



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
CONSEJO DE INVESTIGACIONES
RECTORIA



ARTICULO CIENTIFICO

Utilización del extracto Azadirachta indica contra bacterias de importancia Médica. 2002.

Dr. MSP Antonio Vásquez Hidalgo¹

© Copyright. Puede citar al autor.

R esumen

Objetivos del estudio:

Determinar las propiedades antibacterianas de la Planta Natural *A.*

¹ Docente del Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. UES.

indica contra bacterias de *E coli*, *S aureus* y *S epidermidis*.

Metodología: Se utilizaron extractos de hojas y semillas en Pruebas in vitro. Se utilizó una muestra no aleatoria de tres cepas bacterianas comunes, que son: *E coli*, *S aureus*, y *S epidermidis*, las cuales fueron inoculadas en 200 cajas de petri ($n=100$ y controles $n=100, p=0.05$) en medio de TSA y Agar Sangre. Se obtuvo el extracto a diferentes concentraciones por el método de reflujo, luego se hicieron las siembras en las placas, observando por el método de recuento de colonias el crecimiento o inhibición bacteriana. ($n=100, P=0.05$).

Resultados: De las tres cepas con el extracto de las hojas se obtuvo un 24 % de no crecimiento y un 16 % de inhibición y 30 % de crecimiento contra la cepa de *S. epidermidis*. En *S. aureus* y *E. coli* los resultados no fueron significativos. ($n=200, p=0.05$). En la cepa de *S. epidermidis* el 40 % de las placas no hubo crecimiento a una concentración del 10 % y un 30 % se encontró inhibición a una concentración del 5 %. El crecimiento fue del 27 %. ($n=100, p=0.05$).

Conclusión. La eficacia de la Planta natural contra la cepa de *S. epidermidis* es del 73 %, por lo que puede ser utilizado como una alternativa para el tratamiento de enfermedades de la piel.

Palabras clave: Bactericida, Bacteriostático, bacterias, eficacia.



INTRODUCCION

Objetivos de la investigación.

1. Planteamiento del problema:

La justificación del estudio a nivel de **Salud Pública** radica fundamentalmente en la prevalencia de enfermedades infecciosas causadas por bacterias. Muchos de los casos cuando no son tratados adecuadamente generan cuadros clínicos graves, lo que hace incrementar aumento de los costos hospitalarios en la red de Salud Publica. De tal forma que al encontrar una planta natural pueda disminuir la prevalencia e incidencia de los casos como un tratamiento alternativo.

De las especies de vegetales, la Planta *A. indica* es originaria de la India, conocida ampliamente como insecticida contra mas de 200 especies de plagas. Descubriéndose cada día nuevas propiedades.

GENERAL:

Determinar las propiedades antibacterianas de *la Planta Natural Azadirachta indica* contra *E. coli*, *S. epidermidis* y *S. aureus* en pruebas in vitro, Año 2002.

ESPECIFICOS:

1. Realizar Prueba in vitro para demostrar presencia del principio activo del producto.
2. Determinar la acción de la Planta Natural contra bacterias.
3. Determinar la concentración óptima con efecto antibacteriano.



O p e r a c i o n a l i z a c i ó n d e l a s v a r i a b l e s				
Variable	Definición	Indicador	Valor	Método
1.Planta natural	Término general utilizado para plantas que curan una enfermedad.	Análisis fitoquímico	Principio activo	Técnica de laboratorio.
		Estudio bromatológico	Principio activo	Técnica de laboratorio.
		Principio activo	Presente/ausente	Observación
		Concentración del producto	Letal	Observación
		Disponibilidad del mercado	Ausente/ Presente	Observación
		Tipo de planta	Genero/ Especie	Técnica de laboratorio.
		Método de laboratorio	Sí / no	Técnica de laboratorio.
		Factibilidad	Sí / no	Recursos
2. Bacterias	Termino general para las afecciones producidas por bacterias.	Control de calidad	Bueno/ Malo	Técnica de laboratorio.
		Cultivo in vitro	Si / no	Observación
		Tipo de bacter	Genero/ Especie	Técnica de laboratorio.
		Clasificación taxonómica	Presente/ Ausente	Observación
		Materiales y reactivo	Si / no	Técnica de laboratorio.
Hoja de cotejo	Inhibición/ No inhibición	Observación Grupo testigo		

Hipótesis.

Hipótesis Nula: No existe eficacia de la Planta natural contra las especies de bacterias en las pruebas realizadas in vitro.

