

Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22

Yadira López-Pantoja,* Miguel Angulo-Escalante,** Celida Martínez-Rodríguez,* Johana Soto-Beltrán, Cristóbal Chaidez-Quiroz*

RESUMEN

En años recientes se ha incrementado el interés del uso de extractos naturales como alternativa para el control de microorganismos patógenos al hombre. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad microbicida de extractos acetónicos, etanólicos y metanólicos de semillas de neem y venadillo, a concentraciones de 1, 10, 25 y 50%, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y el bacteriófago P22. Los extractos fueron evaluados por separado para cada microorganismo empleando dos tiempos de contacto (2.5 y 5 min). Las concentraciones iniciales y finales de las bacterias y el bacteriófago fueron expresadas en Log₁₀ Unidades Formadoras de Colonia por mililitro y Unidades Formadora de Placa por mililitro, respectivamente. El extracto etanólico de neem a 10%, inhibió el crecimiento de *E. coli*, mientras que los extractos metanólicos y acetónicos lo hicieron a partir de la concentración de 25% y 50%, respectivamente. El extracto etanólico de venadillo a 50% eliminó a *E. coli*, mientras que los extractos acetónicos y metanólicos redujeron 6 Log₁₀ UFC/mL. Los extractos de venadillo a 50% inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, mientras que los extractos de neem no lograron una total reducción. El extracto etanólico de neem a 50% redujo 4 Log₁₀ UFP/mL del bacteriófago, mientras que los extractos de venadillo mostraron una reducción menor o igual a 3 Log₁₀ UFP/mL. Con base en estos resultados se puede establecer que los extractos etanólicos de neem y venadillo, a concentraciones de 50% mantuvieron una reducción bacteriana y viral de manera constante, y por lo tanto podrían ser una alternativa natural para el control de microorganismos patógenos.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, *Swietenia humilis*, extractos, efecto antimicrobiano, microorganismo modelo.

ABSTRACT

In recent years the interest of natural extracts as an alternative for microbial pathogens control has been increased. The aim of the present study was to evaluate the microbicidal activity of acetonic, ethanolic and methanolic seed extracts obtained from *Azadirachta indica* A. Juss (neem) and *Swietenia humilis* Zucc (venadillo) trees. Concentrations of natural extracts at 1, 10, 25 and 50% were separately confronted against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and the P22 bacteriophage at two contact times (2.5 and 5 min) periods. The initial and final concentrations of both bacterial and viral indicators were expressed in Log₁₀ CFU and PFU per mL, respectively. The ethanolic neem extract at 10% inhibited the *E. coli* growth, while the methanolic and acetonic extracts did it at the 25% and 50% extract concentration. The venadillo ethanolic extract at 50% eliminates *E. coli* while acetonic and methanolic extracts only reduced 6 Log₁₀ CFU/mL. Venadillo extracts at 50% were also able to reduce *S. aureus* growth, while the neem extracts did not. The ethanolic extract at 50% showed at 4 Log₁₀ PFU/mL phage reduction, while the venadillo extracts did not. In summary, the ethanolic extracts, at 50%, from both neem and venadillo proved to be a natural choice for the microbial control.

Key words: *Azadirachta indica*, *Swietenia humilis*, natural extracts, antimicrobial effect, microbial indicators.

* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán. Carretera a El Dorado Km 5.5, 80129, Culiacán, Sinaloa. Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos.

** Laboratorio de Toxicología.

Correspondencia:

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Culiacán. Carretera a El Dorado Km. 5.5, 80129, Culiacán, Sinaloa. Investigador Titular C, Responsable del Área de Inocuidad y Jefe del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos. Fax: (667) 760.5536. E-mail: chaqui@ciad.edu.mx, www.ciad.edu.mx

Recibido: 15-03-2007

Aceptado: 14-09-2007

INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha incrementado el interés en el uso de extractos naturales como alternativas para el control de microorganismos patógenos al hombre. Esto se justifica al considerar que la mayoría de los agentes químicos empleados para la descontaminación de alimentos y/o agua generan residuos que, además de afectar el medio ambiente, pueden ser un riesgo para la salud de los consumidores.¹ Los extractos obtenidos del árbol del neem (*Azadirachta indica* A. Juss) (Figura 1) son una fuente natural contra una gran variedad de microorganismos patógenos. El neem pertenece a la familia Meliaceae, y es ampliamente cultivado en África, Australia, El Caribe, América Central y América del Sur. La madera de neem se utiliza para construcción de muebles, postes y horcones.² Utilizando distintas partes de la planta se emplea para generar productos cosméticos, farmacéuticos y medicinales. Se ha empleado para el control del acné y afectaciones generales de la piel, como anti-séptico, en la elaboración de dentífricos y enjuagues bucales, además, se ha utilizado para el control de infecciones parasitarias, de la hipertensión, y contra la diabetes mellitus.³ También se conoce que varios extractos crudos de neem tienen actividad insecticida y microbiciada, siendo las más importantes la actividad antialimentaria y el bloqueo en el proceso de metamorfosis de larvas.⁴ El principal metabolito activo es el nortriterpenoide conocido como azadiractina.^{8,2} Además, las semillas de neem contienen una serie de limonoides estructuralmente relacionados con la azadiractina, lo que podría significar que también sean



