

Extractos de callos de *Moringa oleifera* inducidos con 2,4-D y BAP en bacterias de interés clínico

Salus

Salus.2026; 30(2):8-18

Extracts from *Moringa oleifera* callus induced with 2,4-D and BAP on bacteria of clinical interest

Rafael Fernández Da Silva ¹  Francy Pérez ¹ 

RESUMEN

Introducción: La *Moringa* es un árbol reconocido por sus múltiples beneficios medicinales, debido a los abundantes metabolitos secundarios que presenta; los extractos obtenidos *in vivo* o *in vitro* han demostrado efecto en distintas enfermedades.

Objetivo: evaluar el efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de callo no embriogénico (NE) de *Moringa oleifera*, inducidos con diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP, en bacterias de interés clínico. **Métodos:** De callo NE obtenido de diferentes combinaciones de 2,4-D y BAP, se realizaron extractos etanólicos de 5, 7, 10, 15, 20 y 25%. A partir de estas concentraciones de extracto se determinó el efecto antimicrobiano, evaluando la concentración mínima inhibitoria "CMI" ó bactericida "CMB" por microdilución en 50 µL de inóculo bacteriano de las cepas *E. aerogenes* y *P. vulgaris*, de manera cualitativa a través de la turbidez del cultivo líquido y cuantitativamente en unidades formadoras de colonia (UFC) en cultivo sólido, a 37°C a 24 h. **Resultados:** El mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano con CMI de 5% y 7% y CMB de 10% con todos los extractos en ambas cepas bacterianas, en particular con extractos de callos inducidos en 1 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP y 1,5 mg/L de 2,4-D con 0,5 mg/L de BAP. Se observó disminución del número de UFC a partir de 5% (50 mg/mL), observando desde 10% (100 mg/mL) un efecto bactericida pronunciado debido a que no se observa crecimiento en ambas bacterias. **Conclusión:** La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de callo NE a bajas concentraciones, presenta un elevado potencial biocida para las bacterias interés clínicos evaluadas, pudiéndose proponer como posibles alternativas natural para tratamientos de afecciones ocasionadas por dichos microorganismos y otras cepas con alta resistencia microbiana.

Palabras clave: Calogénesis, extracto de callo no embriogénico, metabolitos secundarios, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Introduction: *Moringa* is a tree recognized for its multiple medicinal benefits, due to the abundant secondary metabolites it presents; The extracts obtained *in vivo* or *in vitro* have shown an effect on different diseases. **Objective:** The objective of this research was to evaluate the antimicrobial effect of ethanolic extracts of non-embryogenic (NE) callus of *Moringa oleifera*, induced with different combinations of the growth regulators 2,4-D and BAP, on bacteria of clinical interest. **Methods:** From NE callus obtained from different combinations of 2,4-D and BAP, ethanolic extracts of 5, 7, 10, 15, 20 and 25% were made. From these extract concentrations (5-25%) the antimicrobial effect was determined, evaluating the minimum inhibitory concentration "CMI" or bactericidal "CMB" by microdilution in 50 µL of bacterial inoculum of the strains *E. aerogenes* and *P. vulgaris*, qualitatively through the turbidity of the liquid culture and quantitatively in colony-forming units (CFUs) in solid culture, at 37°C for 24 h. **Results:** The greatest inhibitory effect on microbial growth with a MIC of 5% and 7% and a MBC of 10% with all extracts in both bacterial strains, in particular with callus extracts induced in 1 mg/L of 2,4-D with 0.5 and 1 mg/L of BAP and 1.5 mg/L of 2,4-D with 0.5 mg/L of BAP. The decrease in the number of CFU was observed from 5% (50 mg/mL), observing from 10% (100 mg/mL) a pronounced bactericidal effect due to the fact that no growth is observed in both bacteria. **Conclusion:** The antimicrobial activity of ethanolic extracts of non-embryogenic callus at low concentrations presents a high biocidal potential for the bacteria evaluated, whose microorganisms are of great clinical interest. These positive and promising results could be proposed as possible natural alternatives for the treatment of conditions caused by these microorganisms and other strains with high microbial resistance.

Key words: Callogenesis, non-embryogenic callus extract, secondary metabolites, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad se ha recurrido al uso de la medicina tradicional, por medio del empleo de las plantas medicinales, que son usadas desde tiempos remotos por pobladores primitivos de manera empírica. En la actualidad, aún se recurren a las plantas de interés medicinal por su capacidad de sintetizar una variedad de compuestos como lo son los metabolitos secundarios, los cuales son obtenidos por cultivo celular, con el fin de encontrar nuevos compuestos capaces de resolver problemas de salud, la mayoría de ellas como consecuencia de infecciones bacterianas y fúngicas. ¹

¹ Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), FACyT-UC. Departamento de Biología, Universidad de Carabobo. Estado Carabobo, Venezuela.

Autor de Correspondencia: Rafael Fernández Da Silva 

e-mail: rfernandez2@uc.edu.ve

Recibido: 17/04/2025

Aprobado: 29/07/2026

Partiendo de lo anteriormente mencionado, dentro de estas plantas de interés medicinales se encuentra la empírica ². En años recientes se ha demostrado científicamente que posee numerosos atributos que se le ha adscrito por ser una planta de interés investigativo. En relación a sus múltiples usos, *Moringa oleifera* es una especie arbórea conocida también como “árbol milagroso”. Desde el punto de vista taxonómico, la *Moringa* pertenece a la familia *Moringaceae*, el cual agrupa un género que comprende 13 especies donde su investigación actual sólo es conocida en *Moringa stenopetala*, *Moringa peregrina* y *Moringa oleifera*. ^{3,4}

M. oleifera es de gran interés a nivel investigativo debido a su importancia económica en cuanto a la alimentación, salud, gestión de residuos, purificación de agua y obtención de combustible (biodiesel)., de esta manera es valorada por sus múltiples aplicaciones, incluyendo sus propiedades antimicrobianas, nutritivas, antioxidantes, antiinflamatoria, expectorante, antibiótico, diurético, para el asma, anemia, diabetes, anticancerígeno, entre otros. ^{3,4,5}

Adicionalmente, esta planta es rica en varias sustancias como glucosinolatos, isotiocianatos, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y cinamatos. Varios de los compuestos identificados pueden considerarse nutraceuticos, ya que son útiles tanto en la nutrición como en la salud humana, que presentan actividad anticancerígena, hipotensiva y en años recientes se han generado resultados científicos que confirman dichas actividades incluyendo la antimicrobiana. ^{4,6}

Por lo tanto, entre las alternativas naturales, *M. oleifera* representa un fuente beneficiosa y aprovechable de compuestos químicos únicos, dada la gran diversidad de metabolitos secundarios en comparación a los compuestos sintéticos, los cuales pueden actuar de manera sinérgica sobre los microorganismos, dificultando de esta forma su capacidad para generar resistencia al medicamento ^{7,8,9}. Es por ello que dichos metabolitos podrían ser efectivos y de innovación en cuanto a la industria farmacéutica como principios activos de antibióticos contra patógenos por su fácil obtención, extrayéndose a través de solventes orgánicos y agua, como acetona, metanol, éteres y alcoholes, de acuerdo a su composición química y polaridad intrínseca. ^{10,11,12}

Existen numerosas enfermedades causadas por bacterias que podrían ser combatidas con dichos metabolitos secundarios, los cuales son muy importantes dada a la incidencia patógena a escala mundial que puede causar enfermedades de origen alimentario, así como infecciones urinarias, respiratorias, entre otras. Los patógenos causantes de estas enfermedades, han mostrado resistencia a un elevado número de antibióticos, donde los extractos de *Moringa* podrían usarse para ser tratados. ¹³

El cultivo de células vegetales ha surgido como una alternativa para la obtención de metabolitos de alto valor agregado, producidos en las plantas en bajas concentraciones y para los cuales, no existen procesos de síntesis química conocidos, compuestos con dichas propiedades se encuentran los metabolitos secundarios extraídos de explantes de plantas y callos obtenidos in

vitro de plantas como lo han descrito en *Azadirachta indica* ¹⁴, *Aloe vera* ¹⁵, *Zea mays* ¹⁶, *Coffea arabica* ¹⁷ entre otros, observando elevadas actividades antimicrobianas. Siendo estas alternativas para las investigaciones recientes que llevan a cabo investigaciones de nuevos compuestos naturales de fácil obtención, económicamente accesibles con propiedades bactericidas, esto debido a la creciente demanda de búsqueda de nuevos tratamientos y desarrollo de nuevos antibióticos que hagan frente a la creciente resistencia de muchas cepas microbianas.

