

Efecto antimicrobiano del extracto de callo de *Moringa oleifera* en microorganismos de interés clínico

Antimicrobial effect of *Moringa oleifera* callus extract on microorganisms of clinical interest

Rafael Fernández ¹  Elisa Villamizar ¹  Gabriel Padilla ¹ 

RESUMEN

Introducción: La moringa es una planta arbórea multipropósito ancestral, por las diversas propiedades ambientales y médico-farmacéuticas que presenta y 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 esta investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de callo de *Moringa oleifera* en microorganismos de interés clínico. **Métodos:** A partir de extractos (acetónicos, metanólicos y etanólicos) de callo no embriogénico (NE) del 5 al 50% de *Moringa oleifera*, se determinó el efecto antimicrobiano (concentración mínima inhibitoria "CMI", bactericida "CMB" o fungicida "CMF") por microdilución en 50 μ L de los microorganismos de interés clínico (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*), cualitativamente por turbidez del cultivo líquido y cuantitativamente en unidades formadoras de colonia (UFC) en cultivo sólido, a 37°C a 24 h. **Resultados:** Se observó un mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano con un CMI del 5% y un CMB o CMF del 10%, con todos los extractos en *P. aeruginosa* y con el extracto etanólico en *E. coli* y *C. albicans*; mientras que con *S. aureus*, la mayor inhibición bacteriana se obtuvo con los dos extractos alcohólicos con un CMI del 20% y un CMB del 25%. **Conclusión:** La exposición del extracto de callo no embriogénico a bajas concentraciones presenta un elevado potencial biocida para estos microorganismos clínicamente trascendentes, planteando la posibilidad de emplearlo para el tratamiento tópico de afecciones ocasionadas por éstos.

Palabras clave: Moringa, bactericida, fungicida, extracto de callo no embriogénico.

ABSTRACT

Introduction: Moringa is an ancestral multi-purpose tree plant, due to the various environmental and medical-pharmaceutical properties it presents, and given the numerous secondary metabolites it synthesizes. In the medicinal field, its extracts have been shown to have effects on diseases of different origin, both *in vivo* and *in vitro* studies. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial effect of *Moringa oleifera* callus extract on microorganisms of clinical interest. **Methods:** From extracts (acetonic, methanolic and ethanolic) of non-embryogenic callus (NE) from 5 to 50% of *Moringa oleifera*, the antimicrobial effect (minimum inhibitory concentration "MIC", bactericidal "BIC" or fungicidal "FIC") was determined by microdilution in 50 μ L of the microorganisms of clinical interest (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) qualitatively by turbidity of the liquid culture and quantitatively in colony forming units (CFU) in solid culture, at 37°C for 24 h. **Results:** A greater inhibitory effect on microbial growth was observed with a MIC of 5% and a CMB or CMF of 10%, with all the extracts in *P. aeruginosa* and with the ethanolic extract in *E. coli* and *C. albicans*; while with *S. aureus*, the highest bacterial inhibition was obtained with the two alcoholic extracts with a MIC of 20% and a CMB of 25%. **Conclusion:** The exposure of non-embryogenic callus extract at low concentrations presents a high biocidal potential for these clinically important microorganisms, raising the possibility of using it for the topical treatment of conditions caused by these.

Key words: Moringa, bactericidal, fungicidal, no embryogenic callus extract.

INTRODUCCIÓN

El árbol de Moringa (*Moringa oleifera*, Lam., 1783) es originario de la región del sub-Himalaya de la India^{1,2}, conocido popularmente en dicho país, como "árbol milagroso" o "árbol de la vida"³, que se ha diseminado en otras partes de Asia, así como las zonas tropicales y subtropicales en África y América^{1,2}. Esta planta perenne, pero poco longeva (máximo 20 años) de la familia Moringaceae⁴, de bajo porte (10-12 m de altura; 20-40 cm de diámetro)^{5,6} y de crecimiento rápido^{1,2}, presenta un tronco recto de corteza gruesa, corchosa gris blanquecina y una copa tipo paraguas⁵⁻⁷, con ramas inclinadas y frágiles, con un follaje plumoso de hojas compuestas tripinnadas verde oscuro^{8,9}, con flores de pétalos blancos perfumados, agrupadas en una inflorescencia tipo panícula, y con frutos tipo vaina de

¹Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), FACyT-UC, Valencia-Venezuela.

Autor de correspondencia: Rafael Fernández 

e-mail: rfernandez2@uc.edu.ve

Recibido: 27/07/2023

Aprobado: 23/01/2024

forma triangular (20-60 cm de largo) con 12 a 35 semillas redondas aladas que ayudan en la diseminación.¹⁰

Esta planta ancestral es reconocida mundialmente como un árbol multipropósito debido a que casi cualquier parte de la misma es de alto valor nutricional al tener vitaminas, nutrientes^{11,12} y aminoácidos esenciales¹³, o por presentar múltiples propiedades medicinales. Desde hace siglos, tradicionalmente, muchas culturas la han utilizado como antiespasmódico, ansiolítico, expectorante, diurético, analgésico, cicatrizante, antiinflamatorio; así como para la anemia, el asma, bronquitis, cólera, conjuntivitis, deficiencia de esperma, diabetes, entre otros¹²⁻¹⁴. Algunas de estas aplicaciones se han demostrado en diversos estudios recientes¹⁵, como el efecto hepatoprotector, diurético, purgante, antimicrobiano, anti caries dental^{16,17}, antioxidante, antiinflamatorio, antihipertensivos y anticancerígenos^{1,18,19}. Asimismo, se le atribuyen usos en la purificación de agua a partir de las proteínas de las semillas^{20,21}, así como en la obtención de biodiesel y biogas¹². La propiedad antimicrobiana de la *M. oleifera* viene dada por los metabolitos secundarios que sintetizan, como glucosinolatos y flavonoides²²⁻²⁴, extraídos con diversos solventes (agua, etanol, metanol, acetona, entre otros)²⁵, obteniendo en algunos casos mayor efectividad que los antibióticos tradicionales¹; inclusive contra cepas resistentes²⁶ de *Staphylococcus aureus*²⁷ y *Candida albicans*.²⁸

Debido a estas propiedades, el cultivo de esta especie se ha incrementado en los últimos años, a través de la propagación por estacas y principalmente semillas, sin embargo, las inversiones de éste son grandes, limitando su uso²⁹. Por tanto, el cultivo in vitro de tejidos vegetales permite el desarrollo de líneas celulares clonales élites, libres de microorganismos, con alto rendimiento de metabolitos secundarios de interés, utilizando tan sólo un mínimo de material vegetal.³⁰

Los microorganismos de interés clínico son aquellos que causan afecciones de salud importantes, por lo cual deben controlarse con agentes biocidas. En este sentido, la *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, son relevantes al evaluar el efecto de compuestos antimicrobianos.

