



**Efecto de los extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* contra microorganismos bacterianos y fúngicos de importancia clínica en Colombia.**

**LAURA GERALDINE DAZA**

**YASUNARI LISSETH SALINAS TABERA**

**JESSICA PAOLA ROA MEZA**

**Asesor interno**

**LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL M.SC.**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**INFORME FINAL**

**BOGOTA D.C. 2019**

## DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a Dios y a todos los que hicieron parte de este proceso personal y académico.

A nuestros padres, que siempre nos acompañan incondicionalmente en cada etapa de nuestras vidas, a nuestros hijos que son la mayor motivación para culminar este proceso formativo, a nuestra familia por apoyar nuestro desarrollo formativo.

A nuestros amigos quienes, a lo largo de la carrera, aportaron su granito de arena, para lograr este proyecto de vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al docente Edison Tello, por su apoyo académico permitiéndonos ampliar nuestro conocimiento y llevar a cabo todos los procesos, para poder cumplir con los objetivos de este proyecto.

Igualmente, a la Docente Ligia Consuelo Sánchez y el semillero de investigación Ceparium por su acompañamiento durante este proceso, creyendo en nuestras capacidades.

Agradecemos a la institución que nos ha brindado las herramientas para crecer académicamente, proporcionándonos los conocimientos necesarios para poder cumplir con nuestro proyecto de vida.

## DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a Dios y a todos los que hicieron parte de este proceso personal y académico.

A nuestros padres, que siempre nos acompañan incondicionalmente en cada etapa de nuestras vidas, a nuestros hijos que son la mayor motivación para culminar este proceso formativo, a nuestra familia por apoyar nuestro desarrollo formativo.

A nuestros amigos quienes, a lo largo de la carrera, aportaron su granito de arena, para lograr este proyecto de vida.

## Tabla de contenido

RESUMEN.....	14
1. INTRODUCCION .....	17
2. OBJETIVOS .....	19
OBJETIVO GENERAL .....	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	19
3. ANTECEDENTES .....	20
4. MARCO TEORICO .....	26
<i>Eichhornia crassipes y Lemna gibba</i> .....	26
Taxonomía.....	26
Orígenes e importancia.....	27
Distribución geográfica en Colombia .....	28
Extractos.....	29
Métodos de obtención .....	29
Percolación en frio .....	29
Destilación .....	30
Microorganismos .....	31
Bacterias.....	31
Hongos.....	37
Métodos para inhibición microbiana y fúngica.....	42
Método de Difusión radial en medio sólido.....	42
Concentración Mínima Inhibitoria.....	43
Cromatografía Líquida de alta densidad (HPLC).....	43
5. DISEÑO METODOLOGICO .....	44
Tipo de investigación.....	44
Hipótesis.....	44
Fase 1: Recolección de material y obtención de extractos.....	45
Fase 2: Aislamiento de los microorganismos patógenos .....	45
Fase 3: Medición de la actividad antimicrobiana .....	47
1. Difusión radial en agar .....	47
2. Concentración mínima inhibitoria CMI .....	49
6. RESULTADOS .....	51

<b>6.1. DIFUSION RADIAL EN AGAR (Bacterias)</b> .....	<b>51</b>
<b>6.2. DIFUSION RADIAL EN AGAR (Hongos)</b> .....	<b>60</b>
<b>6.3. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (Bacterias)</b> .....	<b>64</b>
<b>6.4. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (Hongos)</b> .....	<b>78</b>
<b>6.5. Cromatografía líquida de alta densidad HPLC</b> .....	<b>85</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>91</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>97</b>
<b>9. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>98</b>
<b>10.REFERENCIA</b> .....	<b>99</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>108</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Distribución geográfica en Colombia de <i>Eichhornia crassipes</i> y <i>Lemna gibba</i> .....	28
<b>Figura 2.</b> Difusión radial en agar de <i>Staphylococcus aureus</i> . Roa J. 2018 .....	51
<b>Figura 3.</b> Difusión radial en agar de <i>Bacillus subtilis</i> . Roa J. 2018 .....	51
<b>Figura 4.</b> Difusión radial en agar de <i>Enterococcus faecalis</i> . Roa J. 2018.....	51
<b>Figura 5.</b> Difusión radial en agar de <i>Enterococcus faecium</i> . Roa J. 2018. ....	52
<b>Figura 6.</b> Difusión radial en agar de <i>Listeria monocytogenes</i> . Roa J. 2018.....	52
<b>Figura 7.</b> Difusión radial en agar de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (clínica). Roa J. 2018 .....	52
<b>Figura 8.</b> Difusión radial en agar de <i>E.coli</i> ATCC. Roa J. 2018 .....	53
<b>Figura 9.</b> Difusión radial en agar de <i>E.coli</i> nativa. Roa J. 2018 .....	53
<b>Figura 10.</b> Difusión radial en agar de <i>Acinetobacter baumannii</i> . Roa J. 2018 .....	53
<b>Figura 11.</b> Difusión radial en agar de <i>Acinetobacter</i> sp. Roa J. 2018.....	54
<b>Figura 12.</b> Difusión radial en agar de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (s. salud). Roa J. 2018 .....	54
<b>Figura 13.</b> Figura 13. Difusión radial en agar de <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Roa J. 2018 .....	54
<b>Figura 14.</b> Difusión radial en agar de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC BAA-1706). Roa J. 2018.....	55
<b>Figura 15.</b> Difusión radial en agar de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC BAA-1705). Roa J. 2018.....	55
<b>Figura 16.</b> Grafica Halos de inhibición de antibióticos frente a panel de bacterias Gram negativas .....	56
<b>Figura 17.</b> Grafica halos de inhibición de antibióticos frente a panel de bacterias Gram positivas .....	57
<b>Figura 18.</b> Grafica halos de inhibición de extractos frente a panel de bacterias Gram negativas .....	58
<b>Figura 19.</b> Grafica halos de inhibición de extractos frente a panel de bacterias Gram positivas .....	59
<b>Figura 20.</b> Difusión radial en agar de <i>Cándida glabrata</i> . Roa J. 2018 .....	60

<b>Figura 21.</b> Difusión radial en agar de <i>Cándida Krusei</i> . Roa J. 2018 .....	60
<b>Figura 22.</b> Difusión radial en agar de <i>Cándida albicans</i> . Roa J. 2018 .....	61
<b>Figura 23.</b> Difusión radial en agar de <i>Cándida parapsilosis</i> . Roa J. 2018 .....	61
<b>Figura 24.</b> Difusión radial en agar de <i>Microsporum cannis</i> . Roa J. 2018 .....	61
<b>Figura 25.</b> Difusión radial en agar de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . Roa J. 2018 .....	62
<b>Figura 26.</b> Difusión radial en agar de <i>Microsporum gypseum</i> . Roa J. 2018 .....	62
<b>Figura 27.</b> Grafica halos de inhibición de antifúngicos frente a panel de hongos	63
<b>Figura 28.</b> Grafica halos de inhibición de extractos frente a panel de levadura...	63
<b>Figura 29.</b> Grafica halos de inhibición de extractos frente a panel de hongos filamentosos .....	64
<b>Figura 30.</b> Microdilución en placa de <i>Staphylococcus aureus</i> MHB1 Roa J. 2018 .....	65
<b>Figura 31.</b> Microdilución en placa de <i>Bacillus subtilis</i> MHB2 Roa J. 2018.....	66
<b>Figura 32.</b> Microdilución en placa de <i>Enterococcus faecalis</i> MHB3 Roa J. 2018 .	67
<b>Figura 33.</b> Microdilución en placa de <i>Enterococcus faecium</i> MHB4 Roa J. 2018.	68
<b>Figura 34.</b> Microdilución en placa de <i>Listeria monocytogenes</i> MHB5 Roa J. 2018 .....	69
<b>Figura 35.</b> Microdilución en placa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (clínica) MHB6 Roa J. 2018. ....	70
<b>Figura 36.</b> Microdilución en placa de <i>E.coli</i> ATCC MHB7 Roa J. 2018 .....	71
<b>Figura 37.</b> Microdilución en placa de <i>E.coli</i> nativa MHB8 Roa J. 2018.....	72
<b>Figura 38.</b> Microdilución en placa de <i>Acinetobacter baumannii</i> MHB9Roa J. 2018	73
<b>Figura 39.</b> Microdilución en placa de <i>Acinetobacter</i> sp. MHB10 Roa J. 2018 .....	74
<b>Figura 40.</b> Microdilución en placa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (s. salud) MHB11 Roa J. 2018.....	75
<b>Figura 41.</b> Microdilución en placa de <i>Staphylococcus epidermidis</i> MHB12 Roa J. 2018 .....	76
<b>Figura 42.</b> Microdilución en placa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC BAA-1706) Roa J. 2018.....	77

<b>Figura 43.</b> Microdilución en placa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC BAA-1705) Roa J. 2018.....	77
<b>Figura 44.</b> Microdilución en placa de <i>Candida glabrata</i> MHL1 Roa J. 2018 .....	78
<b>Figura 45.</b> Microdilución en placa de <i>Candida krusei</i> MHL2 Roa J. 2018 .....	79
<b>Figura 46.</b> Microdilución en placa de <i>Candida albicans</i> MHL3 Roa J. 2018.....	80
<b>Figura 47.</b> Microdilución en placa de <i>Candida Parabsilosis</i> MHL4Roa J. 2018...	81
<b>Figura 48.</b> Microdilución en placa de <i>Microsporum canis</i> MHF1 Roa J. 2019 ....	82
<b>Figura 49.</b> Microdilución en placa de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> MHF2 Roa J. 2019 .....	83
<b>Figura 50.</b> Microdilución en placa de <i>Microsporum gypseum</i> MHF3 Roa J. 2019	84
<b>Figura 51.</b> Muestra1: Extracto de Lenteja ( <i>Lemna gibba</i> ) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm .....	85
<b>Figura 52.</b> Muestra1: Extracto de Lenteja ( <i>Lemna gibba</i> ) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm .....	85
<b>Figura 53.</b> Muestra1: Extracto de Lenteja ( <i>Lemna gibba</i> ) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm .....	86
<b>Figura 54.</b> Muestra2: Extracto B Raíz ( <i>Eichhornia crassipes</i> raíz) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm .....	86
<b>Figura 55.</b> Muestra2: Extracto B Raíz ( <i>Eichhornia crassipes</i> raíz) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm .....	87
<b>Figura 56.</b> Muestra2: Extracto B Raíz ( <i>Eichhornia crassipes</i> raíz) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm .....	87
<b>Figura 57.</b> Muestra3: Extracto B Hoja ( <i>Eichhornia crassipes</i> hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm .....	88
<b>Figura 58.</b> Muestra3: Extracto B Hoja ( <i>Eichhornia crassipes</i> hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm .....	88
<b>Figura 59.</b> Muestra3: Extracto B Hoja ( <i>Eichhornia crassipes</i> hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm .....	89
<b>Figura 60.</b> Muestra4: Extracto B Tallo ( <i>Eichhornia crassipes</i> tallo) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm .....	89

<b>Figura 61.</b> Muestra4: Extracto B Tallo ( <i>Eichhornia crassipes</i> tallo) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm .....	90
<b>Figura 62.</b> Muestra4: Extracto B Tallo ( <i>Eichhornia crassipes</i> tallo) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm .....	90

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Código de microorganismos .....	46
<b>Tabla 2.</b> Actividad inhibitoria de los antibióticos frente a panel de bacterias Gram negativas.....	56
<b>Tabla 3.</b> Actividad inhibitoria de los antibióticos frente a panel de bacterias Gram positivas. ....	57
<b>Tabla 4.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a panel de bacterias Gram negativas.....	58
<b>Tabla 5.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a panel bacterias Gram positivas. ....	59
<b>Tabla 6.</b> Actividad inhibitoria de los antifúngicos frente a panel de hongos. ....	62
<b>Tabla 7.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a panel de levaduras.....	63
<b>Tabla 8.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a panel de hongos filamentosos. ....	64
<b>Tabla 9.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB1 por el método CMI..	65
<b>Tabla 10.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB2 por el método CMI	66
<b>Tabla 11.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB3 por el método CMI	67
<b>Tabla 12.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB4 por el método CMI	68
<b>Tabla 13.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB5 por el método CMI	69
<b>Tabla 14.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB6 por el método CMI	70
<b>Tabla 15.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB7 por el método CMI	71
<b>Tabla 16.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB8 por el método CMI	72
<b>Tabla 17.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB9 por el método CMI .....	73
<b>Tabla 18.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB10 por el método CMI .....	74
<b>Tabla 19.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB11 por el método CMI .....	75
<b>Tabla 20.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB12 por el método CMI .....	76

<b>Tabla 21.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHL2 por el método CMI	79
<b>Tabla 22.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHL3 por el método.....	80
<b>Tabla 23.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHL4 por el método CMI	81
<b>Tabla 24.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHF1 por el método CMI	82
<b>Tabla 25.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHF2 por el método CMI	83
<b>Tabla 26.</b> Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHF3 por el método CMI	84

## INDICE DE ANEXO

<b>Anexo 1.</b> Proceso de extracción de los extractos de las plantas <i>Eichhornia crassipes</i> y <i>Lemna gibba</i> . .....	108
--	-----



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**Efecto de los extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* contra  
microorganismos bacterianos y fúngicos de importancia clínica en  
Colombia.**

**RESUMEN**

Los reportes de la Organización Mundial de la Salud sobre resistencia microbiana tienen en alerta a las entidades de salud en todo el mundo. En la búsqueda de nuevos fármacos, las plantas son preferidas por sus metabolitos. Macrofitas como *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*, que son un problema para los cuerpos de agua, han sido descritas por sus metabolitos como promisorias para ensayos antimicrobianos. El objetivo de este proyecto fue evaluar la acción antimicrobiana y antifúngica de extractos obtenidos a partir de las plantas acuáticas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* frente a un panel de 12 bacterias, 4 levaduras y 3 hongos filamentosos de importancia clínica. La metodología incluyó la recolección, secado y obtención de extractos crudos a partir de las 2 plantas; evaluación de los extractos frente al panel de microorganismos utilizando pruebas de difusión radial en agar y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microplaca. Los extractos de hojas de *Lemna gibba*, hojas y raíz de *Eichhornia crassipes*, tuvieron actividad antibacteriana y antimicótica frente al panel de cepas en estudio, finalmente se trató de establecer el tipo de sustancias en cada uno de los extractos por *High Performance Liquid Chromatography* HPLC. Con estos resultados, se espera a

futuro realizar nuevos ensayos especialmente con lenteja de agua, utilizando solventes que permitan ampliar el espectro.

**Palabras claves:** *Eichhornia crassipes*, *Lemna gibba*, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), difusión radial en agar.

### SUMMARY

The reports of the World Health Organization on microbial resistance keep health entities around the world on alert. In the search for new drugs, plants are preferred for their metabolites. Macrophytes such as *Eichhornia crassipes* and *Lemna gibba*, which are a problem for water bodies, have been described by their metabolites as promising for antimicrobial assays. The objective of this project was to evaluate the antimicrobial and antifungal action of extracts obtained from the aquatic plants *Eichhornia crassipes* and *Lemna gibba* against a panel of 12 bacteria, 4 yeasts and 3 filamentous fungi of clinical importance. The methodology included the collection, drying and obtaining of raw extracts from the 2 plants; Evaluation of the extracts against the panel of microorganisms using radial diffusion tests on agar and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in microplate. The extracts of *Lemna gibba* leaves, leaves and root of *Eichhornia crassipes*, had antibacterial and antifungal activity in front of the panel of strains under study, finally it was tried to establish the type of substances in each of the extracts by *High Performance Liquid Chromatography* HPLC. With these results, new tests are expected in the future, especially with water duck, using solvents that allow the spectrum to be extended.

Keywords: *Eichhornia crassipes*, *Lemna gibba*, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), radial diffusion in agar.

**Estudiantes:** Laura Geraldine Daza  
Yasunari Lisseth Salinas Tabera  
Jessica Paola Roa Meza

**Docente:** Ligia Consuelo Sánchez Leal

**Fecha:** 2019- II

**Institución:** UCMC

## 1. INTRODUCCION

Se habla de resistencia microbiana cuando los microorganismos desarrollan la capacidad de inactivar el efecto que los medicamentos producen en ellos, generando así el ambiente para continuar su crecimiento y no morir. La resistencia a los antibióticos tiene el potencial de afectar a las personas en cualquier etapa de la vida, así como a las industrias de la salud, veterinaria y agricultura, por lo que es uno de los problemas de salud pública más urgentes del mundo.

Cada año en Estados Unidos, al menos 2 millones de personas se infectan con bacterias resistentes a los antibióticos y, como resultado, al menos 23,000 personas mueren. Nadie puede evitar completamente el riesgo de infecciones resistentes, pero algunas personas tienen mayor riesgo que otras (por ejemplo, personas con enfermedades crónicas). Si los antibióticos pierden su efectividad, se pierde la capacidad de tratar infecciones y controlar las amenazas para la salud pública<sup>1</sup>.

Por otra parte, las Naciones Unidas en el decenio 2010-2020 trata el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), donde resalta el manejo y desarrollo de recursos genéticos, ya sean de plantas, animales o microorganismos, para ser utilizados con diversos fines, desde la investigación básica hasta el desarrollo de productos. En algunos casos, los conocimientos tradicionales asociados a los recursos genéticos que provienen de comunidades indígenas y locales proporcionan información valiosa a los investigadores en cuanto a las propiedades y el valor específico de estos recursos y su posible utilización para el desarrollo, por ejemplo, de nuevos medicamentos o cosméticos. Entre los usuarios de recursos genéticos pueden incluirse instituciones de investigación y académicas y empresas privadas que desempeñan sus actividades en diversos sectores, como el farmacéutico, el de la agricultura, la horticultura, la cosmética y la biotecnología<sup>2</sup>.

El concepto de resistencia microbiana y el de potencial de los recursos genéticos se ligan, cuando se procede a la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas,

con resultados efectivos, como es el caso concreto de los estudios de las plantas con un gran potencial antimicrobiano.

*Eichhornia crassipes* es una de las plantas con alta productividad, pero a su vez es una de las peores malezas ubicada entre las diez primeras del mundo. Se considera una amenaza para la diversidad de especies nativas locales de cuerpos y agua porque cambia estado natural del ambiente acuático tanto en lo físico como en lo químico, alterando así la estructura y función de los ecosistemas mediante la interrupción de las cadenas alimentarias y el ciclo de nutrientes<sup>3</sup>.

*Lemna gibba*, ha sido más investigada por su capacidad para procesos de bioremediación por ser un potente bioacumulador de cromo, cadmio, cobre, níquel, plomo y selenio<sup>4</sup>. En el área de uso terapéutico, la lenteja de agua (*Lemna spp.*) se ha descrito como una planta acuática con efectos fungicidas, propiedades inmunomoduladoras, antioxidante y ampliamente utilizada como materia prima para la producción de analgésicos y remedios antipiréticos<sup>5</sup>.

El objetivo de este proyecto fue evaluar la acción antimicrobiana y antifúngica de extractos obtenidos a partir de las plantas acuáticas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* frente a un panel de 12 bacterias, 4 levaduras y 3 hongos filamentosos de importancia clínica. Se utilizó como métodos para observación y medición de la actividad Difusión radial en agar, el cual se realizó para cada microorganismo por triplicado. La actividad se evaluó midiendo el halo de inhibición generado por cada sensidisco los cuales fueron impregnando con los diferentes extractos. El otro método fue por Concentración Mínima Inhibitoria CMI en microplacas de Elisa de 96 pozos previamente llevadas a UV, agregando en cada pozo caldo Mueller Hinton, e inóculo de cada microorganismo y por dilución seriada para los extractos. Los resultados obtenidos indican que las dos plantas tienen actividad antibacteriana y antimicótica. El siguiente paso fue realizar la cromatografía líquida HPLC para observar la actividad de estos extractos.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la acción antimicrobiana y antifúngica de extractos obtenidos a partir de las plantas acuáticas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* frente a un panel de 12 bacterias: 4 levaduras y 3 hongos filamentosos de importancia clínica

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar los bioensayos para determinar la eficacia de los extractos contra el panel de los microorganismos patógenos clínicos.
- Determinar la inhibición de los microorganismos bacterianos y fúngicos frente a los extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* por el método difusión radial en agar y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microplaca.
- Establecer la identidad de las sustancias de los extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* por cromatografía líquida HPLC

### 3. ANTECEDENTES

El desarrollo de antibióticos y su comercialización en masa ha ocasionado multirresistencia por parte de los microorganismos desde el siglo pasado esto constituye una amenaza para el mundo entero ya que el tratamiento es cada vez más limitado. El uso de antibióticos en la humanidad es reciente, siendo la penicilina el primero en ser descubierto en 1928 esto también provocó que su uso excesivo diera desarrollo a resistencia por parte del *Staphylococcus*, de allí inicio el surgimiento de la resistencia lo que ha conllevado a buscar nuevas estrategias de desarrollar nuevos antibióticos naturales<sup>6</sup>.

La mayor parte de información de los microorganismos multirresistentes proviene en gran medida de las instalaciones clínicas, según cifras de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) 1,4 millones de personas contraen infecciones intrahospitalarias y los microorganismos más implicados son *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* *Pseudomonas aeruginosa*<sup>7</sup> y según un estudio en américa latina mostró altas tasas de *K. pneumoniae* y *E. coli* son positivas para betalactamasas de espectro extendido (BLEE), Gram negativos resistentes a carbapenemasas, Enterococos resistentes a vancomicina (ERV), y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)<sup>6</sup>.

En la actualidad se ha encontrado que la resistencia no solamente es microbiana sino también fúngica un claro ejemplo de ello es la levadura *Candida albicans* la cual es oportunista en niños, neonatos y en cuidados intensivos. Se ha observado un gran número de pacientes que no responden a los tratamientos con antimicóticos derivados de los azoles y polienos<sup>8</sup>, de esta problemática deriva la importancia de los productos vegetales.

Según Cabrera y colaboradores en el año 1992 nos habla de la importancia de los productos de origen vegetal ya que son recursos naturales renovables de múltiple uso para el hombre<sup>9</sup>. En este mismo año se adoptó en Colombia el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) que es una oportunidad para el desarrollo

sostenible mediante el uso de biotecnología, aportando un valor agregado a los recursos biológicos de nuestro país. De allí deriva el término de la bioprospección supone una herramienta que amplía las posibilidades de uso sostenible de los recursos biológicos, genéticos y derivados, pues permite la “búsqueda de moléculas, genes, o ingredientes activos, que pueden ser producidos industrialmente sin recurrir al uso extractivo insostenible de la biodiversidad”<sup>10</sup>.

El primer uso que se le dio a las plantas *Eichhornia crassipe* y *Lemna gibba* fue en la parte de biorremediación y en los últimos años se han estudiado los metabolitos como potencial medicinal.

A continuación, se describen algunos reportes:

Vadlapudi V realizó un ensayo antimicrobiano con el extracto metanólico de diversas plantas de la India, entre ellas *E. crassipes*. Los extractos fueron evaluados mediante la técnica de difusión en agar frente a *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Xanthomonas campestris*. Los halos de inhibición de *E. crassipes* fueron para *A. alternata*, de 11 mm, para *A. flavus* de 10 mm, *F. oxysporum* la inhibición fue de 9 mm, frente a *R. solani* el halo de inhibición fue de 14 mm, y para *X. campestris* fue de 8 mm siendo para la bacteria el reporte de menor sensibilidad<sup>11</sup>.

Shanab S. y cols., realizaron una extracción metanólica de *E. crassipes* evaluando los compuestos mediante cromatografía de capa fina, el extracto crudo se fraccionó utilizando diferentes cantidades de hexano/acetato de etilo, se realizaron cinco concentraciones desde 20 mg/mL hasta 250 mg/mL, estas concentraciones se probaron contra *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans*, el ensayo se realizó mediante la técnica difusión en disco y se evaluó el halo de inhibición que ejercía cada extracto sobre los microorganismos seleccionados, frente a *Bacillus subtilis* todos los extractos ejercieron inhibición entre 12 mm y 14 mm, frente a *Enterococcus faecalis* todos los extractos inhibieron con halos de 11 mm a 14 mm, contra *Staphylococcus aureus* se encontraron halos entre 12 mm y 15 mm, con *Enterococcus faecalis* fue donde se encontró mayores halos de

inhibición alcanzando los 16 mm, frente a los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* no se encontró ninguna inhibición por parte de los extractos mientras que con *Candida albicans* hubo halos entre 12 mm y 15 mm con todos los extractos<sup>12</sup>.

Thamaraiselvi y cols., realizaron extracciones etanólicas, con acetato de etilo, cloroformo y acuosas de las hojas de *Eichhornia crassipes*, realizaron una marcha fitoquímica del extracto etanolico y por último evaluaron la actividad antimicrobiana de cada extracto frente a *Micrococcus luteus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Monascus ruber* y *Aspergillus fumigates* mediante la técnica de difusión en agar. La marcha fitoquímica mostró que en las hojas se encontraban compuestos como: alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, antraquinonas, fenoles, los ensayos antimicrobianos mostraron que frente a *M. luteus* el extracto etanólico presentó un halo de 11 mm de inhibición, con acetato de etilo 10 mm, con cloroformo 8 mm, y con el extracto acuoso 9 mm; frente a *R. rubrum* se encontraron halos de inhibición de 10 mm, 12 mm, 14 mm, 10 mm con el extracto etanolico, de acetato de etilo, cloroformo y acuoso respectivamente; frente a *A. fumigates* hubo inhibición por parte de todos los extractos con halos de hasta 15 mm y por último contra *M. ruber* los halos se encontraban entre 8 mm y 11 mm<sup>13</sup>.

En el trabajo previo realizado por el grupo Ceparium relacionado con *Eichhornia crassipes* se demostró que para *Providencia rettgeri* con ESBLs el extracto de hojas de *Eichhornia crassipes* demostró ser el más efectivo a una concentración de 1500 mg/ml con un diámetro de inhibición de 15 mm. El extracto de tallos de *Eichhornia crassipes* inhibió a *Staphylococcus aureus* con un halo de 18 mm<sup>14</sup>.

Las investigaciones de lenteja de agua se centran en los estudios toxicológicos. Además, es usada como modelo de patogénesis frente a varios microorganismos. Los trabajos encontrados como antecedentes sobre su acción antimicrobiana se enuncian a continuación:

Effiong B. y Cols, desarrollaron extractos acuosos y etanolicos de la lenteja de agua, para observar la capacidad antifúngica de la lenteja de agua contra *Fusarium Oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*,

*Rhizopus oryzae*. Los resultados arrojaron que los extractos etanolicos tienen una mayor inhibición fungicida que el extracto acuoso; probablemente se puede utilizar la lenteja de agua como agente antifúngico en estanques de producción de peces, aumentando la práctica de acuicultura en la pesca de Nigeria<sup>15</sup>.

En el estudio realizado por Gülçin I. y Cols, donde investigaron la actividad antioxidante, anti-candidal, anti-bacterial y anti-rradical de *Lemna minor* L. utilizando metodología In Vitro, estos investigadores realizaron extractos de agua liofilizada y extractos de etanol. Utilizaron un total de 21 bacterias y 4 levaduras como muestra de estudio. El extracto de agua liofilizado y extracto de etanol inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria sicca*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus pneumoniae*, y un efecto anticandidal contra *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*<sup>5</sup>.

