




Efecto antibacteriano de hojas y callo de *Azadirachta indica* A. Juss en microorganismos de interés alimentario.

Antibacterial effect of leaves and callus of *Azadirachta indica* A. Juss in microorganisms of food interest.

Rafael Fernández Da Silva , Jessica Salomón , Doris Reyes de Fuentes 

RESUMEN

El Neem es una planta arbórea multi propósito milenaria, por las diversas propiedades agrícolas, ambientales y medico farmacéuticas que presenta, dado los numerosos metabolitos secundarios que sintetiza. En el ámbito medicinal, sus extractos han demostrado tener efectos en enfermedades de distinto origen, tanto en estudios in vivo como in vitro. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano (concentración mínima inhibitoria "CMI" y bactericida) de extractos (acetónicos, metanólicos, hexanólicos y etanólicos) foliares y de callo no embriogénico (NE) del 5 al 50% de *Azadirachta indica*, por micro dilución en 50 µL de las bacterias de interés alimentario *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*; cualitativamente por turbidez del cultivo líquido y cuantitativamente en unidades formadoras de colonia (UFC) en cultivo sólido, a 37°C a 24 h. Se observó un mayor efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano con extractos de callo NE, principalmente en *S. typhimurium*, con un CMI del 20% y un CMB del 30%, siendo el extracto etanólico el más efectivo, a diferencia de los extractos foliares acetónicos, metanólicos y hexánicos donde las CMI y CMB fueron 40% y 50% respectivamente, mientras que para el etanólico el CMI fue de 30% y el CMB de 40%. La bacteria *L. monocytogenes*, no disminuyó en su crecimiento a las concentraciones ensayadas, independientemente del tipo de extracto foliar, sin embargo, con extractos de callo NE, se observó una disminución significativa del crecimiento a partir del 50%, en particular con el extracto etanólico, mostrando solo un efecto bacteriostático con este. Se concluye que el extracto etanólico de callo NE al 20% tiene un efecto bactericida en *S. typhimurium*, mientras que para *L. monocytogenes* debería ser a concentraciones superiores al 50%, sugiriéndose a futuro como un simple insumo genérico eficaz, seguro al ambiente y a bajo costo, en el procesamiento de alimentos, luego de cumplirse las validaciones legales in vivo del caso, que admitan su definitivo uso comercial.

Palabras clave: bactericida, extracto foliar, callo no embriogénico.

Universidad de Carabobo. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (Facyt). Departamento de Biología, Centro de Biotecnología Aplicada (CBA). Bárbula Carabobo Venezuela

Autor de correspondencia: Rafael Fernández Da Silva.

E-mail: rafaelfer21031970@gmail.com

Recibido: 08-07-2020 Aprobado: 29-09-2020

ABSTRACT

Neem is an ancient multi-purpose tree plant, due to the diverse agricultural, environmental and medical pharmaceutical properties it presents, given the numerous secondary metabolites it synthesizes. In the medicinal field, its extracts have been shown to have effects on diseases of different origins, both in in vivo and in vitro studies. The objective of this study was to evaluate the antibacterial effect (minimum inhibitory concentration "MIC" and bactericidal "BIC") of extracts (acetone, methanolic, hexanolic and ethanolic) of foliar and non-embryogenic callus (NE) from 5 to 50% of *Azadirachta indica*, by micro-dilution in 50 µL of the bacteria of food interest *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*; qualitatively by turbidity of the liquid culture and quantitatively in colony forming units (CFU) in solid culture, at 37°C at 24 h. A greater inhibitory effect of bacterial growth was observed with NE callus extracts, mainly in *S. typhimurium*, with a MIC of 20% and a BIC of 30%, the ethanolic extract being the most effective, unlike acetone foliar extracts, methanolic and hexanes where the MIC and BIC were 40% and 50% respectively, while for the ethanolic the MIC was 30% and the BIC 40%. The *L. monocytogenes* bacteria did not decrease in growth at the concentrations tested, regardless of the type of leaf extract, however, with NE callus extracts, a significant decrease in growth was seen from 50%, in particular with the extract ethanolic, assuming only a bacteriostatic effect with it. It is concluded that the 20% NE callus ethanolic extract has a bactericidal effect on *S. typhimurium*, while for *L. monocytogenes* it should be at concentrations above 50%, suggesting it as a simple generic input effective, safe in the future to the environment and at low cost, in food processing, after completing the legal validations in vivo of the case, which admit its definitive commercial use.

Key words: bactericidal, foliar extract, no embryogenic callus extract, Neem.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los alimentos contaminados por bacterias son los causantes de la mayoría de las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) que afectan a la población mundial (1).

Dos de los principales microorganismos patógenos responsables de infecciones o intoxicaciones alimentarias son *Salmonella spp.* y *Listeria spp.* (2), siendo *S. typhimurium* la responsable de la contaminación de alimentos (huevos, leche, carne y pollos crudos) y de la gastroenteritis en millones de personas cada año (3). El *L. monocytogenes* es la causante de la listeriosis, afección con un alto

grado mortalidad a nivel mundial. Por su alta capacidad de sobrevivencia tiene también altas probabilidades de contaminar los alimentos en diferentes etapas de su producción (3).

La *Salmonella* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, capaz de desarrollarse en un amplio intervalo de pH (6,6 a 8.2) y a una temperatura (32-37° o inclusive más altas) (4).

