

Evaluación de actividad antimicrobiana de MORINGA (Moringa oleífera)

Evaluation of antimicrobial activity of MORINGA (Moringa oleífera)

Investigación Terminada

Benavides Julie

Facultad de Ciencias y Biotecnología

Grupo de Investigación ICIF-CES

ralvarezq@ces.edu.co

Ramírez Valentina

Facultad de Ciencias y Biotecnología

ramirezm.valentina@uces.edu.co

Universidad CES

Programa de Química Farmacéutica

Resumen

Moringa (*Moringa oleífera*) es un árbol originario del sur del Himalaya, es rico en vitaminas y con un valor alto en aminoácidos libres; por su valor nutritivo es utilizado en alimentación humana y animal. Las hojas de moringa contienen diversos metabolitos secundarios como: glucosinolatos, isotiocianatos, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y cinamatos, los cuales en estudios *in vitro* presentaron actividad contra microorganismos patógenos. En este trabajo se realiza la evaluación de la actividad antimicrobiana de acuerdo a la norma de referencia estándar CLSI M07-A9 e implementando el método de microdilución en platos de 96 pozos, para establecer el efecto de extractos etanólicos obtenidos mediante diferentes procesos de extracción de hojas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC: 6538) y *Bacillus subtilis* (ATCC: 6633). La medición del crecimiento bacteriano a una longitud de onda de 625 nm, mostró un porcentaje de inhibición significativo del 61% (*S. aureus*) y 19% (*B. Subtilis*), respecto a ciprofloxacina a una concentración de 2 mg/mL. La eficacia antimicrobiana del extracto de moringa provee una base científica cuantitativa muy promisoría para su eventual uso como antimicrobiano; sin embargo, se requiere del aislamiento y purificación de los fitoquímicos responsables de la bioactividad, además se recomienda la evaluación de su citotoxicidad y genotoxicidad. Lo anterior es un aporte a la constante búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas que permitan ofrecer alternativas fitoterapéuticas contra cepas multiresistentes de microorganismos.

Abstract

Moringa (*Moringa oleífera*) is a tree native to the southern Himalayas, it is rich in vitamins and a high value in free amino acids, for its nutritional value is used in human and animal feed. Moringa leaves contain various secondary metabolites such as: glucosinolates, isothiocyanates, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins and cinnamates, which *in vitro* studies showed activity against pathogenic microorganisms. In this work, the evaluation of the antimicrobial

activity is carried out according to the standard reference standard CLSI M07-A9 and implementing the method of microdilution in 96-well plates, to establish the effect of ethanol extracts obtained through different extraction processes of leaves on strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC: 6538) and *Bacillus subtilis* (ATCC: 6633). The measurement of bacterial growth at a wavelength of 625 nm showed a significant inhibition percentage of 61% (*S. aureus*) and 19% (*B. Subtillis*) with respect to ciprofloxacin at a concentration of 2 mg / mL. The antimicrobial efficacy of moringa extract provides a very promising quantitative scientific basis for its eventual use as an antimicrobial, however, isolation and purification of the phytochemicals responsible for bioactivity is required, in addition the evaluation of its cytotoxicity and genotoxicity is recommended. The above is a contribution to the constant search for new antimicrobial substances that allow us to offer phytotherapeutic alternatives against multiresistant strains of microorganisms

Área de Conocimiento

Ciencias farmacéuticas (Productos naturales bioactivos).

Pharmaceutical Sciences (Bioactive natural products).

Palabras Clave

Actividad antimicrobiana, moringa, microdiluciones, procesos de extracción.

Keywords

Antimicrobial activity, moringa, microdilutions, extraction processes.