*Lemna paucicostata* ha sido objeto de estudio por su naturaleza y su hábitat ya que es una planta que crece en la mayoría de aguas contaminadas, de ahí surgió el interés de muchos científicos por estudiar que compuestos bioactivos ejercían efecto para la protección integral de la planta de diminuto tamaño. Uno de los estudios realizados por investigadores de la India como son Madhavi D. y Cols es que utilizaron la planta como modelo experimental *Lemna paucicostata* para comprender y analizar los compuestos activos (fitocompuestos). Aislaron un compuesto aromático y un glucósido esteroide, pero el que tuvo acción antimicrobiana fue el compuesto aromático pues demostró un halo de inhibición de 10mm contra bacterias Gram negativas, entre ellas, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>16</sup>.

En 2015 el investigador Almahy H. en su estudio titulado "Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of *Lemna minor* against eight different bacterial species" Investigó las propiedades antimicrobianas de extractos metanolicos de hojas de *L. minor* frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Shigella flexneri*, *Bacillus*

*megaterium* y *Salmonella typhi*. Mostrando diferentes grados de actividad contra la mayoría de las bacterias antes mencionadas<sup>17</sup>.

El estudio previo realizado por Torres y cols con el grupo *Ceparium* demostró halos de inhibición para *E. coli* de entre 5 mm y 7 mm en concentraciones de 226 ug/ml a 28.2 ug/ml, para *S. aureus* entre 3mm y 7mm en concentraciones de 226 ug/ml a 56.5 ug/ml y para *K. pneumoniae* de entre 2 mm y 6 mm en concentraciones de 226 ug/ml a 28.2 ug/ml. La técnica de microdilución determinó la MIC del extracto de lenteja de agua para *E.coli* fue entre 28.2 a 14.1 ug/ml, *S aureus* entre 28.2 a 7.06 ug/ml y *K.pneumoniae* entre 28.2 a 14.1 ug/ml. Se concluyó que el extracto orgánico de lenteja de agua fue capaz de inhibir el crecimiento de los diferentes microorganismos en estudio en diferentes concentraciones<sup>18</sup>.

En el año 2017, Gutierrez-Morales y colaboradores, realizaron una investigación sobre el efecto contra *Staphylococcus* aislados de conejos y ganado vacuno, de los extractos de hojas de *Eichhornia crassipes*, *Pistacia vera* y *Zizipus amole*. Los resultados obtenidos sugieren que el extracto metanólico de las hojas de *P. vera*, *Z. amole* y *E. crassipes* pueden ser utilizados para su posible aplicación en la etnomedicina, particularmente como preparación de medicamentos contra las infecciones estafilocócicas puesto que se evidenció la biopotencia de estas plantas contra *Staphylococcus aureus* meticilina resistente MRSA presente en ganado vacuno, y *S. aureus* sensible a la oxacilina SOSA<sup>19</sup>.

En 2018, Jagathesan y Rajiv realizaron un estudio con nanopartículas de hierro utilizando extracto de *Eichhornia crassipes*. Ellos encontraron que la zona más alta de inhibición se observó a una concentración de 100 µg / ml de nanopartículas de óxido de hierro mediadas por *Eichhornia* contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas fluorescens*. Las nanopartículas de óxido de hierro (FeNPs) mostraron una buena actividad antibacteriana y los investigadores consideran que podrían ser usados en campos medicinales<sup>20</sup>.

Con relación a la actividad antimicrobiana, en el año 2019, Mohamed y colaboradores realizaron un trabajo con extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* como alternativa para realizarle un tratamiento a papel histórico y preservarlo contra la acidificación, oxidación y contaminación por hongos. El experimento consistió en realizar extractos etanólicos de las dos plantas e impregnarlo a un sustrato de celulosa, cada extracto en forma independiente. Los resultados evidenciaron que los dos extractos son una nueva alternativa de origen natural para una eficaz desacidificación sinérgica, antioxidación, antirradical, quelación de metales y tratamiento fungicida de papel histórico<sup>21</sup>.

## 4. MARCO TEORICO

### *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*

#### Taxonomía.

#### *Eichhornia crassipes*

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Viridaeplantae

**Subdivisión:** Spermatophytina

**División:** Tracheophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Commelinales

**Familia:** Pontederiaceae

**Género:** *Eichhornia*

**Especie:** *E. crassipes*

Es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Pontederiaceae, son plantas de tallo corto del que surgen hojas en forma de roseta con largos peciolo y láminas de 2,5- 6cm de largo y 3-12 de ancho en las hojas sumergidas e peciolo es largo y ancho y en las hojas de la superficie el peciolo es corto e hinchado esto facilita que la planta flote. Tiene entre 4-16 flores de tonos azules a grises con aspecto parecido a los Jacintos. El fruto es una capsula de 1.5 cm de largo. Se reproduce por semilla y de forma asexual<sup>22</sup>.

#### *Lemna gibba*

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Viridaeplantae

**Subdivisión:** Spermatophytina

**División:** Tracheophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Alismatales

**Familia:** Araceae

**Género:** Lemna

**Especie:** *Lemna gibba*

Es una planta flotante con máximo tres hojas, estas tienen únicamente una raíz. Cada vez que las hojas van creciendo se van separando, la raíz mide de 1-2 cm y las hojas tienen una longitud de 1- 8 milímetros y de ancho 0.6 -5 milímetros cada hoja tiene 3 venas y 5 incisiones que ayudan a la planta a flotar. Su reproducción principalmente de forma asexual<sup>23</sup>.

### **Orígenes e importancia**

*Eichhornia crassipes* es originaria de aguas dulces de América del Sur, en las cuencas Amazónica, y del Plata. Habita principalmente en aguas estancadas, pero también puede encontrarse en aguas con flujo de velocidad disminuido como lo son ríos, canales, zanjas de drenaje, etc. Es considerada una maleza en el mundo por su crecimiento que se ha extendido en zonas tropicales y subtropicales donde forma alfombras que cubren campos de arroz, canales de riego e impide la navegación y pesca, no se reproduce en zonas donde hay invierno. Pese a ser considerada una maleza posee la capacidad de degradar desechos y contaminantes del agua, algunos estudios muestran que puede actuar como insecticida en enfermedades parasitarias en zonas tropicales<sup>22</sup>.

*Lemna gibba* es una planta con distribución universal, se ha encontrado en hemisferios norte y sur, incluyendo América, Europa, Asia, Australia y Nueva Zelanda, crece en agua dulce, ciénagas, lagos y ríos calmados. Es utilizada como alimento para animales, en tratamiento de aguas residuales y en fitorremediación por su capacidad de remoción de cadmio, cromo, cobre, níquel, plomo y selenio<sup>24</sup>

## Distribución geográfica en Colombia



**Figura 1** Distribución geográfica en Colombia de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*

## **Extractos**

Para obtener las sustancias activas de una planta se recurre a un extracto.

El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente que por lo general los más usados son agua o alcohol, puede ser en frio o caliente y el producto puede ser concentrado o espeso de acuerdo con la sustancia de origen<sup>24</sup>.

### **Métodos de obtención**

Las técnicas de extracción son procedimientos que se utilizan para extraer diferentes tipos de sustancias orgánicas de material biológico como plantas; las técnicas de extracción son diversas, se pueden encontrar técnicas mecánicas como los procesos pelatrice y/o sfumatrice los cuales son utilizados principalmente para extraer aceites esenciales, también existen técnicas de extracción con solventes como la percolación en frio o la roto evaporación, las cuales se fundamentan en la capacidad que poseen ciertas sustancias para solubilizar algunos componentes que se encuentran en las plantas, por ultimo encontramos la extracción por medio de fluidos súper críticos la cual consiste en la separación de metabolitos utilizando una sustancia la cual se lleva hasta un punto en el cual su presión y temperatura critica es superada y por lo tanto esta sustancia se comporta como un líquido y un gas lo que permite que se puedan extraer ciertas sustancias sin afectar a las otras<sup>25</sup>.

### **Percolación en frio**

La percolación en frio es un método de extracción sencillo que consiste en el uso de sustancias como el agua o los alcoholes con el fin de extraer sustancias biológicas las cuales fácilmente se solubilizan en dichos compuestos, aunque industrialmente es un método de bajo rendimiento para análisis pequeños es de gran utilidad, existen diferentes elementos de laboratorio que permiten realizar una

percolación pero realmente lo que permiten es la rápida solubilización de un compuesto ya que el principio es el mismo. El proceso para llevar a cabo una percolación consiste en dejar secar el material biológico del cual se quieren extraer los compuestos, triturarlo y por último sumergirlo en el disolvente de elección con el fin de permitir que los compuestos deseados se solubilizan en el solvente<sup>25</sup>.

### **Destilación**

La destilación es una técnica que permite separar líquidos los cuales se encuentran en disolución, la separación por lo general depende de la volatilidad que posea dicha disolución, la técnica consiste en calentar un matraz el cual contiene el compuesto a separar, el matraz está unido a un tubo el cual está frío y permite la condensación del líquido que se está evaporando para posteriormente depositarse en otro matraz sin que vuelva a mezclarse con la sustancia que se está separando<sup>26</sup>.

El elemento que comúnmente se utiliza en el laboratorio para llevar a cabo una destilación a pequeña escala es un rotoevaporador el cual permite la separación de líquidos en disolución principalmente. Este consiste en un tubo condensador un matraz de muestra, un matraz receptor, una cámara de vacío y un recipiente para calentar el matraz de muestra, el funcionamiento consiste en hacer calentar el matraz de muestra hasta que la sustancia volátil se empieza a evaporar por medio de la cámara de vacío se genera una succión que moviliza el vapor hacia la cámara de condensación la cual se encuentra fría a causa del agua que se encuentra en circulación para posteriormente ser depositado de forma líquida en el matraz receptor y de esta forma separa el soluto del solvente<sup>27</sup>.

## **Microorganismos**

### **Bacterias**

#### ***Staphylococcus aureus***

Son cocos Gram positivos que suelen agruparse en racimos. Tienen una forma esférica y un diámetro de alrededor de una micra. Su forma de obtener energía es a través de la fermentación como de la respiración. Los requerimientos de cultivo, no son exigentes desde el punto de vista nutricional, creciendo en medios pobres y simples. En su relación con el oxígeno son aerobios-anaerobios facultativos<sup>28</sup>.

Probablemente, es el más versátil de los microorganismos patógenos. Puede producir enfermedad por toxinas o superantígenos, invadir cualquier órgano o tejido y originar supuración, necrosis tisular, trombosis vascular y bacteriemia. Es el microorganismo con mayor capacidad de originar metástasis por vía hematógena. Puede crecer en el citoplasma celular, formar biopelículas y originar bacteriemia persistente o infección crónica o permanecer quiescente y reactivarse meses o años más tarde. Coloniza determinadas áreas de la piel y las mucosas, desde donde causa reinfecciones, contamina el entorno y se extiende a otros pacientes. A su vez, si la densidad de población bacteriana en el foco infeccioso es elevada, *S. aureus* puede hacerse resistente a la mayoría de antibióticos utilizados en monoterapia<sup>29</sup>.

#### **Información Taxonómica**

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Bacillales

**Familia:** Staphylococcaceae

**Género:** Staphylococcus

**Especie:** *S.aureus*

### ***Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, Catalasa-positiva, aerobio facultativo encontrado en el suelo. Miembro del Género *Bacillus*, *B. subtilis* tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiéndole al organismo tolerar condiciones ambientalmente. Las infecciones asociadas a esta bacteria se han presentado en pacientes inmunocomprometidos.

#### **Información Taxonómica**

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Bacillales

**Familia:** Bacillaceae

**Género:** *Bacillus*

**Especie:** *Bacillus subtilis*

### ***Enterococcus faecalis***

Son anaerobios facultativos, inmóvil, catalasa negativo o débilmente positiva, con capacidad para fermentar glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido láctico, pero sin gas. Además, presenta capacidad para formar biopelículas.

Se estima que las septicemias representan el 6 % de todas las enfermedades intrahospitalarias y que, en cuanto a su origen, pueden ser primarias o secundarias: las primeras tienen lugar vía la introducción accidental de la bacteria en la sangre, al implantarse prótesis o catéteres, o bien, al practicarse endoscopías, hemodiálisis o al administrarse nutrición parenteral. Por su parte, las bacteremias secundarias aparecen previa infección en alguna otra región

anat6mica, destacando las vfas urinarias, el tracto respiratorio o los tejidos cutfneo y subcutfneo, sobre todo despu6s de haberse sufrido de quemaduras o de traumatismos graves, tambi6n como resultado de intervenciones quir6rgicas. Estas septicemias suelen aparecer con mayor frecuencia en neonatos o pacientes de edad avanzada, ante la insuficiencia de los mecanismos de defensa en ambos grupos<sup>30</sup>.

### Informaci6n Taxon6mica

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Lactobacillales

**Familia:** Enterococcaceae

**G6nero:** Enterococcus

**Especie:** *E. faecalis*

#### ***Enterococcus faecium***

Es una bacteria Gram-positivo, bacteria gamma hemol6tica o no hemol6tica en el g6nero *Enterococcus*. Puede ser comensal (inocuo, organismo coexistente) en el intestino humano, pero podrfa ser pat6geno, causando enfermedades como meningitis neonatal.

*Enterococcus faecium* en la actualidad es un pat6geno emergente en los hospitales. Presenta resistencia a diferentes f6rmacos como penicilina, ampicilina, aminogluc6sidos o glucop6ptidos y tiene una gran capacidad de adquirirla<sup>31</sup>.

## Información Taxonómica

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Lactobacillales

**Familia:** Enterococcaceae

**Género:** Enterococcus

**Especie:** *E. faecium*

### ***Listeria monocytogenes***

Es un cocobacilo Gram positivo que constituye la causa importante de infección, en especial en mujeres embarazadas, recién nacidos e inmunosuprimidos. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Puede encontrarse en el suelo, los vegetales y haciendo parte de la flora fecal de muchos mamíferos. Asimismo, se ha aislado de vegetales crudos, leches, pescado, pavo y carne ya sea fresca o procesada, pollo o res.

Se encuentra implicada como causante de bacteremia y meningoencefalitis. También se han descrito casos de infecciones gastrointestinales en individuos inmunocompetentes que han consumido alimentos contaminados con un alto inóculo de la bacteria<sup>32</sup>.

## Información Taxonómica

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Bacillales

**Familia:** Lactobacilaceae

**Género:** Listeria

**Especie:** *L. monocytogenes*

### ***Klebsiella pneumoniae***

Bacilo Gram negativo importante no sólo por su frecuencia como causa de infecciones asociadas al cuidado de la salud y de la comunidad, sino por los mecanismos patogénicos que posee, como la capacidad de producir cápsula, la presencia de estructuras especializadas que le permiten adherirse a las células del hospedero (pilis), y de sideróforos que le permiten obtener el hierro necesario para su desarrollo<sup>33</sup>.

#### **Información Taxonómica**

- **Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Klebsiella*

**Especie:** *pneumoniae*

### ***Escherichia coli***

Son bacilos Gram negativos, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano, no utilización de citrato como fuente de carbono y no producción de acetoina. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Es una bacteria mesófila, su óptimo de desarrollo se encuentra en el entorno de la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (35-43 °C). La temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C<sup>34</sup>.

#### **Información Taxonómica**

- **Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Escherichia*

**Especie:** *coli*

### ***Acinetobacter baumannii***

Los *Acinetobacter* son bacilos aerobios Gram negativos que pertenecen a la familia Neisseriaceae. Son ubicuos, pueden sobrevivir en superficies secas durante un mes y suelen ser portados en la piel por los trabajadores de la salud, lo que eleva las probabilidades de que los pacientes sean colonizados y de que se contaminen los equipos médicos. Hay muchas especies de *Acinetobacter*, todas pueden causar enfermedades en el ser humano, pero el *A. baumannii* (AB) es responsable del 80% de las infecciones.

Es cocobacilo gramnegativo, no formador de esporas, aerobio estricto, inmóvil, catalasa positiva y oxidasa negativo. Su temperatura de crecimiento es de 20 °C a 30 °C, y es capaz de crecer en los medios de cultivo habituales, sin requerimientos especiales. Puede oxidar la glucosa y otras aldosas<sup>35</sup>.

### **Información Taxonómica**

- **Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Pseudomonadales

**Familia:** Moraxellaceae

**Género:** *Acinetobacter*

**Especie:** *baumanni*

## ***Staphylococcus epidermidis***

Coco Gram positivo aerobio, coagulasa negativo. Forma parte de la flora habitual de la piel. Se caracteriza por ser novobiocina sensible, fue considerado como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante y es considerado el agente causal de diferentes entidades clínicas, entre ellas: Infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteremia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardiacas protésicas e implantes de mama)<sup>36</sup>.

### **Información Taxonómica**

- **Dominio:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Cocci

**Orden:** Bacillales

**Familia:** Staphylococcaceae

**Género:** *Staphylococcus*

**Especie:** *epidermidis*

## **Hongos**

### ***Candida glabrata***

Levadura saprófita que hace parte de la microbiota comensal, este si produce proteinasas y presenta hidrofobicidad en su superficie celular facilitando su adherencia. Los blastoconidios miden de 1 a 4  $\mu\text{m}$ , y esta levadura solo asimila los azucares glucosa y trealosa<sup>37</sup>.

## Información Taxonómica

- **Reino:** Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Clase:** Saccharomycetes

**Orden:** Saccharomycetales

**Familia:** Saccharomycetaceae

**Género:** *Candida*

**Especie:** *glabrata*

### ***Candida albicans***

Es un hongo dimórfico, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza. Pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio. Este dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. Cuando es levadura se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped<sup>38</sup>.

## Información Taxonómica

- **Reino:** Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Clase:** Saccharomycetes

**Orden:** Saccharomycetales

**Familia:** Saccharomycetaceae

**Género:** *Candida*

**Especie:** *albicans*

### ***Candida parapsilosis***

Es diploide morfológicamente caracterizado por células redondeadas, ovales o alargadas y producción de pseudohifas. Éstas últimas se encuentran vinculadas de manera importante a un conjunto específico de aminoácidos, particularmente citrulina, la cual origina cambios importantes en la morfología celular y colonial del microorganismo. *C. parapsilosis* es incapaz de formar hifas verdaderas. Este se ha aislado frecuentemente de piel y uñas de las manos de enfermeras y otros profesionales del área de salud, de donde forma parte de la microbiota humana normal. También se ha aislado de dispositivos médicos tales como catéteres intravasculares, líneas de nutrición parenteral, entre otros dispositivos prostéticos. Recientemente se le ha considerado a *C. parapsilosis* como un importante patógeno emergente, asociado de manera creciente a un amplio espectro clínico de infecciones<sup>39</sup>.

### **Información Taxonómica**

- **Reino:** Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Clase:** Saccharomycetes

**Orden:** Saccharomycetales

**Familia:** Saccharomycetaceae

**Género:** *Candida*

**Especie:** *parapsilosis*

### ***Cándida krusei***

Es conocido como un patógeno fúngico para pacientes con neoplasias hematológicas y para receptores de trasplantes. Las células mayores son cilíndricas, y miden hasta 25 µm de largo. Las colonias separadas exceden con frecuencia los 5 mm de diámetro, crecimiento óptimo a 25 °C<sup>40</sup>.

#### **Información Taxonómica**

- **Reino:** Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Clase:** Saccharomycetes

**Orden:** Saccharomycetales

**Familia:** Saccharomycetaceae

**Género:** *Candida*

**Especie:** *krusei*

### ***Microsporium canis***

Hongo filamentoso que presenta macroconidios abundantes, fusiformes, grandes (de 35-110 x 12-25 µm), pluriseptados (de 6 a 12 células), paredes muy gruesas y rugosas (2 µm), con tabiques transversales que circunscriben amplias celdillas. Microconidios piriformes (1–2 µm) habitualmente escasos, en breves racimos o sésiles, que brotan lateralmente de la hifa. Además, hifas en raquetas, escasas espirales y clamidosporas<sup>41</sup>.

#### **Información Taxonómica**

- **Reino:** Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Clase:** Eurotiomycetes

**Orden:** Onygenales

**Familia:** Arthrodermataceae

**Género:** *Microsporum*

**Especie:** *cannis*

### ***Trichophyton mentagrophytes***

Colonias de color blanco-crema, algodonosas, sobreelevadas que se extienden rápidamente; también hay zonas lisas y granulares, mientras que el reverso presenta un pigmento claro, amarillo o amarillo-marrón. Las microconidias con forma de perla o lágrima y dan positiva la prueba de la ureasa; también pueden aparecer hifas en espiral y ausencia de macroconidias<sup>42</sup>.

### **Información Taxonómica**

- **Reino:** Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Clase:** Eurotiomycetes

**Orden:** Onygenales

**Familia:** Arthrodermataceae

**Género:** *Trichophyton*

**Especie:** *mentagrophytes*

### ***Microsporum gypseum***

Es un hongo geofílico patógeno para humanos y animales. Las formas de infección en humanos son: el suelo, los gatos, los perros y pequeños mamíferos. Esta especie es poco frecuente como causa de dermatofitosis en el hombre, descrita, sobre todo, en tiña corporis y, raramente, en tiña capitis. Macroconidios elipsoidales simétricos, de pared delgada con 4 a 6 células, extremo distal

redondeado extremo proximal (adyacente a la hifa) truncado, Colonia polvorienta color canela<sup>43</sup>.

### Información Taxonómica

- **Reino:** Fungi

**Filo:** Ascomycota

**Clase:** Eurotiomycetes

**Orden:** Onygenales

**Familia:** Arthrodermataceae

**Género:** *Microsporum*

**Especie:** *gypseum*

### Métodos para inhibición microbiana y fúngica

#### Método de Difusión radial en medio sólido

Fundamento: el método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH (Mueller Hinton) previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano<sup>44</sup>.

## **Concentración Mínima Inhibitoria**

Fundamentos: consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CIM<sup>44</sup>.

## **Cromatografía Líquida de alta densidad (HPLC)**

El fundamento de la cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Tiene una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica. La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra<sup>45</sup>.

## 5. DISEÑO METODOLOGICO

### Tipo de investigación

El estudio fue experimental cuantitativo descriptivo.

### Universo

Extractos de plantas acuáticas de cualquier cuerpo de agua de Colombia  
Microorganismos patógenos de importancia clínica

### Población

Extractos de plantas acuáticas de cualquier cuerpo de agua de Bogotá  
Bacterias y hongos patógenos de importancia clínica

### Muestra

Extractos vegetales de las plantas macrofitas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* obtenidas por Hurtado y Muñoz en 2018 en un cuerpo de agua de Bogotá.

14 bacterias, 4 levaduras y 3 hongos filamentosos del Banco de cepas de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

### Hipótesis

Los extractos de las plantas macrofitas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*, presentan actividad antimicrobiana frente a un panel de 14 bacterias, 4 levaduras y 3 hongos filamentosos patógenos de importancia clínica.

### Variables

La variable dependiente para este estudio fueron la actividad biológica de los extractos de las plantas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* frente a los microorganismos patógenos de importancia clínica utilizados.

La variable independiente fue el tipo de naturaleza y comportamiento de los microorganismos utilizados. Interferencia de los solventes utilizados en la obtención de los extractos

## **Indicadores**

Sensibilidad, resistencia y CMI de los extractos obtenidos frente a microorganismos patógenos de importancia clínica.

## **Fase 1: Recolección de material y obtención de extractos**

Los extractos fueron obtenidos por Hurtado y Muñoz en 2018 en un trabajo previo del grupo CEPARIUM, su procedencia es canales anexos del humedal tierra blanca el cual se encuentra localizado al nororiente del casco urbano del municipio de Soacha. Ver **Anexo 1**

## **Fase 2: Aislamiento de los microorganismos patógenos**

Se seleccionaron 21 microorganismos para realizar los ensayos de actividad antimicrobiana y antifúngica, así: 14 bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* (clínica), *Klebsiella pneumoniae* (s. salud) *E.coli* ATCC, *E.coli* nativa, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* sp, *Staphylococcus epidermidis*, 7 hongos *Cándida glabrata*, *Cándida Krusei*, *Cándida albicans*, *Cándida parapsilosis*, *Microsporium cannis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium gypseum*. A continuación, a estos microorganismos se les asignó un código para facilitar la organización, como se muestra en la Tabla 1:

**Tabla 1. Código de microorganismos**

<b>ITEM</b>	<b>MICROORGANISMO</b>
<b>MHB1</b>	<i>S. aureus</i>
<b>MHB2</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>MHB3</b>	<i>E. faecalis</i>
<b>MHB4</b>	<i>E. faecium</i>
<b>MHB5</b>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>MHB6</b>	<i>K. pneumoniae (clínica)</i>
<b>MHB7</b>	<i>E. coli ATCC</i>
<b>MHB8</b>	<i>E. coli nativa (l. urinaria)</i>
<b>MHB9</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>MHB10</b>	<i>Acinetobacter</i>
<b>MHB11</b>	<i>K. pneumoniae (s. salud)</i>
<b>MHB12</b>	<i>S. epidermidis</i>
<b>MHL1</b>	<i>C. glabrata</i>
<b>MHL2</b>	<i>C. krusei</i>
<b>MHL3</b>	<i>C. albicans</i>
<b>MHL4</b>	<i>C. parapsilosis</i>
<b>MHF1</b>	<i>M. canis</i>
<b>MHF2</b>	<i>T. mentagrophytes</i>
<b>MHF3</b>	<i>M. gypseum</i>

Las cepas micóticas se recuperaron en Agar PDA (agar papa dextrosa) los hongos filamentosos y en Agar Saboraud, las levaduras.

Las cepas bacterianas se recuperaron en caldo y agar BHI (infusión cerebro corazón).

Todas las cepas que se utilizaron en los ensayos fueron tomadas del Banco de Cepas de la Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca.

### **Fase 3: Medición de la actividad antimicrobiana**

#### **1. Difusión radial en agar**

Las pruebas de actividad antimicrobiana y antifúngica se realizaron para cada microorganismo por triplicado. La actividad se evaluó midiendo el halo de inhibición generado por cada sensidisco.

##### **1. 1 Actividad antibacteriana**

###### **Controles**

Control de resistencia recomendado por la NCLS: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1706), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1705)

Control negativo: sensidiscos impregnados con la misma cantidad del solvente utilizado para reconstituir los extractos (Acetato de etilo y Etanol).

Antibióticos: Gram negativas: Norfloxacin (NOR), Tobramicina (TOB), Cloramfenicol (C), Cefaclor (CEC), para las bacterias Gram positivas Ampicilina (AMP), Norfloxacin (NOR), Eritromicina (E), Penicilina (P) y BCDO

###### **Procedimiento**

1. Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetros de papel Whatman N° 1, los cuales se esterilizaron previamente. Se impregnaron con 30 µl de cada extracto en dos pasos primero 15 µl y luego de dejar secar se completó con los otros 15 µl para obtener la concentración deseada 30µg/µl, se diluyo con acetato de Etilo y Etanol.

2. Los sensidiscos se colocaron sobre cajas de Petri con 25 ml de agar Mueller Hinton las cuales fueron previamente inoculadas con un hisopo de algodón estéril, con una suspensión bacteriana a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ mL, escala Mc Farland 0.5.

3. Las cajas con los sensidiscos, se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

## **1. 2. Actividad antifúngica**

### **Controles**

Control negativo: sensidiscos impregnados con la misma cantidad del solvente utilizado para reconstituir los extractos (Acetato de etilo y Etanol).

