

AKASMERIA



ppi 201502ZU4670

Esta publicación científica en formato digital es continuidad de la revista impresa ISSN 00755222

Volumen 45. N° 1. Enero - Junio 2017

Universidad del Zulia
Facultad de Medicina
Escuela de Medicina
Departamento de Enfermedades
Infecciosas y Tropicales
Maracaibo, Venezuela

ABSTRACT

Increasing the bacterial growth rate reduces the time getting the bacteria identification. This is helpful to choose an accurate and quick therapeutic strategy during microbiological infections, avoiding illness complications or in some cases the death. Here, we used bacterial growth method and we evaluated the growth of *Staphylococcus aureus* including an extract of *Chenopodium quinoa*, *Amaranthus caudatus* and *Salvia hispanica* in the routine culture media. Results show that adding these extracts, at low concentrations, have a protective effect against the cytotoxicity that could be generated by the oxidative stress product of the cellular metabolism of the bacteria growing *in vitro* and significantly increase the bacterial growth. The addition of these extracts to conventional culture media could improve bacterial growth during a bacteriological diagnosis and to reduce the time of pathogen identification.

Key words: *Chenopodium quinoa*, *Amaranthus caudatus*, *Salvia hispanica*, *Staphylococcus aureus*, bacterial growth.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones microbiológicas continúan siendo un problema de salud tanto a nivel de la comunidad como en los centros sanitarios. Escoger un rápido y certero tratamiento para las infecciones causadas por bacterias evita complicaciones de los pacientes y en ocasiones su muerte (1).

A pesar que en la actualidad las técnicas de biología molecular son importantes herramientas de diagnóstico microbiológico (2-4), los cultivos bacteriológicos siguen siendo utilizados para la identificación de los patógenos que causan infecciones (5). Por ello, nuevas aportaciones que mejoren esta forma de diagnóstico resulta relevante en el diagnóstico clínico.

Chenopodium quinoa (quinoa), *Amaranthus caudatus* (amaranto) y *Salvia hispanica* (chía) son altamente apreciadas por su valor nutricional (6). Estos productos naturales son ricos en proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y ácidos grasos poliinsaturados (7-11).

Evidencias experimentales muestran que el extracto de quinoa presenta propiedades antioxidantes, inmunoreguladoras y antiinflamatorias (12-14). En este sentido, ácidos grasos, tocoferoles, tocotrienoles y carotenoides presentes en la quinoa blanca,

roja y negra, han sido asociados con la actividad antioxidante (14). Sin embargo, las propiedades inmunoreguladoras y antiinflamatorias parecen estar relacionadas con una fracción de polisacáridos (12,13). También, se ha informado la presencia de compuestos fitoecdisteroides en las semillas de quinoa con capacidad de regular la diabetes (15). Resulta novedoso que un estudio reciente muestra que el extracto de quinoa es un sustrato idóneo para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* (16). Una mezcla de quinoa y amaranto aporta gran cantidad de glicanos, algunos de los cuales son importantes fuentes de energía para el crecimiento bacteriano (17). También, se ha descrito que el extracto de amaranto tiene capacidad protectora contra compuestos tóxicos (18) y que la chía puede restaurar el sistema antioxidante en animales de experimentación (19).

Hasta la fecha, la mayoría de estudios que involucran la quinoa, el amaranto y la chía están enfocados en su capacidad nutricional. No obstante, se ha demostrado que una biopelícula obtenida de quinoa presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (20). También, polifenoles aislados de la quinoa se emplean para el tratamiento del cáncer (21). A pesar de ello, los estudios respecto a las

aplicaciones biomédicas de estos compuestos resultan escasos.

Con el objetivo de incrementar el crecimiento bacteriano durante un diagnóstico clínico y reducir el tiempo de identificación del patógeno, en este trabajo, se evaluó el crecimiento de una bacteria relevante en la práctica clínica en un medio de cultivo convencional enriquecido con extractos de *quinoa*, *amaranto* y *chía*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Una colonia de *S. aureus* (ATCC12435) crecida por 24 horas en medio Luria-Bertani (LB) sólido fue resuspendida en medio LB líquido a 37°C (pH 7,0 y 10 g/L de NaCl) en una atmósfera húmeda con tensión de oxígeno normal. Las células fueron cultivadas por 4 horas antes de realizar los experimentos.

