

Antimicrobial effect of ethanol extract of leaf neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Listeria monocytogenes*

Luis Guillermo Ramírez Mérida, Alba Morón de Salim, Doris Reyes,
Ariana Rivero, Luz A. Sánchez, Luz K. Sánchez.

Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT). Instituto de Investigaciones en Nutrición (INVESNUT).
Universidad de Carabobo Sede Valencia, Venezuela.

RESUMEN: *Listeria monocytogenes* es un patógeno causante de enfermedades alimentarias. En la búsqueda de controlar su propagación utilizando sustancias naturales se planteó el objetivo de mostrar si el extracto etanólico foliar de neem (*Azadirachta Indica* A. Juss.) tiene efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes* ICTA-12446. El extracto se obtuvo a partir de hojas de neem sometidas a secado por 8 días, se redujeron de tamaño mecánicamente, se sometieron a maceración en frío por 3 días usando etanol 96% en recipientes ámbar, se filtró y concentró en rota evaporador. Se estandarizó el concentrado con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 60 mg/L. *Listeria monocytogenes* ICTA-12446, fue inoculado en caldo nutriente junto con soluciones del extracto a diferentes concentraciones (20, 30, 40, 50 y 60 mg/L), se emplearon tiempos de contacto (2.5, 5, 10 y 15 minutos). Cumplido cada tiempo se realizaron diluciones seriadas e inocularon en agar nutritivo por extensión durante 24 h a 37°C. Se efectuó el recuento en Unidades Formadoras de Colonias UFC. Al comparar las concentraciones del extracto se evidencia entre 20 y 60 mg/mL diferencia significativa, mientras que en 30, 40 y 50 mg/mL un comportamiento similar. Al contrastar tiempos de contacto, se observa que entre el tiempo 2.5 min y los restantes un $p=0,03$. El tiempo mínimo donde existió inhibición fue 2.5 minutos, y concentración mínima inhibitoria de 20 mg/mL. Los cuatro tiempos de contacto arrojan porcentajes de inhibición microbiana de 100% al emplear 60mg/mL. Se concluye que el extracto etanólico foliar de neem posee un efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave: Bacteriostático, bactericida, neem, extracto etanólico, *L. monocytogenes*.

SUMMARY: Antimicrobial effect of ethanol extract of leaf neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* is a pathogen causing foodborne illness. In seeking to control its spread using natural substances in order to show if the leaf ethanol extract of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) has antimicrobial effect on *L. monocytogenes* ICTA-12446, was proposed. The extract was obtained from neem leaves, which was subjected to drying for 8 days. It was reduced in size mechanically, and subjected to cold soak for 3 days, using 96% ethanol in amber vessels, filtered and concentrated in rot evaporator. Concentrated was solubilized with dimethylsulfoxide (DMSO) and standardized to achieve a concentration of 60 mg/mL *Listeria monocytogenes* was inoculated in nutrient broth with extract solutions at different concentrations (20, 30, 40, 50 and 60mg/mL), four contact times (2.5, 5, 10 and 15 minutes) were used. Completed each time it was diluted and inoculated on nutrient agar by extension for 24h at 37°C. The count of Colony Forming Units UFC was taking. Comparing the concentrations of the extract between 20 and 60mg /mL significant difference was appreciate, while 30, 40 and 50 mg/mL show a similar behavior. Contrasting contact times observed between time 2.5 min and the remaining $p = 0.03$. The minimum time where there was some kind of inhibition was 2.5 minutes, and minima inhibitory concentration of 20mg/mL. The four contact times yield microbial inhibition percentages of 100% by using 60mg/L. It is concluded that ethanol extract of neem leaf has an inhibitory effect on *L. monocytogenes*.

Key words: Bacteriostatic, bactericidal, neem, ethanol extract, *L. monocytogenes*.

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes se caracteriza por ser un bacilo Grampositivoaerobio o anaerobio facultativo. Se le considera un patógeno mesófilo, aunque tiene la capacidad de desarrollarse a temperaturas de refrigeración y rangos de pH muy variables lo cual

le diferencia de otras bacterias patógenas. Esta capacidad de adaptación tanto a condiciones como ambientes hostiles, hacen que *L. monocytogenes* presente un potencial fenotípico que actúa como factor de virulencia. Puede causar brotes delisteriosis, enfermedad esta que genera manifestaciones graves en el individuo tales como meningitis y/o encefalitis,

abortos o infecciones neonatales y septicemias afectando principalmente a mujeres embarazadas, ancianos e inmunocomprometidos (1).

