

Efecto biocida in vitro del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus sp* y *Pseudomonas sp*.

Doris Reyes de Fuentes, Rafael Fernández Da Silva.

Universidad de Carabobo. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (Facyt). Departamento de Biología, Unidad de Biotecnología Aplicada (UBA) Universidad de Carabobo; Valencia. Venezuela

Correspondencia: Rafael Fernández Da Silva.

E-mail: rafaelfer2103@hotmail.com

Recibido: Mayo 2013 **Aprobado:** Octubre 2013

RESUMEN

El Neem es una planta de interés etnobotánico, por las potenciales propiedades medicinales, en enfermedades de distinto origen, corroborándose el efecto de sus extractos en estudios *in vitro* e *in vivo*. Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico foliar del Neem (5-80%), cualitativamente por la turbidez del cultivo en medio líquido y cuantitativamente en unidades formadoras de colonia (UFC) en medio sólido, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI), bactericida (CMB) y fungicida (CMF) en 50 µl del inóculo de microorganismos de interés clínico a 37°C a 24 y 48 h. Las cepas evaluadas fueron el complejo *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. Encontrándose a las 24 horas, una CMI de 30, 40 y 45% y una CMB de 35, 45 y 50%, para *S. aureus*, *S. mutans* y *P. aeruginosa*, respectivamente, mientras que en el complejo *C. albicans*, no se detectó efecto fungicida pero sí fungistático parcial. A las 48 horas de exposición *S. mutans* no creció a ninguna concentración, considerándose la CMB 5%, mientras que la CMI para *S. aureus* fue de 25%, para el complejo *C. albicans* de 30% y en *P. aeruginosa* de 35%, en tanto que la CMB para *S.*

aureus fue de 30%, en *P. aeruginosa* de 40% y la CMF para el complejo *C. albicans* fue a 35%. El mayor tiempo de exposición del extracto a bajas concentraciones, tiene un gran potencial biocida para estos microorganismos tan importantes clínicamente, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlo para el tratamiento tópico de afecciones causadas por los mismos.

Palabras clave: bactericida, fungicida, extracto etanólico, *Neem*

ABSTRACT

Biocide effect of leaf extract of *Azadirachta indica* in growth of clinical microbes

Neem is a plant of ethnobotanical interest, for its medicinal properties in diseases of different origin, corroborating the effect *in vitro* and *in vivo* of extracts. This study evaluated the antimicrobial activity, in the ethanol extract of neem leaf (5-80%), qualitatively by the turbidity of the culture in liquid medium and quantitatively in colony forming units (CFU) on solid medium, determining the minimum inhibitory concentration (MIC), bactericidal (BIC) and fungicidal (FIC), in 50 µl of the inoculum of microorganisms of clinical interest at 37°C at 24 and 48 h: The strains tested were complex *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. Found that at 24 hours, MIC was 30, 40 and 45% and BIC was 35, 45 and 50% for *S. aureus*, *S. mutans* and *P. aeruginosa*, respectively, whereas to complex *Candida albicans* not detected fungicidal but fungistatic partial. After 48 hours of culture *S. mutans* did not grow at any concentration, 5% considered bactericidal, while 25% for *S. aureus*, 30% in complex *Candida albicans* and 35% *P. aeruginosa* were MIC, being 30 and 40% for *S. aureus* and *P. aeruginosa* were BIC respectively and fungicidal for *C. albicans* was 35%. The longer exposure to low concentrations of the extract, has great potential as a biocide for these clinically important microorganisms, can be effectively used in the production of generic drugs of low economic value to treat conditions caused by them.

Key words: bactericidal, fungicidal, ethanol extract, *Neem*.

