



**BUAP**

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DEL EXTRACTO  
DE *Azadirachta Indica* A. Juss EN LA INHIBICIÓN DE  
MICROORGANISMOS”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIATURA EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**PRESENTA:**

**NAYELI FLORES RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**M. EN C. MA. DOLORES CASTAÑEDA ANTONIO**

**PUEBLA, PUEBLA**

**AGOSTO DEL 2016**



**BUAP**

“60 Aniversario de la Autonomía Universitaria”

Oficio No. FIQ/AC/163/2016  
Asunto: Registro de Tema de Tesis

**C. NAYELI FLORES RAMÍREZ  
PASANTE DE LA LICENCIATURA  
EN INGENIERÍA AMBIENTAL  
P R E S E N T E:**

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Ambiental cuyo título es el siguiente:

“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DEL EXTRACTO DE Azadirachta Indica A. Juss EN LA INHIBICIÓN DE MICROORGANISMOS”

Con el siguiente contenido:

**INTRODUCCIÓN**

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>ANTECEDENTES</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>METODOLOGÍA</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>

**CONCLUSIONES  
BIBLIOGRAFÍA**

Directora de Tesis: M.C. Ma. Dolores Castañeda Antonio

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO.**

**A T E N T A M E N T E**  
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”  
H. Puebla de Z., 04 de febrero del 2016

  
**M.L.C. MA. GPE. TITA VÁZQUEZ DE LOS MONTEROS**  
**SECRETARIA ACADÉMICA**



C.c.p. Directora de Tesis: M.C. Ma. Dolores Castañeda Antonio  
Minutario Facultad de Ingeniería Química

Facultad  
de Ingeniería  
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San  
Manuel, Ciudad Universitaria,  
Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00  
Ext. 7250 y 7251

*“Ni las victorias de los juegos olímpicos, ni las que se alcanzan en batallas, hacen al hombre feliz. Las únicas que le hacen dichoso son las que consigue sobre sí mismo, Las tentaciones y pruebas son combates. Haz vencido una, dos, muchas veces; combate aún. Si llegas al fin a vencer, serás dichoso toda tu vida, como si hubieras vencido siempre”.*

*Epicteto*

## DEDICATORIA

*A mi Mamá, por ser mi ejemplo para salir adelante, por los consejos que me has dado a lo largo de mi sendero, te doy las gracias por guiarme y tenerme la confianza en que lograría culminar mis estudios, por tener una fortaleza inquebrantable, por ser una mujer luchadora, por ser esa gran mujer de la que estoy orgullosa de que sea mi madre y que espero algún día estés de igual manera orgullosa de mí, porque gracias a tu apoyo, regaños, alegrías, tristezas y amor he logrado concluir esta etapa en mi vida. Esta tesis es el resultado de todo lo que me has enseñado desde mi niñez, ya que siempre has sido esa persona que lucha por lo que quiere y sabe salir adelante y ser triunfadora en la vida. Es por ello que hoy te dedico este trabajo de tesis. Gracias por confiar en mí, darme tu amor incondicional y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida, Te amo Mamá.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A mis **abuelos**, por ser como unos padres para mí que con amor y sabiduría me han formado grandes valores, ya que me han enseñado a luchar y conseguir lo que quiero, que me han instruido con las herramientas necesarias para apreciar cada momento sea bueno o malo, por los regaños que en ese momento merecía, por estar a mi lado alentándome para ser mejor cada día. Gracias por hacer de mí una buena estudiante y ahora una gran profesionalista. Los amo papás.*

*A mis **papás**, por creer y confiar en mí y en mis expectativas, por darme esos consejos cuando los he necesitado, por darme la oportunidad de convertirme en una profesionalista, porque hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera. Gracias por estar conmigo a lo largo de este camino. Los quiero mucho.*

*A mis **tíos**, por brindarme su apoyo y confianza, por darme esas palabras de aliento cuando las he necesitado, por ayudarme a levantarme en esos momentos difíciles de la vida y siempre estar a mi lado. Por ello el día de hoy les doy las gracias debido a que ustedes también han formado una parte muy importante de esta etapa. Los quiero.*

*A mis **primos**, por apoyarme y confiar en que lo lograría.*

*A mi **bisabuela**, por darme esos consejos tan sabios, por enseñarme a valorar las cosas buenas de la vida, por darme su amor.*

*A mi **hermano** (peque), por saberme comprender a pesar de tu corta edad, por apoyarme y darme ese impulso cuando lo he necesitado, por esos abrazos tan reconfortantes, por escucharme aunque no entendías nada de lo que te decía, gracias hermano por apoyarme y confiar en que lo lograría. Ahora te toca a ti ya hacer que se enorgullecen mucho más ti. Te quiero mucho!!!*

*A mi **tía Areli**, por orientarme y apoyarme con sus conocimientos cuando lo he necesitado.  
Gracias por brindarme tu apoyo.*

*A mis **amigos**, por apoyarme a quitar las dudas que salían a lo largo de cada cuatrimestre, por darme una sonrisa en esos momentos de desesperación, por darme ánimos cuando creía que ya no podía, por ello y muchas cosas más les doy las gracias.*

*A **Ana e Irving**, por ser como unos hermanos para mí, por siempre confiar en que lo lograría, por esos momentos de risas que me ayudaron a desestresarme, por esas palabras de aliento cuando las he necesitado. Gracias por todo.*

*A mi **Directora de tesis**, por ayudarme a concluir esta etapa estudiantil y así tener un logro más en mi vida. Gracias por su apoyo.*

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Introducción</b>	1
<b>Planteamiento del problema</b>	3
Justificación	5
Objetivos	7
<i>Objetivos Generales</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Hipótesis	8
<b>CAPÍTULO 1</b>	
Marco teórico	9
<b>1.1. Taxonomía</b>	10
<b>1.2. Clasificación de extracciones</b>	12
<b>1.2.1. Extracción por solución</b>	13
<b>1.2.2. Extracción por centrifugación</b>	14
<b>1.2.3. Extracción en fase sólida</b>	14
<b>1.2.4. Infusión</b>	14
<b>1.2.5. Maceración</b>	14
<b>1.2.6. Digestión</b>	14

1.2.7. Decocción	15
1.2.8. Percolación o lixiviación	15
1.2.9. Maceración – decocción	15
<b>1.3. Cromatografía</b>	<b>15</b>
1.3.1. Cromatografía de papel	16
1.3.2. Cromatografía de capa fina	16
1.3.3. Cromatografía de columna	16
1.3.4. Cromatografía gaseosa	17
<b>1.4. Espectrofotometría de Absorción atómica</b>	<b>17</b>
<b>1.5. Técnica para pruebas de inhibición Kirby Bauer</b>	<b>18</b>
<b>1.6. Técnica por dilución en placa</b>	<b>18</b>
<b>1.7. <i>Escherichia coli</i></b>	<b>19</b>
<b>1.8. <i>Trichoderma aggressivum</i></b>	<b>20</b>
<b>1.9. <i>Candida albicans</i></b>	<b>21</b>

## **CAPÍTULO 2**

Metodología	23
<b>2.1. Adquisición de la planta</b>	<b>23</b>
<b>2.2. Diagrama de la metodología</b>	<b>26</b>
2.2.1. Diagrama de la evaluación del extracto y esterilización	26
2.2.2. Diagrama de pruebas de estandarización de la concentración	27
2.2.3. Diagrama de pruebas de inhibición en placas	28

<b>2.3. Obtención de extractos</b>	29
<b>2.3.1. Extracto de maceración</b>	31
<b>2.3.2. Extracto de infusión</b>	33
<b>2.3.3. Extracto por soxhlet</b>	34
<b>2.3.4. Extracto digestado</b>	35
<b>2.4. Determinación de compuestos orgánicos</b>	37
<b>2.5. Determinación de metales pesados</b>	39
<b>2.6. Preparación de inóculos</b>	40
<b>2.7. Cuantificación de <i>Escherichia coli</i></b>	40
<b>2.8. Dilución en placa</b>	40
<b>2.9. Kirby Bauer modificado</b>	42

### **CAPÍTULO 3**

Resultados	44
<b>3.1. Concentraciones obtenidas en los diferentes extractos</b>	44
<b>3.2. Identificación de compuestos por Cromatografía de Gases</b>	45
<b>3.3. Curvas de calibración de Espectrofotometría de absorción Atómica</b>	50
<b>3.4. Resultados obtenidos de <i>Trichoderma aggressivum</i> con los diferentes extractos de Neem (<i>Azadirachta Indica A. Juss</i>)</b>	55

3.4.1. Resultados obtenidos de <i>Trichoderma agressivum</i> con el extracto de maceración y concentrado	55
3.4.2. Resultados obtenidos de <i>Trichoderma agressivum</i> en Kirby Bauer modificado a dos concentraciones	56
3.4.3. Resultados obtenidos de <i>Trichoderma agressivum</i> del extracto de infusión	57
3.4.4. Resultados obtenidos de <i>Trichoderma agressivum</i> en Kirby Bauer modificado con extracto de infusión	58
<b>3.5. Resultados obtenidos de <i>E. coli</i> con los diferentes extractos de Neem (<i>Azadirachta Indica A. Juss</i>)</b>	<b>59</b>
3.5.1. Resultados obtenidos de <i>E.coli</i> del extracto de maceración y concentrado	59
3.5.2. Resultados obtenidos de <i>E. coli</i> en Kirby Bauer modificado del extracto de maceración y concentrado	60
3.5.3. Resultados obtenidos de <i>E. coli</i> del extracto de infusión	62
3.5.4. Resultados obtenidos de <i>E.coli</i> en Kirby Bauer modificado del extracto de infusión	63
<b>3.6. Resultados obtenidos de <i>Candida albicans</i> de los diferentes extractos de Neem (<i>Azadirachta Indica A. Juss</i>)</b>	<b>64</b>
3.6.1. Resultados obtenidos de <i>Candida albicans</i> del extracto de maceración y concentrado	64
3.6.2. Resultados obtenidos de <i>Candida albicans</i> en Kirby Bauer modificado con extracto de maceración y concentrado	66

3.6.3. Resultados obtenidos de <i>Candida albicans</i> del extracto de infusión	67
3.6.4. Resultados obtenidos de <i>Candida albicans</i> en Kirby Bauer modificado con extracto de infusión	68
Conclusiones	70
Bibliografía	71
Anexos	76

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Semillas	9
<b>Figura 2.</b> Árbol de Neem	9
<b>Figura 3.</b> Flor	10
<b>Figura 4.</b> Corteza	10
<b>Figura 5.</b> <i>Escherichia coli</i>	20
<b>Figura 6.</b> <i>Trichoderma</i>	21
<b>Figura 7.</b> <i>Candida albicans</i>	22
<b>Figura 8.</b> Mapa de Tlaxcala	23
<b>Figura 9.</b> Mapa de Puebla	24
<b>Figura 10.</b> Muestra de Neem de Invernadero en Puebla	25
<b>Figura 11.</b> Muestra de Neem de Mercado Zapata	25
<b>Figura 12.</b> Muestra seca	29
<b>Figura 13.</b> Muestra pesada	29
<b>Figura 14.</b> Muestra en el solvente	30
<b>Figura 15.</b> Muestra en rotavapor	30
<b>Figura 16.</b> Muestra analizada por Cromatografía de Gases	30
<b>Figura 17.</b> Muestra pesada	31
<b>Figura 18.</b> Muestra colocada en la parrilla	31
<b>Figura 19.</b> Filtración del extracto	32
<b>Figura 20.</b> Extracto en embudo de separación	32

<b>Figura 21.</b> Fases obtenidas	32
<b>Figura 22.</b> Muestra analizada por Cromatografía de Gases	32
<b>Figura 23.</b> Muestra pesada	33
<b>Figura 24.</b> Muestra en soxhlet	33
<b>Figura 25.</b> Muestra analizada por Cromatografía de Gases	33
<b>Figura 26.</b> Muestra pesada	34
<b>Figura 27.</b> Esterilización en autoclave	34
<b>Figura 28.</b> Filtrado del extracto	35
<b>Figura 29.</b> Muestra analizada por Espectrofotometría de Absorción Atómica	35
<b>Figura 30a y 30b.</b> Cromatografía de gases	36
<b>Figura 30a.</b> Cromatografo de gases 7890 agilent technologies	36
<b>Figura 30b.</b> Cromatograma obtenido	36
<b>Figura 31.</b> Espectrofotometría de Absorción Atómica	39
<b>Figura 31a.</b> Perkin Elmer modelo AAnalyst 200	38
<b>Figura 31b.</b> Lámparas de cátodo hueco	39
<b>Figura 31c.</b> Software	39
<b>Figura 32.</b> Siembra para las pruebas de inhibición mediante extractos por la técnica de diluciones	42
<b>Figura 33.</b> Siembra para las pruebas de inhibición mediante extractos por la técnica de Kirby Bauer modificado	43
<b>Figura 34.</b> Cromatogramas de Extractos de <i>Azadirachta Indica A. Juss</i>	46

<b>Figura 34a.</b> Cromatograma de Extracto concentrado de Neem con metanol	45
<b>Figura 34b.</b> Cromatograma de Extracto de infusión con diclorometano	46
<b>Figura 34c.</b> Cromatograma de Extracto obtenido por soxhlet con hexano	46
<b>Figura 35a, 35b y 35c.</b> Curvas de calibración de metales	52
<b>Figura 35a.</b> Curva de calibración de Cobre	51
<b>Figura 35b.</b> Curva de calibración de Fierro	51
<b>Figura 35c.</b> Curva de calibración de Zinc	52
<b>Figura 36a y 36b.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Trichoderma aggressivum</i> del extracto de maceración y concentrado	55
<b>Figura 36a.</b> Extracto de maceración a una concentración de 35.838 g/L a las 72 horas	55
<b>Figura 36b.</b> Extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L a las 72 horas	55
<b>Figura 37a y 37b.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Trichoderma aggressivum</i> en Kirby Bauer modificado del extracto de maceración y concentrado	56
<b>Figura 37a.</b> Extracto de maceración a una concentración de 35.838 g/L a las 72 horas	56
<b>Figura 37b.</b> Extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L a las 72 horas	56
<b>Figura 38a y 38b.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Trichoderma aggressivum</i> del extracto de infusión	57

<b>Figura 38a.</b> Extracto de infusión a una concentración de 44.196 g/L a las 24 horas.	57
<b>Figura 38b.</b> Extracto de infusión a una concentración de 44.196 g/L a las 72 horas	57
<b>Figura 39.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Trichoderma</i> <i>agressivum</i> en Kirby Bauer modificado del extracto de infusión	58
<b>Figura 39.</b> Extracto de infusión a una concentración de 44.196 g/L a las 72 horas.	58
<b>Figura 40a y 40b.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>E. coli</i> a dos concentraciones	59
<b>Figura 40a.</b> Extracto de maceración a una concentración de 35.838 g/L a las 72 horas	59
<b>Figura 40b.</b> Extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L a las 72 horas.	59
<b>Figura 41a y 41b.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>E. coli</i> en Kirby Bauer modificado a dos concentraciones	61
<b>Figura 41a.</b> Extracto de maceración a una concentración de 35.838 g/L a las 72 horas.	61
<b>Figura 41b.</b> Extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L a las 72 horas	61
<b>Figura 42.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>E. coli</i> del extracto de infusión	62

<b>Figura 42.</b> Extracto de infusión a una concentración de 44.196 g/L a las 72 horas.	62
<b>Figura 43.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>E. coli</i> por Kirby Bauer modificado del extracto de infusión	63
<b>Figura 44.</b> Extracto de infusión a una concentración de 44.196 g/L a las 72 horas.	63
<b>Figura 44a y 44b.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Candida albicans</i> del extracto de maceración	64
<b>Figura 44a.</b> Extracto de maceración a una concentración de 35.838 g/L a las 24 horas.	64
<b>Figura 44b.</b> Extracto de maceración a una concentración de 35.838 g/L a las 72 horas.	64
<b>Figura 45.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Candida albicans</i> del extracto concentrado de maceración	65
<b>Figura 45a.</b> Extracto de maceración concentrado a una concentración de 2508.7 g/L a las 24 horas.	65
<b>Figura 45b.</b> Extracto de maceración concentrado a una concentración de 2508.7 g/L a las 72 horas.	65
<b>Figura 46a y 46b.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Candida</i> <i>albicans</i> en Kirby Bauer modificado del extracto de maceración y concentrado	67
<b>Figura 46a.</b> Extracto de maceración a una concentración de 35.838 g/L a las 72 horas.	67

<b>Figura 46b.</b> Extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L a las 72 horas.	67
<b>Figura 47.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Candida albicans</i> del extracto de infusión	68
<b>Figura 47.</b> Extracto de infusión a una concentración de 44.196 g/L a las 72 horas.	68
<b>Figura 48.</b> Resultados de la prueba de inhibición de <i>Candida albicans</i> en Kirby Bauer modificado del extracto de infusión	69
<b>Figura 48.</b> Extracto de infusión a una concentración de 44.196 g/L a las 72 horas.	69

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estándar de Mc Farland	39
<b>Tabla 2.</b> Diluciones para pruebas de inhibición	41
<b>Tabla 3.</b> Diluciones para pruebas de inhibición en sembrado masivo	43
<b>Tabla 4.</b> Concentración obtenida mediante el método de maceración	44
<b>Tabla 5.</b> Concentración obtenida mediante el método de infusión	44
<b>Tabla 6.</b> Concentración obtenida mediante el método de digestión	45
<b>Tabla 7.</b> Concentración obtenida mediante el método de soxhlet	45
<b>Tabla 8.</b> Compuestos reportados en el análisis de Cromatografía de gases en metanol	47
<b>Tabla 9.</b> Compuestos reportados en el análisis de Cromatografía de gases con diclorometano	48
<b>Tabla 10.</b> Compuestos reportados en el análisis de Cromatografía de gases con hexano	49
<b>Tabla 11.</b> Otros compuestos del árbol de Neem	50
<b>Tabla 12.</b> Metales reportados en Espectrofotometría de Absorción atómica	53
<b>Tabla 13.</b> Metales detectados por Espectrofotometría de Absorción Atómica	54

## INTRODUCCIÓN

Las plantas han evolucionado por más de 400 millones de años y para contrarrestar el ataque de los insectos estas han desarrollado mecanismos de protección, como la repelencia y la acción insecticida (Anaya *et al.*, 2001).

El uso masivo de estos insecticidas ha tenido un camino muy difícil pues en una primera época las recopilaciones que hacían los investigadores, entre los agricultores e indígenas, tenían mucho de superstición y cuando se les sometió a pruebas con rigor científico no mostraron efecto alguno (Ortiz, 2013).

Sin lugar a dudas los fitoinsecticidas constituyen una muy interesante alternativa de control de insectos además de que solo se han evaluado muy pocas plantas de las 300,000 que existen en el planeta por lo que las perspectivas futuras son aun insospechadas.

Por ello los extractos vegetales nos servirán de válidos sustitutos de costosos productos químicos que no son nada buenos para la fertilidad de la tierra ni para nuestra salud. Podemos preparar extractos para diversas funciones: fungicida, insecticida incluso para obtener valiosos abonos líquidos que reforzarán la vida del suelo y potenciarán el efecto de los abonos (Ecoagricultor, 2015).

Es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano; descubriendo en las plantas compuestos bioactivos para tal fin. El hombre a través del tiempo ha encontrado en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas, empleando las plantas a nivel alimenticio, industrial y medicinal, convirtiéndose de esta manera, en materias primas de vital importancia para el avance de la humanidad (Barragán, 2012)

Existen plantas como el Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*), que han mostrado tener excelentes resultados encontrándose ya en el mercado en formulaciones comerciales. (Ortiz, 2013)

Las plantas se utilizan para casi todo (López S., 2000) otorgan a la humanidad muchos y variados beneficios, además de los predominantes usos medicinal y comestible. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre 66 y 88% de la población del planeta recurre a la herbolaria para atender la curación de diversos padecimientos y enfermedades (Akererele, 1991).

Algunas poblaciones, sobre todo las que habitan en el medio rural, conocen y disponen de amplios grupos de vegetales durante las distintas épocas del año (Villavicencio, 1995).

En el presente trabajo se realiza el estudio de la planta *Azadirachta Indica A. Juss* también conocida como Neem, la cual es ampliamente usada como hipoglucémico y se desea saber si presenta propiedades inhibitorias para algunos microorganismos aunado a sus ya conocidas propiedades.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La agricultura en México ha sido continuamente afectada por diferentes plagas como lo son: el gusano cogollero del maíz, las moscas de las frutas, el picudo del algodnero, las arañas rojas, las mosquitas blancas, entre otras. Con los insectos se asocian numerosas enfermedades virosas y de igual manera se presentan otras causadas por hongos, bacterias y nematodos (Rosas *et al.*, 2007).

Por ello los campesinos han tenido que tomar la decisión de utilizar plaguicidas a pesar que son sustancias químicamente complejas, que ocasionan muchos problemas tanto en la salud como en el medioambiente, al ser aplicados están sujetos a transformaciones a nivel físico, químico y biológico. Algunas cosechas no soportan su aplicación y se pierde la siembra.

Los plaguicidas, son considerados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente como contaminantes de acuíferos ya que tienen una alta toxicidad, persistencia y movilidad. Y por sus propiedades fisicoquímicas son resistentes a la degradación biológica (Cipriano *et al.*, 2012). Actualmente se evita el uso de estos plaguicidas debido a su elevada toxicidad y muchas instituciones están en la búsqueda de alternativas que ocasionen un menor daño al medio ambiente.

En la actualidad, se están investigando diversas plantas por sus principios activos presentes en ellas ya que por medio de diversos estudios se conoce que la mayoría de las especies vegetales poseen propiedades bactericidas, antiinflamatorias, antivirales, antipiréticas, insecticidas y fungicidas (Miranda *et al.*, 2012)

Por ello se están buscando alternativas naturales renovando las técnicas para proteger al cultivo de las distintas plagas existentes. Por medio del uso de plantas de las cuales se obtendrán distintos extractos de las plantas como lo son: ajenojo,

albahaca, barbasco, caléndula, diente de león, manzanilla dulce, neem, rábano picante, ruda, salvia blanca, tabaco, yerbabuena, entre otros.

Por ello se busca investigar al extracto del Neem ya que sea empezado a estudiar como una alternativa para el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia* donde los resultados indicaron que es una alternativa potencial para efectuar el manejo de las bacterias del género *Erwinia*, causante de daño en el cultivo de berenjena (Briceño *et al.*, 2011).

También se conoce que varios extractos crudos de Neem tienen actividad insecticida y microbicida, siendo las más importantes la actividad anti alimentaria y el bloqueo en el proceso de metamorfosis de larvas, las semillas de Neem contienen una serie de limonoides estructuralmente relacionados con la azadiractina, lo que podría significar que también sean biológicamente activos para el control de microorganismos.

El contenido de los componentes con actividad biosida varía de acuerdo a la variedad genética y al estado de madurez del árbol del Neem. (Coventry E, 2001), demostraron que extractos etanólicos de semillas de Neem, inhibieron considerablemente el crecimiento de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* y *Nocardia sp.* Así determinaron los componentes antimicrobianos en extractos de semillas de Neem, encontrando que azadiractina, nimbina y salannina, que en conjunto, son responsables de la actividad antimicrobiana (López *et al.*, 2007).

En el presente estudio se evaluó los efectos de inhibición de los distintos extractos en bacterias, hongos y levaduras y esta podría dar una posible solución al problema de las infecciones o plagas en las cosechas por propiedades ya reportadas y por los compuestos presentes en sus extractos.

## JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo estudia los extractos del Neem como inhibidor de bacterias, hongos y levaduras ya que son un problema constante en los cultivos que afectan las cosechas y a los agricultores, buscando su eliminación han recurrido al uso de distintos plaguicidas, pero al no ser naturales y estar compuestos por productos sintéticos, como los son: los carbamatos, los organoclorados y los organofosforados no los hacen mejor opción.

Estos plaguicidas ayudan a eliminar las diferentes plagas existentes, pero de igual manera envenenan a nuestro medio ambiente ya que al aplicarlo en la cosecha contaminan el suelo con químicos eliminando a la macrobiota y microbiota que ayudan a crear los distintos nutrientes que son necesarios para que el terreno sea fértil.

Debido a que no se ha encontrado un plaguicida que termine con las diferentes plagas existentes, sin provocar daño alguno al medio ambiente, a la salud y a las cosechas, es necesario realizar una investigación sobre el potencial que presentan las plantas para la eliminación y defensa de sus plagas proponiendo que el extracto del Neem podría ser una gran solución a este enorme problema que persiste y que cada día se hace más grande y más resistente a los distintos plaguicidas. Para comprobar que el extracto de Neem ayuda a inhibir el crecimiento de microorganismos, se han escogido: *E. coli*, *Trichoderma aggressivum* y *Candida albicans*.