Así, tenemos al principal patógeno bacteriano de la familia *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, un bacilo Gram negativo, aeróbico, muy versátil nutritivamente, que produce un polisacárido extracelular que en exceso causa obstrucciones pulmonares crónicas. Se añade que presenta una compleja membrana externa muy selectiva al paso de compuestos antimicrobianos, confiriéndole una gran capacidad para defenderse, causando una amplia variedad de infecciones³¹. La *Escherichia coli*, descrita en 1885 por Theodore Escherich³², perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, anaeróbico facultativo³³, que forma parte de la microbiota normal e inocua del ser humano, otros mamíferos y las aves,

al encontrarse en grandes concentraciones en el tracto gastrointestinal. No obstante, en otras partes del cuerpo puede causar enfermedades graves, considerándose, así como cepas patógenas de infecciones extraintestinales (tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal) o intestinales "gastrointestinales".³⁴

El *Staphylococcus aureus* perteneciente a la familia *Micrococcaceae*, es un coco Gram positivo de un alto grado de patogenicidad, al ser uno de los responsables de las infecciones hospitalarias y comunitarias leves como furúnculos, abscesos, conjuntivitis, hasta complicaciones severas como neumonías necrotizantes, osteomielitis, endocarditis, celulitis y shock. Además, sobrevive varios días en superficies inanimadas y se considera un patógeno nosocomial muy importante^{35,36}, que además provoca intoxicación alimentaria^{36,37}. Por último, el complejo *Candida albicans* es un blastomiceto generalmente de forma oval, oportunista al causar enfermedades a individuos inmunocomprometidos o de flora alterada³⁸, observándose infecciones a nivel superficial en la mucosa, en el torrente sanguíneo y en los tejidos profundos, así como infecciones sistémicas como endocarditis e infecciones pulmonares, renales y cerebrales.³⁹

El exigente desarrollo de nuevos antibióticos debido a la constante aparición de cepas superresistentes de muchos microorganismos, tales como *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, así como la búsqueda de compuestos alternativos naturales más accesibles económicamente, ha traído como consecuencia la investigación de las propiedades de los metabolitos secundarios de muchas especies vegetales, tales como *Aloe vera*^{40,41}, *Azadirachta indica*^{42,43} y *Mangifera indica*⁴⁴, empleando sus diferentes partes vegetativas o reproductivas. En *Moringa oleifera*, hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones que reportan actividad antimicrobiana se ha realizado en un 69% con tejido foliar y un 23,5% con semillas, en su mayoría a base de agua, etanol y metanol.⁴⁵

Así, con corteza, extractos acuosos, metanólicos, de cloroformo y de acetato de etilo, inhiben el crecimiento de *Bacillus megaterium*⁴⁶, *Citrobacter freundii*⁴⁶, *Pseudomonas fluorescens*⁴⁶, *Staphylococcus aureus*^{46,47}, *Escherichia coli*⁴⁷, *P. aeruginosa*⁴⁷ y *Salmonella gallinarum*⁴⁷. Mientras que con extractos etanólicos, se inhibe el crecimiento de las bacterias *Shigella boydii*, *S. dysenteriae* y *S. aureus*; y de manera moderada a los hongos *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*.⁴⁸

En semillas con extracto acuoso, se observó inhibición de crecimiento en la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*⁴⁹ y las bacterias *E. coli*⁵⁰, *P. aeruginosa*⁵¹, *S. aureus*⁵⁰ y *Vibrio cholerae*⁵⁰; mientras que con extracto etanólico⁵⁰ fue con las bacterias *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. aerogenes*, *M. aureus*, *M. luteus*, *M. phlei*, *P. mirabilis*, *S. edinburg*, *S. marcescens*, *S. aureus*, *S. faecalis* y con los hongos *Botrytis allii*, *C. pseudotropicalis*, *C. reukauffii*,

Conidiophora cerebella, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Phytophthora cactorum*, *Piricularia oryzae*, *Polystictus versicolor*, *Saccharomyces carlsbergensis* y *Zygorrhynchus sp.*, así como *K. pneumoniae*⁵³ y *V. cholerae*⁵⁰. Por su parte, con extracto metanólico, se mostró actividad antimicrobiana en *Acinetobacter baumannii*⁵³, *B. cereus*⁵³, *B. subtilis*⁵³, *Enterobacter cloacae*⁵³, *Enterococcus faecalis*⁵³, *E. coli*⁵⁴, *Streptococcus pyogenes*⁵³, *P. aeruginosa*⁵³, *P. mirabilis*⁵⁴, *K. pneumoniae*⁵⁴, *S. entérica*⁵⁵, *S. typhi*⁵³, *S. aureus*^{54,56}, *S. epidermidis*⁵⁵, así como con los hongos *Aspergillus niger*⁵³, *C. albicans*^{53,56}, *P. expansum*⁵³ y *Mucor racemus*⁵³. Con extracto de acetato de etilo, se inhibió el crecimiento en *E. faecalis*⁵⁷, *E. coli*^{54,57}, *P. aeruginosa*^{54,57}, *P. mirabilis*⁵⁴, *K. pneumoniae*^{54,57}, *S. typhimurium*⁵⁷, *S. flexneri*⁵⁷, *S. aureus*^{54,57}, *S. epidermidis*⁵⁷, así como los hongos *C. albicans*⁵⁷, *C. tropicalis*⁵⁷. Por último, con extracto hexanólico fue en *P. aeruginosa*⁵⁵, *S. entérica*⁵⁵, *S. aureus*⁵⁵ y *S. epidermidis*⁵⁵.

Con hojas, extractos acuosos mostraron actividad antimicrobiana en *Acinetobacter baylyi*⁵⁸, *B. cereus*⁵⁹, *B. subtilis*⁵⁹, *B. megaterium*⁵⁹, *E. coli*⁶⁰⁻⁶², *K. pneumoniae*⁵⁸, *P. mirabilis*^{58,61}, *P. vulgaris*^{58,61}, *P. aeruginosa*^{51,58,59,61,62}, *P. fluorescens*⁶¹, *S. pullorum*⁶¹, *S. typhi*⁶¹, *Sarcina lutea*⁵⁹, *Shigella shinga*⁵⁹, *S. sonnei*⁵⁹, *S. aureus*⁵⁸⁻⁶², *Streptococcus pyogenes*⁵⁹ y *Yersinia enterocolitica*⁶¹. Por su parte, con el extracto acetónico se inhibió el crecimiento de *E. cloacae*⁶¹, *E. coli*⁶¹, *P. vulgaris*⁶¹, *Micrococcus kristinae*⁶¹ y *S. aureus*⁶¹, así como los hongos *Aspergillus flavus*⁶¹, *C. albicans*⁶¹ y *Pullarium sp.*⁶¹. Con extractos metanólicos, disminuyó el crecimiento en *A. baumannii*⁵³, *B. cereus*⁵³, *B. subtilis*⁵³, *E. aerogenes*⁶³, *E. cloacae*⁵³, *E. faecalis*⁵³, *E. coli*^{53,61-63}, *K. pneumoniae*^{53,58,63,64}, *P. mirabilis*^{58,61}, *P. vulgaris*^{58,61}, *P. aeruginosa*^{54,58,61,65}, *P. fluorescens*^{53,61}, *P. stuartii*⁶³, *S. enterica*⁵⁵, *S. pullorum*⁶¹, *S. typhi*^{53,61}, *Shigella sp.*⁶⁶, *S. epidermidis*⁵⁵, *S. aureus*^{55,62,64,66}, *S. pyogenes*⁵⁸, *Streptococcus sp.*⁶⁶ y *Yersinia enterocolitica*⁶¹; al igual que con los hongos *Aspergillus flavus*⁶¹, *A. niger*⁵³, *C. albicans*^{53,61}, *P. expansum*⁵³, *Pullarium sp.*⁶¹ y *M. racemus*⁵³. Por otra parte, en extractos de hexano, de cloroformo y de acetato de etilo, se observó actividad antimicrobiana en *K. pneumoniae*⁵⁸, *P. mirabilis*⁵⁸, *P. vulgaris*⁵⁸, *P. aeruginosa*^{55,58} y *S. pyogenes*⁵⁸; mientras que con extractos hexánicos, fue en *S. aureus*⁵⁵, *S. epidermidis*⁵⁵ y *S. entérica*⁵⁵. Finalmente, con extractos etanólicos, la inhibición del crecimiento microbiano fue más eficaz en *Aeromonas caviae*⁶⁷, *B. cereus*^{59,68}, *B. subtilis*^{59,68}, *B. megaterium*⁵⁹, *E. faecalis*⁶⁷, *E. coli*^{54,59,61,62}, *Mycobacterium phlei*⁶⁸, *P. mirabilis*⁶¹, *P. vulgaris*⁶¹, *P. aeruginosa*^{61,62}, *P. fluorescens*⁶¹, *Sarcina lutea*⁶⁸, *S. aureus*^{59,65,68,69}, *S. pullorum*⁶¹, *S. typhi*^{61,69}, *Sarcina lutea*⁵⁹, *Shigella shinga*⁵⁹, *S. sonnei*⁵⁹ y *Yersinia enterocolitica*⁶¹; así como, para los hongos *A. flavus*⁶¹, *C. albicans*⁶¹ y *Pullarium sp.*⁶¹.