Alimentos contaminados con *L. monocytogenes* son una de las principales causas de brotes de listeriosis; y pueden conducir a las denominadas enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), lo que llevaría a un problema de salud pública. En vista que se ha reportado la presencia del patógeno en una amplia variedad de alimentos entre ellos vegetales frescos y productos lácteos procesados (2,3), medidas de control sencillas y eficaces para prevenir o disminuir su acción deben ser establecidas. El uso de biocontroladores obtenidos a partir de extractos de plantas, ha venido siendo una alternativa útil y eficiente para controlar patógenos de alimentos a escala de laboratorio (4).

El árbol de neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) de la familia *Meliaceae*, se ha utilizado en la medicina tradicional contra varias enfermedades humanas. Su hoja posee una diversidad de compuestos como hidratos de carbono, minerales, aminoácidos y su principal componente activo la azadiractina, le confiere una amplia gama de actividades farmacológicas y aplicaciones medicinales (5). Se ha demostrado una cierta actividad antimicrobiana de extractos de neem sobre diferentes microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y bacteriófagos (6).

Considerando el comprobado efecto inhibitorio que posee las hojas del neem sobre estos microorganismos, y buscando una medida para controlar el desarrollo de *L. monocytogenes* como patógeno alimentario, evitar su presencia y proliferación en los alimentos, se propuso evaluar el efecto bacteriostático y/o bactericida que pudiese tener el extracto etanólico foliar del neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *L. monocytogenes* y de esta forma dar paso a la aplicación de posibles biocontroladores como métodos alternativos que mejoren la calidad microbiológica de los alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Preparación del extracto etanólico foliar

Arboles de neem ubicados en la U.E “Luisa del Valle Silva” del campus Bárbula de la Universidad de Carabobo, fueron identificados y autenticados por un botánico del Departamento de Biología en la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo. Se recolectaron hojas de los mismos las cuales fueron lavadas vigorosamente con agua

corriente del grifo y un enjuagado final con agua destilada estéril. El material fue cortado en pedazos pequeños y luego colocado en estufa a 70 °C durante ocho días. Posteriormente se redujo el tamaño de forma mecánica y se pulverizó hasta obtener partículas finas, se sometió a maceración en frío usando etanol 96% en recipientes ámbar por 3 días; se filtró y concentró utilizando un concentrador Eppendorf 5301, manteniendo una temperatura de 45°C por 90 min tiempo donde el etanol fue eliminado. Se tomó una alícuota de 0,06 g del extracto concentrado y se solubilizó con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) de grado analítico para lograr una concentración final de 60 mg/mL (7). A partir de este estándar se prepararon soluciones con concentraciones de 20, 30, 40 y 50 mg/mL.

Preparación del inóculo microbiano

Se tomó el cultivo de *L. monocytogenes* ICTA-12446 de 24 horas de crecimiento en agar nutritivo. A partir de allí y con ayuda de un asa de platino se sembró un nuevo cultivo y se incubó a 37°C en caldo nutritivo durante un período de 24 horas. Posterior a este período de tiempo, se realizó una suspensión de la bacteria con agua estéril, ajustando la densidad de la suspensión del cultivo mediante la comparación de medidas de turbidez en un espectrofotómetro (EMCLAB, EMC-11D-V) con respecto a un estándar de 0,5 de Mc Farland de BaSO₄, a fin de garantizar un inóculo inicial de 108 UFC de *L. monocytogenes*/mL. Se verificó la viabilidad de la cepa de *L. monocytogenes* ICTA-12446 para cerciorarse de su crecimiento y autenticidad en placas de agar nutriente y placas de agar PALCAM incubándose durante 24 h a 37°C (8).

Efecto antimicrobiano del extracto etanólico foliar de la planta neem (*Azadirachta Indica* A. Juss)

Para esta evaluación se utilizó el método de dilución en agar. Las diferentes concentraciones del extracto etanólico de neem fueron enfrentadas con una suspensión de *L. monocytogenes* ICTA-12446, de 108 UFC en una relación a partes iguales y empleando cuatro tiempos de contacto (2.5, 5, 10 y 15 minutos). Cumplido cada tiempo de contacto se realizaron diluciones seriadas del extracto (20, 30, 40, 50 y 60mg/mL) se tomaron 100 µL y se inocularon en agar nutritivo por extensión con ayuda de una espátula de Drigalski, se incubaron por 24 h a 37°C. Luego se efectuó el recuento de microorganismos en UFC el cual fue considerado como el número de

microorganismos sobrevivientes.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la concentración más baja de extracto de la planta donde se observó un porcentaje de inhibición de 100%. (9). Por otro lado, el tiempo mínimo de inhibición (TMI) se estableció como el tiempo más bajo en el cual se alcanzó una inhibición de crecimiento microbiano de 100%. Se utilizó como control negativo etanol en cantidades que corresponden al volumen más alto presente en el ensayo de dilución en agar. Además, placas de agar nutritivo inoculadas sin el extracto etanólico de neem añadido sirvieron como control positivo.