En este sentido, se han realizado extractos de *Moringa* a partir de semillas y hojas principalmente, así como de tallos y flores, obteniendo resultados satisfactorios en cuanto a la inhibición bacteriana, empleando callos de naturaleza no embriónica inducidos en cultivos *in vitro*, en el cual se puede realizar la extracción de metabolitos secundarios capaces de eliminar bacterias. Por ello, es necesario contar con métodos de propagación eficientes de *M.oleifera*, para obtener plantas élites ¹⁸ y a partir de estas producir metabolitos secundarios bajo condiciones controladas independientemente de los factores abióticos (sequía, radiación ultravioleta y altas temperaturas) y bióticos (patógenos y plagas), incrementando a su vez el rendimiento de metabolitos específicos ^{19,20,21}, principalmente como agentes antimicrobianos. ^{7,8,9}

Entre los microorganismos de interés clínico se encuentran *Enterobacter aerogenes* y *Proteus vulgaris*, bacilos Gram negativos y anaerobios facultativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Así, *E. aerogenes* no produce esporas y se asocia principalmente a infecciones relacionadas con la atención sanitaria, transmitidas tanto por alimentos como en el ámbito clínico. Es considerado un patógeno oportunista debido a que causa patologías cuando el huésped se encuentra inmunosuprimido; por ello, es relevante su investigación en relación con las infecciones alimentarias y nosocomiales, como las afecciones en diversos tejidos corporales ^{22,23}. Con respecto a *P. vulgaris*, se caracteriza por ser lactosa negativa, móvil y productora de fenilalanina desaminasa. Esta bacteria está presente en el tracto intestinal de diversos animales y puede causar infecciones en el tracto urinario, facilitadas por la presencia de lipoproteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos característicos en sus membranas celulares, los cuales promueven su adhesión a los tejidos del hospedador. ^{24,25}

Por otro lado, las diarreas son un cuadro clínico con una alta prevalencia de morbimortalidad, especialmente en grupos de riesgo como niños menores de cinco años e inmunodeprimidos ^{25,26}. Existe poca información sobre el rol de la patogenicidad que podría involucrar a la flora intestinal en ciertas condiciones para causar cuadros diarreicos. Estudios puntuales previos mencionan la presencia de *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* y *E. aerogenes* en los casos de diarrea aguda y persistente. ^{13,24,25}

En *Moringa oleifera* las investigaciones reportadas de actividad antimicrobiana se han realizado en su mayoría en tejidos foliares y semilla con un 60% y 20% respectivamente, a su vez en extractos de estos de tipo metanólico, acuoso, cloroformico, hexánicos, acetónicos, acetato de etilo, entre otros, inhibiendo bacterias como *Bacillus subtilis* ^{27,28},

Pseudomonas aeruginosa^{27,28}, *Staphylococcus aureus*^{27,28}, *Sarcina lutea*²⁸, *Klebsiella species*²⁸, *Shigella shiga*²⁸, *Salmonella typhi*²⁸, *P. fluorescens*²⁹, *Enterobacter cloacae*³⁰, *P. vulgaris*³¹ y en hongos como *Candida albicans*^{28,30}, *Aspergillus niger*²⁸, *A. flavus*^{28,30} y *A. fumigatus*²⁸. En extractos de callo de explantes foliares sobre *B. megaterium*, *S. aureus*, *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *P. vulgaris*, *M. kristinae* y *S. typhi*, así como también con disolventes como hexano, cloroformo, etil acetato, acetónico y metanol para extraer los metabolitos secundarios.^{27,31,32,33,34,35}

En cuanto al extracto etanólico mostraron una mejor respuesta contra bacterias como *Bacillus subtilis*, *S. aureus*³², *E. coli*³¹, *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*^{31,32} incluyendo un patógeno fúngico *Candida albicans*^{32,36}. Para hoja en *B. cereus*^{37,39}, *B. subtilis*³⁷, *B. megaterium*^{28,37}, *K. pneumoniae*^{33,37}, *P. vulgaris*^{31,36,37,39}, *E. coli*^{38,39,40,41,42,43}, *P. mirabilis*^{31,37,38}, *S. pullorum*³¹, *Sarcina lutea*³⁶, *Shigella shiga*³⁶, *S. sonnei*³⁷, *S. auerus*^{33,36,38,39,44,45}, *S. typhi*^{31,36,42}, *Streptococcus pyogenes*^{31,32}, *Enterococcus sp*³¹, *Vibrio parahaemolyticus*³⁹, *Enterococcus faecalis*³⁹ y *Yersinia enterocolitica*^{31,35}, así como para los hongos *A. flavus*³⁵, *C. albicans*³⁵ y *Pullarium sp*³⁵. Para extractos etanólicos de semilla mostró actividad en *E. aerogenes*³⁸, *B. cereus*³⁸, *E. faecalis*³⁸, *S. aureus*³⁰, *33,39,38,40,43,44*, *E. coli*^{33,35,36,37,39}, *P. mirabilis*³⁵, *K. pneumoniae*³⁵, *P. aeruginosa*^{31,35,36,44}, *P. fluorescens*³⁵, *Sarcina lutea*⁴⁰, *S. pullorum*^{31,35}, *S. typhi*^{35,40}, *Shigella shiga*³³, *S. sonnei*³³ y *Yersinia enterocolitica*³⁵, así como el crecimiento fúngico de *C. albicans*.^{35,42,46}

De esta manera, es importante tomar en cuenta el potencial intrínseco de la Moringa, no solo en lo alimenticio, sino también en lo médico-farmacéutico. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano de extractos, a partir de células indiferenciadas denominados callo, de naturaleza no embriogénica (NE), obtenidos en medios de cultivo in vitro con distintas combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP, de semilla de *Moringa oleifera*, como alternativas positivas y viables, inducidos rápidamente y con alta biomasa, con un alto rendimiento en la producción de metabolitos secundarios acoplado a la actividad antibacteriana en microorganismos de interés alimenticio y sanitario como *E. aerogenes* y *P. vulgaris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó un diseño de tipo experimental, evaluando el efecto antimicrobiano de extracto de callo no embriogénico inducidos en diferentes medios de cultivo, suplementados con diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4D y BAP.

Material Vegetal: Para la inducción del callo desarrollado por cultivo in vitro, se utilizó como explante semillas inmaduras de *M. oleifera* Lam, extraídas de vainas verdes, las cuales se colectaron de un ejemplar juvenil, de aproximadamente 3 metros, con condiciones fitosanitarias adecuadas, ubicado en el Municipio San Diego, Edo. Carabobo-Venezuela. A partir del mencionado explante, se indujo la formación de callo, tipo no embriogénico (NE), los cuales son masas de células no diferenciadas, de superficie rugosa y de

color amarillo o marrón, usados para evaluar la acción antimicrobiana por medio de extractos.