Hipótesis alternativa: Existe eficacia de la Planta Natural contra bacterias en pruebas realizadas in vitro.



Diseño Metodológico.

Tipo de estudio.

Se utilizó un diseño cuasi experimental, con un nivel de confianza del 95 % y un error de estimación del 0.05%. Valor alfa de 0.05.

Población de estudio.

En el estudio se utilizó una muestra no aleatoria de tres cepas puras de bacterias **E. coli**, **S. aureus**, **S. epidermidis**, los cuales serán sembradas en placas de petri a diferentes concentraciones del extracto a (1 % ,5 %, 10 %)más 5 cajas de petri (n=100) en grupo testigo, conteniendo el medio de TSA y Agar Sangre .

Variables de estudio.

1. Plantas natural: *Azadirachta indica*.
2. Bacterias: cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Área de estudio.

Las pruebas se realizaron en el laboratorio del departamento de Microbiología de la Universidad de El Salvador. La obtención del extracto en la Facultad de Química y Farmacia por reflujo.

Selección de la muestra.

Se utilizó un muestreo no aleatorio, para determinar la muestra de estudio. Entre los **criterios de inclusión**, se tiene: 1. Cepas puras de las bacterias, 2. Planta natural sea *Azadirachta indica*, 3. Procesamiento por técnica de laboratorio, 4. No contaminación de las muestras y 5. Exista método de comparación entre la muestra y grupo testigo.

Entre los **criterios de exclusión**, están: 1. Contaminación de otros géneros de bacterias, 2. Planta Natural sea otra, 3. mal utilización de la técnica de laboratorio y 4. Testigo sea diferente al control. 5. Mal control de calidad.



Análisis de la Información.

Se utilizaron métodos estadísticos descriptivos, como: histogramas, polígono de frecuencias, tablas y gráficos, medidas de tendencia central; Método Inferencial, chi-cuadrado, tablas de contingencia 2x2. (ver tabla I) Se utilizó un procesador de texto en los software de Office 2000, Epidat 2, Excel y SPSS.

**TABLA 1
TABLA 2 X 2
Método comparativo entre planta natural y bacterias.**

	Con planta	Sin planta	
Crecimiento +	A	B	Vp+
No crecimiento -	C	D	Vp-

Control de sesgos

Entre los principales sesgos a considerar, fueron: 1. Selección inadecuada de la planta natural, su control fue por estudio fitoquímico y bromatológico; 2. preparación técnica inadecuada, su control fue por método

estandarizado de laboratorio o por grupo testigo; 3. Inadecuada selección de cepas puras, su control fue por clasificación taxonómica; 4. concentración inadecuada del extracto, su control fue por dosis respuesta letal; 5. Sesgo de información, su control fue por validez y confiabilidad; 6. Proceso inadecuado de la Planta natural y cepa de bacterias, su control fue por control de calidad.; 7. Mala preparación del medio. Su control fue por método estandarizado. 8. Usar medios vencidos, su control se verifico por fecha de vencimiento y control de calidad del producto. 9. Mala preparación de las cajas de petri. Su control fue por verificación de muestras. 10. Sesgo del instrumentista al usar un diseño de modelo mal elaborado, su control fue por análisis de resultados verificando de nuevo la técnica. 11. Cultivos mixtos, su control fue por verificar frasco conteniendo el medio. 12. Error de análisis, su control fue por verificación de un experto.

Bacterias	No inhibición	Inhibición parcial	Inhibición Total	Medio cultivo
E coli				
E. aureus				
E epidermidis				



Consideraciones éticas.

No se utilizaron muestras a sujetos de investigación, debido a que se harán pruebas in Vitro. El proceso y manipulación de las muestras se hizo de acuerdo a las normas estandarizadas de bioseguridad de laboratorio, como es: uso de gabacha, uso de guantes, asepsia de la mesa laboratorio, uso de mechero bunsen, uso de mascarilla etc.

Procedimiento metodológico.

En el estudio se va a proceder en tres fases:

PRIMERA FASE: Se hizo análisis fitoquímico de la planta natural, así como estudio bromatológico. Se peso la planta y determinó la concentración.

SEGUNDA FASE

Preparación:

Tubos:

Se prepararon 10 tubos con caldo, a cada tubo se le agregó la cepa pura de *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis* con una asa calibrada (n=15), inoculando 1×10^{12}

UFC/ml, luego se incuban a 35 grados centigrados por 18 hrs, se observa turbidez.

