

Evaluación del efecto antimicrobiano de polifenoles obtenidos mediante una tecnología híbrida a partir de hojas de moringa

M.A. Pérez-Maldonado¹, A.C. Flores-Gallegos^{1*}, R. Rodríguez-Herrera¹, J.A. Ascacio-Valdés¹, A. Sáenz-Galindo²

1 Departamento de Investigación en Alimentos. 2 Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. *Email: carolinaflores@uadec.edu.mx

RESUMEN: Desde la antigüedad se han utilizado diferentes tipos de plantas como tratamientos medicinales, antiinflamatorios y antisépticos, por lo que la utilización de estas como fuentes para la obtención de moléculas de interés, es sumamente importante. Entre la gran variedad de compuestos presentes en las plantas se encuentran los polifenoles, metabolitos útiles para las plantas contra radiaciones, infecciones de patógenos, entre otras funciones adaptativas (Osowski *et al.*, 2017). En este trabajo se obtuvieron extractos polifenólicos de diferentes tipos de fuentes vegetales mediante una tecnología híbrida ultrasonido-microondas, con el objetivo de encontrar una utilidad a todos aquellos materiales desperdiciados o deshechos tras el procesamiento de la planta o fruto. De las fuentes vegetales probadas, se presentan los resultados de hojas de plantas. Se evaluó la actividad antimicrobiana contra tres bacterias transmisoras de enfermedades por alimentos, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Listeria homocytogenes* comparando la medición inicial y final. Posteriormente se evaluaron cinéticas de crecimiento de los tratamientos, logrando observar el comportamiento del crecimiento microbiano. El análisis estadístico permitió identificar los mejores tratamientos, siendo las relaciones de extracción AxB y BxB aquellas con mejor efecto inhibitorio.

Palabras Claves: Antimicrobianos, enfermedades transmitidas por alimentos, polifenoles.

ABSTRACT: Since ancient times, different kinds of plants have been used as medicinal, anti-inflammatory and antiseptic treatments, so the use of plants as sources of molecules of interest, is extremely important. Polyphenols are among the great variety of compounds present in plants, metabolites useful for plants against radiation, pathogen infections, and other adaptive functions (Osowski *et al.*, 2017). In this work polyphenolic extracts of different types of plant sources were obtained by an ultrasound-microwave hybrid technique developed in the university, with the aim of finding a utility to all those materials wasted or discarded after the processing of the plant or fruit. From the plant sources tested, the results of plant leaves are presented. The antimicrobial activity was evaluated against three foodborne bacteria, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Listeria homocytogenes* comparing the initial and final measurement against a negative control. Later, treatment growth kinetics were evaluated, observing the microbial growth behavior. Statistical analysis allowed to identify best treatments, being the extraction relations AxB and BxB the ones with best inhibitory effect.

Keywords: Antimicrobials, foodborne diseases, polyphenols.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos debido a bacterias patógenas, hongos, parásitos, virus, toxinas, y contaminantes químicos son un problema clasificado por la Organización Mundial de la Salud como un tema importante a tratar. Esta contaminación puede ocurrir en diferentes niveles de la cadena de suministro de la industria alimentaria, pudiendo tener un impacto global debido a la globalización y al comercio internacional. La OMS ha trabajado en conjunto con los países miembros para afrontar el problema y las múltiples causas del mismo (World Health Organization, 2010). Ejemplos de estos esfuerzos son la creación del Codex Alimentarius en 1962 (World Health Organization. & Food and Agriculture Organization, 1962), la generación y recopilación de datos actualizados de las enfermedades transmitidas por alimentos, y acciones para ayudar a implementar infraestructura adecuada. A pesar de tales actividades, las enfermedades transmitidas por alimentos son un problema presente en la actualidad.

Un conservador de alimentos es una sustancia química capaz de retardar la vida útil de un alimento, ya se inhibiendo el crecimiento microbiano o evitando cambios drásticos en la composición química; por tanto, son herramientas útiles para retardar el crecimiento microbiano y mantener la inocuidad microbiológica en los alimentos. A continuación, se enlistan algunos de los productos aprobados por la FDA para su uso como conservadores de alimentos: ácido ascórbico, ácido eritróico, ácido sórbico, ácido tiodipropánico, palmitato ascórbico, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ascorbato de calcio, bisulfito de sodio, sorbato de potasio.