La *Listeria sp* es un bacilo corto Gram positivo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Listeriaceae, considerado un patógeno oportunista dado a que depende de las condiciones inmunológicas del hospedador (5).

Las células vegetales se valen de procesos metabólicos, reacciones enzimáticas que generan compuestos químicos clasificados como metabolitos primarios (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), esenciales para la vida de las células y metabolitos secundarios (polifenoles, alcaloides, etc.) Son moléculas de bajo peso relacionados a la adaptación del organismo a su entorno. A menudo actúan como mecanismos de defensa a plagas (artrópodos y vertebrados) y microorganismos patógenos (virus, hongos y bacterias), así como de agente de atracción tanto a los dispersores como polinizadores de frutos y semillas (6).

La propiedad antimicrobiana atribuida a los metabolitos secundarios que sintetizan las células vegetales ha sido estudiada, evaluando extractos vegetales de diferentes especies de plantas, sobre cepas bacterianas Gram negativas y Gram positivas. Se encontró inhibición del crecimiento en: *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Xanthomonas campestris*, *Salmonella typhi*, *Bacillus spp* y *Listeria spp*, entre otras (7).

Al estudiar la actividad antimicrobiana de extractos con distintos solventes orgánicos de diferentes partes vegetativas y reproductivas, el Neem es una de las plantas de mayor interés (8).

La especie de árbol *Azadirachta indica* A. Juss, también conocida como margosa, nimba o lila de la India (en sánscrito "Arishta", que significa aliviador de enfermedades) y se la incluye en la familia Meliaceae. Su origen es la India, distribuyéndose actualmente en el resto de Asia, así como en América, Australia y el Caribe (9). Esta planta es un emblema cultural de la India, dado sus usos curativos. Aparece históricamente en textos hindúes Ayurvédicos y su utilización médica desde el año 4.500 aC y es la base de distintas investigaciones, en particular etnobotánicas, obteniendo diferentes productos farmacéuticos y agrícolas (10).

En Venezuela esta planta ha sido utilizada para reforestar zonas desprovistas de árboles, producción de abono orgánico a base de hojarasca, cubiertas de semillas y partes leñosas, así como en investigaciones como bioinsecticida (11).

Entrando al tercer milenio, esta planta medicinal es una de las más versátiles por el extenso intervalo de actividades biológicas que presenta, ya que los extractos derivados de corteza, hojas, semillas (partes vegetativas) y flores (parte reproductiva) (12), tienen pocos metabolitos protóxicos alérgicos, pero son más abundantes en metabolitos secundario como fenoles, quinonas, flavonoides y alcaloides (13-15).

En medicina popular son empleados para el tratamiento de: artritis, diabetes, eczemas, estrés, gastritis, irregularidades digestivas, lepra, malaria, mal de Chagas, problemas dermatológicos, psoriasis, resfriados, reumatismo, úlceras péptico-duodenales y viruela. Asimismo, se utilizan como anticonceptivo, antihelmínticos, antiinflamatorios, antisifilíticos, emolientes y purgantes (12,16-19).

Más recientemente en tratamientos antivirales e inmunoestimulantes, contra virus tipo-2 del dengue y en herpes-simplex en ratones. Fue probado en humanos contra el virus del VIH, evidenciando un aumento de peso y hemoglobina en los pacientes tratados (20-21).

En estudios sobre cáncer hepático in vivo con ratones y ratas se evidencia la actividad antioxidante, hepatoprotectora, anticancerígena y antitumoral de los extractos (22) o en cáncer oral (23).

Presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra organismos Gram negativos y Gram positivos, incluyendo cepas resistentes a la estreptomina (24-34). Se han realizado estudios con extractos puros acuosos, etanólicos y cetónicos de Neem en *E. coli enteroinvasiva*, *E. coli enterotóxica*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (29).

En estudios in vitro el extracto foliar también inhibió el crecimiento de 14 cepas bacterianas, incluyendo *V. cholerae*, *M. tuberculosis* y *S. pyogenes* (22). Así, la margolona proveniente de la corteza es activa contra *Klebsiella*, *Staphylococcus* y *Serratia sp.*, mientras que la mahmodina tiene una acción antibacteriana moderada contra bacterias patógenas humanas.

De igual forma, la Neembolida tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* y *S. coagulasa* negativa (22). Además, 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* (22). Los extractos foliares acuosos igualmente tienen actividad antiviral in

in vitro, contra los virus Vaccinia, Chikungunya y paperas (parotiditis) (22).

Así, las plantas son una fuente primordial de compuestos bioactivos que puede ser potenciada a gran escala (35). Los cultivos de tejidos o de cultivos vegetales in vitro son una serie de técnicas que permiten, en condiciones controladas de asepsia, cultivar y manipular el crecimiento de las células en el laboratorio.

Por su propiedad de totipotencialidad pueden generar, de una simple célula, una planta completa a través de un proceso de dediferenciación celular, que da origen a un grupo de células con elevada capacidad meristemática, denominada callo, que es una masa de células indiferenciada en constante división celular (36-37). Se distinguen dos tipos: el callo embriogénico (E), que tiene capacidad regenerativa de plantas, caracterizado generalmente por ser compacto, de superficie lisa y blanco crema, de células isodiamétricas, y el callo no embriogénico (NE), que se distingue por ser frágil, de superficie rugosa, de color amarillo, de células irregulares, que no tiene la capacidad de regenerar plantas, pero sí de producir gran cantidad de metabolitos secundarios, dependiendo del estímulo químico (medio de cultivo a través de los reguladores de crecimiento u fitohormonas) o físico (estrés hídrico) a que es sometido (38). De tal manera, que en condiciones in vitro se pueden producir mayores cantidades de metabolitos secundarios (39).