1. Introducción

Moringa oleifera, árbol perteneciente a la familia Moringaceae, es nativo de las estribaciones meridionales del Himalaya y, en la actualidad, se cultiva prácticamente en todas las regiones tropicales, subtropicales y semiáridas del mundo. Puede crecer en condiciones de escasez de agua, pero su cultivo intensivo, con irrigación y fertilización, aumenta los rendimientos de biomasa hasta superar las 100 toneladas por hectárea. (Foidl, Makkar . & Becker, K, 2001). Las hojas, las flores, los frutos y las raíces son apreciados por su valor nutritivo y pueden ser usados en alimentación humana como animal. Las hojas son excepcionalmente ricas en vitaminas y diferentes aminoácidos (Fuglie. 2001). Reportes sobre composición química revelan la presencia de diferentes fitoquímicos como: glucosinolatos, isotiocianatos, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y cinamatos (Fröhlich & Plate, 2000). El alto contenido de vitaminas, minerales y otros fitoquímicos como vainillina, ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ascorbatos, tocoferoles, β -sitosterol, moringina, moringinina y fitoestrógenos (Singh, 2009). Compuestos aislados de la planta como el isotiocianato de bencilo y el 4-(L- α -ramnopiranosiloxi)-glucosinato de bencilo presentan actividad anticancerígena, hipotensiva y antibacteriana (Fahey, 2005). La evaluación científica de los procesos de utilización de la planta, así como la identificación de principios activos y mecanismos de acción, han permitido explicar muchos de los efectos beneficiosos previamente conocidos, optimizar su explotación y proponer nuevas aplicaciones.

El presente trabajo presenta la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de moringa con el fin de proveer una base experimental y cuantitativa para su eventual uso como antimicrobiano. Para la obtención del extracto se realizaron diferentes métodos, los cuales fueron discutidos en torno a su rendimiento y al reconocimiento cualitativo de metabolitos secundarios.

Estructura del artículo

En la Sección 2 se presenta los objetivos del proyecto, la Sección 3 explica los materiales y métodos, la Sección 4 presenta los resultados y en las Secciones 5 y 6 se ofrece el análisis de resultados y las conclusiones. Finalizando, en la sección 7 se tienen las referencias bibliográficas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de moringa, con el fin de proveer una base científica cuantitativa para su eventual uso como antimicrobiano

2.2 Objetivos específicos

- Realizar diferentes métodos de extracción para definir en términos de rendimiento y obtención cualitativa de metabolitos secundarios para el mejor proceso.
- Identificar metabolitos secundarios en los extractos mediante marcha fitoquímica.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de moringa por el método de micro diluciones.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

Etanol 96% JT BAKER; Moringa hojas BioNaturals®, DMSO 90%, ácido clorhídrico 1M, hidróxido de sodio 1M, reactivo de Dragendorff, limaduras de magnesio, reactivo gelatina-sal (1:1), urea 0.1M, cloruro férrico al 10%, agua estéril, caldo Mueller Hinton Oxoid. Cepas Staphylococcus aureus (ATCC:6538) y Bacillus subtilis (ATCC:6633) en agar tripticasa soya lote. G19022, ciprofloxacina inyectable 2mg/mL. Balanza Ohaus (Pioneer), Estufa Memert (400), Rotaevaporador Heidolph (Hei Vap), Plancha de calentamiento Corning (PC420D) Ultrasonido Elba (Easy 30H), Vortex IKA (MS3D), lámpara ultravioleta Camag, micropipetas de 1000 µL y 200 µL Brand, refrigerador Thermo Scientific, Cabina de flujo laminar Streamline (ESCO), autoclave Tuttnaver, incubadora Panasonic, espectrofotómetro Biotek Synergy®.

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción de material vegetal: el material vegetal se secó por 48 horas a 40°C en una estufa de convección natural, posteriormente fue triturado en un molino de doble hélice y se llevó a los siguientes procesos de extracción, según la literatura (British Pharmacopoeia, 2016) -Método extracción por vórtex: 1 g de material vegetal se sometió a agitación a 500 rpm a 25 °C por 30 minutos.

- Método extracción por baño maría: 1 g de material vegetal se sometió a baño maría a 40 °C por 30 minutos.
- Método extracción por ultrasonido: 1 g de material vegetal se sometió a ultrasonido a 25 °C por 30 minutos.

- Método extracción por maceración: 25g del material se adicionan en 160mL de etanol al 96% y se deja en reposo en frasco de vidrio hermético protegido de la luz por ocho días.

