

EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE MORINGA OLEIFERA SOBRE ESCHERICHIA COLI β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Zhandra Arce-Gil¹
 Alejandra Barrera-Aguinaga¹
 Elizabeth Herrera-Sanchez¹
 María Gracia Suárez-Zulueta¹
 Daniela Rojas-Acuña¹
 Erick Suclupe -Farro¹
 Sebastian Iglesias-Osores²



¹ Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo. Lambayeque, Perú
² Hospital Regional Lambayeque

Correspondencia: Sebastian Iglesias Osores
 email: sebasiglo@gmail.com

Todos los autores han participado en la concepción, diseño, recolección de datos, revisión crítica del artículo, análisis e interpretación de los resultados, y han aprobado la versión final.

Recibido: 10/10/2019

Aceptado: 25/10/2109

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto inhibitorio de *M. oleifera* en cepas de *E. coli* BLEE CTX-M, TEM y SHV. **Materiales y métodos:** Tres cepas de *E. coli* BLEE (CTX-M, TEM y SHV) x10⁶ ufm/mL aisladas de urocultivos del Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo, fueron expuestas a un extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera*, a concentraciones de 5% y 10%. Se cuantificó el crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría, los ensayos se realizaron por triplicado. **Resultados:** Se evidenció disminución de crecimiento bacteriano, en las cepas *E. coli* BLEE genes CTX-M, SHV y TEM a comparación del control. **Conclusión:** *M. oleifera* posee actividad bacteriostática en un tiempo de 8 horas, sobre *E. coli* BLEE genes SHV, CTX y TEM.

Palabras clave: *Escherichia coli* β -Lactamasas, *Moringa oleifera*.

INHIBITORY EFFECT OF MORINGA OLEIFERA SEED EXTRACT ON EXTENDED SPECTRUM ESCHERICHIA COLI LACTAMASES

ABSTRACT

Objective: To determine the effect of *M. oleifera* on *E. coli* BLEE strains genes CTX-M, TEM and SHV. **Materials and methods:** three strains of *E. coli* BLEE from different genes isolated from urocultures of Almanzor Hospital. Strains were exposed to *Moringa oleifera* seeds aqueous extract at concentrations of 5% and 10%. Subsequently, bacterial growth was quantified by spectrophotometry. **Results:** A decrease of the bacterial growth was observed, in comparison to the control, in *E. coli* BLEE strains genes CTX-M, SHV and TEM. **Conclusion:** *M. oleifera* has bacteriostatic activity during 8 hours, with *E. coli* BLEE genes SHV, CTX and TEM.

Keywords: beta-Lactamases, *Escherichia coli*, *Moringa oleifera*.

INTRODUCCIÓN

El uso descontrolado de antibióticos es una desventaja que conlleva a múltiples daños y problemas, entre ellos la multidrogorresistencia, propiedad de ciertos microorganismos patógenos responsable de la resistencia antibiótica (1,2), debido a la presencia de enzimas como las β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE), capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de algunos fármacos como Penicilina, Cefalosporina y Monobactam (2-4); responsables del incremento en la morbilidad y mortalidad de pacientes intrahospitalarios en nuestro país (3).

Estas bacterias son patógenos importantes a nivel hospitalario y también en pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad, frecuentemente se les relaciona con infecciones nosocomiales y que confirman que 35,3% de las bacteriemias son causadas por microorganismos conteniendo la presencia de la enzima β -lactamasa (5).

Moringa oleifera (Moringaceae) es una planta altamente valorada, distribuida en muchos países de los trópicos y subtropicales. Tiene una impresionante gama de usos medicinales con alto valor nutricional. Varias partes de esta planta, como las hojas, raíces, semillas, corteza, fruta, flores y vainas inmaduras, actúan como estimulantes cardíacos y circulatorios, poseen efecto antitumoral, anti-pirético, antiepiléptico, antiinflamatorio, antiulceroso, son antibacterianas y antifúngicas, y se están empleando para el tratamiento de diferentes dolencias en el sistema de medicina indígena (6). Se han probado sus efectos antibacterianos in vitro de extractos de partes de la planta en algunos estudios (7). A pesar de las prometedoras propiedades antimicrobianas de *M. oleifera*, son pocos los trabajos en donde se la enfrenta con bacterias multidrogo resistentes, se planteó determinar el efecto del extracto acuoso de semilla de *Moringa oleifera* frente a cepas de *Escherichia coli* BLEE portadoras de genes SHV, TEM, CTX-M con la finalidad de comprobar el poder inhibitorio del extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población de estudio

