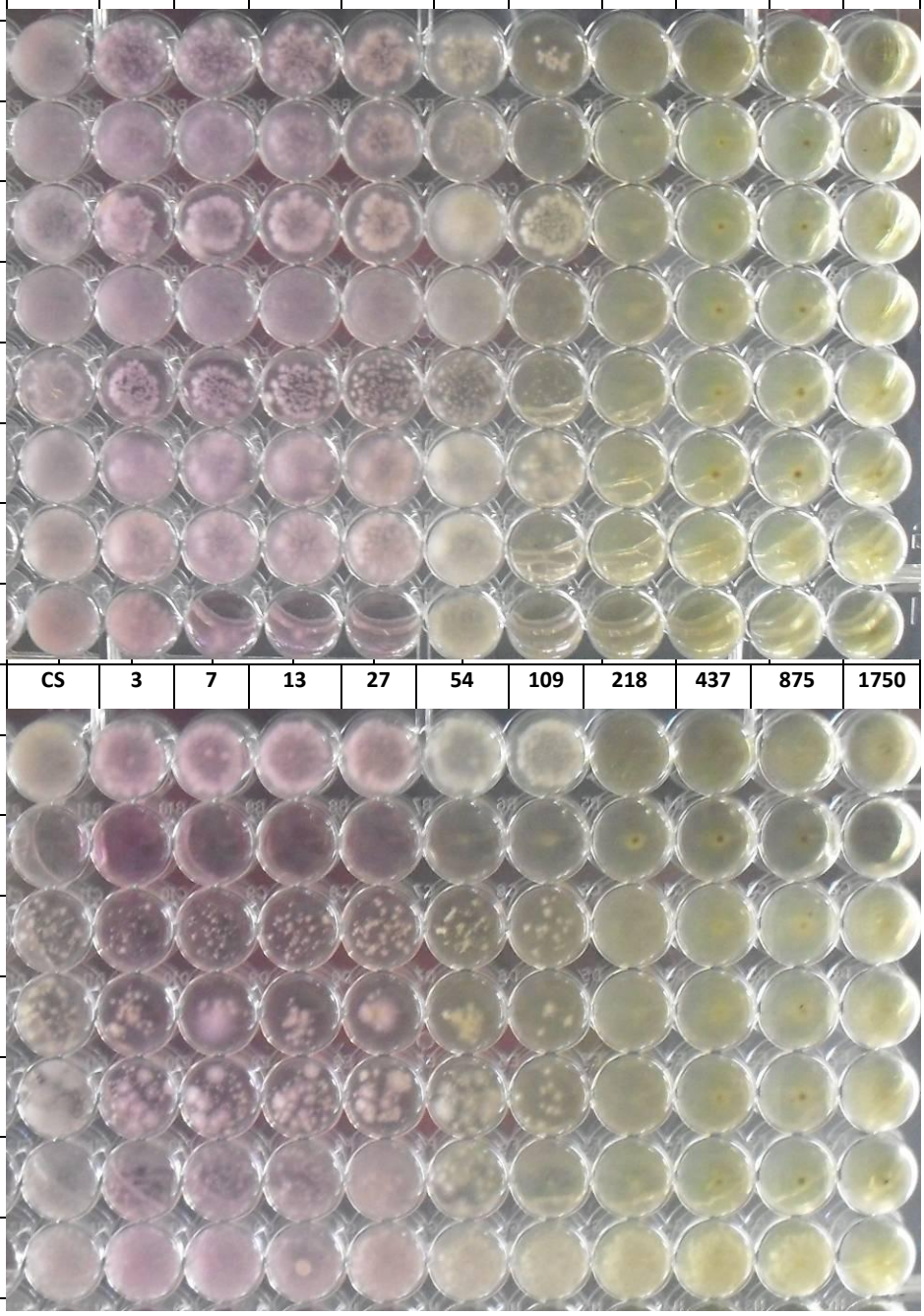


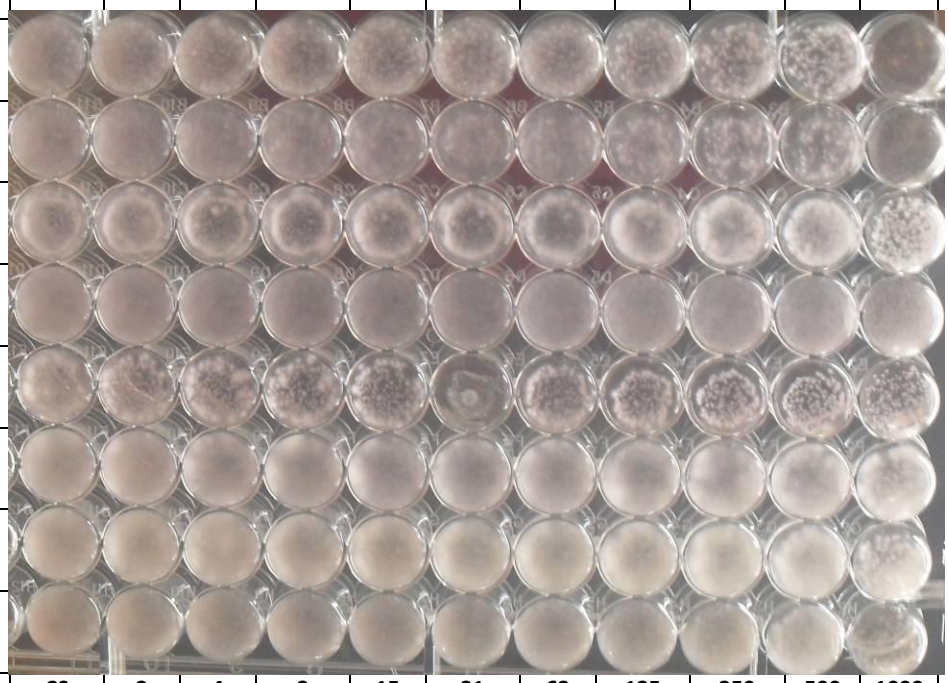
Figura 14. Fracción 6.5 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica*

Aislamiento	CMI	CS	4.5	9	19	39	78	156	312	625	1250	2500
03071	2500											
03072	2500											
04015	2500											
11021	2500											
09063	2500											
03073	2500											
06026	2500											
06034	2500											

Aislamiento	CMI	CS	4.5	9	19	39	78	156	312	625	1250	2500
10016	2500											
No inoculada	-											
03086	N.D.											
09018	N.D.											
12016	N.D.											
06037	2500											
08077	N.D.											

Figura 15. Fracción 6.7 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica*

Aislamiento	CMI	CS	2	4	8	15	31	62	125	250	500	1000
03071	1000											
03072	1000											
04015	N.D.											
11021	N.D.											
09063	N.D.											
03073	N.D.											
06026	N.D.											
06034	N.D.											



Aislamiento	CMI	CS	2	4	8	15	31	62	125	250	500	1000
10016	N.D.											
No inoculada	-											
03086	N.D.											
09018	N.D.											
12016	N.D.											
06037	N.D.											
08077	N.D.											