En la actualidad, los alimentos sin aditivos químicos o aditivos naturales han adquirido cada vez más importancia, estableciéndose como una oportunidad de mercado (Román *et al.*, 2017). En este sentido, la utilización de productos obtenidos de plantas que actúen como preservantes o antimicrobianos, tiene un gran potencial para la adición en alimentos de este tipo. La obtención y utilización de la química de los productos naturales, está adquiriendo un rol importante en el desarrollo tecnológico y científico en las distintas áreas interdisciplinarias de interés para el hombre, como el área bio-médica, nutrición, agropecuaria, ciencia de los alimentos, entre otras; con una amplia perspectiva de sus posibles aplicaciones novedosas (Khan, 2018), entre estos compuestos se encuentran los polifenoles. Existen numerosas propiedades biológicas asociadas a los polifenoles, estando en la cabeza de la lista la capacidad antioxidante de las moléculas. Otras de las funciones atribuidas a estos metabolitos prevenir estados de enfermedades como el hipertensión (Oudot *et al.*, 2019), enfermedades neurodegenerativas (Farzaei *et al.*, 2018), propiedades citotóxicas y apoptóticas en células cancerígenas (Chen *et al.*, 2016), y como es el caso de interés en este trabajo la actividad antimicrobiana (Bostanghadiri *et al.*, 2017). Estos compuestos pueden ser obtenidos a partir de diferentes partes del fruto o de la planta en sí, pudiendo aprovechar aquellos desperdicios o partes no comestibles de una amplia variedad de fuentes vegetales (Osorio *et al.*, 2010).

En este trabajo se evaluó el potencial antimicrobiano de extractos polifenólicos obtenidos a partir de moringa, con la finalidad de contribuir y ampliar el conocimiento de las propiedades antimicrobianas de los compuestos fenólicos. Se presentan los resultados de las fracciones fenólica de hojas de moringa como resultado de distintas condiciones de extracción, en donde se observó un efecto antimicrobiano con valores de inhibición del 50%.

METODOLOGÍA

Obtención de material vegetal y extracción de fitoquímicos

Se recolectaron los materiales vegetales de hoja de moringa, se deshidrataron, molieron y tamizaron hasta obtener un tamaño de partícula deseado. La extracción de los fitoquímicos de la materia previamente preparada, se realizó en un reactor de 1 L en un equipo de ultrasonido acoplado a microondas “Ultrasonic microwave comparative worksation (ATPIO)”. Utilizando relaciones masa/volumen (1:8, 1:12, 1:16) y la concentración de etanol acuoso (0, 30 y 70 %), presentados en el **Tabla I.**

Tabla I. Diseño experimental factorial fraccionada para tratamiento ultrasonido-microondas

Tratamiento	Clave	Relación masa/ volumen	Concentración de etanol (%)
1	Alto x Alto	1:16	70
2	Alto x Bajo	1:16	0
3	Bajo x Alto	1:8	70
4	Bajo x Bajo	1:8	0
5	Medio x Medio	1:12	30

Recuperación de la fracción polifenólica

La separación de fitoquímicos se realizó empleando la metodología descrita por (Ascacio *et al.*, 2010), para la obtención de elagitaninos utilizando una columna empacada de resina de Amberlita® XAD 16N. La fracción polifenólica se secó a 60 °C por dos días o hasta obtener el extracto seco. Los polifenoles totales fueron recuperados en forma de polvos finos y almacenados en recipientes ámbar para protegerlos de la luz.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos polifenólicos de la **Tabla I** a distintas concentraciones (2500, 2000, 1500, 1000, 500 y 0 ppm). Estas diluciones se colocaron en microplacas de 96 pocillos. Se incubaron los microorganismos utilizados (*Escherichia coli*, *Salmonella thypi* y *Listeria monocytogenes*) en caldo Mueller-Hinton por 18 horas, para posteriormente centrifugar y resuspender la pastilla en solución esteril. Mediante la escala de McFarland se ajustaron las concentraciones de las bacterias a $1.5E^8$ microorganismos/ml. En los pocillos con las soluciones de polifenoles, se agregaron 4.17 uL de inóculo ajustado de cada bacteria, exceptuando aquellos pocillos utilizados como control negativo. Se midió la absorbancia inicial a 600nm, y se incubó la placa durante 18 horas a 37 C, tras lo que se midió la absorbancia final.