INTRODUCCIÓN

El árbol de *Azadirachta indica* A. Juss, conocido como Neem, margosa, nimba o lila de la India (en sánscrito “Arishta” que significa aliviador de enfermedades) pertenece a la familia Meliaceae. Es originario de la India y actualmente se distribuye en Asia, América, Australia y el Caribe (1). Esta planta en un icono histórico y cultural de la India, debido a sus diversos usos curativos. La primera evidencia de su empleo como tratamiento médico, se reporta en el año 4.500 aC en textos del sistema hindú “Ayurvédico” de curación natural. Esto ha permitido realizar investigaciones de diferente índole, sobre todo del tipo etnobotánico, para obtener diversos productos agrícolas y farmacéuticos (2). En Venezuela el Neem ha sido empleado en programas de reforestación y en investigaciones como insecticida natural desde 1959 en Dabajuro (Edo. Falcón). Asimismo, se emplea en la recuperación de los suelos, produciendo abono orgánico con sus partes leñosas, cubiertas de semillas y hojarasca, los cuales estabilizan el pH y aportan nitrógeno (3).

No obstante, actualmente esta planta es conocida como una de las más versátiles plantas medicinales del siglo XXI, debido al amplio espectro de actividad biológica que presenta, ya que los extractos obtenidos de sus diversas partes vegetativas, están conformados por metabolitos secundarios como fenoles, quinonas, flavonoides y alcaloides, con poca presencia de metabolitos protóxicos alérgenos (4-6), que se utilizan en medicina popular para el tratamiento de enfermedades tales como: la lepra, los resfriados, la psoriasis, el reumatismo, las irregularidades digestivas, las úlceras péptico-duodenales, la gastritis, los eczemas, la artritis, el estrés, la viruela, la malaria, la diabetes, malaria, mal de chagas y problemas dermatológicos. Asimismo, se utilizan como emolientes, purgantes, antihelmínticos, antiinflamatorios, antisifilíticos y anticonceptivo (7-9). Recientemente en

tratamientos antivirales e inmunoestimulantes, contra virus tipo-2 del dengue y en herpes-simplex en ratones. Además fue probado en humanos contra el virus del VIH, evidenciando un aumento de peso y hemoglobina en los pacientes tratados (3, 9-10). En estudios de cáncer hepático in vivo con ratones y ratas se evidencia la actividad antioxidante, hepatoprotectora, anticancerígena y antitumoral de los extractos (11).

Además, presenta un amplio espectro de actividad contra microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos, incluyendo cepas resistentes a la estreptomina (3, 12- 22). Sobre la base de estos hallazgos, se han realizado investigaciones acerca de la actividad antimicrobiana de extractos puros acuosos, etanólicos y cetónicos de Neem en *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotóxica, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (21). Por otra parte, en estudios *in vitro*, el extracto foliar también inhibió el crecimiento de 14 cepas bacterianas, incluyendo *V. cholerae*, *M. tuberculosis* y *S. pyogenes* (3). Así, la margolona proveniente de la corteza es activa contra *Klebsiella*, *Staphylococcus* y *Serratia sp*; mientras que la mahmodina tiene una acción antibacterial moderada contra bacterias patógenas humanas. Por otra parte, la Neembolida también tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* S. coagulasa negativa (3). También se ha demostrado la actividad antifúngica que ofrecen los extractos foliares y aceites esenciales de Neem en los géneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichosporon*, *Geotrichum* y *Candida* (3). Los extractos foliares acuosos también tienen actividad antiviral *in vitro*, contra los virus Vaccinia, Chikungunya y paperas (parotiditis) (3). En este orden de ideas, hoy en día se buscan mecanismos alternativos económicos, sencillos, versátiles y novedosos para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, debido a la rápida aparición de nuevas cepas microbiales resistentes a los antibióticos convencionales. Por lo cual,

muchos investigadores evalúan diferentes metabolitos vegetales, como potencial solución en el control del crecimiento de nuevas cepas de microorganismos. En este sentido, en función de los antecedentes ya descritos y los estudios etnobotánicos en Venezuela acerca del Neem como antimicrobiano natural y antiséptico en heridas (23,24), la actividad sobre los microorganismos que se propone no se han evaluado exhaustivamente, por lo que se justifica esta investigación, ya que al determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico foliar del Neem, pudiera establecerse como producto terapéutico efectivo de uso externo, seguro al ambiente y a bajo costo para la comunidad, en aras de subsanar las diversas infecciones en heridas ocasionada por diversos microorganismos de interés clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. Las hojas maduras de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) tomadas de plantas en el Campus de la Universidad de Carabobo (Municipio Naguanagua), se secaron en estufa a 60°C durante 72 horas, para luego molerlas hasta obtener 25 g del polvo foliar, el cual fue disuelto en 25mL de etanol al 80% en agitación continua por 24 horas, luego de las cuales se procedió a la evaporación del etanol, obteniéndose una solución a una concentración del 100%, a partir de la cual se diluyó para realizar la evaluación biocida (13-16).