En la actualidad se indagan mecanismos de tratamiento, nuevos, simples, económicos, sencillos, versátiles y alternativos para la erradicación o control de microorganismos que al contaminar los alimentos crudos y/o procesados, puedan perjudicar gravemente al ser humano.

Varios grupos de investigación evalúan diferentes metabolitos secundarios de origen vegetal como potencial solución en el control del crecimiento de bacterias como *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*.

En Venezuela no se ha evaluado exhaustivamente el Neem como antimicrobiano natural (40-41) y pudiera establecerse un protocolo económico de mantenimiento de inocuidad de alimentos, seguro al ambiente y a los consumidores, a fin de evitar las diversas afecciones ocasionadas por dichas bacterias de interés alimentario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. Los extractos se obtuvieron de dos fuentes vegetales de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), una *in vivo* (hoja) y otra generada in vitro (callo) a partir de frutos. Las hojas maduras y los frutos inmaduros sanos,

sin daños y de forma y tamaño uniforme, fueron tomadas de plantas libres de plagas y enfermedades de 3-5 metros de altura, en el Campus de la Universidad de Carabobo (Municipio Naguanagua-Edo. Carabobo). Las hojas y los frutos fueron lavados con agua corriente y jabón líquido (Brisol®), a fin de eliminar cualquier impureza. Luego se enjuagaron con abundante agua destilada, se escurrieron para el subsecuente proceso de secado para las primeras y la desinfección e iniciación in vitro para los segundos. El callo no embriogénico (NE: masa celular indiferenciada, de superficie rugosa y de color amarillo, se obtuvo por cultivo in vitro, iniciado a partir de secciones foliares de vitro plantas, generadas por la germinación de embriones cigóticos, aislados de semillas inmaduras obtenidos de frutos en condición aséptica. La desinfección de los frutos se realizó el mismo día de su colecta en una campana de flujo laminar horizontal, extrayendo el embrión cigótico, retirando primero el epicarpio y mesocarpio, quedando solo el endocarpio, el cual se lavó dos veces (2 min cada uno) con agua destilada estéril y detergente líquido comercial (Dodecylbencensulfonato de sodio, (Clic®, Fácil Química C. A.). Seguidamente se realizó un lavado con alcohol isopropílico al 70% v/v durante 30 segundos y con agua destilada estéril por 1 min, otro lavado con una solución de cloro comercial (3.5% de hipoclorito de sodio) al 20% v/v y Tween 20 (1 gota/ 10 mL) por 5 min, y finalmente 3 lavados con agua destilada estéril (1 min cada uno) para eliminar el cloro y etanol remanente.

Por último, antes de la extracción del embrión cigótico, las semillas se sumergieron en una solución de cisteína al 1% en agua destilada estéril durante 30 min, para reducir la oxidación de estos. Una vez desinfectados los embriones cigóticos, se induce su germinación in vitro en el medio MS (1962) con 0.2 mg/L de BAP (6-N-bencil-aminopurina), en oscuridad continua y temperatura ambiente (25°C) hasta el desarrollo de la raíz y apertura de los cotiledones, luego de lo cual se mantuvo bajo iluminación continua (120µE/m²s⁻¹) para estimular el desarrollo de la vitro planta, de donde se obtuvieron las hojas que fueron los explantes para la inducción de callo no embriogénico, en capsulas de Petri (100 x 15 mm), con medio salino MS (1962) suplementado 1 mg/L de BAP con 0.4 mg/L de AIA (ácido índol acético), medio óptimo para el desarrollo de este tipo de estructura celular (42).

Secado y pulverización del material vegetal. Las hojas se secaron en estufa a 60°C durante 72 horas, para luego molerlas utilizando una licuadora Oster® convencional, hasta obtener 25 g del polvo foliar. Por otra parte, luego de 8 semanas de iniciado el cultivo, se colectaron los callos NE y se secaron en una estufa a 60°C durante 2 días, para posteriormente homogenizarse en un polvo fino en un mortero, bajo campana de flujo laminar (43).

Extractos. Empleando cuatro solventes orgánicos distintos (acetona, metanol, hexano y etanol) al 75% c/u, se obtuvieron extractos crudos foliares y de callo NE. Tanto el polvo foliar como el de callo NE, se disolvió en una relación de 50 mL de solvente con 0.5 g del pulverizado (concentración de 10% p/v), en agitación continua (65 rpm) durante 48h, para luego centrifugarse a 10.000 rpm durante 10 min, separando la biomasa (sedimento) de la fase líquida (sobrenadante), evaporándose el solvente de esta última a 70°C, para subsecuentemente re suspender la muestra sin solvente con DMSO 0,25% en tubos Eppendorf y preservarse a -80°C hasta su uso (38). La solución final o madre se consideró a un 100%, a partir de la cual se diluyó (5, 10, 20, 30, 40 y 50%) para realizar la evaluación antibacteriana (44-45).