Cada uno de estos microorganismos fue seleccionado por diferentes razones como: *E. coli* debido a la reciente contaminación detectada en la aduana de Estados Unidos del cilantro, situación que causó que la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, (FDA, por sus siglas en inglés) prohibiera

parcialmente la importación del cilantro mexicano por supuestamente ser el principal causante de un brote de infecciones estomacales en Texas (Soto, 2015).

*Trichoderma aggressivum* fue elegido debido a que hay un incremento dramático de incidencia y severidad de los "mohos verdes" en la producción de hongos comestibles, lo que ha ocasionado problemas de contaminación en su producción en México, ha causado serias disminuciones en la producción de hongos comestibles y presentar pérdidas económicas para los productores de la región (Arenas *et al.*, 2009). *Candida albicans* ha sido escogida como representante de levaduras debido a que presenta características distintas a las antes mencionadas.

# OBJETIVOS

## ***Objetivo General***

Evaluar el efecto del extracto de *Azadirachta Indica A. Juss* (Neem) como inhibidor para bacterias, hongos y levaduras.

## ***Objetivos Específicos***

- a) Obtener y caracterizar diferentes extractos representativos de plantas de Neem para determinar su composición.
- b) Evaluar los efectos que pudieran tener la aplicación de estos extractos para la inhibición de microorganismos.

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

La etnobotánica estudia las relaciones entre las plantas y los humanos. Estas relaciones han existido desde el momento en que el hombre inició el uso de los vegetales para satisfacer sus necesidades de supervivencia, ya sea como alimento, para producir calor, para abrigarse, en la construcción, como ornamento y para procurar su salud (Hernández *et al.*, 2007).

El árbol de Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*) es una planta perenne arbórea de crecimiento rápido, es originario de la India, solo vive en regiones tropicales y subtropicales, este puede llegar a alcanzar de 15 a 20 m de altura ya desarrollado.

Este es una especie que ha llamado el interés de distintos científicos, ya que tiene múltiples propiedades y usos de sus componentes como lo son: semillas, cáscara de la semilla, hojas, corteza y madera. (Figuras 1, 2, 3 y 4) El árbol del Neem empieza con su producción de frutos después de 3 a 5 años de su plantación y alcanza su máxima producción a los 10 años en el cual puede producir más de 50 kg de frutos anualmente.



**Figura 1.** Semillas



**Figura 2.** Árbol de Neem

## HIPÓTESIS

Los efectos de los extractos de *Azadirachta Indica A.Juss* (Neem) son eficientes en la inhibición de algunos microorganismos que son capaces de infectar a los cultivos. En el caso de *Trichoderma aggressivum* se encuentra presente en los cultivos de hongos comestibles. *E. coli* y *Candida albicans* están presentes en las infecciones de plantas, animales y humanos. Por lo cual estos extractos presentan una alternativa viable para la eliminación de estos microorganismos, permitiendo su supresión sin contaminar los cultivos.



**Figura 3.** Flor



**Figura 4.** Corteza

El Neem prefiere los suelos profundos, livianos, permeables y arenosos, por lo menos sin horizontes endurecidos, pero puede plantarse en una amplia variedad de tipos de suelo, incluyendo sitios difíciles donde la mayoría de otras especies no se desarrollan bien.

La temperatura idónea a la cual el Neem crece normalmente oscila entre una temperatura de 9,5 a 37°C, la cual se podría tomar como una temperatura moderada.

Y de igual manera el Neem crece en condiciones a temperaturas muy elevadas donde la temperatura máxima puede elevarse sobre los 50°C, pero no soporta temperaturas bajas o extensas heladas.

## 1.1. TAXONOMÍA

- ❖ *Azadirachta Indica A. Juss*
- ❖ *Perenne Arbórea*
- ❖ **Origen:** India
- ❖ **Altura:** 15 a 20 m
- ❖ **Vive:** Regiones Tropicales y Subtropicales
- ❖ **Reino:** *Plantae*

- ❖ **División:** *Magnoliophyta*
- ❖ **Orden:** *Sapindales*
- ❖ **Familia:** *Meliaceae*
- ❖ **Género:** *Azadirachta*

El Neem se ha utilizado desde hace varios siglos en la medicina para tratar diversos males desde fiebre hasta la malaria y de igual manera se ha averiguado que el aceite que se extrae de algunas partes del árbol de Neem (hojas, semillas, corteza, etc.)

Posee como agente activo el azadiractina, el cual se ha comprobado que funciona como insecticida natural que compite ventajosamente con los insecticidas sintéticos.

Debido a estas características muchos países han hecho el esfuerzo por importarla. En México fue introducido en 1989 y ha sido objeto de estudio. El Neem puede proporcionar una fuente barata de Manejo Integrado de Plagas (MIP) para agricultores, materia prima para microempresas rurales o para el desarrollo de industrias.

El Neem como manejo de plagas no es tóxico al humano, no contamina el ambiente y es de fácil aplicación a través de procesos rústicos. Por lo tanto puede sustituir ventajosamente a los plaguicidas químicos, los cuales son ecológicamente inaceptables debido a un alto riesgo para la salud, producen resistencia en los insectos e incrementan los costos de producción.

El Neem contiene 30 metabolitos insecticidas; de ellos el más importante es la sustancia identificada como *Azadiractina* (AZA). La *Azadiractina* es una sustancia que es reconocida como un compuesto activo de mayor efectividad contra los insectos, se encuentra en mayor cantidad en las semillas (Fernández, 2004).

La *Azadiractina* se degrada rápidamente en agua o en presencia de luz (2 a 4 días). No es considerado como un compuesto bioacumulable. La cantidad de *Azadiractina* en el árbol de Neem puede variar debido a su naturaleza y bioactividad.

La *Azadiractina* es efectiva contra cerca de 200 especies de insectos, no afectos a los mamíferos o a los animales que consumen estos insectos, ni tampoco a los insectos útiles para la polinización o que son beneficios para la planta (Sánchez, 2009).

Las semillas de Neem contienen una serie de limonoides estructuralmente relacionados con la azadiractina, lo que podría significar que también sean biológicamente activos para el control de microorganismos.

El contenido de los componentes con actividad biocida varían de acuerdo a la variedad genética y al estado de madures del árbol del Neem (López *et al.*, 2007).

Para obtener los diferentes extractos con los que se harán las pruebas de Inhibición de los microorganismos se investigaran los distintos métodos posibles a utilizar.

## **1.2. CLASIFICACIÓN DE EXTRACCIONES**

Existen distintos procesos para la extracción de los diferentes extractos, aceites esenciales, etc. Todavía se llegan a utilizar otros procesos extractivos más convencionales, como lo son por arrastre de vapor, los de extracción por solución y los de extracción por centrifugación.

**1.2.1. Extracción por solución:** Este tipo de extracción genera un rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, además de obtenerse prácticamente todos los compuestos presentes en la planta.

Por otra parte, precisa de equipos de vacío para poder obtener los aceites absolutos, con altos costos operativos. Y sobre todo es necesario utilizar disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, etc.

Necesariamente se han establecido etapas adicionales de purificación si la esencia o el producto se van a destinar al consumo o la higiene humana. Esta restricción ha implicado tener que buscar nuevas soluciones pero también hay elevado su costo y su aplicación. Para ello se lleva a cabo una extracción con disolventes orgánicos, que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura.

Después, se elimina el disolvente obteniendo la fracción deseada. La extracción puede ser sólido – líquido o líquido – líquido en función del estado de la muestra.

- *Extracción sólido – líquido:*

Cuando es una muestra sólida, se pulveriza y a continuación, se extraen los analitos mediante un disolvente en el que sean muy solubles, que los diferencia de las sustancias presentes en la matriz, que han de ser muy insolubles en ese disolvente.

Se suele hacer con agitación, temperatura o ultrasonidos para una mayor eficacia. Normalmente se somete a centrifugación tras la extracción para eliminar los sólidos que hayan podido quedar.

- *Extracción líquido – líquido*

Consiste en extraer los analitos de una muestra líquida mediante un disolvente inmiscible en ella, como puede ser una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible. El pH es fundamental para conseguir buen rendimiento.

**1.2.2. Extracción por centrifugación:** Los extractos y aceites obtenidos por este proceso tienen características aromáticas superiores a las conseguidas por extracción por arrastre de vapor. Al no ser un proceso térmico, sus propiedades son más estables, por los antioxidantes naturales presentes. Aun así, la fricción interna de la materia prima provoca un aumento de temperatura no controlable que puede implicar una degradación térmica y un oscurecimiento del extracto.

**1.2.3. Extracción en fase sólida:** Se emplean columnas o cartuchos capaces de retener el analito, que se extrae posteriormente con un pequeño volumen de disolvente (Arraiza, 2009).

**1.2.4. Infusión:** Se vierte el agua hirviendo sobre la planta colocada en un recipiente de cierre bien ajustado, a fin de evitar la pérdida de principios activos, y se deja en reposo de 5 a 15 minutos, filtrándose y tomándose inmediatamente. Generalmente, se utiliza para flores, hojas y tallos tiernos.

**1.2.5. Maceración:** Se introduce la planta en agua a temperatura ordinaria durante varias horas generalmente, de 8 a 12 horas. Esta forma de extracción se suele emplear para plantas ricas en mucílagos como las semillas de lino.

**1.2.6. Digestión:** Se trata de macerar la planta en agua a temperatura media, alrededor de 50°C, durante un tiempo determinado. Se utiliza, sobre todo, para el agotamiento de las drogas resinosas o cuando los disolventes empleados son grasos (preparación de aceites medicamentosos).

**1.2.7. Decocción:** Consiste en echar la planta en agua hirviendo y dejarla hervir durante 5 o 20 minutos, a una temperatura superior al punto de ebullición, en un recipiente cerrado para evitar la evaporación. Se utiliza para raíces, tallos fuertes y cortezas

**1.2.8. Percolación o lixiviación:** En este caso el agua, alcohol u otro disolvente atravesaría una columna llena de planta pulverizada, arrastrando durante el proceso los principios activos. Ejemplo. Café

**1.2.9. Maceración-decocción:** Se utiliza para ciertas tisanas, compuestas de partes vegetales duras y tiernas, en donde está indicado ponerlas en maceración antes de cocerlas (Corado, 2005).

De las diferentes técnicas para obtener los extractos a ocupar, se utilizaran los extractos por maceración, soxhlet e infusión. Los cuales se analizarán para identificar los compuestos que contiene el extracto.

### **1.3. CROMATOGRAFÍA**

Uno de los métodos más utilizados para la identificación de compuestos es la cromatografía. Ya que la cromatografía es el nombre que se les da a un grupo de técnicas utilizadas en la determinación de la identidad de sustancias, en la separación de componentes de las mezclas y en la purificación de compuestos.

Es una técnica muy efectiva y por lo tanto se utiliza tanto para nivel de investigación como a nivel industrial. Todos los sistemas de cromatografía tienen una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido que se queda fijo en la misma posición. La fase móvil puede ser un líquido o un gas que corre a través de una superficie y de la fase estacionaria.

Las sustancias que están en un sistema de cromatografía interactúan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil. La naturaleza de estas interacciones depende de las propiedades de las sustancias así como también de la composición de la fase estacionaria. Las diferentes técnicas de cromatografía son:

**1.3.1. Cromatografía de papel:** Es un proceso donde el absorbente lo constituye un papel de filtro. Una vez corrido el disolvente se retira el papel y se deja secar, se trata con un reactivo químico con el fin de poder revelar las manchas.

**1.3.2. Cromatografía de capa fina:** Basa en el principio del reparto entre dos fases. En general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interactúe con un medio que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio la fase móvil que es inmisible con la fase estacionaria que se hace fluir a través de esta para eluir a las moléculas en la muestra.

Debido a que las distintas moléculas en la muestra presentan diferentes coeficientes, la fase móvil a los distintos componentes con diferente eficiencia, de modo que aquellos que en la fase móvil serán eluidos más rápido que los que sean preferencialmente solubles en la fase estacionaria.

**1.3.3. Cromatografía de columna:** Los elementos básicos en la cromatografía de columna son una son la fase estacionaria y la fase móvil. La fase estacionaria la forma un sólido poroso, el cual queda soportado en el interior de una columna generalmente fabricada en plástico o vidrio.

La fase móvil se encuentra formada por la solución que lentamente va atravesando la fase estacionaria. La solución que sale al final de la columna

se reemplaza constantemente por nueva solución que se suministra desde un contenedor por la parte superior de la columna. La cromatografía en columna se emplea para la separación de sustancias en escala preparativa.

**1.3.4. Cromatografía gaseosa:** La muestra es evaporizada e introducida en un flujo de un gas apropiado denominado de fase móvil o gas de arrastre. Este flujo de gas con la muestra vaporizada pasa por un tubo conteniendo la fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente o más comúnmente, una película de un líquido poco volátil, soportado sobre un sólido inerte o sobre la propia pared del tubo.

Las sustancias preparadas salen de la columna disueltas en el gas de arrastre y pasan por un detector; dispositivo que genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad del material eluido. La cromatografía gaseosa es una técnica utilizada para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles (Noller, 2011).

## **1.4. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

La espectroscopia de absorción atómica (EAA), tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. Esta radiación es absorbida selectivamente por átomos que tengan niveles energéticos cuya diferencia de energía corresponda en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la ley de Beer, que relaciona esta pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos absorbedores (Lcampos, 2005).

## **1.5. TÉCNICA PARA PRUEBAS DE INHIBICIÓN KIRBY BAUER**

En este método se emplean discos de papel absorbente, impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano. Estos discos se colocan en la superficie de una placa de agar Mueller – Hinton de 4 mm de espesor, en la que se acaba de inocular una suspensión de la cepa por probar, con una turbiedad equivalente al tubo 0,5 del nefelómetro de Mc Farland.

Cuando el disco se humedece con el extracto a evaluar, el antimicrobiano difunde radialmente hacia fuera y crea un gradiente de concentración por disco; así el antimicrobiano está en la alta concentración cerca del disco y va disminuyendo a medida que se aleja del disco. El diámetro del anillo de inhibición dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo por probar, así como también de la solubilidad de la droga y de la tasa de difusión a través del agar.

Por eso es importante controlar muy bien el medio de cultivo, su espesor, el tiempo de incubación y la concentración de bacterias inoculadas, entre otros factores. Si se presentan zonas de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, la medición de esos diámetros de inhibición y su comparación con los valores de los cuadros de referencia, permite establecer si la cepa es resistente, intermedia o susceptible a esa droga (Cavallini, *et al.*, 2005).

## **1.6. TÉCNICA POR DILUCIÓN EN PLACA**

Este método consiste en la preparación de una serie de diluciones del extracto a evaluar, dichas diluciones se realizan en una placa microtituladora en la cual, el primer pozo queda vacío y a los demás se les coloca, con una micropipeta 100 $\mu$  de solución salina.

Al primer pozo que se dejó vacío se le colocan 200 $\mu$  del extracto a evaluar, posteriormente se toman 100 $\mu$  del extracto del primer pozo, los cuales se pasan al segundo pozo, en el cual se agita para obtener una mezcla homogénea que será la dilución 1:1 y así tomar nuevamente 100 $\mu$  de la dilución 1:1, para pasarlos al tercer pozo que será la dilución 1:2 en el cual se agitará la solución para homogenizar y tomar los 100 $\mu$  para repetir el proceso hasta llegar a la dilución 1:32.

Ya terminadas las diluciones se procede a tomar 2 $\mu$  de las diluciones para colocar tres gotas de cada dilución en el agar en el cual ya se sembró la cepa con anterioridad.

### **1.7. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (Figura 5) pertenece a un grupo de bacterias presentes en el intestino del ser humano y animales, siendo, la gran mayoría, inocuas en ellos. Sin embargo, hay algunas cepas de *E. coli* productoras de toxinas, llamadas verotoxinas o toxinas de tipo shiga que pueden causar cuadros gastrointestinales graves en el ser humano.

Las cepas de *E. coli* sobreviven durante meses en el estiércol contaminado las aguas superficiales (bebida y riego), las verduras y frutas y la superficie de las tierras de cultivo.

Estas bacterias se multiplican a temperaturas entre 6 y 50 °C, con una temperatura óptima alrededor de 37 °C. También, pueden crecer en presencia de un 6% de NaCl, ya que son más resistentes a estos compuestos que otras bacterias, como la *Salmonella*. (elika, 2013).



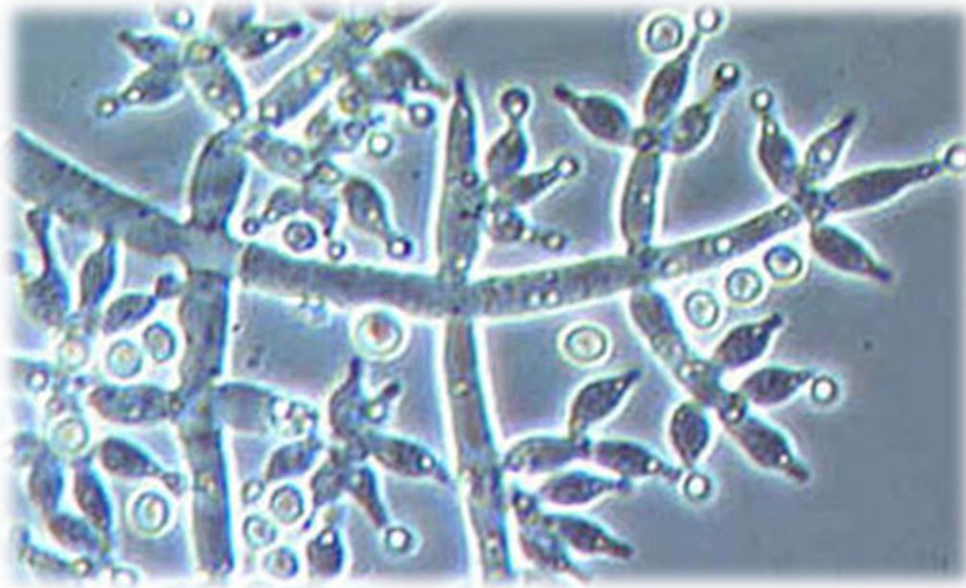
**Figura 5. *Escherichia coli***

### **1.8. *Trichoderma aggressivum***

*Trichoderma aggressivum* (Figura 7), es un habitante natural del suelo, caracterizado por un comportamiento saprofito o parásito, propiedades que benefician su actividad antagónica. Es considerado un colonizador secundario dado su frecuente aislamiento a partir de la superficie de raíces de varias plantas de madera (Camargo, 2005).

Las colonias de *Trichoderma aggressivum* presentan crecimiento rápido, que va formando una colonia delgada sobre la superficie del agar. Las colonias al comienzo son lisas o casi transparentes y algunas veces blancas, posteriormente se presentan penachos blancos y algodonosos, de micelio blanco, conformando una red densa, responsable del pigmento característico (Barnett, 1982).

El género *Trichoderma aggressivum* contiene especies que son de importancia biotecnológica.



**Figura 7. *Trichoderma aggressivum***

### **1.9. *Candida albicans***

*Candida albicans* (Figura 8), es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza. Pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. (INSHT, 2012)

*Candida albicans* está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad (Aristegui, 2002).

El principal agente es *Candida albicans*, pero pueden estar implicadas otras especies de *Candida*, como, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida famata*, *Candida krusei*; *C.lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, etc.

Teniendo en cuenta la reproducción sexuada de las levaduras se las incluye en las subdivisiones *Ascomucotina*, *Basidiomycotina* y *Deuteromycotina* (cuando no se conoce la reproducción sexuada).



**Figura 8. *Candida albicans***

# CAPÍTULO 2

## METODOLOGÍA

### 2.1. Adquisición de la planta

La adquisición de las muestras de la planta de *Azaditachta Indica A. Juss* se llevó a cabo en el mes de agosto del 2015 en un invernadero, en el municipio de Nativitas (Figura 8) en que se encuentra dividido el estado de Tlaxcala, situado en el suroeste del estado y en el límite con el estado de Puebla.



Figura 8. Mapa de Tlaxcala

La segunda muestra se adquirió en la zona urbana de Puebla en el Mercado zapata (Figura 9) en comercios de hierbas llamadas herbolarias.



**Figura 9.** Mapa de Puebla

Las muestras de Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*) es una planta perenne que fue muestreada en su etapa ya madura (Figuras 10 y 11).



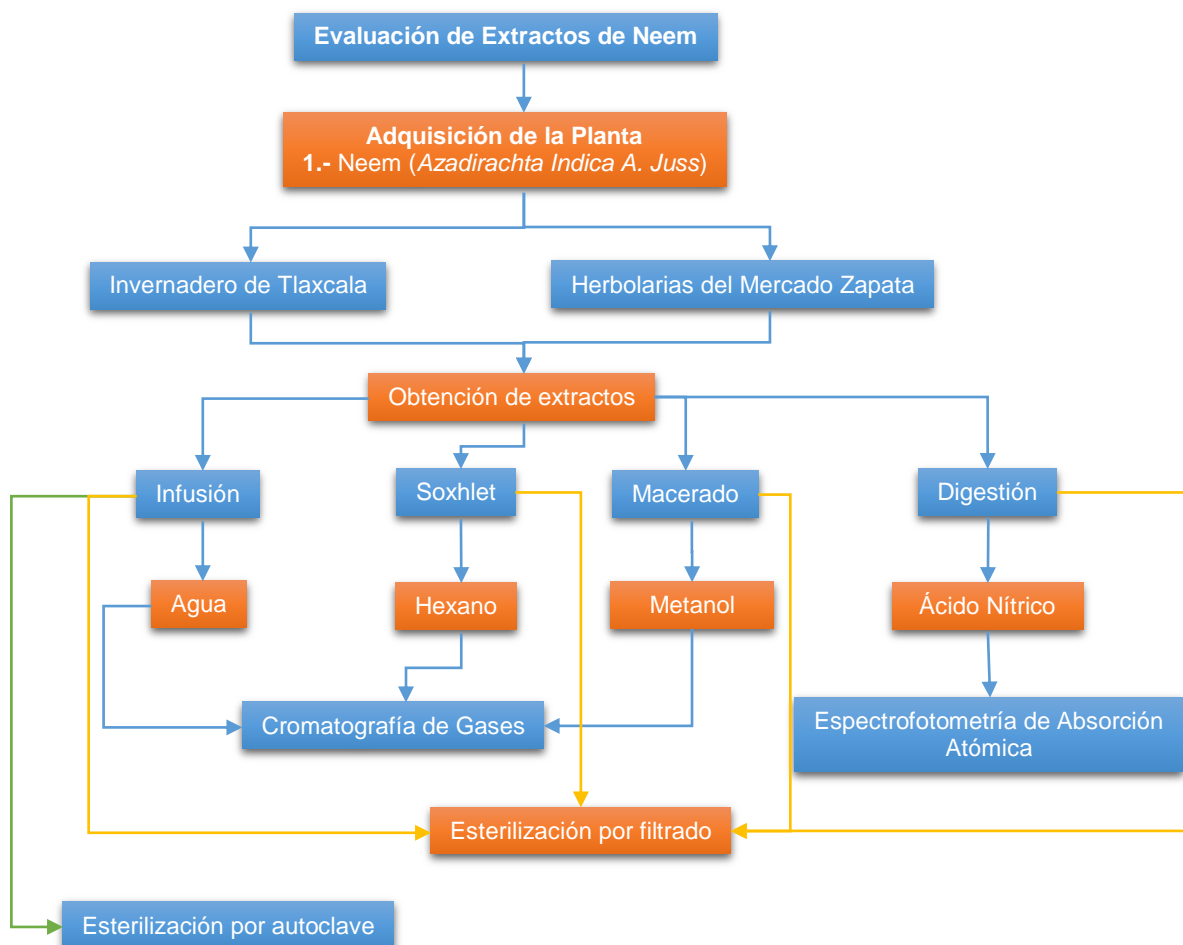
**Figura 10.** Muestra de Neem de Invernadero de Tlaxcala



**Figura 11.** Muestra de Neem de Mercado Zapata

## 2.2. Diagrama de la Metodología

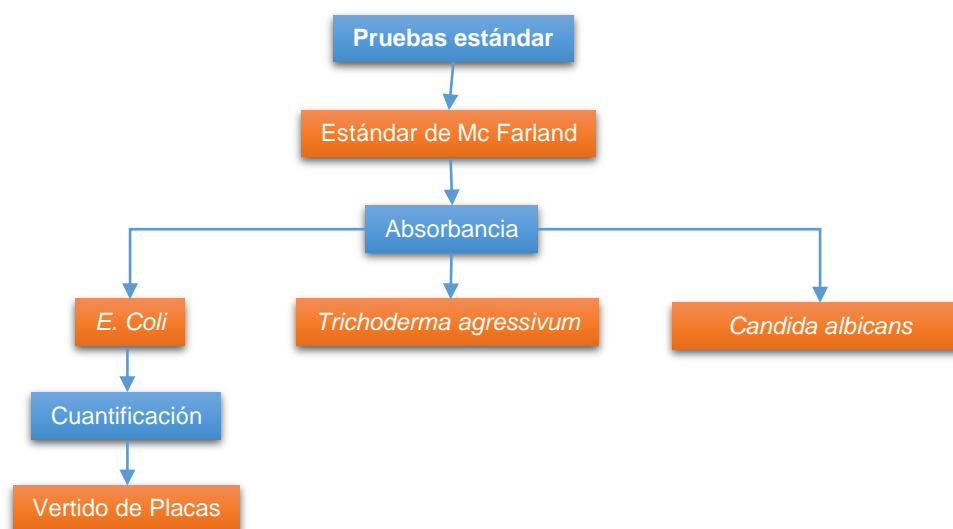
### 2.2.1. Diagrama de la evaluación del extracto y esterilización



Para la evaluación de los extracto se adquirieron las muestras del Neem en dos diferentes lugares, la primera muestra seca se adquirió en un Invernadero en Tlaxcala, la segunda muestra seca se adquirió con las herbolarias en el Mercado Zapata posteriormente se procedió a obtener los diferentes extractos que son: Infusión, Soxhlet, Macerado y Digestión.