Placas:

Se inoculan a una concentración de bacterias equivalente a 1×10^{12} UFC/ml de los tubos a diferentes concentraciones con asa calibrada a las placas (n=200), se incuban a 35 grados por 24 hrs, se observa si hay colonias en cada placa que contienen TSA (n=50) y Agar sangre (n=50).

TERCERA FASE: Para la obtención de muestras se utilizó técnicas de laboratorio, sembrados en medio de cultivo de **TSA y Agar sangre**, utilizando cepas puras obtenidas por muestras de laboratorio, así como el extracto puro de la planta a diferentes concentraciones, mezclado con el medio de cultivo. Se observo durante un periodo de 4 semanas si hay crecimiento o no, de acuerdo a la siguiente escala: actividad bactericida++++(Cero colonias), actividad bacteriostatica ++, y actividad inhibitoria + (< 1 colonia), - crecimiento (> 1 colonia) . Se hará método comparativo con el grupo testigo pero sin la planta natural, con el objeto de observar el crecimiento natural de la bacteria. (fig.1)

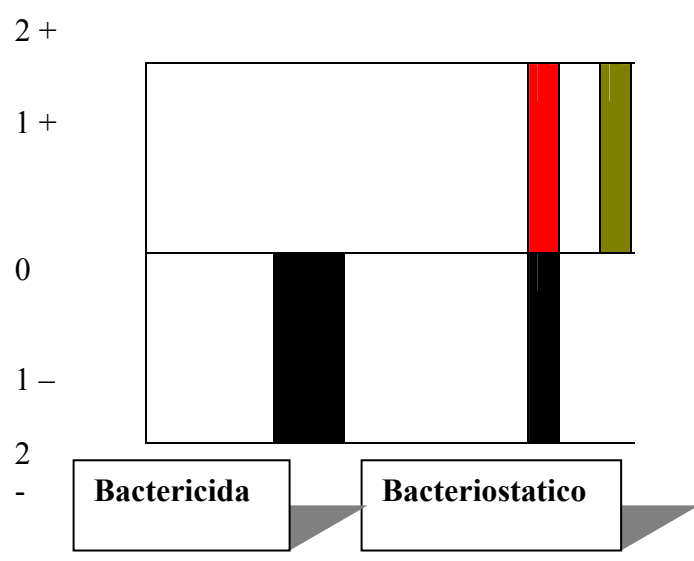


Fig.1 Actividad Antibacteriana

Para el estudio de la actividad bacteriana se hizo calentar la semilla y hojas (Hoja 100 gr mas 600 ml etanol y de semilla 100 gr mas 100 ml de agua destilada) por separado macerándolas vertiéndolas en un frasco de Elermeyer de 500 ml , se calienta a ebullición hasta evaporar a 45 grados por 1 hora. luego es filtrado por el método de Reflujo, se filtra nuevamente y se esteriliza