Microorganismos. Cepas liofilizadas ATCC (American Type Culture Collection) de *Streptococcus mutans* (CVCM656), *Staphylococcus aureus* (CVCM691), *Pseudomonas aeruginosa* (CVCM43) y complejo *Candida albicans* (CVCM1363) suministradas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

Preparación de las suspensiones microbianas. Las cepas liofilizadas se

prehidrataron en caldo infusión cerebro corazón (BHI), para luego incubarse por 24 horas a 37°C para su reproducción en condiciones normales de gases, excepto para *Streptococcus mutans* que requiere un ambiente microaerófilico (5% oxígeno y 10% CO₂). Luego se resembraron en Agar BHI, a excepción de *Streptococcus mutans* que fue sembrado en Agar Sangre en condición microaerófila, incubándose por 24 horas a 37°C. Luego se seleccionaron colonias aisladas suspendiéndolas en Caldo BHI por 24 h a 37°C, hasta ajustar la turbidez de las mismas al patrón de 0,5% Mc. Farland (medida a 540 nm), equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL, posteriormente se tomó una alícuota de 750 µL de la suspensión microbiana en 2250 µL de BHI, para que interactúe con la dilución del extracto respectiva.

Preparación de las diluciones. A partir del extracto concentrado obtenido, se realizaron diluciones puntuales (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80%) con Caldo BHI estéril en tubos 13x100.

Determinación de la CMI, CMB y CMF. Luego de transcurrido el tiempo de exposición de los microorganismos, se procedió a inocular 50 µL de la suspensión microbiana en placas con Agar BHI, utilizando la técnica de siembra en superficie con espátula de Drigalski, así como en tubos con caldo BHI, mediante asa de platino calibrada de 10 µL.

En ambos casos se incubó durante 24 y 48 horas a 37°C, evaluando cuantitativamente el primero a través del número de unidades formadoras de colonias (UFC) y cualitativamente el segundo mediante la turbidez del medio (14-16), estableciéndose para las tres cepas bacterianas la concentración mínima inhibitoria (CMI) que determina el efecto bacteriostático y la concentración mínima bactericida (CMB), así como la CMI y CMF para la levadura, que establece respectivamente el efecto fungistático y fungicida.

Controles. El medio de cultivo con solo extracto para verificar la presencia de contaminantes microbianos fue el control negativo, mientras que el medio con la cepa pura sin el extracto fue el control positivo, ya que verifica la viabilidad celular. Adicionalmente, se realizaron evaluaciones microscópicas (tinción Gram) y pruebas bioquímicas convencionales para constatar la pureza de los cultivos. Por último, se verifico que posibles remanentes del etanol en la solución concentrada final, no tuviera efecto antimicrobiano, asegurando que dicho solvente se haya evaporado por completo durante el proceso de obtención del extracto al 100%, realizando para ello los ensayos con diluciones de una solución sin polvo foliar de Neem, evidenciándose crecimiento microbial de todas las cepas en todas las condiciones.

Análisis de los resultados. Los datos obtenidos por cuadruplicado que verificaron la reproducibilidad de los resultados, se manejaron mediante el programa estadístico: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 18.