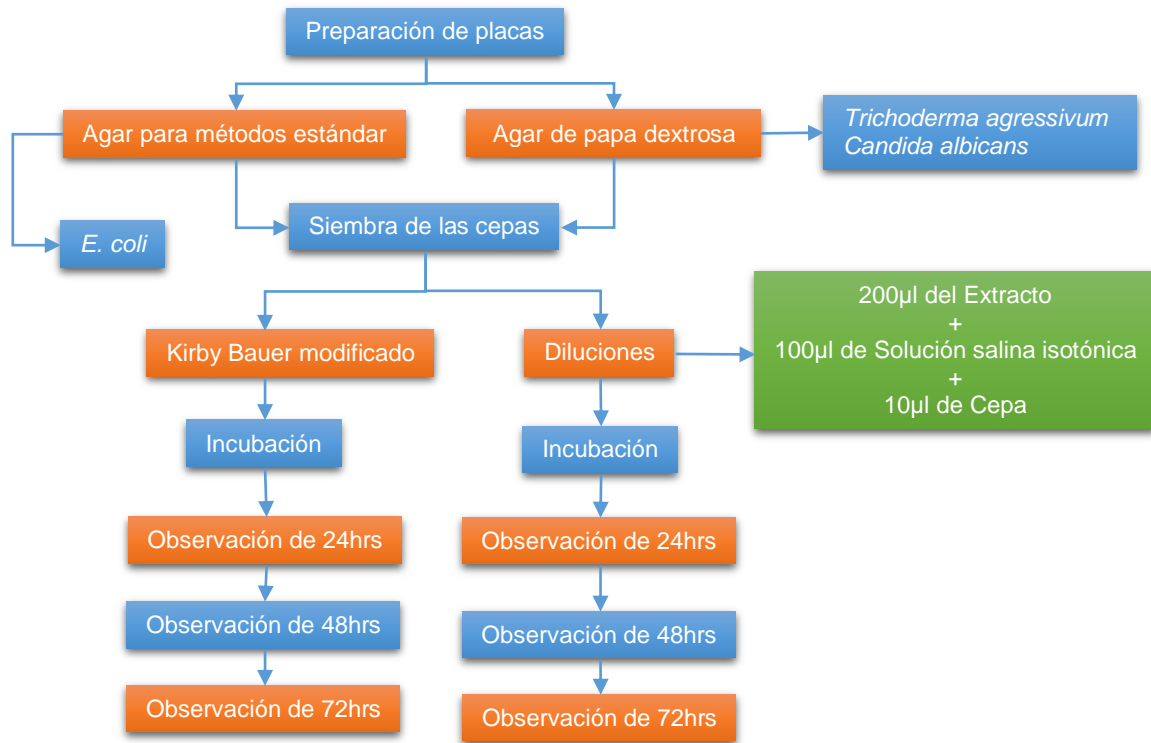
El extracto de infusión se obtuvo por medio de agua, el extracto de Soxhlet con hexano, el extracto de macerado con metanol y el extracto de digestión fue con ácido nítrico. Los extractos de Infusión, Soxhelt y Macerado se analizaron por cromatografía de gases y el extracto de digestión se analizó por espectrofotometría de absorción atómica. Los extractos se filtraron para las pruebas de inhibición, el único extracto que fue esterilizado por autoclave fue el extracto de infusión.

### 2.2.2. Diagrama de pruebas de estandarización de la concentración



Para las pruebas estándar se procedió a realizar un estándar de 0.25 del estándar de Mc Farland con el cual se comparó la turbidez y midió la absorbancia de *E. coli*, *Trichoderma agressivum*, *Candida albicans*. Posteriormente de *E. coli* se procedió a realizar la técnica del vertido de placas para obtener un conteo de *E. coli* en 10µl. Sirve para tener un inculo a una misma concentración y no exista una variación por parte de la concentración de la cepa del microorganismo.

### 2.2.3. Diagrama de pruebas de inhibición en placas



Estas pruebas son con las que se confronta el extracto con el microorganismo ya estandarizado (carga microbiana).

Se prepararon medios de cuenta estándar para *E. coli* y de agar de papa dextrosa para *Trichoderma aggressivum* y *Candida albicans*. Después se procedió a realizar la siembra de las cepas por diferentes métodos como lo son Kirby Bauer modificado y diluciones las cuales se pusieron en incubación, se observando durante 24, 48 y 72 horas llevando un registro de los resultados obtenidos.

## 2.3. Obtención de extractos

Para obtener los diferentes extractos con los que se trabajó se seleccionó la planta *Azadirachta Indica A. Juss* (Neem). Se pesaron 5 gramos de muestra de la planta para la obtención de los 3 diferentes extractos a trabajar. Los extractos con los que se trabajó son: por maceración con metanol, por infusión con agua y mediante soxhlet con hexano.

### 2.3.1. Extracto de maceración

Para la técnica de maceración se colocaron los 5 gramos de la muestra seca de la planta (Figura 12 y 13) en un recipiente de vidrio, al que se le colocó el solvente hasta cubrir la muestra (Figura 14), se dejó macerar en refrigeración durante una semana, posteriormente se colocó en el rotavapor hasta obtener 2ml (Figura 15), los cuales se analizaron mediante cromatografía de gases (Figura 16).



Figura 12. Muestra seca



Figura 13. Muestra Pesada



**Figura 14.** Muestra en el solvente



**Figura 15.** Muestra en rotavapor



**Figura 16.-** Muestra analizada por Cromatografía de Gases

### 2.3.2. Extracto de infusión

Para el extracto de infusión se pesaron 5 gramos de la muestra (Figura 17), se vertió el agua hirviendo sobre la planta (Figura 18) que se colocó en un recipiente cerrado, para evitar la pérdida de principios activos, y se dejó en reposo durante 5 a 15 minutos, se filtró (Figura 19) y se colocó en un embudo de separación (Figura 20 y 21), donde se colocaron 4ml de diclorometano, se procedió a agitarlo, liberar gases de esta manera se repitió el proceso hasta haber añadido 12ml de diclorometano, se dejó reposar hasta que se observó la separación de fases, la fase obtenida se llevó a la centrifugadora durante 5 minutos para obtener una mejor separación de esta y poder analizar por cromatografía de gases (Figura 22).



**Figura 17.** Muestra pesada



**Figura 18.** Muestra colocada en la parrilla



**Figura 19.** Filtración de extracto



**Figura 20.** Extracto en embudo de separación



**Figura 21.** Fases obtenidas



**Figura 22.** Muestra analizada por Cromatografía de Gases

### 2.3.3. Extracto por soxhlet

Para la extracción mediante soxhlet se pesaron 2 gramos de la muestra seca (Figura 23), se colocó la muestra en un sobre de papel filtro que se puso en el soxhlet (Figura 24) y se obtuvieron 2ml del extracto mediante la técnica de reflujo, el cual se analizó por cromatografía de gases (Figura 25).



Figura 23. Muestra Pesada



Figura 24. Muestra en Soxhlet

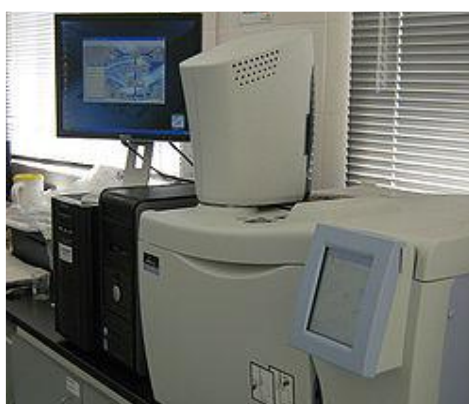


Figura 25. Muestra analizada por Cromatografía de gases

#### 2.3.4. Extracto digestado

Para el extracto digestado para metales se pesaron 5 gramos de la muestra (Figura 26), se colocó la muestra en un matraz al cual se le colocaron 5ml de ácido nítrico, se le añadió posteriormente 40ml de agua destilada, se tapó el matraz y se colocó durante 15 minutos en el autoclave (Figura 27), se filtró la muestra (Figura 28) y se colocó en un frasco para posteriormente analizarlo mediante Espectrofotometría de absorción atómica (Figura 29).



Figura 26. Muestra Pesada



Figura 27. Esterilización en autoclave



**Figura 28.** Filtrado del extracto



**Figura 29.** Muestra analizada por Espectrofotometria de Absorción Atómica.

## 2.4. Determinación de compuestos orgánicos

Con los extractos obtenidos se llevó a cabo la caracterización la cual se realizó utilizando un cromatógrafo de gases 7890 Agilent Technologies (Figura 30a y 30b), acoplado a un espectrómetro de masas 5975.

Para lo cual se inyectó 1 $\mu$ L de cada extracto bajo las siguientes condiciones cromatográficas: uso de una columna DB-5MS, de 0.5 $\mu$ m\*30m\*0.25 $\mu$ m DI, temperatura del inyector 180°C, temperatura del detector 220°C, con una rampa que inicia 56°C/1min, 10°C/min, 196°C/1 min, 20°C/1min, 260°C/5 min.

Una vez obtenidos los cromatogramas, se compararon con la biblioteca NIST08.



**Figura 30a)** Cromatógrafo de gases 7890 Agilent Technologies



**Figura 30b)** Cromatograma obtenido

**Figura 30a) y 30b).** Cromatografía de gases

## **2.5. Determinación de metales pesados**

Equipo de absorción atómica con atomización en llama Perkin Elmer, modelo AAnalyst 200 (Figura 31a), acoplado con una computadora con software (Figura 31c). Lámparas de cátodo hueco monoelemental de: Cu, Zn y Fe (Figura 31b).

Condiciones de trabajo de la muestra para la espectrofotometría de absorción atómica se ocupó el extracto de digestión el cual se preparó con 5 gramos de la muestra de Neem, al cual se le añadió 5 ml de Ácido nítrico.

Se colocó durante 15 en el autoclave, posteriormente se procedió a filtrarlo y se midieron los siguientes metales: Cobre, Fierro y Zinc.

Se realizaron las diluciones necesarias con agua acidulada al 5% con ácido nítrico para obtener las concentraciones de 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L y 2 mg/L para la obtención de las curvas de calibración (Figura 35a, 35b y 35c).

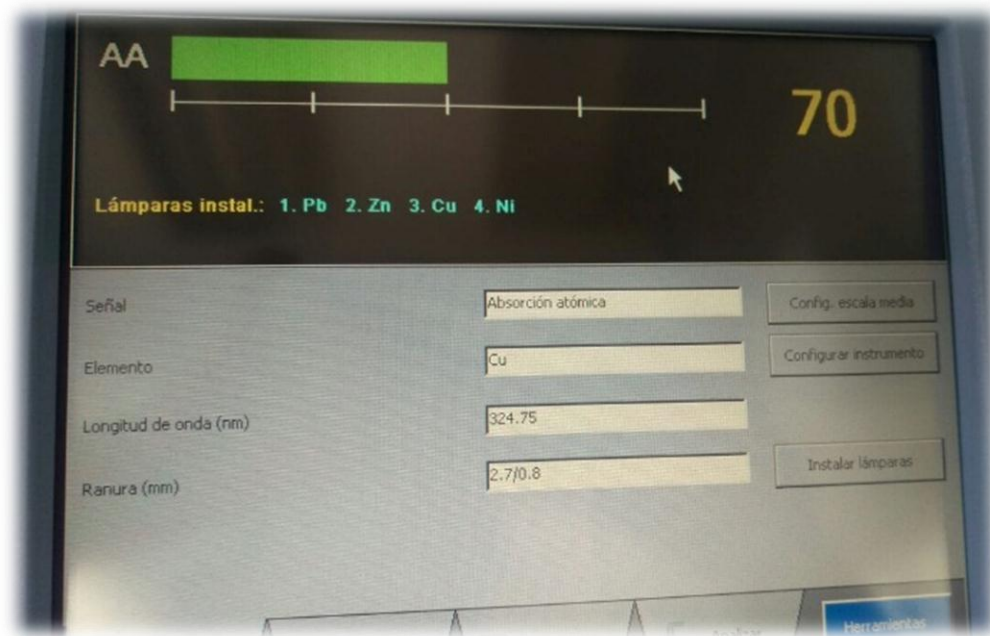
Las diluciones se procedieron a analizar con el espectrofotómetro de absorción atómica, la flama utilizada fue de aire-acetileno con un flujo de aire de 10L por minuto y 2.5L por minuto de acetileno.



**Figura 31a)** Perkin Elmer modelo 3100



**Figura31b)** Lámparas de cátodo Hueco



**Figura 31c) Software**

**Figura 31a), 31b) y 31c).** Espectrofotometría de Absorción Atómica

## 2.6. Preparación de inóculos

Se preparó un estándar de 0.25 del Estándar de Mc Farland. (Tabla 1)

**Tabla 1.** Estándar de Mc Farland

<b>Estándar de Mc Farland</b>	0.25
<b>1.0% de Cloruro de Bario (ml)</b>	0.025
<b>1.0% de Ácido Sulfúrico (ml)</b>	4.975

Mediante su comparación del Estándar de Mc Farland se consiguieron los inóculos en solución salina isotónica, con los que se trabajó.

## **2.7. Cuantificación de *E. coli***

Se realizó una cuantificación de la cepa de *E. coli* por medio de la técnica de vertido de placas. Se preparó el agar de medio estándar para la cepa, se dejó enfriar para proceder a hacer el vertido de placas. Mientras se midió la absorbancia de la cepa que se colocó en solución salina isotónica. En la placa se colocó 10µl de la cepa en el centro de la placa, teniendo cuidado de no tocar las paredes. Se procedió a sentir la temperatura del medio para que el microorganismo sobreviviera.

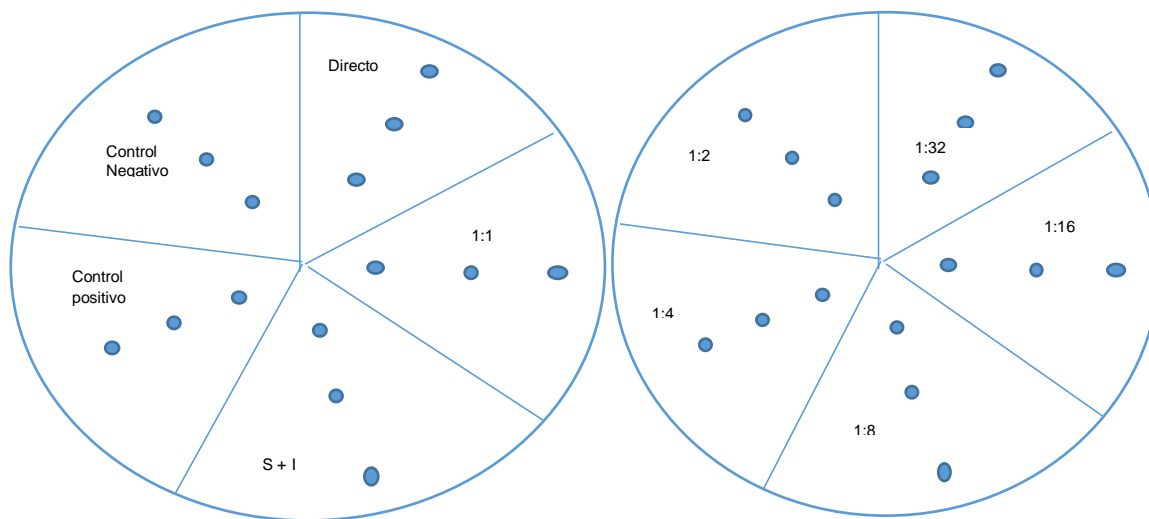
En la placa donde se colocó anteriormente la cepa se vertió el agar de medio estándar sin tocar pared alguna de la placa, se colocó en una superficie plana la placa y se movió con cuidado seis veces de arriba hacia abajo, seis veces de abajo hacia arriba, seis veces de derecha a izquierda, seis de izquierda a derecha, seis en sentido de las manecillas del reloj y seis veces en sentido contrario a las manecillas del reloj, teniendo cuidado de que no tocara el borde, ni la tapa de la placa. Finalmente se dejó que solidificara y se dejó en incubación durante 24 horas para su cuantificación.

## **2.8. Dilución en placa**

La técnica de dilución en placa se realizó de acuerdo a la Tabla 2, ya que se hicieron diluciones del extracto y en cuanto a la aplicación, para las pruebas de inhibición: se colocaron directamente en la placa 3 gotas de 2µl. (Figura 32).

**Tabla 2.** Diluciones para pruebas de inhibición

<b>Control negativo</b>	200µl del extracto
<b>Control positivo</b>	200µl de la cepa
<b>Solvente + inóculo</b>	100µl del solvente + 10µl de la cepa
<b>Directo</b>	100µl del extracto
<b>Dilución 1:1</b>	100µl del extracto + 100µl de solución salina + 10 µl de cepa
<b>Dilución 1:2</b>	100µl de la dilución 1.1 + 100µl de solución salina + 10 µl de cepa
<b>Dilución 1:4</b>	100µl de la dilución 1.2 + 100µl de solución salina + 10 µl de cepa
<b>Dilución 1:8</b>	100µl de la dilución 1.4 + 100µl de solución salina + 10 µl de cepa
<b>Dilución 1:16</b>	100µl de la dilución 1.8 + 100µl de solución salina + 10 µl de cepa
<b>Dilución 1:32</b>	100µl de la dilución 1.16 + 100µl de solución salina + 10 µl de cepa



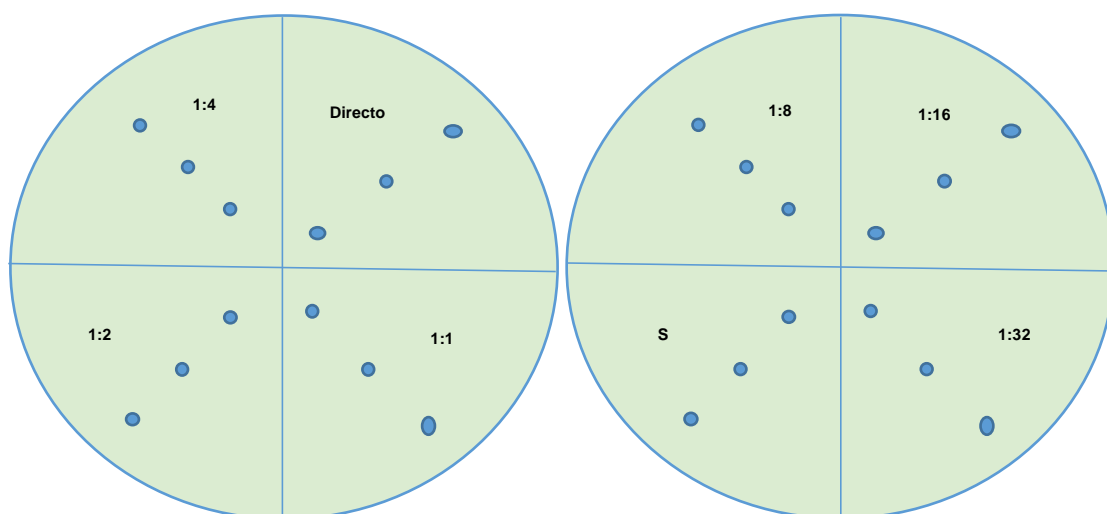
**Figura 32.-** Siembra para las pruebas de inhibición mediante extractos por la técnica de diluciones.

## 2.9. Kirby Bauer modificado

Se realizó la prueba de sembrado masivo en placa en la cual se colocaron 10  $\mu$ l de la cepa los cuales se extendieron en la placa de manera uniforme para el crecimiento del microorganismo, se esperó a que se impregnara la placa. Después que la placa se encontró seca se procedió a hacer las diluciones del extracto del cual se colocaron 3 gotas de 2  $\mu$ l cada una en la placa (Figura 33), de cada dilución, para ver si se obtenían resultados de inhibición del crecimiento de los microorganismos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Diluciones para pruebas de inhibición Kirby Bauer modificado

Directo	100µl del extracto
Dilución 1:1	100µl del extracto + 100µl de solución salina
Dilución 1:2	100µl de la dilución 1.1 + 100µl de solución salina
Dilución 1:4	100µl de la dilución 1.2 + 100µl de solución salina
Dilución 1:8	100µl de la dilución 1.4 + 100µl de solución salina
Dilución 1:16	100µl de la dilución 1.8 + 100µl de solución salina
Dilución 1:32	100µl de la dilución 1.16 + 100µl de solución salina



**Figura 33.-** Siembra para las pruebas de inhibición mediante extractos por la técnica de Kirby Bauer modificado.

A través de esta metodología de Kirby Bauer modificado se buscó realizar las pruebas necesarias para poder demostrar la inhibición de estos microorganismos por medio de los distintos extractos obtenidos.

# CAPÍTULO 3

## RESULTADOS

### 3.1. Concentraciones obtenidas en los diferentes extractos.

La concentración del extracto obtenido de Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*) mediante el método de maceración con metanol (Tabla 4).

**Tabla 4.** Concentración obtenida mediante el método de maceración.

Extracción mediante maceración con metanol			
Planta	Peso (g)	Cantidad del solvente (mL)	Concentración (g/L)
Neem	5.0174	140	35.8385
		2	2508.7

La concentración del extracto obtenido mediante el método de infusión (Tabla 5).

**Tabla 5.** Concentración obtenida mediante el método de infusión.

Extracción mediante infusión			
Planta	Peso (g)	Cantidad del solvente (mL)	Concentración (g/L)
Neem	5.0826	115	44.1965

La concentración del extracto obtenido mediante el método de digestión (Tabla 6).

**Tabla 6.** Concentración obtenida mediante el método de digestión

Extracción mediante el método de digestión			
Planta	Peso (g)	Cantidad del solvente (mL)	Concentración (g/mL)
Neem	5.0008	19.5	0.2564

La concentración del extracto obtenido mediante el método de soxhlet (Tabla 7).