Con las flores, extractos etanólicos inhiben el crecimiento bacteriano en *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, así como el crecimiento fúngico de *C. albicans*⁷⁰; mientras que con extracto metanólico de fruto se observa actividad antibacteriana en *B. cereus*, *B. subtilis*, *Klebsiella sp.*, *Proteus*

sp., *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. aureus* y *V. cholera* y actividad antifungal en *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Curvularia sp.* and *Fusarium sp.*⁷¹

La actividad antimicrobiana es evidente en distintas partes del árbol, requiriendo gran cantidad de material del mismo para la producción masiva de compuestos biocidas, lo cual se dificulta en este tipo de plantas, al ser de más lento crecimiento; aunado a que, dependiendo de las condiciones agroclimáticas y la susceptibilidad a enfermedades y plagas, la productividad de dichos metabolitos secundarios no es estable, por lo cual el cultivo *in vitro* vegetal asegura la masiva y rápida producción de plantas libres de patógenos, con alto rendimiento en metabolitos secundarios antimicrobianos, tal como se demostró con extractos foliares de plantas *ex vitro* e *in vitro* de *Moringa peregrina*, donde fue significativamente mayor la inhibición del crecimiento con extractos de hojas de vitroplantas en base acuosa en *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Methicillin resistant* y *S. typhimurium*⁷², etanólica en *P. vulgaris* y *S. paratyphi*⁷³; y en ambos solventes en *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *S. aureus*^{72,73}. Asimismo, en extractos obtenidos de callo, una masa de células indiferenciada inducida rápidamente y con alta biomasa *in vitro*, se observa elevadas actividades antimicrobianas en las bacterias *B. subtilis*⁷⁰, *E. coli*⁷¹, *K. pneumoniae*⁷⁰, *S. aureus*⁷¹, con extractos hexanólicos, metanólicos, de cloroformo y de acetato de etilo; y en los hongos *Aspergillus brasiliensis*⁷⁴, *A. italicum*⁷⁴, *A. niger*⁷⁴, *C. albicans*^{70,74}, *Penicillium digitatum*⁷⁴ y *Phytophthora infestans*⁷⁴ con extractos acetónicos, etanólicos y metanólicos. Esta actividad biocida se deriva principalmente de metabolitos secundarios de tipo fenólico y flavonoides⁷⁵, siendo de este último en extractos metanólicos de semillas, el Kaempferol contra *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae*, y la Quercetina contra *S. aureus*⁷⁶.

En este orden de ideas, en este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto de callo no embriogénico (NE) de *Moringa oleifera* en microorganismos de interés clínico, como una futura vía alternativa económicamente factible y sustentable a los medicamentos antimicrobianos tradicionales, aportando rápidamente relevantes resultados a través de la eficiente y expedita técnica de microdilución en extractos de NE, masas de células indiferenciadas producidas *in vitro*, independientemente de condiciones agroecológicas del material vegetal de origen, lo cual contrasta con la mayoría de los protocolos y técnicas tradicionales de evaluación antimicrobiana de extractos vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Los extractos se obtuvieron a partir de callo no embriogénico (NE: masa de células no diferenciadas, de superficie rugosa y de color amarillo) desarrollado por cultivo *in vitro* de dos explantes (hoja y tallo) de vitroplantas de *Moringa (Moringa oleifera Lam.)*, obtenidas de la germinación en condición aséptica de embriones cigóticos

aislados de semillas extraídas de frutos maduros (amarillos) colectados de un ejemplar joven libre de enfermedades y plagas, de aproximadamente 4 metros de altura, ubicado en el municipio San Diego, edo. Carabobo-Venezuela.

Desinfección: A las semillas se les retiró la cubierta junto con las alas de la semilla (exocarpio) dejando expuesto el endocarpio, colocándolas en remojo en agua corriente durante la noche^{77,78}. Posteriormente, se sometieron a agitación constante (100 rpm) en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar horizontal, realizando 2 lavados de 2 min c/u con agua destilada estéril y detergente líquido comercial Ariel®. Luego se lavaron con alcohol isopropílico al 70% v/v durante 30 s y con agua destilada estéril por 1 min, seguidamente se realizó otro lavado con cloro comercial NeveX® (3,5% v/v de hipoclorito de sodio) al 20% v/v y Tween 20 (1 gota/10 mL) durante 5 min. Para eliminar remanentes de cloro y etanol, se hicieron 3 lavados con agua destilada estéril (1 min c/u), para luego sumergirlas en cisteína al 1% p/v en agua destilada estéril durante 30 min para reducir la oxidación del explante.⁷⁹

Cultivo de tejidos vegetales: Una vez desinfectadas las semillas, se extrajeron los embriones cigóticos con ayuda de un bisturí estéril, para inducir su germinación *in vitro* en el medio MS (1962) suplementado con las vitaminas tiamina-HCl (1 mg/L) y piridoxina (0,5 mg/L), los aminoácidos glicina (2 mg/L) y cisteína-L (100 mg/L), la sacarosa (azúcar de mesa) al 3% p/v, Agar Powder al 0,8% p/v y sin reguladores de crecimiento; con un pH de 5,8, cultivándose 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 (120 μ E/m²s⁻¹) para estimular el desarrollo completo de la vitrolanta (con hojas expandidas y no senescentes), a partir de la cual se obtuvieron los segmentos nodales (tallo) y foliares, que fueron los explantes para la inducción de callo NE, en cápsulas de Petri (100 x 15 mm), con medio salino MS (1962) suplementado con reguladores de crecimiento: 2 mg.L⁻¹ de BAP + 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D para hoja y 1,5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D para tallo.