RESULTADOS

Al realizar la evaluación del extracto etanólico foliar de Neem en el crecimiento de

microorganismos de interés clínico, se encontró una respuesta diferencial significativa en cuanto al tiempo de cultivo (24 y 48 horas) y a la especie microbial. En primer lugar, se evidenció tanto en el medio líquido como en el sólido, un crecimiento similar en función a la concentración del extracto, en el efecto bacteriostático y bactericida en *S. aureus*, *S. mutans* y *P. aeruginosa*, así como el efecto fungistático y fungicida en *C. albicans*. En este sentido, se encontró que a las 24 horas se inhibe parcialmente el crecimiento microbiano tanto en medio líquido como sólido en el complejo *C. albicans*, observándose un efecto fungistático parcial, pero no fungicida, mientras que para *S. aureus*, *S. mutans* y *P. aeruginosa*, las CMI fueron 30, 40 y 45% y las CMB fueron 35, 45 y 50% respectivamente. A las 48 horas de cultivo *S. mutans* no creció a ninguna concentración, considerándose bactericida el extracto al 5%, mientras que las CMI para *S. aureus*, complejo *C. albicans* y *P. aeruginosa* fueron extractos al 25%, 30% y 35% respectivamente. Mientras que efecto bactericida (CMB) para *S. aureus* y *P. aeruginosa* se logró a extractos al 30% y 40% respectivamente y el efecto fungicida para el complejo *C. albicans* fue con un extracto al 35% (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto biocida del extracto de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en diferentes microorganismos de interés clínico.

Porcentaje de extracto (%)	Crecimiento microbiano <i>Complejo Candida albicans</i>				Crecimiento microbiano <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	24 horas		*48 horas		24 horas		*48 horas	
	ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)
0	+	>1000	+	>1000	+	>1000	+	>1000
5	+	>1000	+	>1000	+	>1000	+	>1000
10	+	>1000	+	>1000	+	>1000	+	>1000
15	+	>1000	+	>1000	+	>1000	+	>1000
20	+	>1000	+	495±5	+	>1000	+	>1000
25	+	>1000	+	97±4	+	>1000	+	>1000
30	+	813±14	+	-	+	>1000	+	89±2
35	+	493±7	-	-	+	597±4	+	-
40	+	206±6	-	-	+	80±1	-	-
45	+	95±5	-	-	+	-	-	-
50	+	78±3	-	-	-	-	-	-
55	+	63±4	-	-	-	-	-	-
60	+	28±2	-	-	-	-	-	-
65	+	15±2	-	-	-	-	-	-
70	+	11±1	-	-	-	-	-	-
75	+	12±1	-	-	-	-	-	-
80	+	10±1	-	-	-	-	-	-

Continuación de la tabla.

Porcentaje de extracto (%)	Crecimiento microbiano <i>Staphylococcus aureus</i>				Crecimiento microbiano <i>Streptococcus mutans</i>			
	24 horas		*48 horas		24 horas		*48 horas	
	ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)
0	+	>1000	+	>1000	+	>1000	+	>1000
5	+	>1000	+	>1000	+	>1000	-	-
10	+	>1000	+	>1000	+	>1000	-	-
15	+	>1000	+	>1000	+	>1000	-	-
20	+	986±5	+	297±3	+	>1000	-	-
25	+	404±4	+	-	+	>1000	-	-
30	+	-	-	-	+	608±7	-	-
35	-	-	-	-	+	102±3	-	-
40	-	-	-	-	+	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-

ML: Medio Líquido; **MS:** Medio sólido; **+**: con turbidez o crecimiento; **-**: Sin turbidez o crecimiento; **UFC:** Unidades formadoras de colonias; **>1000:** número incontable;*: diferencias significativas a $p<0,05$.

DISCUSIÓN

La CMI es la menor concentración de una sustancia que inhibe total o parcialmente el desarrollo microbial en medio sólido, mas no en el líquido, ya que en el medio sólido el factor de dilución es mínimo, por tanto en ciertas circunstancias los microorganismos que vienen estresados por la presencia de alguna sustancia inhibidora pueden no crecer en el agar, observándose así el efecto bacteriostático o fungistático, mientras que en el medio líquido el factor de dilución es grande, de tal forma, que los microorganismos que vengan estresados, en el caldo se elimina por completo la sustancia inhibidora y por ello crecen, por lo cual, la CMB o CMF es la concentración mínima, en la que no se observa el crecimiento en medio sólido y líquido de bacterias y hongos, corroborándose el efecto bactericida y fungicida respectivamente (25).