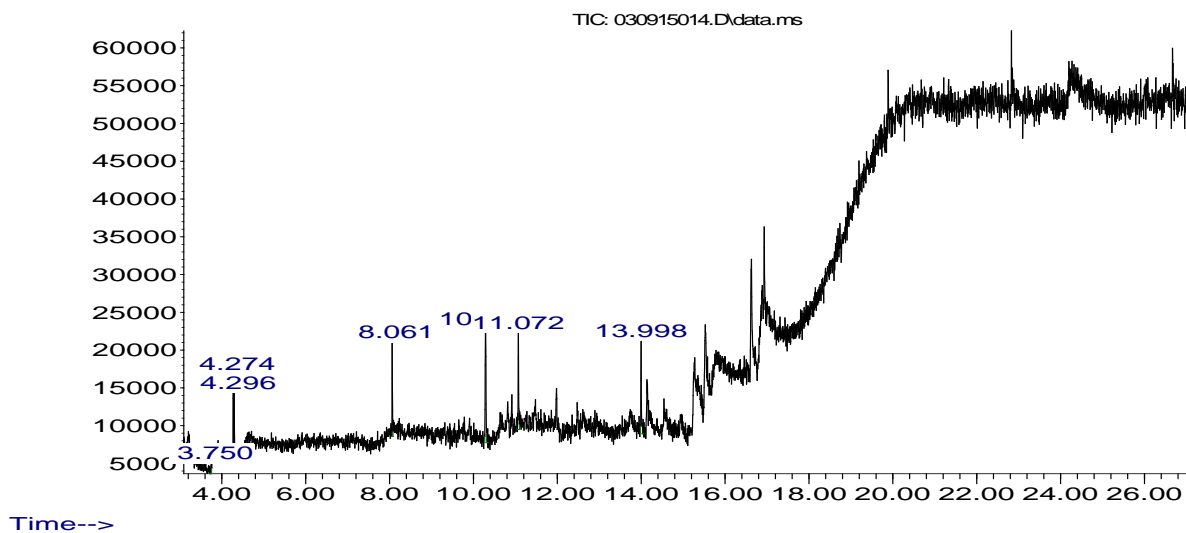
**Tabla 7.** Concentración obtenida mediante el método de soxhlet

Extracción mediante el método de soxhlet			
Planta	Peso (g)	Cantidad del solvente (mL)	Concentración (g/mL)
Neem	2.0792	125	0.0166

### 3.2. Identificación de compuestos por Cromatografía de Gases.

De los diferentes extractos obtenidos se tomó 1 $\mu$ L y se inyectó al Cromatografo de Gases de los cuales se obtuvieron los siguientes cromatogramas (Figura 34a, 34b y 34c):

Abundance



**Figura 34a)** Cromatograma de Extracto concentrado de Neem con Metanol

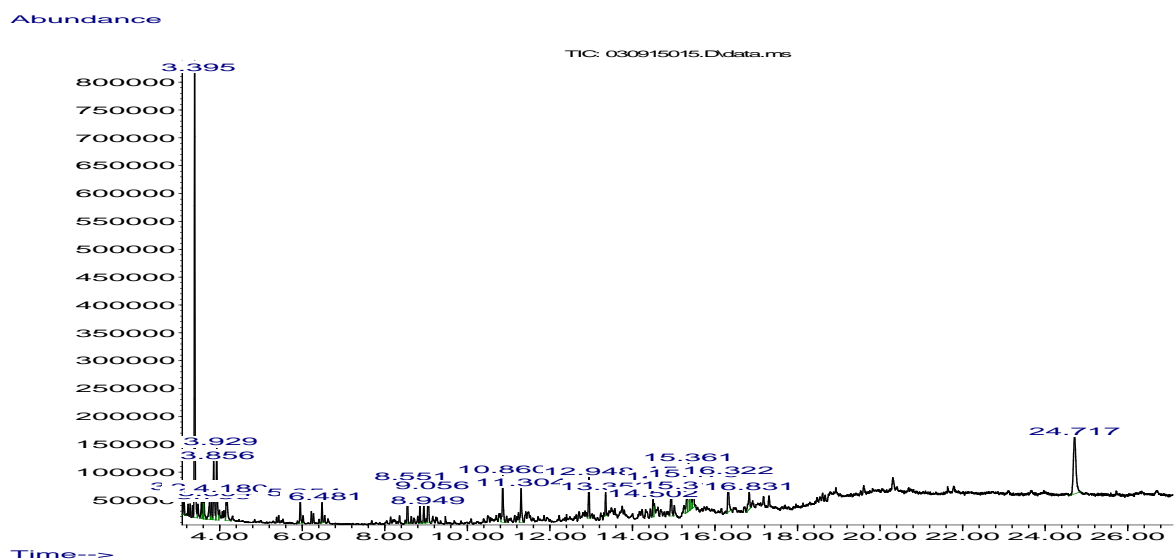


Figura 34b) Cromatograma de Extracto de Infusión con diclorometano

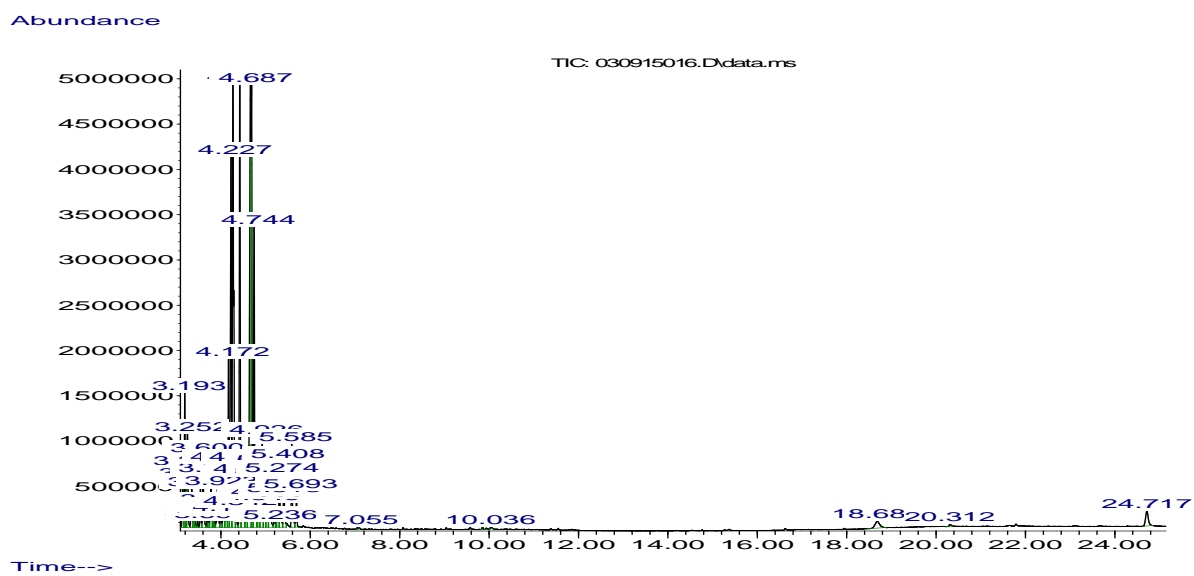


Figura 34c) Cromatograma de Extracto obtenido por Soxhlet con hexano

Figuras 34a, 34b y 34c. Cromatogramas de Extractos de *Azadirachta Indica* A. Juss

Al analizar los diferentes cromatogramas se pudieron observar los diferentes compuestos encontrados en los distintos extractos.

Se presentan los resultados obtenidos del análisis de Cromatografía de gases para el metanol (Tabla 8).

**Tabla 8.** Compuestos reportados en el análisis de CG en metanol

TIPO DE COMPUESTO	COMPUESTO	EFEECTO REPORTADO	FUENTE	CONCENTRACIÓN ESTIMADA EN EL EXTRACTO (mg/L) BASE SECA
<b>Aldehídos</b>	Acetaldehído	Usado en la Fabricación de espejos, prevenir el moho de las frutas almacenadas y como desinfectante o antiséptico en medicina.	37	0.9246
<b>Amina</b>	2,4-Dimetilamina	Usado como agente depilador en bronceados, en tintes, jabones, fungicida agrícola.	38	11.7156

Se encuentran los resultados obtenidos de la Cromatografía de gases del extracto de infusión (Tabla 9).

**Tabla 9.** Compuestos reportados en el análisis de CG con diclorometano

TIPO DE COMPUESTO	COMPUESTO	EFEECTO REPORTADO	FUENTE	CONCENTRACIÓN ESTIMADA EN EL EXTRACTO (mg/L) BASE SECA
<b>Ciclo alquenos</b>	Cyclohexane, 1,3-dimethyl-, cis	Utilizado como solvente para la fabricación de adhesivos, lacas, pinturas, resinas y barnices. Se utiliza también en la extracción de aceites y en síntesis orgánicas.	48	0.6762
<b>Alcano</b>	Heptane, 2,3-dimethyl-	Se utiliza para fabricar otras sustancias químicas y como componentes de la gasolina, disolventes del caucho.	39	0.5878
<b>Alcano de Hidrocarburos</b>	Hentriacontane	Es el componente principal de la cera de las abejas.	41	0.8971
<b>Alcano</b>	Eicosano	Tiene poca aplicación en la industria petrolera	40	4.9808

Se presentan los resultados del análisis de Cromatografía de gases para el solvente de hexano (Tabla 10).

**Tabla 10.** Compuestos reportados en Cromatografía de Gases con hexano

TIPO DE COMPUESTO	COMPUESTO	EFEECTO REPORTADO	FUENTE	CONCENTRACIÓN ESTIMADA EN EL EXTRACTO (mg/L) BASE SECA
Aldehído	2- Hexanal	Utilizado en la industria de los aromas para producir sabores frutales.	42	0.0415
	Metacrilamida	Es usado para la retención de Metales	43	0.2179
Ácidos Carboxílicos	Ácido butanoico 2 etil 2 metil	Se utiliza como un suplemento de la alimentación animal, en la preparación de diversos ésteres.	49	1.5469
	2-Pentene, 4,4-dimethyl-, (E)-	No registrado	-----	2.3104
Terpenoides	Limoneno	Usado como disolvente biodegradable, componente aromático, insecticida	44	0.1230

Los compuestos que se observan en la Tabla 11 han sido reportados en la investigación por Angel & Diana en el 2011 ya que han sido extraídos y aislados de diferentes partes del árbol del Neem.

**Tabla 11. Compuestos bioactivos del Neem** (Angel & Diana, 2011)

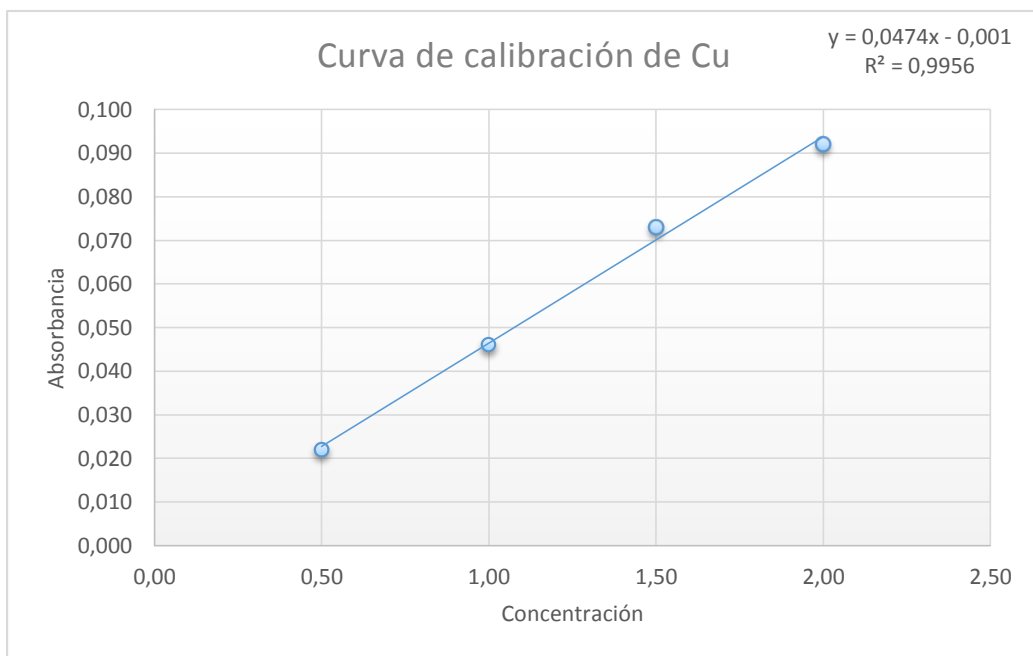
Compuestos bioactivos del Neem	
Azadiractina	Salanina
Nimbina	Nimbidina
Gedunina	Meliantriol

Comparando los compuestos reportados en la investigación de Angel & Diana, con los obtenidos en esta investigación, se coincidió al encontrar un compuesto perteneciente a los terpenoides que es el limoneno el cual es un derivado de triterpenoides presentes en las plantas pertenecientes al orden *Sapindales*.

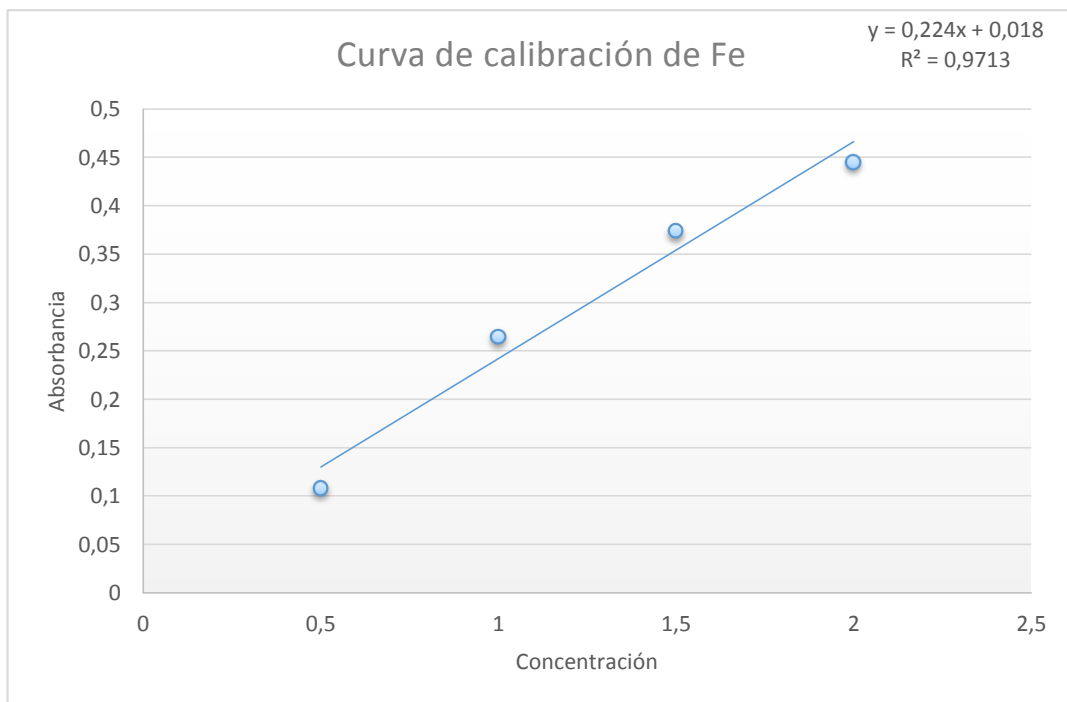
Los terpenoides se están investigando por sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos (Wikiherbolaria, 2015).

### **3.3. Curvas de calibración de espectrofotometría de absorción atómica**

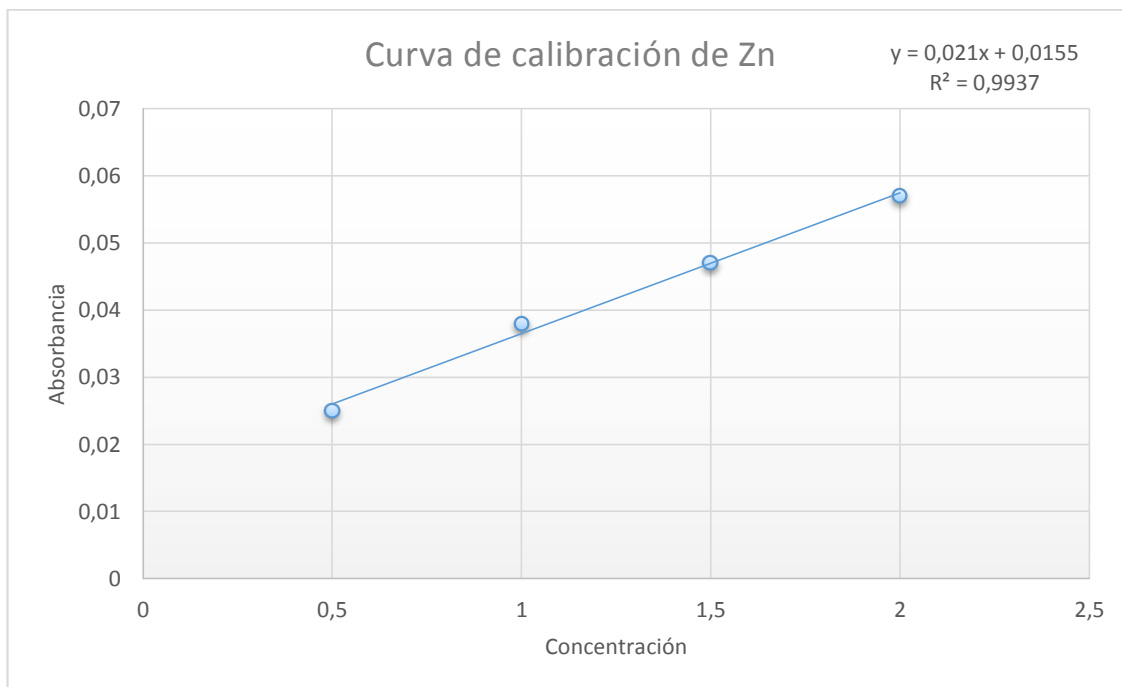
Para la preparación de nuestras curvas de calibración (figuras 35a, 35b y 35c) se realizaron las diluciones necesarias con agua acidulada al 5% con ácido nítrico para obtener las concentraciones de 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L y 2 mg/L.



**Figura 35a. Curva de calibración de Cobre**



**Figura 35b. Curva de calibración de Hierro**



**Figura 35c. Curva de calibración de Zinc**

**Figuras 35a, 35b y 35c. Curvas de calibración de metales**

Se presentan los resultados del análisis de Espectrofotometría de absorción atómica en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Metales reportados en Espectrofotometría de absorción atómica

Metales detectados	Cantidad detectada en extracto	Cantidad detectada en Planta	Efecto reportado	Fuente
Cobre	0.567 mg/L	2.2113 mg/kg	Tienen efecto bactericida y evitan la proliferación de algas	45
Fierro	0.439 mg/L	1.7121 mg/kg	Es una parte esencial de la hemoglobina	46
Zinc	0.245 mg/L	0.9555 mg/kg	Se utiliza en los dentífricos para evitar el mal aliento y en champús para detener la caspa, ayuda en la curación de heridas, la reducción de la duración y severidad de los resfriados y tiene propiedades antimicrobianas	47

Las concentraciones reportadas que fueron detectadas en espectrofotometría de absorción atómica en una investigación realizada por Carlos Romero en el 2004 se pueden observar en la Tabla 13.

**Tabla 13. Metales detectados por Espectrofotometría de Absorción Atómica**  
(Carlos Romero, 2004)

Metales Detectados	Cantidad detectada mg/kg
Cobre	6 mg/kg
Fierro	0.07 mg/kg
Zinc	16 mg/kg

Comparando los resultados obtenidos en esta investigación, con los resultados reportados en la investigación por Carlos Romero en el 2004 se observó una menor cantidad de cobre y zinc en el extracto, y una mayor cantidad de fierro fue encontrada en los resultados de nuestro extracto de espectrofotometría de absorción atómica. Y esto se puede deber a que en la investigación realizada por Carlos Romero, 2004 se utilizó la cascara de la semilla del Neem para su análisis por espectrofotometría de absorción atómica.

### 3.4. Resultados obtenidos de *Trichoderma aggressivum* con los diferentes extractos de Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*)

#### 3.4.1. Resultados obtenidos de *Trichoderma aggressivum* con el extracto de maceración y concentrado.

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición de *Trichoderma aggressivum* con los extractos obtenidos por el método de maceración directo a una concentración de 35.8385 g/L (figura 36a) y el extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L (figura 36b).

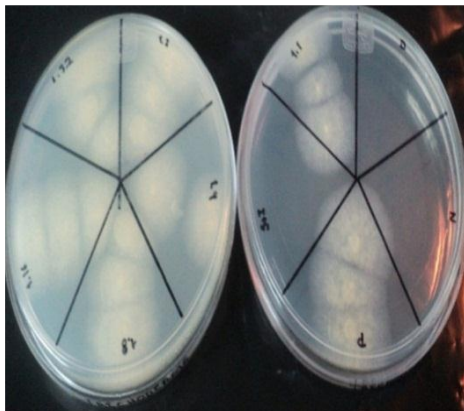


Figura 36a.

Extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L a las 72 horas.

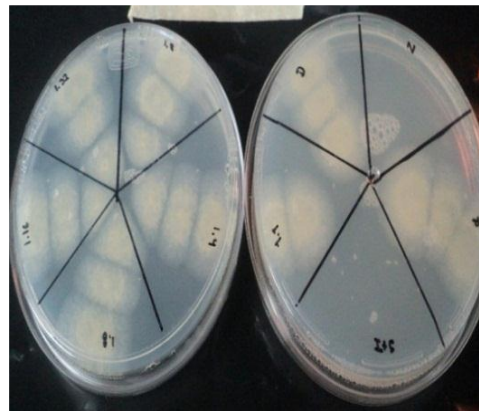


Figura 36b.

Extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L a las 72 horas.

#### Figuras 36a y 36b. Resultados de la prueba de inhibición de *Trichoderma aggressivum* del extracto de maceración y concentrado.

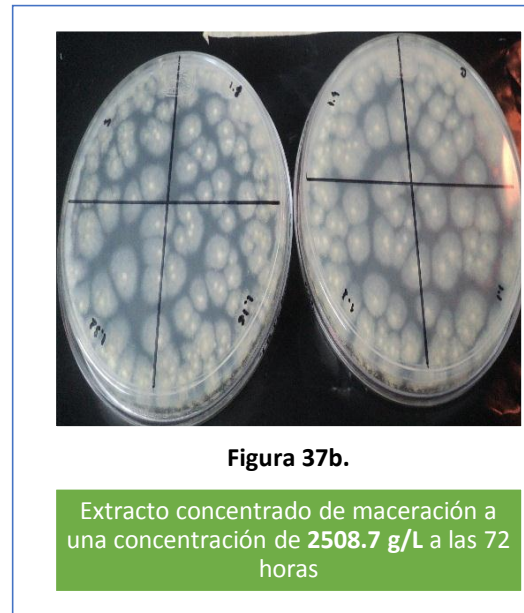
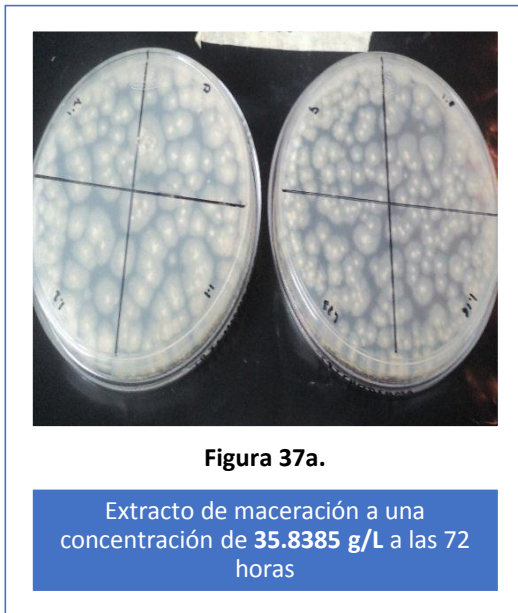
Lo que se aprecia en estas placas es que el extracto de maceración directo a una concentración de 35.8385 g/L (figura 36a), logró inhibir el crecimiento de *Trichoderma aggressivum* al aplicarse el extracto de forma directa sin diluir, de igual modo se observó que el extracto concentrado de maceración a una concentración

de 2508.7 g/L (figura 36b), inhibió solo cuando el extracto se aplica sin diluir el extracto.

Estos resultados difieren a los obtenidos por Lucena *et al* en el 2011 los cuales reportan como resultado un retraso de 4 a 9 días en el crecimiento de *Trichoderma harzianum*.

### 3.4.2. Resultados obtenidos de *Trichoderma aggressivum* en Kirby Bauer modificado a dos concentraciones

Las pruebas de inhibición en *Trichoderma aggressivum* dieron como resultados con el extracto de maceración de una concentración de 35.8385 g/L (figura 37a) y del extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L en Kirby Bauer modificado (figura 37b).