Microorganismos. Cepas liofilizadas utilizadas fueron, ATCC (American Type Culture Collection) de *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) y *Listeria monocytogenes*, suministrada por el Laboratorio SEMITECH, C.A. de Valencia-Edo. Carabobo, ambas de la colección de microorganismos del Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de Facyt-UC.

Preparación de las suspensiones microbianas. Las cepas se prehidrataron en caldo infusión cerebro corazón "BHI" (Brain Heart Infusión), para luego incubarse por 24 horas a 37°C para su reproducción en condiciones normales de gases. Posteriormente, se cultivaron por 24 horas a 37°C en agares selectivos: Agar Mac Conkey para *S. typhimurium* y agar PALCAM para *L. monocytogenes*. Seguidamente, se seleccionaron colonias aisladas suspendiéndolas en Caldo BHI, incubándose nuevamente por 24 h a 37°C, después se ajustó la turbidez de las mismas al patrón de 0,5% Mc. Farland (medida a 540 nm en espectroni 20), equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL (44-45).

Determinación de la actividad antimicrobiana mediante la técnica de microdilución: utilizando microplacas estériles con 96 pocillos de 375 µL de capacidad, bajo campana de flujo laminar horizontal, se colocaron 62,5 µL de caldo estéril en todos los pocillos, junto con 37,5 µL de inóculo bacteriano (excepto en el control negativo) y diferentes volúmenes de los 4 extractos para de esta manera obtener las siguientes concentraciones: 5% (6,67 µL), 10% (13,33 µL), 20% (26,67 µL), 30% (40 µL), y 50% (66,67 µL), incubándose por 24 h a 37°

Para evidenciar la turbidez del medio el crecimiento o no de bacterias (prueba cualitativa), empleando un asa de platino calibrada se procedió a inocular 10 µL de cada tratamiento en tubos de ensayos conteniendo 1 mL de caldo de cultivo. Además, se inocularon 50 µL de cada tratamiento en las placas con agar nutriente, utilizando la técnica de siembra en superficie con la espátula de Drigalski (prueba cuantitativa).

Se dejó incubar por 24 h a 37°C, evaluando después el número de unidades formadoras de colonia (UFC), así como la turbidez de cada uno de los tubos, estableciéndose para las dos cepas bacterianas con los 4 extractos, la concentración mínima inhibitoria (CMI) que determina el efecto bacteriostático y la concentración mínima bactericida (CMB) que determina el efecto biocida.

Controles. El medio de cultivo con solo extracto se utilizó como control negativo, para verificar la presencia de contaminantes microbianos, mientras que el medio de cultivo con la cepa pura sin extracto fue el control positivo, para verificar 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 los posibles remanentes de los solventes en solución concentrada final no tuvieran efecto antimicrobiano, asegurando que los mismos se habían evaporado por completo durante el proceso de obtención del extracto al 100%. Se hicieron ensayos con diluciones de una solución sin polvo foliar o de callo NE de *Azadirachta indica*, evidenciándose crecimiento microbiano de todas las cepas en todas las concentraciones.

Análisis de los resultados. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado obteniendo reproducibilidad de los resultados, que se analizaron mediante el programa estadístico: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 18, empleando como estadísticos clásicos las medias y desviaciones estándar.

RESULTADOS

La evaluación de los distintos extractos foliares y de callo NE mostró una respuesta diferencial significativa de la actividad antimicrobiana en función de la cepa bacteriana, tanto en el medio líquido como en el sólido a las 24 horas de incubación, observándose una mayor inhibición del crecimiento bacteriano con extractos de callo NE, en particular con *Salmonella typhimurium*. En este sentido, para *S. typhimurium* con extractos foliares acetónicos, metanólicos y hexánicos las CMI y CMB fueron 40% y 50% respectivamente, mientras que para el etanólico el CMI fue de 30% y el CMB de 40%.

Con todos extractos de callo NE se evidenció una mayor inhibición del crecimiento para esta cepa, con un CMI del 20% y un CMB del 30%, siendo el etanólico el más efectivo. En relación a *L. monocytogenes* se observó crecimiento en todas las concentraciones ensayadas independientemente del tipo de extracto foliar, sin embargo, con extractos de callo NE, se vio una disminución significativa del crecimiento a partir del 50%, en particular con el extracto etanólico, asumiendo solo un efecto bacteriostático con este (Tabla 1).

Tabla 1a. Efecto bactericida de extractos foliares y de callo NE de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el crecimiento *Salmonella typhimurium*

EXTRACTO		Crecimiento bacteriano			
SOLVENTE	%	HOJA		CALLO	
		ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)
ACETONA	0	+	>1000	+	>1000
	5	+	>1000	+	>1000
	10	+	>1000	+	>1000
	20	+	>1000	+	154±9*
	30	+	354±15	-	-
	40	+	27±3*	-	-
	50	-	-	-	-
	Control -	-	-	-	-
	Control +	+	>1000	+	>1000
	METANOL	0	+	>1000	+
5		+	>1000	+	>1000
10		+	>1000	+	>1000
20		+	>1000	+	77±4*
30		+	696±19	-	-
40		+	510±23*	-	-
50		-	-	-	-
Control -		-	-	-	-
Control +		+	>1000	+	>1000
HEXANO		0	+	>1000	+
	5	+	>1000	+	>1000
	10	+	>1000	+	>1000
	20	+	>1000	+	120±8*
	30	+	569±30	-	-
	40	-	253±18*	-	-
	50	-	-	-	-
	Control -	-	-	-	-
	Control +	+	>1000	+	>1000
	ETANOL	0	+	>1000	+
5		+	>1000	+	>1000
10		+	>1000	+	>1000
20		+	>1000	+	34±3*
30		+	289±27*	-	-
40		-	-	-	-
50		-	-	-	-
Control -		-	-	-	-
Control +		+	>1000	+	>1000