Control Positivo: Farzul (fluconazol) y ketoconazol.

### **Procedimiento**

#### **Levaduras**

1. Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetros de papel Whatman N° 1, los cuales se esterilizaron previamente. Se impregnaron con 30 µl de cada extracto en dos pasos primero 15 µl y luego de dejar secar se completó con los otros 15 µl para obtener la concentración deseada 30µg/µl, se diluyo con acetato de Etilo y Etanol.

2. Los sensidiscos se colocaron sobre cajas de Petri con 25 ml de agar Mueller Hinton las cuales fueron previamente inoculadas con un hisopo de algodón estéril, con una suspensión bacteriana a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ mL, escala Mc Farland 0.5.

3. Las cajas con los sensidiscos, se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

#### **Hongos Filamentosos**

Se realizó la suspensión del inóculo en una solución estandarizada que contenía aproximadamente  $1 \times 10^6$  conidios/ml de cada cepa.

## **2. Concentración mínima inhibitoria CMI**

### **2.1. Actividad antibacteriana**

En microplacas de Elisa de 96 pozos previamente llevadas a UV, se agregó caldo Mueller Hinton, concentración de los extractos e inóculo de cada microorganismo. La lectura de las microplacas se realizó por mínima concentración en la cual se observa crecimiento y comparando con los controles positivo y negativo, se valida la prueba.

#### **Control**

Control negativo caldo Mueller Hinton,

#### **Procedimiento**

1. Primera columna, se agregó el control negativo 100 ul del caldo Mueller Hinton,
2. Segunda columna el control positivo que fue 100 ul de caldo y 100 ul del inóculo obtenido de una suspensión bacteriana de 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml).
3. Los extractos a una concentración de 40 mg/ml y 100  $\mu$ l de caldo Mueller Hinton, y se realizaron diluciones 1:2 hasta la columna 11 de cada extracto.
4. Las microplacas se incubaron durante 24 horas a 37 °C

### **2.2. Actividad antifúngica**

En microplacas de Elisa de 96 pozos previamente llevadas a UV, se agregó caldo Mueller Hinton, concentración de los extractos e inóculo de cada microorganismo. Las lecturas se realizaron por mínima concentración en la cual se observa crecimiento y comparando con los controles positivo y negativo, se valida la prueba.

#### **Control**

Control negativo caldo Mueller Hinton,

## **Procedimiento**

### **Levaduras**

1. Primera columna, se agregó el control negativo 100 ul del caldo Mueller Hinton,
2. Segunda columna el control positivo que fue 100 ul de caldo y 100 ul del inóculo obtenido de una suspensión bacteriana de 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/ml).
3. Los extractos a una concentración de 40 mg/ml y 100 ul de caldo Mueller Hinton, y se realizaron diluciones 1:2 hasta la columna 11 de cada extracto.
4. Las microplacas se incubaron durante 7 siete días a temperatura ambiente.

### **Hongos Filamentosos**

Se obtuvo el inóculo de una solución estandarizada que contenía aproximadamente  $1 \times 10^6$  conidios/ml de cada cepa.

### **Fase 4. Identificación de los metabolitos obtenidos de extractos por cromatografía líquida de alta densidad HPLC**

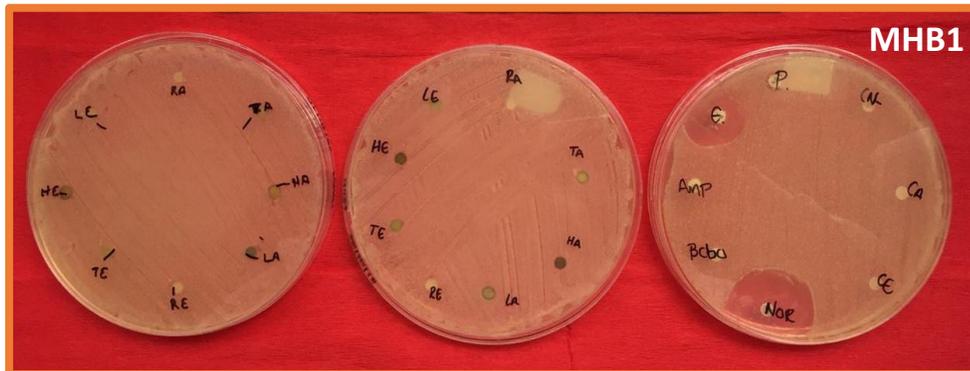
Una vez confirmada la actividad antimicrobiana se realizó una confirmación espectrofotométrica para observar los compuestos responsables de esta actividad y correlacionarlos con algunas investigaciones previas nacionales e internacionales.

Se utilizó el equipo HPLC (Cromatografía Líquida de alta eficiencia) de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca el cual fue calibrado y ajustado por el docente Edisson Tello Camacho de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana y por una estudiante de Doctorado de la misma Universidad.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. DIFUSION RADIAL EN AGAR (Bacterias)

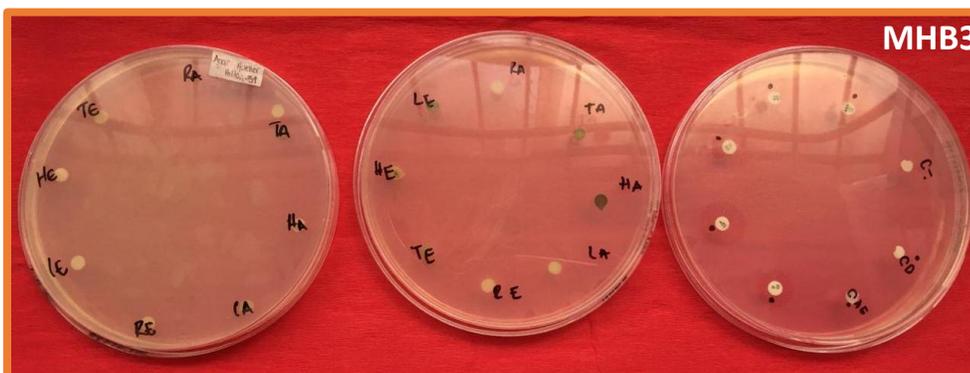
A continuación, se presentan las gráficas de los resultados obtenidos por las bacterias.



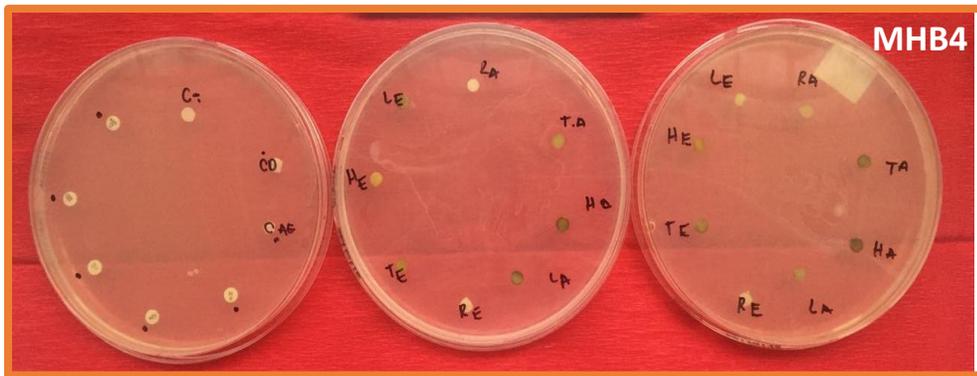
**Figura 2.** Difusión radial en agar de *Staphylococcus aureus*. Roa J. 2018



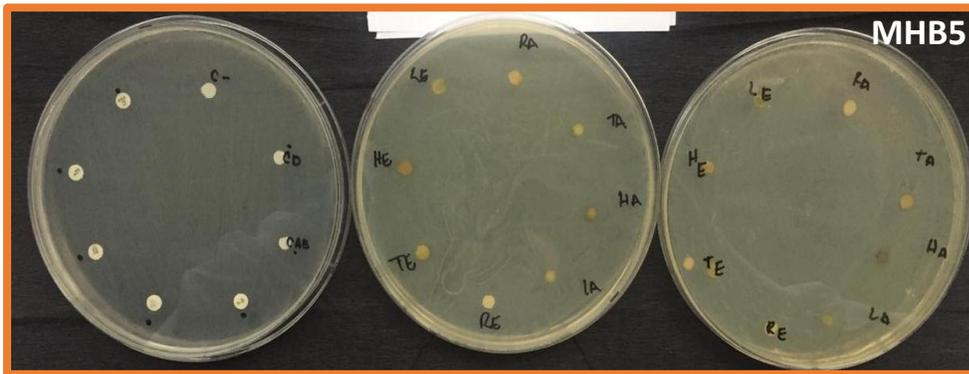
**Figura 3.** Difusión radial en agar de *Bacillus subtilis*. Roa J. 2018



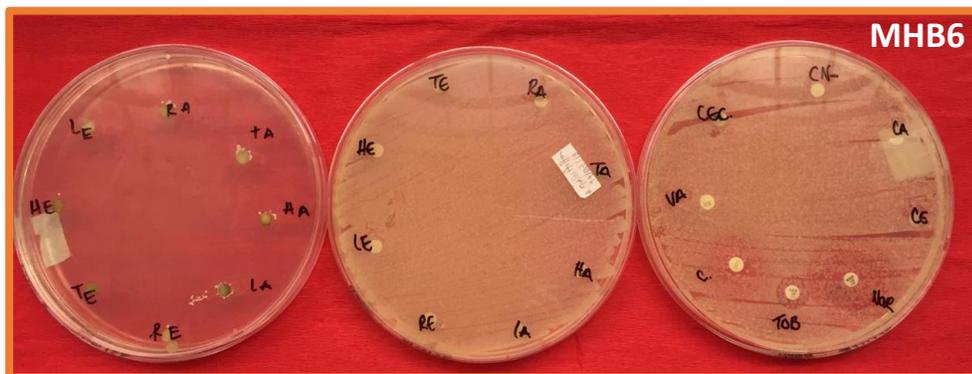
**Figura 4.** Difusión radial en agar de *Enterococcus faecalis*. Roa J. 2018



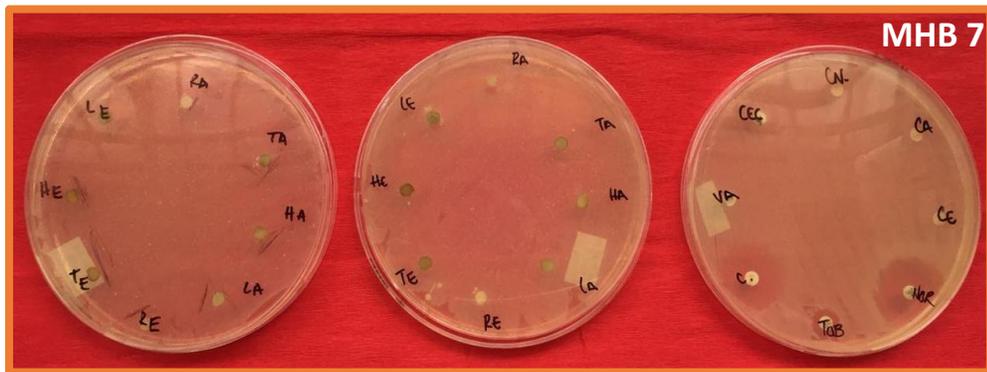
**Figura 5.** Difusión radial en agar de *Enterococcus faecium*. Roa J. 2018.



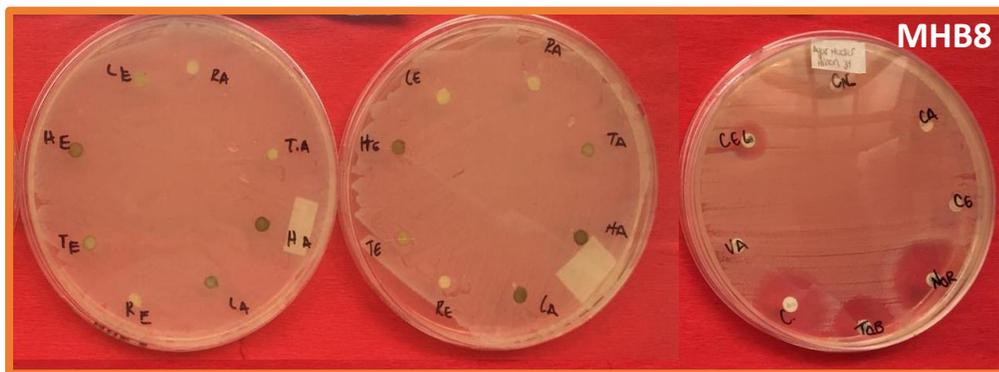
**Figura 6.** Difusión radial en agar de *Listeria monocytogenes*. Roa J. 2018



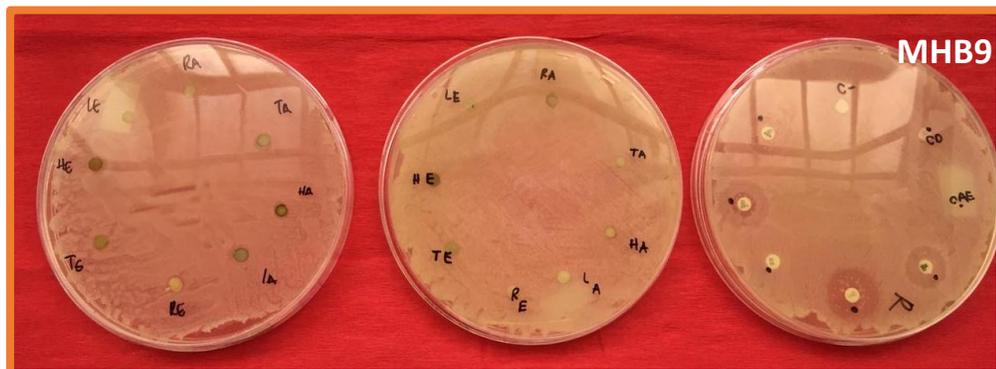
**Figura 7.** Difusión radial en agar de *Klebsiella pneumoniae* (clínica). Roa J. 2018



**Figura 8.** Difusión radial en agar de *E.coli* ATCC. Roa J. 2018



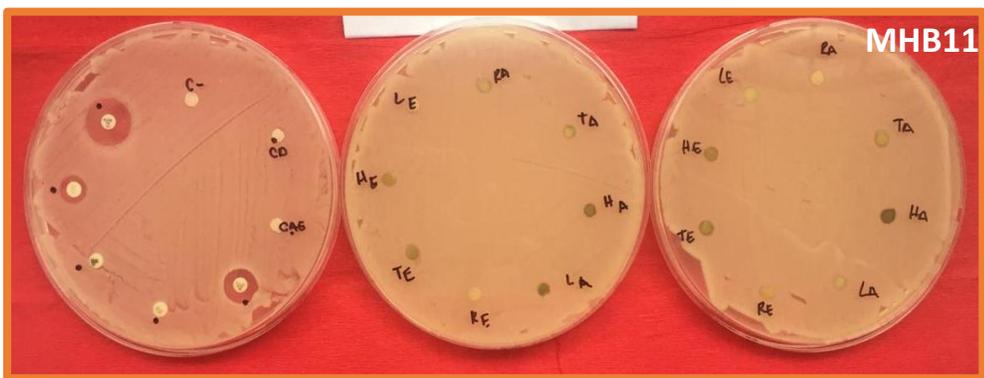
**Figura 9.** Difusión radial en agar de *E.coli* nativa. Roa J. 2018



**Figura 10.** Difusión radial en agar de *Acinetobacter baumannii*. Roa J. 2018



**Figura 11.** Difusión radial en agar de *Acinetobacter* sp. Roa J. 2018



**Figura 12.** Difusión radial en agar de *Klebsiella pneumoniae* (s. salud).  
Roa J. 2018

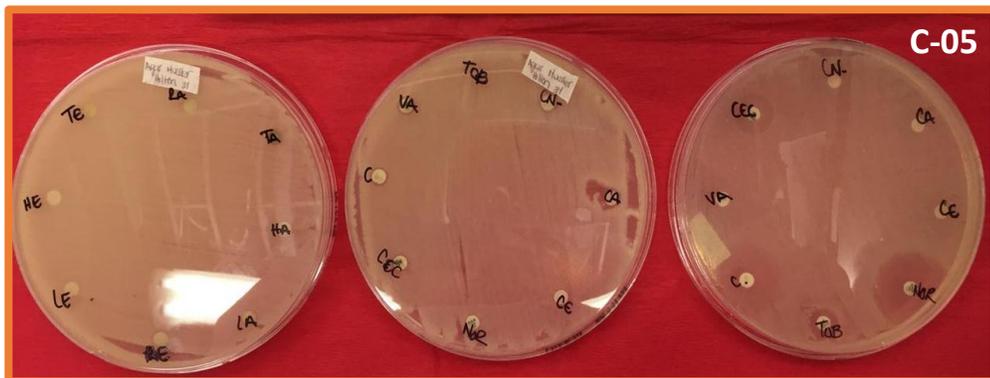


**Figura 13.** Difusión radial en agar de *Staphylococcus epidermidis*. Roa J. 2018

## CONTROLES



**Figura 14.** Difusión radial en agar de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1706). Roa J. 2018

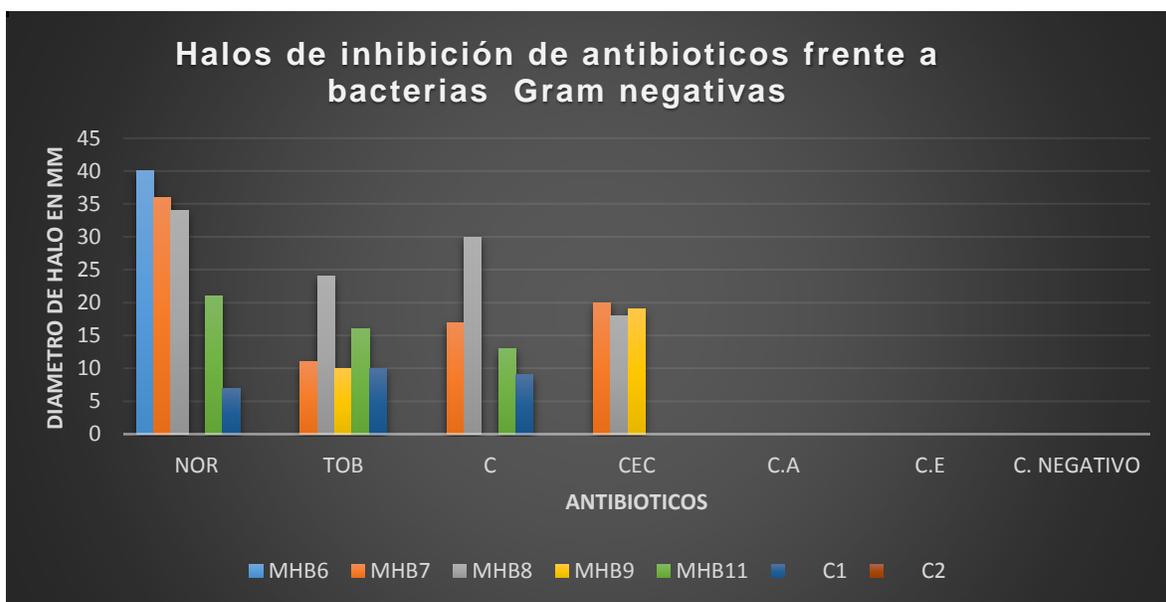


**Figura 15.** Difusión radial en agar de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1705). Roa J. 2018

A continuación, se presentan las tablas y graficas de los resultados obtenidos en los halos de inhibición que se promediaron de las 2 repeticiones y el control, estos los dividimos en bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y el efecto de los antibióticos utilizados.

**Tabla 2.** Actividad inhibitoria de los antibióticos frente a panel de bacterias Gram negativas

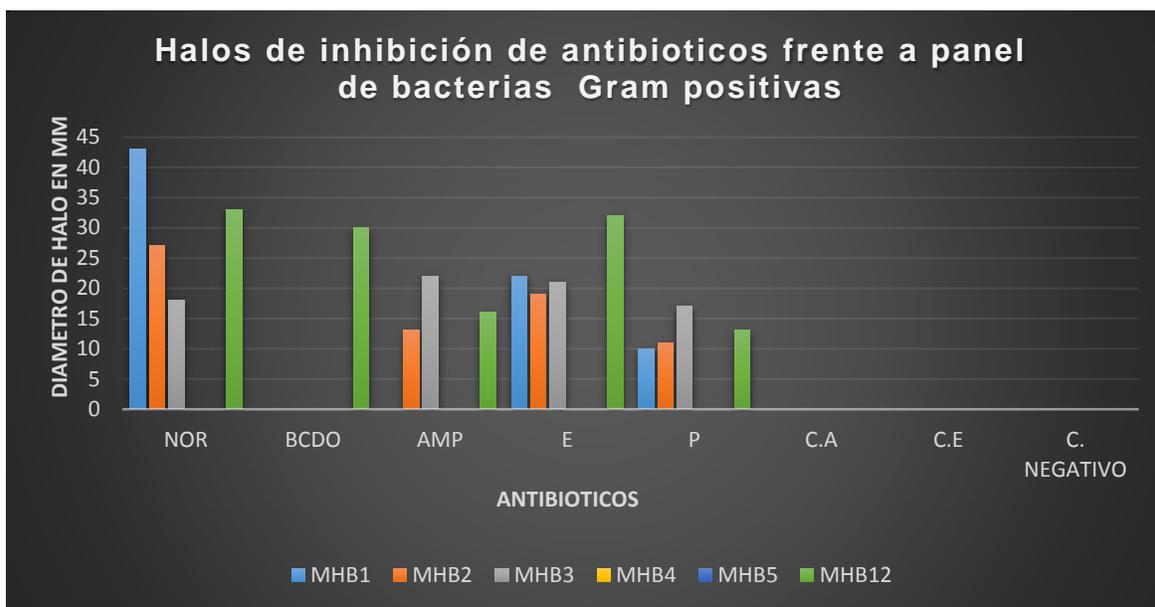
ITEM	NOR	TOB	C	CEC	C.A	C.E	C. NEGATIVO
MHB6	40mm	0	0	0	0	0	0
MHB7	36mm	11mm	17mm	20mm	0	0	0
MHB8	34mm	24mm	30mm	18mm	0	0	0
MHB9	20mm	10mm	24mm	19mm	0	0	0
MHB10	23mm	26mm	30mm	20mm	0	0	0
MHB11	21mm	16mm	13mm	0	0	0	0
C1	7mm	10mm	9mm	0	0	0	0
C2	0	0	0	0	0	0	0



**Figura 16.** Grafica Halos de inhibición de antibióticos frente a panel de bacterias Gram negativas

**Tabla 3.** Actividad inhibitoria de los antibióticos frente a panel de bacterias Gram positivas.

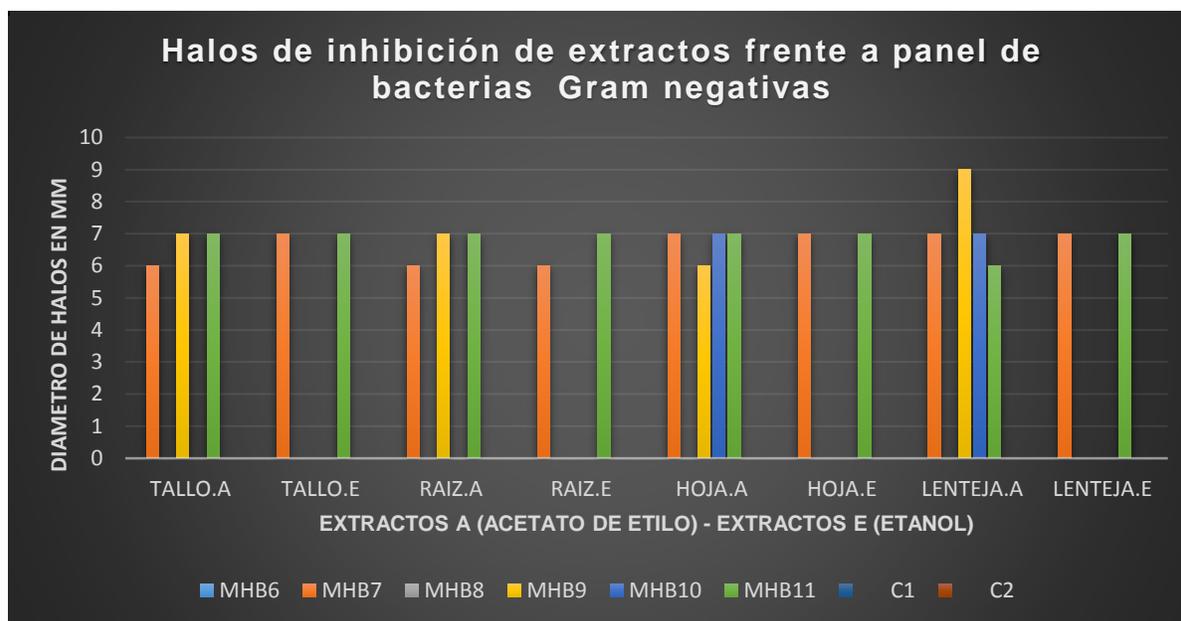
ITEM	NOR	BCDO	AMP	E	P	C. A	C.E	C. NEGATIVO
MHB1	43mm	0	0	22mm	10mm	0	0	0
MHB2	27 mm	0	13mm	19mm	11mm	0	0	0
MHB3	18mm	0	22mm	21mm	17mm	0	0	0
MHB4	0	0	0	0	0	0	0	0
MHB5	0	0	0	0	0	0	0	0
MHB12	33mm	30mm	16mm	32mm	13mm	0	0	0



**Figura 17.** Grafica halos de inhibición de antibióticos frente a panel de bacterias Gram positivas

**Tabla 4.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a panel de bacterias Gram negativas.

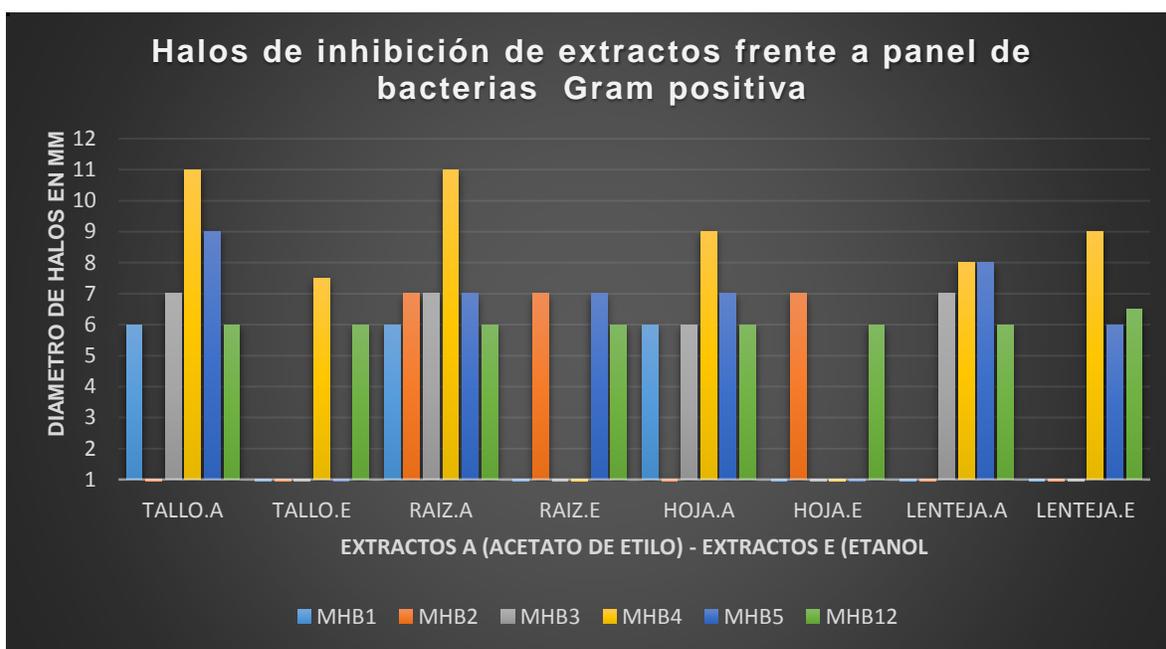
ITEM	TALLO. A	TALLO. E	RAIZ. A	RAIZ. E	HOJA. A	HOJA. E	LENTEJA. A	LENTEJA. E
MHB6	0	0	0	0	0	0	0	0
MHB7	6mm	7mm	6mm	6mm	7mm	7mm	7mm	7mm
MHB8	0	0	0	0	0	0	0	0
MHB9	7mm	0	7mm	0	6mm	0	9mm	0
MHB10	0	0	0	0	7mm	0	7mm	0
MHB11	7mm	7mm	7mm	7mm	7mm	7mm	6mm	7mm
C1	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	0	0	0	0	0	0	0	0



**Figura 18.** Grafica halos de inhibición de extractos frente a panel de bacterias Gram negativas

**Tabla 5.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a panel bacterias Gram positivas.

ITEM	TALLO. A	TALLO. E	RAIZ. A	RAIZ. E	HOJA. A	HOJA. E	LENTEJA. A	LENTEJA.E
MHB1	6mm	0	6mm	0	6mm	0	0	0
MHB2	0	0	7mm	7mm	0	7mm	0	0
MHB3	7mm	0	7mm	0	6mm	0	7mm	0
MHB4	11mm	7.5mm	11mm	0	9mm	0	8mm	9mm
MHB5	9mm	0	7mm	7mm	7mm	0	8mm	6mm
MHB12	6mm	6mm	6mm	6mm	6mm	6mm	6mm	6.5mm



**Figura 19.** Grafica halos de inhibición de extractos frente a panel de bacterias Gram positivas

## 6.2. DIFUSION RADIAL EN AGAR (Hongos)

Se evaluó la actividad antifúngica midiendo los halos de inhibición formados por los sensidiscos impregnados con los extractos en Acetato de Etilo, Etanol y los antifúngicos.