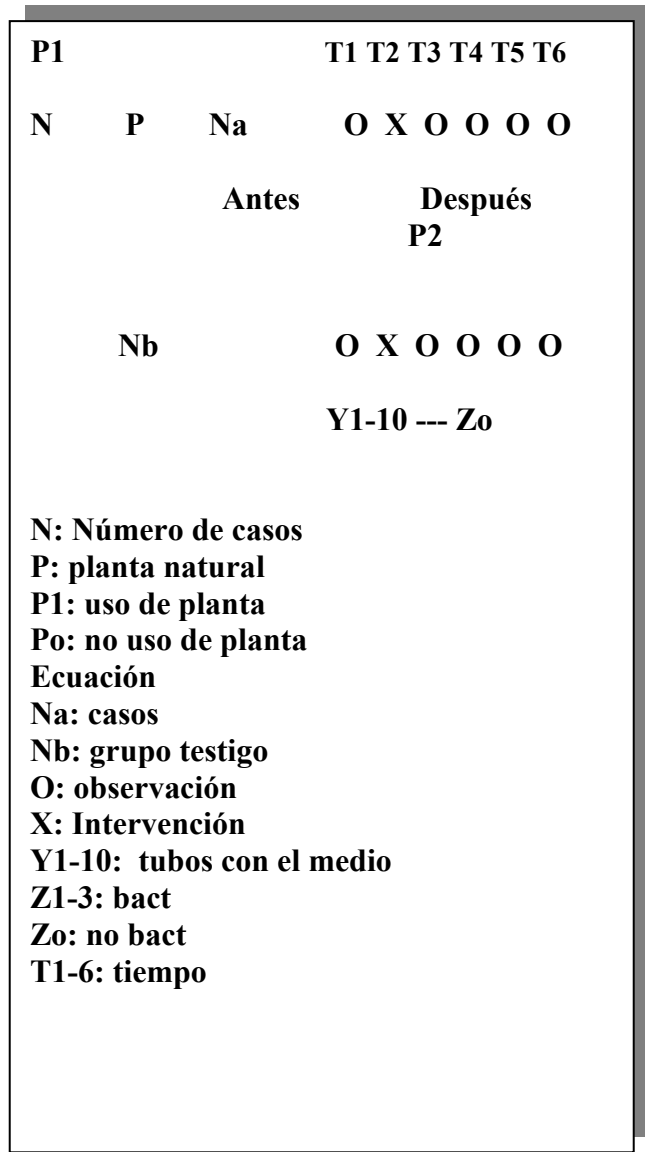


Fig. 2. Diagrama diseño de estudio



Resultados

**Cuadro Resumen
TABLA I
Utilización del Extracto *A.indica* contra
Bacterias. Año 2002**

Discos	Semilla n=50			Hoja n=50			Control n=100	
	<u>E</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>i</u>	<u>S</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>u</u> <u>s</u>	<u>S</u> <u>e</u> <u>p</u> <u>i</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>s</u>	<u>E</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>i</u>	<u>S</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>u</u> <u>s</u>	<u>S</u> <u>e</u> <u>p</u> <u>i</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>s</u>	TSA	Agar Sangre
1-10	-	-	+				-	+
11-20	-	-	++				-	-
21-30	-	-	+				+	-
31-40	-	-	++				-	-
41-50	-	-	++				-	+
51-60				-	-	++	+	+
61-70				-	-	+++	-	-
71-80				-	-	++	-	-
81-90				-	-	++	-	-
91-100				-	-	+++	+	-

Clave: - : crecimiento, +,++ :
inhibición, +++: no crecimiento.

FUENTE: Pruebas in vitro. Año 2002.

En la **Tabla 1** y **Gráfico 1** del total utilizado por el extracto en forma de semilla se tiene que el 40 % había inhibición bacteriana, un 60 % de crecimiento y un 20 % de eficacia. Al utilizar la hoja se tiene que 24 % no hay crecimiento, 16 % de inhibición y 30 % de crecimiento. Por cepa se tiene que el *S.epidermidis* el 60 % no

presento crecimiento y un 40 % de inhibición, en *S.aureus* y *E coli* los cambios no fueron eficaces. En los controles el crecimiento fue alto 70 %.

**Cuadro Resumen
TABLA II
Utilización del Extracto *A.indica*
contra *S.epidermidis*. Año 2002**

Disco	Hoja n=100			Control n=100	
	10 %	5 %	1 %	Agar	TSA
1-10	+++	++	-	+++	+++
11-20	+++	+++	+	+++	++++
21-30	+++	++	-	++	+++
31-40	+++	++	-	-	++
41-50	+++	+	-	+++	+++
51-60	+++	+	-	+++	-
61-70	+++	++	-	+++	+++
71-80	+++	++	-	+++	++
81-90	+++	+++	-	++	+++
91-100	+++	++	-	+++	+++

Clave: - : crecimiento, +,++ :
inhibición, +++: no crecimiento.

FUENTE: Pruebas in vitro. Año 20

En la **Tabla II** exclusivamente en la cepa de *S.epidermidis* se tiene que el 27 % había crecimiento , 30 % inhibición y 40% no crecimiento, a las concentraciones de 1, 5 y 10 % respectivamente. En general el 70 %



no se observo crecimiento de las colonias y en un 30 % inhibición.

Tabla III
Tabla 2 x 2
Uso del extracto contra las cepas
***E coli*, *S aureus* y *S epidermidis*.**
Año 2002.

	Con Planta	Sin Planta	Total
Crecimiento +	60	30	90
No crecimiento	40	70	110
TOTAL	100	100	200

En la **Tabla III** se tiene una sensibilidad del 60 % y una especificidad del 70 %. Chi de 18.0 ($p=0.05$). Por Lo que se acepta la hipótesis de investigación y se rechaza la hipótesis nula.

Tabla IV
Tabla 2 x 2
Uso del extracto contra las cepas
***S epidermidis*.** Año 2002.