Secado y pulverización del material vegetal: Callos NE de 8 semanas de inducido se secaron en estufa a 60°C durante 48 horas, para luego molerlas utilizando un mortero estéril, bajo campana de flujo laminar, hasta obtener 25 g del polvo fino.⁸⁰

Extractos: Empleando tres solventes orgánicos distintos (acetona, metanol y etanol) al 75% c/u, se obtuvieron extractos crudos de callo NE, el cual 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 48 h, 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 luego resuspender la muestra sin solvente con DMSO 0,25% en tubos Eppendorf y preservarse a -80°C

hasta su uso³⁸. La solución final se consideró a un 100%, de donde se diluyó (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50%) para realizar la evaluación antimicrobiana.^{42,44}

Microorganismos: Las cepas liofilizadas utilizadas fueron: ATCC (American Type Culture Collection) del complejo *Candida albicans* (CVCM1363), *Pseudomonas aeruginosa* (CVCM43) y *Staphylococcus aureus* (CVCM691), suministradas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela (UCV); así como *Escherichia coli* (U9-41) donada por la Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, todas de la colección de microorganismos del Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo (Facyt-UC).

Preparación de las suspensiones microbianas: Las cepas se prehidrataron en caldo infusión cerebro corazón "BHI" (*Brain Heart Infusion*), para luego incubarse por 24 horas a 37°C para su reproducción en condiciones normales de gases. Posteriormente, se cultivaron por 24 h a 37°C en agares selectivos: Sabouraud con clorafenicol para *C. albicans*, MacConkey para *E. coli*, Cetrimide para *P. aeruginosa* y Manitol salado para *S. aureus*. Consecutivamente, se seleccionaron colonias aisladas suspendiéndolas en Caldo BHI, incubándose nuevamente por 24 h a 37°C. Después se ajustó la turbidez de éstas al patrón de 0,5% Mc. Farland (medida a 540 nm en Spectronic 20), equivalente a 1.5 x 10⁸ UFC/mL.^{42,44}

Determinación de la actividad antimicrobiana mediante la técnica de microdilución: bajo campana de flujo laminar horizontal, utilizando microplacas estériles con 96 pocillos de 375 μ L de capacidad, se colocaron 62,5 μ L de caldo estéril, junto con 37,5 μ L de inóculo bacteriano (excepto en el control negativo) y diferentes volúmenes de los 3 extractos, para de esta forma lograr las siguientes concentraciones: 5% (6,67 μ L), 10% (13,33 μ L), 15% (19,99 μ L), 20% (26,67 μ L), 25% (33,34 μ L), 30% (40 μ L), 35% (46,67 μ L), 40% (53,34 μ L), 45% (60,01 μ L) y 50% (66,67 μ L), incubándose por 24 h a 37°. Para evidenciar el crecimiento o no de microorganismos se realizaron dos pruebas: una cualitativa a través de la turbidez del medio, empleando un asa de platino calibrada, se inoculó 10 μ L de cada tratamiento en tubos de ensayos conteniendo 1 mL de caldo de cultivo; mientras que, para la prueba cuantitativa, se inocularon 50 μ L de cada tratamiento en las placas con agar nutriente, utilizando la técnica de siembra en superficie con la espátula de Drigalski. 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 3 cepas bacterianas con los 3 extractos, la concentración mínima inhibitoria (CMI) que determina el efecto bacteriostático y la concentración mínima bactericida (CMB) o fungicida (CMF) que determina el efecto biocida.

Controles: El control positivo se utilizó para verificar la viabilidad celular y fue el medio de cultivo con la cepa pura sin extracto, mientras que el control negativo se empleó para determinar la presencia de contaminantes microbianos, y fue el medio de cultivo con solo extracto. También se efectuaron evaluaciones microscópicas de las cepas con el objeto de comprobar la pureza de los cultivos: tinción Gram y pruebas bioquímicas convencionales. Finalmente, se cotejó que las soluciones concentradas finales no tuvieran efecto antimicrobiano, debido a probables remanentes de los solventes, certificando que los mismos se habían evaporado en su totalidad durante el proceso de obtención del extracto al 100%. Asimismo, se ejecutaron ensayos con diluciones de una solución sin polvo de callo NE de *Moringa oleifera*, evidenciándose crecimiento microbiano de las cepas en todas las concentraciones.

Análisis de los resultados: Los ensayos se realizaron por quintuplicado obteniendo reproducibilidad de los resultados, que se analizaron mediante el programa estadístico PAST 3.11, 2016, empleando como estadísticos clásicos las medias y desviaciones estándar. Se aplicó ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias entre los tratamientos aplicados en función de sus efectos sobre las variables cepas y extracto.

RESULTADOS

La evaluación de los extractos acetónico, metanólico y etanólico de callo no embriogénico (NE) mostró una respuesta diferencial significativa de la actividad antimicrobiana en función de la cepa del microorganismo, tanto en el medio líquido como en el sólido a las 24 h de incubación, observándose una mayor inhibición del crecimiento en *P. aeruginosa* en los tres tipos de extractos al 10%, a diferencia de *S. aureus* que fue inhibido su crecimiento a mayores concentraciones (25-30%) en los distintos extractos (Tabla 1 y 2).

En este sentido, para *P. aeruginosa*, con todos los extractos las CMI y CMB fueron 5% y 10% respectivamente (Tabla 1). Con *E. coli*, se observó una actividad antibacterial diferente en función del tipo solvente del extracto, encontrándose de forma ascendente una mayor inhibición del crecimiento, desde el extracto acetónico, con una CMI de 20% y un CMB de 25%, seguido del extracto metanólico con un CMI del 10% y un CMB del 15%; y por último el extracto etanólico, con un CMI de 5% y un CMB de 10% (Tabla 1). Por su parte, con el hongo *C. albicans*, la mayor inhibición del crecimiento fúngico se logró con el extracto etanólico con un CMI de 5% y un CMF del 10%, seguido del extracto acetónico con un CMI de 20% y un CMF de 25%; mientras que el extracto metanólico mostró la menor inhibición del crecimiento fungal con un CMI del 25% y un CMF del 30% (Tabla 2). Por último, *S. aureus* fue la cepa bacteriana con la menor respuesta inhibitoria a los extractos ensayados, con el extracto acetónico en primer lugar, con un CMI del 25% y un CMB del 30%, seguido por los extractos etanólico y metanólico con un CMI del 20% y un CMB del 25% (Tabla 2).