Cinéticas de crecimiento

Se seleccionaron las Mínimas Concentraciones Inhibitorias (MCI) de acuerdo a los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los polvos polifenólicos y se procedió a realizar el experimento en placas de 96 pocillos según lo mencionado anteriormente. Se monitoreó el cambio de absorbancia durante de 24 h, con mediciones cada hora.

El análisis estadístico se realizó mediante el software SAS versión 9.0, bajo un diseño de experimentos de bloques completamente al azar con igual número de repeticiones, comprobando las diferencias significativas mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los gráficos del crecimiento antimicrobiano tratados con extracto de hoja de moringa son mostrados en la **Figura 1**. De forma general, los extractos de moringa mostraron poca actividad antimicrobiana, ya que, si bien se puede observar un efecto de inhibición lineal donde a mayor concentración mayor inhibición, las concentraciones para lograr la MCI están por encima de las concentraciones de otros extractos probados, necesitando concentraciones superiores, en su mayoría a 1500 ppm, además de no lograr un efecto bactericida con las concentraciones tratadas.

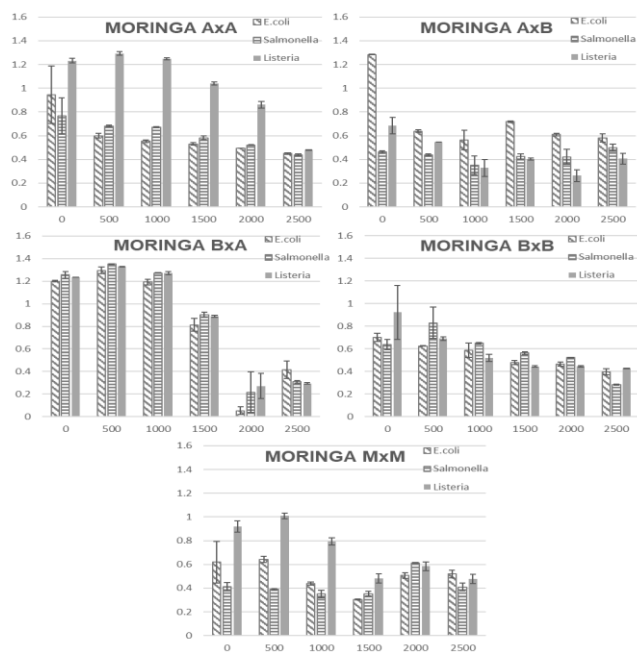


Figura 1. Efecto antimicrobiano de los extractos de hoja de guanábana a las diferentes condiciones de extracción probadas contra inóculos de *E. coli*, *S. typhi* y *L. monocytogenes*. Gráficos mostrados en relación DO/Conc.

Fuente	C.E.	E.coli		S. tiphy		L. homocytogenes	
		MCI	MCB	MCI	MCB	MCI	MCB
Moringa	AxA	2500	>2500	>2500	>2500	2500	>2500
Moringa	AxB	500	>2500	>2500	>2500	1000	>2500
Moringa	BxA	2000	>2500	2000	>2500	2000	>2500
Moringa	BxB	>2500	>2500	2500	>2500	1500	>2500
Moringa	MxM	1500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500