	Con Planta	Sin Planta	Total
Crecimiento +	27	10	37
No crecimiento	73	90	163
TOTAL	100	100	200

En la **Tabla IV** se tiene una sensibilidad del 27 % y una especificidad del 90 % en la cepa ***S epidermidis***. Chi de 9.56 ($p=0.05$).

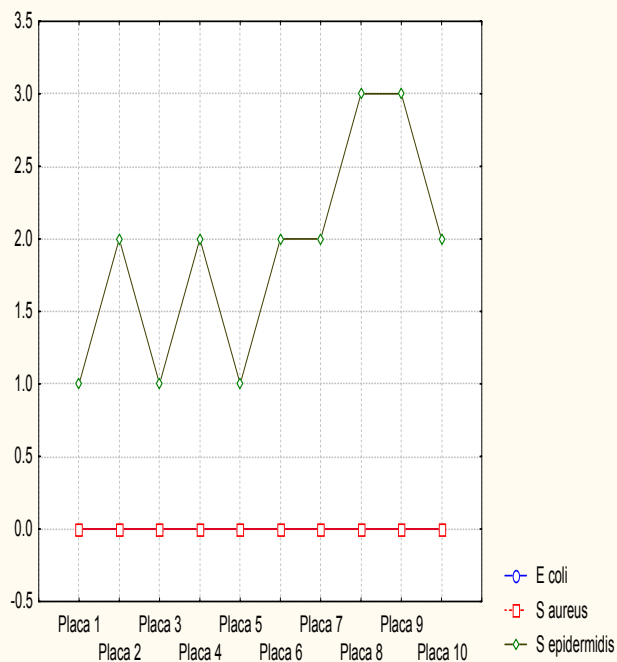
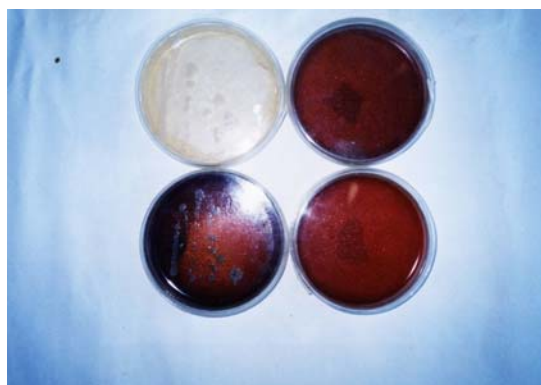


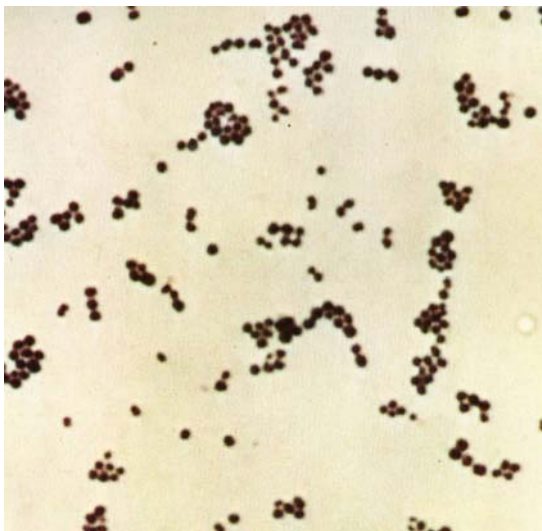
Grafico 1. Uso del extracto contra bacterias. año 2002



FOTOGRAFIA 1. Placas de TSA y AGAR con y sin crecimiento bacteriano.2002



FOTOGRAFIA 2. Placas de AGAR Y TSA inoculadas con Bacterias. 2002



FOTOGRAFIA 3. Crecimiento Bacteriano. 100 x. *S. aureus*.2002.

Discusion

Los resultados del experimento muestran que la hipótesis de investigación es afirmativa. La planta natural tiene eficacia sobre las bacterias, especialmente sobre *S epidermidis*.

En nuestro caso las hojas contienen mayor principio activo que las semillas, los resultados muestran mayores efectos sobre las bacterias, en una relación de 2:1.

Los usos de la *A. indica* se conocen desde hace 4500 años a.c., de la planta se han encontrado propiedades antisepticas, antifungicas, antipireticas ⁽¹⁾.

Contienen resinas, alcaloides y sustancias taninas ⁽²⁾, se degrada labilmente a la luz, pH alcalino y calor. Otras propiedades están, como: antiinflamatorio, repelente ^(1,3).