Tabla 1b. Efecto bactericida de extractos foliares y de callo NE de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el crecimiento *Listeria monocytogenes*

EXTRACTO		Crecimiento bacteriano			
SOLVENTE	%	HOJA		CALLO	
		ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)
ACETONA	0	+	>1000	+	>1000
	5	+	>1000	+	>1000
	10	+	>1000	+	>1000
	20	+	>1000	+	+
	30	+	>1000	+	+
	40	+	>1000	+	826±23
	50	+	>1000	+	414±17*
	Control -	-	-	-	-
	Control +	+	>1000	+	>1000
	METANOL	0	+	>1000	+
5		+	>1000	+	>1000
10		+	>1000	+	>1000
20		+	>1000	+	>1000
30		+	>1000	+	>1000
40		+	>1000	+	452±35
50		+	>1000	+	244±26*
Control -		-	-	-	-
Control +		+	>1000	+	>1000
HEXANO		0	+	>1000	+
	5	+	>1000	+	>1000
	10	+	>1000	+	>1000
	20	+	>1000	+	>1000
	30	+	>1000	+	>1000
	40	-	>1000	+	>1000
	50	-	>1000	+	>822±45*
	Control -	-	-	-	-
	Control +	+	>1000	+	>1000
	ETANOL	0	+	>1000	+
5		+	>1000	+	>1000
10		+	>1000	+	>1000
20		+	>1000	+	>1000
30		+	>1000	+	>1000
40		+	>1000	+	453±29
50		+	>1000	+	164±23*
Control -		-	-	-	-
Control +		+	>1000	+	>1000

Se ve que en el caso de *L. monocytogenes*, a medida que se incrementaba la concentración del extracto de callo NE, en particular a 40 y 50%, donde es evidente la disminución de UFC, se nota a su vez un cambio de morfología y tamaño de la colonia, que al verificarse que no era un contaminante, asumimos que era una respuesta de resistencia al extracto por parte del microorganismo.

DISCUSION

La extracción cualitativa y/o cuantitativa de los metabolitos secundarios depende del tipo y concentración del solvente que permite o no que un metabolito específico sea soluble en dicho solvente.

La acetona es miscible en resinas, aceites, ceras y grasas, es un solvente polar aprótico. (Acepta protones, pero no los dona) Esta característica hace que sea posible una afinidad con los compuestos del tipo fenólicos. El metanol y etanol son alcoholes próticos polares, considerados de polaridad intermedia, capaces de donar protones para formar puentes de hidrogeno y pueden ser afines a fenoles y flavonoides.

Estos tres solventes polares son los más usados para extraer polifenoles, en particular en mezclas acuosas, a diferencia del hexano que es un solvente alifático y apolar y por ende menos afín a la extracción de dichos compuestos, sino de compuestos grasos, que tienen gran cantidad de cadenas hidrocarbonatadas (46).

Hay pocos estudios en cuanto a la relación de producción de metabolitos secundarios en condiciones in vivo (planta o parte de esta) o in vitro (callo). Con respecto al tejido foliar y de callo inducido en *Boungavillea glabra*, se concluye que estaban presentes todos los compuestos en ambos, pero en diferentes concentraciones, asumiendo que las diferencias dependen de las condiciones de cultivo, donde las proporciones de metabolitos secundarios son desiguales debido a que el cultivo in vitro favorece el heterotrofismo de las células vegetales (47).

Las hojas de neem tienen un 4,1% de alcaloides, 2,5% de flavonoides, 4,5% de glicosidos, 5,0% glicósidos cardacos, 3,0% de triterpenoides y esteroides, 4,96% de saponinas y 0,643% de taninos (48-49). Dichos compuestos pueden estar presentes también en los callos, pero en diferentes concentraciones, dependiendo del proceso de inducción de los mismos.

La inhibición bacteriana es provocada principalmente por la acción de compuestos polifenolicos (50), lo cual puede referirse a la respuesta antibacteriana encontrada en este trabajo en el caso de *S. typhimurium* (47),

La resistencia encontrada a estos extractos en *L. monocytogenes* puede deberse a los diferentes mecanismos de resistencia que ha desarrollado este microorganismo frente a antimicrobianos y agentes físicos. Estos

mecanismos son imprescindibles para que la especie se desarrolle exitosamente en casi todos los ambientes (51).

Son escasos los estudios que evalúan la acción antibacteriana del extracto de neem en *S. typhimurium*, ya sea de hojas como de callos. Sin embargo, utilizando extracto etanólico y metanólico de hojas frescas de Neem pero no se observan inhibición de su crecimiento en ninguna de las concentraciones utilizadas (7, 52), contrastando con los resultados de este estudio, donde se evidencio un efecto bactericida en dicho tejido.

Con extracto foliar etanólico al 50% (50 mg/mL) se logra inhibir el crecimiento de esta cepa bacteriana (53), o a 100 mg/mL utilizando el método de difusión en discos (54).