Enriquecimiento del cultivo celular

El medio de cultivo LB fue suplementado con cada uno de los extractos (*quinoa*, *amaranto* y *chía*) o con una combinación de los mismos (*quinoa-chía*, *quinoa-amaranto*, *amaranto-chía*), utilizando dos concentraciones de cada uno de ellos (0,1 mg/ml y 0,5 mg/ml). Los medios de cultivos enriquecidos fueron inmediatamente utilizados.

Determinación del crecimiento bacteriano

Medio de cultivo LB fresco (control) y medio LB enriquecidos fueron inoculados con 1×10^6 células de *S. aureus*. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación en una atmósfera húmeda con tensión de oxígeno normal. El crecimiento bacteriano fue monitorizado por la medición de la densidad óptica a 600 nm cada 2 horas, por un total de 12 horas utilizando un Nanodrop (Bio-Rad, USA) en el medio de cultivo LB fresco (control) y medio LB enriquecido, con y sin el agregado de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a 0,00015% (v/v) como agente oxidante para inducir las especies reactivas del oxígeno.

Análisis y presentación de los resultados

El número de muestras (n) en cada condición experimental se indica en los pies de las figuras. Para el análisis estadístico se realizó un análisis bidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de un post-test de Bonferroni. El valor de $P \leq 0,05$ fue considerado significativo. Para graficar los datos se utilizó el software GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

Se evaluó el crecimiento de *S. aureus* en un medio de cultivo convencional enriquecido con extractos con de *quinoa*, *amaranto* y *chía*. Los resultados obtenidos muestran que la adición de los extractos al medio de cultivo convencional incrementa significativamente el crecimiento de la bacteria (Figura 1). Hay que señalar que, aunque se utilizaron dos concentraciones diferentes de cada uno de los extractos (0,1 y 0,5 mg/ml) solo la concentración de 0,5 mg/ml mostró resultados significativos. También se emplearon los extractos de forma individual y en diferentes combinaciones (*quinoa-chía*, *quinoa-amaranto*, *amaranto-chía*) y los resultados indican que hay un ligero incremento del crecimiento bacteriano en estas muestras, pero no es significativamente diferente respecto al crecimiento obtenido en el medio convencional (*datos no mostrados*).

Dado que la adición de los tres extractos mejora el crecimiento bacteriano respecto al control y en la literatura se informa que, de forma independiente estos compuestos, se caracterizan por presentar propiedades antioxidantes, se exploró si los extractos logran mejorar el crecimiento bacteriano en un cultivo sometido a estrés oxidativo.

Los resultados muestran un mayor crecimiento en el medio suplementado con los extractos respecto al medio de cultivo convencional, lo que sugiere que el medio enriquecido puede reducir el estrés oxidativo inducido por (H_2O_2) (Figura 2).

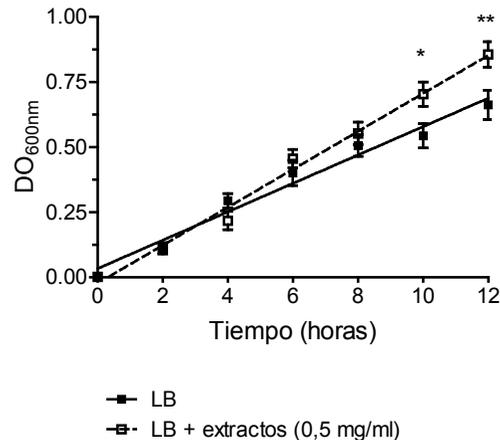


Fig 1. Medio de Luria-Bertani suplementado incrementa el crecimiento bacteriano. La figura muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en un medio de cultivo enriquecido con los extractos de quinoa, amaranto y chía. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos y se presentan en forma de crecimiento del microorganismo como absorbancia a 600 nm en el tiempo (media \pm error estándar de la media, n=3, en triplicado). El análisis estadístico se realizó a través de un análisis bidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de un post-test de Bonferroni. El valor de $P < 0,05$: *Significativamente diferente comparado con el control a las 10 horas. El valor de $P < 0,01$: **Significativamente diferente comparado con el control a las 12 horas. Para la presentación gráfica de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