Figura 1. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

biológicamente activos para el control de microorganismos.⁹ Limonoides, como nimbina, nimbolina y melantriol, han sido aislados, y junto con la azadiractina son considerados compuestos de gran actividad biocida contra insectos y microorganismos.^{5,7,9-11} El contenido de los componentes con actividad biocida varían de acuerdo a la variedad genética y al estado de madurez del árbol del neem.¹³

Coventry y Allan (2001),⁵ demostraron que extractos etanólicos de semillas de neem, inhibieron considerablemente el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* y *Nocardia* sp. En este mismo trabajo determinaron los componentes antimicrobianos en extractos de semillas de neem, encontrando que azadiractina, nimbina y salannina, en conjunto, son responsables de la actividad antimicrobiana. Williams y col. (1998),⁶ estudiaron el efecto inhibitorio de azadiractina pura y azadiractina formulada (Neemix), en *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* larvae, demostrando que el efecto inhibitorio de azadiractina pura en el crecimiento de las tres bacterias fue significativamente más bajo que el encontrado en azadiractina formulada (Neemix). Esto sugiere que los "componentes inertes" en Neemix potencian el efecto inhibitorio. Okemo y col. (2001),⁷ determinaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de neem, encontrando que a concentraciones de 8 y 0.5 mg/mL, se inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Otra fuente natural lo constituye el árbol del venadillo (*Swietenia humilis* Zucc), perteneciente a la familia de las Meliaceae. Originario de las regiones tropicales de América y ampliamente distribuido en las zonas del Pacífico mexicano.¹⁴ La madera de venadillo tiene un alto valor comercial en el mercado de la ebanistería mundial. Es fuerte y resistente a la pudrición por hongos y bacterias y a los insectos, sin necesidad de tratarla con productos químicos.¹⁵ La corteza ha sido utilizada contra la diarrea y la fiebre.¹⁶ Las infusiones de extractos de semillas son tradicionalmente usadas para tratamientos contra amibas y lombrices.¹⁷

El venadillo contiene, en su corteza y semillas, limonoides los cuales han sido caracterizados y su actividad biocida ampliamente demostrada.^{14,18} El uso de infusiones, de extractos de semillas de venadillo, han sido tradicionalmente empleadas para el control de infecciones parasitarias, particularmente contra amibas (*E. coli* y *E. histolytica*).¹⁷

Segura y col. (1993),¹⁴ determinaron el efecto insecticida de extractos metanólicos de venadillo con-

tra la larva de *Tenebrio molitor*, encontrando que inhibió significativamente el crecimiento de esta larva. Jiménez y col. (1997),¹⁸ estudiaron el efecto insecticida de humilnolides A-D contra *Ostrinia nubilalis*, demostrando que estos compuestos activos redujeron el crecimiento del insecto, así como también incrementaron el tiempo de desarrollo de los sobrevivientes. También se ha demostrado la actividad bactericida de extractos acetónicos de semillas de venadillo contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.¹⁹

Los limonoides, tetranortriterpenoides, presentes en la familia Meliaceae son sintetizados mediante la ruta biosintética de los terpenoides. Se inicia con la ciclización del escualeno resultando un ion tetracíclico y dos compuestos químicamente similares, el eufano y el tirucaleno, los cuales son los últimos precursores biogénicos.²¹

El aceite extraído de las semillas de neem es una mezcla de aceites, el cual se puede obtener por presión, extracción al vapor y por extracción con solventes. Es un líquido café oscuro, espeso, semisólido, de sabor amargo y fuerte olor. Está compuesto principalmente de triglicéridos y algunos compuestos triterpenoides, los cuales son responsables del sabor amargo.²²

Por otro lado, para evaluar la actividad microbici- da de compuestos químicos y/o naturales se puede emplear el porcentaje de reducción de una concentración dada de microorganismos modelos²³ que representan a microorganismos patógenos con características morfológicas y estructurales similares.^{24,25} *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y el bacteriófago P22, han sido ampliamente utilizados como microorganismos modelo, los cuales representan a bacterias Gram negativas, Gram positivas y virus entéricos, respectivamente.²⁶⁻³⁰

Debido a que los extractos de neem y venadillo pueden tener una aplicación como agentes microbici- das, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antimicrobiano, *in vitro*, de extractos acetóni- cos, etanólicos y metanólicos de semillas de neem y venadillo, recolectadas en Culiacán, Sinaloa, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y el bacterió- fago P22.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las semillas de neem y venadillo

Con base al estudio del contenido de limonoides en semillas del árbol del neem desarrollado por Angulo-

Escalante y col., (2004),¹³ se procedió a la colecta de frutos de neem y venadillo de árboles localizados en la zona centro de la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México. Se obtuvieron frutos de neem y venadillo, los cuales fueron despulpados y/o descortezados. El seca- do de los frutos consistió en un proceso de 6 h bajo el sol y 15 días bajo sombra.¹³ La colecta se realizó bajo la supervisión del botánico Jesús Aguilar Patiño, di- rector del herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa, quien utilizó los criterios internacionales para la identificación y cla- sificación de plantas.