Con extractos etanólicos y metanólicos de callos inducidos de hojas de Neem, en las bacterias Gram-negativas *E. coli*, *S. aeruginosa* y *P. pyogenes*, se logró la inhibición del crecimiento de las mismas, excepto con la última (55), pero si se logra a partir de 10 g/mL, empleando extracto metanólico de callo, evidenciando que los metabolitos presentes en los callos son más efectivos que los presentes en hojas frescas (56).

Los cultivos in vitro de callos, que son una masa de células indiferenciadas en elevada actividad mitótica, permiten de manera constante la síntesis de metabolitos secundarios, debido al alto nivel de desorganización y por ende no especialización celular (56), confiriendo así una cierta ventaja frente a los extractos obtenidos de partes frescas de la planta. En concordancia, con este planteamiento en este estudio se logró inhibir el crecimiento de *S. typhimurium*, a una menor concentración del extracto derivado de callo.

En cuanto a *L. monocytogenes*, no se ha evaluado su crecimiento usando extractos de callos de neem, sino con extractos etanólicos y metanólicos de hojas frescas indicando una disminución del crecimiento de esta especie a partir del 10% mediante el método de difusión de discos (52). Asimismo, usando extracto metanólico foliar se inhibió el crecimiento a partir de 50 mg/mL (7), o a partir de 30 mg/mL empleando extracto etanólico foliar (57).

Se conoce que las bacterias Gram positivas son más susceptibles al ataque de agentes bactericidas dado que carecen de una pared celular de peptidoglucanos, como si la poseen las bacterias Gram negativas.

Bacterias como *E. coli* y *L. monocytogenes* poseen mecanismos de defensa que han permitido su prevalencia sobre los alimentos y en el ambiente circundante, en casi cualquier condición. Por ello, generalmente la fase estacionaria del crecimiento bacteriano antecede a la fase de muerte. Esto ocurre cuando la célula experimenta cambios en la concentración de nutrientes o acumulación de toxinas, la cual está regulada por un mecanismo que se conoce como muerte celular programada (PCD), el cual

se ha insertado evolutivamente en el genoma bacteriano. Este mecanismo permite que la bacteria disminuya el nivel poblacional, degrade ARN, y reduzca el contenido celular. Al final de la fase estacionaria, se activa este programa de muerte, por ciertos métodos de detección, que destruye a la mayoría de las células de la población, liberando su contenido para que las otras sean capaces de sobrevivir.

Recientes estudios han mostrado que bacterias saprófitas, como en el caso de *L. monocytogenes*, algunas células con PCD entran en un período de dormancia latente (LTS). Estas células se caracterizan por ser predominantemente cocos, permitiendo una mayor resistencia a las condiciones de estrés. El mecanismo por el cual las células de *Listeria* entran en LTS, cambiando de su forma bacilar a cocos, no se ha aclarado todavía (58).

Es posible que se esté presentado otro mecanismo, los biofilms. Se ha encontrado al menos 3 diferentes tipos de biofilms que forma *L. monocytogenes*. Van desde la formación de una capa plana de células hasta la estructura parecida a un panal de abejas. Dependiendo del tipo cepa se forma un tipo de biofilm: para las cepas que no poseen flagelo se forma una capa poco gruesa de células planas y, aunado a esto, se activa cuando hay un nivel alto de células por mililitro de medio. La otra estructura, del panal de abejas, es la que forman la mayoría de las cepas. Consiste en un aglomerado de células muertas, restos de flagelos y ADN (ADN que proviene del ambiente o restos de algún fago), pero que van dejando huecos vacíos entre ellas; en estos huecos se encuentran nadando células bacterianas (solamente las que poseen flagelos).

A parte de estas estructuras existen otros tipos, redes de células en 3D, agregados desorganizados y otros. Todas estas estructuras son utilizadas por la especie para permitir su supervivencia en el tiempo y frente a los agentes estresantes (59).

Además del género *Listeria*, se ha encontrado estos mecanismos en especies de *Staphylococcus* y *Pseudomonas*. Esto puede ser una explicación de porqué las células de *L. monocytogenes* presentaron una disminución del número UFC, sin ser eliminadas completamente. De hecho, el tamaño de la colonia que se observó cuando las células fueron expuestas a partir del 40% de concentración, coincide con el argumento de que las bacterias tienden a ir acumulándose más para permitir la supervivencia, lo que se traduce como un crecimiento en el tamaño de las colonias (59).

Las bacterias Gram negativas se han caracterizado por ser más resistentes a los antibióticos y otras moléculas tóxicas, como se ha demostrado en múltiples investigaciones. No se ha podido inhibir el crecimiento de *S. typhimurium* con extractos de neem, sin embargo, en este estudio se logró la inhibición y la acción bactericida de la especie. Si bien, la pared celular que poseen las bacterias Gram negativas, están

caracterizadas por ser rígidas y resistentes a la lisis celular, en esta ocasión los compuestos metabólicos secundarios causaron daño a la célula bacteriana provocando la muerte. Los alcaloides, flavonoides, glicósidos, triterpenoides y esteroides, saponinas, taninos, entre otros, causan muerte celular pero no por un solo proceso específico. Hay algunos sitios en la célula donde estos compuestos causan mayor efecto, como son la membrana plasmática, degradación de la pared celular y proteínas, provocando filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz (60).