Desinfección: En condiciones de asepsia, bajo campana de flujo laminar horizontal, en agitación constante (100 rpm), se llevó a cabo la desinfección de las semillas, realizando 2 lavados de 2 min c/u con agua destilada estéril y detergente líquido comercial, luego se lavaron con alcohol isopropílico al 70% v/v durante 30 seg y con agua destilada estéril por 1 min, posteriormente se realizó otro lavado con cloro comercial NeveX® (3,5% v/v de hipoclorito de sodio) al 20% v/v y Tween 20 (1 gota/10 mL) durante 5 min. Adicionalmente, a fin de eliminar remanentes de cloro y etanol se hicieron 3 lavados con agua destilada estéril (1 min c/u), las semillas inmaduras se sumergieron luego en una solución de cisteína al 1% p/v en agua destilada estéril durante 30 min para reducir la oxidación del explante.⁴⁷

Cultivo in vitro de tejidos: Posterior al proceso de desinfección se procedió a extraer los embriones cigóticos, con bisturí estéril, retirando las alas de las semillas. Cuidando las condiciones de esterilidad, se sembraron en medios sólidos, medio MS (1962)⁴⁸ suplementado con las vitaminas tiamina-HCl (1 mg/L) y piridoxina (0,5 mg/L), los aminoácidos glicina (2 mg/L) y cisteína-L (100 mg/L), la sacarosa (azúcar de mesa) al 3% p/v, Agar Powder al 0,8% p/v y los reguladores del crecimiento 2,4-D y BAP, en 19 combinaciones inductoras (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos realizados para la inducción de callo en 19 combinaciones de hormona de 2,4 D con respecto a BAP para la evaluación antimicrobiana de los extractos.

Tratamiento	Inducción mg/dL	
	2,4 D	BAP
M1	0,3	0,5
M2	0,3	1,0
M3	0,5	0,5
M4	0,5	1,0
M5	1,0	0,5
M6	1,0	1,0
M7	1,5	0,5
M8	2,0	1,0
M9	2,0	0,5
M10	2,5	1,0
M11	2,5	0,5
M12	3,0	1,0
M13	3,0	0,5
M14	3,5	1,0
M15	3,5	0,5
M16	4,0	0,5
M17	4,0	1,0
M18	5,0	0,5
M19	10,0	1,0

Extracto (Secado y pulverización de callos): Ya obtenidos los callos NE, pasadas las 8 semanas de inducción, se procedió al secado, en estufa 55°C durante 24h. Posteriormente, bajo campana de flujo laminar horizontal,

se procedió a moler los callos para cada tratamiento, hasta obtener polvo fino.³³

Extracción de metabolitos secundarios con etanol: Para cada tratamiento de inducción de callo, se pesó 0,5 g de polvo de callo no embriogénico y se colocaron en tubos de centrifuga 5 mL, usando como solvente orgánico etanol al 70% (5 mL de etanol por cada 0,5 g de cada pulverizado para una concentración final de 10% p/v). Para facilitar la interacción del solvente orgánico con el polvo del callo, los tubos se mantuvieron durante 48 h en agitación (basculante) continua a 65 rpm. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a fin de separar la fase líquida (sobrenadante) de la biomasa correspondiente. La fase líquida se trasvasó a unos tubos de Eppendorf (≈ 2 mL) que fueron incubados a 70 °C para la evaporación del solvente durante 3 horas. La muestra obtenida (≈ 1 mL) se resuspendió en DMSO al 0,25% y se preservó hasta su uso, siendo esta la solución madre o se consideró el 100%. A partir de esta solución madre de los extractos de callos se realizaron diluciones (5%, 7%, 10%, 15%, 20% y 25%) para la evaluación de la actividad antimicrobiana.^{10,33,49}

Preparación de medios para evaluación bacteriológica: Para la evaluación de la acción antimicrobiana de los extractos orgánicos sobre las bacterias *E. aerogenes* y *P. vulgaris* se llevó a cabo la técnica de microdilución. Para su realización se prepararon los medios para la reproducción de las bacterias, el medio el cual constituyó de caldo nutriente y agar bacteriológico. Se activaron las cepas aisladas de *P. vulgaris* y *E. aerogenes* resuspendiendo en caldo puro (caldo nutriente) incubando durante 24 horas a 37° C. Transcurrido el tiempo indicado se elaboró el inóculo equivalente al patrón de 0,5 de la escala de McFarland como lectura (en espectrofotómetro a 540 nm) 0.100 ± 2 DO que representa $1,5 \times 10^8$ células/mL, para la posterior evaluación antimicrobiana.¹⁴

Proceso de microdilución para la determinación de la actividad antimicrobiana: Para cada tratamiento (M1 a M19) se llevó a cabo el proceso de microdilución. Utilizando microplacas estériles de 96 pocillos de 375 μ L, bajo campana de flujo laminar horizontal, se colocaron 60 μ L de caldo estéril en todos los pocillos, junto con 20 μ L de inóculo bacteriano (excepto en el control negativo), se llevaron a cabo diferentes volúmenes del extracto (para cada tratamiento), de esta forma lograr las siguientes concentraciones: 5% (40 μ L), 7% (56 μ L), 10% (80 μ L), 15% (120 μ L), 20% (160 μ L) y 25 (200 μ L). Para los controles se tomó lo siguiente: a) control negativo, se usó 100 μ L de extracto puro, para determinar la presencia de microorganismos contaminantes, b) control positivo, constituyó del medio de cultivo con la cepa pura sin extracto, este se utilizó para verificar la viabilidad celular. Lo anteriormente mencionado, se incubó por 24 h a 37°C.

Para constatar el crecimiento o no de microorganismos, se realizó una prueba cualitativa que constó de la turbidez del medio, empleando un asa de platino calibrada, se inoculó 10 μ L de cada tratamiento en tubos de ensayos con 1 mL de caldo de cultivo. A su vez se realizó pruebas cuantitativas inoculando 50 μ L de cada tratamiento en las placas con agar nutriente, utilizando la técnica de siembra en superficie con la espátula de Drigalski. Incubándolos por 24 h a 37°C.

Transcurrido el tiempo se evaluó el número de unidades formadoras de colonia (UFC), así como la turbidez de cada uno de los tubos, estableciéndose para las 2 cepas bacterianas con el extracto por cada tratamiento (M1-M19) determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) que determina el efecto bacteriostático y la concentración mínima bactericida (CMB).^{50,51,52,53}

Evaluación de pureza de los cultivos: Además de los controles positivos y negativos de las microdilución, también se efectuaron evaluaciones microscópicas de las cepas, con el fin de comprobar la pureza de los cultivos entre ellas tinción Gram y pruebas bioquímicas respectivas a cada cepa.

Con respecto a las concentraciones finales de los extractos de cada tratamiento (M1-M19), se comprobaron que estos no tuviesen actividad antimicrobiana, es decir, que no existiese posibles excedentes del etanol y que estos habían sido totalmente evaporados, en el proceso de obtención de la solución madre del extracto puro (100%), que no tuviese dicho efecto antimicrobiano. Adicionalmente, se efectuaron ensayos con diluciones de una solución sin polvo de callo NE de *M. oleifera*, evidenciándose crecimiento microbiano de todas las cepas y en las concentraciones.

Evaluación de la acción antimicrobiana de los extractos etanólicos sobre *Enterobacter aerogenes* y *Proteus vulgaris*: Para determinar las diferencias entre extractos, el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) corresponde a la evaluación cuantitativa, en función de cada extracto etanólico (M1-M19). Así, pues se realizaron cinco réplicas para cada tratamiento, con el objetivo de tener repetibilidad de los resultados. Se utilizó una prueba de ANOVA de dos vías, para evaluar las diferencias entre los tratamientos aplicados en función de sus efectos sobre las cepas y extracto y una prueba de Tukey para evaluar cuál extracto es diferente otro. Estas pruebas se realizaron usando el paquete estadístico PAST 3.11, 2016.

RESULTADOS

La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de callo no embriogénico (NE) en función de la cepa del microorganismo, tanto en el medio líquido como en el sólido incubadas a las 24 horas, mostraron una respuesta diferencialmente significativa, donde pareciesen tener una mejor respuesta inhibitoria en *P. vulgaris* que en *E. aerogenes* (Figura 1). Sin embargo, en ambos hubo la misma respuesta inhibitoria, al lograrse observar la disminución en el número de UFC a medida que aumenta la concentración del extracto (Figura 2), obtenido en todas las combinaciones de reguladores de crecimiento en la inducción de callo (M1-M19) (Tabla1). La CMI se consideró como la menor concentración del extracto de *M. oleifera* capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos de prueba después de 24 horas. De manera general la mayoría de los extractos de cada tratamiento presentaron efecto antimicrobiano en las concentraciones, desde el 7% en algunas y a partir de 10 y 15% en la mayoría, coincidiendo con el análisis de ANOVA de dos vías realizadas, tanto en *P. vulgaris* como para *E. aerogenes*, observándose una inhibición del crecimiento en ambas cepas en cada uno de los extractos (Figura 2).