En este sentido, los resultados obtenidos 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 *P. aeruginosa*, así como el efecto fungistático y fungicida en el complejo *C. albicans*, tal como se ha evidenciado en diversos trabajos publicados con extractos acuosos, etanólicos, metanólicos y acetónicos de distintos órganos vegetales de esta planta (26-29).

Asimismo, a mayor tiempo de exposición (48 h) al extracto se obtuvo una actividad superior, ya que el crecimiento de todas las cepas de microorganismos estudiadas fue erradicado a bajas concentraciones del mismo, lo que podría ser debido a lo lento del proceso de desacople o inhibición de los sistemas estructurales o funcionales de la célula microbial, por parte de los metabolitos secundarios presentes en el extracto (30, 31). Tal es el caso del complejo *C. albicans*, donde solo se observa el efecto fungicida a las 48 h de exposición, o en el caso de las cepas bacterianas donde la CMB se redujo de 5 a 35% en relación al tiempo de 24 h.

En el presente estudio, el *S. mutans* mostró efecto bactericida a las 24 horas utilizando el extracto etanólico foliar al 45%, concentración mayor a la empleada de un extracto acetónico de corteza (20%) sobre *S. sobrinus* (25). Además, a las 48 horas de exposición la CMB fue del 5%, un resultado no reportado con anterioridad, con este extracto para esta cepa

En el caso de *S. aureus* se encontró una tendencia similar, donde un incremento en el tiempo de exposición determina un mayor efecto bactericida, reduciendo a un 5% la CMB a las 48 horas, no encontrando crecimiento bacteriano con el extracto al 30%, una concentración superior a la indicada, por otros autores, utilizando extractos metanólicos, de cloroformo de hojas y de callo embriogénico al 0.01% y 0.02% respectivamente a las 4 horas (29), así como en extractos metanólicos de corteza al 0,1% a las 8 horas de cultivo (13, 32), en extractos hexanólicos de semillas al 0.1% a las 24 horas (33), en éter de petróleo de corteza u hojas al 0,1% a las 24 horas (34), en extractos etanólicos de corteza al 0.2% a las 24 horas (35) y extractos metanólicos y acetónicos de semillas al 10% a las 24 horas (27). De tal manera que al ser los extractos provenientes de tejidos y solventes distintos al estudio, se puede inferir que los mismos presentan una diferente proporción y número de metabolitos secundarios potencialmente biocidas a la cepa, siendo los resultados de este trabajo pioneros para este microorganismo con este tipo de extracto.

Con respecto a *P. aeruginosa*, se obtuvo una respuesta parecida a las indicadas en las dos cepas bacterianas anteriores, donde un incremento en el tiempo de exposición influyó en un mayor efecto bactericida, reduciendo a un 5% la CMB a las 48 horas, no encontrando crecimiento bacteriano con un extracto al 40%, una concentración inferior al 50% señalada con extracto hexanólico de semillas a las 24 horas de cultivo (35), una prometedor resultado no reportado antes con el extracto de Neem para esta cepa.

En cuanto al complejo *C. albicans*, no se observó efecto fungicida a las 24 horas de

cultivo, aspecto logrado a las 48 horas de exposición con el extracto al 35%, CMF superior a la indicada al emplear extractos metanólicos y de cloroformo de hojas y de callo embriogénico al 0.01% y 0.02% respectivamente a las 4 horas de cultivo (29), o 0,8% del extracto metanólico de corteza a las 8 horas de cultivo (13), aspecto posiblemente atribuible a que los extractos al ser diferentes al empleado en este estudio, pueden presentar una distinta proporción de compuestos biocidas a la cepa. Sin embargo, se reporta efectos fungicidas en cultivos de 24 horas con extractos etanólicos foliares al 0,05% (36), lo cual pudo deberse a que la cepa utilizada en este trabajo presentó un mayor grado de resistencia al extracto.