La combinación de dos o más tipos de antimicrobianos naturales pueden conducir a efectos sinérgicos o antagónicos. Como se sabe, en el Neem existen diversos tipos de metabolitos confluyendo al mismo tiempo, así que estos efectos debieron estar presentes para lograr la actividad bactericida observada en esta investigación. Un efecto sinérgico puede ser la inhibición de una ruta bioquímica, inhibición de enzimas protectoras, entre otros. Por ejemplo, en un estudio de mezclas ternarias de carvacol, timol y sorbato de potasio, se registraron de manera general, 28 combinaciones sinérgicas, 15 aditivas y 9 antagónicas para la inhibición de *L. innocua* y *S. typhimurium* (60). En esta investigación no se puede indicar el número y tipo de efectos de los metabolitos, ya que se trabajó con extracto crudo, sin llegar a la caracterización cuantitativa de metabolitos secundarios del mismo, aspecto que sería interesante realizar en futuros trabajos.

Se puede concluir que se estableció que los extractos a base de callo no embrionario, fueron significativamente más eficaces en inhibir el crecimiento de *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*, mediante la técnica de microdilución, en particular con la primera especie bacteriana mencionada, donde hay un efecto bactericida con el extracto etanólico a concentraciones superiores al 20% a las 24 h de exposición. Pero, con *L. monocytogenes*, solo se evidencia un efecto bacteriostático a 50% de los extractos, -a pesar de notar la disminución de UFC y manifestar una morfología de resistencia-, por lo que sugerimos seguir trabajando a este respecto, y en particular con extractos de ciertos metabolitos cuantificados, que permitieran romper las barreras de resistencia de esta bacteria y poder así controlar las graves afecciones que esta ocasiona al hombre, para así, en un futuro no lejano, plantear el uso de este tipo de extracto como un sencillo y eficaz aditivo antibacteriano para alimentos susceptibles a contaminarse por estos microorganismos, durante su procesamiento.

Agradecimiento

Al personal asistente del Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo (Naguanagua-Edo. Carabobo) por el apoyo en la ejecución de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Organización Mundial de la Salud (OMS). Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de Enfermedades de Transmisión Alimentaria. 2015; http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200047/1/WHO_FOS_15.02_spa.pdf.
- Carrillo L, Audisio M. Manual de microbiología de los alimentos. Argentina: Asociación cooperadora de la facultad de Ciencias Agrarias. 2007;63.
- Maurer J. Factors affecting variation in Salmonella virulence. En: J.B. Gurtler et al. (Eds.). Foodborne Pathogens Estados Unidos: Springer International Publishing. 2017; p.151-167.
- Robledo, A. Investigación de Salmonella spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. Tesis de pregrado. Universitat Politècnica de Catalunya. España. 2015; p.77.
- Oteo J, Alós J. Listeria y Listeriosis. 2017; <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/listeria.pdf>.
- Agostini T, Vieira R, Bizzo H, Silveira D, Gimenes M. Secondary Metabolites. In: Chromatography and Its Applications. Editorial S. Dhanarasu. Intech. 2012; p.131-16.
- Yehia, H. Methanolic Extract of Neem leaf (*Azadirachta indica*) and its antibacterial activity against foodborne and contaminated bacteria on sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Ame Eurasian J Agric Environ Sci. 2016; 16(3):598-604.
- Ramesh K, Eapen S, Devanand P. Bioactive constituents and antimicrobial activity of cell cultures of *Azadirachta indica*. J Pharma Biosci. 2011; 2(4):617-628.
- Luz. Neem, un árbol milagroso. Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Maracaibo-Venezuela. 2001; p.49.
- 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.
- Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee R. Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*). Curr Sci. 2002; 82(11):1336-1345.
- Guptaa S, Prasadb S, Tyagib A, Kunnunmakkarac A, Aggarwald B. Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. Phytomedicine. 2017; 34:14-20.
- 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.
- Asif M. Antimicrobial Potential Of *Azadirachta Indica* against Pathogenic Bacteria and Fungi. J Pharma Phytochem. 2012; 1(4):79-84.
- Bijauliya R, Alok S, Chanchal D, Sabharwal M, Yadav R. An Updated review of pharmacological studies on *Azadirachta indica* (Neem). IJPSR. 2018; 9(7): 2645-2655.
- 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.
- 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.
- Atawodi S, Atawodi J. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. Phytochem Rev. 2009; 8:601-620.
- Akbar, S. Handbook of 200 Medicinal Plants a comprehensive review of their traditional medical uses and scientific justifications. Springer Suiza. 2020; p.2076.
- 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.
- 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.
- 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.
- Agrawala S, Poplib D, Sircarb K, Chowdhry A. Are view of the anti-cancer activity of *Azadirachta indica* (Neem) in oral cancer. J Oral Biol Craniofacial Res. 2020; 10:206-209.
- Sunday E, Atawodi J. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. Phytochem Rev. 2009; 8: 601-620.
- López Y, Escalante M, Rodríguez C, Soto J, Chaidez C. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y Venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y *Bacterifago P22*. Bioquímica. 2007; 32(004):117-125.
- 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 Med Plants Res. 2010; 4(22):2393-2398.
- 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.
- Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. 2003; 16(4):385-393.
- Paiva P, Gomes F, Napoleão T, Sá R, Correia M, Coelho L. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. Curr. Res. Tech Education Top Appl Microb Microbial Biotech. 2010; 1:396-406.
- 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.
- Silva N, Fernandez J. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. J Venomous Animals Toxins includ Trop Dis. 2010; 16(3):402-413.