Obtención de los extractos acetónicos, etanólicos y metanólicos de semillas de neem y venadillo

La grasa de las semillas de neem y venadillo fueron removidas con hexano.⁵ Se pesaron 50 g del germen de semillas pulverizadas en una licuadora convencio- nal (Osterizer, México), se colocaron en un frasco vo- lumétrico de 250 mL donde fueron adicionados 200 mL de hexano. Se mezcló por 15 min y se dejó repo- sar durante 24 h. Usando una tela de organza, la mezcla se filtró para recuperar el germen de la semi- lla desengrasada, y se dejó secar a temperatura am- biente por dos horas. Posteriormente, 50 g de semilla desengrasada fue mezclada durante 15 min, con 200 mL del solvente correspondiente (acetona, etanol y metanol), y se dejó reposar durante 24 h.³¹ La mezcla se filtró (Whatman No. 40), y el filtrado fue colocado en un frasco volumétrico, y mediante un rotavapor (Buchi R-205, Suiza) se removió el solvente para así obtener el extracto crudo.

Determinación de limonoides totales en extrac- tos de neem y venadillo

Los limonoides totales fueron determinados siguien- do la metodología establecida por Jianming y col. (1999).³¹ En tubos cónicos de 10 mL, se colocaron 0.7 mL de diclorometano, un gramo de extracto y 0.2 mL de vainillina (0.02 mg/mL). La mezcla se agitó ma- nualmente y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 min. Enseguida se le adicionó 0.3 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%), 0.7 mL de metanol y se dejó reposar por 5 min. Finalmente, la absorción fue medida a 577 nm en un espectrofotómetro UV – VIS (VARIAN modelo CARY 1E). La concentración de li- monoides fue cuantificada utilizando una curva de calibración ($r^2 = 0.9998$) que se obtuvo con solucio- nes estándar de azadiractina en diclorometano (0.01 - 0.1 mg/mL).

Inóculos

Se utilizaron controles positivos de *Escherichia coli* (ATCC 15597), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, hospedero del bacteriófago P22, obtenidos del cepario del laboratorio de microbiología ambiental del departamento de suelos y aguas de la Universidad de Arizona a cargo del Dr. Charles P. Gerba.

Purificación de las bacterias

Las bacterias fueron purificadas empleando la metodología descrita por Ukuku y Sapers (2001).³² Una colonia bacteriana fue inoculada en 5 mL de caldo de soya y tripticaseína (TSB, Difco; EU), se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente se adicionó 1 mL del crecimiento bacteriano en 25 mL de caldo TSB, y se incubó por 24 h a 37°C. La suspensión bacteriana fue colocada en tubos de centrifuga estériles y se centrifugaron a 13,800 X g (Beckman, J2-MI, EU) durante 10 min a 4°C. El sedimento obtenido se lavó y resuspendió en 25 mL de solución amortiguadora estéril (PBS, 0.1 M, pH de 7.2) y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones. El procedimiento de lavado, se repitió dos veces. Las bacterias purificadas se mantuvieron a 4°C antes de ser utilizadas.

La concentración inicial de las suspensiones bacterianas fue determinada por la técnica de extensión en placa. Se realizaron diluciones decimales por triplicado (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8}) y 0.1 mL de cada dilución decimal fue colocada en cajas petri conteniendo agar selectivo mFC (Difco™, EU) y agar sal y manitol (Bioxon, México) e incubadas a 44.5 y 37°C durante 24 h para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Finalmente, la concentración bacteriana se cuantificó con base en las unidades formadoras de colonia observadas en el medio y el resultado fue expresado en Log_{10} UFC/mL. La concentración inicial de las bacterias fue de 8 Log_{10} UFC/mL para *Escherichia coli*, y 8 Log_{10} UFC/mL para *Staphylococcus aureus*.

Regeneración del bacteriófago P22

Para la propagación del bacteriófago se empleó la metodología establecida en el compendio de métodos para el análisis de agua (APHA, 1998),³³ la cual se describe a continuación: Una colonia de *S. typhimurium*, hospedero específico del bacteriófago P22, fue colocada en 5 mL de TSB e incubada a 37°C por 24 h. Posteriormente 1 mL del inóculo, en fase estacionaria, fue depositado en 25 mL de TSB, se incubó, du-

rante 3 h (fase de crecimiento logarítmico) a 37°C bajo agitación constante (baño maría a 110 rpm).

Diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10}) de una concentración de 9 Log_{10} UFP/mL del bacteriófago fueron preparadas. En un tubo que contenía 3 mL de agar de soya y tripticaseína (TSA, siglas en inglés) al 1% a temperatura no mayor a $47 \pm 2^\circ\text{C}$ (agar suave), se le agregó 1 mL del cultivo de *Salmonella typhimurium* y 0.1 mL de la dilución del bacteriófago. Se agitó para mezclar y enseguida se vertió en cajas petri conteniendo agar soya tripticaseína al 1.5%. Una vez que el agar suave (1%) se solidificó, se incubó a 37°C durante 24 h. Se realizaron tres réplicas de cada dilución. Transcurrido el tiempo de incubación, las cajas petri conteniendo la mezcla del virus y la bacteria se retiraron de la incubadora, se le añadieron 6 mL de solución amortiguadora (fosfato de potasio monobásico, pH 7.2), con el objetivo de separar los bacteriófagos del agar, se dejó reposar 2 h, y el sobrenadante obtenido se llevó a centrifugación a 13,800 X g durante 15 min.

El sobrenadante obtenido del proceso de centrifugado, se filtró utilizando una membrana de acetato de celulosa de 0.2 μm de porosidad y 47 mm de diámetro. El filtrado fue colocado en tubos estériles y refrigerados a 4°C antes de ser utilizado.

El bacteriófago fue cuantificado mediante la técnica de doble agar, previamente descrita, y la concentración del bacteriófago fue expresada en Log_{10} unidades formadoras de placa por mililitro (Log_{10} UFP/mL) la cual fue de 10.1 Log_{10} UFP/mL.

Evaluación bactericida de extractos por el método de extensión en placa

La suspensión bacteriana fue tratada con extractos acetónicos, etanólicos y metanólicos de semillas de neem y venadillo a concentraciones de 50, 25, 10 y 1%. 0.1 mL de la suspensión bacteriana fue inoculada a 2 mL del extracto.³⁴ Se emplearon dos tiempos de contacto, 2.5 y 5 min, para evaluar la actividad bactericida de los extractos. Después de cada tiempo, se tomó un mL de la mezcla y se realizaron diluciones decimales (10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8}). De cada dilución, se tomó 0.1 mL y se colocaron en cajas petri conteniendo agar mFC y sal y manitol para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. La suspensión bacteriana se extendió uniformemente utilizando una varilla de vidrio, y finalmente las cajas petri se incubaron durante 24 h a 44.5°C y 37°C para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.³⁵ Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

Evaluación viricida de extractos por el método de doble agar

La actividad viricida de los extractos fue evaluada usando una alícuota (0.1 mL) de la concentración inicial del bacteriófago ($10.1 \text{ Log}_{10} \text{ UFP/mL}$) y 2 mL de los extractos acetónicos, metanólicos y etanólicos de semillas de neem y venadillo a concentraciones de 50, 25, 10 y 1%. Se establecieron dos tiempos de contacto, 2.5 y 5 min, pasado el tiempo de contacto, se tomó 1 mL de la mezcla y se realizaron diluciones decimales (10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10}). En un tubo conteniendo 3 mL de TSA al 1% en forma líquida y a temperatura no mayor de $47 \pm 2^\circ\text{C}$, se añadió 0.1 mL de cada dilución del bacteriófago y 1 mL de *S. typhimurium* (por triplicado), se agitó la mezcla y se colocó en cajas petri conteniendo TSA al 1.5%, en forma sólida (BD, Bioxon, México). Inmediatamente después se agitó de manera manual para uniformizar la mezcla y se dejó solidificar. Posteriormente las cajas petri fueron incubadas a 37°C por 24 h para obtener la concentración final. La capacidad de reducción microbiana de los extractos se determinó de acuerdo a lo descrito por Geldreich (1996),²³ manifestando que un antimicrobiano es efectivo cuando logra reducir 6 y 4 Log_{10} de una concentración inicial bacteriana y viral, respectivamente.

Análisis estadísticos

El diseño estadístico empleado fue de bloques con tres factores totalmente al azar. Los factores fueron los extractos, las concentraciones y el tiempo de contacto, y los microorganismos fueron bloqueados. Al realizar los análisis de varianza y encontrar diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey a un $\alpha = 0.05$. El paquete estadístico empleado fue Minitab, Versión Release 13.20 (2003).

RESULTADOS

Determinación de limonoides totales en extractos de neem y venadillo

En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de neem y venadillo. Los solventes acetona, metanol y etanol fueron utilizados para extraer las sustancias inhibitorias de las semillas analizadas. El *cuadro I* muestra el contenido de limonoides en extractos obtenidos a partir de semillas de neem y venadillo. El extracto etanólico re-

cupera una concentración mayor de compuestos activos, seguido del extracto acetónico y metanólico tanto en neem como en venadillo. Los extractos obtenidos a partir de neem resultaron con mayor contenido de compuestos limonoides que los extractos de venadillo.