A continuación, se presentan las gráficas de los resultados obtenidos por los hongos.



**Figura 20.** Difusión radial en agar de *Cándida glabrata*. Roa J. 2018



**Figura 21.** Difusión radial en agar de *Cándida Krusei*. Roa J. 2018



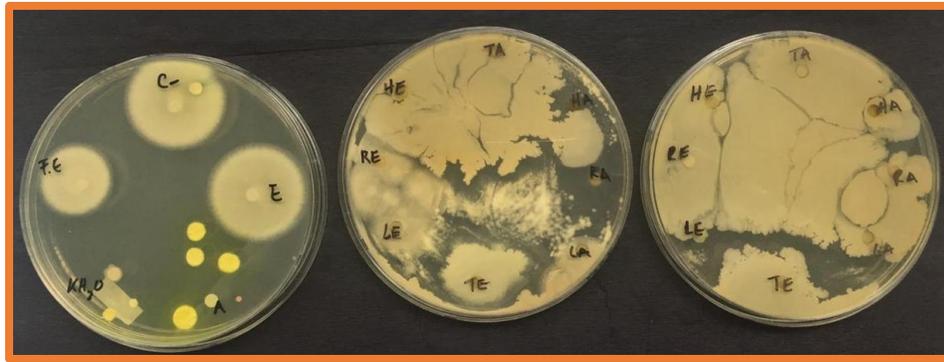
**Figura 22.** Difusión radial en agar de *Cándida albicans*. Roa J. 2018



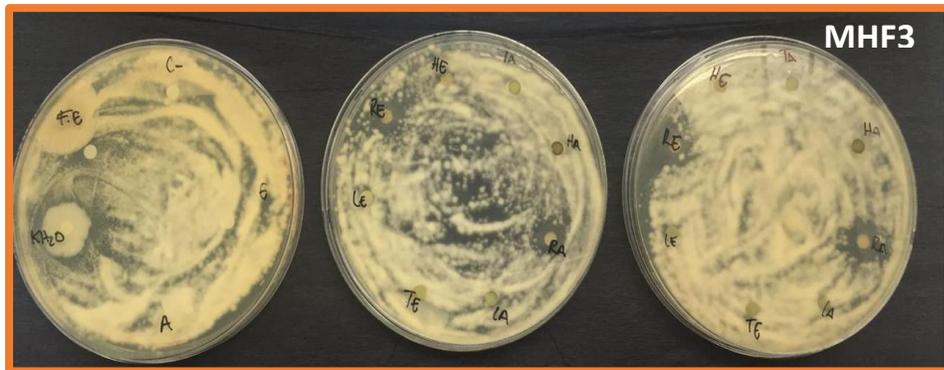
**Figura 23.** Difusión radial en agar de *Cándida parapsilosis*. Roa J. 2018



**Figura 24.** Difusión radial en agar de *Microsporium cannis*. Roa J. 2018



**Figura 25.** Difusión radial en agar de *Trichophyton mentagrophytes*. Roa J. 2018

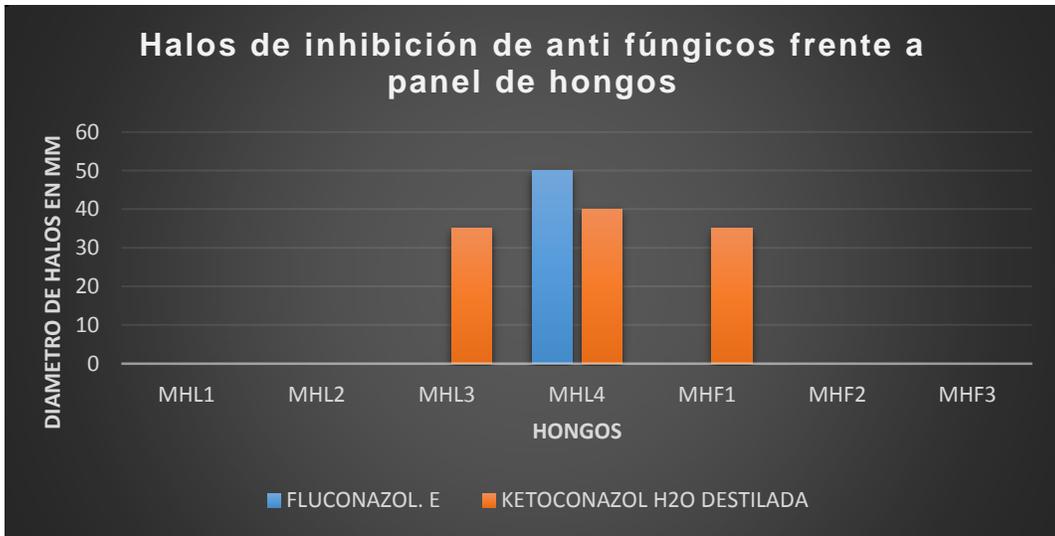


**Figura 26.** Difusión radial en agar de *Microsporum gypseum*. Roa J. 2018

A continuación, se presentan las tablas y graficas de los resultados obtenidos en los halos de inhibición que se promediaron de las 2 repeticiones y el control., estos los dividimos en levaduras, hongos filamentosos y antifungicos.

**Tabla 6.** Actividad inhibitoria de los antifúngicos frente a panel de hongos.

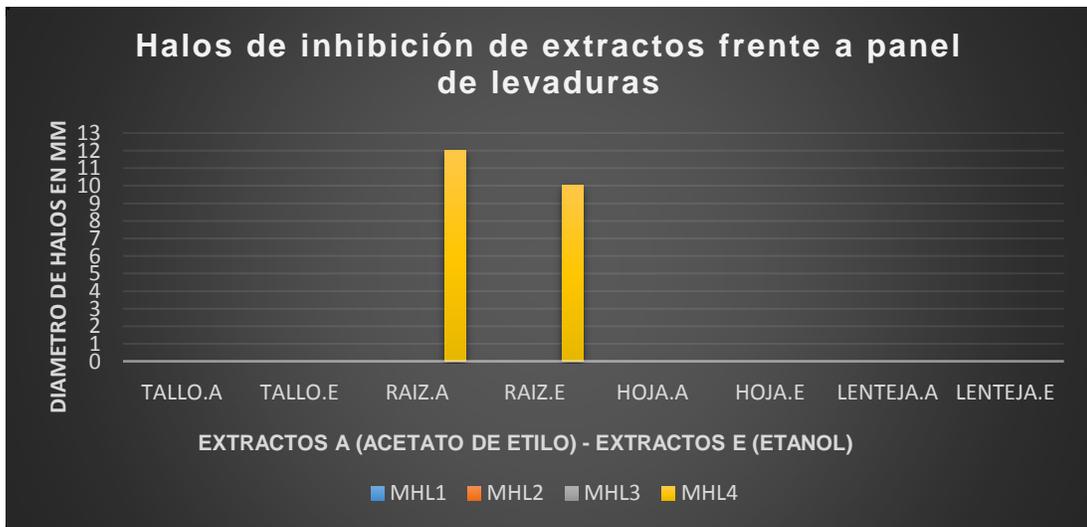
ITEM	FLUCONAZOL. E	KETOCONAZOL H2O DESTILADA
MHL1	0	0
MHL2	0	0
MHL3	0	35mm
MHL4	50mm	40mm
MHF1	0	35mm
MHF2	0	0
MHF3	0	0



**Figura 27.** Grafica halos de inhibición de antifúngicos frente a panel de hongos

**Tabla 7.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a panel de levaduras.

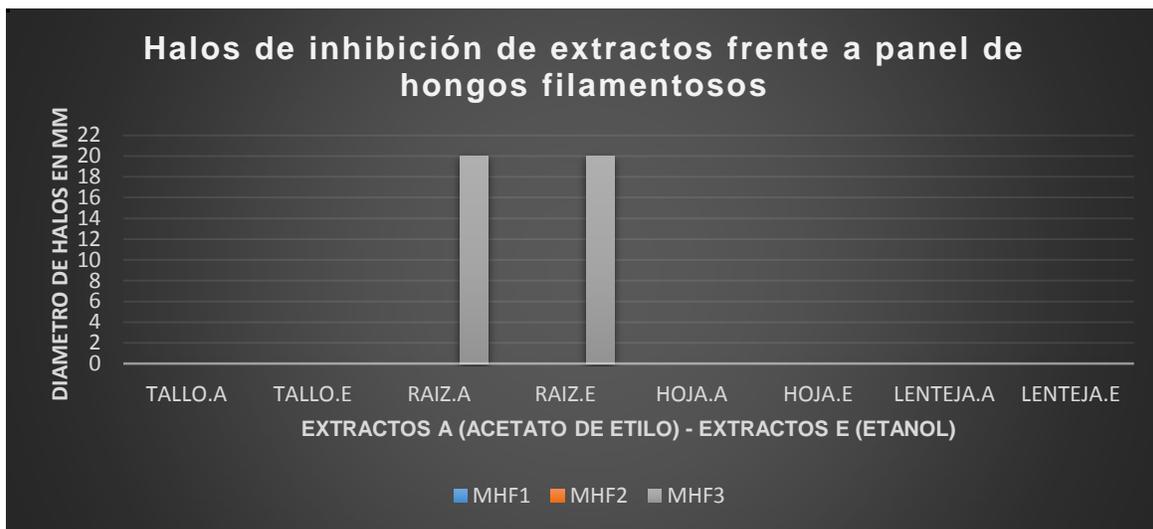
ITEMS	TALLO. A	TALLO. E	RAIZ. A	RAIZ. E	HOJA. A	HOJA. E	LENTEJA. A	LENTEJA. E
MHL1	0	0	0	0	0	0	0	0
MHL2	0	0	0	0	0	0	0	0
MHL3	0	0	0	0	0	0	0	0
MHL4	0	0	12mm	10mm	0	0	0	0



**Figura 28.** Grafica halos de inhibición de extractos frente a panel de levadura.

**Tabla 8.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a panel de hongos filamentosos.

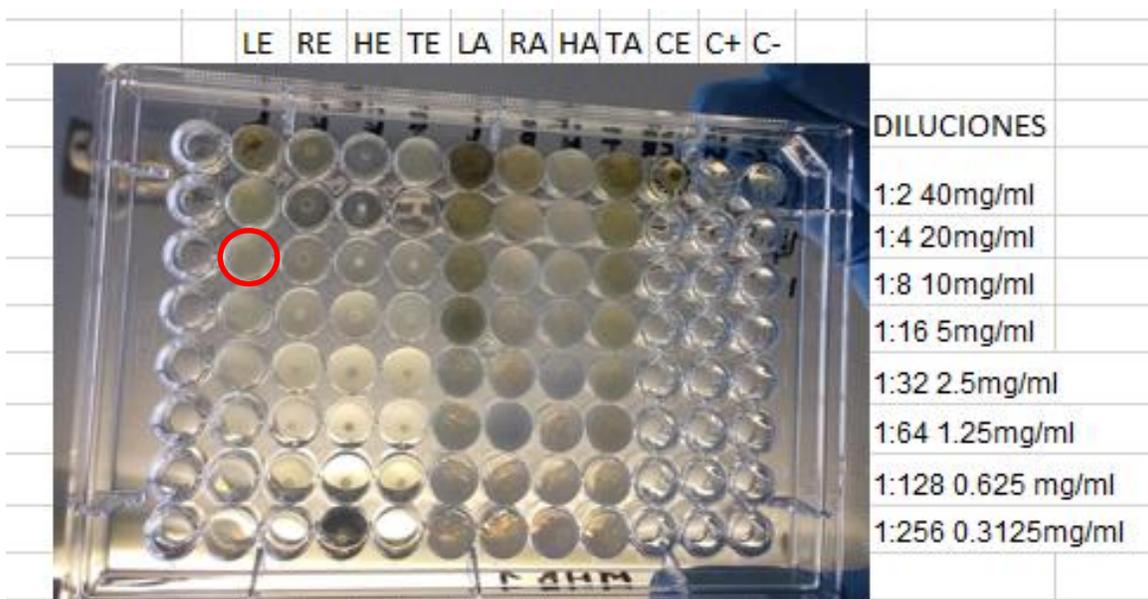
ITEM	TALLO. A	TALLO. E	RAIZ. A	RAIZ. E	HOJA. A	HOJA. E	LENTEJA. A	LENTEJA. E
MHF1	0	0	0	0	0	0	0	0
MHF2	0	0	0	0	0	0	0	0
MHF3	0	0	20mm	20mm	0	0	0	0



**Figura 29.** Grafica halos de inhibición de extractos frente a panel de hongos filamentosos

### 6.3. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (Bacterias)

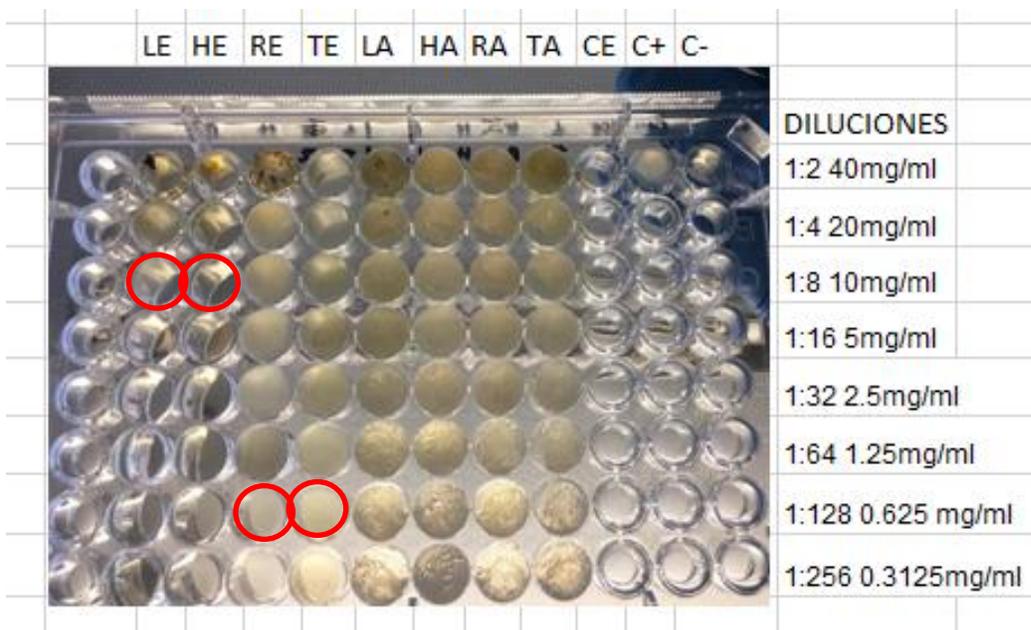
En las siguientes graficas podemos observar los ensayos realizados en microplaca con las bacterias patógenas, mostrando el orden de las diluciones, los extractos y sus debidos solventes, (C-: control negativo, C+: control positivo, EL: Etanol *Lemna Gibba*, ER: Etanol Raíz de *Eichhornia crassipes*, ET: Etanol tallo de *Eichhornia crassipes*, EH: Etanol Hoja de *Eichhornia crassipes*, AL: Acetato de etilo *Lemna Gibba*, AR: Acetato de etilo Raíz de *Eichhornia crassipes*, AT: Acetato de Etilo tallo de *Eichhornia crassipes*, AH: Acetato de etilo Hoja de *Eichhornia crassipes*)



**Figura 30.** Microdilución en placa de *Staphylococcus aureus* MHB1 Roa J. 2018  
 La actividad microbiana del extracto de LE (*lemna gibba* en etanol) frente a la cepa *S. aureus* se ve reflejada en la dilución 1:8 que corresponde a la concentración 10.mg/ml, siendo esta la concentración mínima inhibitoria de este extracto.

**Tabla 9.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB1 por el método CMI

MHB1	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml								
Dil 1:8 10mg/ml								X
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml								
Dil 1:64 1.25mg/ml								
Dil 1:128 0.625 mg/ml								
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

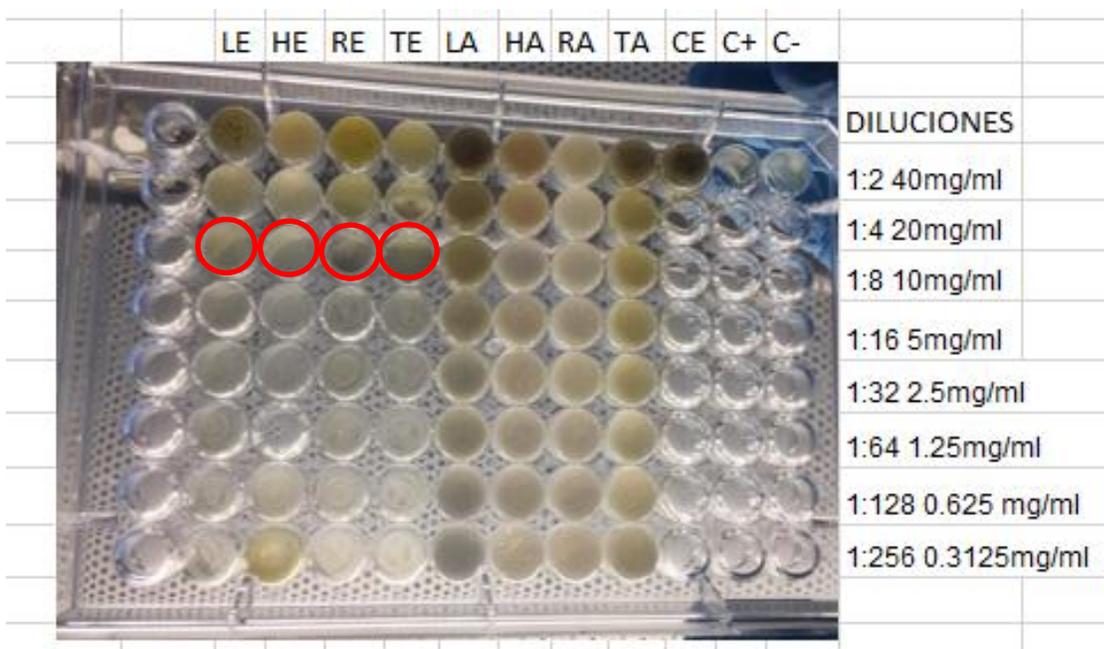


**Figura 31.** Microdilución en placa de *Bacillus subtilis* MHB2 Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) y HE (hoja *Eichornnia crassipes etanol*) frente a *Bacillus subtilis* se ve reflejada en la dilución 1:8 que corresponde a la concentración 10mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria de estos extracto, en la RE (raiz *Eichornnia crassipes etanol*) y TE ( tallo *Eichornnia crassipes etanol*) La actividad se presenta en la dilución 1:128 que corresponde a la concentración 0.625mg/ml.

**Tabla 10.**Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB2 por el método CMI

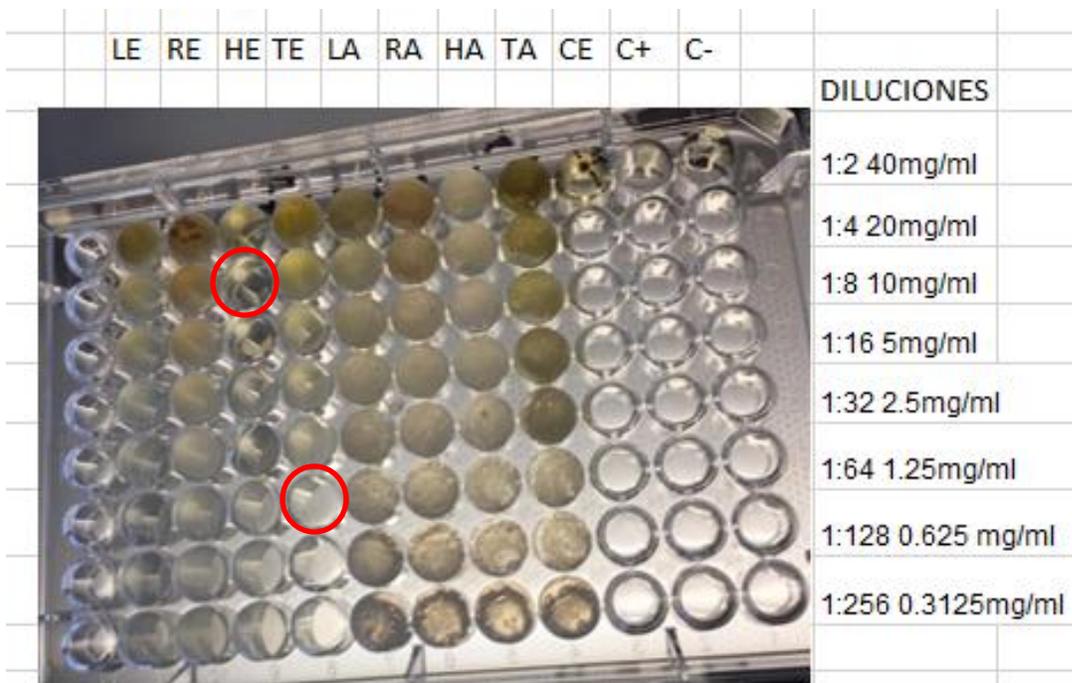
MHB2	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml								
Dil 1:8 10mg/ml						X		X
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml								
Dil 1:64 1.25mg/ml								
Dil 1:128 0.625 mg/ml					X		X	
Dil 1:256 0.3125mg/ml								



**Figura 32.** Microdilución en placa de *Enterococcus faecalis* MHB3 Roa J. 2018  
 La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*), HE (hoja *Eichornnia crassipes etanol*), RE (raiz *Eichornnia crassipes etanol*) y TE (tallo *Eichornnia crassipes etanol*) frente a *Enterococcus faecalis* se ve reflejada en la dilución 1:8 que corresponde a la concentración 10mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria de estos extracto.

**Tabla 11.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB3 por el método CMI

MHB3	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml								
Dil 1:8 10mg/ml					X	X	X	X
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml								
Dil 1:64 1.25mg/ml								
Dil 1:128 0.625 mg/ml								
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

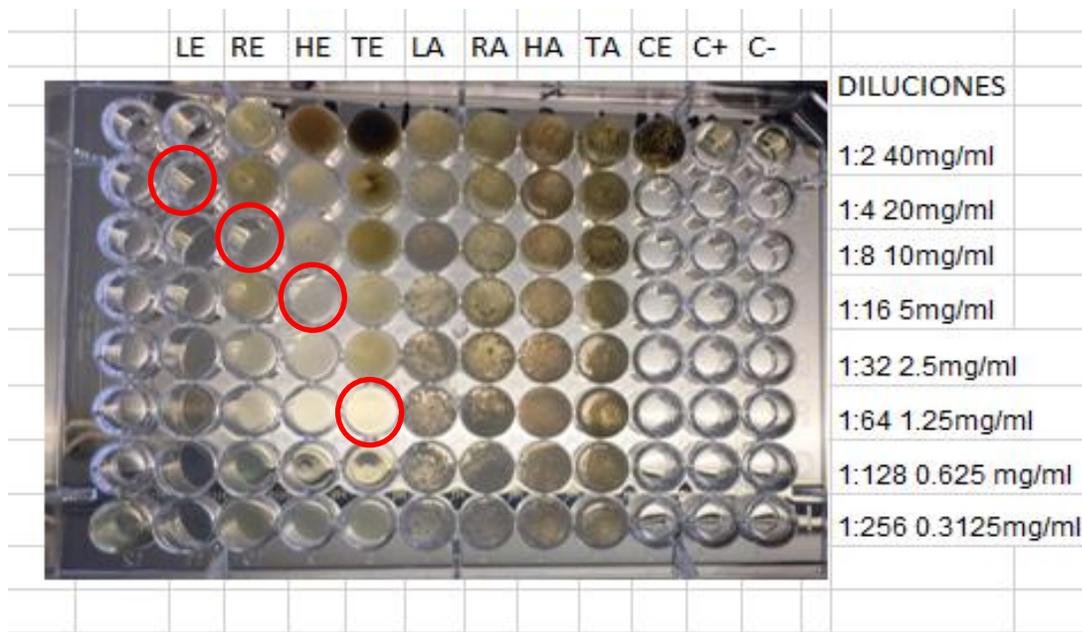


**Figura 33.** Microdilución en placa de *Enterococcus faecium* MHB4 Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto HE (hoja *Eichornnia crassipes* etanol) frente a *Enterococcus faecium* se ve reflejada en la dilución 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml y TE ( tallo *Eichornnia crassipes* etanol), se ve reflejada en la dilución 1:64 que corresponde a la concentración 1.25mg/ml siendo esta la concentración mínima inhibitoria de estos extractos.