Sin embargo, al comparar los extractos con la prueba de Tukey, no se percibe una diferencia entre extractos con 0,5 y 1 mg/L de BAP. No obstante, en *P. vulgaris* los extractos obtenidos de callo inducido con 2,5 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP (M11 y M12) y en *E. aerogenes* con los extractos de callo inducidos en 0,3 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP (M1 y M2) y 1,5 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP (M7 y M8), mostraron diferencias significativas. Asimismo, en ambas bacterias los extractos obtenidos de callo NE de medios de inducción con mayores concentraciones de la auxina 2,4-D (M18: 5 mg/L; M19: 10 mg/L) fueron significativamente diferentes y más eficientes en el efecto antimicrobiano (Figura 1).

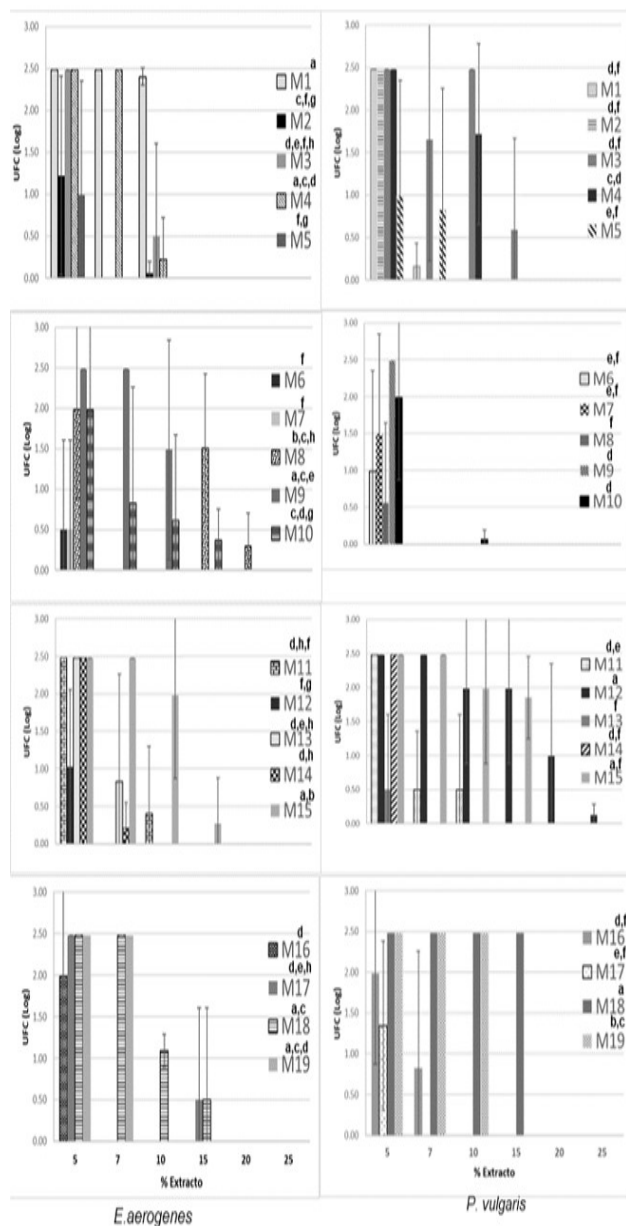


Figura 1. Efecto de la concentración del extracto sobre el crecimiento de *E. aerogenes* y de *P. vulgaris*, 5% (50 mg/mL), 10% (100 mg/mL), 15% (150 mg/mL) y 20% (200 mg/mL). Los tratamientos fueron divididos en grupos: tres grupos de 5 y uno de 4 para facilitar la evaluación del comportamiento del efecto antimicrobiano por los tratamientos. Las barras en las cajas representan el error estándar. Las letras son las diferencias significativas: letras iguales no hay diferencias significativas, mientras que letras diferentes si las hay.

La tendencia general observada, fue que a medida que aumentaba la concentración del extracto etanólico (5-25%), se inhibía el crecimiento de *E. aerogenes*, siendo el extracto de 5% el menos efectivo, mientras que 20% y 25% fueron los más efectivos para contrarrestar el crecimiento bacteriano (CB). Por lo tanto, cuando se evaluó la efectividad de los extractos en la inhibición del crecimiento de *E. aerogenes*, dentro de cada extracto en función del medio de inducción de callo NE (Tabla 1), las tendencias observadas fueron que el extracto 10% no tiende a mostrar diferencias significativas con 5% que es el menos efectivo, aunque tampoco con los otros de 15% (Figura 1).

La poca diferencia de los resultados entre extractos al 5% y 10% en cuanto a la actividad antimicrobiana, contrasta con la evidente efectividad inhibitoria evidenciadas al observar los resultados con extractos al 10 y 15%. Así en *P. vulgaris*, se obtuvo similar respuesta inhibitoria en los tratamientos de inducción con 1 mg/L de 2,4-D con 0,5 mg/L y 1 mg/L de BAP (M5, M6) y con 1 mg/L de 2,4-D con 0,5 mg/L de BAP (M7), donde en el 7% hubo total actividad inhibitoria (Figura 1).

En el caso de *E. aerogenes*, el extracto 5, 7 y 10% parecen no ser efectivo, siendo los mejores el de 25% seguido del de 20% y 15%. Los tratamientos de inducción que tuvieron mejor respuesta (CMB) fueron 0,3 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP (M1, M2), 1 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP (M5, M6), 1,5 mg/L de 2,4-D con 0,5 mg/L de BAP (M7), 2,5 mg/L de 2,4-D con 1 mg/L de BAP (M12), 4 mg/L de 2,4-D con 0,5 mg/L de BAP (M16) y 10 mg/L de 2,4-D con 1 mg/L de BAP (M19) (Figura 1).

En cuanto a la evaluación antimicrobiana para *P. vulgaris*, (Figura 1) se verán diferentes letras, que representan las diferencias significativas entre los extractos dentro de cada tratamiento de inducción (Tabla 1). Cabe destacar que a medida que aumenta las concentraciones dentro de los tratamientos la respuesta inhibitoria es menor, es decir, a mayores concentraciones de combinación de 2,4 D con BAP, las actividades antimicrobianas de los extractos de estos son ineficientes, tales como el M18 (5 mg/L de 2,4-D con 1 mg/L de BAP) y M19 (10 mg/L de 2,4-D con 1 mg/L de BAP).

Al evaluar la efectividad de los extractos en la inhibición del crecimiento de *P. vulgaris* dentro de cada tratamiento de inducción (Tabla 1), se observaron algunas diferencias significativas entre ellos (Tukey $p < 0,06$). Sin embargo, de manera general, no hubo diferencias significativas del extracto al 5% con el resto de los extractos, siendo este el menos efectivo en todas las combinaciones de reguladores de crecimiento. De esta manera, a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico se inhibe el crecimiento de *P. vulgaris* (Figura 1), observándose una actividad inhibitoria efectiva, así como también actividad bacteriostática con una muy baja frecuencia en los tratamientos al 10%.

Para extracto al 5% hubo crecimiento en todos los tratamientos de inducción de callo NE (Tabla 1), no mostrando diferencias significativas entre los tratamientos

siendo tan efectiva como las demás concentraciones de los tratamientos. De manera que, a mayores concentraciones del extracto (15, 20 y 25%), donde hubo poco o nulo crecimiento bacteriano, evidenciándose las mejores respuestas inhibitorias (Figura 2).