Actividad antimicrobiana de extractos de neem y venadillo contra *Escherichia coli*

Como se muestra en el *cuadro II*, *E. coli* fue más susceptible a los extractos de neem. Los extractos acetónicos, metanólicos y etanólicos a concentración de 10% y tiempo de contacto de 5 min inhibieron considerablemente el crecimiento de este microorganismo. Aumentada la concentración a 50%, independientemente del extracto y de los tiempos de contacto (2.5 y 5 min), se logró inhibir completamente el crecimiento microbiano (*Cuadro II*). Por otra parte, los extractos etanólicos y metanólicos fueron más eficientes que el extracto acetónico, ya que a concentraciones de 25% y tiempo de contacto de 5 min inhibieron completamente el crecimiento microbiano, mientras que con el extracto acetónico, sólo al duplicar esta concentración (50%) se obtuvieron los mismos resultados. No se encontraron diferencias significativas entre estos extractos ($p > 0.05$), sin embargo al ajustar el número de logaritmos reducidos a 6 $\text{Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ ²³ los tres extractos (acetónico, metanólico y etanólico) obtuvieron una reducción 6 $\text{Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ de *E. coli* a un tiempo de contacto de 5 min. Por otro lado, el extracto etanólico fue el más eficiente, ya que a concentración de 1% y tiempo de contacto de 5 min se alcanzó una reducción de 6 $\text{Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ (*Cuadro II*), mientras que a una concentración de 10% logró inhibir completamente el crecimiento de *E. coli* en los dos tiempos de contacto (2.5 y 5 min), obteniéndose estos mismos resultados a concentraciones de 25 y 50%, no encontrándose diferencias significativas entre las concentraciones. Sin embargo, se puede observar que este extracto fue significativamen-

Cuadro I. Contenido de limonoides totales en extractos de neem y venadillo.

Extracto	% Limonoides/g	
	Neem	Venadillo
Acetónico	8.60	6.34
Etanólico	10.94	7.55
Metanólico	8.85	5.98

Cuadro II. Inactivación de *Escherichia coli* por extractos de neem y venadillo.

Concentración (%)	Tiempo de contacto*	Neem			Venadillo		
		Reducción Log ₁₀ UFC/mL [†]					
		E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂	E ₃
1	2.5	2	4	2	1	1	1
	5.0	3	6	2	2	2	2
10	2.5	2	8	2	1	2	1
	5.0	5	8	5	3	3	2
25	2.5	4	8	5	4	4	2
	5.0	6	8	8	5	5	3
50	2.5	8	8	8	7	8	5
	5.0	8	8	8	7	8	6

*Minutos; E₁, Extracto acetónico; E₂, Extracto etanólico; E₃, Extracto metanólico.[†]Reducción logarítmica de *E. coli* expresada en unidades formadoras de colonias.**Cuadro III.** Inactivación de *Staphylococcus aureus* por extractos de neem y venadillo.

Concentración (%)	Tiempo de contacto*	Neem			Venadillo		
		Reducción Log ₁₀ UFC/mL [†]					
		E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂	E ₃
1	2.5	4	4	3	2	4	2
	5.0	4	5	4	2	5	2
10	2.5	4	5	3	4	5	4
	5.0	5	5	3	4	5	4
25	2.5	5	5	4	4	5	4
	5.0	6	5	4	6	6	5
50	2.5	6	7	4	8	8	8
	5.0	7	7	5	8	8	8

*Minutos; E₁, Extracto acetónico; E₂, Extracto etanólico; E₃, Extracto metanólico.[†]Reducción logarítmica de *E. coli* expresada en unidades formadoras de colonias.

te diferente a los extractos metanólicos y acetónicos ($p < 0.0001$). Esto probablemente se debió a que el extracto etanólico tiene un mayor contenido de limonoides (*Cuadro I*), los cuales son responsables de la actividad antimicrobiana del neem.⁸ En cuanto a los extractos de venadillo, se puede observar que *E. coli* fue más resistente a estos extractos, ya que sólo a concentraciones mayores de 25% se inhibió de manera significativa su crecimiento. A concentraciones de 50% del extracto etanólico inhibió completamente el crecimiento de la bacteria. Coronel y col., (2001)¹⁹ demostraron que la exposición por 5 minutos de *E. coli* en extractos acetónicos de semillas de venadillo provocaron una reducción del 99%. Los tres extractos obtuvieron una reducción igual o mayor que 6 Log₁₀ UFC/mL a la concentración de 50% y 5 min de tiempo de contacto (*Cuadro II*).

Actividad antimicrobiana de extractos de neem y venadillo contra *Staphylococcus aureus*

El *cuadro III* muestra que a concentraciones de 1 y 10% los extractos acetónico, metanólico y etanólico lograron una reducción de 5 Log₁₀ UFC/mL de la concentración inicial de *S. aureus* (8 Log₁₀ UFC/mL). A una concentración de 25% y un tiempo de contacto de 2.5 y 5 min, sólo el extracto acetónico alcanzó una reducción de 6 Log₁₀ UFC/mL. Mientras que la concentración de 50%, sólo los extractos etanólico y acetónico, inhibieron más de 6 Log₁₀ el crecimiento de *S. aureus*. Contrario a lo que sucedió en el caso de *Escherichia coli*, donde el extracto etanólico logró reducciones iguales o mayores a 6 Log₁₀ UFC/mL a partir de la concentración de 1%. Por otro lado, únicamente a 50% los extractos de venadillo lograron reducir completamente el crecimiento microbiano, no

encontrándose diferencias significativas entre ellos. Mientras que a concentraciones de 1, 10 y 25%, los extractos de venadillo redujeron menos de 6 Log₁₀ UFC/mL de *S. aureus*.