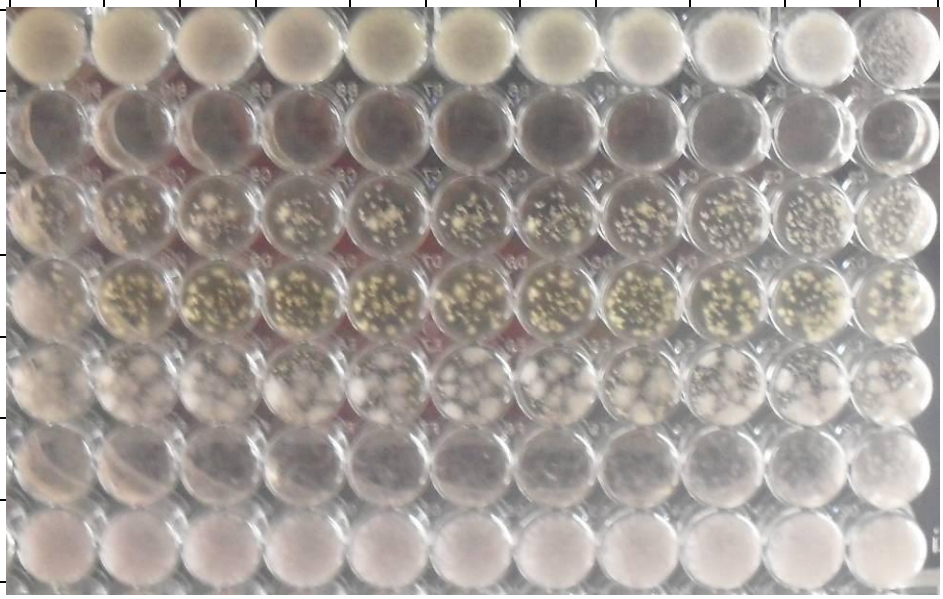


Figura 16. Fracción 6.9 del extracto crudo de biomasa celular de *A. indica*

Aislamiento	CMI	CS	7	13	27	54	109	218	437	875	1750	3500
03071	N.D.											
03072	N.D.											
04015	N.D.											
11021	N.D.											
09063	N.D.											
03073	N.D.											
06026	3500											
06034	3500											

Aislamiento	CMI	CS	7	13	27	54	109	218	437	875	1750	3500
10016	N.D.											
No inoculada	-											
03086	N.D.											
09018	N.D.											
12016	N.D.											
06037	3500											
08077	N.D.											

Figura 17. Extracto de hojas de *A. indica*

Aislamiento	CMI	CS	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200
03071	100											
03072	100											
04015	200											
11021	200											
09063	100											
03073	200											
06026	200											
06034	100											

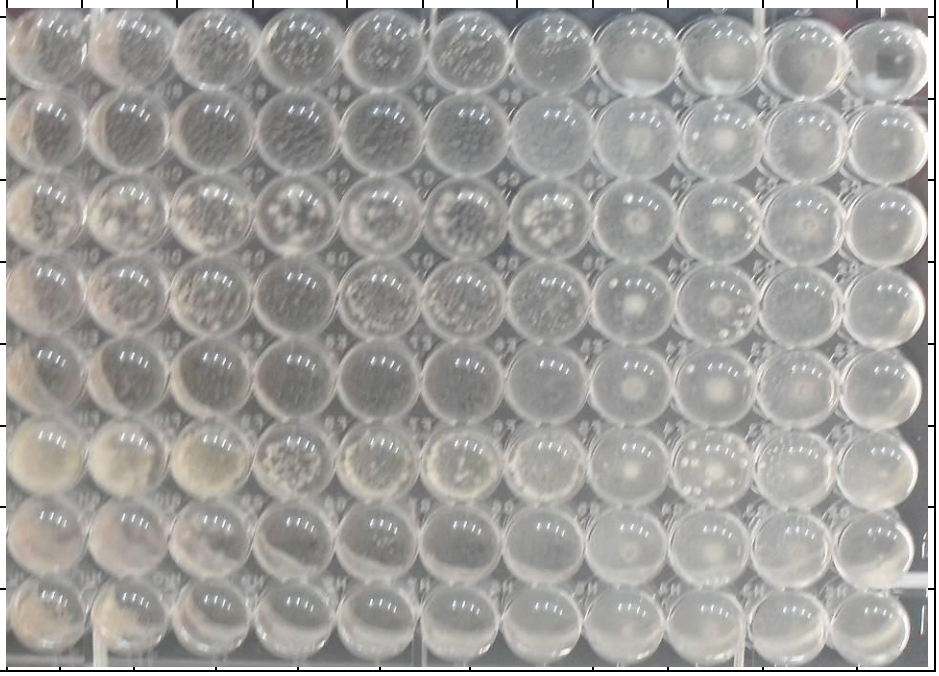
Aislamiento	CMI	CS	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200
10016	100											
No inoculada	-											
03086	100											
09018	100											
12016	100											
06037	50											
08077	N.D.											