**Tabla 12.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB4 por el método CMI

MHB4	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml						X		
Dil 1:8 10mg/ml								
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml								
Dil 1:64 1.25mg/ml					X			
Dil 1:128 0.625 mg/ml								
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

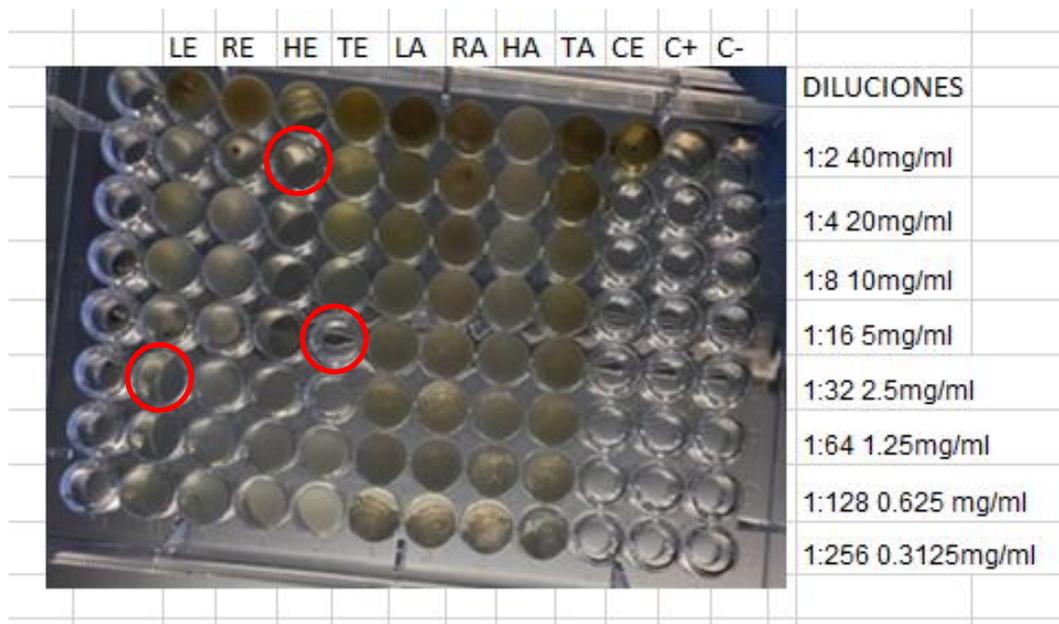


**Figura 34.** Microdilución en placa de *Listeria monocytogenes* MHB5 Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente a *Listeria monocytogenes* se ve reflejada en la dilución 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml, en la RE (raíz *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilución 1:8 que corresponde a la concentración 10mg/ml, HE (hoja *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilución 1:16 que corresponde a la concentración 5mg/ml y el TE (tallos *Eichornnia crassipes etanol*) se presenta en la dilución 1:64 que corresponde a la concentración 1.25mg/ml. siendo estas las concentraciones mínimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 13.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB5 por el método CMI

MHB5	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml								X
Dil 1:8 10mg/ml							X	
Dil 1:16 5mg/ml						X		
Dil 1:32 2.5mg/ml								
Dil 1:64 1.25mg/ml					X			
Dil 1:128 0.625 mg/ml								
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

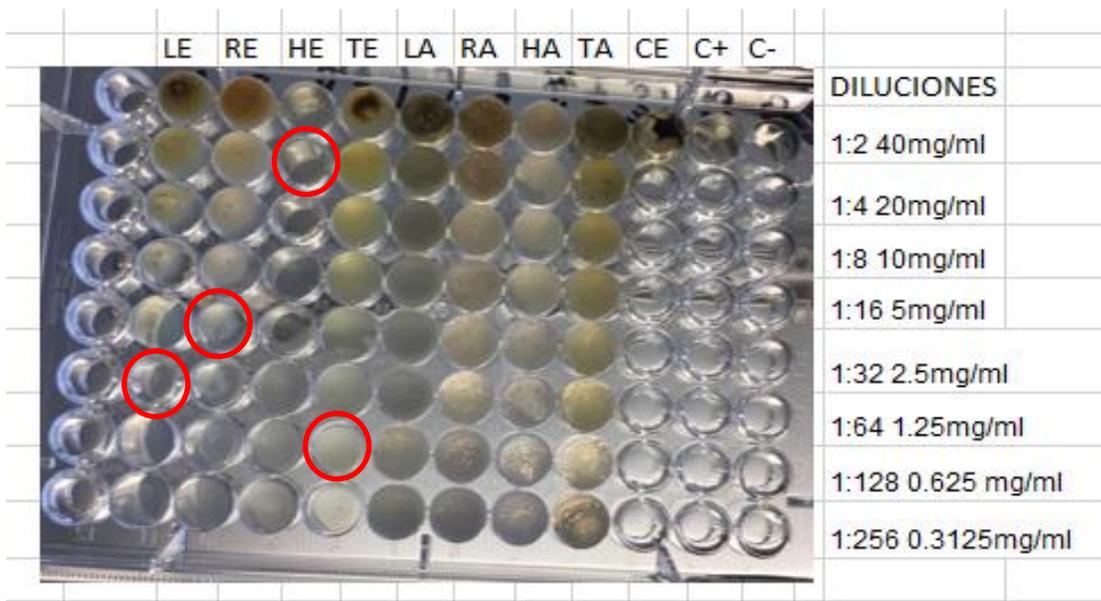


**Figura 35.**Microdilución en placa de *Klebsiella pneumoniae* (clínica) MHB6 Roa J. 2018.

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente *Klebsiella pneumoniae* (clínica) se ve reflejada en la dilucion 1:64 que corresponde a la concentracion 1.25 mg/ml en HE (hoja *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilucion 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml, y en TE ( tallo *Eichornnia crassipes etanol*) se presenta en la dilucion 1:32 que corresponde a la concentracion 2.5mg/ml. siendo estas las concentraciones minimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 14.**Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB6 por el método CMI

MHB6	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml						X		
Dil 1:8 10mg/ml								
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml					X			
Dil 1:64 1.25mg/ml								X
Dil 1:128 0.625 mg/ml								
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

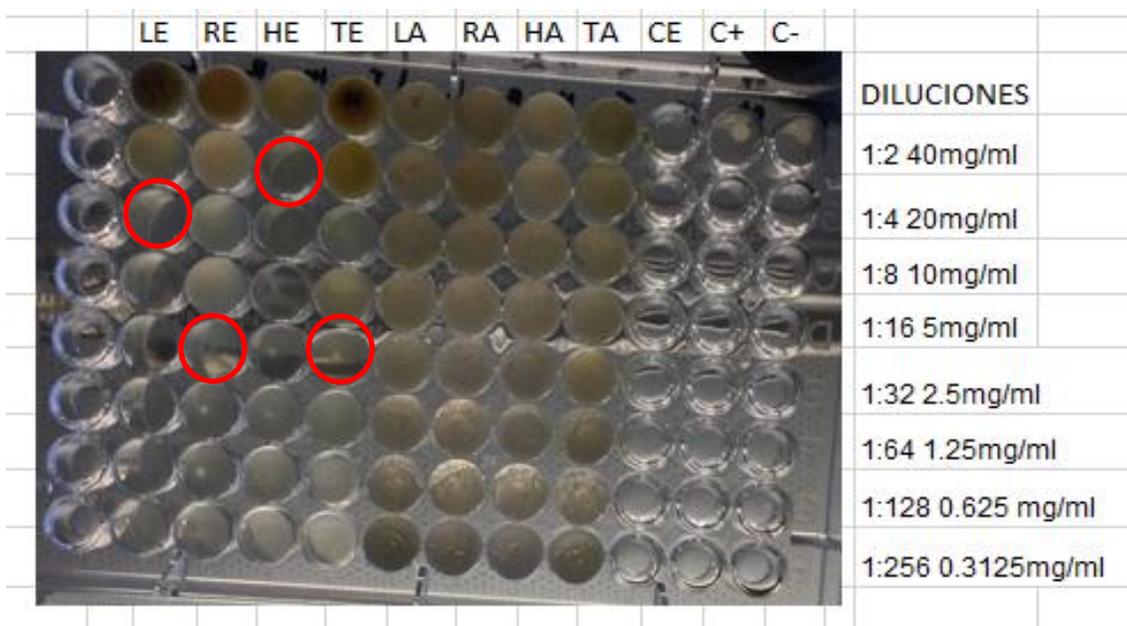


**Figura 36.** Microdilución en placa de *E.coli* ATCC MHB7 Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente a *E.coli* ATCC se ve reflejada en la dilucion 1:64 que corresponde a la concentracion 1.25mg/ml en RE (raiz *Eichornnia crassipes etanol*), 1:32 que corresponde a la concentracion 2.5mg/ml, HE ( hoja *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilucion 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml y el TE ( tallo *Eichornnia crassipes etanol*) se presenta en la dilucion 1:128 que corresponde a la concentracion 0.625mg/ml. siendo estas las concentraciones minimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 15.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB7 por el método CMI

MHB7	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml						X		
Dil 1:8 10mg/ml								
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml							X	
Dil 1:64 1.25mg/ml								X
Dil 1:128 0.625 mg/ml					X			
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

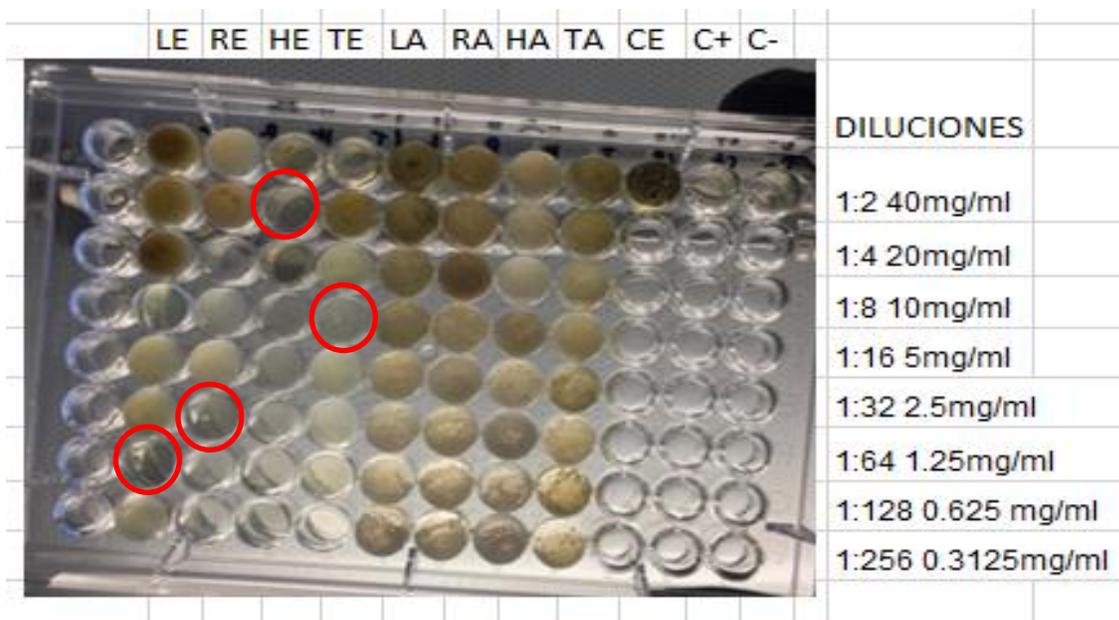


**Figura 37.** Microdilución en placa de *E.coli* nativa MHB8 Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente a *E.coli* nativa se ve reflejada en la dilución 1:8 que corresponde a la concentración 10mg/ml, en RE (raiz *Eichornnia crassipes etanol*), 1:32 que corresponde a la concentración 2.5mg/ml, HE ( hoja *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilución 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml y el TE ( tallo *Eichornnia crassipes etanol*) se presenta en la dilución 1:32 que corresponde a la concentración 2.5mg/ml. siendo estas las concentraciones mínimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 16.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB8 por el método CMI

MHB8	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml						X		
Dil 1:8 10mg/ml								X
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml					X		X	
Dil 1:64 1.25mg/ml								
Dil 1:128 0.625 mg/ml								
Dil 1:256 0.3125mg/ml								



**Figura 38.** Microdilución en placa de *Acinetobacter baumannii* MHB9 Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente a *Acinetobacter baumannii* se ve reflejada en la dilución 1:128 que corresponde a la concentración 0.625mg/ml, en RE (raíz *Eichornnia crassipes etanol*), 1:64 que corresponde a la concentración 1.25mg/ml, HE (hoja *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilución 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml y el TE (tallo *Eichornnia crassipes etanol*) se presenta en la dilución 1:16 que corresponde a la concentración 5mg/ml. siendo estas las concentraciones mínimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 17.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB9 por el método CMI

MHB9	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml						X		
Dil 1:8 10mg/ml								
Dil 1:16 5mg/ml					X			
Dil 1:32 2.5mg/ml								
Dil 1:64 1.25mg/ml							X	
Dil 1:128 0.625 mg/ml								X
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

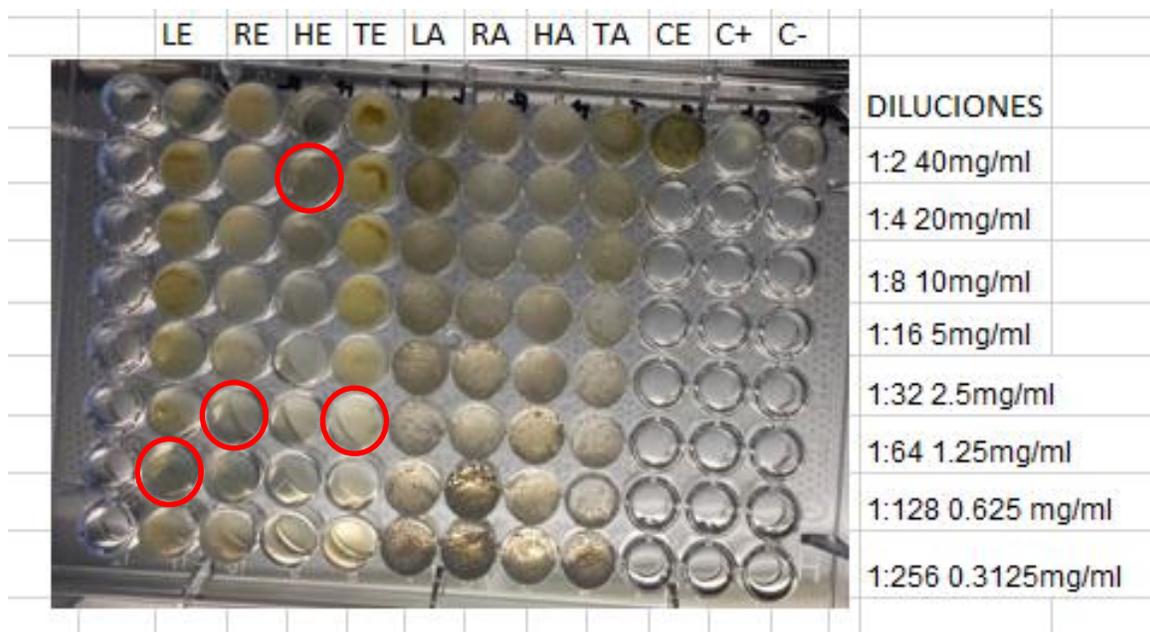


**Figura 39.** Microdilución en placa de *Acinetobacter sp.* MHB10 Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente a *Acinetobacter* se ve reflejada en la dilución 1:8 que corresponde a la concentración 10mg/ml, en RE (raíz *Eichornnia crassipes etanol*) y TE (tallo *Eichornnia crassipes etanol*) 1:32 que corresponde a la concentración 2.5mg/ml, HE (hoja *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilución 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml. siendo estas las concentraciones mínimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 18.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB10 por el método CMI

MHB10	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml						X		
Dil 1:8 10mg/ml								X
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml					X		X	
Dil 1:64 1.25mg/ml								
Dil 1:128 0.625 mg/ml								
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

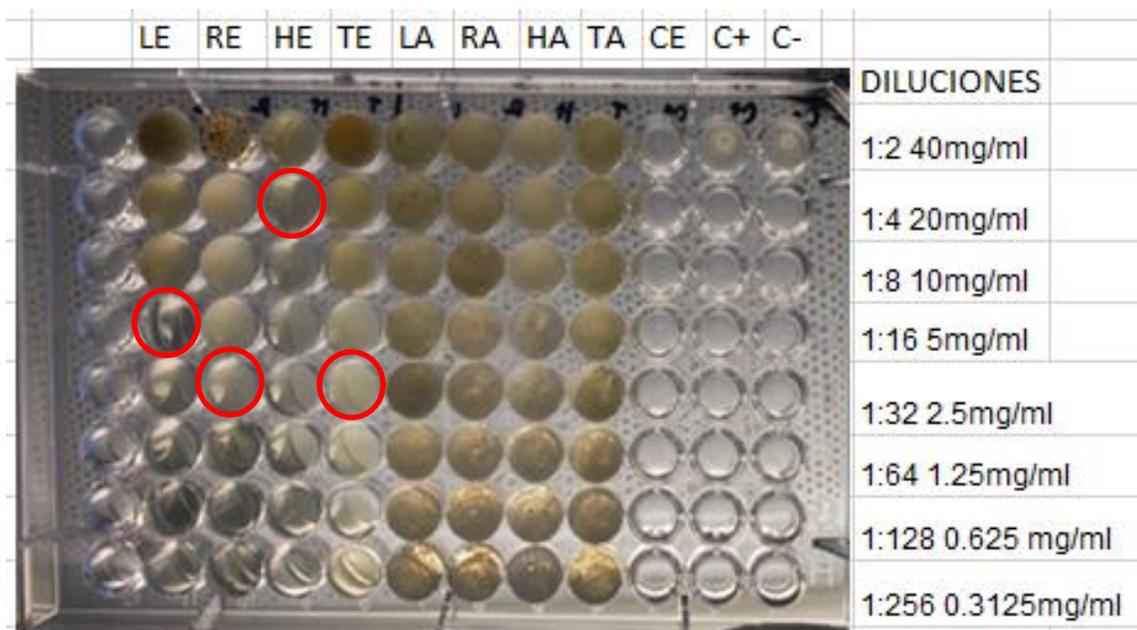


**Figura 40.** Microdilución en placa de *Klebsiella pneumoniae* (s. salud) MHB11  
Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente a *Klebsiella pneumoniae* (s. salud) se ve reflejada en la dilución 1:128 que corresponde a la concentración 0.625mg/ml, en RE (raíz *Eichornnia crassipes* etanol) y TE (tallo *Eichornnia crassipes* etanol) 1:64 que corresponde a la concentración 1.25mg/ml, HE (hoja *Eichornnia crassipes* etanol) se ve reflejada en la dilución 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml. siendo estas las concentraciones mínimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 19.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB11 por el método CMI

MHB11	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml						X		
Dil 1:8 10mg/ml								
Dil 1:16 5mg/ml								
Dil 1:32 2.5mg/ml								
Dil 1:64 1.25mg/ml					X		X	
Dil 1:128 0.625 mg/ml								X
Dil 1:256 0.3125mg/ml								



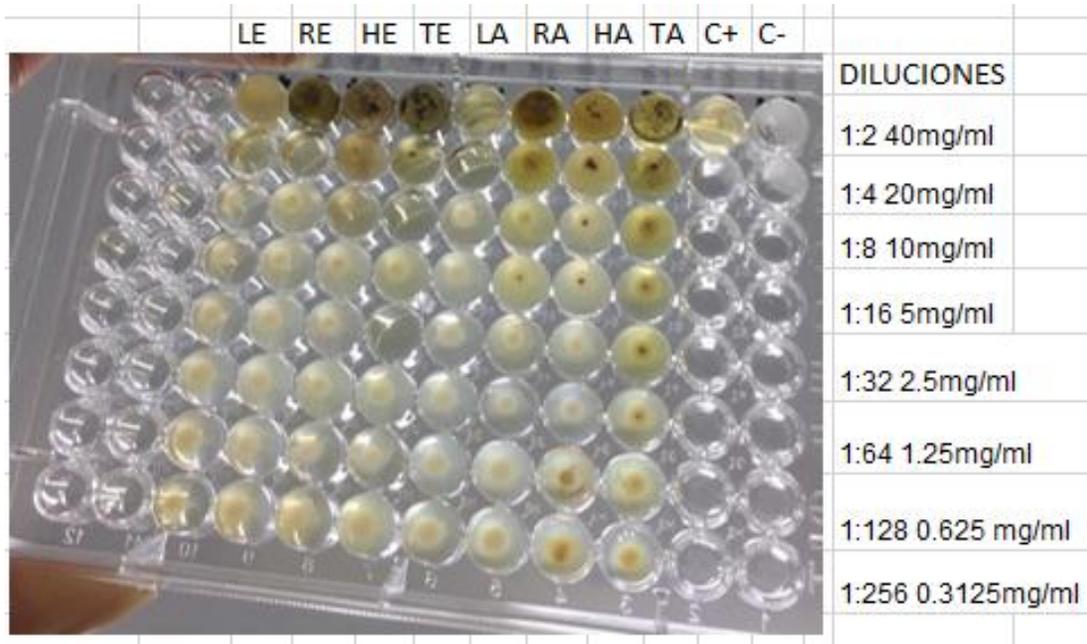
**Figura 41.** Microdilución en placa de *Staphylococcus epidermidis* MHB12 Roa J. 2018

La actividad microbiana que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente a *Staphylococcus epidermidis* se ve reflejada en la dilucion 1:16 que corresponde a la concentracion 5mg/ml, en RE (raiz *Eichornnia crassipes etanol*) y TE ( tallo *Eichornnia crassipes etanol*) 1:32 que corresponde a la concentracion 2.5mg/ml, HE ( hoja *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilucion 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml. siendo estas las concentraciones minimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 20.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHB12 por el método CMI

MHB12	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE
Dil 1:2 40mg/ml								
Dil 1:4 20mg/ml						X		
Dil 1:8 10mg/ml								
Dil 1:16 5mg/ml								X
Dil 1:32 2.5mg/ml					X		X	
Dil 1:64 1.25mg/ml								
Dil 1:128 0.625 mg/ml								
Dil 1:256 0.3125mg/ml								

## CONTROLES



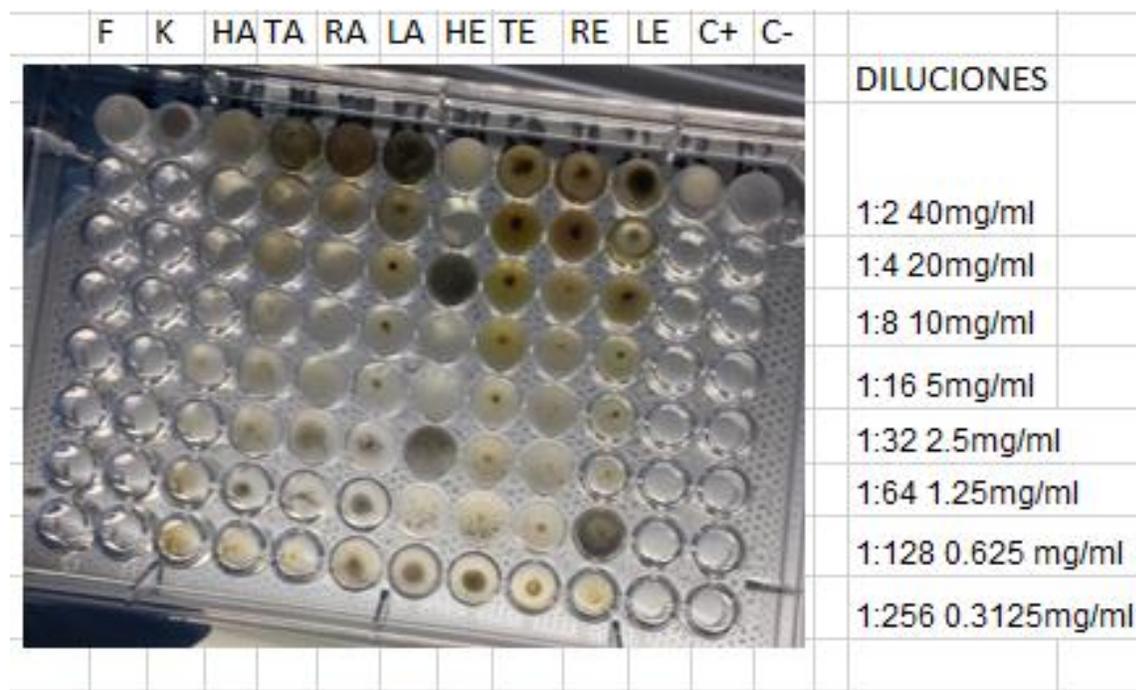
**Figura 42.** Microdilución en placa de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1706)  
Roa J. 2018



**Figura 43.** Microdilución en placa de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1705)  
Roa J. 2018

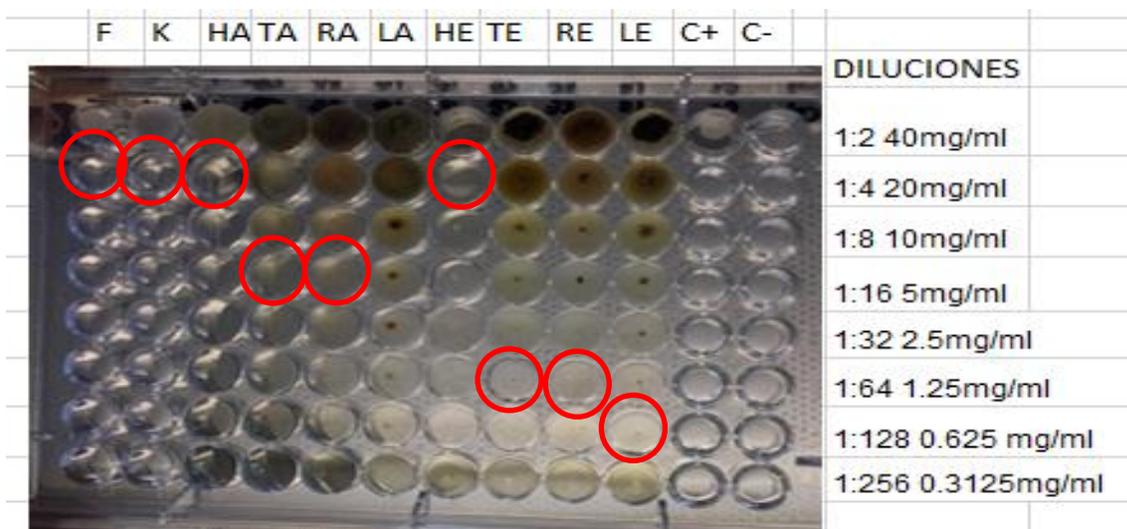
#### 6.4. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (Hongos)

En las siguientes imágenes podemos observar los ensayos realizados en microplaca con los hongos patógenos, mostrando el orden de las diluciones, los extractos y sus debidos solventes, (C-: control negativo, C+: control positivo, EL: Etanol *Lemna Gibba*, ER: Etanol Raíz de *Eichhornia crassipes*, ET: Etanol tallo de *Eichhornia crassipes*, EH: Etanol Hoja de *Eichhornia crassipes*, AL: Acetato de etilo *Lemna Gibba*, AR: Acetato de etilo Raíz de *Eichhornia crassipes*, AT: Acetato de Etilo tallo de *Eichhornia crassipes*, AH: Acetato de etilo Hoja de *Eichhornia crassipes*, K: ketoconazol y F: fluconazol).