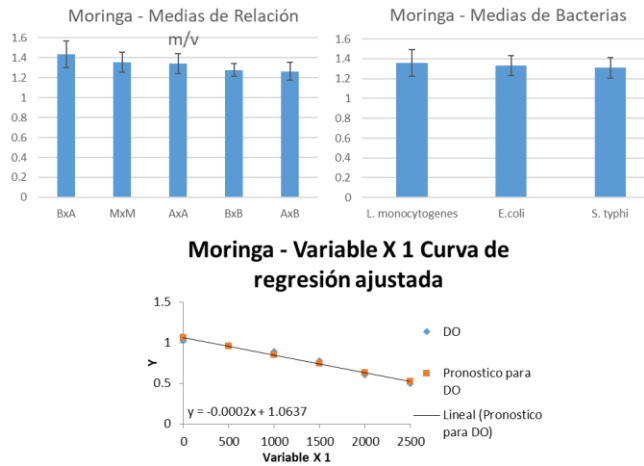


Figura 2. Gráficas de las medias poblacionales de 2 de las variables sometidas al análisis estadístico (superiores) de hoja de moringa, barras acomodadas de mayor a menor (izquierda-derecha). Grafica de curva de regresión ajustada de la variable X1 (concentración), mostrando la linealidad de la inhibición conforme aumenta la concentración, grafica mostrada en unidades DO/Concentración.

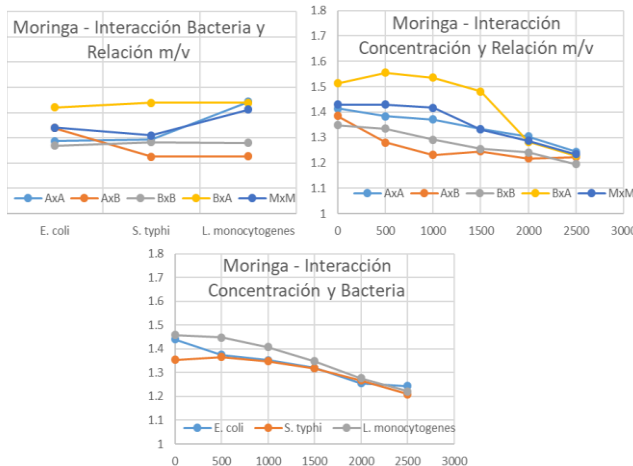


Figura 3. Gráficas de la fuente hoja de moringa, de las diferentes interacciones entre las variables sometidas al análisis estadístico. No se graficaron las interacciones sin diferencias significativas.

Las medias de las condiciones de extracción y las medias del crecimiento de las tres bacterias se muestran en la **Figura 2**. En la variable de bacterias se determinó, mediante la prueba de Tukey, que las tres son estadísticamente diferentes entre sí, aunque de acuerdo a los datos *S.typhi* fue la más inhibida de las tres. En las condiciones de extracción no se encontraron diferencias significativas entre algunas de ellas, observando un total de tres grupos, de mayor a menor están: la relación BxA como el peor tratamiento, una población estadísticamente igual de MxM y AxA, y otro grupo más que consta de BxB y AxB los cuales fueron los mejores tratamientos. Un análisis de regresión lineal permitió la obtención de la ecuación de la recta, con este dato se determinó teóricamente la concentración necesaria para obtener un efecto bactericida, la cual fue de 5381 ppm.

En las gráficas de la **Figura 3**, podemos observar las interacciones entre las distintas variables analizadas estadísticamente. De esta manera se pudo establecer la mejor relación de entre BxB y AxB. Observando la interacción bacteria y relación, se observa una mayor inhibición, en *S. typhi* y *L. monocytogenes* al utilizar la relación AxB, mientras que BxB es mejor para inhibir a *E.coli*. En las concentraciones que van de 500 a 2000, AxB tiene mejor inhibición, mientras que en 2500 es mejor BxB. En la interacción concentración y bacteria, observamos un comportamiento sumamente parecido, pareciendo no haber diferencias entre si se inhibe *Salmonella* y *E. coli*, así como entre *Listeria* en las últimas dos concentraciones (2000 y 2500 ppm).

En la **Tabla II**, se presentan las concentraciones necesarias para lograr tanto la MCI como la Mínima Concentración Bactericida (MCB), para cada uno de los microorganismos tratados en los experimentos.