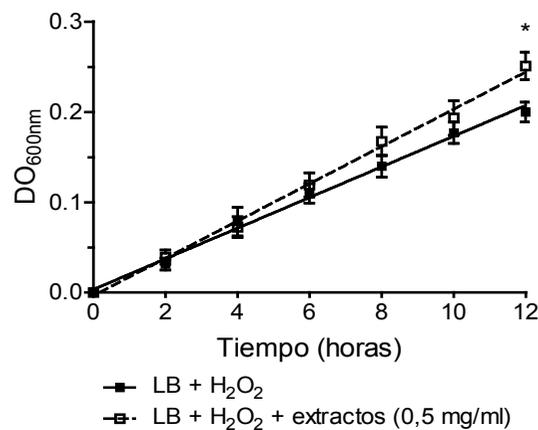


Fig 2. Los extractos de quinoa, amaranto y chía protegen a las células de *S. aureus* en cultivo del estrés oxidativo. La figura muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en un medio de cultivo enriquecido con los extractos de quinoa, amaranto y chía sometido a un agente oxidante. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos y se presentan en forma de crecimiento del microorganismo como absorbancia a 600 nm en el tiempo (media \pm error estándar de la media, n=3, en triplicado). El análisis estadístico se realizó a través de un análisis bidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de un post-test de Bonferroni. El valor de $P < 0,05$: *Significativamente diferente comparado con el control a las 12 horas. Para la presentación gráfica de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

DISCUSIÓN

Durante las infecciones microbiológicas reducir el tiempo para identificar el patógeno y conocer su perfil de resistencia a los antibióticos es un aspecto clave a la hora de elegir una rápida y específica estrategia terapéutica que permite una pronta recuperación del paciente y garantiza su supervivencia (1,22). A pesar de los avances en el diagnóstico y la asistencia sanitaria, la mortalidad relacionada con la sepsis sigue siendo considerable, y representa la segunda causa de muerte en unidades de cuidado intensivo no coronaria (23). En este sentido, el tratamiento antimicrobiano inapropiado es una preocupación a nivel mundial que se asocia a factores críticos como el aumento de la mortalidad por sepsis (24,25) o la resistencia microbiana a los antibióticos (26,27).

En la actualidad, los cultivos bacteriológicos se continúan empleando para el diagnóstico y la identificación de patógenos. Para muchos el cultivo de sangre todavía representa un buen método de aislamiento de patógenos presentes en el torrente sanguíneo (28,29). Teniendo en cuenta que *S. aureus* continúa siendo uno de los microorganismos más aislados en las infecciones bacterianas (30) y que incrementar su crecimiento *in vitro* durante el diagnóstico microbiológico puede repercutir de forma positiva en la salud del paciente, en este trabajo se evaluó el crecimiento de *S. aureus* en un medio de cultivo convencional enriquecido con extractos de *quinoa*, *amaranto* y *chía*.

Se ha observado que la adición de los extractos al medio de cultivo convencional incrementa significativamente el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, resulta contradictorio que estos extractos pueden presentar actividad antimicrobiana sobre algunas especies. Un estudio previo mostró que un extracto de *quinoa* a altas concentraciones tuvo efecto antibacteriano contra *E. coli* y *S. aureus* (31). También, resulta interesante que la administración de resolvina D2, un autacoide de estructura lipídica que puede derivar del metabolismo de los ácidos grasos omega-3, mejora la supervivencia en un modelo de sepsis multibacteriana (32), y que la alimentación de ratones con una dieta rica en ácidos grasos

poliinsaturados mejora la supervivencia durante una sepsis inducida por *S. aureus* (33). Al parecer estas propiedades antimicrobianas están más relacionadas con la modulación de la respuesta inmune que la acción directa sobre las bacterias. A pesar de ello, los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que si los extractos se mantienen a una concentración por debajo de 1 mg/ml mejoran el crecimiento bacteriano y carecen de propiedades antibacterianas.

También, se ha descrito que a partir de las semillas de *amaranto* se puede aislar péptidos con actividad antimicrobiana y que estos pueden ser fuertemente antagonizados por cationes (34). Para evitar la aparición de posible capacidad antimicrobiana del extracto de *amaranto*, se utilizó el medio LB con altas concentraciones del catión monovalente sodio.