Análisis de los Datos

El porcentaje de inhibición microbiana se realizó mediante la fórmula:

$$\%IM = \frac{M_0 - M_f}{M_0} \times 100$$

Donde:

M₀: concentración microbiana inicial

M_f: concentración microbiana final.

Para determinar los cambios en la dinámica poblacional en UFC de *L. monocytogenes* ICTA-12446, de acuerdo a las concentraciones del extracto etanólico de neem usadas en el estudio; se promediaron y se graficaron los valores en UFC obtenidas, a fin de presentar las respectivas tendencias de variación microbianas, comparando cada uno de los tratamientos mediante la aplicación de la prueba de correlación de Spearman (prueba no paramétrica que mide la diferencia entre una distribución observada y otra esperada) empleando un nivel de confianza de 95%. Los datos fueron procesados a través del programa estadístico STATISTIX 9.0.0. Todas las evaluaciones se realizaron por cuadruplicado.

RESULTADOS

La figura 1 muestra los resultados correspondientes al comportamiento de *L. monocytogenes* ICTA-12446, en los diferentes tiempos de contacto evaluados para cinco concentraciones del extracto. En todas las concentraciones de extracto evaluadas, se observa una disminución progresiva lo que es algo comparable con un modo de acción estática.

En los tiempos de contacto 2.5 y 5 minutos se observó un descenso progresivo de la población microbiana conforme se incrementa la concentración del extracto etanólico foliar de neem; sin embargo, a los 2.5 minutos, se presenta una disminución significativa del crecimiento cuando la concentración del extracto es de 50mg/mL, mientras que, a los 5 minutos de contacto este fenómeno se observó a partir de la concentración de 40mg/mL. De igual forma se pudo observar que cuando se incrementa el tiempo de contacto, se obtiene un descenso más marcado de la población microbiana de *L. monocytogenes* ICTA-12446, esto se evidencia a los 10 minutos con una concentración de 20mg/mL del extracto etanólico de neem; por su parte en el tiempo de contacto más elevado empleado (15 minutos) la disminución se hizo evidente en relación a cualquiera de las concentraciones del extracto etanólico foliar de neem utilizada en el ensayo, siendo los niveles más bajos encontrados para la concentración de 50 y 60 mg/mL.

En la figura 2 se muestra el porcentaje de inhibición alcanzado luego de evaluar los diferentes tiempos de contacto del extracto etanólico de neem con el cultivo de *L. monocytogenes* ICTA-12446. Se observa que en los cuatro tiempos de contacto utilizados se llega a porcentajes de inhibición microbiana de 100% cuando se emplea la concentración de 50 y 60mg/mL. Las variables restantes utilizadas van aumentando el porcentaje de inhibición microbiana de forma proporcional a medida que se aumenta la concentración del extracto y el tiempo de contacto.

Al comparar las concentraciones del extracto se evidencia que existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0,002$) entre las concentraciones de 20 y 60 mg/mL, mientras que las concentraciones de 30, 40, 50 y 60 mg/mL tienden a tener un comportamiento relativamente similar. El mismo análisis comparó los tiempos de contacto, encontrándose diferencia significativa entre el tiempo de 2.5 minutos y los restantes (5, 10 y 15 minutos) ($p = 0,03$), no presentando diferencias significativas entre los 5, 10 y 15 minutos ($p = 0,18$).

Se evidencia que el tiempo mínimo requerido para observar algún tipo de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* ICTA-12446, utilizando extracto etanólico foliar de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) bajo el criterio establecido para el TMI es de 2.5 minutos; mientras que la CMI sería de 20mg/mL de extracto etanólico.