Todos los extractos se sometieron a rotaevaporación para eliminación del solvente y se almacenaron a -20°C en frasco de vidrio hermético ámbar para su posterior utilización. El cálculo del rendimiento del extracto por cada método se realizó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ rendimiento} = (\text{Peso extracto final} / \text{peso extracto inicial}) \times 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de rendimiento

El peso del extracto final corresponde a los gramos de extracto obtenido luego del proceso de rotaevaporación y el peso del extracto inicial es los gramos de material seco utilizado en cada método de extracción.

3.2.2 Reconocimiento de metabolitos secundarios: se realizó mediante el uso de pruebas fitoquímicas reportadas en literatura (Martinez, Valencia & otros, 2008), las cuales son una prueba química de caracterización consistente en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular de un compuesto, son pruebas de tipo cualitativo que dan indicio de la presencia o ausencia de un metabolito secundario en particular.

3.3.3 Evaluación de actividad biológica: se realizó mediante microdiluciones, siguiendo el protocolo CLSI-M07A9 (“Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing”, 2012) con algunas modificaciones (Cockerill, 2015). Para el ensayo, las colonias de las bacterias iniciaron con una absorbancia medida a 625nm de 0.08, la cual es equivalente a 0.5 en la

escala de McFarland. En cada micro pozo se colocó 100µL de inóculo, 50µL de caldo Mueller Hinton y 50 µL de las muestras a analizar, para el control positivo se reemplazó la muestra por el antibiótico, para el control de crecimiento se utilizó 50µL de agua estéril y para el control de esterilidad se incluyó 100µL de caldo Mueller Hinton y 100µL de agua estéril, todos los pozos conservaron un volumen final de 200 µL. Antes de la medición en el espectrofotómetro a 625 nm, todos los platos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas. Todos los extractos fueron filtrados previamente por membrana de 0,22 µm estéril, y se realizó medición de los extractos para la corrección de absorbancia. El resultado de actividad antimicrobiana se determinó mediante el porcentaje de inhibición de crecimiento utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [(Absorbancia \text{ Control} - Absorbancia \text{ extracto}) / Absorbancia \text{ control}] \times 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de inhibición de crecimiento

Para el diseño estadístico se realizaron mediciones por triplicado, con concentraciones del extracto de 10 mg/mL y 5 mg/mL preparados con DMSO. Los datos fueron tabulados en Microsoft® Excel® donde se obtuvieron las medias de las absorbancias de cada análisis, además se graficó para cada tipo de bacteria el comportamiento de cada una de las muestras.

4. Resultados

En la Tabla 1 se presenta el porcentaje de rendimiento del extracto de moringa obtenido luego de realizar diferentes métodos de extracción.

Tabla 1. Rendimiento de extracción de material vegetal

Método de extracción	Material vegetal obtenido	Rendimiento
Vórtex	0.1349±0.001g	13.49±0.001%
Baño maria	0.1336±0.001g	13.36±0.001%
Ultrasonido	0.1861±0.001g	18.61±0.001%
Maceración	5.7885±0.1 g	32.1583±0.001%

En la Tabla 2 se presenta los metabolitos secundarios identificados para el extracto de moringa luego de realizar diferentes métodos de extracción, en la tabla la presencia se identifica con signo "+" y la ausencia con signo "-".

Tabla 2. Metabolitos secundarios en extractos etanólicos de moringa

Metabolito secundario	Método de extracción			
	vórtex	baño maria	ultrasonido	maceración
Alcaloides	+	-	+	+
Flavonoides	-	+	+	+
Saponinas	-	-	+	+
Taninos	+	-	+	+
Antocianinas	+	-	+	+
Cumarinas	-	-	+	+

En la Tabla 3 se presentan los resultados de actividad biológica frente *S. aureus* y *B. subtilis* obtenida con el extracto de moringa por el método de maceración, evaluado a dos concentraciones, y el resultado obtenido por el antibiótico ciprofloxacina a concentración de una presentación comercial inyectable de 2mg/mL.