Figura 18. Control positivo (Terbinafina)

Aislamiento	CMI	CS	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
03071	0.0313											
03072	0.0156											
04015	0.0313											
11021	0.0078											
09063	0.0156											
03073	0.0313											
06026	0.0039											
06034	0.0313											

Aislamiento	CMI	CS	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
10016	0.0156											
No inoculad	-											
03086	0.0313											
09018	0.0156											
12016	0.0313											
06037	0.0039											
08077	N.D.											

Figura 19. Extracto de aceite de semilla

Aislamiento	CMI	CS	9	19	39	78	156	312	625	1250	2500	5000
03071	1250											
03072	2500											
04015	1250											
11021	1250											
09063	1250											
03073	625											
06026	625											
06034	N.D.											

Convenciones: CS. Control Solvente. CMI. Concentración Mínima Inhibitoria. N.D. No Detectado. Valores de concentración en µg/mL.

Dentro del rango de concentraciones desplegado entre todos los extractos, la CMI fluctuó entre 50 y 5000µg/mL; el control positivo (Terbinafina) exhibió el mayor poder antifúngico al inhibir totalmente el crecimiento hasta 0.0039µg/mL. El análisis estadístico posterior reveló que hubo diferencias significativas entre el tipo de extracto empleado, siendo la fracción 6.3 la más efectiva en cuanto al promedio del porcentaje de inhibición frente a todos los hongos evaluados. No se tuvo en cuenta el extracto de aceite de semillas debido a datos faltantes (tabla 10).

Tabla 11. Agrupamiento Duncan y diferencias significativas entre tipos de extractos.

Duncan*	Inhibición (%)	N	Extracto/fracción
A	63.848	165	Terbinafina
B	40.061	165	6.3
C	18.758	165	hojas
C	18.394	165	6.2

Tabla 11. (Continuación)

Duncan*	inhibición (%)	N	extracto/fracción
C	15.636	165	crudo de biomasa
D	7.939	165	6.5
D	5.212	165	6.9
D	1.242	165	6.7

*Valores con igual letra no difieren significativamente

Sólo se presentó una diferencia significativa entre especies de hongos dermatofitos, siendo *M. gypseum* el menos afectado en su crecimiento por la adición de extractos de *A. indica.* Lo anterior posiblemente indique una mayor resistencia de esta especie a los agentes antifúngico, lo cual concuerda en parte con lo expresado por Carrillo – Muñoz *et al.* (2008), quienes reportan una menor sensibilidad de esta especie frente a la Terbinafina respecto de otras como *T. rubrum* y *T. interdigitale,* según la media geométrica de las CMI en evaluaciones con el método M38-A2.

Tabla 12. Agrupamiento Duncan y diferencias significativas entre especie de hongo

Duncan*	Inhibición (%)	N	Hongo
A	27.273	88	*M. canis*
A	23.307	440	*T. rubrum*
A	22.773	440	*T. menta*
A	20.379	264	*E. floccosum*
B	1.989	88	*M. gypseum*

*Valores con igual letra no difieren significativamente

Los resultados anteriores permiten correlacionar la actividad antifúngica (a mayor porcentaje de inhibición mayor actividad antifúngica) con el tipo de extracto. Es interesante notar como la actividad antifúngica decrece a medida que aumenta la polaridad de las fracciones, indicando que los compuestos activos pueden encontrarse en dicha fracción. Esto podría interpretarse como contrario a lo expuesto por Govindachari *et al.* (1997), quienes reportan que la fracción no polar de extractos de aceite de neem no exhibió ningún poder antifúngico frente a los hongos evaluados, incluso promoviendo su crecimiento. Se atribuye este efecto a que dicha fracción

contenía cadenas de ácidos grasos, los cuales sirvieron como fuente de carbono para los hongos. A pesar de que la fracción 6.3 corresponde a compuestos poco polares, hace parte del extracto crudo metanólico obtenido inicialmente de la biomasa celular (que comprende, entre otros, triterpenoides) y no puede tratarse de ácidos grasos por cuanto esta clase de compuestos no tienen afinidad con el MeOH. Se infiere por tanto que el efecto inhibitorio de esta fracción es debido a la presencia de otra clase de compuestos relacionados con los triterpenoides.