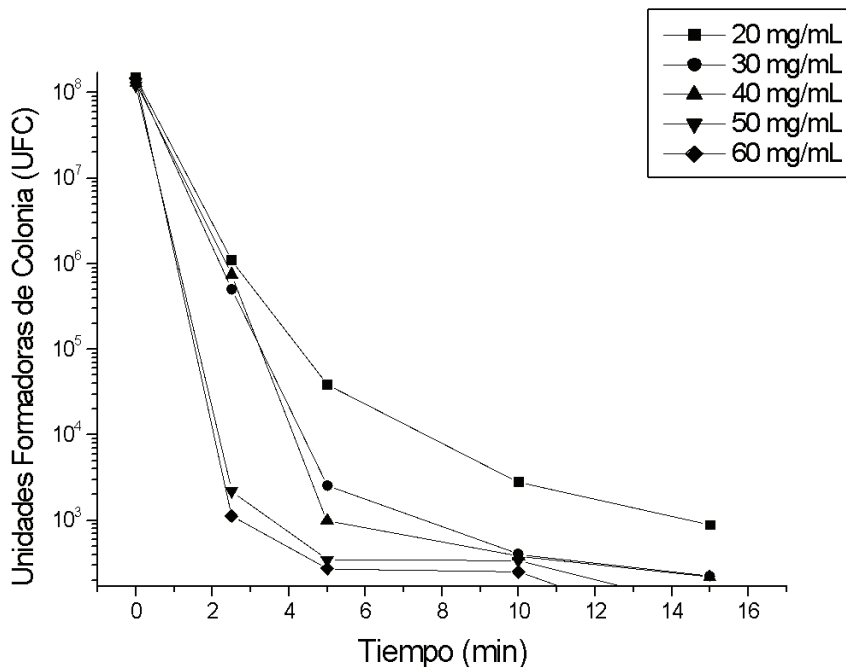


FIGURA 1. Comportamiento poblacional de *L. monocytogenes* a concentraciones variables de extracto etanólico foliar de neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) y tiempos de contacto.

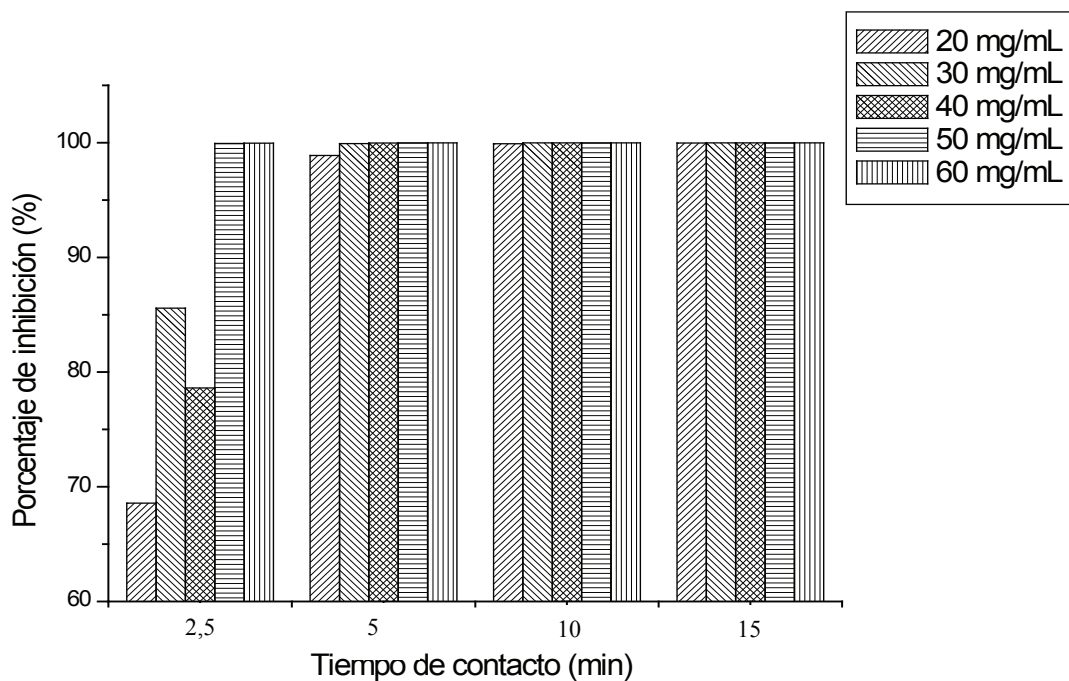


FIGURA 2. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* a concentraciones variables de extracto de neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran un efecto entre 12 y 26 veces más inhibitorio que el reportado por Mahfuzul y col (10), quienes evaluaron el efecto de extractos de neem sobre el crecimiento de varias cepas microbianas, encontrando que los extractos de neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) mostraban actividad antimicrobiana de un 7 a 26% en microorganismos del tipo Gram positivo en estudio, además destacan que la actividad antimicrobiana se desarrolla mejor si el extracto de la planta es etanólico, tal como el realizado en esta investigación. Por su parte, Valarmathy y col. (11), destacan que los extractos etanólico de neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) son más eficaces contra algunas bacterias que extractos provenientes de otras plantas. Esta acción es producto de las propiedades e interacciones químicas presentes, en vista que muchos compuestos polares como flavonoides, taninos, alcaloides, con actividad antimicrobiana, son fácilmente extraídos con ayuda de etanol por lo que estos extractos presentan un eficaz efecto.