De tal manera, que de los 19 tratamientos inductores de callo NE, 12 mostraron actividad inhibitoria a partir del 10%, donde 5 de estos tratamientos las CMI fueron al 5% y 7% a diferencia de *E. aerogenes*, obteniendo así, actividades apropiadas en cuanto a su efectividad para inhibir el CB, los cuales fueron 1 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP (M5 y M6), 1,5 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP (M7 y M8), 3 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP (M13 y M14) y 4 mg/L de 2,4-D con 1 mg/L de BAP (M17). Por otra parte, se evidenció con 2,5 mg/L de 2,4-D con 1 mg/L de BAP (M12) una actividad bacteriostática donde se apreció crecimiento de bacterias, siendo está concentración la menos efectiva para esta cepa (Figura 2).

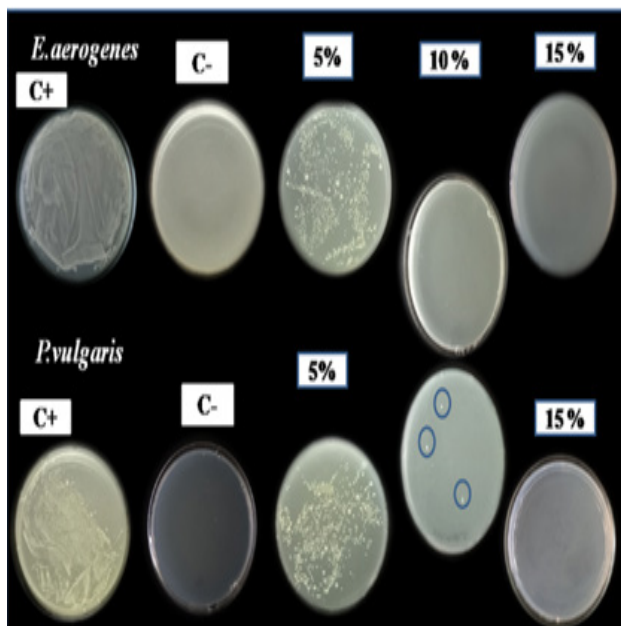


Figura 2. Representación general de la acción del extracto etanólico sobre el crecimiento de *E. aerogenes* y *P. vulgaris*. Control positivo (C+), controles negativos de cada extracto (C-). Extracto 5% (50 mg/mL), extracto 10% (100 mg/mL), extracto 15% (150 mg/mL). El extracto 20% (200 mg/mL) y 25% (250 mg/mL).

DISCUSIÓN

Recientemente, los cultivos celulares se han utilizado para la producción de varios grupos de metabolitos secundarios. La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar) ⁵³. A través del método de microdilución se evidenció la disminución en número de UFC en las cepas de *E. aerogenes* y *P. vulgaris* tanto en medio sólido como líquido con la adición del extracto realizado con el solvente orgánico utilizado el cual fue el etanólico.

En este estudio el extracto de etanol de callo NE, presentó una gran efectividad debido a que se observó actividades tanto bactericida como bacteriostática en las cepas evaluadas, logrando un efecto antimicrobiano total a partir del 10% (100 mg/mL), evidenciándose un efecto bactericida a mayores concentraciones, independientemente del tratamiento inductor. Esta concentración es inferior a la referida por otros investigadores, utilizando el método de difusión en agar pasadas las 24 h de cultivo de semillas ⁴², donde reportan CMI de 150 mg/L, 200 mg/L y 400 mg/L para el extracto etanólico de semillas de *M. oleifera* ^{32,38} mostrando una alta actividad inhibitorias y antagónicas contra *E. aerogenes* a 150 mg/mL y 200 mg/mL. Otros investigadores han hecho mención que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 200 mg/mL para etanol y 400 mg/mL para el extracto acuoso. ^{28,30,31,40,43,44,54,55,56,57}

De la misma manera han hecho referencia de que el extracto de etanol de *M. oleifera* tiene una fuerte actividad antimicrobiana y un efecto inhibitor, por ejemplo, en *P. vulgaris* donde en 20 % y 40% si demostró serlo, mientras que en 5% y 10% no fue inhibitor ³². En definitiva y acorde a estudios previos citados, el resultado de este estudio demostró que *M. oleifera* es una fuente potencial de agentes antimicrobianos contra algunas bacterias patógenas, en este caso de interés clínico.

Con relación a esto, los ensayos de evaluación antimicrobiana de extractos de Moringa, se han realizado a partir de tejidos foliares y/o de semillas secadas y molidas, así como con el método de difusión en discos ^{51,57}, sin inducir callos o inducirlos a partir de estos, encontrándose diferentes resultados en función del tipo órgano vegetal y solvente de extracción ^{28,30,40,41,43,44, 54}, siendo esta investigación pionera al emplear callo de naturaleza no embriogénica crecidas en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (0,3; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 10 mg/L de 2,4 D con respecto a 0,5 y 1 mg/L de BAP) como material para la obtención del extracto para la evaluación antimicrobiana sobre cepas como *E. aerogenes* y *P. vulgaris*.

Es importante reafirmar que la mayoría de los estudios se han realizado con extractos obtenidos a partir de hojas, flores, semillas y tallo de *M. oleifera*, usando solventes orgánicos como el etanol, acetona ⁵⁸, cloroformo ^{59,60,61}, alcohol, metanol, diclorometanol, hexánicos ^{62,63}, tal como se menciona en la literatura citada en dicha investigación., la mayoría se ha realizado a partir de hojas ^{32,34,35}, seguidas de semillas ^{35,36,63}, flores ⁴⁶, frutos ^{36,64}, y actualmente de callos obtenidos *in vitro* ^{46,65}. Además de ser los solventes más utilizados para la extracción de metabolitos secundarios, las investigaciones señalan la mayor efectividad comparando un solvente u otro ⁶⁴, siendo el etanol y el metanol los más comunes y los más efectivos, ya que diversos autores califican el extracto etanólico como el que posee una mayor capacidad para extraer metabolitos con acción antimicrobiana, como se reporta en el presente trabajo, el cual presentó un gran efecto en las dos bacterias estudiadas.

Sin embargo, el uso de callo que son masas de células indiferenciadas inducidas *in vitro*, provee rápidamente material para la obtención de extractos con un alto rendimiento de metabolitos secundarios antimicrobianos,

independientemente de las condiciones agroecológicas y estacionales del cultivo ⁶⁶. En este sentido, el uso de extractos etanólicos de callo NE de explantes foliares *Moringa oleifera*, inducidos con 1 mg/L de 2,4-D con 2 mg/L de BAP, ejerció un efecto bactericida al 10% con *P. aeruginosa* y *E. coli*, 25% en *S. aureus*, mientras que el efecto fungicida en *C. albicans*, fue al 10%. ⁶⁷

Por otro lado, no han establecido, ni encontrado diferencias significativas entre el tipo de extracto, concentración y efecto sobre la cepa a estudiar, por ello en este estudio se analizaron los resultados a través de las pruebas estadísticas mencionadas. Los reguladores del crecimiento también pueden influir en el contenido en fenoles y, por tanto, probablemente en la actividad antibacteriana de los extractos. Por otra parte, no sólo es la naturaleza del solvente, sino también se deben a las propiedades de la *Moringa* de acuerdo a sus respuestas antimicrobianas, pues son numerosos los metabolitos secundarios en la semilla de *M. oleifera* que son extraídos y que poseen efectos inhibitorios sobre el crecimiento, resistencia y actividad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. ³⁷

Ahora bien, es importante señalar que los microorganismos pueden desarrollar paralelamente otros mecanismos de resistencia como la producción de β -lactamasas y de esta manera alcanzar niveles de resistencia que suelen ser clínicamente relevantes ⁶⁸. En estas cepas la actividad β -lactamasa y pérdida de porinas (OmpF) son factores que contribuyen a las resistencias, pero no son mecanismos suficientes para explicar el fenotipo de resistencia. ⁶⁹