Otros estudios han encontrado efectos contra la *Damalinea ovis* (piojos), es decir contra ectoparasitos con buena eficacia, reduciendo en 2 dias el 96 % de los piojos. ⁽⁴⁾. Asi como en infecciones microbianas. ⁽³⁾

En nuestro experimento a la incubación de las placas durante 4 horas no se observó crecimiento de colonias, a las 24 hrs no se observó sustancialmente diferente resultado. A



temperatura ambiente las placas no se observo nuevas colonias, ni durante 4 semanas.

A diferentes concentraciones entre 5 a 10 % los resultados fueron desde inhibición hasta no crecimiento de bacterias. Sugiriendo que ha mayor concentración mayor es el efecto letal en las bacterias, causando efecto bactericida ($p=0.05$)

Sus propiedades antibacterianas, aun a bajas concentraciones es eficaz contra algunas cepas gram positivas mas que gram negativas.

Actualmente el Neem(**A. indica**) esa ampliamente explotado contra insectos ^(5,6,7).

Se ha confirmado que no es toxico para las especies animales ni al humano (^{8,9}), e incluso induce la producción de citocinas como gammainterferon y aumentando el numero de linfocitos ⁽¹⁰⁾.

Tiene propiedades en pacientes con infecciones bucales (gingivitis, piorrea) en el 50 % mostraron

reducción de bacterias y eliminación de la halitosis ⁽⁸⁾. Algunos autores recientemente han encontrado efecto bactericida en caries dental y dermatitis seborreica ^(1,5).

Los componentes de la planta son 22 veces menos toxicos que la cafeína⁽¹¹⁾

Agradecimientos.

Al Consejo de Investigaciones Cientificas de Rectoria UES por el financiamiento de la investigación, a **Dra María Isabel Rodríguez**(Rectora) por su apoyo a la investigación docente, al **Dr. Salvador Castillo** que en forma incondicional nos complementamos en la preparación del extracto y dilución de las concentraciones en los laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia, al **Lic. Roberto Fuentes Palma** y **Br. Roger Chevez** por su colaboración.



Referencia Bibliográfica

1. Herblin. Tips on hair care. Herbal extracts. Google. 2002. <http://www.herblin.com>.
2. Azadirachta indica. Indian Azadirach. The British Pharmaceutical Codex. 2002.
3. Anxiolytic activity of A indica leaf extract In rats. Indian Journal of Experimental Biology. Vol 32. July 1994.
4. Guerini, V.H.. Efecto de los extractos de A indica sobre el piojo Damalinia ovis en ovejas. Online Journal of veterinary reseca. 2002.
5. Help. Neem in Medicine. India on Line. Google. Com 2002.
6. IMP. Neem Based Insecticidas. University of Conneticut USA. Integrated Post Management Program. 2002.
7. Azadirachta indica. One Tress Arsenal Againts Pests. Google.com A. indica ref. 65.2002.
8. AUPEC. Ciencia al día. El árbol milagroso. Sirve para todo. AUPEC@mafalda.univalle.edu.co
9. Neem tree of life . Revista Natural. <http://www.zoetecnocampo.com>. 2001.
10. Upadilla. Et all. Inmuno-modulatory properties of neem. Natural Institute of Immunology, India. Int J inmunopharmacol 1992 oct;14(7).
11. Aza-Neem. Efecto sistémico. Actividad y modo de accionar. Google.com. 2002.

Bibliografía General

1. **vegetales de la Flora Salvadoreña:**1989:Vol I: 325-330
2. Guerrero.M. **Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la Flora Salvadoreña:** Edit. Universitaria: 1994: 295-30
3. González, Ayala. **Botánica Medicina popular.** Edit. Cuscatlan. 1994:Vol2.:91
4. MSPAS. **Reporte Epidemiológico diario de consulta externa.** 1999
5. Koneman, A. Et al. **Diagnostico microbiológico.**:edit. Panamericano:1988:298-300
6. Lezate.M. **Medicina Natural.** Pax México:1997:165-173
7. Heinerman. J. **Propiedades curativas:**edit. Paidos: 1995: 13-106
8. Lazo Waldo. **Antimicrobianos producidos por las plantas.** 1991:6:rev.micolog.:9-37
9. Bonifaz, A., Muños A. Et al. **Propiedades antimicrobianas.**1990: Dermat. Rev mex; 34 (3); 199-204
1. **PLANTER. Obtención y aprovechamiento de extractos**