Tabla 1. Efecto antimicrobiano de extractos de callo NE de *Moringa oleifera* Lam., en el crecimiento *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

EXTRACTO	CRECIMIENTO MICROBIANO				
	SOLVENTE	%	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ML			MS (UFC)	ML	MS (UFC)
ACETONA	0	+	>1000	+	>1000
	5	+	>1000	+	>1000*
	10	+	>1000	-	-
	15	+	958±45	-	-
	20	+	264±23*	-	-
	25	-	-	-	-
	30	-	-	-	-
	35	-	-	-	-
	40	-	-	-	-
	45	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	Control -	-	-	-	-
	Control +	+	>1000	+	>1000
METANOL	0	+	>1000	+	>1000*
	5	+	>1000	+	>1000*
	10	+	869±53*	-	-
	15	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	30	-	-	-	-
	35	-	-	-	-
	40	-	-	-	-
	45	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	Control -	-	-	-	-
	Control +	+	>1000	+	>1000
ETANOL	0	+	>1000	+	>1000
	5	+	925±42*	+	>1000*
	10	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
	20	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	30	-	-	-	-
	35	-	-	-	-
	40	-	-	-	-
	45	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	Control -	-	-	-	-
	Control +	+	>1000	+	>1000

ML: Medio Líquido "Caldo"; MS: Medio sólido "Placas"; UFC: Unidades formadoras de colonias;>1000: Incontables;*:diferenciassignificativasap<0,05.

Tabla 2. Efecto antimicrobiano de extractos de callo NE de Moringa oleífera Lam., en el crecimiento *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*.

EXTRACTO	CRECIMIENTO MICROBIANO					
	SOLVENTE	%	<i>Candida albicans</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
			ML	MS (UFC)	ML	MS (UFC)
ACETONA		0	+	>1000	+	>1000
		5	+	>1000	+	>1000
		10	+	>1000	+	>1000
		15	+	320±15	+	598±43
		20	+	27±13*	+	173±22
		25	-	-	+	56±15*
		30	-	-	-	-
		35	-	-	-	-
		40	-	-	-	-
		45	-	-	-	-
		50	-	-	-	-
		Control -	-	-	-	-
		Control +	+	>1000	+	>1000
	METANOL		0	+	>1000	+
		5	+	>1000	+	>1000
		10	+	>1000	+	251±32
		15	+	340±19	+	33±8
		20	+	130±11	+	5±2*
		25	+	25±8*	-	-
		30	-	-	-	-
		35	-	-	-	-
		40	-	-	-	-
		45	-	-	-	-
		50	-	-	-	-
		Control -	-	-	-	-
		Control +	+	>1000	+	>1000
ETANOL			0	+	>1000	+
		5	+	458±30*	+	>1000
		10	-	-	+	>1000
		15	-	-	+	986±89
		20	-	-	+	157±14*
		25	-	-	-	-
		30	-	-	-	-
		35	-	-	-	-
		40	-	-	-	-
		45	-	-	-	-
		50	-	-	-	-
		Control -	-	-	-	-
		Control +	+	>1000	+	>1000

ML: Medio Líquido "Caldo"; MS: Medio sólido "Placas"; UFC: Unidades formadoras de colonias; >1000: Incontables; *: diferencias significativas a p<0.05.

DISCUSIÓN

La actividad antimicrobiana de *Moringa*, empleando extractos a base de distintos solventes (acetato de etilo, agua, etanol, hexano, metanol y acetona), con corteza⁴⁶⁻⁴⁸, hojas^{51, 53-69}, flores⁷⁰, frutos⁷¹ y semillas⁴⁹⁻⁵⁷ se ha evidenciado en su mayoría, a través de estudios in vitro con el método de difusión en agar, tanto en especies de microorganismos Gram negativos^{46-48, 50-66, 68-70} como Gram positivos^{46, 47, 50, 52-69}. No obstante, los resultados obtenidos con dicho método contrastan con el de macrodilución, similar al de microdilución (empleado en este estudio; que se distingue en el uso de menores volúmenes, para una respuesta rápida) descrito en *Aloe vera*⁴⁰, *Azadiractha indica*⁴² y *Mangifera indica*⁴⁴, al igual que con el método de microdilución indicado en *Azadiractha indica*⁴³. De tal manera que, con todos los microorganismos evaluados en este trabajo, se observó una respuesta similar a la encontrada en zabila⁴⁰, mango⁴⁴ y neem⁴², donde se empleó esencialmente el mismo método de esta investigación, observándose que a medida que se incrementa la concentración del extracto, disminuye gradualmente el crecimiento microbiano hasta tener una acción biocida a las 48 h, a concentraciones inferiores al 40% de extracto etanólico foliar.

En este sentido, se muestra en la mayoría de los casos en este estudio, que el extracto de callo NE a partir de solventes alcohólicos (etanol y metanol), presentó la más elevada efectividad debido a que presenta actividad bacteriostática y bactericida en la bacteria Gram positiva *S. aureus* y las Gram negativas *E. coli* y *P. aeruginosa*; así como el efecto fungistático y fungicida en el complejo *C. albicans*, tal como se han evidenciado en diversos trabajos publicados con extractos etanólicos^{48, 50-53, 58, 60-62, 64-69} y metanólicos^{46, 47, 53-56, 61-66, 71} con distintos órganos de *Moringa oleífera*^{9, 31}. Esta respuesta es replicada en extractos etanólicos de vitroplantas en *S. aureus*^{72, 73} y de callo en *E. coli*⁷⁰ y *S. aureus*⁷⁰. La mayor actividad biocida con este tipo de extractos puede deberse a que, a partir de solventes polares, se extraen con mayor rendimiento una diversidad de metabolitos secundarios antimicrobianos, como fenoles, alcaloides, saponinas y triterpenos, en particular con metanol⁵⁸, donde se destaca la epicatequina y quercetina⁷⁵ que inhiben el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus*.⁷⁶

Con *E. coli*, se encontró efecto bactericida de 10 a 25% en los extractos ensayados, siendo en el extracto etanólico, la menor concentración hallada (10%); concentración superior a la señalada por otros investigadores utilizando el método de difusión en agar a las 24 h de cultivo, con extracto metanólico de semillas al 0,005%⁵⁴ y de hojas al 0,05%⁶⁴, 0,1%⁶³ y 5%⁶⁶, con extracto acetónico de corteza al 7,5%⁴⁷, extracto acetónico foliar de 0,5%⁶⁵, 5%⁷² y de hojas de vitroplantas al 7,5%⁷², con extracto etanólico de flores y de callo al 5%⁷⁰, de hojas al 2%⁶¹ y 5%⁶⁸; no obstante, es inferior al obtenido con extracto etanólico de semillas al 20%⁵⁰. Al contrastar los resultados encontrados, con el método de macrodilución en *Aloe vera*⁴⁰ y *Mangifera indica*⁴⁴,

evidenciamos que el extracto de *Moringa oleifera* ejerce una mayor actividad bactericida, dado a que la CMB del extracto de zabila y mango fue respectivamente de 40% y 30%.