Tabla 3. Actividad del extracto de moringa obtenido por maceración y el resultado del control positivo

Muestra ensayada	%inhibición <i>S. aureus</i>	%inhibición <i>B. subtilis</i>
Extracto a 5 mg/mL	57.57	10.40
Extracto a 10 mg/mL	61.39	19.31
Ciprofloxacina a 2 mg/mL	87.63	83.12

5. Análisis de resultados

El proceso de maceración produjo el mejor porcentaje de rendimiento y la presencia de todos los metabolitos secundarios evaluados, por esta razón, fue el extracto seleccionado para los ensayos de actividad biológica. Con el método de ultrasonido se potenció la suspensión de tejido vegetal, lo cual permitió para la obtención de metabolitos, sin embargo, el rendimiento sigue siendo bajo. El método de vórtex generó una agitación suave del material y el baño maría un proceso térmico que podría impedir la extracción de materiales sensibles a la temperatura, por tanto, estos dos métodos no generan altos porcentajes de rendimiento ni la presencia de

los diferentes compuestos fitoquímicos. En los diferentes extractos los metabolitos secundarios registrados corresponden a los informados previamente por diferentes autores.

La inhibición obtenida con el extracto etanólico de moringa mostró resultados significativos, si se compara con el porcentaje obtenido con el antibiótico comercial ciprofloxacina a una concentración de 2mg/mL, lo anterior representa una base científica cuantitativa que permite establecer el uso en fitoterapia del extracto como antimicrobiano (Sánchez, 2006).

6. Conclusiones

La eficiencia de los procesos de extracción de material vegetal está determinada por varios factores que tienen relación directa con la solubilidad de los componentes a extraer, temperatura, tamaño de la partícula, porosidad, impurezas, agitación, la capacidad de disolución y cantidad del solvente, es por ello que estos procedimientos se han perfeccionado para mejorar el rendimiento y la composición de diferentes metabolitos secundarios como es el caso del proceso de maceración.

El resultado de actividad antimicrobiana obtenida con el extracto etanólico de moringa obtenido con el proceso de maceración representó un aporte a la constante búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas que permitan ofrecer terapias a cepas multiresistentes de microorganismos a partir de recursos naturales de origen vegetal; sin embargo, se requiere del aislamiento y purificación de los diferentes fitoquímicos de este extracto, para establecer los compuestos responsables de esta actividad y de la evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad de estas fracciones.

7. Referencias

- [1] Foidl, N.; Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2001). "The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses". In: *The miracle tree: The multiple attributes of Moringa*. (Ed. J. Lowell Fuglie). CTA Publication. Wageningen, The Netherlands. p. 45.
- [2] Fuglie, L. J. (2001). "Combating malnutrition with *Moringa*". In: *The miracle tree: the multiple attributes of Moringa*. (Ed. L.J. Fuglie). CTA Publication. Wageningen, The Netherlands.p. 117.
- [3] Fröhlich, B. and Plate, J. (2000). "The cubic mouse: a new device for three-dimensional input". In: Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems (The Hague, The Netherlands, April 01 - 06, 2000). CHI '00. ACM, New York, NY, 526-531. Recuperado de: DOI= <http://doi.acm.org/10.1145/332040.332491>.
- [4] Singh, B.N. (2009). "Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*." *Food Chem. Toxicol.* 47:1109.
- [5] Fahey, J. (2005). "*Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties". *J. Trees for Life.* 1:5.
- [6] British Pharmacopoeia. (2016). General Notices. Herbal Drugs preparations. Volume IV. London: The Stationery Office. p. 43-51
- [7] Martinez A, Valencia G, Jimenez N, Mesa M, Galeano E. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica*. Medellín: Universidad de Antioquia. p. 5-14.
- [8] Cockerill. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, 22nd Informational Supplement.

- [9] Sánchez, J. S. (2006). "Resistencia a antibióticos". *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48 v (2), 105–112.

Este material es presentado al *II Encuentro Interinstitucional de Semilleros de Investigación UNAB*, una actividad carácter formativo. La Universidad Autónoma de Bucaramanga se reserva los derechos de divulgación con fines académicos, respetando en todo caso los derechos morales de los autores y bajo discrecionalidad del grupo de investigación que respalda cada trabajo para definir los derechos de autor. **Conserve esta información.**