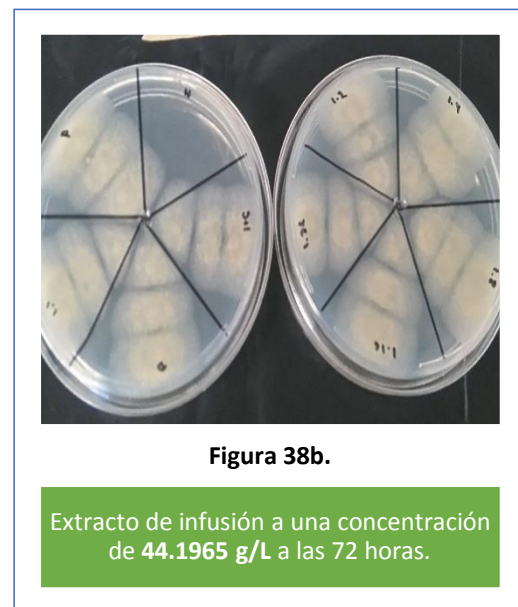
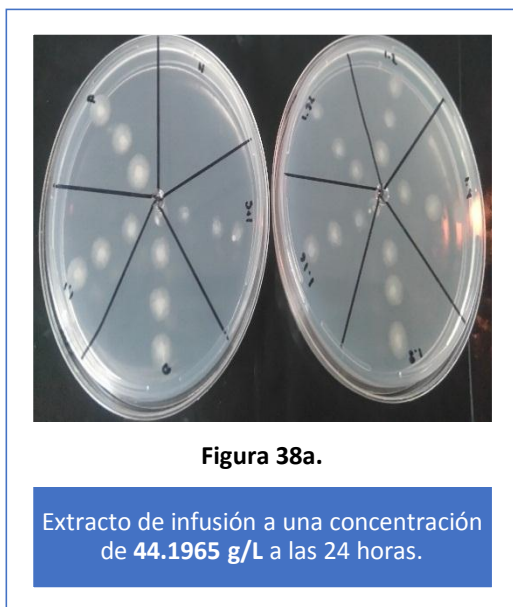
**Figuras 37a y 37b. Resultados de la prueba de inhibición de *Trichoderma aggressivum* en Kirby Bauer modificado.**

En las figuras 37a y 37b se puede observar que *Trichoderma aggressivum* mostró resistencia a la aplicación de los extractos a diferentes concentraciones desde las primeras 24 horas ya que se observó crecimiento de éste.

Los resultados de nuestra investigación son diferentes a los obtenidos en la investigación realizada por Lucena *et al* en el 2011 puesto que reportan un efecto de retraso en el crecimiento de *Trichoderma aggressivum* con la aplicación del extracto.

### 3.4.3. Resultados obtenidos de *Trichoderma aggressivum* del extracto de infusión.

Como resultados obtenidos de la prueba de inhibición en *Trichoderma aggressivum* del extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L en diluciones se presentan en las figuras 38a y 38b.

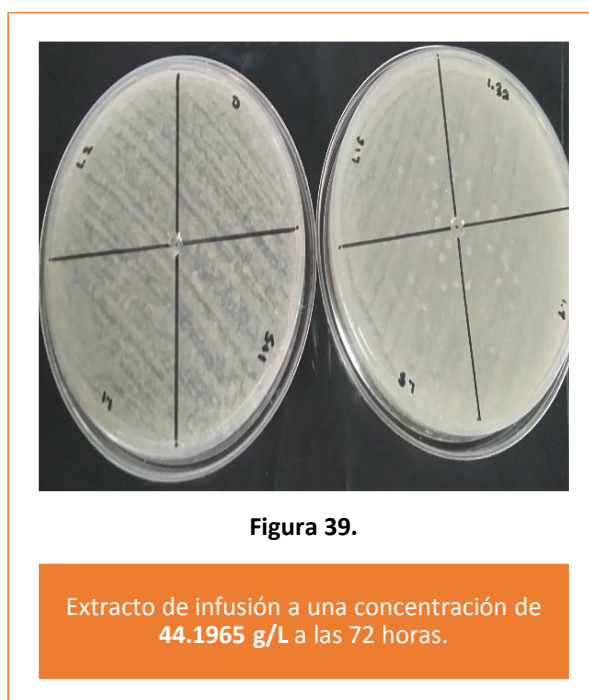


**Figuras 38a y 38b. Resultados de la prueba de inhibición de *Trichoderma aggressivum* del extracto de infusión.**

En los resultados obtenidos del extracto de infusión no se observaron resultados de inhibición de *Trichoderma aggressivum* desde las primeras 24 horas (figura 38a). Se buscaron investigaciones realizadas anteriormente con extractos de infusión de Neem y no se encontró alguno, pero se observaron mejores resultados en la prueba por el método de maceración comparado con los demás formas de extracción.

#### 3.4.4. Resultados obtenidos de *Trichoderma aggressivum* en Kirby Bauer modificado con extracto de infusión.

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición de *Trichoderma aggressivum* con el extracto de infusión por kirby bauer modificado se presentan en la figura 39.



**Figura 39. Resultados de la prueba de inhibición de *Trichoderma aggressivum* en Kirby Bauer modificado del extracto de infusión.**

El extracto de infusión no tuvo efectos de inhibición sobre *Trichoderma aggressivum* en Kirby Bauer modificado (figura 39). Mostrando que el extracto de infusión no tiene

un efecto inhibitorio en ninguna de las 2 formas en las que se realizó esta investigación. Se buscaron investigaciones realizadas con extractos de infusión de Neem anteriormente, como inconveniente no se encontró alguna que ocupe un extracto obtenido a través de infusión.

### 3.5. Resultados obtenidos de *E. coli* con los diferentes extractos de Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*)

#### 3.5.1. Resultados obtenidos de *E. coli* del extracto de maceración y concentrado.

Como resultados obtenidos de la prueba de inhibición de *E. coli* con el extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L (figura 40a) y el extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L (figura 40b).

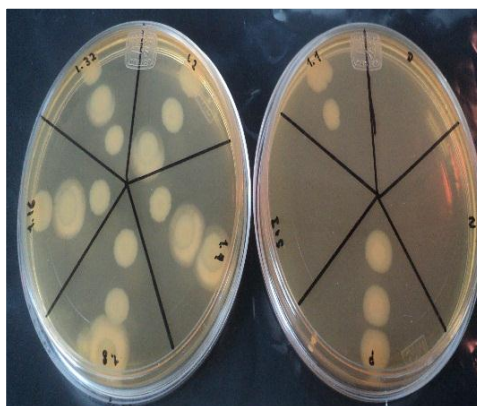


Figura 40a.

Extracto de maceración a una concentración de **35.8385 g/L** a las 72 horas.

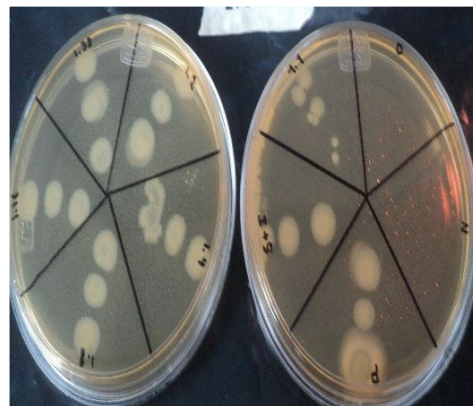


Figura 40b.

Extracto concentrado de maceración a una concentración de **2508.7 g/L** a las 72 horas.

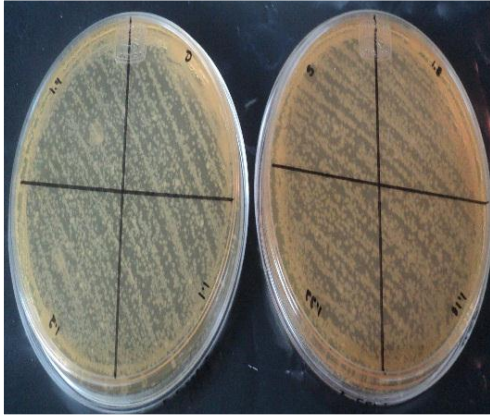
**Figuras 40a y 40b. Resultados de la prueba de inhibición de *E. coli* a dos concentraciones.**

Se mostró una inhibición de crecimiento de *E. coli* con el extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L (figura 40a), cuando este es aplicado de manera directa y no se hace dilución alguna. El extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L (figura 40b), mostró resultados de inhibición cuando el extracto es aplicado de forma directa.

En la investigación realizada por López Pantoja *et al*; en el 2007 se encontró que el extracto obtenido de manera etanólica a una concentración del 10% logró inhibir completamente el crecimiento de *E. coli*. Esto probablemente se debió a que el extracto etanólico tiene un mayor número de limonoides, los cuales son responsables de la actividad antimicrobiana del Neem.

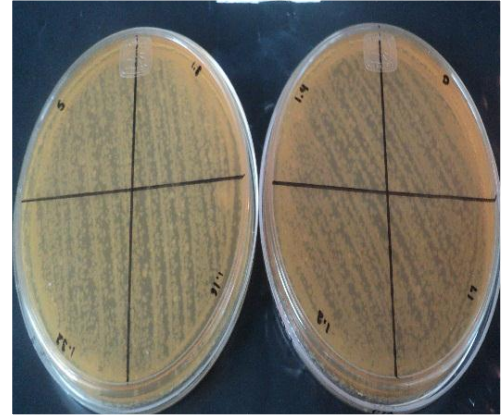
### **3.5.2. Resultados obtenidos de *E. coli* en Kirby Bauer modificado del extracto de maceración y concentrado.**

Como resultados de la prueba de inhibición de *E. coli* con el extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L (figura 41a), y con el extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L (figura 41b) en Kirby Bauer modificado.



**Figura 41a.**

Extracto de maceración a una concentración de **35.8385 g/L** a las 72 horas.



**Figura 41b.**

Extracto concentrado de maceración a una concentración de **2508.7 g/L** a las 72 horas

**Figuras 41a y 41b. Resultados de la prueba de inhibición de *E. coli* en Kirby Bauer modificado a dos concentraciones.**

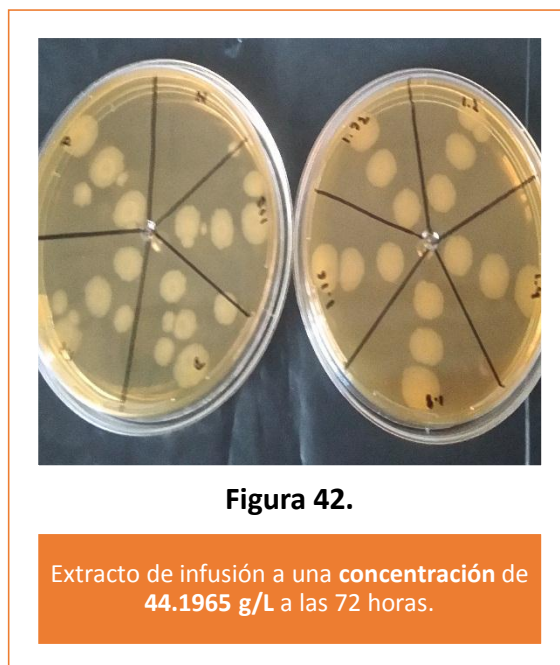
El extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L (figura 41a) y el extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L (figura 41b), no lograron la inhibición del crecimiento de *E. coli*.

En una investigación realizada por López Pantoja *et al*; en el 2007 se reportó que *E. 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.

Por lo que nuestros resultados difieren a los resultados obtenidos en la investigación realizada por López Pantoja *et al*; en el 2007 y esto podría deberse a que ellos ocuparon la semilla del Neem para sus extractos.

### 3.5.3. Resultados obtenidos de *E. coli* del extracto de infusión.

En la prueba de inhibición de *E. coli* dio como resultado con el extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L los presentado en la figura 42.

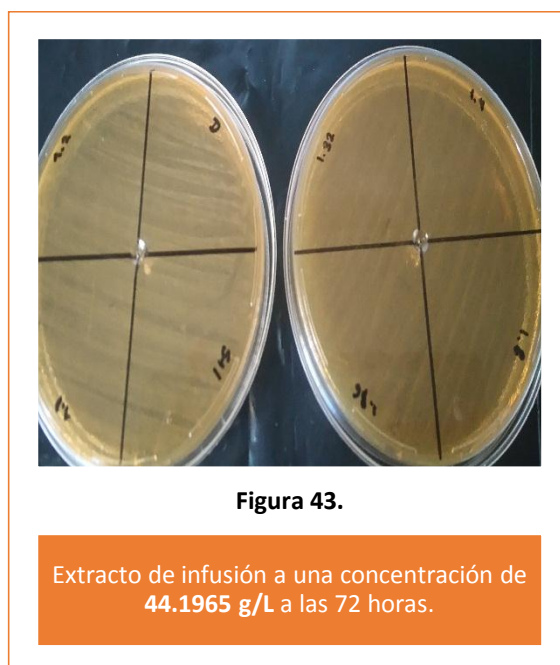


**Figura 42. Resultados de la prueba de inhibición de *E. coli* del extracto de infusión.**

El extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L no mostró efecto de inhibición sobre *E. coli* (Figura 42). Se buscaron investigaciones realizadas anteriormente en cuanto a la inhibición de crecimiento de *E. coli* con el extracto de infusión de Neem pero no se encontraron investigaciones que ocuparan el extracto de infusión.

### 3.5.4. Resultados obtenidos de *E. coli* en Kirby Bauer modificado del extracto de infusión.

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición de *E. coli* con el extracto de infusión en Kirby Bauer modificado a una concentración de 44.1965 g/L se presentan en la figura 43.



**Figura 43. Resultados de la prueba de inhibición de *E. coli* por Kirby Bauer modificado del extracto de infusión.**

Los resultados obtenidos para la inhibición de *E. coli* con el extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L (figura 43), fueron negativos con el extracto de infusión, debido a que no se observó ningún retraso en el crecimiento de este, ni inhibición de crecimiento de *E. coli*.

### 3.6. Resultados obtenidos de *Candida albicans* con los diferentes extractos de Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*)

#### 3.6.1. Resultados obtenidos de *Candida albicans* del extracto de maceración y concentrado.

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición de *Candida albicans* con el extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L (figuras 44a y 44b) y el extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L (figuras 45a y 45b).

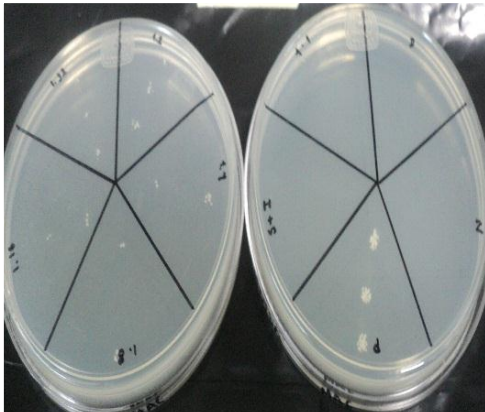


Figura 44a.

Extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L a las 24 horas.

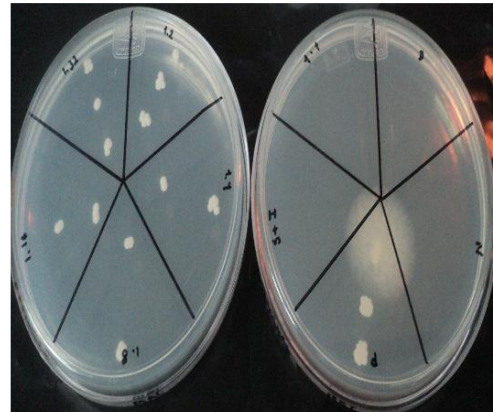


Figura 44b.

Extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L a las 72 horas.

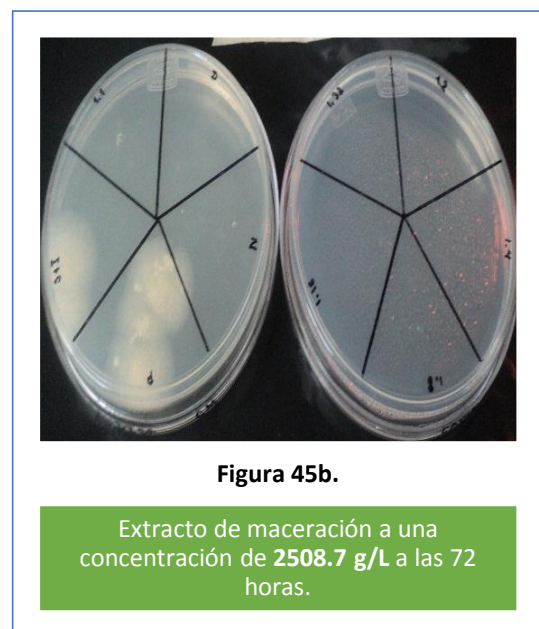
#### Figuras 44a y 44b. Resultados de la prueba de inhibición de *Candida albicans* del extracto de maceración.

El extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L utilizado para la inhibición de crecimiento de *Candida albicans* mostró resultados positivos en la investigación debido a que en su aplicación directa del extracto y en dilución 1:1

desde las primeras 24 horas (figura 44a) como se puede observar evitó el crecimiento de *Candida albicans*.

De igual manera se observó un crecimiento lento de *Candida albicans* en las diluciones, y se pudo observar que inhibió el crecimiento de esta hasta las 72 horas (figura 44b) de su observación. También se observó la inhibición de crecimiento de *Candida albicans* en Solvente más inóculo.

En la investigación realizada por Doris Reyes de Fuentes en el 2013, se encontró que a las 24 horas se inhibe parcialmente el crecimiento microbiano tanto en medio líquido como sólido en el complejo *Candida albicans*, observándose un efecto fungistático parcial, pero no fungicida.



**Figuras 45a y 45b. Resultados de la prueba de inhibición de *Candida albicans* del extracto concentrado de maceración.**

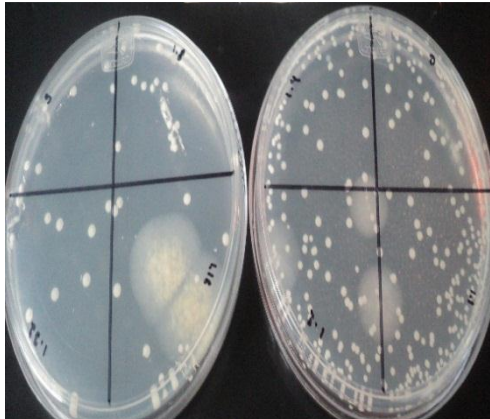
El extracto de maceración concentrado a una concentración de 2508.7 g/L tuvo un efecto positivo en la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* puesto que se observó la inhibición de crecimiento de este en todas las diluciones del extracto desde las primeras 24 horas (figura 45a), hasta las 72 horas (figura 45b), de su observación.

Los resultados obtenidos por Doris Reyes de Fuentes en el 2013 muestran que el extracto etanólico foliar de Neem utilizado, es de alta efectividad, ya que posee actividad bacteriostática y bactericida en las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *S. mutans* y Gram negativa, así como el efecto fungistático y fungicida en el complejo *Candida albicans*.

Los resultados coinciden con que el extracto de Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*) por maceración y concentrado inhiben el crecimiento de *Candida Albicans*.

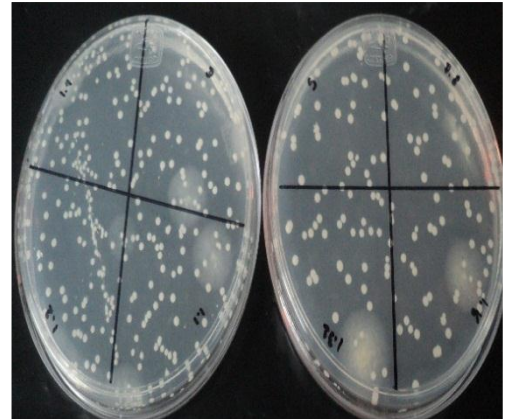
### **3.6.2. Resultados obtenidos de *Candida albicans* en Kirby Bauer modificado con extracto de maceración y concentrado.**

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición de *Candida albicans* con el extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L (figura 46a) y el extracto concentrado de maceración a una concentración de 2508.7 g/L (figura 46b) en Kirby Bauer modificado.



**Figura 46a.**

Extracto de maceración a una concentración de **35.8385 g/L** a las 72 horas.



**Figura 46b.**

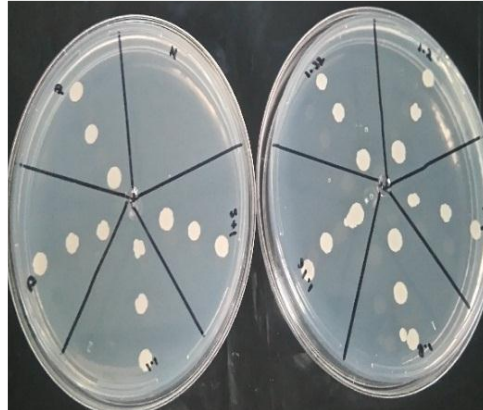
Extracto de maceración a una concentración de **2508.7 g/L** a las 72 horas.

**Figura 46. Resultados de la prueba de inhibición de *Candida albicans* en Kirby Bauer modificado del extracto de maceración y concentrado.**

Los resultados observados en Kirby Bauer modificado (Figura 46) difirieron a los obtenidos en el método de diluciones en placa de ambas concentraciones. En las figuras 46a y 46b se observó un crecimiento lento de *Candida Albicans* y por el método de diluciones en placa en las figuras 44b y 45 b se pudo observar un efecto inhibitorio de *Candida Albicans*.

### **3.6.3. Resultados obtenidos de *Candida albicans* del extracto de infusión.**

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición de *Candida albicans* con el extracto infusión a una concentración de 44.1965 g/L se puede observar en la figura 47.



**Figura 47**

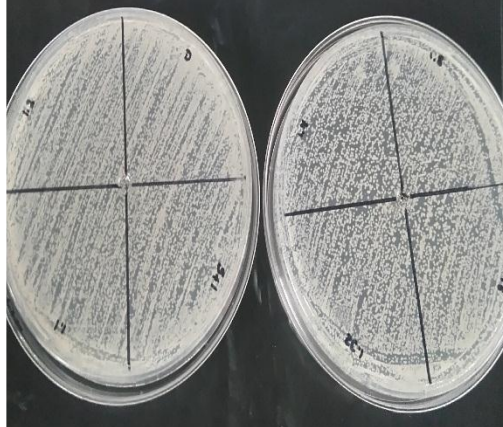
Extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L a las 72 horas.

**Figura 47. Resultados de la prueba de inhibición de *Candida albicans* del extracto de infusión.**

En la figura 47 se observa que las pruebas de inhibición de crecimiento con el extracto de infusión para *Candida albicans* fueron negativas ya que si hubo crecimiento de este en las distintas diluciones que se realizaron.

#### **3.6.4. Resultados obtenidos de *Candida albicans* en Kirby Bauer modificado con extracto de infusión.**

Los resultados obtenidos de la prueba de inhibición de *Candida albicans* con el extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L en Kirby Bauer modificado se presentan en la *figura 48*.



**Figura 48.**

Extracto de infusión a una concentración de **44.1965 g/L** a las 72 horas.

**Figura 48. Resultados de la prueba de inhibición de *Candida albicans* en Kirby Bauer modificado del extracto de infusión.**

El extracto de infusión no inhibió el crecimiento de *Candida albicans*, ya que en el período de investigación se observó su crecimiento a las 24 horas de incubación.

## CONCLUSIONES

El extracto de maceración de *Azadirachta Indica A. Juss* a dos diferentes concentraciones reveló una actividad antimicrobiana contra los microorganismos seleccionados para esta investigación, siempre y cuando el extracto utilizado sea aplicado de manera directa.

*Candida albicans* al ser evaluada mostró ser muy sensible a la aplicación del extracto concentrado de maceración desde la concentración más alta que es de 2508.7 g/L, hasta la más baja cuando es diluido a 39.1984 g/L ya que presentó de manera eficiente un efecto de inhibitorio.

Por otra parte se observó que el extracto de infusión no tuvo efecto inhibitorio alguno sobre *Trichoderma*, *Candida albicans* y *E.coli*, lo que indica que las características de este extracto no son suficientes para inhibir los microorganismos de esta investigación, o la concentración ocupada fue muy baja, debido a que el agua no extrae sus compuestos eficientemente o bien son degradados o perdidos por efecto de la temperatura. En la caracterización de los compuestos se encontró acetaldehído, 2,4-Dimetilamina en el extracto de maceración y limoneno en el extracto de soxhlet. Estos compuestos tienen propiedades fungicidas e insecticidas los cuales por su naturaleza se encargan de inhibir el desarrollo de los microorganismos.

De acuerdo a todo lo observado se detectó que el extracto que es más eficiente para la inhibición de *Candida albicans* es el extracto de maceración a una concentración de 2508.7 g/L y con menos eficiencia en *Trichoderma aggressivum* solo cuando es aplicado de manera directa.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Akerele, O. H. (1991). *The Conservation of Medicinal Plants*. Cambridge: Cambridge University Press.
2. Albert, L. A. (2002). *Toxicología Ambiental*. México: Limusa.
3. Anaya, A. L. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. México: Plaza y Valdés.
4. Ángel, C. R., & Diana, O. M. (2011). *Pruebas en cromatografía de líquidos para determinar el uso del extracto de plantas en la formulación de insecticidas*. Hidalgo: Tesis.
5. Arenas, O. R., Lara, M. H., Huato, M. A., & Hernández, F. D. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 143 - 151.
6. Aristegui, B. (2002). *Candida albicans (Robin) Berkhout*. España: Revista Iberoamericana Micología.
7. Arraíza, M. P. (2009). *Obtención de extractos y esencias*. Madrid: Sin editorial.
8. Barnett, H. H. (1982). *Ilustred genera of imperfect fungi. Third edition*. . Minnesota: Burgess publishing.
9. Barragán, D. C. (2012). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico*. Bogotá: Revista mexicana de ciencias farmacéuticas.