En cuanto a la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas se tiene que la inhibición de enzimas por los compuestos fenólicos, provocan la interrupción de la producción de energía en la membrana plasmática de estas bacterias ⁶⁸, pues como bien se conoce que la presencia de la membrana de lipopolisacáridos en dichas bacterias la hace impermeables a moléculas exógenas. ^{70,71}

En relación a los mecanismos de resistencias, estudios hacen mención que los genes *ampC* han sido descubiertos en plásmidos de varias especies de *Enterobacteriaceae* ⁷¹. Estos genes *ampC* son probablemente derivados de genes cromosómicos *ampC* de *C. freundii*, *E. cloacae* y *M. morganii*, aislamiento de estos, se han visto que producen grandes cantidades de β -lactamasa AmpC, confiriendo resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido, cefamicinas, penicilinas y combinaciones de inhibidores de β -lactamasas. ^{72,73,74,75,76}

Actualmente la producción de enzimas constituye el principal mecanismo de resistencia a los β -lactámicos, sobre todo en las bacterias Gram negativas, particularmente en la familia *Enterobacteriaceae* y pueden ser de codificación cromosómica o plasmídica ⁷⁴ y producen generalmente niveles insignificantes de esta enzima. Sin embargo, a pesar de ello contribuyen a la resistencia intrínseca de estas especies ^{74,75,76}, si bien los incrementos en la resistencia a β -lactámicos por alteración en la permeabilidad suelen ser moderados.

Sin duda alguna conocer estos mecanismos a futuro sirven de orientación para futuras investigaciones en la evaluación de extractos ya sea a partir de explantes o callos NE in vitro ^{76,77,78,79,80}. Todo ello es de crucial importancia porque muchos microorganismos representan un problema para la salud pública, tanto por el aumento de los costos del tratamiento, como por el grado de las complicaciones infecciosas y la resistencia de los patógenos a los antibióticos como es el caso de las bacterias mencionadas anteriormente

De tal manera se ha afirmado que *Moringa oleifera* posee un porcentaje de inhibición de crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas de 85% ⁷⁷. Asimismo, se ha demostrado que el extracto de semillas posee aún mayor poder bactericida por la presencia de proteínas catiónicas de bajo peso molecular (MOCP) evidenciando que 10 mL del extracto al 5% lentifica a nivel máximo el crecimiento bacteriano ^{81,82}, aunado que en otros estudios in vitro se indicó actividad antimicrobiana con poder bactericida con los extractos etanólicos y metanólicos de semillas de *Moringa* sobre especies patógenas, tales como *S. aureus*, *E. coli* y *V. cholerae* ^{78,79}. A su vez observó que la formación de biofilms de *S. aureus* y *P. aeruginosa* había sido inhibido hasta en un 83%, al enfrentarse a flavonoides extraídos de semillas de *M. oleifera*. ^{77,78,79}

Adicionalmente, la actividad antimicrobiana de los extractos está relacionada a los solventes orgánicos de los mismos, por lo cual, es probable que se deba a flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas extraídos con solventes de alta polaridad, como etanol, metanol o agua ⁸³. En este sentido, los extractos etanólicos de *Moringa* en este estudio fueron de color café claro, color atribuido principalmente a compuestos tipo flavonoide. ^{84,85}

Por lo tanto, la respuesta encontrada en este trabajo para ambas bacterias Gram negativas, se debió probablemente a la presencia de los metabolitos similares en los extractos, asumiendo la ausencia de mecanismos únicos que caractericen a la especie para la defensa contra metabolitos de origen externo, sugiriendo que los principios activos extraídos con etanol del callo no embrionario derivado de semillas, pueden jugar un rol significativo en la acción inhibitoria contra bacterias clínicamente importantes.

CONCLUSIONES

Al evaluar la acción antibacteriana de los extractos etanólicos de callos no embrionarios de *Moringa oleifera* inducidos con distintas combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP, en *E. aerogenes* y *P. vulgaris* mediante la técnica de microdilución, se determinó que a 5% del extracto de callo derivado de cualquier combinación inductora, se muestra un claro efecto inhibitorio, siendo más efectiva la actividad antibacteriana en cualquier concentración de los extractos (5, 10, 15, 20 y 25%) en *P. vulgaris*, coincidiendo la mayor actividad inhibitoria en ambas cepas bacterianas con los medios de inducción suplementados con 1 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP y 1,5 mg/L de 2,4-D con 0,5 mg/L de BAP. Sin embargo, para *P. vulgaris*, independientemente de la concentración del extracto, la mejor respuesta inhibitoria se logró principalmente con la inducción con 0,3 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP, 1 mg/L de 2,4-D con 0,5

mg/L de BAP, 1,5 y mg/L de 2,4-D con 0,5 mg/L de BAP, 1,5 y mg/L de 2,4-D con 1 mg/L de BAP, 3 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP y por último con 4 mg/L de 2,4-D con 0,5 y 1 mg/L de BAP. Finalmente, a partir de 10% del extracto etanólico de cualquier medio de inducción, se observa el efecto bactericida. Por lo tanto, recomendamos continuar con las evaluaciones antimicrobianas con los extractos de callo no embriogénico más efectivos en otras bacterias Gram positivas y Gram negativas, a fin de plantear posibles alternativas naturales para afecciones ocasionadas por dichos microorganismos y otras cepas con alta resistencia microbiana.

Agradecimiento: Al personal asistente del Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo (Naguanagua-Edo. Carabobo).

REFERENCIAS

1. Gaynes R. The discovery of penicilline - New insights after more than 75 years of clinical C use. *Emerging Infectious Disease*. 2017; 23(5): 849-852. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2305.161556>
2. Martín C, Martín G, García A, Fernández T, Hernández E, Puls J. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*. 2013; 36(2):137-149. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2691/269129327001.pdf>
3. Razis A, Ibrahim M, Kntayya S. Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific J Cancer Prevention*. 2014; 15:8571-8576. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.20.8571>
4. Cannet R, Arvayo K, Ruvalcaba V. Aspectos tóxicos más relevantes de *Moringa oleifera* y sus posibles daños. *Biocencia*. 2014; 16(2): 36-43. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i2.45>
5. Fahey J. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. *J Trees for Life*. 2005; 1:5. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420039078.ch12>
6. Mahajan S, Mehta A. Effect of *M. oleifera* Lam. seed extract on ovalbumin induced air way inflammation in guinea pigs. *Inhalation Toxicology*. 2008; 20(10):897- 909. <https://doi.org/10.1080/08958370802027443>
7. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Bertoli J. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *Int J Mol Sci*. 2015;16: 12791-12835. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160612791>
8. Spandana U, Srikanth J, Gopi J, Ashok V. A review on miracle tree: *Moringa oleifera*. *J Pharmacogn Phytochem*. 2016; 5(6): 189-191. <https://doi.org/10.5958/0975-4385.2018.00016.X>
9. Alarcón M, Fernández R, Reyes D. *Moringa oleifera*: potenciales usos en odontología. *Rev Salus UC*. 2017; 21(2): 28-34. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/3759/375953625007/html/>
10. Mukesh R, Manohar Y. Comparative antimicrobial activities of neem and curry leaf extracts and their synergist effect against selected pathogenic bacteria and fungus. *Int Res J Pharm*. 2015; 6(11): 755-759. <http://dx.doi.org/10.7897/2230-8407.0611147>
11. Abdallah E. Antibacterial properties of leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. Growing in Sudan. *J Adv Med & Pharma Sci*. 2016; 5(1): 1-5. <http://dx.doi.org/10.9734/JAMPS/2016/21386>
12. Falaise C, Franis C, Travers M, Morga B, Haure J, Tremblay R, Turcotte F, Pasetto P, Gastineau R, Hardivillier Y, Leignel V, Mouget J. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*. 2016; 14(159):2-27. <https://doi.org/10.3390/md14090159>
13. Böhles N, Busch K, Hensel M. Vaccines against human diarrheal pathogens: Current status and perspectives. *Human Vaccin Immunother*. 2014;10(6): 1522-35. <http://dx.doi.org/10.4161/hv.29241>
14. Fernández R, Salomón J, Reyes R. Efecto antibacteriano de hojas y callo de *Azadirachta indica* A. Jussen microorganismos de interés alimentario. *Rev Salus UC*. 2020; 24(2):27-34. Disponible en: <https://servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/vol24n2/art04.pdf>
15. Reyes R, Fernández R. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto foliar de zabala (*Aloe vera* L.) en microorganismos de interés clínico. *Rev Salus UC*. 2014; 18(3):27-32. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382014000300006
16. Díaz O, Hernández Y, Flores C. Aislamiento y caracterización de bacterias antagonistas y sus metabolitos para el control de *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Rev Fac Agro*. 2020; 43(3):, 77-87. https://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_agro/article/view/17325
17. Suárez S, Alfaro E, Ramírez E. Actividad antioxidante, polifenoles y flavonoides de *Coffea arabica* de cinco regiones peruanas. *Rev Soc Química Perú*, 2020; 86(4), 343-354. <http://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v86i4.307>
18. Devendra B, Prasad V, Sriniva N. Callus induction and somatic embryogenesis of *Moringa oleifera* Lam an anti-radiation plant. *J Agric Tech*. 2012; 8(6): 1953-1963. Available online <http://www.ijat-aatsea.com>
19. Olson M, Fahey J. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Rev Mex Biod*. 2011;82(4): 1071-82. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532011000400001
20. Pérez C. Trabajo de Fin de Carrera: *Moringa oleifera* Lam., especie forestal de usos múltiples. Revisión bibliográfica. E.U.I.T. Forestal (U.P.M.). Madrid. 2012.
21. Gupta S, Jain R, Kachhwaha S, Kothari S. Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* lam. review of current status and future possibilities. *J Herbal Med*. 2018; 11:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.07.003>
22. Davin A, Pagès J. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol*. 2015; 6:392. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>
23. Colquechagua F, Sevilla C, Gonzales E. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Rev Perú Med Exp Skud Pública*. 2015; 32(1):26-32. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2015.321.1571>
24. Albert B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). New York: Garland Science. 2015; 1263- 1292 pp.