**Figura 44.** Microdilución en placa de *Candida glabrata* MHL1 Roa J. 2018

No presentaron actividad antifúngica por parte de los extractos.

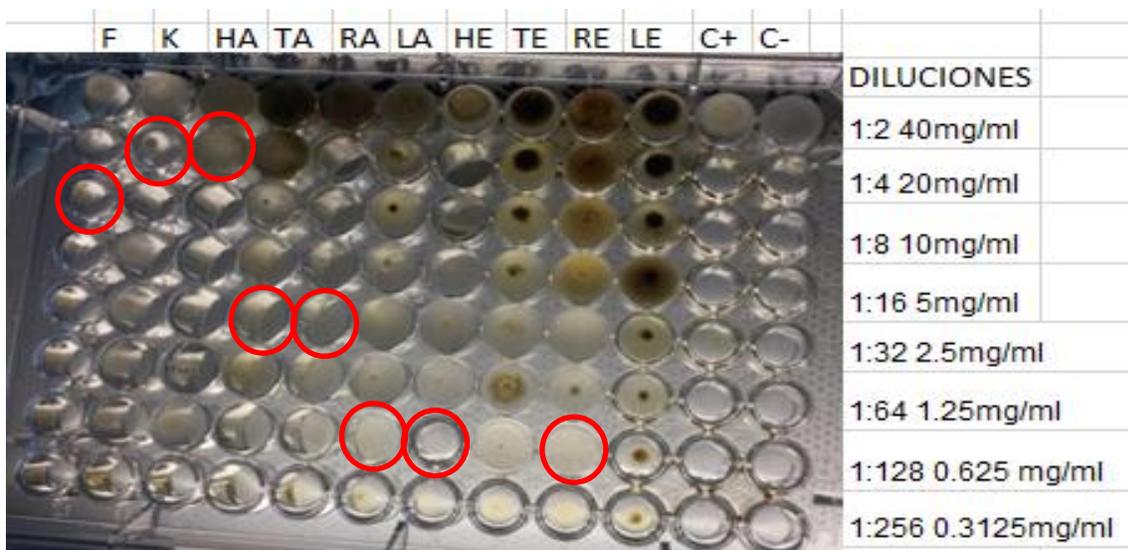


**Figura 45.** Microdilución en placa de *Candida krusei* MHL2 Roa J. 2018

La actividad antifúngica que presenta el extracto LE (*Lemna gibba etanol*) frente a *Cándida krusei* se ve reflejada en la dilucion 1:128 que corresponde a la concentracion 0.625mg/ml, en RE (raiz *Eichornnia crassipes etanol*) y TE ( tallo *Eichornnia crassipes etanol*) 1:64 que corresponde a la concentracion 1.25mg/ml, HE ( hoja *Eichornnia crassipes etanol*) se ve reflejada en la dilucion 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml, RA (raiz *Eichornnia crassipes acetato de etilo*) y TA ( tallo *Eichornnia crassipes acetato de etilo*) 1:16 que corresponde a la concentracion 5mg/ml, HA (hoja *Eichornnia crassipes acetato de etilo*), F(fluconazol) y K(ketoconazol) 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml, siendo estas las concentraciones minimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 21.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHL2 por el método CMI

MHL2	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE	K	F
Dil 1:2 40mg/ml										
Dil 1:4 20mg/ml		X				X			X	X
Dil 1:8 10mg/ml										
Dil 1:16 5mg/ml	X		X							
Dil 1:32 2.5mg/ml										
Dil 1:64 1.25mg/ml					X		X			
Dil 1:128 0.625 mg/ml								X		
Dil 1:256 0.3125mg/ml										

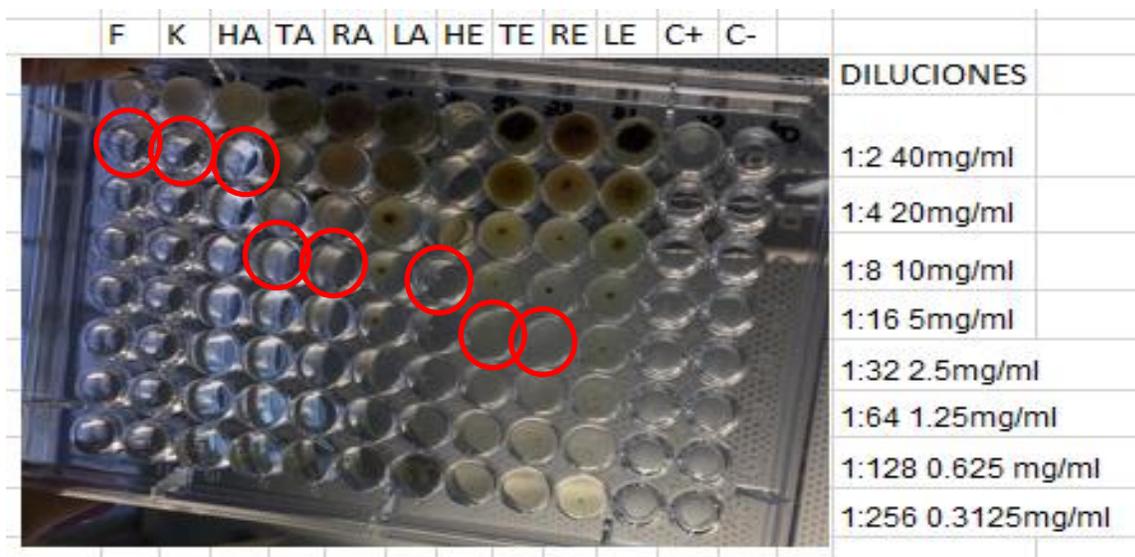


**Figura 46.** Microdilución en placa de *Candida albicans* MHL3 Roa J. 2018

La actividad antifúngica que presenta el extracto RE (raíz *Eichornnia crassipes* etanol), HE ( hoja *Eichornnia crassipes* etanol) y LA (*Lemna gibba* acetato de etilo) frente a *Cándida albicans* se ve reflejada en la dilucion 1:128 que corresponde a la concentracion 0.625mg/ml, RA (raíz *Eichornnia crassipes* acetato de etilo) y TA ( tallo *Eichornnia crassipes* acetato de etilo) 1:32 que corresponde a la concentracion 2.5mg/ml, HA (hoja *Eichornnia crassipes* acetato de etilo), K(ketoconazol) 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml, F(fluconazol) dilucion 1:8 que corresponde a la concentracion 10mg/ml siendo estas las concentraciones minimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 22.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHL3 por el método

MHL3	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE	K	F
Dil 1:2 40mg/ml										
Dil 1:4 20mg/ml		X							X	
Dil 1:8 10mg/ml										X
Dil 1:16 5mg/ml										
Dil 1:32 2.5mg/ml	X		X							
Dil 1:64 1.25mg/ml										
Dil 1:128 0.625 mg/ml				X		X	X			
Dil 1:256 0.3125mg/ml										

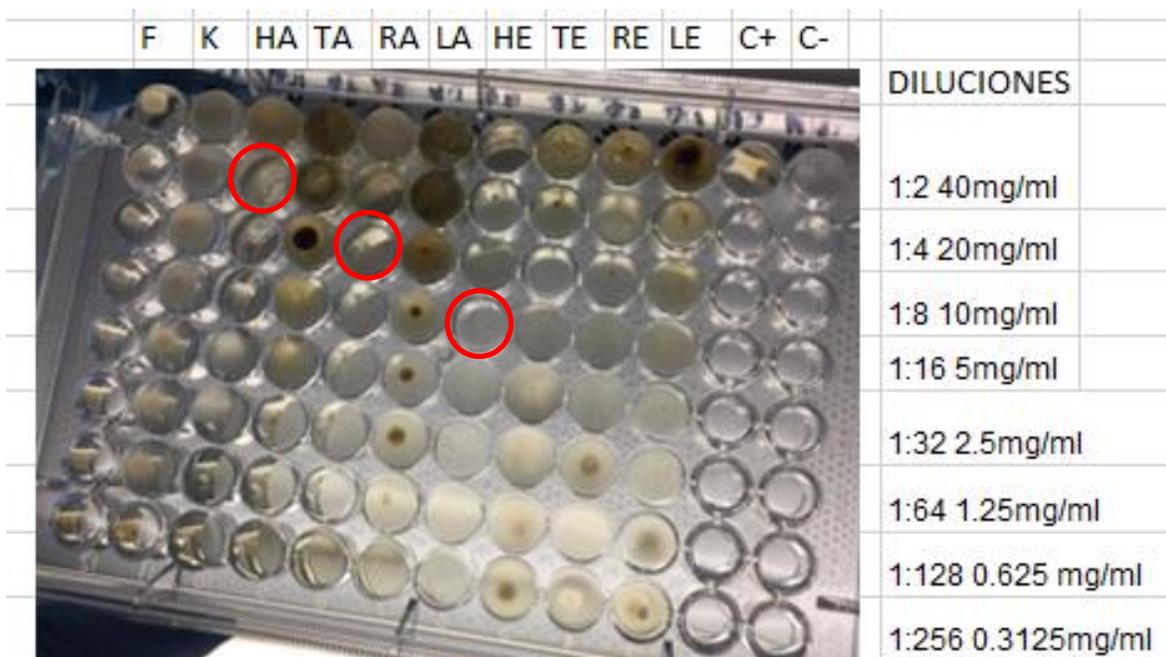


**Figura 47.** Microdilución en placa de *Candida Parapsilosis* MHL4Roa J. 2018

La actividad antifúngica que presenta el extracto RE (raíz *Eichornnia crassipes etanol*) y TE (tallo *Eichornnia crassipes etanol*) frente a *Cándida Parapsilosis* se ve reflejada en la dilución 1:32 que corresponde a la concentración 2.5mg/ml, HE (hoja *Eichornnia crassipes etanol*), RA (raíz *Eichornnia crassipes acetato de etilo*) y TA (tallo *Eichornnia crassipes acetato de etilo*) se ve reflejada en la dilución 1:16 que corresponde a la concentración 5mg/ml, HA (hoja *Eichornnia crassipes acetato de etilo*), F(fluconazol) y K(ketoconazol) 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml, siendo estas las concentraciones mínimas inhibitorias de estos extractos

**Tabla 23.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHL4 por el método CMI

MHL4	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE	K	F
Dil 1:2 40mg/ml										
Dil 1:4 20mg/ml		X							X	X
Dil 1:8 10mg/ml										
Dil 1:16 5mg/ml	X		X			X				
Dil 1:32 2.5mg/ml					X		X			
Dil 1:64 1.25mg/ml										
Dil 1:128 0.625 mg/ml										
Dil 1:256 0.3125mg/ml										

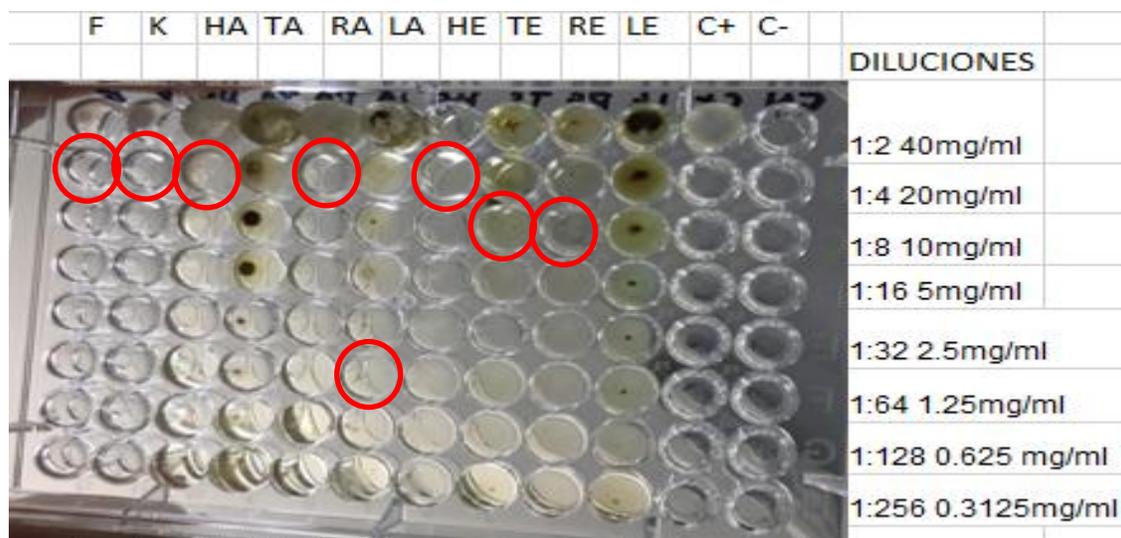


**Figura 48.** Microdilución en placa de *Microsporium cannis* MHF1 Roa J. 2019

La actividad antifúngica que presenta el extracto HE ( hoja *Eichornnia crassipes* etanol) frente a *Microsporium cannis* se ve reflejada en la dilucion 1:16 que corresponde a la concentracion 5mg/ml, RA (raiz *Eichornnia crassipes* acetato de etilo) en la dilucion 1:8 que corresponde a la concentracion 10mg/ml, HA (hoja *Eichornnia crassipes* acetato de etilo) 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml, siendo estas las concentraciones minimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 24.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHF1 por el método CMI

MHF1	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE	K	F
Dil 1:2 40mg/ml										
Dil 1:4 20mg/ml		X								
Dil 1:8 10mg/ml			X							
Dil 1:16 5mg/ml						X				
Dil 1:32 2.5mg/ml										
Dil 1:64 1.25mg/ml										
Dil 1:128 0.625 mg/ml										
Dil 1:256 0.3125mg/ml										

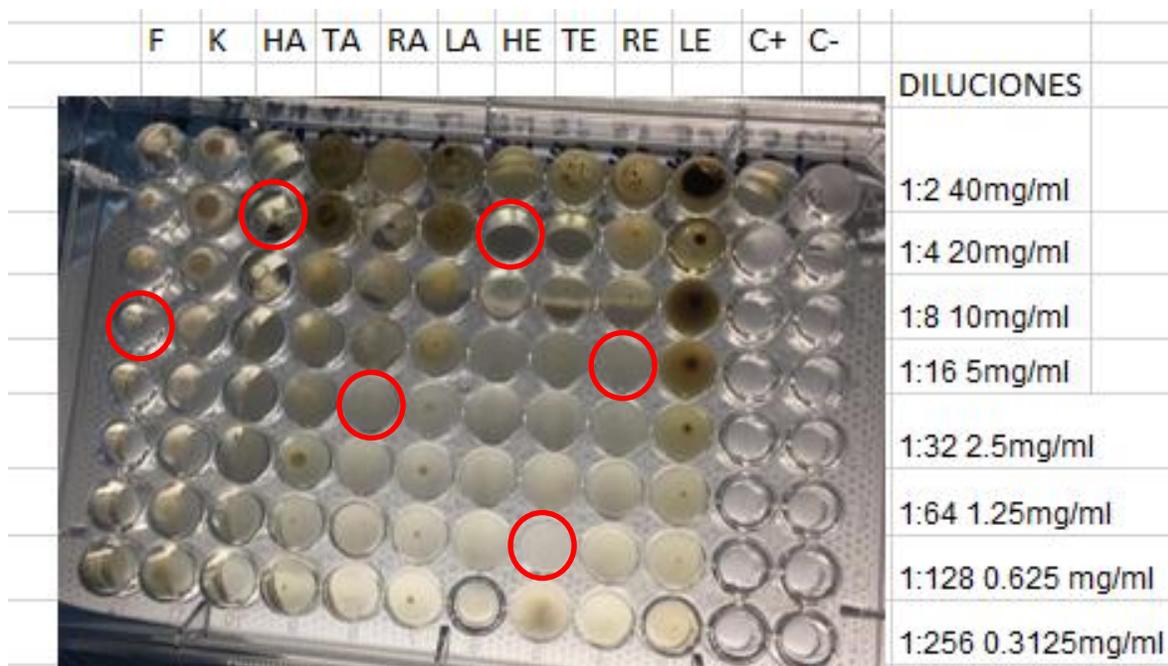


**Figura 49.** Microdilución en placa de *Trichophyton mentagrophytes* MHF2 Roa J. 2019

La actividad antifúngica que presenta el extracto RE (raiz *Eichornnia crassipes* etanol) y TE ( tallo *Eichornnia crassipes* etanol) frente a *Trichophyton mentagrophytes* se ve reflejada en la dilucion 1:8 que corresponde a la concentracion 10mg/ml, HE ( hoja *Eichornnia crassipes* etanol) y RA (raiz *Eichornnia crassipes* acetato de etilo), HA (hoja *Eichornnia crassipes* acetato de etilo), F(fluconazol) y K(ketoconazol) en la dilucion 1:4 que corresponde a la concentracion 20mg/ml, LA (*Lemna gibba* acetato de etilo) en la dilucion 1:64 que corresponde a la concentracion 1.25mg/ml, siendo estas las concentraciones minimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 25.**Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHF2 por el método CMI

MHF2	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE	K	F
Dil 1:2 40mg/ml										
Dil 1:4 20mg/ml		X	X			X			X	X
Dil 1:8 10mg/ml					X		X			
Dil 1:16 5mg/ml										
Dil 1:32 2.5mg/ml										
Dil 1:64 1.25mg/ml				X						
Dil 1:128 0.625 mg/ml										
Dil 1:256 0.3125mg/ml										



**Figura 50.** Microdilución en placa de *Microsporium gypseum* MHF3 Roa J. 2019

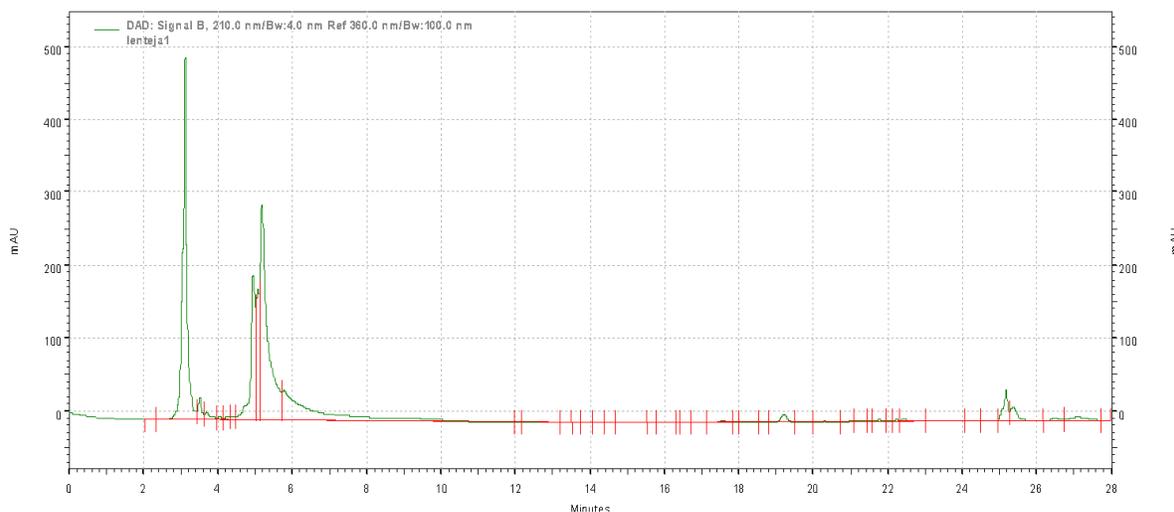
La actividad antifúngica que presenta el extracto RE (raiz *Eichornnia crassipes* etanol) y F (fluconazol) frente a *Microsporium gypseum* se ve reflejada en la dilución 1:16 que corresponde a la concentración 5mg/ml, TE ( tallo *Eichornnia crassipes* etanol) 1:128 que corresponde a la concentración 0.625mg/ml, HE ( hoja *Eichornnia crassipes* etanol) y HA (hoja *Eichornnia crassipes* acetato de etilo), en la dilución 1:4 que corresponde a la concentración 20mg/ml, siendo estas las concentraciones mínimas inhibitorias de estos extractos.

**Tabla 26.** Actividad inhibitoria de los extractos frente a MHF3 por el método CMI

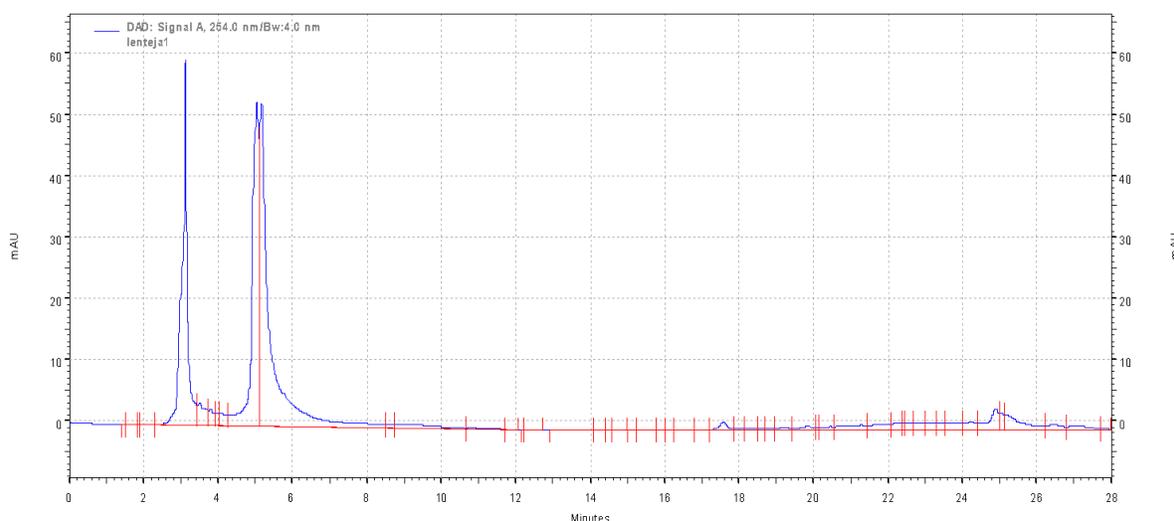
MHF3	TA	HA	RA	LA	TE	HE	RE	LE	K	F
Dil 1:2 40mg/ml										
Dil 1:4 20mg/ml		X				X				
Dil 1:8 10mg/ml										
Dil 1:16 5mg/ml							X			X
Dil 1:32 2.5mg/ml			X							
Dil 1:64 1.25mg/ml										
Dil 1:128 0.625 mg/ml					X					
Dil 1:256 0.3125mg/ml										

## 6.5. Cromatografía líquida de alta densidad HPLC

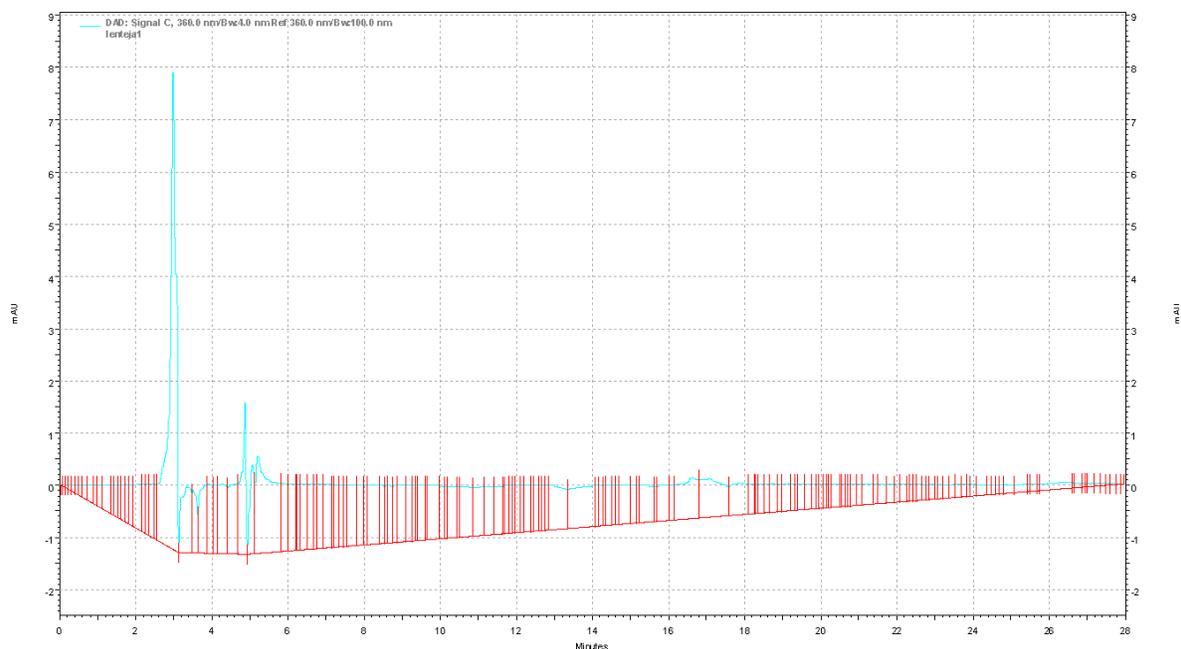
A continuación, las gráficas de identificación de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana por técnica espectrofotométrica HPLC.