Los resultados anteriores también contrastan aparentemente con los reportes de Govindachari *et al.* (1998), Suresh *et al.* (1997) y Mahmoud *et al.* (2011), quienes habían demostrado que la mezcla de fracciones exhibía una actividad antifúngica incrementada respecto a las fracciones o compuestos aislados, pero debe tenerse en cuenta que las fracciones evaluadas en este trabajo no son compuestos puros en sí, sino que siguen siendo mezclas complejas de compuestos; se requerirían procedimientos cromatográficos adicionales para lograr aislar de forma pura un compuesto presente en el extracto crudo de biomasa celular. Los resultados actuales son por tanto un indicio de que los triterpenoides evaluados en forma pura pierden actividad, mientras que en conjunto despliegan un efecto sinérgico. Se podría pensar entonces que el extracto crudo de biomasa debería poseer una actividad antifúngica mayor, pero los resultados muestran que al contrario, ésta es menor respecto a la mayoría de las fracciones. Cabe la explicación, aún sin estudios comparativos, de que existe un efecto antagónico o un enmascaramiento por la mezcla entre todas las fracciones en el extracto crudo.

Un hallazgo importante es la relación entre el poder antifúngico (expresado en el promedio del porcentaje de inhibición) y el perfil cromatográfico en HPLC, en la que se evidencia una diferencia significativa entre el extracto de hojas, aceite de semillas y de biomasa celular. Los extractos de hojas y de aceite de semillas mostraron un pico importante en los 15 minutos de corrida, mientras que éste es muy reducido en el de biomasa celular. Se cree que los compuestos con actividad antifúngica se ubican en este rango de tiempo, debido a que los extractos de hojas y aceite de semillas exhibieron CMI más bajas que el de biomasa. Lo anterior puede deberse a diferencias en el metabolismo secundario en los tres tipos de material vegetal donde se producen los compuestos bioactivos, relacionado con el hecho de que los cultivos de células en suspensión de *A. indica* se encuentran en condiciones menos estresantes o inductivas para la producción de esta clase de metabolitos con actividad antifúngica.

Compárense estos resultados con los de Suresh *et al.* (1997) quienes sugieren que la fracción metanólica del extracto de hojas contiene los compuestos responsables de la actividad antifúngica contra *P. arachidis.* El análisis en HPLC de dicho extracto muestra gran cantidad de picos definidos, entre los cuales se encuentran los compuestos nimonol e isomeldenina.

4. Conclusiones

El trabajo realizado con los extractos de *A. indica*, en particular el procedente de biomasa de suspensiones celulares, constituye el primer reporte en cuanto a la determinación de su actividad antifúngica sobre hongos dermatofitos mediante un método de referencia reproducible y aceptado. Esto confirma el potencial de esta especie para el control de enfermedades de la piel causadas por hongos dermatofitos, a partir de compuestos bioactivos producidos en sistemas de cultivos de células en suspensión.

Todos los extractos de *A. indica* exhibieron actividad antifúngica en mayor o menor grado relacionado con su perfil cromatográfico en HPLC, siendo más activos los procedentes de hojas y aceite de semillas, debido a la presencia acentuada de compuestos triterpenoides en los 15 minutos de corrida. A pesar de que el extracto de biomasa celular mostró CMI más altas, se encontró al fraccionarlo en compuestos de diferente polaridad una fracción con mayor actividad antifúngica, lo cual indica que el metabolismo de las células en suspensión de *A. indica* produce compuestos bioactivos, cuyo efecto es enmascarado en el extracto crudo por antagonismo.

La determinación de la sensibilidad *in vitro* de hongos dermatofitos frente al extracto crudo de biomasa y sus fracciones se logró mediante el método de microdilución en caldo M38-A2, lo cual permitió comparar paralelamente esta sensibilidad con la del antimicótico comercial Terbinafina. A pesar de que difirieron significativamente frente al antimicótico comercial, los extractos de *A. indica* mostraron una inhibición total del crecimiento de los hongos dermatofitos a concentraciones entre 50µg/mL y 5000µg/mL.