Estudio experimental de estímulo creciente, realizado entre marzo a noviembre del 2017; la población estuvo constituida por cepas de *E. coli* BLEE y la muestra estuvo constituida por tres cepas de *E. coli* BLEE, confirmadas microbiológicamente y molecularmente del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo, aisladas de urocultivos del Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo de Chiclayo- Lambayeque, Perú, durante el año 2014.

Para la determinación de la curva de crecimiento se usó el espectrofotómetro (UV-VIS Spectrophotometer Pharo

300 Spectroquant®- MERCK) partiendo de concentraciones con un valor de absorbancia de 0.6-0.8 de densidad óptica (D.O) medidas a 600 nm. La concentración bacteriana fue determinada en un total de ocho horas siendo medida con el espectrofotómetro a cada hora. El extracto acuoso fue a partir de semillas de *M. oleifera* previamente lavadas con agua destilada y secadas en estufa a 37 °C. Se pesaron y trituraron 5 g y 10 g por triplicado, se adicionó 100 mL de agua bidestilada, agitándose a 400 rpm por 30 min. Dejándose sedimentar por 20 minutos, pasando el sobrenadante por un filtro Milipore de 20 μ m utilizando una jeringa de 20 mL. La solución fue almacenada en refrigeración (4 - 8 °C) hasta su uso.

Las *E. coli* BLEE fueron sembradas en 100 mL de caldo Lauril Triptosa - LT (MERCK) por 24 horas a 37 °C. Las muestras fueron procesadas inoculando 1 mL de caldo nutritivo de *E. coli* BLEE previamente cultivada en 20 mL de caldo LT y 5 mL de extracto de semillas de *M. oleifera* a 37 °C, en un matraz de 100 mL. Este procedimiento se siguió para cada cepa bacteriana analizada con las dos concentraciones del extracto al 5% y 10%, realizándose tres repeticiones para cada concentración por cepa. Se consideró el promedio de las absorbancias de las tres repeticiones en cada hora representado en gráficos para cada ensayo. El proyecto fue aprobado por el comité de ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo.

RESULTADOS

Las cepas de *E. coli* Blee portadoras de los genes SHV, CTX-M y TEM fueron caracterizadas molecularmente, estas fueron enfrentadas a las concentraciones de *M. oleifera* a 5% y 10%, se obtuvieron tres gráficos en los que se observan la influencia del extracto acuoso de semilla de *M. oleifera* sobre las curvas de crecimiento bacteriano dadas en términos de absorbancia y tiempo, donde la inhibición en crecimiento bacteriano se evidencia por la disminución en los valores de absorbancia en comparación con la cepa control, siendo medidos por un tiempo de ocho horas. Se pudo apreciar una amplia diferencia de crecimiento de la cepa *E. coli* Blee portadora del gen SHV, en relación con el control y las dos concentraciones del extracto acuoso de semilla (Figura 01).

Las cepas *E. coli* Blee portadoras de los genes TEM y CTX-M también muestran inhibición del crecimiento al ser enfrentadas con el extracto acuoso de semillas (Figura 02 y Figura 03). Las tres cepas muestran una mayor inhibición del crecimiento a la concentración del 10%.

DISCUSIÓN

En esta investigación se buscó el efecto inhibitorio de

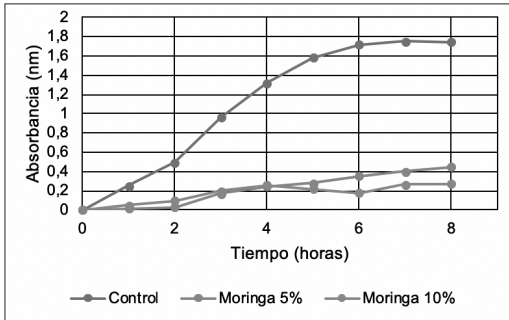


Fig. 01: Inhibición de crecimiento bacteriano de *E. coli* BLEE-SHV frente a *M. oleifera* a 8 horas.