Actividad antimicrobiana de extractos de neem y venadillo contra el bacteriófago P22

El cuadro IV, muestra que tanto los extractos de neem y venadillo a 1, 10 y 25%, redujeron menos de 4 Log₁₀ UFP/mL del bacteriófago P22. Siendo únicamente el extracto etanólico de neem, a 50% y un tiempo de contacto de 5 min, que redujo más de 4 Log₁₀ el crecimiento del bacteriófago. Esto indica claramente que las bacterias en estudio y el bacteriófago P22 responden de manera diferente a los extractos de neem y venadillo, por lo que la evaluación bactericida y viricida deben conducirse de manera separada.

DISCUSIÓN

Los limonoides son responsables de la actividad biocida y son componentes intrínsecos de las semillas de neem y venadillo.^{7,14,18,36} La técnica colorimétrica³¹ basada en el análisis de vainillina resultó ser un método conveniente para determinar el contenido total de limonoides en los extractos empleados como agentes antimicrobianos. Sin embargo, el uso de esta técnica en extractos obtenidos a partir de la cáscara de la semilla y hojas es inadecuada debido a la presencia de sustancias consideradas como fuente de interferencia.³¹ Eloff (1998)³⁷ y Cowan (1999),³⁸ encontraron que el metanol es más eficiente que el etanol y la acetona ya que extrae mayor cantidad de compuestos químicos en hojas de plantas, lo cual no concuerda

con nuestros resultados, sin embargo cabe mencionar que el proceso de extracción difiere del utilizado en el presente estudio.

Se ha reportado que los extractos de neem tienen efecto inhibitorio en una amplia gama de microorganismos incluyendo algas,³⁹ hongos,^{40,41} bacterias^{5,7,42,43} y protozoarios.⁴⁴ En el presente estudio se observó que los tres extractos de neem inhiben, en diferente grado, el crecimiento y la replicación de bacterias (Gram – y +) y virus (bacteriófagos), respectivamente. *Escherichia coli* fue más susceptible a los extractos de neem que *Staphylococcus aureus*, ya que se observó la inhibición del crecimiento de *E. coli* fue de manera creciente y constante desde la concentración más baja evaluada (1%) hasta la mayor (50%), alcanzando inclusive la eliminación total de la bacteria. Estos datos concuerdan con los encontrados por Fabry y col., (1998)¹¹ y Awadh y col., (2001),⁴⁵ quienes encontraron que extractos metanólicos de plantas originarias de África y la India inhibieron considerablemente el crecimiento de *E. coli* a bajas concentraciones, mientras que los extractos acetónicos mostraron efectividad a altas concentraciones y mayor tiempo de contacto. Así mismo, Almas (2001)⁴⁶ demostró que el extracto etanólico de semillas de neem a concentraciones menores de 5% inhibió significativamente el crecimiento de *E. coli*, y Williams y col., (1998),⁶ evaluaron el efecto inhibitorio de formulaciones de neem contra *Bacillus subtilis* y *E. coli*, encontrando que a una concentración de 50 µg/mL, se inhibió completamente el crecimiento de *E. coli*, mientras que para *B. subtilis* la inhibición fue mínima. El mecanismo de acción, por el cual generalmente los microorganismos resisten a la acción de los extractos de neem, ha sido poco estudiado.

Cuadro IV. Inactivación de bacteriófago P22 por extractos de neem y venadillo.

Concentración (%)	Tiempo de contacto*	Neem			Venadillo		
		Reducción Log ₁₀ UFP/mL [†]					
		E ₁	E ₂	E ₃	E ₁	E ₂	E ₃
1	2.5	2	2	2	2	2	2
	5.0	2	2	2	2	2	2
10	2.5	3	3	3	2	2	2
	5.0	3	3	3	2	2	2
25	2.5	3	3	3	2	2	2
	5.0	3	3	3	2	2	2
50	2.5	3	4	3	2	3	2
	5.0	3	5	3	2	3	3

*Minutos; E₁, Extracto acetónico; E₂, Extracto etanólico; E₃, Extracto metanólico.

[†]Reducción logarítmica del bacteriófago P22 expresada en unidades formadoras de colonias.