Las cinéticas de crecimiento de los tratamientos de moringa se muestran en la **Figura 4**. Cabe destacar que la gráfica de control negativo es representativa, ya que se utilizaron distintos controles negativos para cada relación. De acuerdo a los datos, la relación de Moringa AxA, no alcanzó la MCI ni siquiera a las 2500 ppm probadas. En el tratamiento BxB, uno de los catalogados como mejor tratamiento, se logró la MCI en 2500 ppm excepto en *E. coli*. Para el tratamiento AxB, el otro mejor tratamiento, difieren los datos de la cinética con respecto a los experimentos iniciales, ya que de acuerdo a los primeros datos, tanto para *E. coli* como para *L. monocytogenes*, un tratamiento de 2000ppm, debería haber alcanzado la MCI, situación que no sucedió por un mínimo.

Entre las variaciones que podrían explicar estas diferencias se encuentra el tiempo de crecimiento, ya que, al realizarse las cinéticas por 24 horas, tiempo superior a las 18 horas de experimentos iniciales. Podría existir un comportamiento diferente en las 6 horas extras, lo cual modificaría el resultado final mostrado en la cinética.

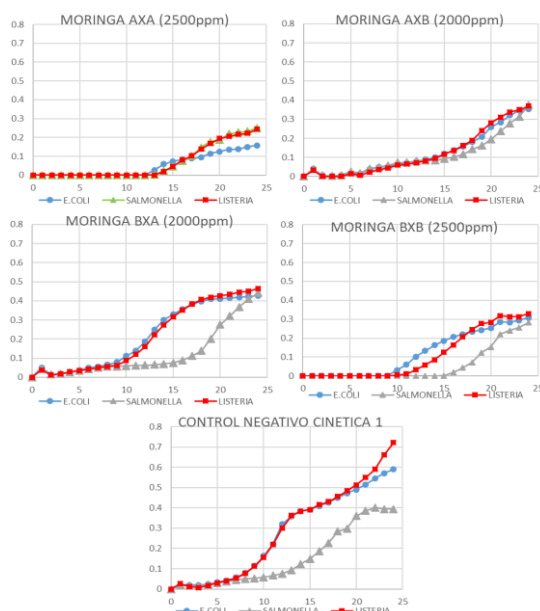


Figura 4. Cinéticas de crecimiento de los tres microorganismos (*E. coli*, *S. typhi* y *L. monocytogenes*) tratados con los extractos de hoja de moringa. Los gráficos se muestran en DO/Horas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bostanghadiri, N., Pormohammad, A., Chirani, A. S., Pouriran, R., Erfanimanesh, S., & Hashemi, A. (2017). Comprehensive review on the antimicrobial potency of the plant polyphenol Resveratrol. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1588–1595. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.084>
- Chen, M., Zhao, Z., & Yu, S. (2016). Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Polyphenols from Sugar Beet Molasses on Colon Carcinoma Cells in Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, (17), 993. <https://doi.org/10.3390/ijms17070993>
- Farzaei, M. H., Tewari, D., Momtaz, S., Argüelles, S., & Nabavi, S. M. (2018). Targeting ERK signaling pathway by polyphenols as novel therapeutic strategy for neurodegeneration. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 183–195. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.07.010>
- Khan, R. A. (2018). Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(5), 739–753. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2018.02.015>
- Osorio, E., Flores, M., Hernández, D., Ventura, J., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2010). Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya Illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.017>
- Osowski, A., Kasperek, A., Wiczorek, Z., Amarowicz, R., & Szabelski, M. (2017). Evaluation of the characteristics of some plant polyphenols as molecules intercepting mitoxantrone. *Food Chemistry*, 227,

- 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.083>
- Oudot, C., Gomes, A., Nicolas, V., Le Gall, M., Chaffey, P., Broussard, C., ... Brenner, C. (2019). CSRP3 mediates polyphenols-induced Cardioprotection in hypertension. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2019.01.001>
- Román, S., Sánchez-Siles, L. M., & Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 44–57. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.06.010>
- World Health Organization. (2010). ¿Qué está haciendo la OMS para ayudar a los países a mejorar la inocuidad de los alimentos? Retrieved January 25, 2019, from <https://www.who.int/features/qa/19/es/>