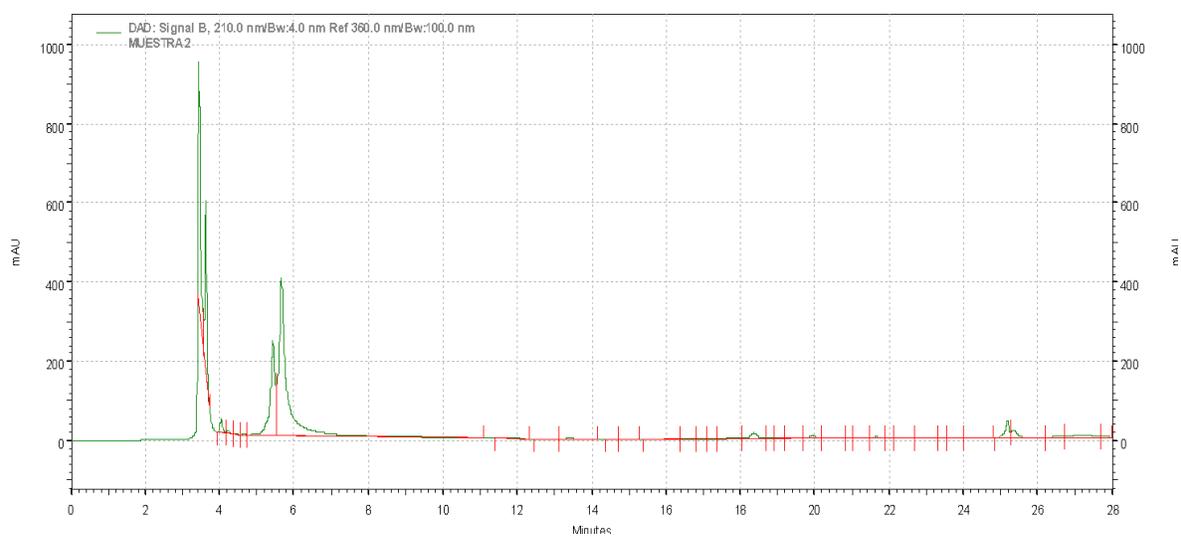
**Figura 51.**Muestra1: Extracto de Lenteja (*Lemna gibba*) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm



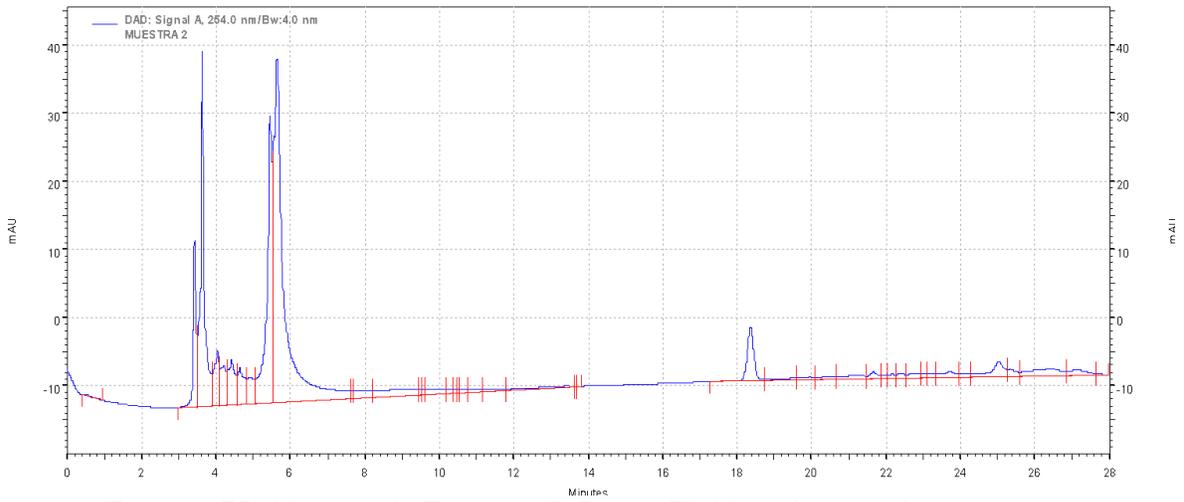
**Figura 52.**Muestra1: Extracto de Lenteja (*Lemna gibba*) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm



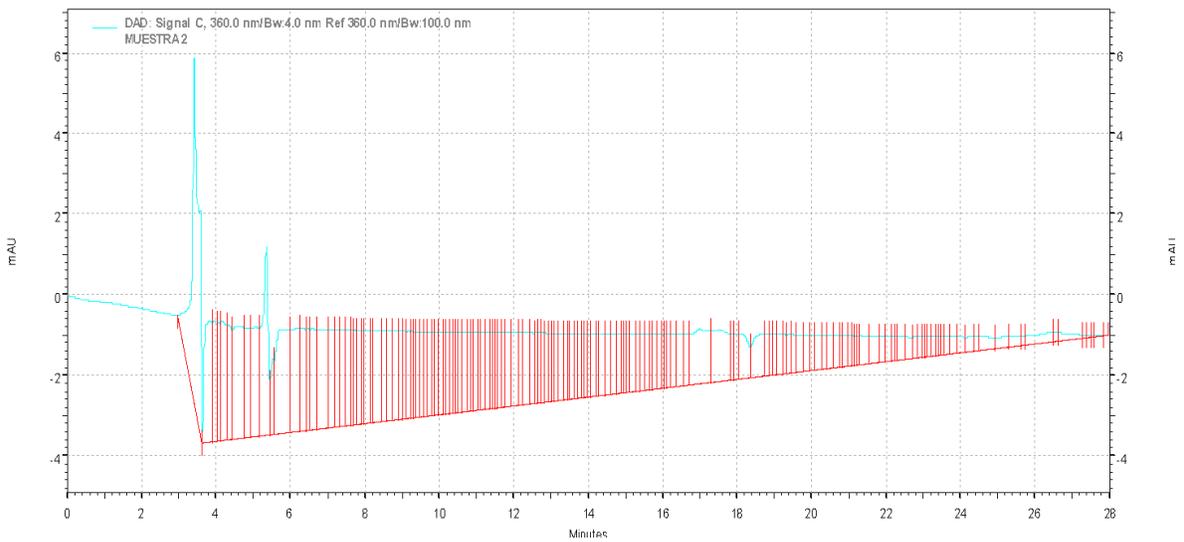
**Figura 53.** Muestra1: Extracto de Lenteja (*Lemna gibba*) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm



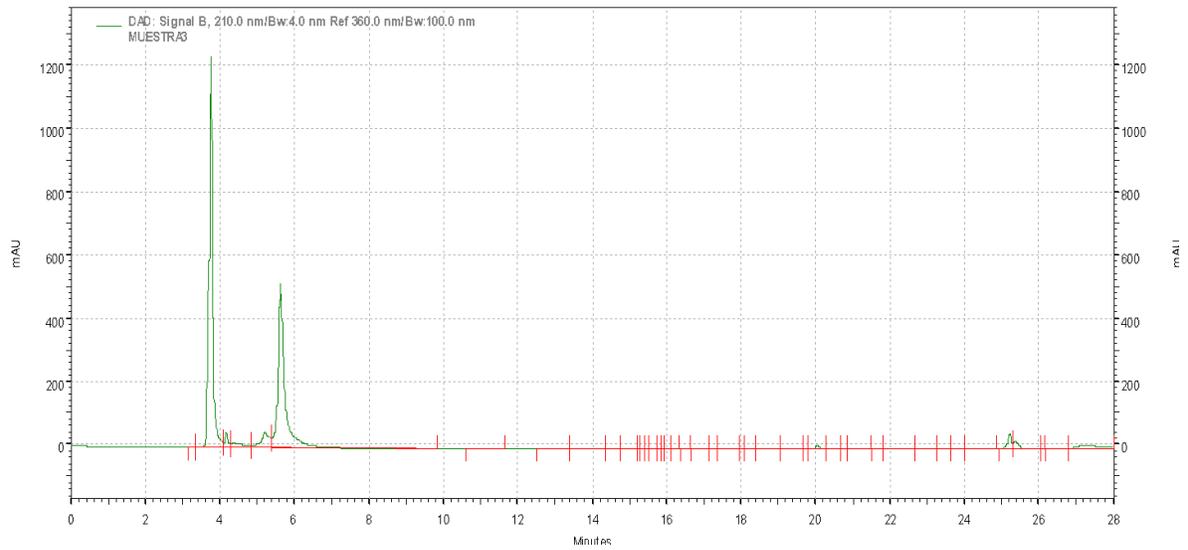
**Figura 54.** Muestra2: Extracto B Raíz (*Eichhornia crassipes raíz*) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm



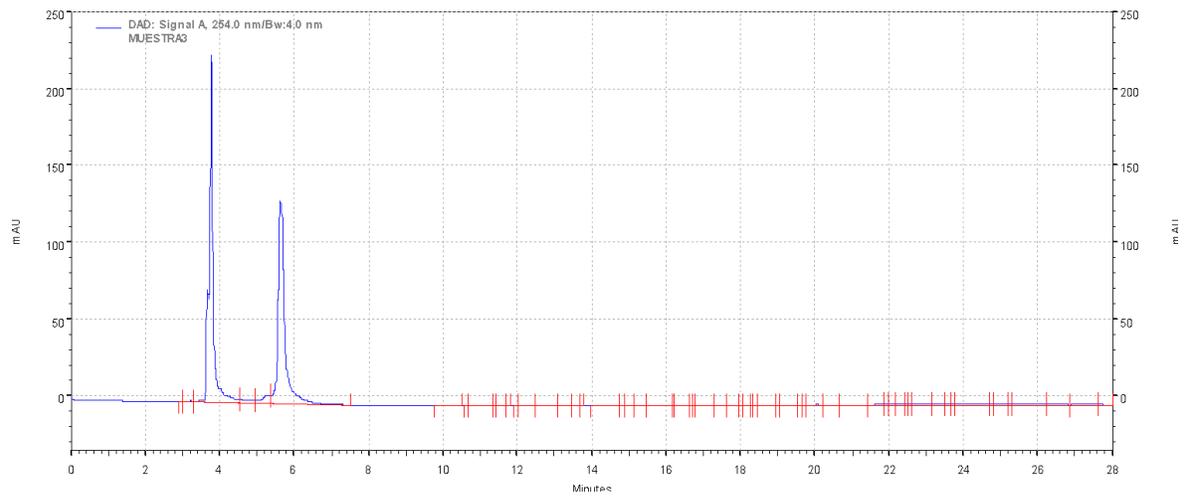
**Figura 55.** Muestra2: Extracto B Raíz (*Eichhornia crassipes* raíz) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm



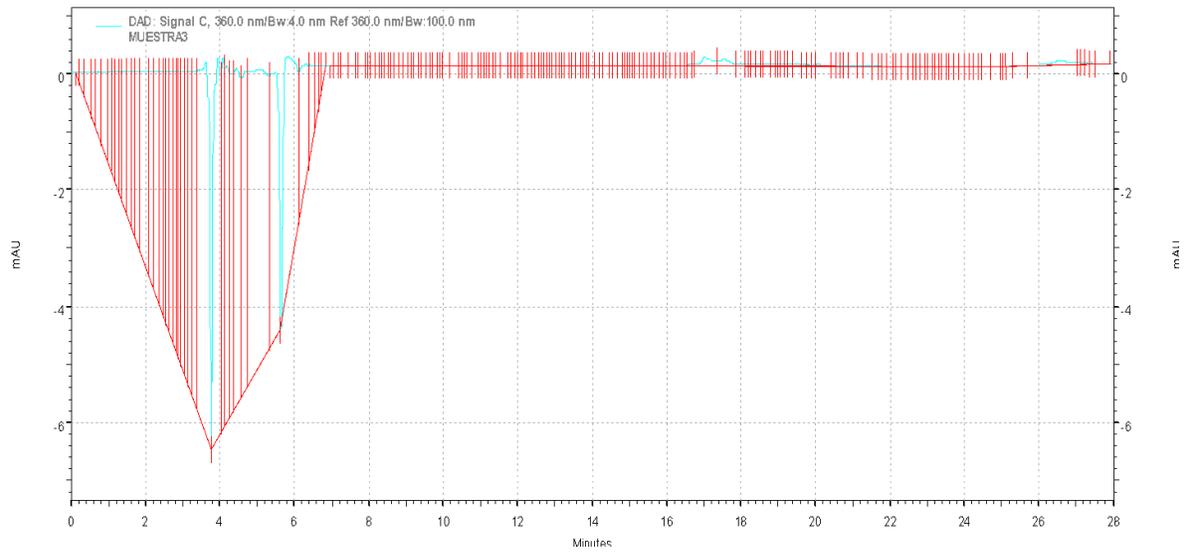
**Figura 56.** Muestra2: Extracto B Raíz (*Eichhornia crassipes* raíz) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm



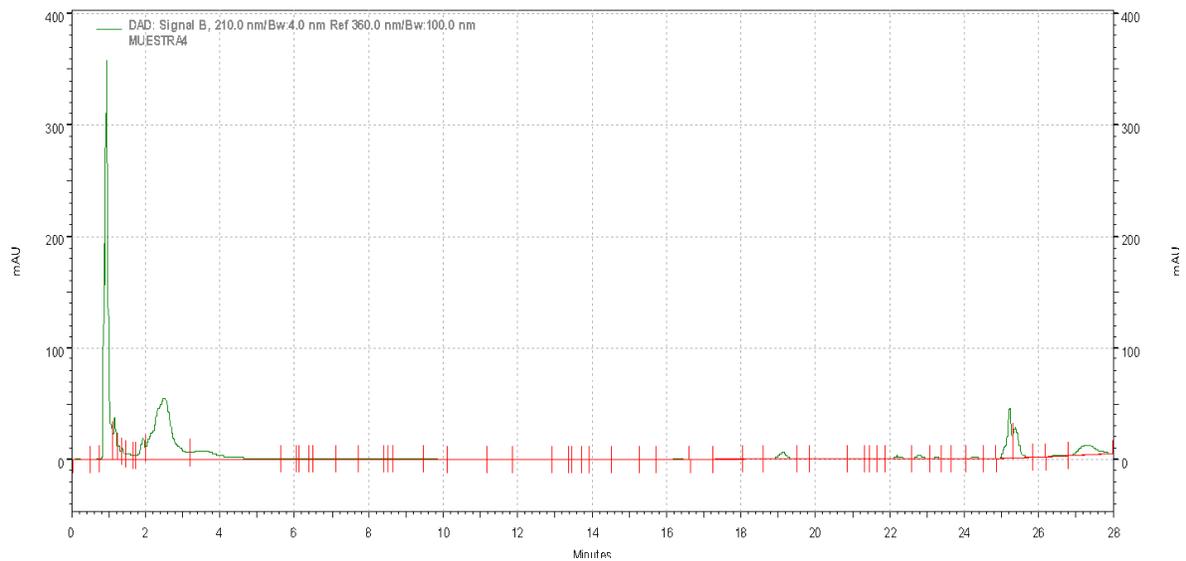
**Figura 57.** Muestra3: Extracto B Hoja (*Eichhornia crassipes* hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm



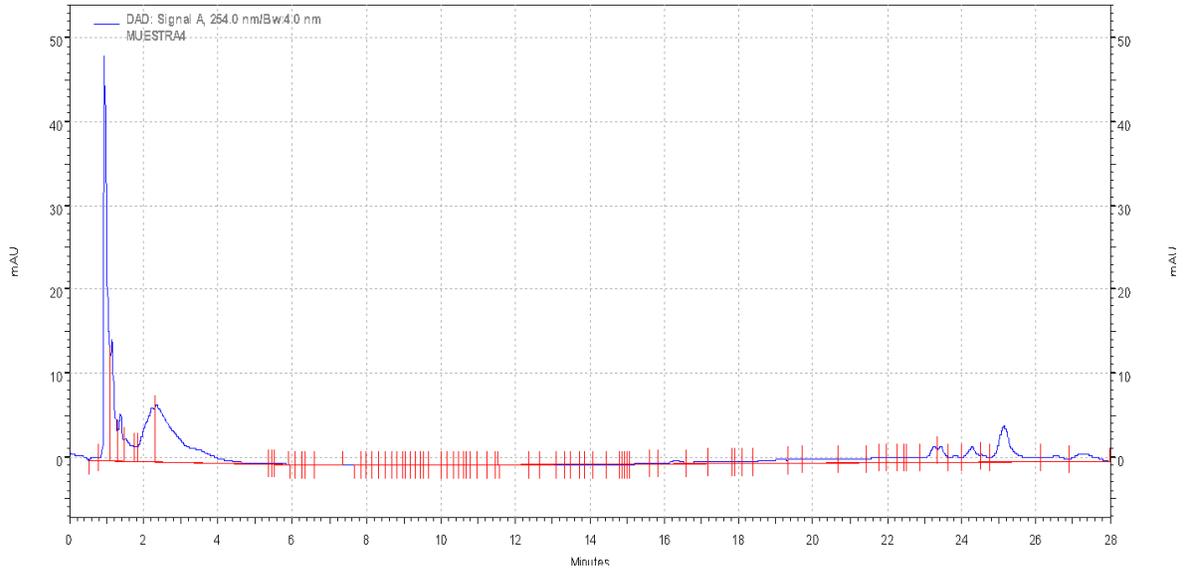
**Figura 58.** Muestra3: Extracto B Hoja (*Eichhornia crassipes* hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm



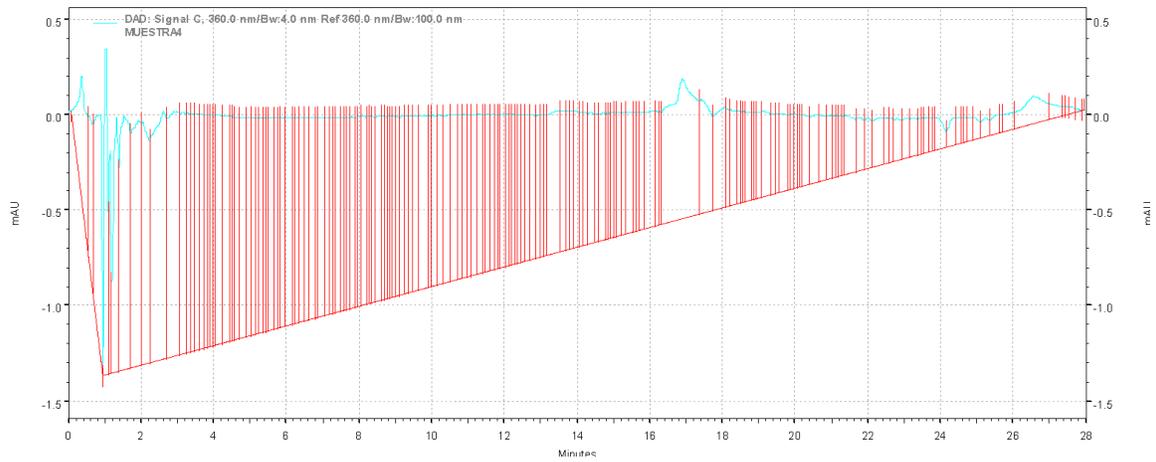
**Figura 59.** Muestra3: Extracto B Hoja (*Eichhornia crassipes* hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm



**Figura 60.** Muestra4: Extracto B Tallo (*Eichhornia crassipes* tallo) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm



**Figura 61.** Muestra4: Extracto B Tallo (*Eichhornia crassipes* tallo) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm



**Figura 62.** Muestra4: Extracto B Tallo (*Eichhornia crassipes* tallo) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm

## 7. DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana se ha convertido en una amenaza para la salud humana, veterinaria y vegetal, afectando los alimentos y el ambiente. En 1998, es reconocida por la Organización Mundial de la Salud, como una problemática de salud pública, dando así parámetros para prevenir la diseminación de microorganismos resistentes a los antibióticos<sup>46,47</sup>.

El uso indiscriminado de los antibióticos como modelo terapéutico para el manejo de microorganismos patógenos ha generado un impacto negativo. La OMS en el primer informe generado el 30 de abril del 2014 en Ginebra, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, señala “La resistencia está afectando a muchos agentes infecciosos distintos, pero se centra en la resistencia a los antibióticos en siete bacterias responsables de infecciones comunes graves, como: la septicemia, la diarrea, la neumonía, las infecciones urinarias o la gonorrea. Los datos son muy preocupantes y demuestran la existencia de resistencia a los antibióticos, especialmente a los utilizados como «último recurso» en todas las regiones del mundo”, por lo tanto, se puede observar que las bacterias como todos los seres vivos también tienen mecanismos biológicos, que les permite adaptarse a todos los ambientes. Aunque la resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, pero ciertos factores contribuyen al aumento de esta expresión<sup>48</sup>.

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), Comunidad Andina de Naciones (CAN) y la Universidad Nacional de Colombia<sup>49</sup>, entre otros estamentos nacionales e internacionales<sup>50</sup>, establecen que mediante la bioprospección y aprovechando los recursos naturales en Colombia se pueden diseñar alternativas de nuevos fármacos de origen natural, los cuales serían utilizados para mitigar la problemática de resistencia microbiana y a la vez permitan la conservación ambiental de los micro y/o macro organismos que pudieran ser utilizados para este fin<sup>51</sup>. Entre los organismos más investigados con fines de bioprospección se encuentran las plantas<sup>52</sup>, las cuales tienen sustancias

que han demostrado su capacidad de inhibir el crecimiento in vitro de patógenos y muchas de ellas son usadas en la medicina tradicional para tratar diversas infecciones<sup>53</sup>. Los investigadores han llegado incluso a identificar proteínas blanco que aparecen específicamente cuando se hacen tratamientos con extractos de plantas<sup>54</sup>.

Los extractos de las plantas se han utilizado para la creación de fitomedicamentos, que contienen principios activos aislados o en mezcla y su uso ha resultado eficaz. Entre los criterios para la selección de las especies objeto de evaluación antimicrobiana y antifúngica en este trabajo, se consideró los antecedentes de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* que demostraron tener un gran potencial de acción biológico<sup>3,5,13,14</sup>. Según Carreño (2016) en los últimos años se ha demostrado que *Eichhornia crassipes* puede manipularse de manera sostenible en su ecosistema y ser usada en fitorremediación de aguas contaminadas con metales pesados<sup>55</sup>. En el caso de *Lemna* sp se ha podido demostrar que es capaz de remover entre el 98 al 99% de coliformes totales en aguas servidas<sup>56</sup>. Esto nos muestra la importancia de estas plantas consideradas maleza del agua y los beneficios que se pueden tener a nivel ambiental y humano.

La finalidad de este trabajo fue continuar el proceso de investigación que venía realizando el grupo de investigación Ceparium, evaluando con diferentes microorganismos bacterianos y fúngicos la actividad antimicrobiana y antifúngica de las plantas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*. En el caso de la investigación en este trabajo, se orientó la búsqueda de la actividad microbiana en patógenos recurrentes que en la actualidad tienen una importancia por la resistencia en algunos casos a varios antibióticos, en el ámbito clínico a nivel de Colombia; se utilizaron 14 bacterias, 4 levaduras y 3 hongos filamentosos, utilizando los extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* utilizando como solventes Acetato de etilo y Etanol que según su polaridad son capaces de extraer un amplio número de metabolitos presentes en las especies vegetales.

Los bioensayos se realizaron por difusión radial en agar y concentración mínima inhibitoria (CMI) son métodos estandarizados para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

En el método de difusión radial en agar, se obtuvo un resultado importante con las bacterias Gram negativas, específicamente en los extractos obtenidos con Acetato de Etilo. Se evidenciaron halos entre 6mm y 7mm para las bacterias *E. coli* ATCC, *Acinetobacter baumannii* y *K. pneumoniae* (s. salud). En las bacterias Gram positivas los resultados más importantes se obtuvieron con el extracto de *Eichhornia crassipes* en Acetato de Etilo, el cual mostró inhibición en casi todas las bacterias con diferentes halos; el más relevante fue de 11mm con *Enterococcus faecium*. En algunas bacterias como *S. epidermidis* se presentaron halos de 6mm en todos los extractos con los diferentes solventes.

En las pruebas antimicrobianas con las 4 levaduras, se evidenció resistencia con 3 de ellas, excepto *C. parapsilosis*, en donde se observaron halos de inhibición con diámetros de 12 y 10 mm con el extracto de la raíz de *Eichhornia crassipes* obtenido con Acetato de Etilo y Etanol. Para los hongos filamentosos, solo se evidenciaron halos de inhibición con *M. gypseum*, con el mismo extracto utilizado para *C. parapsilosis* presentando halos de 20mm con los dos solventes. Al respecto, el trabajo de Mohamed y colaboradores en 2019 encontraron en su investigación que hay actividad antifúngica de los extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* para los hongos *Aspergillus niger*el, *Penicillium roqueforti* corroborando de esta forma la efectividad como antifúngico de estos extractos.<sup>21</sup>.

De acuerdo con recomendaciones de varios trabajos de investigación, para el ensayo de CMI, se utilizó una concentración de 40mg/ml del extracto. Los resultados se interpretaron de acuerdo con lo estandarizado por la NCCLS, tomando la última concentración en la que el extracto actuó como inhibidor de los microorganismos. En el presente trabajo, hubo interferencia en los ensayos que contenían acetato de etilo y no pudo realizarse una observación de las inhibiciones por parte de los extractos. En el caso de los extractos obtenidos con etanol, no

hubo interferencias para su interpretación. Con relación a los controles con los solventes fue muy importante su realización, por cuanto se ha observado que el etanol, por ser un químico que actúa destruyendo la membrana celular y desnaturalizando proteínas, al tener agua va a penetrar mejor las bacterias para dañar la membrana y dar rápida desnaturalización a las proteínas, causando interferencia con el metabolismo y lisis celular<sup>57</sup>. En el caso particular del presente trabajo, no hubo ninguna reacción inesperada.

En el panel de bacterias enfrentadas a los extractos en los que se utilizó etanol, se observó que todos mostraron actividad en un buen número de las bacterias, en especial el de *Lemna gibba* y hoja de *Eichornnia crassipes*, presentando inhibición desde la dilución 1:4 con una concentración de 20mg/ml. En el caso del extracto de hoja de *Eichornnia crassipes*, las bacterias que presentaron la CMI en esta dilución fueron *Staphylococcus epidermidis* (MHB12), *Klebsiella pneumoniae* (s. salud) (MHB11), *Acinetobacter* sp.(MHB10), *Acinetobacter baumannii* (MHB9), *E.coli* nativa(MHB8), *E.coli* ATCC(MHB7), *Klebsiella pneumoniae* (clínica)(MHB6), *Enterococcus faecium*(MHB4). Para el caso de *Lemna gibba*, la única que no presentó inhibición fue *Enterococcus faecium* (MHB4). Al respecto, en 2015 el investigador Almahy H. en su estudio titulado “Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of *Lemna minor* against eight different bacterial species”, investigó las propiedades antimicrobianas de extractos metanólicos de hojas de otra variedad de *Lemna*, la denominada *L. minor* frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Shigella flexneri*, *Bacillus megaterium* y *Salmonella typhi*. En este trabajo se encontraron diferentes grados de actividad contra la mayoría de bacterias antes mencionadas confirmando los resultados obtenidos frente al extracto de *Lemna gibba* que a pesar de ser otra variedad que tiene potencial antimicrobiano<sup>17</sup>.

El panel de levaduras no presentó actividad en la prueba CMI, en el caso de *Candida glabrata* (MHL)1. El extracto de hoja *Eichornnia crassipes* con los dos solventes, presentó actividad desde la dilución 1:4 con una concentración de 20mg/ml en *Candida parapsilosis*MHL4, *Candida krusei* (MHL2) y *Candida*

*albicans* (MHL3) demostrando el potencial del extracto de hoja frente a estos agentes infecciosos.

En los hongos filamentosos, el extracto de hoja *Eichornnia crassipes* en los dos solventes presentó en todos los hongos filamentosos. Adicionalmente, con el extracto de *Lemna gibba* desde la dilución 1:4 a una concentración de 20mg/ml, con el solvente acetato de etilo *Trichophyton mentagrophytes* MHF2, mostró en la dilución 1:64 que corresponde a la concentración 1.25mg/ml una buena actividad.

Con relación a la verificación de la identificación de compuestos realizada con el análisis HPLC que no mostro picos de actividad con los diferentes extractos utilizados en los bioensayos, se debe tener en cuenta la polaridad del extracto por medio de cromatografía en capa fina y así poder determinar la clase de solventes que se utilizan en estos ensayos, en algunos estudios muestran mayor actividad en el espectro, los extractos que se hacen por la técnica de ultrasonido usando metanol como solvente permiten observar diferentes picos en las graficas<sup>61</sup>.

Según Venegas Casanova y colaboradores encontraron en el estudios de extractos y análisis con HPLC que el metanol es más polar que el etanol, pero la pureza del metanol limitó la extracción de los metabolitos encargados del efecto antioxidante en su ensayo, demostrando que el etanol utilizado tuvo la pureza que declaraba 96 °GL aumentando su rendimiento y su poder de extracción<sup>62</sup>.

Aunque en la actualidad se adelantan varios estudios relacionados con la capacidad microbiana de diversas plantas en diferentes partes del mundo, los estudios con respecto a la Lenteja de agua *Lemna* spp. y *Eichornnia crassipes* se encuentran centrados en el campo de la biorremediación, debido a que por su presencia en el agua como malezas adquieren la capacidad para absorber muchos compuestos y esta actividad es muy importante a nivel ambiental.

El presente estudio junto con los previos y simultáneos que ha realizado el grupo Ceparium, permiten demostrar que estas plantas acuáticas, tienen la capacidad antimicrobiana, la cual puede ser aprovechada para el desarrollo de nuevas

formas de tratamiento<sup>23,58,59,60</sup>, como alternativa a la multiresistencia frente a antibióticos y antifúngicos.