Con *P. aeruginosa*, se obtuvo un efecto bactericida al 10% en todos los extractos evaluados, siendo mayor la concentración hallada, en comparación a la descrita por otros investigadores empleando el método de difusión en agar a las 24 h de cultivo, con extracto metanólico de hojas de 0,05%⁶⁴, 0,4%⁵⁵, 2%⁵³ y 5%⁷², así como de semillas de 0,005%⁵⁶, 0,4%⁵⁵ y 2%⁵³, extracto acetónico de corteza al 7,5%⁴⁷, de hoja al 7,5%⁷² y de hojas de vitroplantas al 5%⁷², como en extractos etanólicos foliares al 7,5% de plantas de campo y cultivadas in vitro.⁷²

Al comparar los resultados hallados con estudios de mango⁴⁴, neem⁴² y zabila⁴⁰ con esta bacteria, utilizando el método de macrodilución, se encuentra una menor CMB en moringa, dado a que en las plantas antes mencionadas fue de 45% para *Aloe vera* y 50% para *Azadirachta indica* y *Mangifera indica*.

Para *S. aureus*, se consiguió el menor efecto biocida de las bacterias evaluadas, con 30% con extracto acetónico y 25% con los extractos etanólicos y metanólico; siendo mayor la concentración encontrada en comparación a la señalada en trabajos con el método de difusión en agar a las 24 h de cultivo, con extracto metanólico de semillas de 0,005%^{54,56}, 0,4%⁵⁵ y 2%⁵³, de hojas de 0,05%⁶⁴, 0,4%⁵⁵, 2%⁵³, 5%^{66,72} y 20%⁶⁹, así como en hojas in vitro al 2,5%⁷² y de corteza al 20%⁴⁶, extracto acetónico de corteza de 7,5%⁴⁷ y foliar ex vitro de 0,5%⁶⁵, 5%⁷², y 20%⁶⁹ e in vitro al 2,5%⁷² y extractos etanólicos de corteza al 0,003%⁴⁸, de flores y callo al 5%⁷⁰, de hojas de 2%⁶¹, 5%^{68,72} y 11,11%⁶⁷, así como de vitroplantas al 2,5%⁷²; sin embargo, fue inferior a la señalada en extractos etanólicos foliares de plantas de campo y cultivadas in vitro con un 40%.⁷³

Por otra parte, comparando los resultados encontrados en este estudio, con los hallados con el método de macrodilución, el efecto bactericida fue logrado a mayor CMB en *Aloe vera*⁴⁰ y *Azadirachta indica*⁴². 60% y 35% respectivamente, a diferencia de *Mangifera indica*⁴⁴, que el CMB fue 20%, menor al señalado en este trabajo y reafirmando lo resistente de esta bacteria a agentes antimicrobiales.

Por último, para el complejo *C. albicans*, se encontró efecto fungicida de 10% a 30% en los extractos ensayados, siendo hallada la mejor respuesta antifúngica con el extracto etanólico al 10%, concentración superior a la indicada por otros investigadores empleando el método de difusión en agar a las 24 h de cultivo, con extracto metanólico de semillas y hojas al 2%⁵³ y extracto etanólico de flores y callo al 5%⁷⁰; pero inferior a la hallada con extracto acetónico, etanólico y metanólico de callo al 40%⁷⁴. No obstante, al comparar los resultados obtenidos con el mismo método empleado en este trabajo, se observó una respuesta biocida superior, ya que en mango⁴⁴, neem⁴² y zabila⁴⁰, la CMB fue de 20%, 35% y 45% respectivamente.

CONCLUSIONES

Los extractos alcohólicos de callo no embriogénico (NE) de esta planta arbórea, tan popular en Venezuela, fueron significativamente más eficaces en su acción biocida en las cuatro cepas de microorganismos evaluadas, mediante la eficaz y rápida técnica de microdilución; en particular con el extracto etanólico al 10% en *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, seguido del extracto metanólico y etanólico al 25% para *Staphylococcus aureus*. Se demuestra que, a partir de extractos de NE (que son masas celulares no diferenciadas de origen vegetal obtenidas *in vitro*), puede lograrse actividad antimicrobiana en bacterias y hongos de interés clínico, evitando la influencia agroecológica de los materiales vegetales tradicionalmente empleados.

Por lo cual, recomendamos el uso de la técnica de microdilución en extractos de callo NE con otros microorganismos, así como la cuantificación de los metabolitos secundarios responsables de dicha inhibición microbial, para reforzar su uso medicinal terapéutico, en un futuro no lejano, a través de formulaciones antimicrobianas eficaces y económicas para el tratamiento de las afecciones causadas por las bacterias y levadura evaluadas en este estudio, así como para otras cepas microbiales.

AGRADECIMIENTOS

Al personal asistente del Centro de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo (Naguanagua-Edo. Carabobo).

REFERENCIAS

- Devendra B, Srinivas N, Prasad V, Swarna P. Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam., leaf extract, against selected bacterial and fungal strains. *Int J Pharma Bio Sci*. 2011; 2(3):13-18.
- Martín C, Martín G, García A, Fernández T, Hernández E, Puls J. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*. 2013; 36(2):137-149.
- Anwar F, Bhanger M. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *J Agric Food Chem*. 2003; 51:6558-6566. <https://doi.org/10.1021/jf0209894>
- Olson M, Fahey J. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Rev Mex Biod*. 2011; 82(4):1071-1082. <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.4.678>
- Falasca S, Bernabé M. Zonificación agroclimática de la moringa (*Moringa oleifera*) en Argentina para producir biodiesel y bioetanol. *Av Energ Renov M Amb*. 2009; 13:65-70.
- Sánchez Y, Martínez, G, Sinagawa S, Vásquez J. *Moringa oleifera*; importancia, funcionalidad y estudios involucrados. *Rev Cien Universidad Autónoma de Coahuila*. 2013; 5(9):25-29.
- Parrota J. *Moringa oleifera* Lam., En: Roloff A, Weisgerber H, Lang U, Stimm B, editors. *Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim 2009; p.1-8.