Estos porcentajes elevados de inhibición bacteriana confirman los resultados de investigaciones previas que indican que los extractos de las hojas de neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) poseen una buena actividad antibacteriana, siendo que la presencia de algunos metabolitos secundarios como los alcaloides, saponinas, esteroides, triterpenos puede ser las responsables de este efecto mostrando el gran potencial de los compuestos bioactivos que la planta posee (12). La presencia de compuestos fenólicos probablemente ejercen efectos tóxicos a nivel de la membrana donde se acumulan y provocan una pérdida de integridad interviniendo en la formación de las estructuras lipídicas del microorganismo, ocasionando daño y muerte celular. En base a esto, Barsagade y Wagh en el año 2010 (13) sugieren que los agentes bioactivos de la planta tienen una gran actividad como compuestos antimicrobianos y que, por lo tanto, pueden ser utilizados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Se puede concluir, que aunque la concentración de extracto de 20 mg/mL y el tiempo de 2.5 minutos fueron las variables donde se alcanzó 100% de inhibición por separado, partiendo desde el punto de vista estadístico, la mejor opción a tomar en consideración para alcanzar un efecto óptimo en conjunto sería el empleo de 30mg/mL con 5 minutos de tiempo de contacto. Además, los resultados obtenidos dan base para inferir

que el extracto etanólico foliar de la planta neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) puede ser una herramienta útil para el control de *Listeria monocytogenes* y muy beneficioso desde el punto de vista de la industria alimentaria, presentando ventajas tales como: es biodegradable, es menos tóxico que otras sustancias coadyuvantes, y no desequilibra la biodiversidad de los agroecosistemas dado que se estaría obteniendo un producto natural de bajo costo que puede ser usado como conservante lo que tendría gran impacto en la economía ya que, al contar con un buen control de los microorganismos, los alimentos producidos tendrán una mejor calidad y ello se verá reflejado en las ventas del producto. Además, podría generar brechas de gran interés para la industria farmacéutica porque a partir de un producto con capacidad para inhibir microorganismos se pueden originar nuevos antibióticos para el control de patógenos. Por otro lado, este extracto podría utilizarse como coadyuvante con otros compuestos que produzcan inhibición, para así provocar efectos sinérgicos amplios para el tratamiento y prevención de estos contaminantes en alimentos.

REFERENCIAS

1. Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro sur* 2009; 37(1):1-8.
2. Ramírez L, Morón de Salim A, Alfieri A, Gamboa O. Detección de *Listeria monocytogenes* en queso blanco criollo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Arch Latinoamer Nutr* 2010; 60(3):254-260.
3. Ramírez L, Morón de Salim A, Alfieri A, Gamboa O. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates (*Lycopersicon esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos en tres supermercados de Valencia. Venezuela. *Arch Latinoamer Nutr* 2009; 59(3):318-324.
4. Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J FoodMicrobiol* 2012; 156:7-17.
5. Subapriya R, Nagini S. Medicinal properties of neem leaves: a review. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005; 5(2):149-6.
6. López Y, Escalante M, Martínez 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 el bacteriófago P22. *Bioquímica* 2007; 32(4):117-125.
7. Atep D, Erdoúrul Z. Antimicrobial Activities of Various Medicinal and Commercial Plant Extracts.

- Turk J. Biol. 2003; 27: 157-162.
8. Ramírez Mérida L, Morón de Salim A, Catinella R, Castillo L. Efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de Aloe vera sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. Arch Latinoamer Nutr 2012; 62 (1): 73-78.
 9. Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schempp C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. Phytomedicine 2007;14: 508–516.
 10. Mahfuzul H, Bari M, Inatsu Y, Vijay K, Kawamoto S. Antibacterial activity of guava (*Psidium guajava* L.) and neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria. Mary Ann Liebert 2007; 4(4): 481-488.
 11. Valarmathy K, Gokulakrishnan M, Kausar M, Kusum P. A study of antimicrobial activity of ethanolic extracts of various plant leaves against selected microbial species. IJPR 2010; 1(8): 293-295
 12. Koon S, Budida S. Antibacterial potential of the extracts of the leaves of *Azadirachta Indica* A. Juss. NotSci Biol 2011; 3(1): 65-69.
 13. Barsagade N, Wagh G. Comparative screening of leaf extracts of common plants and weeds for their antibacterial and antifungal activities. Asiatic J. Biotech Res; 3(1): 227-232.

Recibido: 08-10-2015
Aceptado: 19-12-2015