10. Biasoli, D. M. (2013). *Candidiasis*. Argentina: CEREMIC.
11. Briceño, G., García, J., Maselli, A., & Rosales, L. C. (2011). Efecto de extractos etanólicos de Ruda y Neem sobre el control de bacterias Fitopatógenas del Genero Erwinia. *Agronomía Tropical*, 141 - 148.
12. Camargo, H. (2005). *Evaluación en campo de la incidencia de Rhizoctonia solani en arroz (Oriza satriva), luego de la inoculación en semilla de un formulado comercial a base del antagonista Trichoderma harzianum*.
13. Carlos Romero, R. C. (2004). *Elaboración de un abono orgánico a partir de la cascara de la semilla del árbol de Neem (Azadirachta indica)*. Venezuela: Revista Ingeniería UC.
14. Castaño, J. C. (2008). *Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de Trichoderma spp frente al hongo Fitopatógeno Rhizoctonia solani*. Bogotá: Tesis.
15. Cavallini, E. R., Coronado, M. d., Chavarría, F. H., & Hidalgo, J. D. (2005). *Bacteriología General: Principios y Practicas de Laboratorio*. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
16. Cipriano, G. G., & Durga., R. M. (2012). Problemática y Riesgo Ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 1-10.
17. Corado, A. E. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio*. Guatemala: Sin editorial.

18. Doris Reyes de Fuentes, R. F. (2013). *Efecto biocida in vitro del extracto foliar de Azadirachta indica en Staphylococcus sp y Pseudomonas sp*. Venezuela: Scielo.
19. Ecoagricultor. (2015). *Cómo preparar extractos con propiedades fungicidas, insecticidas o abonos líquidos*. Agricultura ecológica.
20. Edith Miranda Cruz, J. E. (2012). *Actividad antimicrobiana de extractos de Psidium friedrichsthalianum L., Pterocarpus hayesii L., Tynanthus guatemalensis L. y Spondias purpurea L.* Chile: Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.
21. elika. (2013). *Escherichia coli*. España: artículo.
22. Fernández, M. O. (2004). *El árbol de nim establecimiento y aprovechamiento en la huasteca potosina*. San Luis potosí: INIFAP.
23. Hernández, M. R., Bello, C. H., & Mavil, J. E. (Sin mes de 2007). Etnobotánica y ecología de plantas por tres curanderos contra la mordedura de serpiente en la región de Acayucan, Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, págs. 89 - 100.
24. INSHT. (2012). *Candida albicans*. México: BDataBio.
25. Lcampos. (2005). *Espectrometría de Absorción Atómica*. Chihuahua: Sin editorial.
26. López Pantoja, Y., Angulo Escalante, M., Martínez Rodríguez, C., Soto Beltrán, J., & Chaidez Quiroz, C. (14 de Octubre - Diciembre de 2007). Efecto antimicrobiano de extractos de crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss)

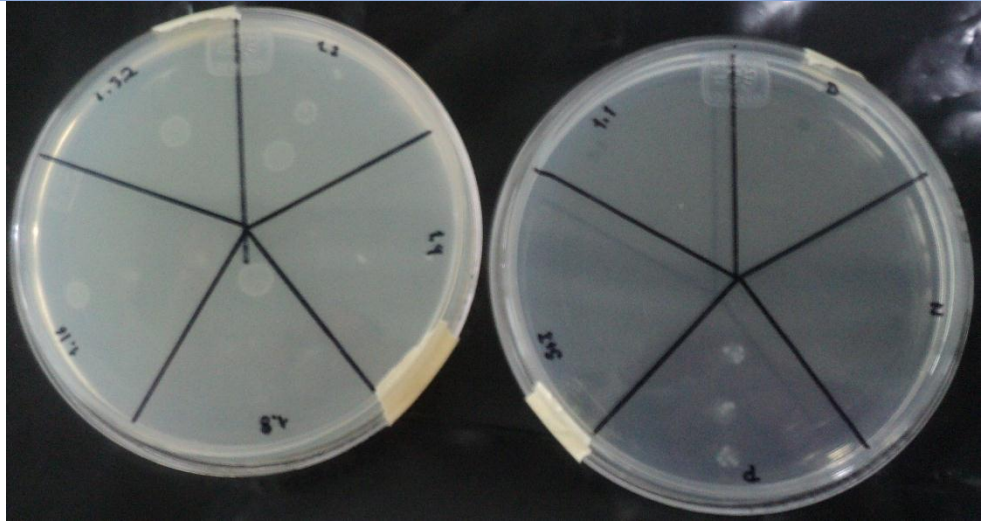
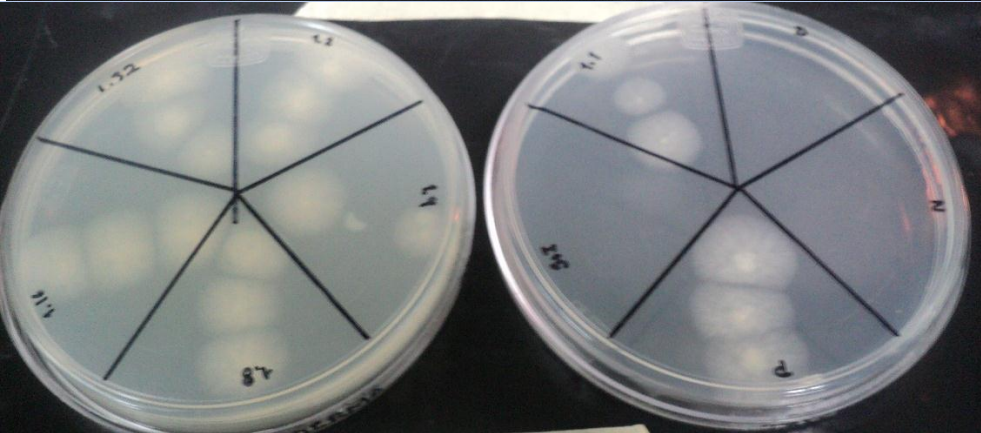
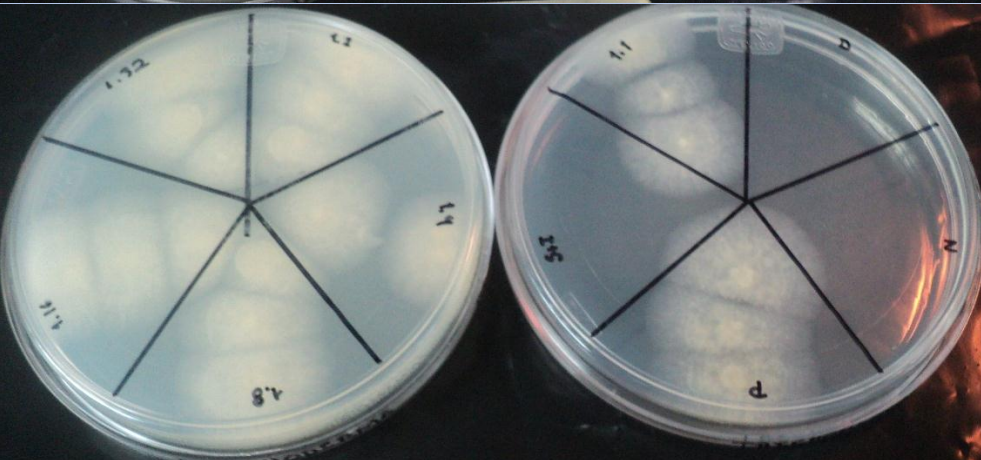
- y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y bacteriófago P22. *Mediagraphic*, 32, 117 - 125.
27. López S., J. A. (2000). *Los mil y un usos de las plantas. En: Botánica Mágica y Misteriosa*. España: Mundi prensa.
28. Lucena, S. A., Osario, D. U., Chopite, M. E., & Tamayo, M. J. (2011). *Compatibilidad in vitro de extractos vegetales y Trichoderma Harzianum y efecto en el crecimiento de Sclerotium Rolfsii Sacc. y Sclerotium Cepivorum Berk*. Venezuela: Sin editorial.
29. Noller, C. R. (2011). *Química Orgánica*. España: Interamericana S.A de C.V.
30. Ortiz, J. I. (2013). *Efecto insecticida del extracto de Ruda (Ruta graveolens) y Albahaca (Ocimum basilicum) para el control de Tribolium castaneum bajo condiciones de laboratorio*. Saltillo: Tesis.
31. Ramírez, A. R. (2011). *Escherichia coli*. Tesis.
32. Rosas, R. A., Mojica, H. B., Vásquez, J. L., & Peña, A. H. (2007). *Manejo Integrado de Plagas*. México: SAGARPA.
33. Sánchez, F. O. (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: Tesis.
34. Soto, D. (31 de Julio de 2015). *Critican traba en EU a cilantro mexicano. Reforma*.
35. Villavicencio, M. B. (1995). *Plantas útiles del estado de Hidalgo I*. Pachuca Hidalgo: Tesis.
36. Wikiherbolaría. (2015). *Terpenoides*. Wikia.

37. [http://carbonilo.blogspot.mx/2012\\_06\\_01\\_archive.html](http://carbonilo.blogspot.mx/2012_06_01_archive.html) 18 de Febrero del 2016
38. <https://es.wikipedia.org/wiki/Dimetilamina> 18 de Febrero del 2016
39. <http://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/4147sp.pdf> 18 de Febrero del 2016
40. <https://it.wikipedia.org/wiki/Eicosano> 18 de Febrero del 2016
41. <http://brainly.lat/tarea/2261837> 18 de Febrero del 2016
42. <https://es.wikipedia.org/wiki/Hexanal> 18 de Febrero del 2016
43. <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/DIC10/garcia.pdf> 18 de Febrero del 2016
44. <https://es.wikipedia.org/wiki/Limoneno> 18 de Febrero del 2016
45. <http://quimicaparatodos.blogcindario.com/2009/11/00190-cobre-propiedades-y-usos.html> 28 de Febrero del 2016
46. <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/fe.htm> 18 de Febrero del 2016
47. <http://elementos.org.es/zinc> 18 de Febrero del 2016
48. [http://www.resirene.com.mx/images/content/PCONT\\_KUO\\_RESIR/uploads/HT%20RESIRENE%20CICLOHEXANO%20V2%20SEP15.pdf](http://www.resirene.com.mx/images/content/PCONT_KUO_RESIR/uploads/HT%20RESIRENE%20CICLOHEXANO%20V2%20SEP15.pdf)
49. <http://lasaludfamiliar.com/caja-de-cerebro/conocimiento-195.html>

# ANEXOS

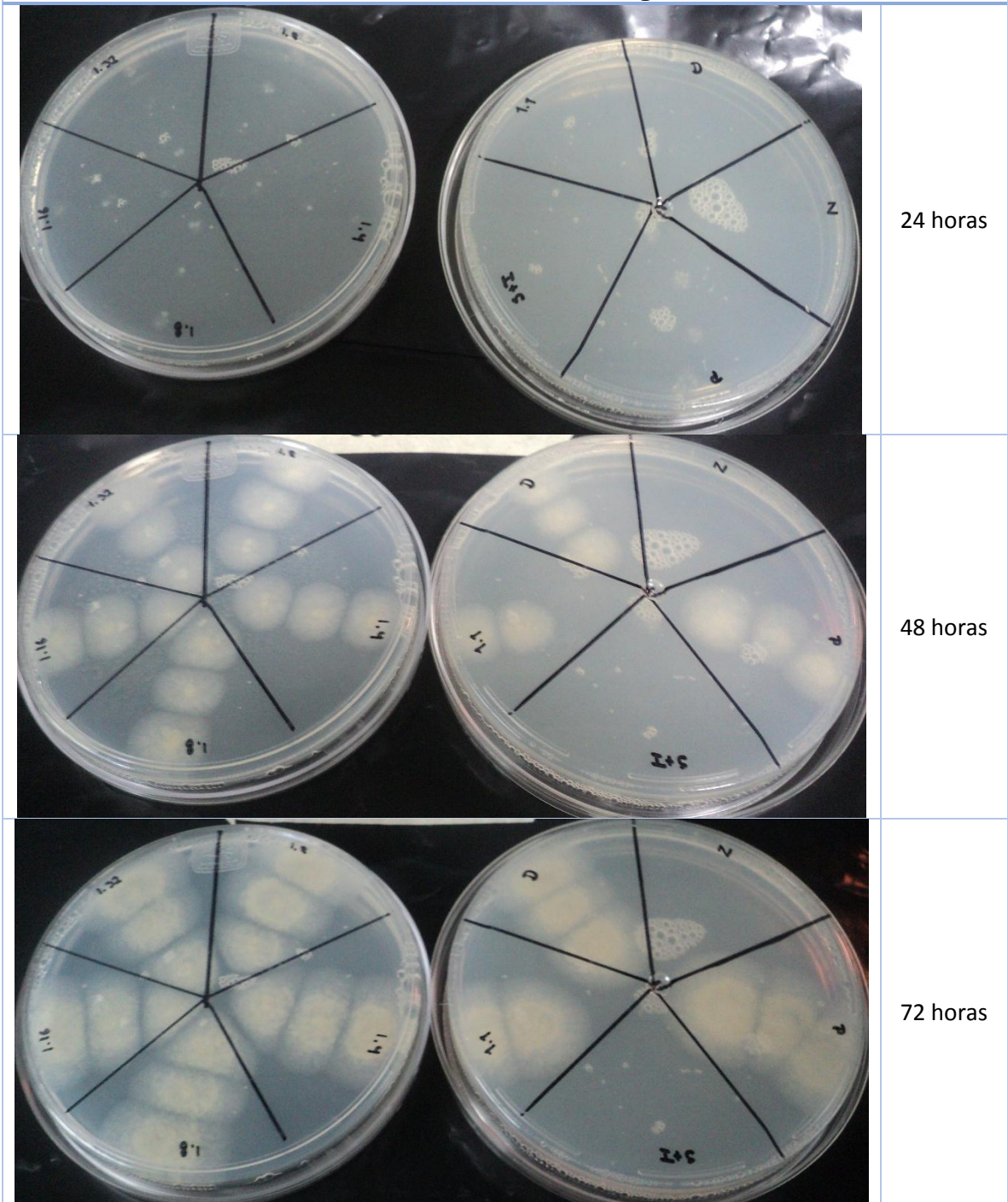
## Anexo1

*Trichoderma aggressivum* con extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L

 Two petri dishes showing the initial growth of Trichoderma aggressivum on a medium containing a 35.8385 g/L maceration extract. The dishes are divided into five sectors labeled 1.32, 1.4, 1.8, 1.1, and P. The growth is minimal and localized.	24 horas
 The same two petri dishes after 48 hours. The fungal growth has significantly increased, covering more of the surface area in each sector.	48 horas
 The same two petri dishes after 72 hours. The growth is even more extensive, with the fungus appearing to coalesce in some areas.	72 horas

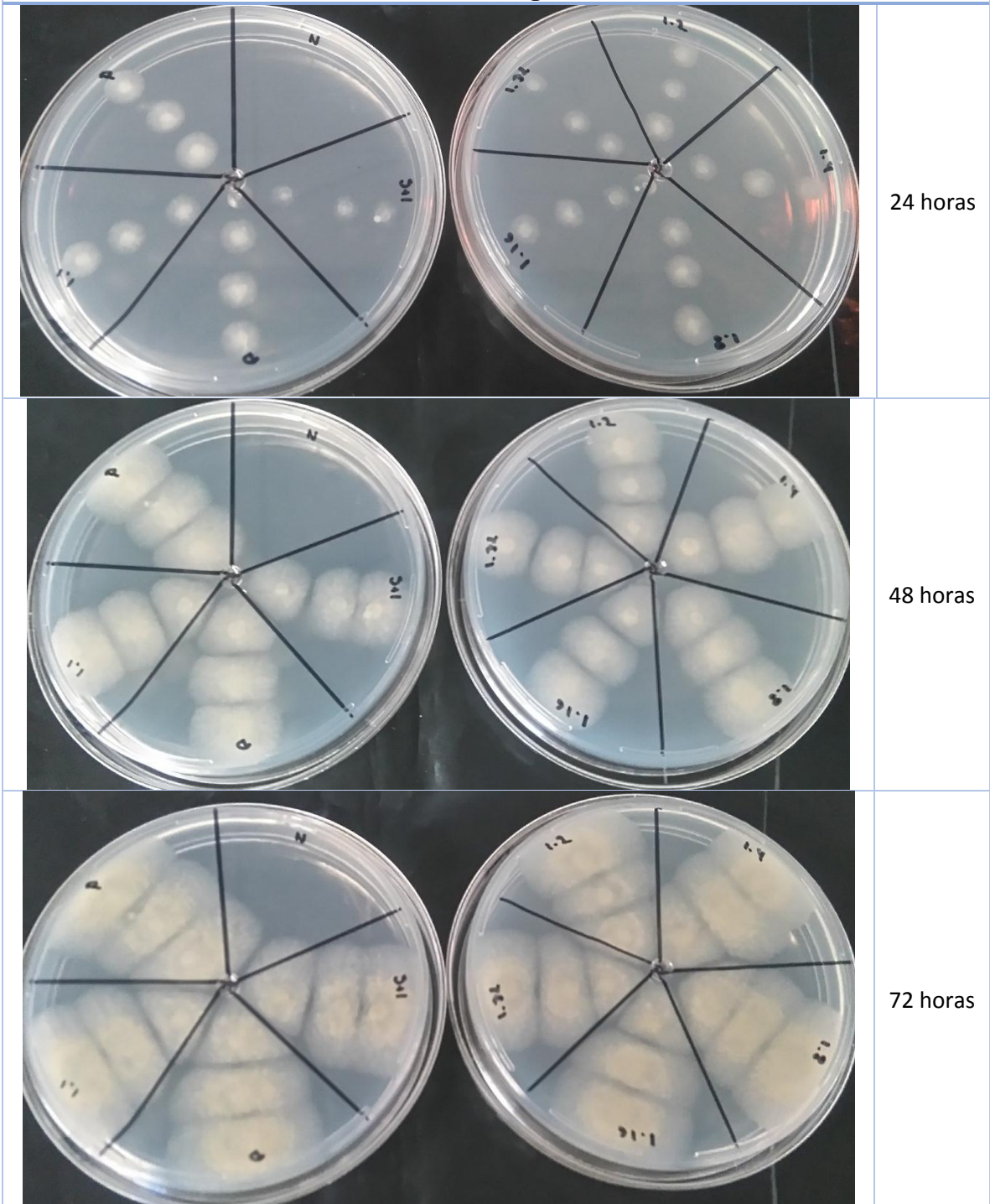
Anexo 2

*Trichoderma aggressivum* con extracto concentrado de maceración a una concentración de **2508.7 g/L**



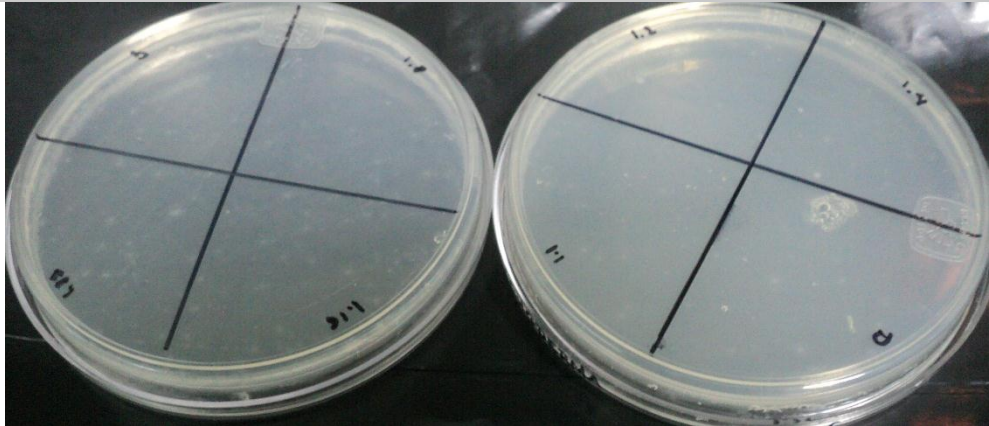
Anexo 3

*Trichoderma aggressivum* con extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L



Anexo 4

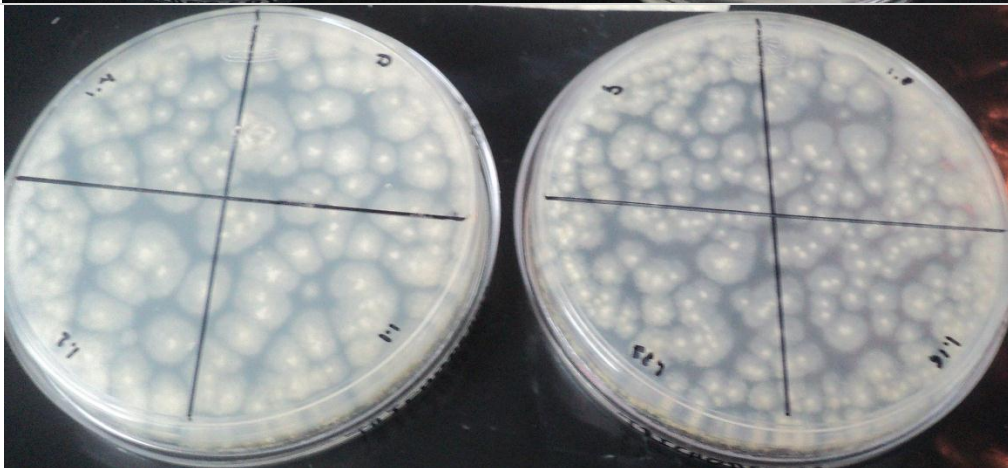
*Trichoderma aggressivum* en Kirby Bauer modificado con extracto de maceración a una concentración de **35.8385 g/L**