Para *S. aureus* aun a la concentración mayor evaluada (50%), la reducción bacteriana no alcanzó la eliminación total. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Williams *et al.*, (1998)⁶ quienes encontraron que *E. coli* fue más susceptible que *B. subtilis* (Gram positiva) a Neemix (formulado de neem), inhibiendo completamente su crecimiento a bajas dosis. Estudios previos han demostrado que *S. aureus* posee genes que le permiten generar resistencia contra biocidas (agentes químicos y antibióticos).⁴⁷

Tomando en cuenta el criterio de Geldreich (1996),²³ el extracto etanólico de neem a 1% fue el más efectivo, al reducir 6 Log₁₀ UFC/mL de *E. coli* después de 5 min de tiempo de contacto, así mismo la concentración de 25% del extracto acetónico de neem logró inhibir 6 Log₁₀ UFC/mL de *S. aureus*, mientras que los extractos etanólicos y metanólicos fueron efectivos solamente al duplicar esta concentración (50%). La reducción de 4 Log₁₀ UFP/mL del bacteriófago P22 sólo se alcanzó con el extracto etanólico a la concentración de 50%. Esto probablemente se debió a que el extracto etanólico contiene mayor contenido de limonoides, los cuales son los responsables de la actividad antimicrobiana de neem.⁵ Por otro lado, los extractos de venadillo mostraron efectividad, sin embargo ninguno de ellos logró inhibir 4 Log₁₀ UFP/mL del bacteriófago P22.

Por lo tanto, se concluye que el extracto etanólico de neem al 10%, inhibió completamente el crecimiento de *Escherichia coli*, mientras que los extractos metanólicos y acetónicos lo hicieron a partir de la concentración de 25% y 50%, respectivamente. El extracto etanólico de venadillo a 50% resultó ser el más efectivo al eliminar completamente a *E. coli*, mientras que los extractos acetónicos y metanólicos alcanzaron una reducción mayor o igual a 6 Log₁₀ UFC/mL. Los extractos acetónicos, metanólicos y etanólicos a 50%, obtenidos a partir de venadillo, inhibieron completamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, mientras que los extractos de neem no lograron una reducción total. El extracto etanólico de neem a 50% redujo 4 Log₁₀ UFP/mL el crecimiento del bacteriófago P22, mientras que los extractos de venadillo mostraron una reducción menor o igual a 3 Log₁₀ UFP/mL del bacteriófago P22. En base a estos resultados se puede establecer que los extractos etanólicos de neem y venadillo, a concentraciones de 50%, fueron los que mantuvieron una reducción bacteriana y viral de manera constante, y por lo tanto podrían ser una alternativa natural para el control de microorganismos patógenos.

REFERENCIAS

1. Arnason JT, Philogene BJR, Morand P. *Insecticides of plant origin*; ACS Symposium series 387; American Chemical Society: Washington, DC. 1989. p. 321.
2. Koul O, Murray B, Isman MB, Ketkar CM. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. *Can J Bot*. 1990; 68: 1-11.
3. Das BK, Mukherjee SC, Sahu BB, Murjani G. Neem (*Azadirachta indica*) extract as an antibacterial agent against fish pathogenic bacteria. *Indian J Exp Biol*. 1999; 37: 1097-100.
4. Kumar ARV, Jayadevi HC, Ashoka HJ, Chandrashekara K. Azadirachtin use efficiency in commercial neem formulations. *Curr Sci*. 2003; 84: 1459-64.
5. Coventry E, Allan EJ. Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica*. 2001; 29: 1-10.
6. Williams RF, Peng CYS, Chuang RY, Doi RH, Mussen EC. The inhibitory effect of azadirachtin on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in the honeybee, *Apis mellifera* L. *J Invert Pathol*. 1998; 72: 252-7.
7. Okemo PO, Mwatha WE, Chhabra SC, Fabry W. The kill kinetics of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *African J Sci Technol*. 2001; 2: 113-8.
8. Mitchell MJ, Smith SL, Johnson S, Morgan ED. Effects of the neem three components azadirachtin, salanin, nimbin, and 6- desacetylnimbin on ecdysone 20- monooxygenase activity. *Arch Insect Biochem Physiol*. 1997; 35: 199-209.
9. Kumar I, Parmar BS. Physicochemical variation in neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura* L. *J Agric Food Chem*. 1996; 47: 1735-9.
10. Murray BI, Koul O, Luczynski A, Kaminsli J. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J Agric Food Chem*. 1990; 38: 1406-11.
11. Fabry W, Okemo OP, Ansorg R. Antibacterial activity of east African medicinal plants. *J Ethnopharmacology*. 1998; 60: 79-84.
12. Govindachari TR, Gopalakrishnan G, Suresh G. Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels. *Fitoterapia*. 1999; 70: 558-60.
13. Angulo-Escalante MA, Gardea-Bejar AA, Vélez de la Rocha R, García-Estrada RS, Carrillo-Fasio A, Chaidez-Quiroz C, et al. Contenido de Azadirachtina A en semillas de NIM (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México. *Rev Fitotecnia Mex*. 2004; 27: 305-11.
14. Segura R, Mata R, Anaya AL, Hernández B, Villena R, Soriano M, et al. New tetratanortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *J Nat Prod*. 1993; 56: 1567-74.
15. CONAFOR. *Swietenia humilis* Zucc. SIRE-paquetes tecnológicos. México. 2001.
16. CONSEFORH. Caoba del Pacífico *Swietenia humilis* Zucc, un árbol maderable de alto valor. Disponible en: URL: <http://www.geocities.com/RainForest/4075/Swihum.htm>. 2000.
17. Stanley PC. *Trees and shrubs in Mexico*. United States National Herbarium: Washington, DC.; 1996. p. 560.
18. Jiménez A, Mata R, Pereda R, Calderón J, Isman MB, Nicol R, et al. Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. *J Chem Ecol*. 1997; 49: 1981-8.