8. Paliwal R, Sharma V, Pracheta J. A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): A multipurpose tree with high economic and commercial importance. *Asian J Biotechnol.* 2011; 3(4):317-328. <http://dx.doi.org/10.3923/ajbkr.2011.317.328>
9. Swati S, Kaur A, Kumari C, Ali A, Garg P, Thakur P, Attri C, kulshrestha S. *Moringa oleifera* – a never die three: an overview. *Asian J Pharm Clin Res.* 2018; 11(12):57-65. <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i12.28049>
10. Pistelli L, Moilanen S, Pistelli L. *Moringa oleifera* come "l'albero della vita": una pianta dalle molteplici potenzialità. *Natural.* 2013; 1:62-69.
11. Palada M, Chang L. Suggested cultivation practices for *Moringa*. AVRDC. 2003; 3:1-5.
12. Rao P, Dahapal, S, Thaggikuppe P, Kumar, P. An updated review on "Miracle tree": *Moringa oleifera*. *Res. J Pharm Phytochem.* 2018; 10(1):1-5. <http://dx.doi.org/10.5958/0975-4385.2018.00016.X>
13. Fuglie, L. The miracle tree: The multiple attributes of *Moringa*. Church World Service. Dakar, 2001 p. 85.
14. Cannett R, Arvayo K, Ruvalcaba N. Aspectos tóxicos más relevantes de *Moringa oleifera* y sus posibles daños. *Biotecnia.* 2014; 16(2):36-43.
15. Höhn D, Fonseca, C, Avila, S, Guedes A, Fernandes L. *Moringa oleifera* Lam, características e potenciais usos: uma alternativa sustentável para o desenvolvimento de pequenas comunidades rurais. *Cadernos de Agroecologia.* 2018; 13(2):1-10.
16. Villarreal A, Ortega K. Revisión de las características y usos de la planta *Moringa oleifera*. *Investigación & Desarrollo.* 2014; 22(2):309-330.
17. Basit A, Rizvi A, Badruddeen, Alam J, Mishra A. Phytochemical a pharmacological overview of sahanjan (*Moringa oleifera*). *Int J Pharm Chemical Res.* 2015; 1(4):156-164.
18. Torres J, Sinagawa, S, Martínez, G, López, A, Sánchez, E, Aguirre, V, Torres, R, Oliveres, E, Osorio E, Gutiérrez A. *Moringa oleifera*: phytochemical detection, antioxidants, enzymes and antifungal properties. *Phyton.* 2013; 83:193-202.
19. Abdull A, Ibrahim M, Kntayya S. Health benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific J Cancer Prevention.* 2014; 15(20):8571-8576. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.20.8571>
20. 20. Moulin M, Mossou E, Signor L, Kieffer S, Kwaambwa H, Nermark F, Gutfreund P, Mitchell E, Haertlein M, Forsyth V, Rennie, A. Towards a molecular understanding of the water purification properties of *Moringa* seed proteins. *J Colloid Interface Sci.* 2019; 554:296-304. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.06.071>
21. 21. Kaur A, Kumari C, Tripathi A, Kakadec A, Li X, Kulshrestha S. Development and efficacy analysis of a *Moringa oleifera* based potable water purification kit. *J Water Process Engine.* 2019; 27:37-46. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.11.005>
22. Stohs S, Hartman M. Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Res.* 2015; 29(6):796-804. <https://doi.org/10.1002/ptr.5325>
23. Spandana U, Srikanth, P, Gopi J, Ashok V. A review on miracle tree: *Moringa oleifera*. *J. Pharmacognosy Phytochem.* 2016; 5(6):189-191.
24. Alarcón M. Fernández R, Reyes D. *Moringa oleifera*: potenciales usos en odontología. *Rev Salus.* 2017; 21(2):28-34.
25. Abdallah E. Antibacterial properties of leaf extracts of *Moringa oleifera* Lam. Growing in Sudan. *J Adv Med Pharm Sci.* 2016; 5(1):1-5. <http://dx.doi.org/10.9734/JAMPS/2016/21386>
26. Fernandes G, Mourão J, Ângelo Â, Costa R, Fernandes R. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2010; 52(3):129-132. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652010000300003>
27. Franco J, Zerpa, E, Moreno, R, Colmenares, R, Pérez, M, Leal C, Parra K. Susceptibilidad in vitro del *Staphylococcus aureus* al cloranfenicol aislado en muestras de secreciones. Hospital "Dr. Patrocinio Peñuela Ruiz" IVSS. San Cristóbal, Edo. Táchira. Venezuela. *Bol Venez. Infectol.* 2015; 26(1):40-45.
28. Whaley S, Berkow, E, Rybak, J, Nishimoto, A, Barker K, Rogers P. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* an emerging non-*albicans Candida* species. *Frontiers Microb.* 2017; 7:1-12. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>
29. Bernal M, Oquendo, G, Suárez, M, Rodríguez E, Vela O. Evaluación del marco de siembra de *Moringa oleifera* Lam. *Agr Org.* 2013; 19(2):23-27.
30. Hussein G, Shaaban H. Regeneration of horseadish tree (*Moringa oleifera* Lam.) through somatic embryogenesis and suspension culture. *Egypt J Exp Biol (Bot.).* 2016; 12(1):89-96.
31. Streeter, K, Katouli M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infect Epidemiol Med.* 2016; 2(1):25-32. <http://dx.doi.org/10.7508/iem.2016.01.008>
32. Kaper J. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2005; 295(1):355-356.
33. Scheutz, F. & Strockbine N.A. Genus I. *Escherichia*. In: Brenner, D.J., et al. (Eds.) The Proteobacteria. Part B: The Gamma proteo bacteria. Springer; 2005; 2 (Part B):607-623pp.
34. Makvana M, Krilov L. *Escherichia coli* Infections. *Pediatr Review.* 2015; 36(4):167-171. <https://doi.org/10.1542/pir.36-4-167>
35. Borga G, Caífa, G, La Rosa, M, González, F, Silva, M, Caldera J, Pitteloud J. Frecuencia y resistencia bacteriana de *Staphylococcus aureus* en infecciones nosocomiales en el Hospital Universitario de Caracas, años 2004 y 2007. *CIMEL.* 2010; 15(1):28-30.
36. 36. Zendejas G, Avalos, H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev. Biomed.* 2014; 25:129-143
37. Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomédica.* 2006; 17:287-305.