25. Mohammed G, Kadhim M, Hameed I. *Proteus* species: Characterization and Herbal Antibacterial: A Review. *Int J Pharmacognosy*. 2016; 8(11): 1844-1854. Available online on www.ijppr.com
26. OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. 2017. [Consultado en Septiembre 24, 2021] disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
27. Dewangan G, Koley K, Vadlamudi V, Mishra A, Poddar A, Hirpurkar D. Antibacterial activity of *Moringa Oleifera* (drumstick) root bark. *J Chem Pharm Res*. 2010; 2(6):424-428. Available on line www.jocpr.com
28. Nikkon F, Saud Z, Rahman M, Haque E. In vitro antimicrobial activity of the compound isolated from chloroform extract of *Moringa oleifera* Lam. *Pak J Bio Sci*. 2003; 6(22):188-1890. <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2003.1888.1890>.
29. Zaffer M, Ahmad A, Sharma R, Mahajan S, Gupta A, Kumar R. Antibacterial activity of bark extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some selected bacteria. *Pak J Pharm Sci*. 2014; 27(6):1857-1862. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25362592/>
30. Abo S, Abd-Alaziz M, Al-Zohairy A, Abo Z. Antimicrobial activity of methanolic extracts of leaves and seeds of three *Moringa* species grown in Egypt against some human pathogens. *N. Egypt J Microbiol*. 2017; 46:112-123. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/320962128>
31. Oluduro A. Evaluation of Antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. Leaf in South-Western Nigeria. *Malaysian J Microbiol*. 2012; 8(2):59-67. <http://dx.doi.org/10.21161/mjmm.02912>
32. Alozie Y, Sonye C. Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* Leaf against Isolates of Beef Offal. *British Microbiol Res J*. 2015; 9(2): 1-7. <http://dx.doi.org/10.9734/BMRJ/2015/17554>
33. Kala S, Vijayalakshmi M, Khalivulla S, Mallikarjuna K. Phytochemical and antimicrobial analysis of callus extracts of *Biophytum sensitivum* (Linn) DC. *British Microbiol Res J*. 2014; 4(8): 869-884. <http://dx.doi.org/10.9734/BMRJ/2014/7270>
34. Moyo B, Masika P, Muchenje V. Paper Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. *Afri J Biotechnol*. 2012; 11(11):2797-2802. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.686>
35. Pavithra I, Macdonnell P, Van Vuuren S, Cock I. Interactive antibacterial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts and conventional antibiotics against bacterial triggers of some autoimmune inflammatory diseases. *South Afr J Bot*. 2019; 124: 420-435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.008>
36. Arora D, Onsare J. Antimicrobial Potential of *Moringa oleifera* Seed Coat and Its Bioactive Phytoconstituents. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2014; 42(2):152-161. <http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1402.02003>
37. Rahman M, Islam M, Akhtar S, Islam M, Rahman M, Rahman M, Alam M. Antibacterial Activity of Leaf juice and extracts of *Moringa oleifera* Lam. against Some Human Pathogenic Bacteria. *CMU J Nat Sci*. 2009; 8(2):219-227. Disponible en: <https://cmuj.cmu.ac.th/nlsc/journal/article/449>
38. Fowoyo P, Oladoja E. Phytochemical Screening, Nutritional Composition and Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* Seed and Leaf Extract against Selected Gastrointestinal Pathogens. *J Pharma & Biological Sci*. 2015; 10(6):116-124. <http://dx.doi.org/10.9790/3008-1062116124>
39. Peixoto J, Silva G, Costa A, Vieira G, Fonteles A, dos Fernandes, R. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. *Asian Pacific J Trop Med*. 2011; 4(3):201-204. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60069-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60069-2)
40. Llanko P, McDonnell P, van Vuuren S, Cock I. Interactive antibacterial profile of *Moringa oleifera* Lam. Extracts conventional and conventional antibiotics against bacterial triggers of some autoimmune inflammatory diseases. *S Afri J Bot*. 2019; 124:420-435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.008>
41. Singh K, Tafida G. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* (Lam) leaves extracts against some selected bacteria. *Int J Pharm Pharm*. 2014; 6(9):52-54. Disponible en: <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ijpps/article/view/3198/9898>
42. Emmanuel S, Olajide O, Abubakar S, Idowu I, Orishadipe, A, Thomas, S. Phytochemical and antimicrobial studies of methanol, ethyl acetate, and aqueous extracts of *Moringa oleifera* seeds. *Am J Ethnomed*. 2014; 1(5):346-354. Disponible en: <https://indianmedicine.eldoc.ub.rug.nl/72698/>
43. Dave K, Shah H, Patel K. Antibacterial activity and phytochemical analysis of methanolic and acetonitrile extracts from *Moringa oleifera*, *Vitex negundo* and *Rosa indica*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2018; 7(7):3718-3727. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.430>
44. Sunartia S, Lahaya N, Fadhlirrahman M, Gondipon, R. Antibacterial Activity *Moringa oleifera* Leaf and red Ginger extract as natural feed additive. *Natural Feed Additive*. Hasanuddin J Anim Sci. 2022; 4(1):58-67. <http://dx.doi.org/10.20956/hajas.v4i1.20042>
45. Pal S, Mukherjee P, Saha K, Pal M, Saha, B. Antimicrobial action of the leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. *Ancient Sci Life*. 1995; 14(3):197-199. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3331240/>
46. Talreja T. Screening of crude extract of flavonoids of *Moringa oleifera* against bacterial and fungal pathogen. *J Phyto*. 2010; 2(11):31-35. Retrieved from <https://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/view/2206>
47. Artigas D, Fernández R. Establecimiento del sistema de regeneración por embriogénesis somática de *Azadirachta indica* A. Juss. *Acta biológica colombiana*. 2015; 20(2): 73-83. Disponible: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319046907012.pdf>
48. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*. 1962; 15(3): 473-497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
49. Reyes L. Identificación de metabolitos de *Bougainvillea glabra* variedad Variegata y su efecto contra *Sodoptera frugiperda* J.E Smith. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. España. 2015; 115 pp.
50. Reyes D, Ortega D, Quintero J, Piquer S, Alarcón M, Fernández R. Efecto antimicrobiano del extracto foliar de mango (*Mangifera indica* L. cv. Bocado) en microorganismos de interés clínico. *Rev Salus UC*. 2017; 21(2):7-13. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3759/375953625003.pdf>
51. Sánchez C, Delgado S. Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (Ortiga, ajenojo, malva olorosa). Tesis de pregrado. Universidad de Cuenca. España. 2010; 65pp.