Por otra parte, se ha reportado que compuestos fenólicos obtenidos de quinoa tiene un efecto inhibitorio en la proliferación de células de cáncer de próstata y que sus propiedades anticancerígenas se deben a la reducción del estrés oxidativo (21). Adicionalmente, se ha demostrado que la *chía* restaura el sistema antioxidante en animales de laboratorio (19) y que el *amaranto* tiene un efecto quimioprotector contra metabolitos tóxicos (18). Dado estos hallazgos, se decidió explorar un posible mecanismo por el cual estos extractos podrían mejorar la viabilidad celular.

El (H_2O_2) es un agente oxidante que ha demostrado tener un amplio espectro de citotoxicidad contra virus, bacterias, levaduras y esporas (35,36). A pesar de la producción de catalasa por *S. aureus* se utilizó bajas concentraciones de H_2O_2 para inducir estrés oxidativo. Los resultados muestran un número de bacterias significativamente superior en el medio de cultivo enriquecido con los extractos con respecto al medio de cultivo convencional, lo que hace pensar que el suplemento puede reducir el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 .

Se ha planteado que estos extractos y en especial la *quinoa* presentan una serie de compuestos con propiedades antioxidantes como los polifenoles y tioles, y que esta fracción podría ser la responsable de inhibir tanto la peroxidación lipídica como la pérdida de grupos tioles (37). La presencia de grupos tioles libres podría justificar la protección de las bacterias

al estrés oxidativo generado por H_2O_2 , estos compuestos pueden proteger los residuos de cisteínas en las proteínas a través su reducción directa (38) o por la formación de disulfuros mixtos que son sustratos de las enzimas que catalizan su regeneración, como tioredoxina (39). Esto sustentaría la idea de que la mezcla de estos extractos puede actuar como un agente reductor de grupos disulfuro.

A todo ello podemos sumar que a pesar que los mecanismos de la acción antioxidante de los polisacáridos aún son polémicos, varios estudios han postulado que estas macromoléculas, en parte, pueden ser agentes reductores y participar en la eliminación de los radicales libres (40). Por lo que, el contenido de polisacáridos o glicoconjugados presentes en estos extractos podrían explicar en parte la actividad antioxidante presente en esta compleja mezcla.

Los hallazgos obtenidos sugieren que la mezcla de los extractos *quinoa*, *amaranto* y *chía* utilizados, a bajas concentraciones, tienen un efecto protector contra especies reactivas del oxígeno generadas por el metabolismo celular de las bacterias cultivadas *in vitro*, lo que favorece el crecimiento bacteriano de *S. aureus*.

Esfuerzos adicionales se deben realizar para estandarizar el uso de estos extractos en la preparación de medios de cultivo para diagnóstico bacteriológico y evaluar el crecimiento de otras bacterias de interés clínico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad Técnica de Ambato (Resolución 0932-CU-P-2016) y el Programa “Becas Prometeo” de la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno de Ecuador para Wilber Romero Fernández.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Burillo A, Bouza E. Use of rapid diagnostic techniques in ICU patients with infections. *BMC Infect Dis.* 2014;14:593.
- (2) Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol.* 2007;9(1):21-39.
- (3) Nolte FS. Molecular diagnostics for detection of bacterial and viral pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2008;47 Suppl 3:S123-126.
- (4) Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2014;4(1):1-25.
- (5) Houpikian P, Raoult D. Traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):122-131.
- (6) Nascimento AC, Mota C, Coelho I, Gueifao S, Santos M, Matos AS, et al. Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: proximates, minerals and trace elements. *Food Chem.* 2014;148:420-426.
- (7) Tang Y, Li X, Chen PX, Zhang B, Hernandez M, Zhang H, et al. Characterisation of fatty acid, carotenoid, tocopherol/tocotrienol compositions and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. *Food Chem.* 2015;174:502-508.
- (8) Ullah R, Nadeem M, Imran M. Omega-3 fatty acids and oxidative stability of ice cream supplemented with olein fraction of chia (*Salvia hispanica* L.) oil. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):34.
- (9) Nowak V, Du J, Charrondiere UR. Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Chem.* 2016;193:47-54.
- (10) Valdivia-Lopez MA, Tecante A. Chia (*Salvia hispanica*): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. *Adv Food Nutr Res.* 2015;75:53-75.
- (11) Rastogi A, Shukla S. Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(2):109-125.
- (12) Yao Y, Yang X, Shi Z, Ren G. Anti-inflammatory activity of saponins from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells. *J Food Sci.* 2014;79(5):H1018-1023.
- (13) Yao Y, Shi Z, Ren G. Antioxidant and immunoregulatory activity