Dentro de las especies de dermatofitos evaluadas, *M. gypseum* mostró menos inhibición en su crecimiento, sugiriendo posibles mecanismos que lo hacen más resistente a la acción de los extractos y el antimicótico comercial.

5. Perspectivas futuras

Se afianza una vez más el potencial del cultivo de células en suspensión como productoras de metabolitos secundarios bioactivos, brindando oportunidades a nivel biotecnológico e industrial en el país. Para el caso de compuestos con actividad antifúngica contra dermatofitos, la investigación debe encaminarse hacia la obtención de líneas celulares con un metabolismo incrementado en la producción de triterpenoides, más específicamente los identificados en las fracciones menos polares de esta familia química.

Debido a que ya se cuenta con estudios referentes a la optimización de la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares de *A. indica*, como la azadirachtina, se tiene una base para establecer métodos de producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica. Igualmente, la metodología de los bioensayos es ampliamente aceptada en el mundo.

No muy lejos debe considerarse la evaluación de los compuestos activos del neem *in vivo*, formulando productos de aplicación tópica en pacientes afectados con dermatofitosis, y comparando su evolución frente a los productos comerciales.

Bibliografía

Aljabre, S.H.M., Randhawa, M.A., Akhtar, N., Alakloby, O.M., Alqurashi, A.M. y Aldossary, A. (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. Journal of Ethnopharmacology 101, Issues 1–3, 116-119.

Balakumar, S., Rajan, T., Thirunalasundari, S. (2011). Antifungal activity of *Aegle marmelos* (L.) Correa (Rutaceae) leaf extract on dermatophytes. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1, Issue 4, 309-312.

Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K. y Bandyopadhyay U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Science 82, Issue 11.

Caceres, A., Lopez R., B., Giron, M.A., Logemann, H. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. Journal of Ethnopharmacology 31, Issue 3, 263-276.

Capataz-Tafur, J. (2005). Efecto de elicitores abióticos sobre sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *Azadirachta indica* y su efecto sobre *Spodoptera sp.* Tesis Maestría en Biotecnología, Facultad De Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Carrillo-Muñoz, A.J., Giusiano, G., Cárdenes, D., Hernández-Molina, J.M., Eraso, E., Quindós, G., Guardia, C., Del Valle, O., Tur-Turg, C. y Guarro, J. (2008). Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. International Journal of Antimicrobial Agents 31, Issue 6, 540–543.

David Morgan, E. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. Bioorganic & Medicinal Chemistry 17, 4096–4105.

Dayanandan, P. y Ponsamuel, J. (2000). Ulltrastructure of terpenoid secretory cells of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). In Electron Microscopy in Medicine and Biology, P.D.Gupta and H.Yamamoto, eds. (New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.), pp. 179-195.

Fernández-Torres, B. (2005). Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos. Tesis Doctoral. Unidad de Microbiología Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques Facultat de Medicina i Ciències de la Salut Universitat Rovira i Virgili Reus, España.

Ghahfarokhi, M.S., Shokoohamiri, M.R., Amirrajab, N., Moghadasi, B., Ghajari, A., Zeini, F. *et al.* (2006). In vitro antifungal activities of *Allium cepa, Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes. Fitoterapia 77 321–323.

Govindachari, T.R., Suresh, U.G., Gopalakrishnan, G., Banumathy, B., y Masilamani, S. (1998). Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. Phytoparasitica 26, Issue 2, 109-116.

Govindachari, T. R.; Suresh, U. G.; Gopalakrishnan, G.; Masilamani, S.; Banumathi, B. (2000). Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. Fitoterapia 71 317-320.

Guimarães, K.G., Dias de Souza Filho, J., Dos Mares-Guia, T.R., Castro Braga, F. (2008). Dihydroisocoumarin from *Xyris pterygoblephara* active against dermatophyte fungi. Phytochemistry 69, Issue 2 439-444.

Gurgel, L.A., Sidrim, J.J.C., Martins, D. T., Cechinel Filho, V. y Rao V.S. (2005). In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. Journal of Ethnopharmacology 97, Issue 2, 409-412.