19. Coronel IJ, Rubio CW, Angulo EM, Chaidez C. Actividad bactericida de extractos acetónicos de semillas de *Swietenia humilis* y *Azadirachta indica* A. Juss. contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. *Rev Mex Cienc Farm.* 2001; 32: 47.
20. Mulholland DA, Parel B, Coombes PH. The chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxylaceae of Southern and Eastern Africa and Madagascar. *Curr Organic Chem.* 2000; 4: 1011-54.
21. Roy A, Saraf S. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in Plants Kingdom. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29: 191-201.
22. Therapeutic Goods Administration (TGA). Evaluation of cold-pressed oil from the seeds kernels of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) for use in listable therapeutic goods. *Australian Department of Health and Ageing*; 2001. p. 1-30.
23. Geldreich E. *Microbial quality of water supply in distribution systems*. Washington, D.C.: CRC Lewis; 1996. p. 76-8.
24. Toranzos GA, McFeters GA. Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press; 1997. p. 159-71.
25. Allen MJ, Edberg SC. 1995. The public health significance of bacterial indicators in drinking water. *The Royal Society of Chemistry*. Special Publication. UK: Athenaeum Press; 1999. p. 32-5.
26. Michael JK, Carter WE. Modeling antimicrobial activity of clorox™ using an agar-diffusion test: a new twist on an old experiment. *Bioscience.* 2000; 23: 9-13.
27. Takikawa A, Abe K, Yamamoto M, Ishimaru S, Yasui M, Okubo Y, et al. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* O157. *J Biosci Bioeng.* 2002; 94: 315-20.
28. Thiem B, Goslinska O. Antimicrobial activity of *Solidago virgaurea* L. from in vitro cultures. *J Fitoterapia.* 2002; 73: 514-7.
29. Katerere DR, Gray AL, Nash RJ, Waigh RD. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry.* 2003; 63: 81-8.
30. Grabow W. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA.* 2001; 27: 251-68.
31. Jianming D, Varoujan AY, Raghavan VGS, Jocelyn RP. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 3738-42.
32. Ukuku DO, Sapers MG. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella stanley* attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. *J Food Protect.* 2001; 64: 1286-91.
33. APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th edition. Washington, DC.: American Public Health Association; 1998.
34. Proietti A, Lanzafame P, Pitzus E. Attività di un nuovo disinfettante (Virkon) su microorganismi di isolamento ospedaliero. *Boll Microbiol Indagini Lab.* 1994; 14: 17-20.
35. Beuchat LR, Harris LJ, Ward TE, Kajs T M. Development of a proposed standards method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizers. *J Food Prot.* 2001; 64: 1103-9.
36. Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr Sci.* 2002; 82: 1336-45.
37. Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol.* 1998; 60: 1-8.
38. Cowan MM. Plant products as an antimicrobial agent. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 564-82.
39. Sundaram KMS, Curry J. High performance liquid chromatographic determination of azadirachtin in conifer and deciduous foliage, forest soils, leaf litter and stream water. *J Liq Chromatogr.* 1997; 16: 3275-90.
40. Zeringue HJ Jr, Bhatnagar D. Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 3543-7.
41. Habte M, Muruleedhara BN, Ikawa H. Response of neem (*Azadirachta indica*) to soil P concentration and mycorrhizal colonization. *Arid Land Res Manag.* 1993; 7: 327-33.
42. Sadducee S, Faizi S, Sadduce BS, Chiasuddin. Constituents of *Azadirachta indica*. Isolation and structure elucidation of a new antibacterial tetranortriterpenoid mahmodin and a new protlimonoid, naheed. *J Nat Prod.* 1992; 55: 303-10.
43. Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol* 2003; 80: 223-30.
44. Jones W, Denholm AA, Ley SV, Lovell H, Wood A, Sinden RE. Sexual development of malaria parasites is inhibited *in vitro* by the neem extract azadirachtin, and its semi-synthetic analogues. *FEMS Microbiol Letters.* 1994; 120: 267-73.
45. Awadh Ali NA, Jülich WD, Kusnick C, Lindequist U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol.* 2001; 74: 173-9.
46. Almas K. The antimicrobial effects of extracts of *Azadirachta indica* (neem) and *Salvadora persica* (Arak) chewing sticks. *Indian J Dent Res.* 2001; 10: 23-6.
47. Mayer SM, Boos M, Beyer A, Fluit AC, Schmitz FJ. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistance and susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrobial Chem.* 2001; 47: 896-7.