Finalmente, se puede concluir que el mayor efecto biocida se logra a las 48 horas de exposición a bajas concentraciones del extracto etanólico foliar. A este tiempo de cultivo, a partir del extracto al 5%, la cepa más sensible fue *S. mutans*, a diferencia de las cepas *S. aureus*, *P. aeruginosa* y complejo *C. albicans* que fueron más resistentes, dado que se requirieron mayores concentraciones del extracto (30-40%). De tal forma, que sustentándose en los resultados hallados con este extracto *in vitro*, se puede sugerir la posibilidad de su efectivo empleo en la elaboración de medicamentos genéricos de uso tópico de bajo valor económico, para el tratamiento de las afecciones causadas por estos microorganismos tan importantes clínicamente, previa evaluación de su efectividad y seguridad, aunado a que no hay contraindicaciones alérgicas que se hayan reportado en productos con esta planta (3).

Agradecimiento. Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC) según oficio N° CDCH-AM-0477-10 del 07/12/2010. Asimismo al personal asistente de la Unidad de Biotecnología Aplicada (UBA) del Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo (Naguanagua-Edo. Carabobo) por el apoyo en la ejecución de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Luz. Neem, un árbol milagroso. Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Maracaibo-Venezuela. 2001; 49 pp.
2. Vanisgree M, Lee CH, Lo Sh, Nalawade S, Lin CH, Tsay H. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Bot Bull Acad Sin 2003; 45: 1-22.
3. Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee R. Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*). Curr Sci 2002; 82 (11): 1336-1345.
4. Ogbuewu I, Odoemenam H, Obikaonu H, Opara M, Emenalom O, Uchegbu M, Okoli I, Esonu B, Iloeje M. The growing importance of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in agriculture, industry, medicine and environment: a review. Res J Medicinal Plant 2011; 5 (3): 230-245.
5. Asif M. Antimicrobial Potential Of *Azadirachta Indica* Against Pathogenic Bacteria And Fungi. J Pharma & Phytochemistry; 2012.1(4):79-84
6. García D, Medina M, Domínguez C, Baldizán A, Humbría J, Cova L. Evaluación química de especies no leguminosas con potencial forrajero en el estado Trujillo, Venezuela. Zootecnia Trop 2006; 24(4): 401-415.
7. National Research Council (NRC). Neem: A Tree for Solving Global Problems. Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Sci. and Technology for Int. Development. National Academy Press 1992; 1:141
8. Atawodi S, Atawodi J. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. Phytochem Rev 2009; 8:601–620.
9. Zeitlin L, Whaley K, Hegarty T, Moench T, Cone R. Tests of vaginal microbicides in the mouse genital herpes model. Contraception 1997; 56 (5): 329-335.
10. Parida M, Upadhyay C, Pandya G, Jana M. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. J Ethnopharmacology 2002; 79 (2): 273-278.
11. Taha M, Wahab S, Othman F, Hanachi P, Abdul A, Al-Zubairi A. Chemopreventive properties of *Azadirachta indica* aqueous extract on DEN-AAF hepatocarcinogenized rats. Int J Mol Med & Adv Sci 2008; 4(2):50-54
12. Sunday E, Atawodi J. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. Phytochem Rev 2009; 8: 601-620.
13. López Y, Escalante M, Rodríguez C, Soto J, Chaidez C. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y Venadillo (*Switenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y Bacterifago P22. Bioquímica 2007. 32(004):117-125
14. Mehrotra S, Srivastava A, Nandi S. Comparative antimicrobial activities of Neem, Amla, Aloe, Assam Tea and Clove extracts against *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Medicinal Plants Res 2010. 4(22): 2393-2398
15. Aarati N, Ranganath N, Soumya G, Kishore B, Mithum K. Evaluation of antibacterial and anticandidal efficacy of aqueous and alcoholic extract of Neem (*Azadirachta indica*) and in vitro study. I J R Ayurveda & Pharmacy 2011; 2(1):230-235
16. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap 2003; 16(4):385-393
17. Paiva P, Gomes F, Napoleão T, Sá R, Correia M, Coelho L. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. Curr. Res. Technology & education Top Appl Microb Microbial Biotechnology 2010; 1: 396-406
18. Vaghasiya Y, Chanda S. Screening of Methanol and Acetone Extracts of Fourteen Indian Medicinal Plants for Antimicrobial Activity. Turk J Biol 2007; 31: 243-248
19. Silva N, Fernandez J. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2010; 16(3):402-413
20. Rahmatullad M, Jahan R, Khatun A, Jahan F, Azad A, Bashar A, Miajee E, Ahsan S, Nahar N, Ahmad I, Chowdhury M. A pharmacological Evaluation of Medicinal Plants used by Folk Medicinal Practitioners of Station Purbo Para Village of Jamalpur Sadar Upazila in Jamalpur district, Bangladesh. American-Eurasian J Sustainable Agriculture, 2010; 4(2): 170-195
21. Gualteri M, Villalta C, Guillén A, Lapenna E, Andara E. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la *Azadirachta indica* A. Juss (Neem). Rev INHRR 2004; 35(1): 1-7.