52. Reyes R, Fernández R. Efecto biocida in vitro del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus* sp y *Pseudomonas* sp. *Rev Salus UC*. 2013; 17(3):27-32. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382013000300006
53. Miller L, Rittenhouse S, Utrup L, Poupard J. Comparison of three methods of determination of a single MIC of an antimicrobial agent. *Journal Clinical Microbiology*. 1994;32: 1373-1375. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.5.1373-1375.1994>
54. Vieira G, Mourão J, Angelo A, Costa R, Vieira R. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Rev Inst Med Trop*. 2010; 52(3):129-132. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652010000300003>
55. Nugraha A, Niken A, Kadarwenny C, Pratoko D, Triatmoko B, Rosyidi V, Norcahyanti I, Dewi I, Dianasari D, Sary I, Wangchuk P. Phytochemical screening and the antimicrobial and antioxidant activities of medicinal plants of Meru Betiri National Park-Indonesia. *J Herbs Spices Med Plants*. 2020; 26(3):1-13. <http://dx.doi.org/10.1080/10496475.2020.1734136>
56. Swati S, Kaur A, Kumari C, Ali A, Garg P, Thakur P, Attri C, kulshrestha S. *Moringa oleifera* – a never die three: an overview. *Asian J Pharm Clin Res*. 2018; 11(12):57-65. <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i12.28049>
57. Streeter K, Katouli M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infect Epidemiol Med*. 2016; 2(1):25-32. <http://dx.doi.org/10.18869/modares.iem.2.1.25>
58. Savita S, Preeti S. Evaluation of antibacterial and antimutagenic potential of *Acokanthera oppositifolia* and *Leucaena leucocephala*. *Am J Pharm & Health Res*. 2015;(3), 1. Disponible en: <https://ajphr.com/articles/AJPHR301019>
59. Bukar A, Uba A, Oyeyi T. Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts against some food – borne microorganisms. *Bajopas*. 2010;3(1): 43-8. <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v3i1.58706>
60. Dalukdeniya D, De Silva K, Rathnayaka R. Antimicrobial activity of different extracts of leaves bark and roots of *Moringa oleifera* (Lam). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2016;5(7): 687-691. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.507.078>
61. Kheir SM, Kafi SK, Elbir H. The antimicrobial activity and phytochemical characteristic of *Moringa oleifera* seeds, leaves, and flowers [Internet]. *World J Pharm Res*. 2014; 4(1): 258-271. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/270963263>
62. Aderibigbe S, A, Adentunji O, Odeniyi M. Antimicrobial and pharmaceutical properties of the seed oil of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leguminosae). *Afri J Biomedical Res*. 2011;14(1):63-68. Disponible en: <https://utoronto.scholaris.ca/server/api/core/bitstreams/9803056c-124e-4106-95a1-0fbf5e6dbf79/content>
63. Lüring M, Beekman W. Anti-cyanobacterial activity of *Moringa oleifera* seeds. *J. Appl Phycol*. 2010; 22:503-510. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-009-9485-y>
64. Sayeed M, Hossain M, Chowdhury M, Mohsinul H. In vitro Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam Fruits. *J Pharma Phytochem*. 2012; 1(4):94- 98. Disponible en: <https://scispace.com/papers/in-vitro-antimicrobial-activity-of-methanolic-extract-of-1ai5hf6vfp>
65. Aloo B, Yator K. Effects of *Moringa oleifera* seeds on *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, pH and turbidity in water from selected sources in kitale town. University of Eldoret, Department of Biological Sciences: KENYA. 2015. 2-9 pp.
66. Hussain A, Ahmed H, Nazir H, Ullah I. Plant tissue culture: current status and opportunities. En: A. Leva y L. Rinaldi (Eds). *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. 2012. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/50568>
67. Fernández R, Villamizar E, Padilla G. (2024). Efecto antimicrobiano del extracto de callo de *Moringa oleifera* en microorganismos de interés clínico. *Rev Salus UC*. 2024; 28(1): 7-16. Disponible en: <https://servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/index.htm>
68. Martinez J, Pascual A, Garcia I, Martinez L. Detection of a plasmid mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type of beta lactamases. *J Antimicrobial Chemo*. 2003;52: 703-706. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg388>
69. Essack S. The Development of β -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of β -Lactamases. Review Article. *Pharma Res*. 2001;18: 1391-1399. <https://doi.org/10.1023/a:1012272403776>
70. Gambino L, Gracheck S, Miller P. Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 1993;175:2888–2894. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.175.10.2888-2894.1993>
71. Hawkey P. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrobial Chemo*. 2003;51(1):29-35. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg207>
72. Alfaro R. Revisión de la bibliografía sobre AmpC: Una importante β -lactamasa. *Rev Médica Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*. 2005; 40(2), 59-67. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462005000200002
73. Normark B, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med*. 2002; 252(2): 91-106. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01026x>
74. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10: 12–26. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00763x>
75. Mazzariol A, Cornaglia G, Nikaido H. Contributions of the AmpC β -lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to β -lactams. *Antimicrobial Agents & Chemo*. 2000; 44(5): 1387–1390. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.44.5.1387-1390.2000>
76. Petrosino J, Pendleton A, Weiner J, Rosenberg S. chromosomal system for studying AmpC-mediated β -lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents & Chemo*. 2002; 46(5): 1535–1539. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.5.1535-1539.2002>
77. Al Husnan L, Alkahtani M. Impact of *Moringa* aqueous extract on pathogenic bacteria and fungi in vitro. *Ann Agric Sci*. 2016;61(2):247–50. <https://doi.org/10.1016/j.aas.2016.06.003>
78. Alegbeleye O. How Functional Is *Moringa oleifera*? A Review of Its Nutritive, Medicinal, and Socioeconomic Potential. Vol. 39, *Food & Nutrition Bull*. 2018. p.149–70. <https://doi.org/10.1177/0379572117749814>

79. Moura M, Napoleão T, Coriolano M, Paiva P, Figueiredo R, Coelho L. Water-soluble Moringa oleifera lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol*. 2015;119(3):666–676. <https://doi.org/10.1111/jam.12882>
80. Arce Z, Barrera A, Herrera A, Suárez E, Rojas A, Suclupe D, Iglesias O. Efecto inhibitorio del extracto de semilla de Moringa oleifera sobre Escherichia coli β -lactamasas de espectro extendido. *Medicina Naturista*. 2020;14: 91-94. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7248982>
81. Dasgupta S, Kumar G, Mitra S. Evaluation of the antimicrobial activity of Moringa oleifera seed extract as a sustainable solution for potable water. *RSC Adv*. 2016 Mar;6(31):25918–25926. <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA04011J>
82. García C, Astocondor L, Banda C. Enterobacterias productoras de B-lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta Médica Perú*. 2012;29(3):163–169. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7774429>
83. Reda S, ElSouda S, Hanan A, Moharam M, Shaker K. Antioxidant, antimicrobial activities of flavonoids glycoside from Leucaena leucocephala leaves. *J App Pharma Sci*. 2015; 5(6), 138-147. <https://doi.org/10.7324 / JAPS.2015.50623>
84. Walker P, Crane E. Constituents of propolis. *Apidologie*. 1987;18 (4): 327-334. <https://doi.org/10.1051/apido:19870404>
85. Carrillo M, Castillo L, Mauricio R. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información tecnológica*. 2011;22(5), 21-28. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642011000500004>.

Salus