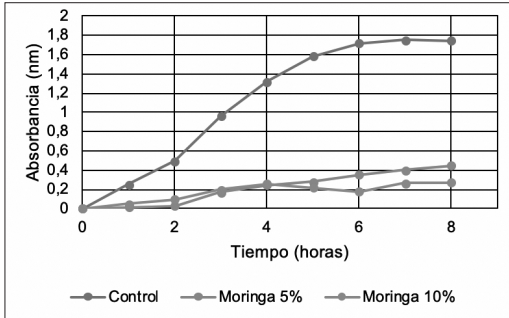


Fig. 02: Inhibición de crecimiento bacteriano de *E. coli* BLEE-TEM frente a *M. oleifera* a 8 horas.

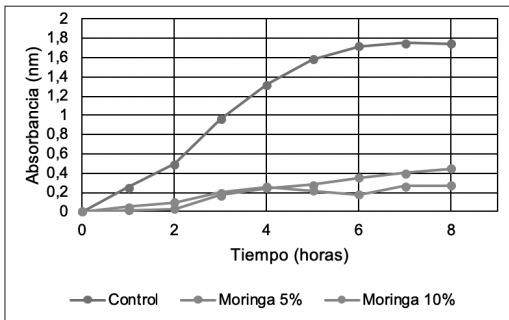


Fig. 03: Inhibición de crecimiento bacteriano de *E. coli* BLEE-CTX-M frente a *M. oleifera* a 8 horas.

dos concentraciones de extracto de semillas de *M. oleifera* contra tres cepas de *E. coli* Blee, encontrando que moringa tiene efecto bacteriostático sobre las tres cepas de *E. coli* Blee estudiadas. Otra investigación ejecutada en Chiclayo - Lambayeque, detectó por PCR los genes BLEE en *E. coli* aisladas de urocultivos de pacientes locales, siendo los causales los genes SHV, TEM, CTX-M, destacando el gen SHV como el más frecuente (3). Estos patógenos requieren nuevas estrategias para ser combatidos; una

propuesta es *Moringa oleifera*, planta nativa del noreste de India, conocida por la propiedad antibacteriana de sus hojas, raíces y semillas. Diferentes estudios reportan el poder bactericida del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Moringa oleifera* (8-11). En Ecuador, se analizó el efecto antimicrobiano de *M. oleifera* para *E. coli* evidenciando leve actividad antibacteriana (12), mientras que otro estudio reportó que dicho extracto presentó alta actividad bactericida con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 128 ug/mL (8). Asimismo, una investigación de El Cairo afirmó que dicha planta posee un porcentaje de inhibición de crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas de 85% (11). No obstante, han 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 (4,13).

Cuando se compararon las curvas de crecimiento bacteriano de la cepa control versus las curvas de crecimiento bacteriano de las cepas multidrogoresistentes expuestas a las dos concentraciones de *Moringa*, se observó que existe menor crecimiento bacteriano en todas las pruebas. Diferentes estudios han demostrado in vitro la actividad antimicrobiana con poder bactericida de los extractos etanólicos y metanólicos de semillas de *Moringa* sobre especies patógenas, así tenemos que los extractos de semilla de esta planta muestran actividad antimicrobiana contra patógenos humanos tales como *S. aureus*, *E. coli* y *V. cholerae* (14,15). La formación de biofilms de *S. aureus* y *P. aeruginosa* han sido inhibidos hasta en un 83% al enfrentarse a flavonoides extraídos de semillas de *M. oleifera*; en levaduras se ha reportado hasta un 80% de inhibición en el caso de *Candida spp*, porcentajes muy similares a los alcanzados al enfrentarlos a los antibióticos o antifúngicos respectivamente (16).

Moringa afecta sobre todo a la cepa *E. coli* -SHV, siendo este un gen de naturaleza cromosómica y el que se expresa con mayor frecuencia en este tipo de bacterias (3). *Moringa* al 10% tiene mayor efecto inhibitorio que al 5% para las tres cepas en estudio, como lo dice el estudio de Dzotam debiéndose tal vez a la presencia en mayor cantidad de las proteínas lectinas encontradas en los extractos de semillas de esta planta que muestran actividad antibacteriana pues se ha demostrado que estas causan daño celular bacteriano mediante la rápida fusión a las membranas interna y externa, lentificando la fisión binaria y con esto el crecimiento bacteriano (13), siendo usadas actualmente como un método natural para el tratamiento de aguas, reportándose tener actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli*, y un efecto bactericida frente a

Pseudomonas fluorescens, *Serratia marcescens* y algunas especies de *Bacillus* (17).