32. Rahmatullad M, Jahan R, Khatun A, Jahan F, Azad A, Bashar A, Miajee E, Ahsan S, Nahar N, Ahmad I, Chowdhury MA pharmacological Evaluation of Medicinal Plants used by Folk Medicinal Practitioners of Station Purbo Para Village of Jamalpur Sadar Upazila in Jamalpur district, Bangladesh. *Ame-Eurasian J Sustainable Agri*. 2010; 4(2):170-195.
33. 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.
34. Vinoth B, Manivasagaperumal R, Rajaravindran M. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Azadirachta indica* A. Juss. *I J Res Plant Sci*. 2012; 2(3):50-55.
35. Joshee N, Sadanand A, Parajuli D. *Medicinal Plants from Farm to Pharmacy*. Springer Suiza. 2019; p.445.
36. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue and cell cultures. *J Med Plants Res*. 2009; 3(13):1222-1239.
37. Çalışkan T, Hatipoğlu R, Kırıcı S. Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under In vitro Conditions. *Turk J Agri- Food Sci Tech*. 2019; 7(7):971-980.
38. Fernandez R, Ramirez P, Silva J, Storaci V, Cuomo C, De Guglielmo Z, Smits G. Establecimiento de un sistema de selección in vitro de variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.) resistentes al hongo *Pyricularia grisea*. *Acta Biol Colom*. 2017; 22(1):85-100.
39. Orozco F, Sepúlveda G, Trejo G, Zamilpa A, Rodríguez M. Oxygen limitations to grow *Azadirachta indica* cell culture in shake flasks. *Rev Mex Ing Química*. 2011; 10(3):343-352.
40. 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.
41. 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.
42. Fernandez, Villaroel A, Cuomo L, Storaci V. Evaluación de un sistema de regeneración por embriogénesis somática de *Neem* (*Azadirachta indica*). *Acta Biol Colom*. 2016; 21(3):581-592.
43. 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.
44. Reyes D, Fernández R. Efecto biocida in vitro del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus* sp y *Pseudomonas* sp. *Salus*. 2013; 17(3):34-41.
45. Reyes D, Ortega D, Quintero Q, Piquer S, Alarcón M, Fernández R. Efecto antimicrobiano del extracto foliar de mango (*Mangifera indica* L. cv. Bocado) en microorganismos de interés clínico. *Salus*. 2017; 21(2):7-13.
46. Masschelein L. Los solventes. Chile: Dirección de Bibliotecas Archivos y Museos. 2004; p.145.
47. Reyes L. Identificación de metabolitos de *Boungainvillea glabra* Choise variedad *Variegata* y su efecto contra *Sodoptera frugiperda* J.E Smith. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. España. 2015; p.115.
48. Aslam, F., K. Rehman & M. Sarwar. Antibacterial activity of various phytoconstituents of *Neem*. *Pak J Agri Sci*. 2009; 46(3):209-213.
49. Srivastava S, Agrawal B, Kumar A, Pandey A. Phytochemicals of *Azadirachta indica* Source of Active Medicinal Constituent Used for Cure of Various Diseases: A Review. *J Sci Res*. 2020; 64(1):285-290.
50. Takó M, Kerekes E, Zambrano C, Kotogán A, Papp T, Krisch J, Vágvölgyi C. Plant Phenolics and Phenolic-Enriched Extracts as Antimicrobial Agents against Food-Contaminating Microorganisms. *Antioxidants* 2020; 9 (165):1-21.
51. Buchanan R, Gorris, L, Hayman M, Jackson T, Whiting R. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. 2017; 75:1-13.
52. Das S, Chatterjee S, Mandal N. Enhanced antibacterial potential of ethanolic extracts of neem leaf. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014; 3(9):617-621.
53. Rubyath Q, Parveen F, Jalaluddin M. Growth inhibitory effect of ethanolic neem leaves extract on *Klebsiella*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. *J Bangladesh Pharmacol Soc*. 2014; 9:347-350.
54. Arulkumar A, Somasundaram S, Sampathkumar S. Effects of plain, hill and coastal neem (*Azadirachta indica*) extracts against human pathogenic bacteria. *I J Microbiol Res*. 2015; 6(1):9-12.
55. Satdive R, Eapen S, Fulzele D. Bioactive constituents and antimicrobial activity of cell cultures of *Azadirachta indica*. *I J Pharma Bio Sci*. 2011; 2(4): 616-628.
56. Ahmed I. Bioactivity of neem (*Azadirachta indica*) callus extract. Tesis de maestría. Universidad Islámica Omdurman. 2001; p.60.
57. Ramírez L, Morón A, Reyes, D, Rivero, A, Sánchez L, Sánchez L. Antimicrobial effect of ethanol extract of leaf neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Listeria monocytogenes*. *Arch Latinoamericanos Nutrición*, 2016; 66(1):60-65.
58. Wen J, Deng X, Li Z, Dudley E, Ramaswamy C. Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* during the transition to the Long-Term-Survival Phase. *App Env Microbiol*. 2011; 77(17):5966-5972.
59. Guilbaud M, Piveteau P, Desvaux M, Brisse S. Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *App Env Microbiol*. 2015; 81(5):1813-1819.
60. García R, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2008; 2(2):41-51.