24 horas



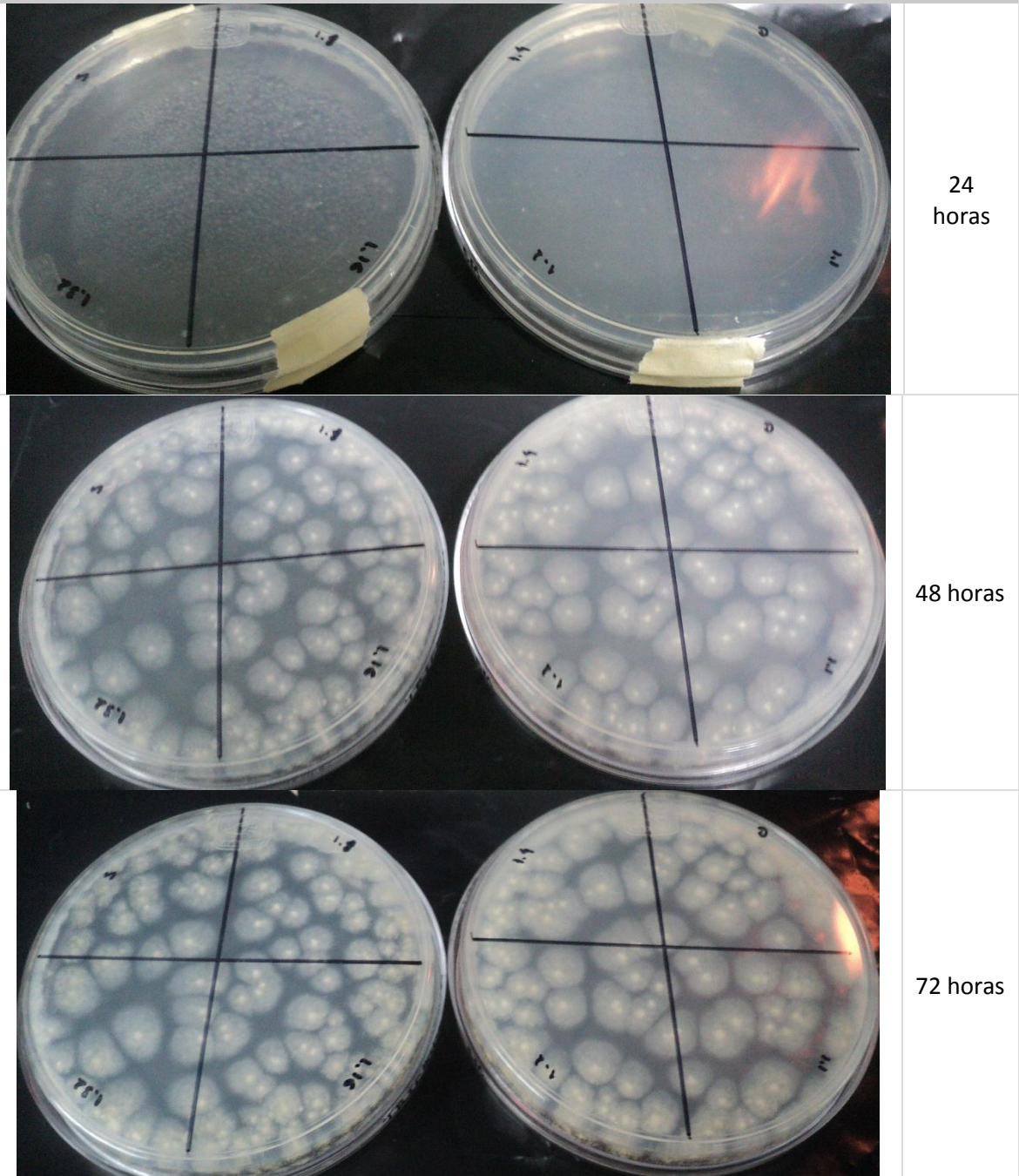
48 horas



72 horas

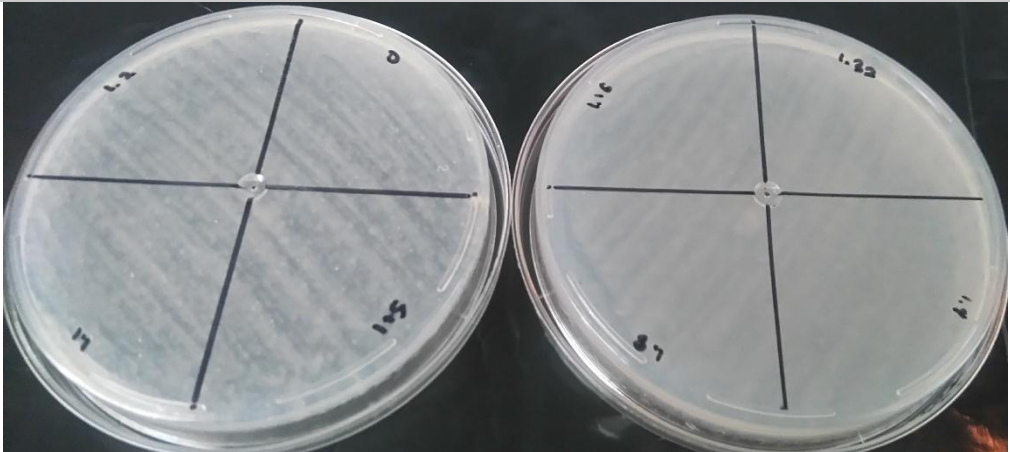
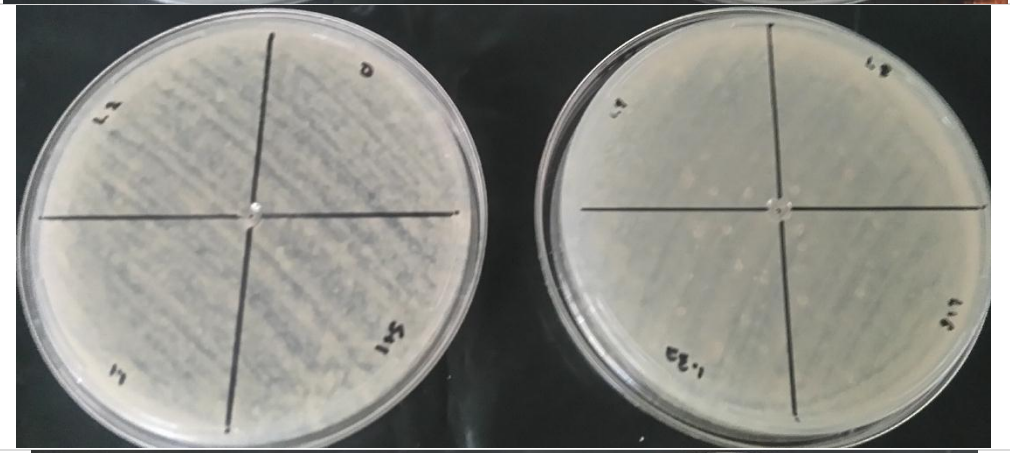
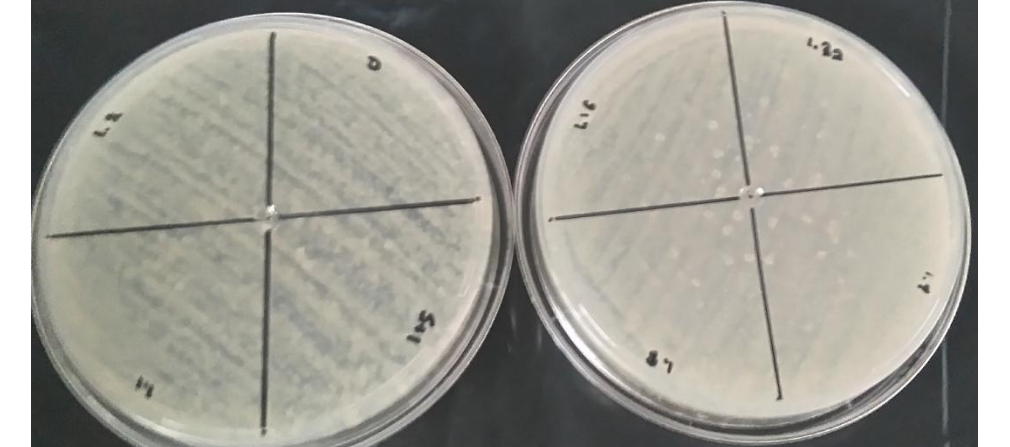
Anexo 5

*Trichoderma aggressivum* en Kirby Bauer modificado con extracto concentrado de maceración a una concentración de **2508.7 g/L**

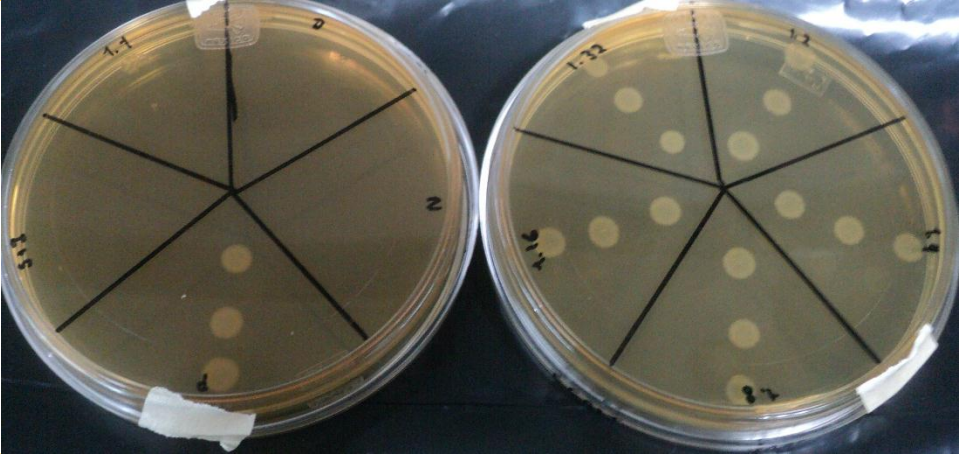

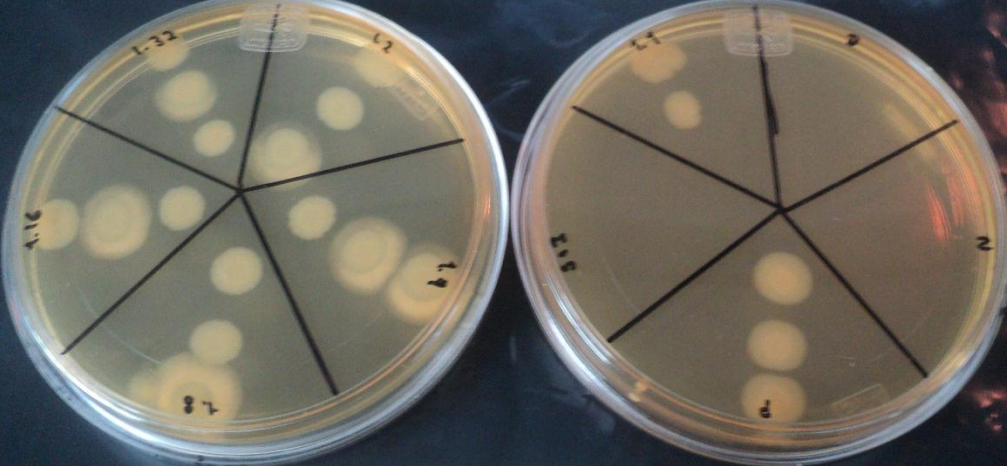


Anexo 6

*Trichoderma aggressivum* en Kirby Bauer modificado con extracto de infusión a una concentración de **44.1965 g/L**

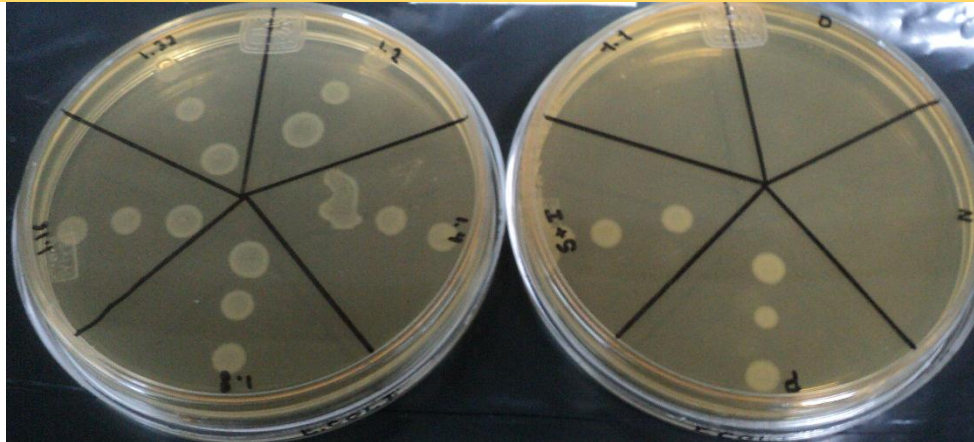
 Two petri dishes showing the initial growth of Trichoderma aggressivum on a modified Kirby-Bauer medium. The dishes are divided into four quadrants by a cross. The growth is visible as a thin, white, fuzzy layer on the surface of the agar. The left dish is labeled with 'L.22' in the top-left, 'L.19' in the bottom-left, and 'L.21' in the bottom-right. The right dish is labeled with 'L.22' in the top-right, 'L.19' in the bottom-right, and 'L.20' in the bottom-left.	24 horas
 Two petri dishes showing the growth of Trichoderma aggressivum after 48 hours. The growth is more pronounced, appearing as a thicker, more textured white layer. The left dish has labels 'L.22' (top-left), 'L.19' (bottom-left), and 'L.21' (bottom-right). The right dish has labels 'L.22' (top-right), 'L.19' (bottom-right), and 'L.20' (bottom-left).	48 horas
 Two petri dishes showing the growth of Trichoderma aggressivum after 72 hours. The growth is very dense and covers most of the surface area. The left dish has labels 'L.22' (top-left), 'L.19' (bottom-left), and 'L.21' (bottom-right). The right dish has labels 'L.22' (top-right), 'L.19' (bottom-right), and 'L.20' (bottom-left).	72 horas

Anexo 7

<i>E. coli</i> con extracto de maceración a una concentración de 35.8385 g/L	
	24 horas
	48 horas
	72 horas

Anexo 8

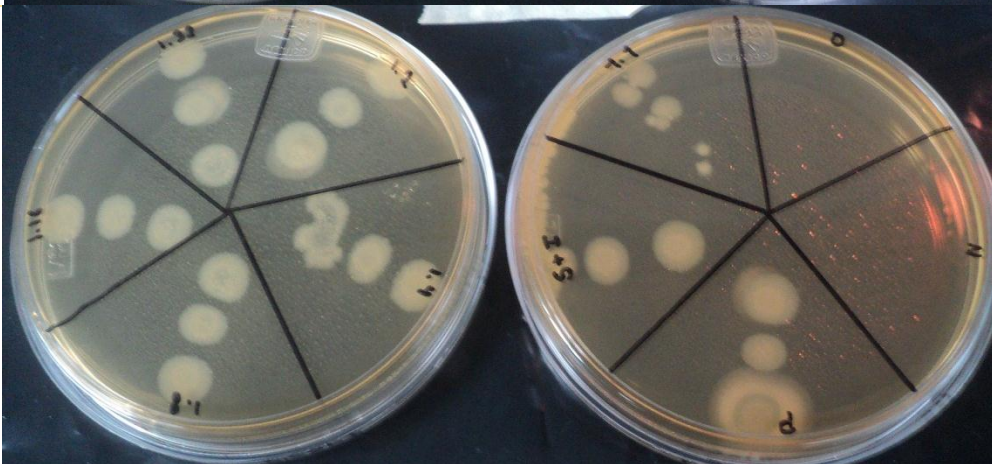
*E. coli* con extracto concentrado de maceración a una concentración de **2508.7 g/L**



24 horas



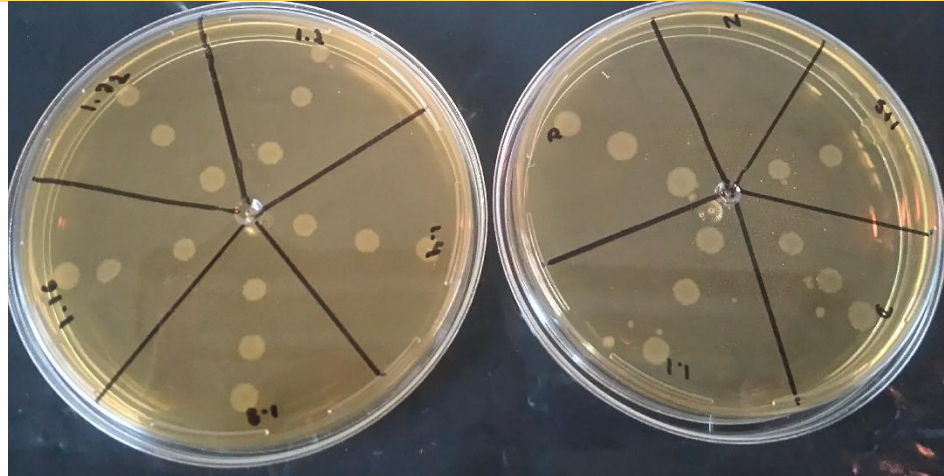
48 horas



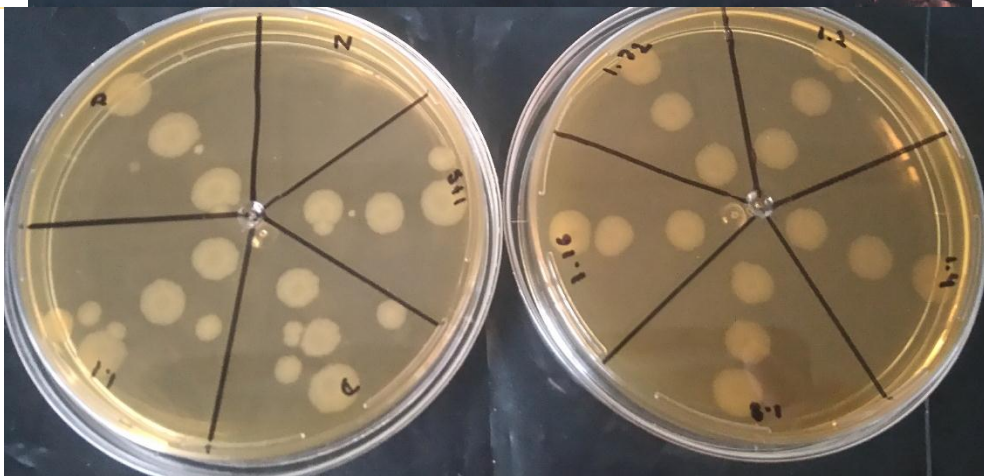
72 horas

Anexo 9

*E. coli* con extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L



24 horas



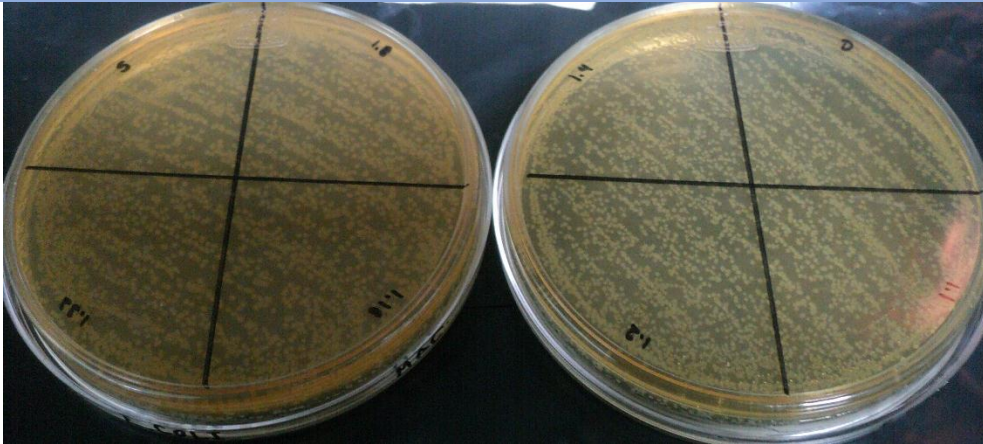
48 horas



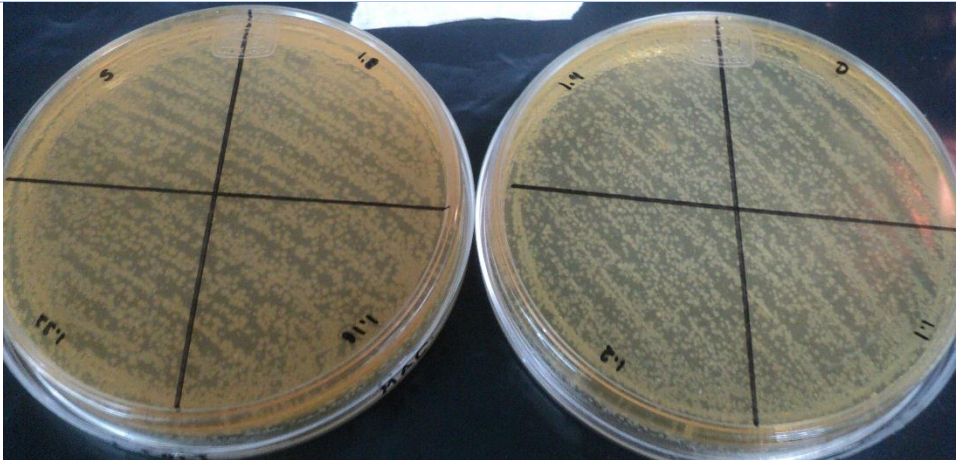
72 horas

Anexo 10

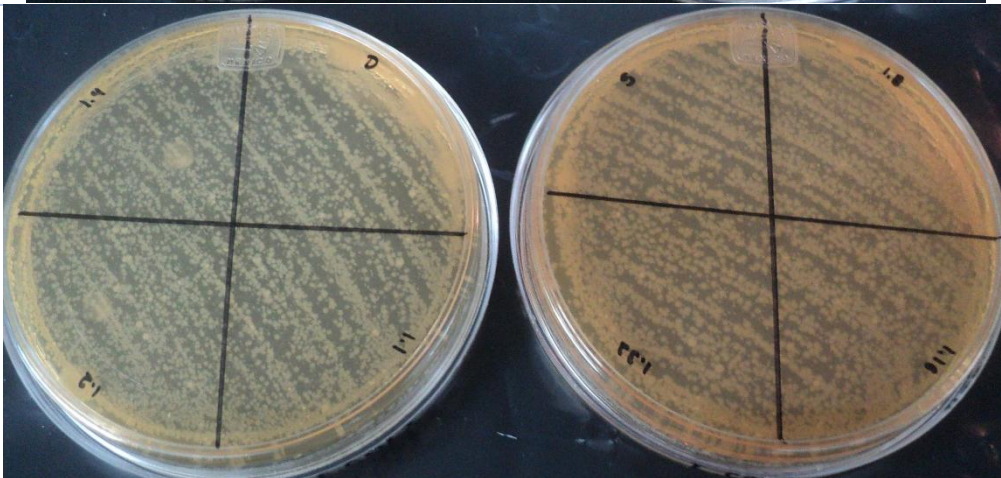
*E. coli* en Kirby Bauer modificado con extracto de maceración a una concentración de **35.8385 g/L**



24 horas



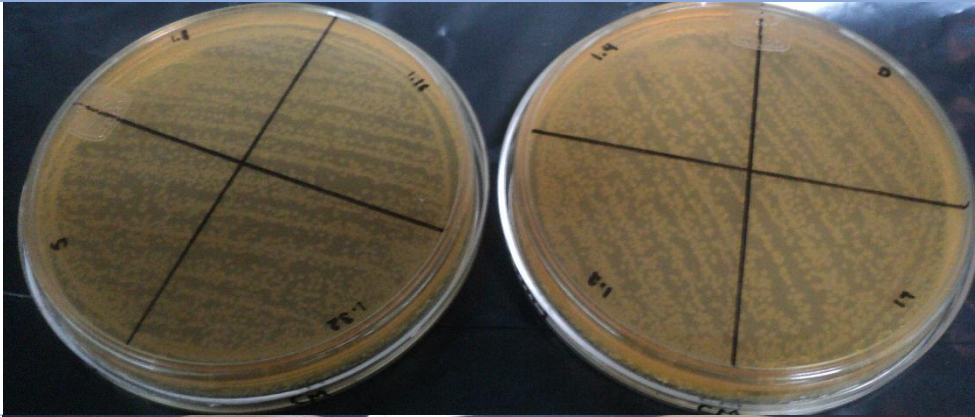
48 horas



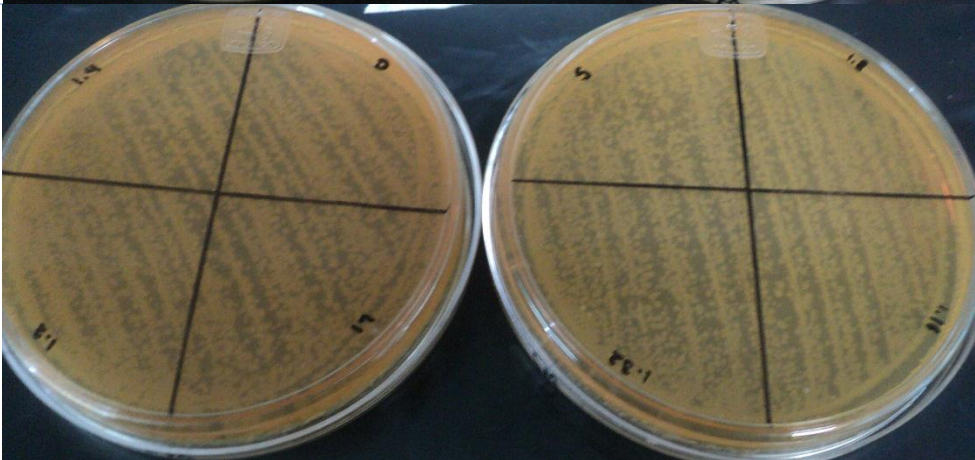
72 horas

Anexo 11

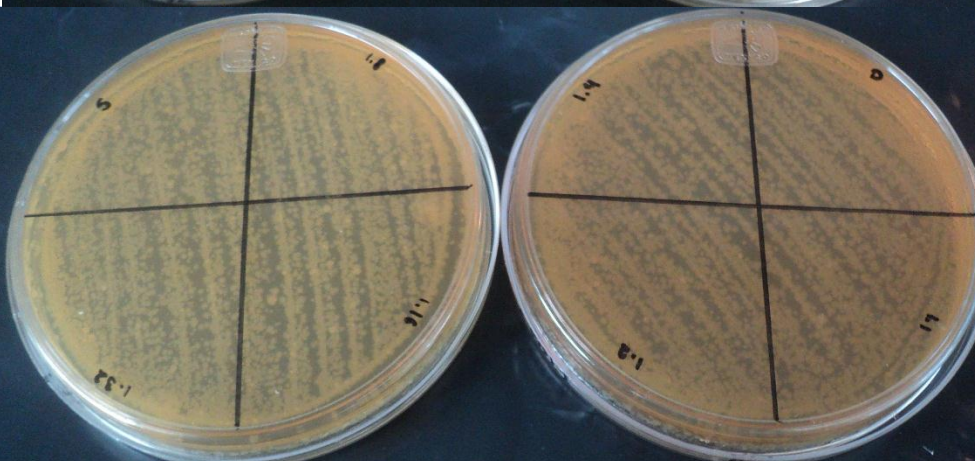
*E. coli* en Kirby Bauer modificado con extracto concentrado de maceración a una concentración de **2508.7 g/L**