Entre las limitaciones de esta investigación lo serían haber realizado la medición de la densidad óptica por un tiempo de 8 horas, siendo necesario en futuros trabajos llegar a un mayor reporte en horas. También determinar la concentración mínima inhibitoria y realizar lectura en paralelo de cultivos bacterianos.

CONCLUSIONES

De este trabajo podemos concluir que las dos concentraciones del extracto acuoso de semillas de *M. oleifera* tuvieron actividad bacteriostática en un tiempo de 8 horas, sobre el crecimiento de cepas *E. coli* Blee con genes SHV, CTX y TEM. Siendo más vulnerable la cepa que expresa el gen SHV. De esta manera, *Moringa* puede ser una alternativa de terapia natural contra microorganismos que presentan alta resistencia antibiótica como lo son *E. coli* Blee.

Este artículo ha sido financiado por los autores, que declaran no tener conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Gómez J, García-Vázquez E, Hernández-Torres A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quim*. 2015;28(1):1-9.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268-81.
- Arce Z, Llontop J, Alarcón E, López E. Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de *Escherichia coli* β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo-Perú. *Rev cuerpo méd HNAAA*. 2014;7(3).
- García C. Enterobacterias productoras de B-lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta Médica Peru*. 2012;29(3):163-9.
- Adrianzén D, Arbizu Á, Ortiz J, Samalvides F. Mortalidad por bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productoras de beta lactamasas de espectro extendido: cohorte retrospectiva en un hospital de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2013;30(1):18-25.
- Anwar F, Latif S, Ashraf M, Gilani AH. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses [Internet]. Vol. 21, *Phytotherapy Research*. John Wiley & Sons, Ltd; 2007 [cited 2019 Sep 19]. p. 17-25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2023>
- Peixoto JRO, Silva GC, Costa RA, de Sousa-Fontenelle J, Vieira GHF, Filho AAF, et al. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2019 Sep 19];4(3):201-4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S199576451600692>
- Dzotam JK, Touani FK, Kuete V. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Dec;16(1):9.
- Saini RK, Sivanesan I, Keum YS. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. Vol. 6, 3 *Biotech*. Springer; 2016. p. 203.
- Elgamily H, Moussa A, Elborae A, El-Sayed H, Al-Moghazy M, Abdalla A. Microbiological assessment of *Moringa oleifera* extracts and its incorporation in novel dental remedies against some oral pathogens. *Maced J Med Sci*. 2016 Dec;4(4):585-90.
- Al Husnan LA, Alkahtani MDF. Impact of *Moringa* aqueous extract on pathogenic bacteria and fungi in vitro. *Ann Agric Sci*. 2016 Dec;61(2):247-50.
- Azuero A, Jaramillo C, San Martín D, D'Armas Regnault H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Cienc Unemi*. 2018 Dec;9(20):11.
- Dasgupta S, Kumar Gunda NS, Mitra SK. Evaluation of the antimicrobial activity of *Moringa oleifera* seed extract as a sustainable solution for potable water. *RSC Adv*. 2016 Mar;6(31):25918-26.
- Alegbeleye OO. How Functional Is *Moringa oleifera*? A Review of Its Nutritive, Medicinal, and Socioeconomic Potential. Vol. 39, *Food and Nutrition Bulletin*. 2018. p. 149-70.
- Moura MC, Napoleão TH, Coriolano MC, Paiva PMG, Figueiredo RCBQ, Coelho LCBB. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol*. 2015 Sep;119(3):666-76.
- Onsare JG, Arora DS. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*. 2015 Feb;118(2):313-25.
- Ferreira RS, Napoleão TH, Santos AFS, Sá RA, Carneiro-da-Cunha MG, Morais MMC, et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Lett Appl Microbiol*. 2011 Aug;53(2):186-92.