## 8. CONCLUSIONES

- Los bioensayos por el método de difusión radial en agar y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) permitieron establecer actividad antimicrobiana de los extractos de raíz, hojas y tallos de los extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* frente al panel de las 12 bacterias, 3 de las levaduras y los 3 hongos filamentosos utilizados. A pesar del tiempo de almacenamiento de los extractos y la pérdida de sus metabolitos.
- El bioensayo más promisorio fue el que se realizó extracto de raíz de *Eichhornia crassipes* frente a *Microsporium gypseum* MHF3, por cuanto al ser comparados con los antifúngicos convencionales, presentó actividad, tanto halo de inhibición en la prueba de difusión como en las reacciones de CMI.
- Con la técnica de análisis cromatográfico HPLC no se pudo establecer las sustancias presentes en los extractos de *Lemna gibba* y *Eichhornia crassipes*, se debe tener en cuenta los solventes y la clase de extracto que se está utilizando y el tiempo de conservación del extracto.

## 9. RECOMENDACIONES

- Para próximos bioensayos en microplaca por concentración mínima inhibitoria (CMI), se debe considerar hacer el experimento en ubos de vidrio para el caso del solvente Acetato de Etilo ya que genera una interferencia en las microplacas de plástico impidiendo observar la inhibición.
- Los ensayos cromatográficos con HPLC se debe tener en cuenta las características del extracto y así complementar con una Resonancia Magnética Nuclear para confirmar cuál es el compuesto que está realizando la inhibición.

## 10.REFERENCIA

1. Centers for Disease Control and Prevention National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID) Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP), Antibiotic Resistance Threatens Everyone Page last updated: September 10, 2018
2. El Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación en los Beneficios, decenio de las Naciones Unidas 2010- 2020 [online] [www.cbd.int](http://www.cbd.int)
3. Aboul-Enein AM , Al-Abd AM , Shalaby E , Abul-Ela F , Nasr-Allah AA , Mahmoud AM , El-Shemy HA . (Eichhornia crassipes Mart) Solm de parasito de agua para el potencial remedio medicinal Plant Signaling & Behavior [serial on the Internet]. (2011, june), [cited April 11, 2018]; 6(6), 834-836.Available from: Academic Search Complete.
4. Duman F., Aksoy A., Ozturk F. y Ceylan A. Exogenous salicylate application affects the lead and copper accumulation characteristics of *Lemna gibba* L. 2010 *Zeitschrift fur Naturforschung C* Vol: 65 Pag: (11-12).
5. Gülçin I., Kireççi E., Akkemik E., Topal F., Hisar O. Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). 2010. *Turk. J. Biol.* Vol. 34. Pp: 175-188.
6. Rocha C, Nathanael D. Reynolds, Mark P. Simons. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. Rev Peru Med Exp Salud Publica Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v32n1/a20v32n1.pdf>
7. Villalobos AP, Barrero LI, Rivera SM, Ovalle MV, Valera D. Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia,

2011. *Biomédica* [online]. 2014, vol.34, suppl.1, pp.67-80. ISSN 0120-4157. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1698>.
8. López-Avila, K., Dzul-Rosado, K., Lugo-Caballero, C., Arias-Leon, J., & Zabala-Castro, J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Revista Biomedica*, 2016, 127-136. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2016/bio163e.pdf>
  9. Perez-Gonzalez LE. Estudio fitoquímico biodirigido de las plantas con potencial actividad insecticida *trichilia havanensis* y *croton ciliato glanduliferus*, proyecto de grado [online]. 2006  
[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lcf/perez\\_g\\_le/capitulo4.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/perez_g_le/capitulo4.pdf)
  10. Español WJ. Bioprospección y Conocimiento Tradicional en Colombia, tesis de grado [online]. 2017. <http://bdigital.unal.edu.co/64359/1/2018-06-11%20Tesis%20Final%20Bioprospecci%C3%B3n%20y%20CT.pdf>
  11. Vadlapudi V. In Vitro Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of Selected Indian Medicinal Plants. *Pharmacophore*. 2010. Vol.3. Pp 214-219.
  12. Shanab S., Shalaby E., Lightfoot D., El-Shemy H. Allelopathic Effects of Water Hyacinth [*Eichhornia crassipes*]. *Plos One*. 2010. Oct 8;5(10):e13200. doi: 10.1371/journal.pone.0013200
  13. Thamaraiselvi, P. L and Jayanthi P. Preliminary studies on phytochemicals and antimicrobial activity of solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2012, 2 (2):115-122
  14. Rodríguez C y Zárate A. Actividad antimicrobiana in vitro de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. Proyecto de Grado, Bogotá, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2014.

15. Effiong BN., Sanni A. Antifungal Properties and Phytochemical Screening of Crude Extract of *Lemna paucicostata* (Helgelm) Against Fish Feed Spoilage Fungi. 2009. Life Science Journal. Vol 6(3): 19-22
16. Madhavi D., Bethapudi R., Krupadanam D. and Kavi P. Antibacterial aromatic compound and steroid glycoside isolated from duckweed *Lemna paucicostata* Hegelm. 2014. Annals of Phytomedicine. Vol 3(2): 78-81
17. Almahy H. Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of *Lemna minor* against eight different bacterial species. 2015. International Journal of Pharmacy. Vol: 5(1). Pag. 46-50
18. Torres Y., Vargas C., Zamora P. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de lenteja de agua (*Lemna gibba*) con tres microorganismos de importancia clínica. Proyecto de Grado en fase de sustentación, Bogotá, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2016.
19. Gutierrez-Morales, A., Velasquez, V., Khusro, A., Salem, A., Estrada, M., Salem, M & Burrola, C. Anti-staphylococcal properties of *Eichhornia crassipes*, *Pistacia vera*, and *Ziziphus amole* leaf extracts: Isolates from cattle and rabbits. Microbial Pathogenesis, 2017, (113), 181-189. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.015>
20. Jagathesan, G., & Rajiv, P. Biosynthesis and characterization of iron oxide nanoparticles using *Eichhornia crassipes* leaf extract and assessing their antibacterial activity. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 13, 90-94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.014>
21. Mohamed, W., Mansour, M., & Salem, M. *Lemna gibba* and *Eichhornia crassipes* extracts: Clean alternatives for deacidification, antioxidation and fungicidal treatment of historical paper. Journal of Cleaner Production, 2019, 846-855. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.09734>
22. Ramil-Rego P, Marco Rubinos R, Gómez-Orellana L, Rodríguez P, Hinojo Sánchez B, *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms en el Parque Nacional

Marítimo-Terrestre das las Atlánticas de Galicia como resultado de un transporte por mar a larga distancia, Recursos Rurais (2014) nº 10: 15-24  
IBADER: Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvimento Rural

23. Arroyave MP, La lenteja de agua (*lemna minor* L.): Una planta acuática promisoría, Rev.EIA. Esc. Ing. Antioquía no.1 Envigado Jan./June 2004
24. González Villa A, Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas de las amazonas, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales departamento de ingeniería química abril de 2004.
25. Capítulo 4. Técnicas de extracción y concentración. Universidad Nacional Abierta y a Distancia [online] 30 de enero del 2016  
[http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401552/Capitulo\\_4/451percolacin\\_e\\_n\\_frio.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401552/Capitulo_4/451percolacin_e_n_frio.html)
26. Guerrero P. manual de prácticas de operaciones unitarias. Universidad Sonora. Escuela de ciencias químicas, 1987 Pp 220-224
27. BUCHI labortechnik AG Manual de instrucciones Rotoevaporador R-220 SE, Suiza, Pp 21-28.
28. Seija V, Género Staphylococcus, TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA; 2008 [online]  
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>.
29. Mensa J, Soriano A, Llinares P, Barberán J, Montejo M, Salavert M, Alvarez-Rocha L, Maseda E, Moreno A, Pasquau J, Gómez J, Parra J, Candel J, Azanza JS, García JE, Marco F, Soy D, Grau S, Arias J, Fortún J, Alarcón C, Picazo J, Sociedad Española de Quimioterapia (SEQ) Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) GTIPO-Sociedad Española de Anestesiología y Reanimación, Guía de tratamiento antimicrobiano de la

- infección por *Staphylococcus aureus*. Revista Española de Quimioterapia, 2013; Suppl. 1 [online] <https://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>
30. Garza-Velasco R, Hernández-Acosta K y Gomez A. Mejía-Chávez Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. [online] <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Enterococcus.pdf>
31. Casal M, Causse M, Solís F, Rodríguez-López F, Casal M, Investigación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterococcus faecium*. Revista Española de Quimioterapia, 2012 [online] <https://seq.es/seq/0214-3429/25/3/casal.pdf>
32. Crespo MP, Vélez JD, Castañeda C, Hoyos F, López ML, Salazar JC, Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. Revista Colombia medica Vol. 30 N° 2, 1999
33. López-Vargas J, Echeverri-Toro L, K. pneumoniae: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. Revista IATREIA Vol 23, No. 2 de JUNIO 2010.
34. Canet JJ, *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención (I) [online] <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
35. López S, López-Brea M, ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*? Revista EL SEVIER, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Vol. 18. Núm.3. Marzo 2000.
36. Garcia-Apac C, Pardo-Valdespino J, Seas-Ramos C, Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: Reporte de un caso. Revista Médica Herediana, Vol. 14. Núm 4. octubre 2003.
37. Tapia C. *Cándida glabrata*. Revista chilena de infectología Vol. 25 Núm 4, pág. 293 [online] <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v25n4/art09.pdf>

38. Berkhout R. *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología 2002.[online] <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF>
39. Treviño-Rangel R, González-González J, Garza-González E, González M. *Cándida parapsilosis*, una amenaza desafiante. Revista EL SEVIER, Medicina Universitaria 2012;14(56):157-165
40. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, Rinaldi M, Barton R, Veselov A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. Revista Journal of Clinical Microbiology Febrero de 2008; 46 (2): 515-521 [online] <https://jcm.asm.org/content/46/2/515>
41. Bial-Arístegu, *Microsporum canis*. Revista Iberoamericana de Micología 2002.[online] <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/033.PDF>
42. Molina A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. Revista EL SEVIER Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2011;29(Supl 3):33-39 [online] <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2009-micologia.pdf>
43. Sandoval NJ, Arenas R, Giusiano G, García D, Chávez L, Zúniga P. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE DERMATOFITOSIS Y PITIRIASIS VERSICOLOR. Revista Médica de Honduras. Vol. 80, No. 2, 2012 [online] <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2012/pdf/Vol80-2-2012-8.pdf>
44. Cantón R, García JE, Gómez L, Martínez L, Rodríguez C, Vila, J, García J.A Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.  
Editor Picazo J J. 2000 <http://www.seimc.org>

45. Romero A, Escalada JP , Bregliani M y Pajares A. Instituto de Tecnología Aplicada (ITA), Santa Cruz b) Facultad de Ingeniería - UNPSJB, Chubut Utilización de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para determinar consumo de sustrato. 2016 [online] [Downloads/Dialnet-UtilizacionDeCromatografiaLiquidaDeAltaEficienciaH-5619081%20\(2\).pdf](Downloads/Dialnet-UtilizacionDeCromatografiaLiquidaDeAltaEficienciaH-5619081%20(2).pdf)
46. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020. FAO, 2016. Recuperado el 18 Agosto de 2019. En: <http://www.fao.org/documents/card/es/c/64f1df17-6e85-4e94-84dc-ba9f14efcc45/>
47. Organización Mundial de la Salud OMS. Estrategia Mundial para contener la Resistencia a los antimicrobianos. Suiza. 2001. Recuperado el 20 de mayo de 2019, de [http://www.antibioticos.mscbs.gob.es/PDF/resist\\_OMS\\_estrategia\\_mundial\\_contra\\_resistencias.pdf](http://www.antibioticos.mscbs.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf)
48. Informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos 30 de abril 2014 [online] <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
49. Roca W. Tendencias en el desarrollo de capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina. Informe preparado para la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) y la Corporación Andina de Fomento (CAF). 2004. 66-98

50. Organización Mundial de la Salud OMS. Estrategia Mundial para contener la Resistencia a los antimicrobianos. Documento. En: <http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf> Consultado el 10 de marzo de 2018.
51. Duarte., O, Velho, L. La bioprospección como mecanismo de cooperación para la construcción de capacidades endógenas en ciencia y tecnología y análisis de las capacidades de Colombia para adelantar procesos de Bioprospección. VI Jornadas Latinoamericanas de Estudios Sociales de la Ciencia y la Tecnología – *ESOCITE*. 2006. 1-26.
52. Lagoudakis C.H., Savolainenb V., Williamsond E. M., Steven F. F., Wagstaffe J., Baralf S.R., Watsong M. F., Pendryg C. A., Hawkinsa J. A. Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting. *PNAS*. 2012. Vol 109: 15835–15840
53. Rojas N, Avellaneda S, Cuellar A. Plantas utilizadas en la medicina tradicional en Tierra Caliente, Guerrero, México para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 2010. Vol 2:124-136.
54. Yong AL., Ooh KF., Ong HC., Chai T & Wong FC. Investigation of antibacterial mechanism and identification of bacterial protein targets mediated by antibacterial medicinal plant extracts. *Food Chemistry* 2015. 186: 32–36
55. Uriel Fernando Carreño Sayago. Diseño y evaluación de un biosistema de tratamiento a escala piloto de aguas de curtiembres a través de la *Eichhornia crassipes* Rev. colomb. biotecnol vol.18 no.2 Bogotá July/Dec. 2016
56. León R, Pernía B, Sigüencia R, Franco S, Noboa A, Cornejo X. Potencial de plantas acuáticas para la remoción de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas servidas Enfoque UTE vol.9 n.4 Quito Oct. /Dec. 2018

57. Elvir JR, Efecto del Etanol sobre las Membranas Biológicas Revista Médica Hondureña - vol. 61 -1993 [online] <http://cidbimena.desastres.hn/RMH/pdf/1993/pdf/Vol61-1-1993-4.pdf>
58. Bres P., Crespo D., Rizzo P. y Rossa R. Capacidad de las macrofitas *Lemna minor* y *Eichhornia crassipes* para eliminar el níquel. 2012. RIA. Vol. 38 /N.º 2.
59. Tchinda C, Voukeng I, Beng V, Kuete. Antibacterial activities of the metanol extracts of *Albizia adianthifoli*, *Alchornea Laxiflora*, *Laportea ovalifolia* and three other Cameroonian plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. 2016. Saudi Journal of Biological Sciences. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X16000358?via%3Dihub>
60. Hasanshahian M, Khosravi F. Study the anti-microbial effects of *Artemisia santonica* extract on some pathogenic bacteria. 2015. Advanced herbal Medicine Vol 1(4): 43-46.
61. DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES MEDIANTE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC) A PARTIR DEL EXTRACTO POLAR ACIDO DE *Euphorbia laurifolia* juss ex lam Y SU ACTIVIDAD TÓXICA tesis de grado [online]. 2018. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6280/QUchchjd.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
62. Edmundo A. Venegas Casanova, Arnold M., Gómez Alva, Armando N., Chávez León & Juan E., Valdiviezo Campos Mily Ormeño Llanos & Edison Vásquez Corales. Evaluación fitoquímica preliminar del extracto metanólico y etanólico de las flores de *Cordia lutea* Lam. (Boraginaceae) y su capacidad antioxidante. 2019. Arnaldoa Vol 26 (1).

## 11. ANEXOS

**Anexo 1.** Proceso de extracción de los extractos de las plantas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*

### RECOLECCION DE MATERIAL VEGETAL

Las plantas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*, se recolectaron en canales anexos del humedal tierra blanca (figura 2, 3), el cual se encuentra localizado al nororiente del casco urbano del municipio de Soacha. La recolección la realizaron los estudiantes del grupo de investigación CEPARIUM, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.



**Figura 2.** Canales anexos al humedal Tierra blanca (*Eichhornnia crassipes*)

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura3.** Canales anexos al humedal tierra blanca (*Lemna gibba*)

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

### **Aspectos importantes en la recolección de las muestras**

Los aspectos tenidos en cuenta para la recolección de las muestras fueron los siguientes: ausencia de sintomatología de invasión de hongos o bacterias, ausencias de manchas o cortes superficiales, ausencias de elementos extraños en raíz, tallo u hoja.

### **Transporte de las muestras.**

Las muestras fueron transportadas en bolsas plásticas, debidamente rotuladas y puestas a su vez en recipientes de icopor.

### **Procesamientos del material vegetal**

#### **Separación y lavado del material vegetal.**

Para el procesamiento de la muestra de *Eichhornia crassipes* o Buchón de agua, fue necesario separar sus partes en: raíz, tallo y hojas, (figura 5, 6, 7) su lavado se realizó de esta misma forma, se procesaron y se evaluó su actividad antimicrobiana por separado. Por otra parte, la lenteja de agua (*Lemna gibba*) no se separó debido a su tamaño. (Figura 4)



**Figura 4.** Proceso de lavado y separación de (*Lemna gibba*)

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura 5.** Proceso de lavado y separación de Hojas de *Eichhornia crassipes*

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura 6.** Proceso de lavado y separación de Tallo de *Eichhornia crassipes*.

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura 7.** Proceso de lavado y separación de Raíz de *Eichhornia crassipes*

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

### **Secado de las muestras.**

Las muestras se envolvieron en papel kraft por separado y se dejaron en invernadero a una temperatura promedio de 27°C, durante 15 días. (Figura 8)



**Figura 8.** Secado y almacenamiento de muestra.

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

### **Almacenamiento de las muestras**

Las muestras fueron almacenadas en bolsas de papel, debidamente marcadas hasta su procesamiento. (Figura 8)

### **Obtención de los extractos**

Para la obtención de los extractos del material vegetal se realizó el siguiente procedimiento.

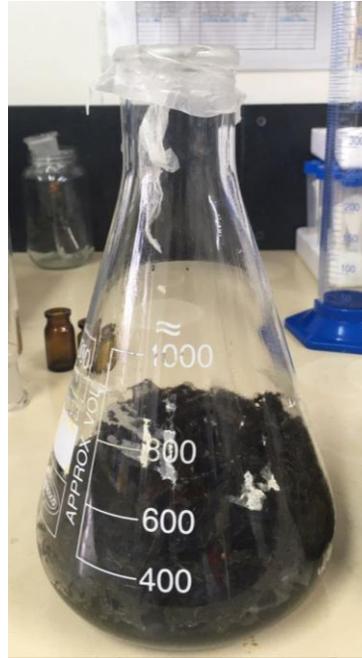
Seguido a la limpieza y secado del materia vegetal, se procedió a reducir su tamaño, cortando todas la muestras por separado en trozos pequeños de aproximadamente 0,5 cm.

Se pesó en gramos el material obtenido (Tabla 2) y se depositó en los frascos dispuestos para la extracción. (Figura 9, 10, 11, 12)

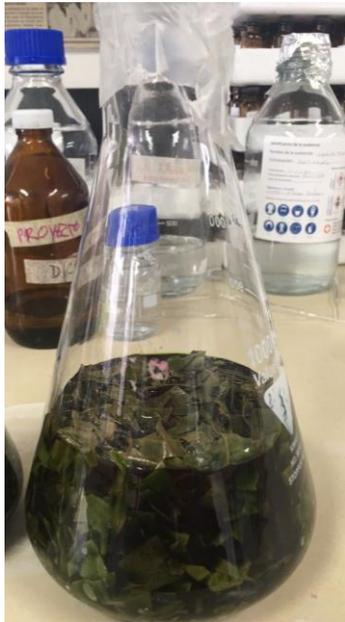
Se adiciono el solvente, en este caso se utilizó Diclorometano, hasta cubrir completamente el material vegetal dentro del recipiente. Se tapó y se dejó reposar durante 24 horas.



**Figura 9.** *Lemna gibba*  
**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura 10.** Raíz de *Eichhornia crassipes*  
**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

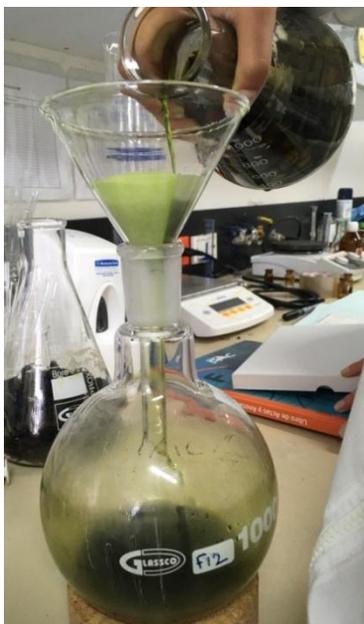


**Figura 11.** Hojas de *Eichhornia crassipes*  
**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura 12.** Tallo de *Eichhornia crassipes*  
**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

A las 24 horas de reposo, se filtró el material vegetal, dándole paso por un papel filtro. (Figura 13) Se recuperó el solvente con ayuda de un rota evaporador. Este proceso se repitió 3 veces. (Figura 14, 15)



**Figura 13.** Proceso de Filtrado del extracto obtenido con Dicloromentano  
**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura 14.** Balones listos para pasar por el rotaevaporador

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura 15.** Proceso de Rota evaporación

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

El producto final se pesó (Tabla 3), se envaso en viales ámbar (Figura16), y se almacenó en refrigeración.



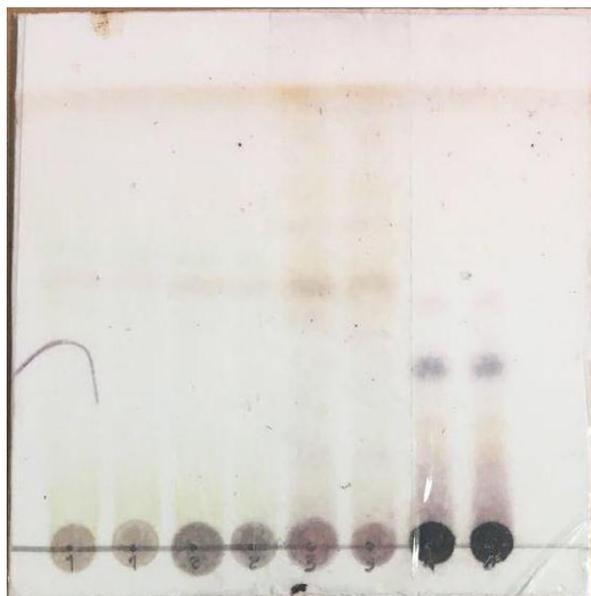
**Figura 16.** Viales ambar con extracto.

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

Se procede a realizar cromatografía en capa fina para determinar el tipo de polaridad que tienen cada extracto obtenido, para realizar la cromatografía se

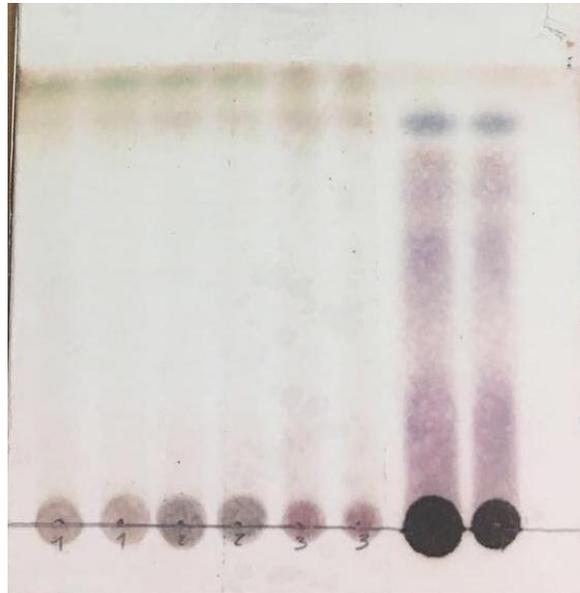
usan dos tipos de solventes con diferente polaridad cada uno, Acetato de etilo con un índice de polaridad de 4.4 lo cual lo hace un compuesto polar y Hexano con un índice de polaridad de 0.1 lo cual lo hace un compuesto apolar.

Se realizan dos cromatografías en capa fina con diferentes tipos de concentraciones de cada solvente para garantizar que allí aparezcan los compuestos polares y apolares, en la primera cromatografía se mezcla Hexano + Acetato de etilo 8:2 en 10 ml lo cual quiere decir que ponemos 8 ml de Hexano y 2ml de Acetato de etilo, (Figura 17) y en la segunda cromatografía se mezclan los mismos componentes pero con diferente concentración en este caso sería 1:1 en 10 ml (Figura 18) lo cual quiere decir que se agregó 5ml de Hexano y 5ml de Acetato de etilo, en las dos cromatografías se realiza por duplicado cada muestra es decir dos puntos de *Lemna gibba* siendo la muestra 1, dos de tallo de *Eichhornia crassipes* siendo la muestra 2, dos de raíz de *Eichhornia crassipes* siendo la muestra 3 y dos de hoja de *Eichhornia crassipes* siendo la muestra 4.



**Figura 17.** Cromatografía 8:2, donde se evidencian los compuestos apolares.

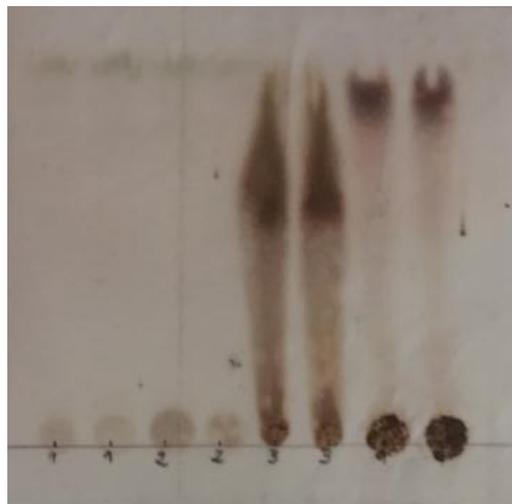
**Fuente:** Hurtado y Muñoz.



**Figura 18.** Cromatografía 1:1, donde se evidencian más los compuestos polares.

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

Posterior a estas cromatografías se tomó la decisión de realizar una tercera cromatografía en Acetato de etilo al 100% (Figura 19) para ver mejor la totalidad de compuestos polares, en esta cromatografía se tuvo en cuenta el mismo patrón de muestras.



**Figura 19.** Cromatografía 100% en Acetato de etilo.

**Fuente:** Hurtado y Muñoz.

Se evidencia la totalidad de compuestos polares como la raíz de *Eichhornia crassipes* y la hoja de *Eichhornia crassipes*.

Los pesos finales se relacionan en la tabla a continuación.

<b>MATERIAL VEGETAL</b>	<b>PESO SECO</b>
Hoja de <i>Eichhornia crassipes</i>	38.66g
Tallo de <i>Eichhornia crassipes</i>	53.66g
Raíz de <i>Eichhornia crassipes</i>	89.17g
<i>Lemna gibba</i>	21.18g

**Tabla 2.** Peso seco final del material vegetal

<b>MATERIAL VEGETAL</b>	<b>PESO FINAL DEL EXTRACTO.</b>
Hoja de <i>Eichhornia crassipes</i>	1.597g
Tallo de <i>Eichhornia crassipes</i>	1.490g
Raíz de <i>Eichhornia crassipes</i>	1.446g
<i>Lemna gibba</i>	3.283g

**Tabla 3.** Peso de extracto de cada material vegetal