24 horas



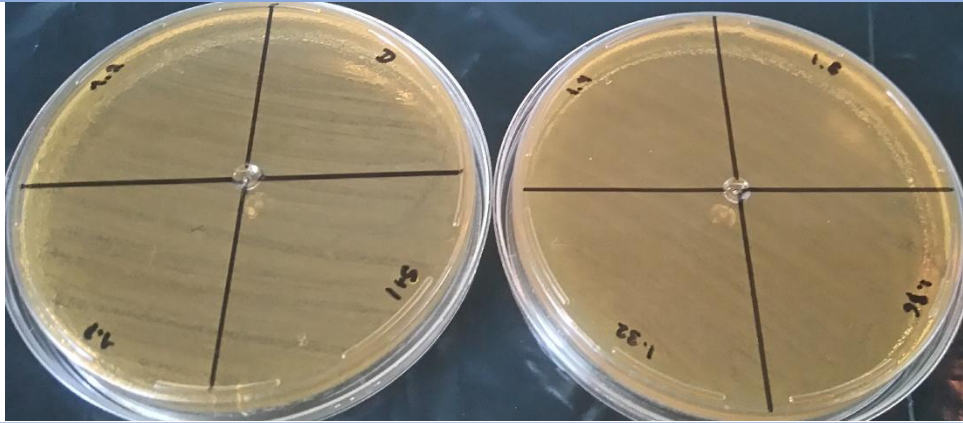
48 horas



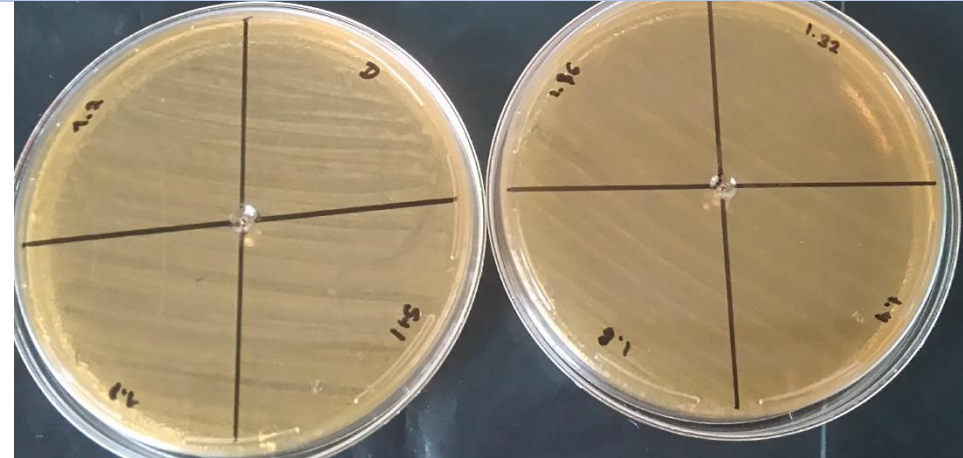
72 horas

Anexo 12

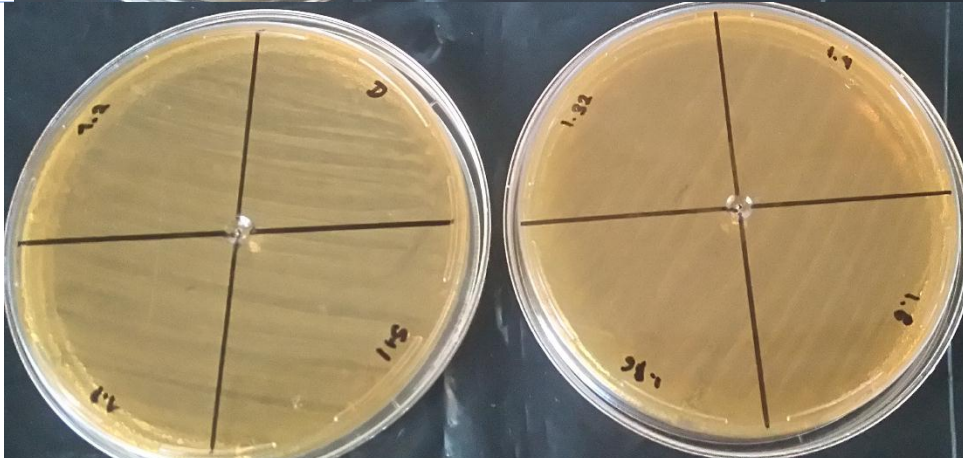
*E. coli* en Kirby Bauer modificado con extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L



24 horas



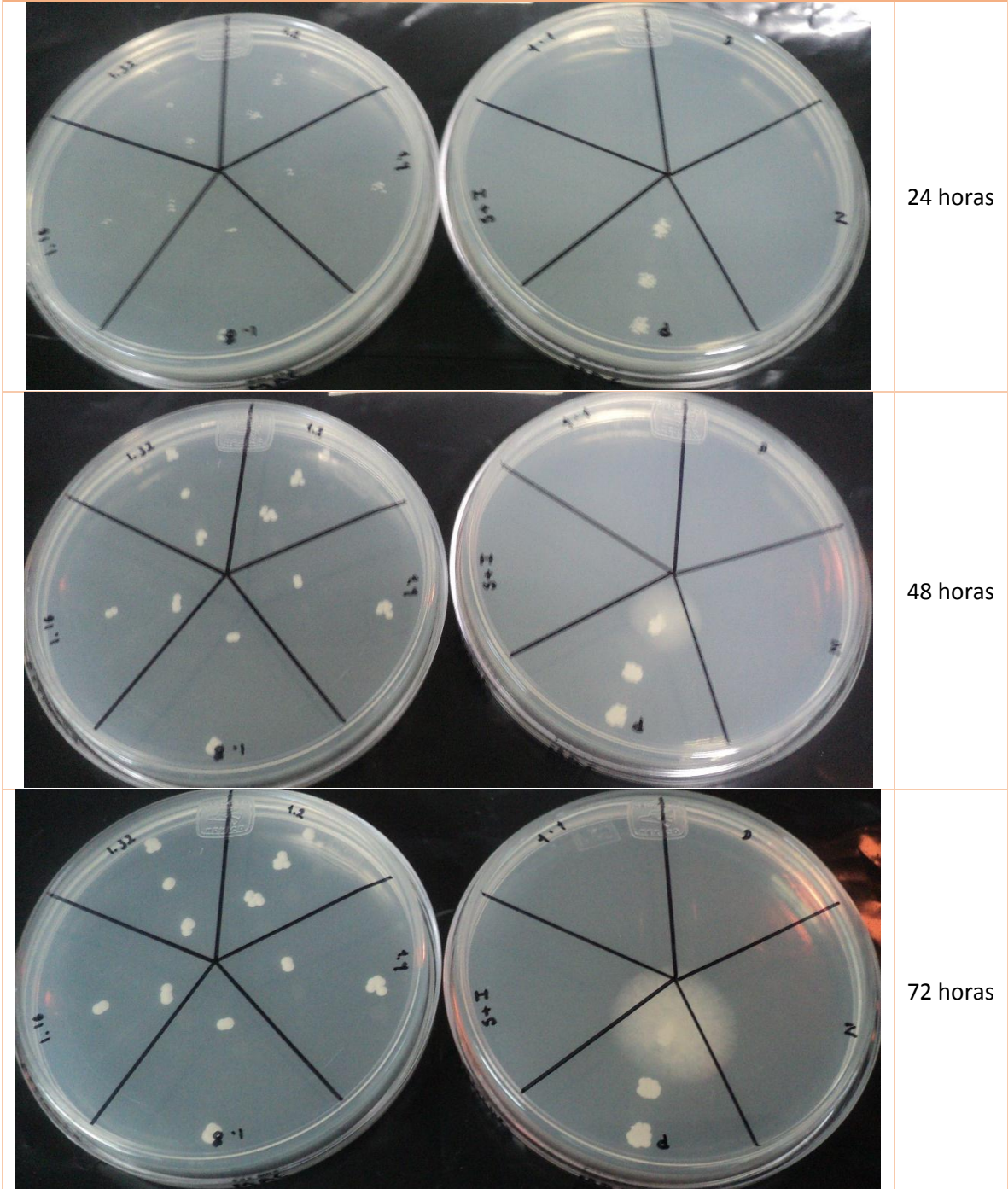
48 horas



72 horas

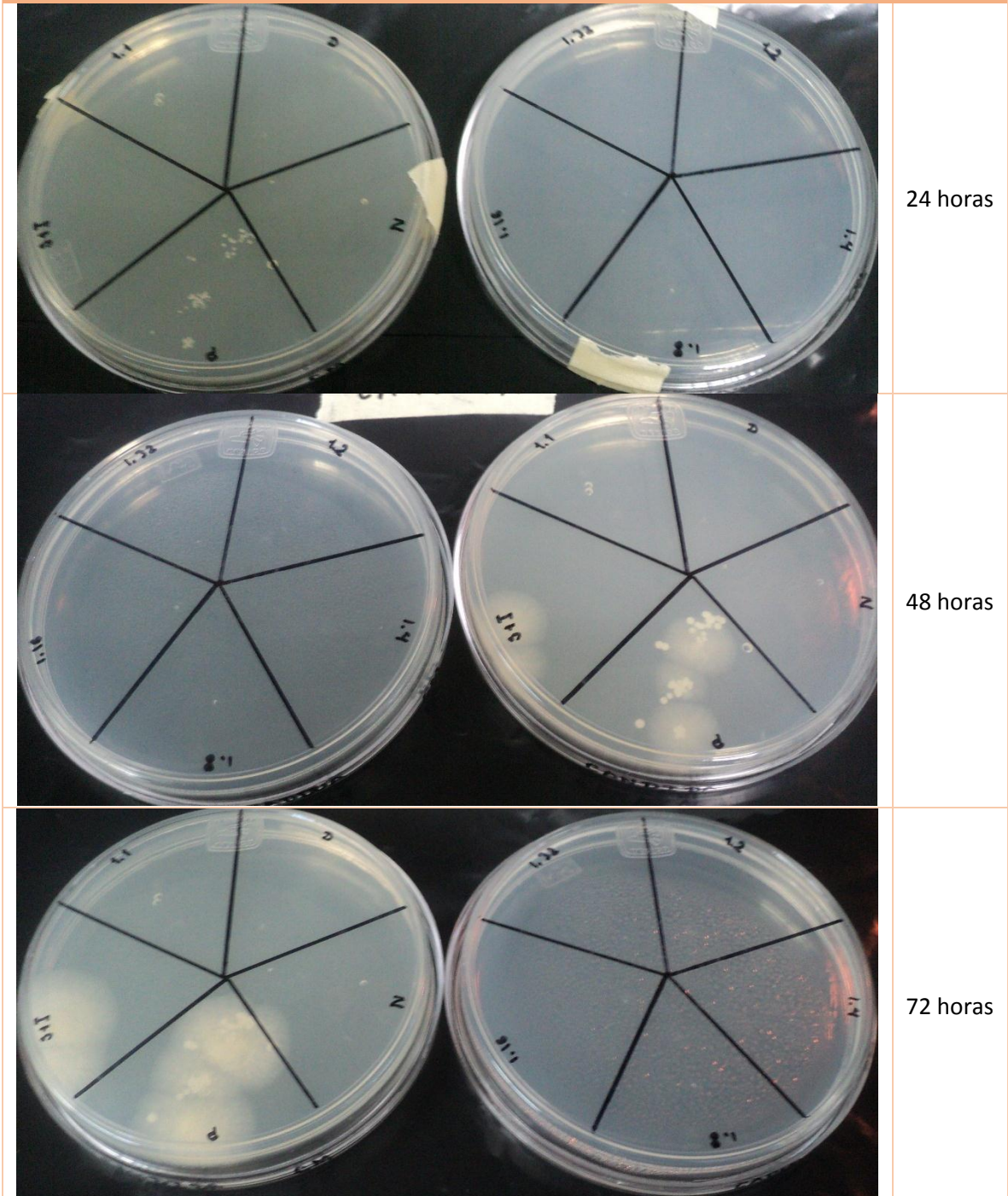
Anexo 13

*Candida albicans* con extracto de maceración a una concentración de **35.8385 g/L**



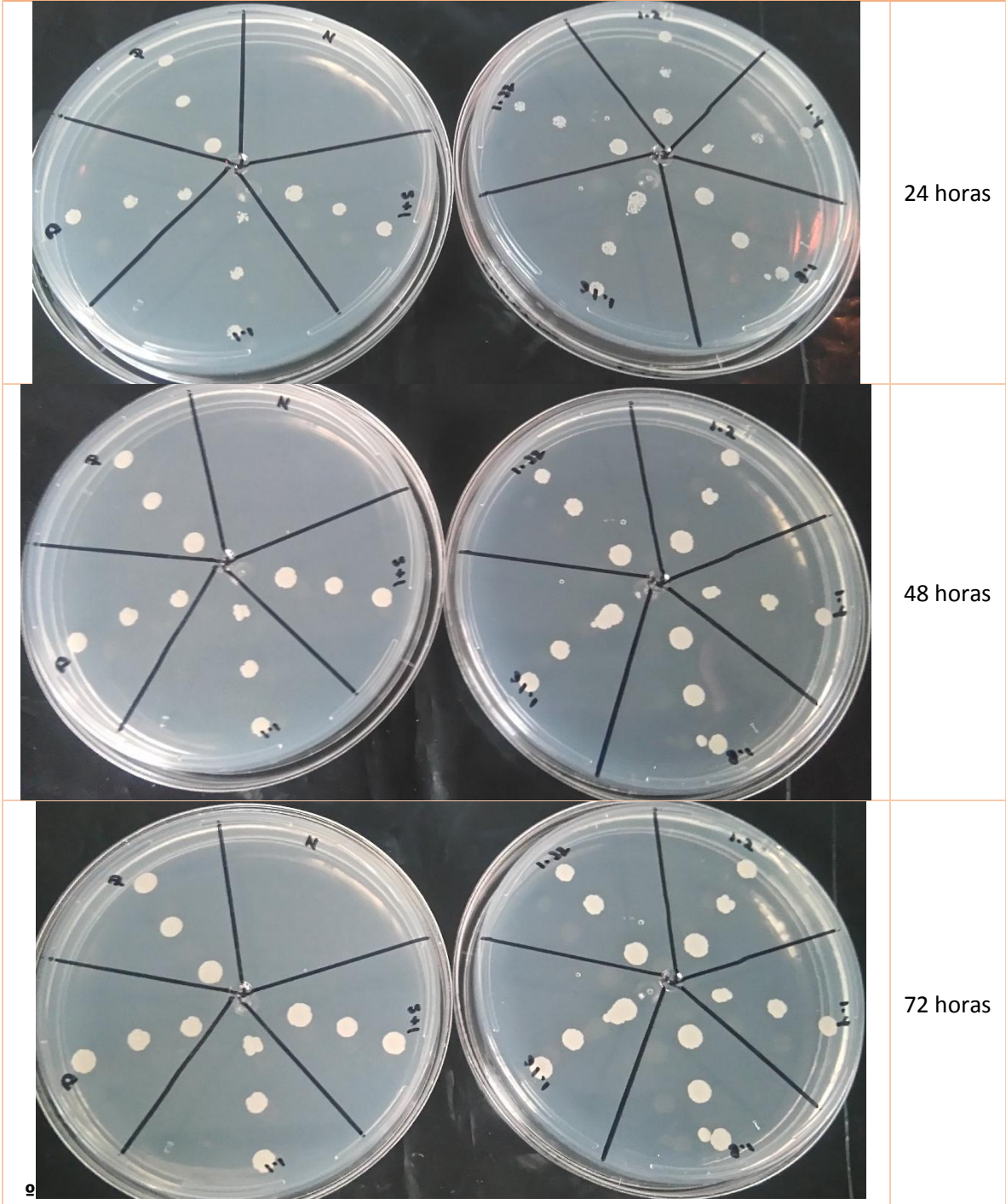
Anexo 14

*Candida albicans* con extracto concentrado de maceración a una concentración de **2508.7 g/L**



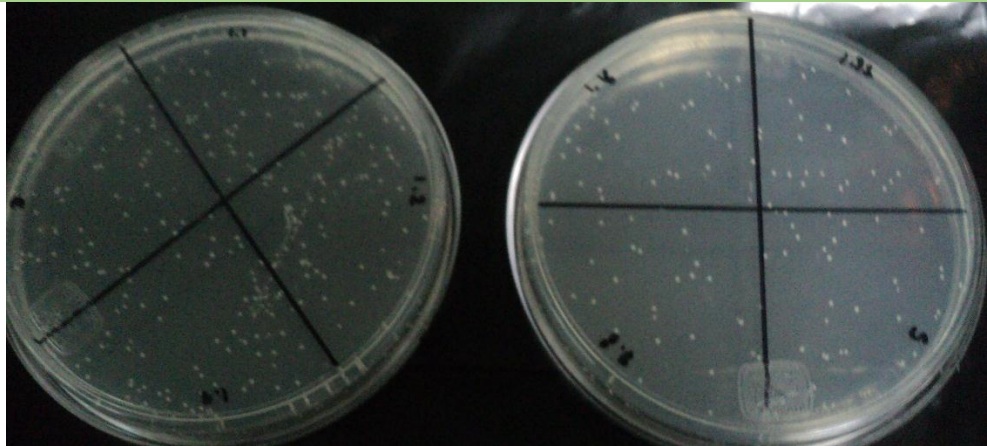
Anexo 15

*Candida albicans* con extracto de infusión a una concentración de **44.1965 g/L**

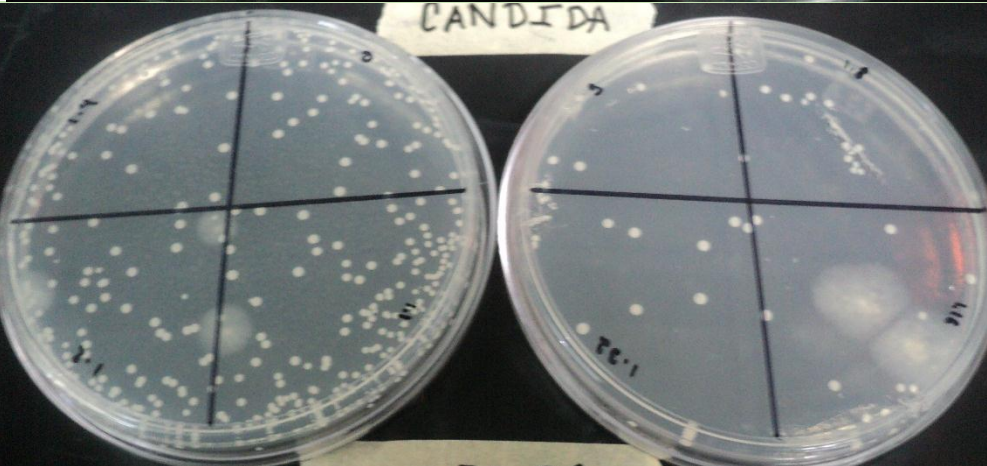


Anexo 16

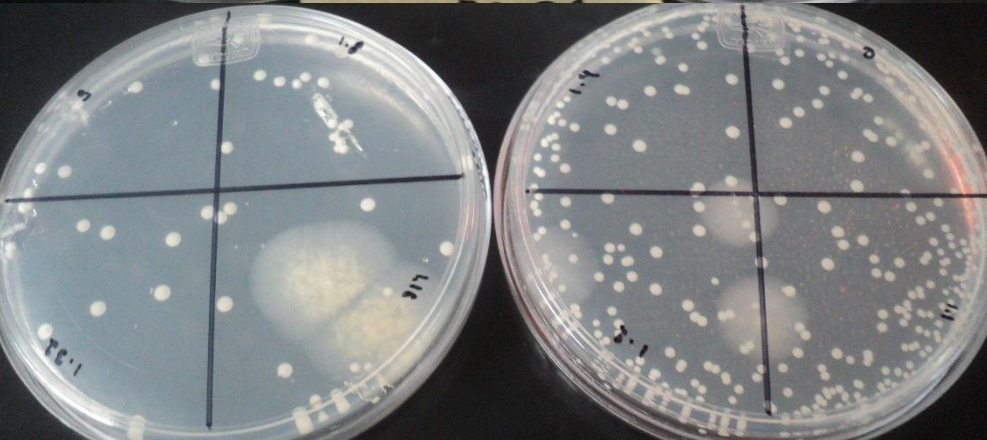
*Candida albicans* en Kirby Bauer modificado con extracto de maceración a una concentración de **35.8385 g/L**



24 horas



48 horas



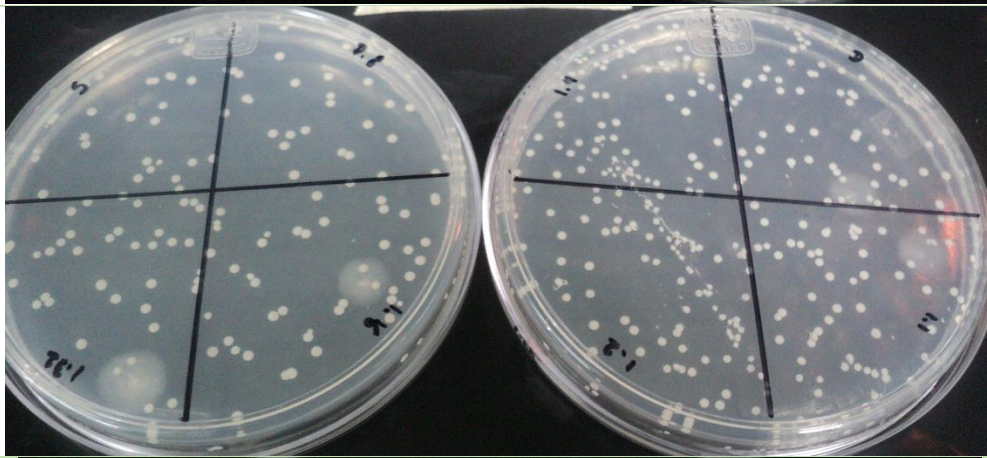
72 horas

Anexo 17

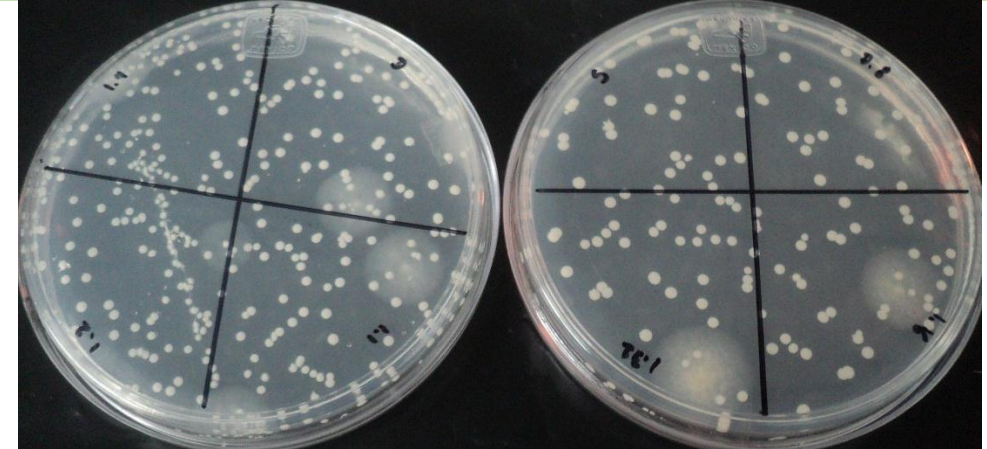
*Candida albicans* en Kirby Bauer modificado con extracto concentrado de maceración a una concentración de **2508.7 g/L**



24 horas



48 horas



72 horas

Anexo 18

*Candida albicans* en Kirby Bauer modificado con extracto de infusión a una concentración de 44.1965 g/L



24 horas



48 horas



72 horas