Jarvis, A.P., Morgan, E.D., Edwards, D.C. (1999). Rapid separation of triterpenoids from neem seed extracts. Phytochemical analysis 10, 39-43.

Kane, J; Summerbell, R; Sigler, L; Krajden, S; Land G. 1997. *Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails*. Belmont, EEUU: Star Publishing Company.

Khan, M., Wassilew, S.W., Schmutterer, H., Ascher, K.R. (1987). In Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants (eds Schmutterer, H. and Asher, K.R.), GTZ, Eschborn, Germany, 460-466.

Koroishi, A.M., Foss, S.R., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P. (2008). In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. Journal of Ethnopharmacology 117, Issue 2, 270-277.

Lee, C.W.T. y Shuler, M.L. (1991). Different shake flask closures alter gas phase composition and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell suspensions. Biotechnol. Techniq. 5, 178.

Lyer, S.R., Williamson, D. (1991). Efficacy of some plant extracts to inhibit the protease activity of *Trichophyton* species. Geobios 18, 3-6.

Mahmoud, D.A., Hassanein, N.M., Youssef, K.A., Abou Zeid, M.A. (2011). Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. Brazilian Journal of Microbiology 42, 1007-1016.

Maoz, M. y Neeman, I. (2000). Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. Journal of Ethnopharmacology 71, Issue 3, 479-482.

Mordüe, A.J, et al. Neem tissue Culture and the Production of Insect Antifeedant and Growth Regulatory Compounds. En: Proceedings N° 63: Integrated Crop Protection Towards Sustainability; 1993.

Muñoz, W. y Vanegas, O. A. (2004). Comportamiento de las células vegetales en suspensión de *Azadirachta indica* A. Juss en un biorreactor agitado. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Minas.

Natarajan, V., Pushkala, S., Karuppiah, V.P., Prasad, P.V. (2002). Anti dermatophytic activity of *Azadirachta indica* (neem) by invitro study. Indian J Pathol Microbiol 45, Issue 3, 311-3.

Natarajan, V., Venugopal, P.V., Menon, T. (2003). Effect of *Azadirachta indica* (neem) on the growth pattern of dermatophytes. Indian Journal of Medical Microbiology 21, Issue 2, 98-101.

Okemo, P.O., Mwatha, W.E., Chabrab, S.C., Fabryc, W. (2001). The kill kinetics of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliacae) extracts on *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. African Journal of Science and Technology (AJST) Science and Engineering Series, 2(2), 113-118.

Orozco Sánchez, F. (2009). Efecto de la oferta de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de terpenoides con células de *Azadirachta indica* en un biorreactor. Yautepec, Morelos, México. Tesis (Doctorado en Ciencias). Instituto Politécnico Nacional.

Orozco-Sánchez, F. y Rodríguez-Monroy, M. (2007). Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. Rev. Mex. Ing. Quim. 6, 251-258.

Polaquini, S.R.B., Svidzinski, T.I.E., Kemmelmeier, C. y Gasparetto, A. (2006). Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. Archives of Oral Biology 51, Issue 6, 482-490.

Ponnusamy, K., Petchiammal, C., Mohankumar, R., Hopper, W. (2010). In vitro antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R.Br. Journal of Ethnopharmacology 132, Issue 1, 349-354.

Rajendra Prasad, N., Anandi, C., Balasubramanian, S., Pugalendi, K.V. (2004). Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. Journal of Ethnopharmacology 91, Issue 1, 21-24.

Rebell, G; Taplin, D. 1979. *Dermatophytes, their recognition and identification*. Coral Gables, EEUU: University of Miami Press.

Rodríguez-Monroy, M. y Galindo, E. (1999). Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. Enzyme Microb. Technol. 24, 687-693.

Sidhu, O.P., Behl, H.M. (1996). Seasonal variation in azadirachtins in seeds of *Azadirachta indica*. Current Science 70, 1084–1086.

Suresh, G., Narasimhan, N.S., Masilamani, S., Partho, R.D. y Gopalakrishnan, G. (1997). Antifungal fractions and compounds from uncrushed green leaves of *Azadirachta indica*. Phytoparasitica 25, Issue 1, 33-39.