38. Pardi G, Cardozo E. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontol Venez.* 2002; 40(1):9-17.
39. Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence.* 2014; 5:161-169. <https://doi.org/10.4161/viru.26187>
40. Reyes R, Fernández R. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto foliar de zabala (*Aloe vera* L.) en microorganismos de interés clínico. *Rev Salus.* 2014; 18(3):27-32.
41. Alarcón M, Reyes, D, Fernández R. Evaluación in vitro de dos extractos de *Aloe vera* en bacterias patógenas. *Rev Salus.* 2016; 20(3):41-46.
42. Reyes R, Fernández R. Efecto biocida in vitro del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus sp* y *Pseudomonas sp*. *Rev Salus.* 2013; 17(3):27-32.
43. Fernández R, Salomón J, Reyes R. Efecto antibacteriano de hojas y callo de *Azadirachta indica* A. Jussen microorganismos de interés alimentario. *Rev Salus.* 2020; 24(2):27-34.
44. Reyes D, Ortega D, Quintero J, Piquer S, Alarcón M, Fernández R. Efecto antimicrobiano del extracto foliar de mango (*Mangifera indica* L. cv. Bocado) en microorganismos de interés clínico. *Rev Salus.* 2017; 21(2):7-13.
45. Van der Berg J, Kuipers S. The antibacterial action on *Moringa oleifera*: A systematic review. *S Afr J Bot.* 2022; 151:224-233. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.034>
46. Zaffer M, Ahmad A, Sharma R, Mahajan S, Gupta A, Kumar R. Antibacterial activity of bark extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some selected bacteria. *Pak J Pharm Sci.* 2014; 27(6):1857-1862.
47. Dewangan G, Koley K, Vadlamudi V, Mishra A, Poddar A, Hirpurkar D. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* (drumstick) root bark. *J Chem Pharm Res.* 2010; 2(6):424-428.
48. Nikkon F, Z. Saud, Z, Rahman M, Haque E. In vitro antimicrobial activity of the compound isolated from chloroform extract of *Moringa oleifera* Lam. *Pak J Bio Sci.* 2003; 6(22):188-1890.
49. Lüring M, Beekman W. Anti-cyanobacterial activity of *Moringa oleifera* seeds. *J. Appl Phycol.* 2010; 22:503-510. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9485-y>
50. Vieira G, Mourão J, Angelo A, Costa R, Vieira R. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Rev Inst Med Trop.* 2010; 52(3):129-132. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000300003>
51. Pérez M, Cabrera L, Colina G. *Pseudomonas aeruginosa* sensible a extractos de hojas y semillas de *Moringa oleifera*. *Redieluz.* 2018; 8(2):61-67.
52. Eilert U, Wolters B, Nahrstedt A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. *Planta méd.* 1981; 42:55-61. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971546>
53. Abo S, Abd-Alaziz M, Al-Zohairy A, Abo Z. Antimicrobial activity of methanolic extracts of leaves and seeds of three *Moringa* species grown in Egypt against some human pathogens. *N. Egypt J Microbiol.* 2017; 46:112-123.
54. Emmanuel S, Olajide O, Abubakar S, Idowu I, Orishadipe, A, Thomas, S. Phytochemical and antimicrobial studies of methanol, ethyl acetate, and aqueous extracts of *Moringa oleifera* seeds. *Am J Ethnomed.* 2014; 1(5):346-354.
55. Anzano A, de Falco B, Ammar M, Ricciardelli A, Grauso L, Sabbah M, Capparelli R, Lanzotti V.. Chemical Analysis and Antimicrobial Activity *Moringa oleifera* Lam. Leaves and Seeds. *Molecules.* 2022; 27:8920. <https://doi.org/10.3390/molecules27248920>
56. Onsare J, Arora D. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Appl Microb.* 2014; 118:313-325. <https://doi.org/10.1111/jam.12701>
57. Arora D, Onsare J. Antimicrobial Potential of *Moringa oleifera* Seed Coat and Its Bioactive Phytoconstituents. *Korean J Microbiol Biotechnol.* 2014; 42(2):152-161.
58. Llanko P, McDonnell P, van Vuuren S, Cock I. Interactive antibacterial profile of *Moringa oleifera* Lam. Extracts conventional and conventional antibiotics against bacterial triggers of some autoimmune inflammatory diseases. *S Afr J Bot.* 2019; 124:420-435. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.008>
59. Rahman M, Islam M, Akhtar S, Islam M, Rahman M, Rahman M, Alam M. Antibacterial activity of leaf juice and extracts of *Moringa oleifera* Lam. against Some Human Pathogenic Bacteria. *CMU J Nat Sci.* 2009; 8(2):219-227.
60. Sunartia S, Lahaya N, Fadhlirrahman M, Gondipon, R. Antibacterial Activity *Moringa oleifera* Leaf and red Ginger extract as natural feed additive. *Natural Feed Additive. Hasanuddin J Anim Sci.* 2022; 4(1):58-67.
61. Oluduro A. Evaluation of Antimicrobial properties and nutritional potentials of *Moringa oleifera* Lam. Leaf in South-Western Nigeria. *Malaysian J Microbiol.* 2012; 8(2):59-67.
62. Singh K, Tafida G. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* (Lam) leaves extracts against some selected bacteria. *Int J Pharm Pharm.* 2014; 6(9):52-54.
63. Dzotam J, Touani F, Kuete V. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafafa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. *BMC Complem Alter Med.* 2016; 16:9. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-0990-7>
64. Nugraha A, Niken A, Kadarwenny C, Pratoko D, Triatmoko B, Rosyidi V, Norcahyanti I, Dewi I, Dianasari D, Sary I, Wangchuk P. Phytochemical screening and the antimicrobial and antioxidant activities of medicinal plants of Meru Betiri National Park-Indonesia. *J Herbs Spices Med Plants.* 2020; 26(3):303-314. <https://doi.org/10.1080/10496475.2020.1734136>
65. Moyo B, Masika P, Voster M. Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. *Afr J Biotech.* 2012; 11(11):2797-2802.
66. Abdallah M, Muhammad F, Ibrahim A. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* methanolic leaves extracts against some Gram-positive and ram-negative bacterial isolates. *Microbes Infect Dis.* 2022; 3(1):199-208.

67. Peixoto J, Silva G, Costa A, Vieira G, Fonteles A, dos Fernandes, R. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa leaf* extracts. *Asian Pacific J Trop Med*. 2011; 4(3):201-204. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60069-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60069-2)
68. Pal S, Mukherjee P, Saha K, Pal M, Saha, B. Antimicrobial action of the leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. *Ancient Sci Life*. 1995;14(3):197-199.
69. Dave K, Shah H, Patel K. Antibacterial activity and phytochemical analysis of methanolic and acetonetic extracts from *Moringa oleifera*, *Vitex negundo* and *Rosa indica*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2018; 7(7):3718-3727. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.430>*Vitex negundo* and *Rosa indica*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2018; 7(7):3718-3727. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.430>
70. Talreja T. Screening of crude extract of flavonoids of *Moringa oleifera* against bacterial and fungal pathogen. *J Phyto*. 2010; 2(11):31-35.
71. Sayeed M, Hossain M, Chowdhury M, Mohsinul H. In vitro Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Moringa oleifera* Lam Fruits. *J Pharma Phytochem*. 2012; 1(4):94- 98.
72. Hasan L, Moh'd Hadi W, Awad M. Clonal propagation and antibacterial activity of *Moringa peregrina* (Forssk) fiori plant. *J Adv Biotechnol*. 2016; 6(1):787-797.
73. Shatnawi, M, Abubaker S, Odat, N, Rahman A, Majdalawi M. Antimicrobial Activity and Micropropagation of Some Rare and Endangered Plants of Jordan. *J Ecol Eng*. 2021; 22(6):151-158. <http://dx.doi.org/10.12911/22998993/137679>.
74. Alrayes L, Awad M, Moh'd Hadi W. In vitro studies on callus induction of *Moringa peregrina* (Forssk) fiori plant and antifungal activity of plants extracts. *Jordan J Agric Sci*. 2018; 14(2):146-156.
75. Govardhan R, Negi P, Radha C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. *J Funct Foods*. 2013; 5:1883-1891. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.009>
76. Adewale S, Similoluwa A, Kolawole A. Phytochemical and antibacterial investigation of *Moringa oleifera* seed: experimental and computational approaches. *Eclética Quím. J*. 2021; 46(2):17-25. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eq.v46.2.2021.p17-25>
77. Padilla C, Fraga N, Suárez M. Efecto del tiempo de remojo de las semillas de *Moringa (Moringa oleifera)* en el comportamiento de la germinación y en indicadores del crecimiento de la planta. *Rev Cub Cien Agric*. 2012; 46(4):419-421.
78. Jun-jie Z, Yue-sheng, Y, Meng, L, Shu, L, Yi, T, Han C, Xiao C. An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick. *Ind Crop Prod*. 2017;103(1):59-63. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.028>
79. Artigas D, Fernández R. Establecimiento del sistema de regeneración por embriogénesis somática de *Azadirachta indica* A. *Juss. Acta biol Colomb*. 2015; 20(2):73-83. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.44200>
80. Kala S, Vijayalakshmi M, Khaliulla S, Mallikarjuna K. Phytochemical and antimicrobial analysis of callus extracts of *Biophytum sensitivum* (Linn) DC. *Br Microbiol Res J*. 2014; 4(8):869-884.

Salus