22. Vinoth B, Manivasagaperumal R, Rajaravindran M. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Azadirachta indica* A. Juss. International J Res in Plant Science 2012; 2(3):50-55
23. Bermúdez A, Velázquez D. Etnobotánica médica de una comunidad campesina del estado Trujillo, Venezuela: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. Rev Facultad de Farmacia 2002; 44:2-6
24. Otaiza R, Mejías R, Carmona J, Mejías R, Arredondo M. Estudio etnobotánico de algunas plantas medicinales expendidas en los herbarios de Mérida, Ejido y Tabay (Estado Mérida-Venezuela). Rev Med Farmacia 2003; 45(1): 69-76.
25. Gil M, Reyes D, Rojas T, Flores M. Actividad bacteriostática y bactericida de una tintura de propóleos proveniente del Estado Cojedes sobre bacterias de interés clínico. Bol Venez de Infectol 2008; 19(2):124
26. Bhuiyan M, Nishimura M, Matsumura S, Shimono T. Antibacterial effects of the crude *Azadirachta indica* Neem bark extract on *Streptococcus sobrinus*. Pediatric Dental J 1997; 7 (1): 61-64.
27. Hidalgo, A. Utilización del extracto alcohólico de *Azadirachta indica* A. Juss contra bacterias de importancia medica *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Minerva Revista en línea CIC-UES. 2007; 1:1-10. Disponible en: <http://www.cic.ues.edu.sv/revista> [consulta 13/01/2013]
28. Helmy W, Amer H, El-Shayeb N. Biological and anti-microbial activities of aqueous extracts from tree (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). J App Sci Res 2007; 3(10):1050-1055
29. Osman, A. Bioactivity of Neem (*Azadirachta indica*) Callus Extract. Thesis submitted to the Sudan Academy of Science in partial fulfillment for the requirements for the degree of Master of Science in Biotechnology. 2008; 1:48
30. Soriano F. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la lectura interpretada del antibiogramas. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica 2010. 28(7):461-466
31. Vives E, Medvedovsky D, Rothlin R. Farmacología General de las drogas antibacterianas. 2003. Pp:27 <http://www.dftc.ucr.ac.cr/index.php/farmacologia-clinica> [consulta 21/02/2013]
32. Sukanya S, Sudisha J, Hariprasad P, Niranjana S, Prakash H, Fathima S. Antimicrobial activity of leaf extracts of indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. African J Biotechnology 2009; 8(23):6677-6682.
33. El-Mahmood A, Ogbonna O, Raji M. The antibacterial activity of *Azadirachta indica* (neem) seeds extracts against bacterial pathogens associated with eye and ear infections. J Medicinal Plants Res 2010; 4(14):1414-1421
34. Satdive R, Eapen S, Fulzele D. Bioactive constituents and antimicrobial activity of cell cultures of *Azadirachta indica*. Int J Pharma & Bio Sci 2011; 2 (4):617-628
35. Oongsakul M, Jindarat A, Rojanaworarit C. Antibacterial effect of crude alcoholic and aqueous extracts of six medicinal plants against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. J Health Res 2009; 23(3):153-156
36. Bohora A, Hegde V, Kokate S. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extract and 2% sodium hypochlorite against *E. faecalis*, *C. albicans* and mixed culture - An in vitro study Endontology 2010; 1:10-14