- of polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):19307-19318.
- (14) Tang Y, Li X, Zhang B, Chen PX, Liu R, Tsao R. Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. *Food Chem.* 2015;166:380-388.
- (15) Graf BL, Poulev A, Kuhn P, Grace MH, Lila MA, Raskin I. Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties. *Food Chem.* 2014;163:178-185.
- (16) Dallagnol AM, Pescuma M, Rollan G, Torino MI, de Valdez GF. Optimization of lactic ferment with quinoa flour as bio-preservative alternative for packed bread. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(9):3839-3849.
- (17) Lamothe LM, Srichuwong S, Reuhs BL, Hamaker BR. Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) and amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) provide dietary fibres high in pectic substances and xyloglucans. *Food Chem.* 2015;167:490-496.
- (18) Adewale A, Olorunju AE. Modulatory of effect of fresh *Amaranthus caudatus* and *Amaranthus hybridus* aqueous leaf extracts on detoxify enzymes and micronuclei formation after exposure to sodium arsenite. *Pharmacognosy Res.* 2013;5(4):300-305.
- (19) Marineli Rda S, Moura CS, Moraes EA, Lenquiste SA, Lollo PC, Morato PN et al.. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1alpha expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition.* 2015;31(5):740-748.
- (20) Pagno CH, Costa TM, de Menezes EW, Benvenuti EV, Hertz PF, Matte CR, et al. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chem.* 2015;173:755-762.
- (21) Gawlik-Dziki U, Swieca M, Sulkowski M, Dziki D, Baraniak B, Czyz J. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts - in vitro study. *Food Chem Toxicol.* 2013;57:154-160.
- (22) Peeling RW, Smith PG, Bossuyt PM. A guide for diagnostic evaluations. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(11 Suppl):S2-6.
- (23) Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013;369(21):2063.
- (24) Davey PG, Marwick C. Appropriate vs. inappropriate antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 3:15-21.
- (25) Lueangarun S, Leelarasamee A. Impact of inappropriate empiric antimicrobial therapy on mortality of septic patients with bacteremia: a retrospective study. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2012;2012:765205.
- (26) Canton R, Horcajada JP, Oliver A, Garbajosa PR, Vila J. Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31 Suppl 4:3-11.
- (27) Llor C, Bjerrum L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf.* 2014;5(6):229-241.
- (28) Barenfanger J, Graham DR, Kolluri L, Sangwan G, Lawhorn J, Drake CA, et al. Decreased mortality associated with prompt Gram staining of blood cultures. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(6):870-876.
- (29) Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(6):513-520.
- (30) Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603-661.
- (31) Miranda MD-H, J.; Vega-Gálvez, A.; Jorquera, E.; Quispe-Fuentes, Q and Martínez, M. . Antimicrobial Potential and Phytochemical Content of Six Diverse Sources of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Agricultural Sciences.* 2014;5:1015-1024.
- (32) Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA. et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature.* 2009;461(7268):1287-1291.
- (33) Svahn SL, Ulleryd MA, Grahnmemo L, Stahlman M, Boren J, Nilsson S, Jansson JO, Johansson ME. Dietary Omega-3 Fatty Acids Increase Survival and Decrease Bacterial Load in Mice Subjected to

- Staphylococcus aureus*-Induced Sepsis. Infect Immun. 2016;84(4):1205-1213.
- (34) Broekaert WF, Marien W, Terras FR, De Bolle MF, Proost P, Van Damme J, et al. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. Biochemistry. 1992;31(17):4308-4314.
- (35) Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. FEMS Microbiol Rev. 2013;37(6):955-989.
- (36) Tuladhar E, Terpstra P, Koopmans M, Duizer E. Virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour disinfection. J Hosp Infect. 2012;80(2):110-115.
- (37) Bors W, Michel C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. Ann N Y Acad Sci. 2002;957:57-69.
- (38) Poole LB. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. Free Radic Biol Med. 2015;80:148-157.
- (39) Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. Am J Physiol Cell Physiol. 2008;295(4):C849-868.
- (40) Wang J, Hu S, Nie S, Yu Q, Xie M. Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:5692852.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

Kasmera

Revista del Departamento de
Enfermedades Infecciosas y Tropicales

Vol. 45 N° 1, Enero - Junio 2017

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en diciembre de 2016, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve