



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

**Presentado por:**

**LAURA GERALDINE DAZA RUIZ  
YASUNARI LISSETH SALINAS TABERA  
JESSICA PAOLA ROA MEZA**

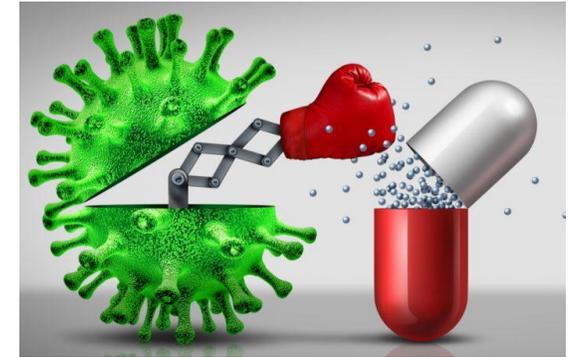
**LIGIA CONSUELO SANCHEZ LEAL MS.c  
Asesora**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ, D.C., 2019**

# Introducción



Resistencia  
microbiana



<https://galeria.dibujos.net/fiestas/navidad/planeta-tierra-1-pintado-por-planetita-8431800.html>

<https://guiadafarmacia.com.br/cinco-fatos-sobre-resistencia-bacteriana-aos-antibioticos/>

*Eichhornia crassipes*  
*Lemna gibba*

Amenaza para la  
humanidad

Plantas con potencial  
antimicrobiano

Nuevas alternativas



<http://noticias-ambientales-internacionales.blogspot.com/2016/07/11-paises-se-disputan-recursos.html>

<http://agronomosudg.com/wp-content/uploads/2018/08/Mejoramiento-Genetico-y-Biotecnologico-min-300x203.png>

# Marco teórico

## *Eichhornia crassipes*



<https://www.ecogestos.com/el-jacinto-de-agua-una-especie-invasora-en-aguas-espanolas/>

Originaria de agua dulce de América del Sur, en las cuencas Amazónica, y del Plata



## *Lemna gibba*

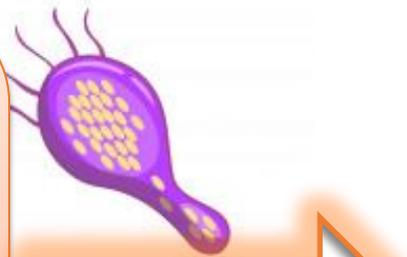
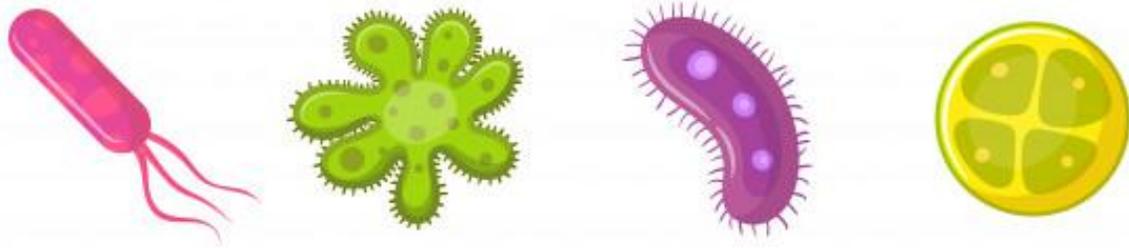


<https://www.pinterest.fr/pin/299630181439092802/>

Tiene distribución universal, se ha encontrado en hemisferios norte y sur, incluyendo América, Europa, Asia, Australia y Nueva Zelanda

# Marco teórico

## Microorganismos patógenos de importancia clínica



### MICROORGANISMOS

*S. aureus*

*B. subtilis*

*E. faecalis*

*E. faecium*

*L. monocytogenes*

*K. pneumoniae (clínica)*

*E. coli ATCC*

*E. coli nativa (I. urinaria)*

*Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter sp*

*K. pneumoniae (s. salud)*

*S. epidermidis*

*C. glabrata*

*C. krusei*

*C. albicans*

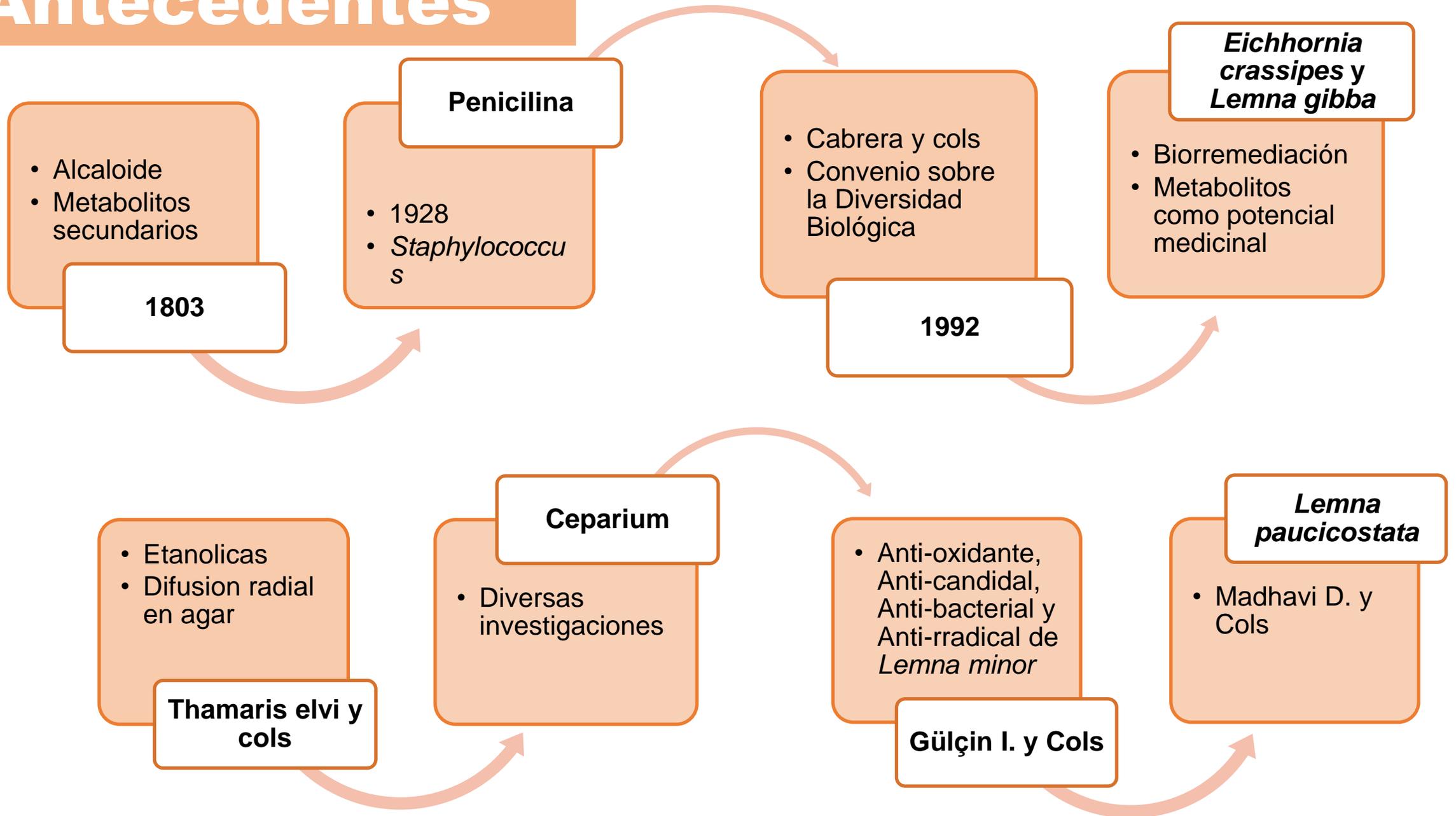
*C. parapsilosis*

*M. canis*

*T. mentagrophytes*

*M. gypseum*

# Antecedentes



# 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 específicos

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

# Metodología

- Recolección del material vegetal



Canales anexos al humedal tierra blanca (*Eichorniacrassipes*) Fuente Hurtado y Muñoz 2018

- Tratamiento del material vegetal



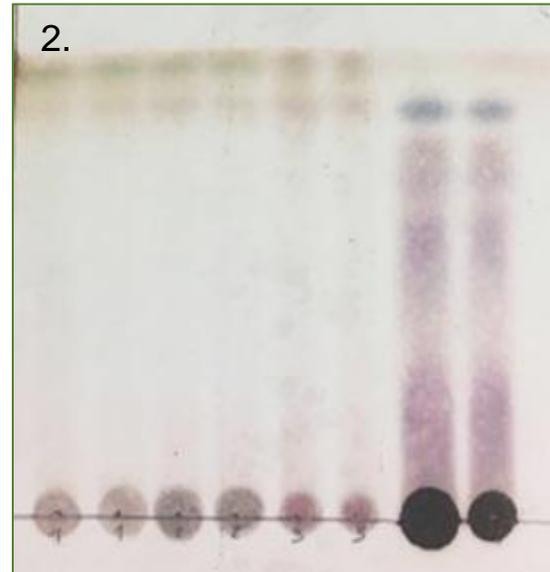
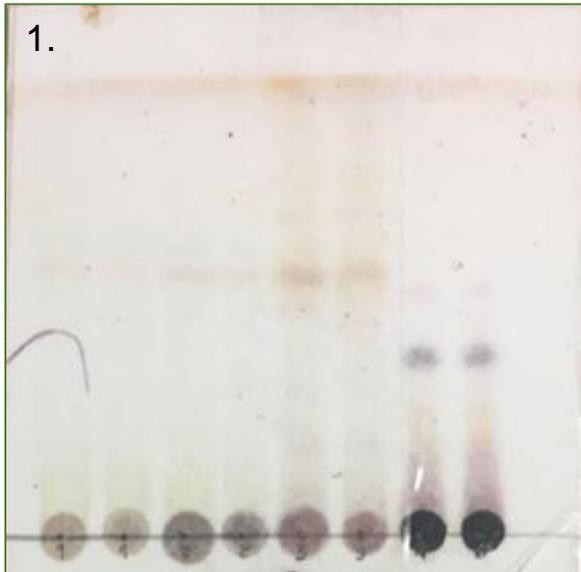
Fuente Hurtado y Muñoz 2018

# Metodología

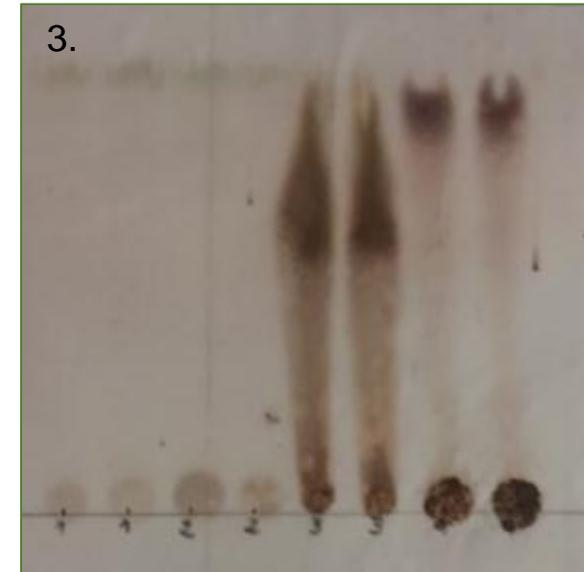
- Cromatografía capa fina

Acetato de etilo

Hexano



Fuente Hurtado y Muñoz 2018





<http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/halos-de-inhibicion.html>

# Difusión radial en agar

## Actividad antibacteriana

### Control negativo:

sensidiscos con acetato de etilo y etanol

### Control positivo:

Norfloxacin, Tobramicina, Cloramfenicol, Cefaclor, para las bacterias Gram negativas y para las Gram positivas

Ampicilina, Norfloxacin, Eritromicina, Penicilina y BCDO

### Procedimiento

Sensidiscos impregnados con 30  $\mu$ l de cada extracto

Se colocaron en agar Mueller Hinton, previamente inoculado con una suspensión bacteriana.

## Actividad antifúngica

### Control negativo:

sensidiscos impregnados Acetato de etilo y Etanol.

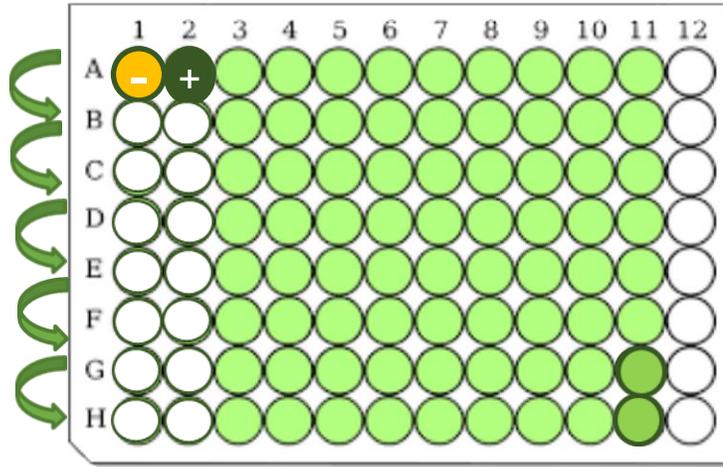
### Control Positivo:

Farzul (fluconazol) y ketoconazol.

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

# Concentración mínima inhibitoria

procedimiento



<https://publicdomainvectors.org/es/vectoriales-gratuitas/96-microplate-pozo-vector-de-la-imagen/26102.html>

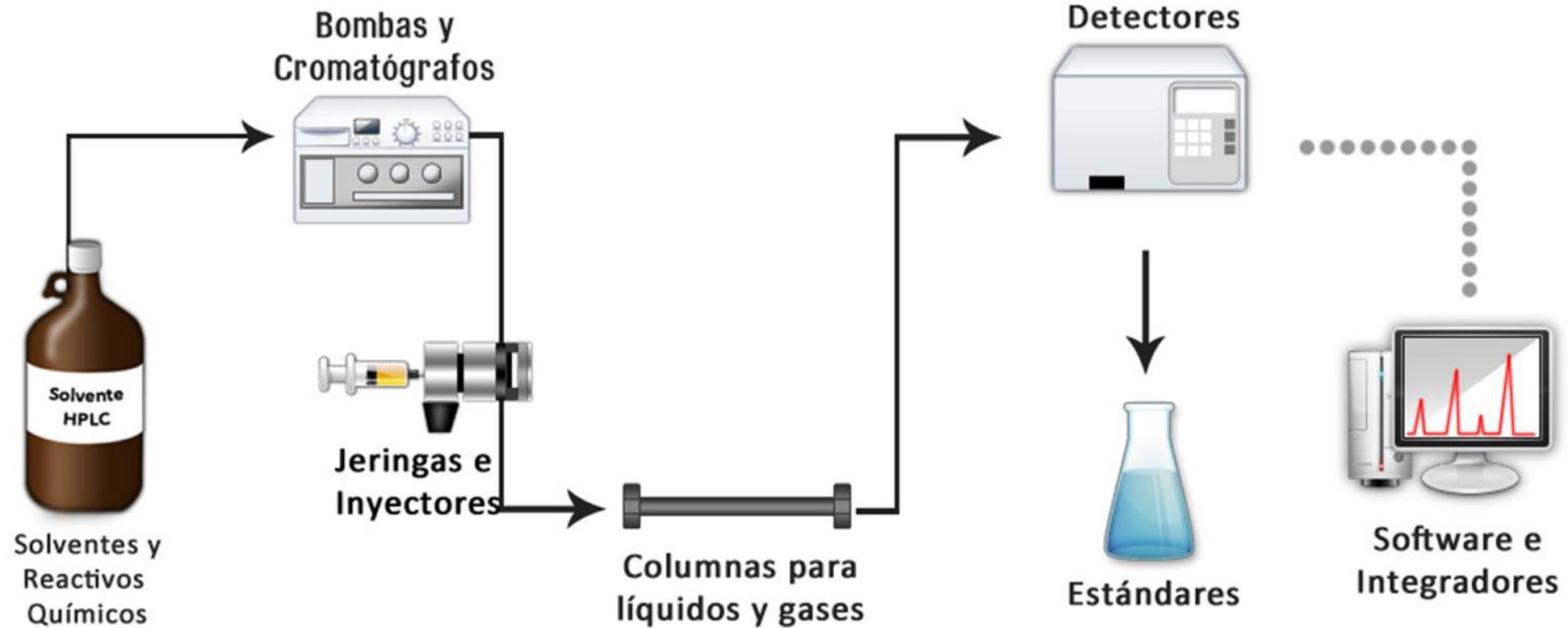
Primera columna, se agregó el control negativo

Segunda columna con control positivo

Tercera columna con los extractos y caldo Mueller Hinton, y se realizaron diluciones 1:2 hasta la columna 11 de cada extracto.

# Metodología

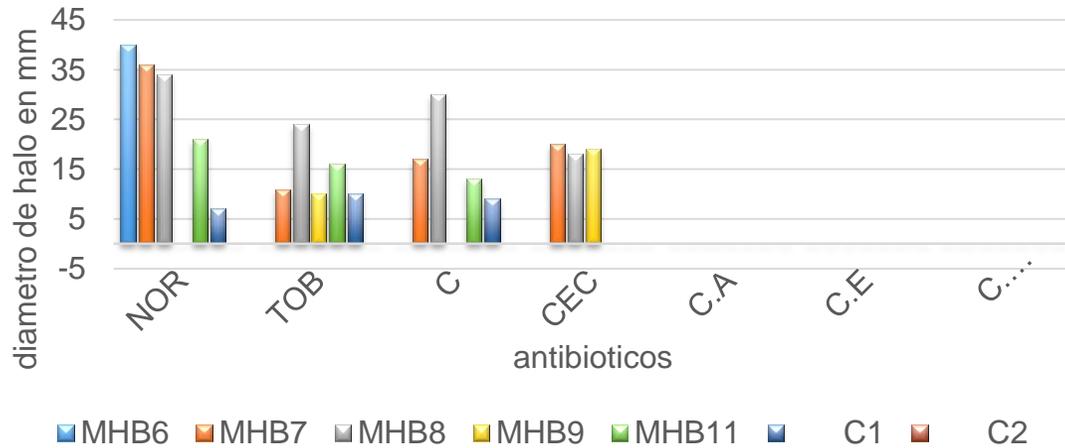
- IDENTIFICACION METABOLITOS OBTENIDOS DE EXTRACTOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA DENSIDAD HPLC





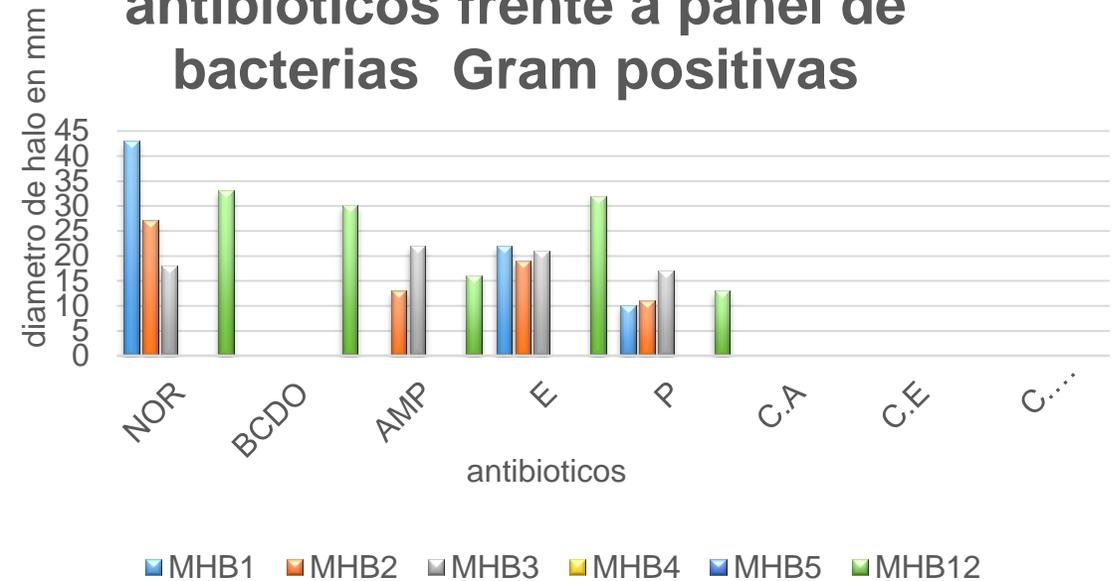
# Resultados y discusión

## Halos de inhibición de antibióticos frente a bacterias Gram negativas



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

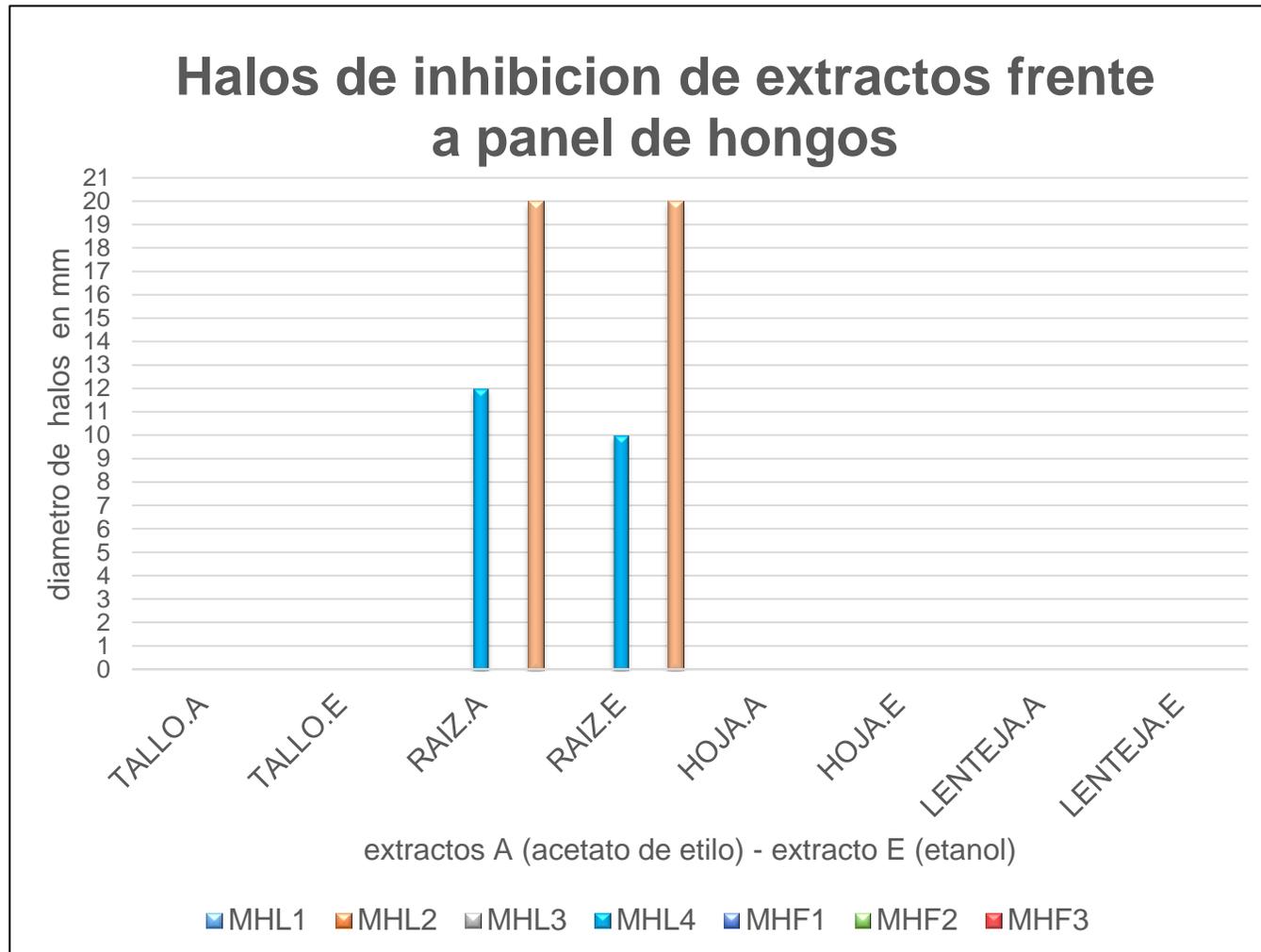
## Halos de inhibición de antibióticos frente a panel de bacterias Gram positivas



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

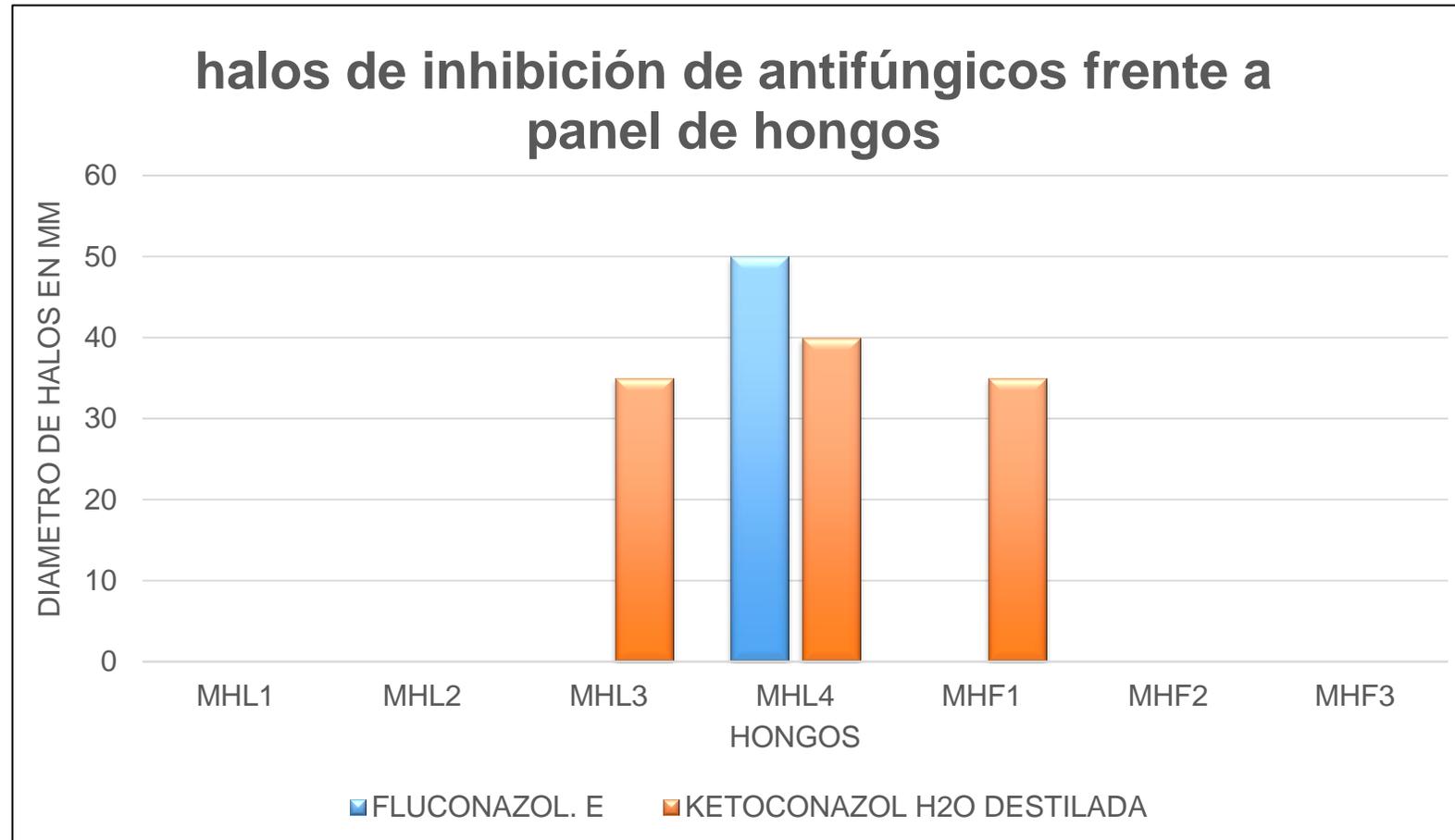
# Resultados y discusión

- Bioensayos en difusión radial agar de extractos frente a panel de hongos



Mohamed y colaboradores en 2019 encontraron actividad antifúngica de los extractos de *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* para los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti* corroborando de esta forma la efectividad como antifúngico de estos extractos.

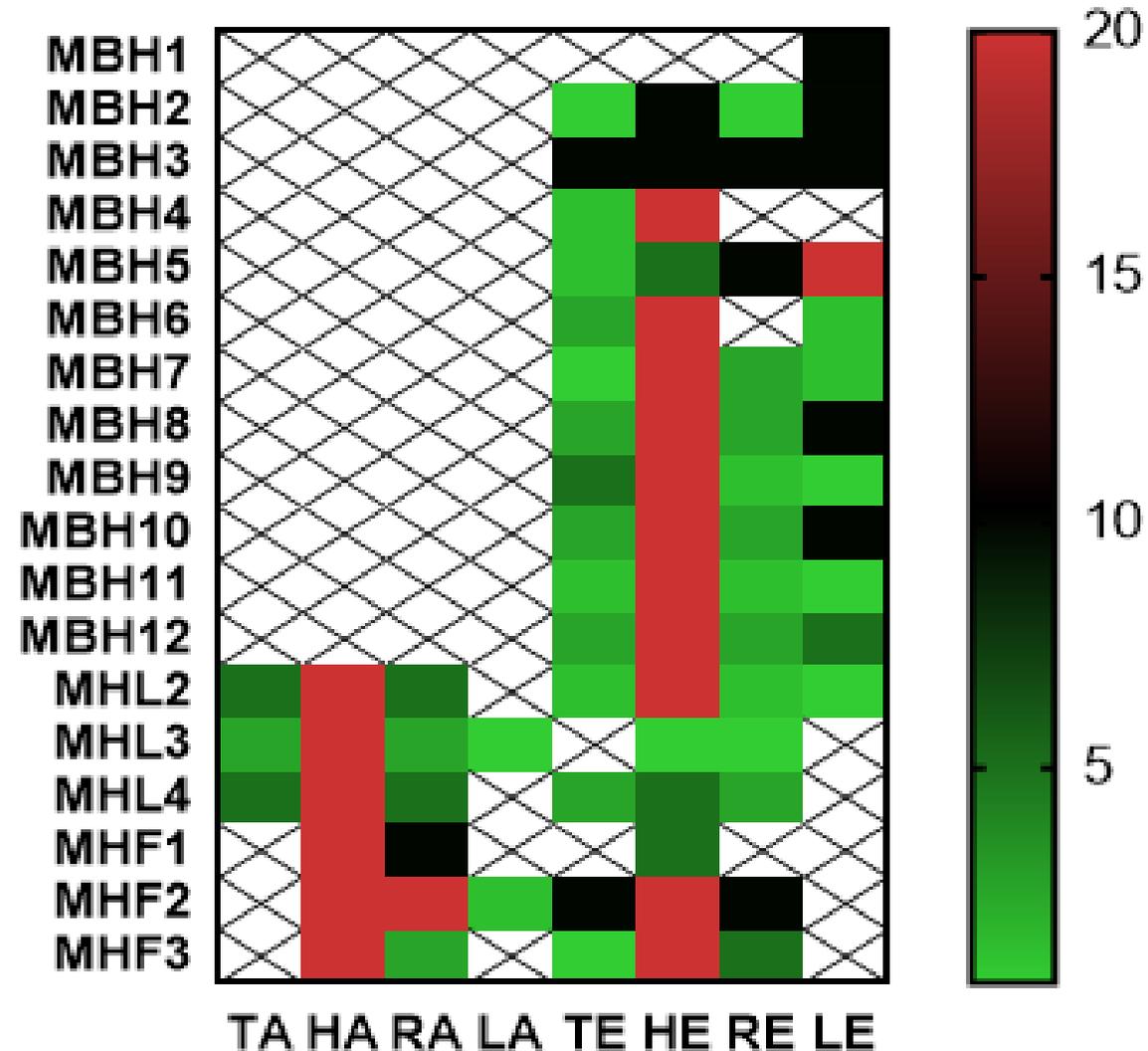
# Resultados y discusión



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

- Bioensayos por CMI con extractos frente a panel de microorganismos patógenos

## Resultados y discusión



# Resultados y discusión

- HPLC de extracto de Lenteja (*Lemna gibba*)

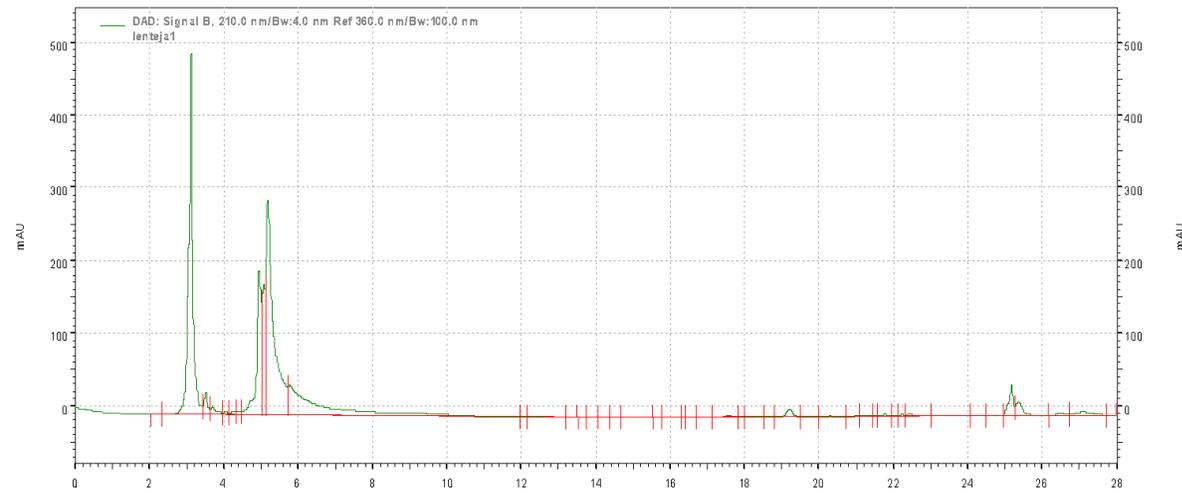


Figura 51. Muestra 1: Extracto de Lenteja (*Lemna gibba*) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm

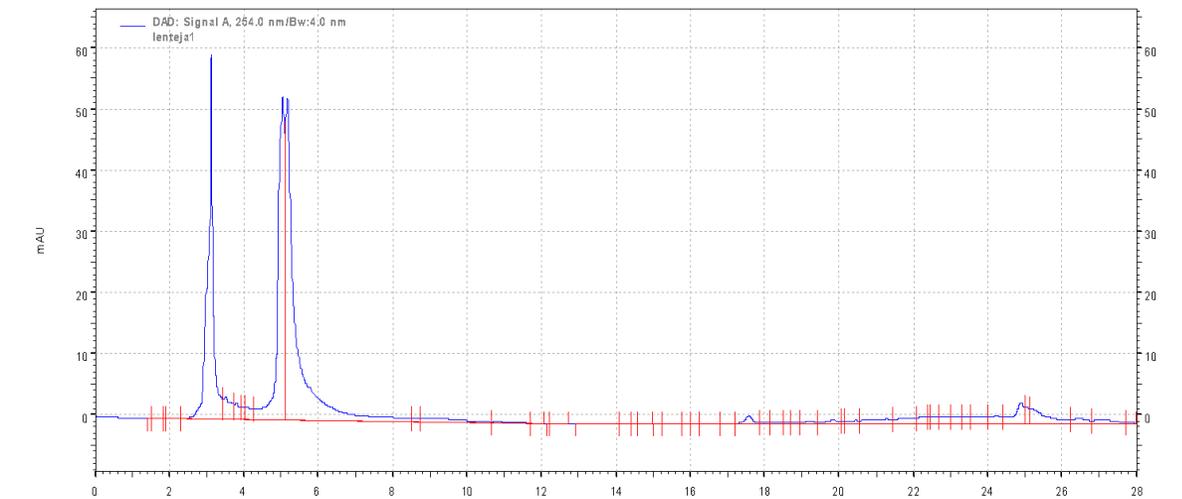


Figura 52. Muestra 1: Extracto de Lenteja (*Lemna gibba*) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm

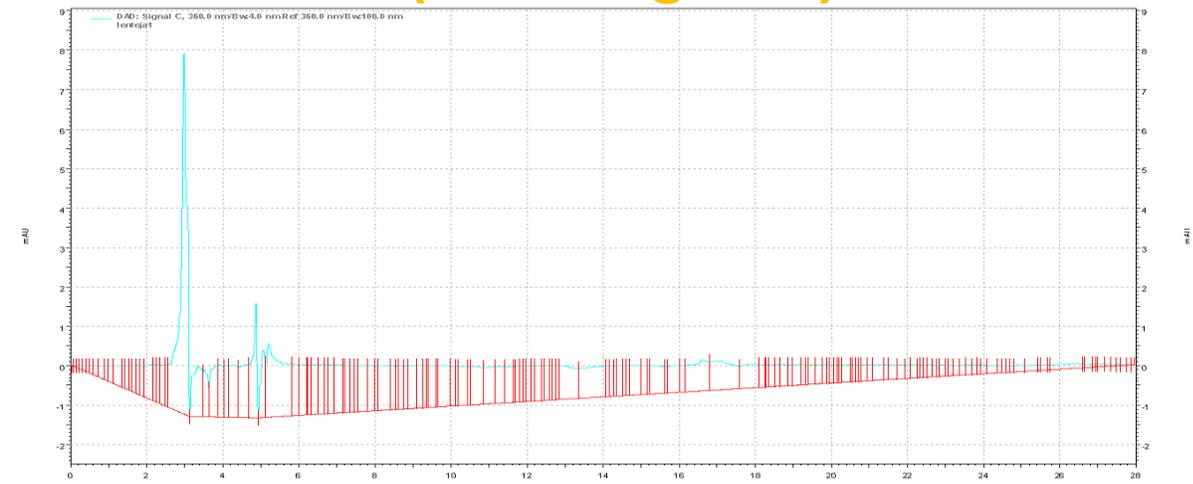
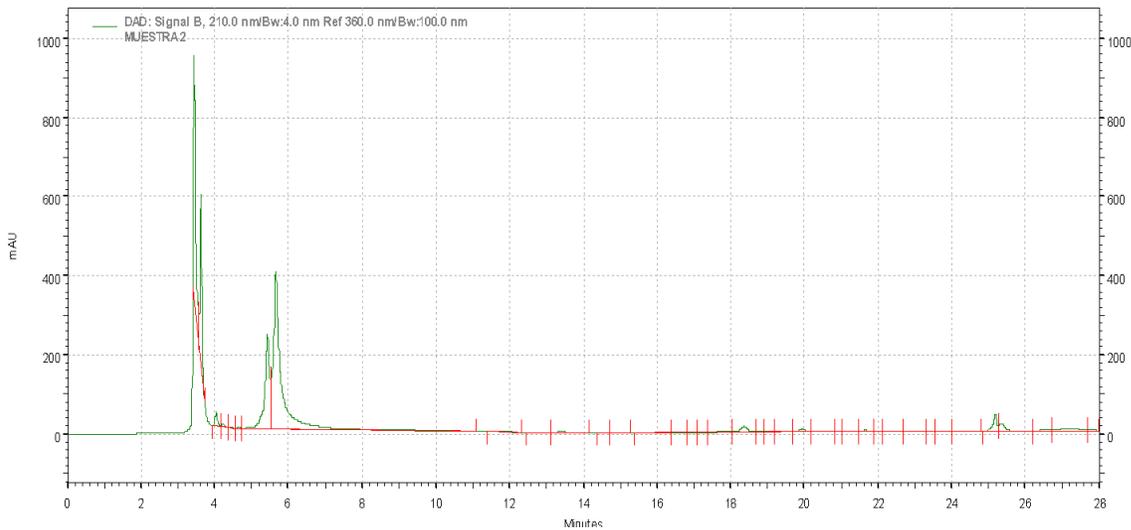


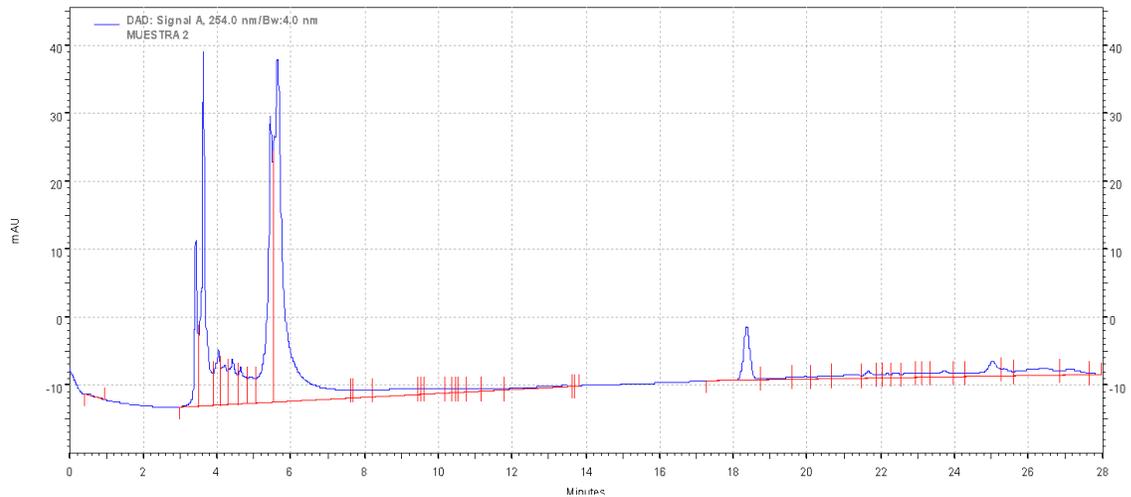
Figura 53. Muestra 1: Extracto de Lenteja (*Lemna gibba*) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm

Según Venegas Casanova y colaboradores encontraron en el estudio 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

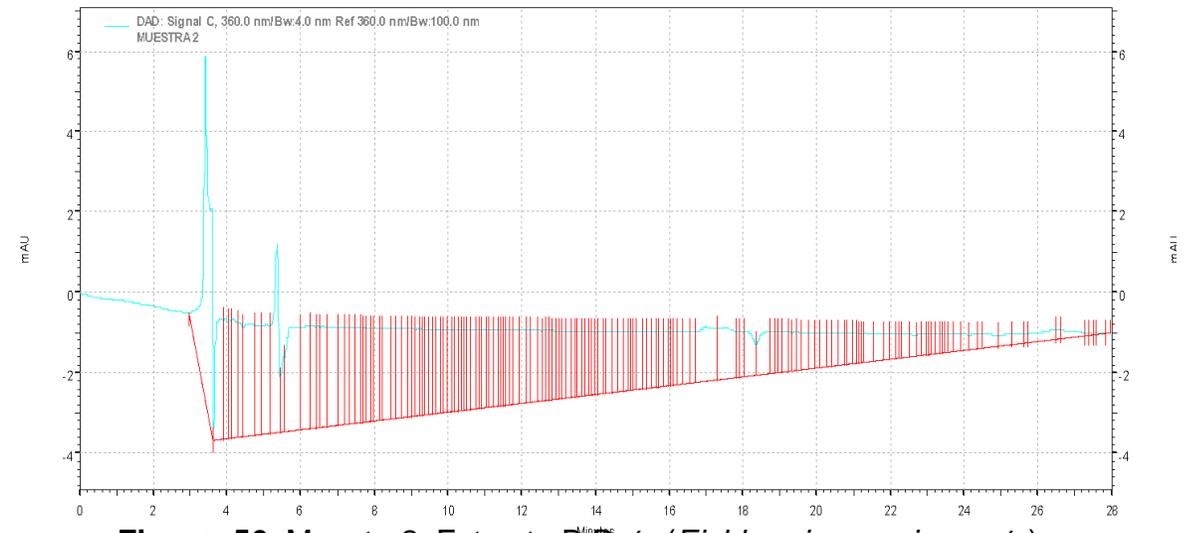
# Resultados y discusión



**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

- HPLC de extracto de Raíz (*Eichhornia crassipes* raíz)

# Resultados y discusión

- HPLC de extracto de Hoja (*Eichhornia crassipes* hoja)

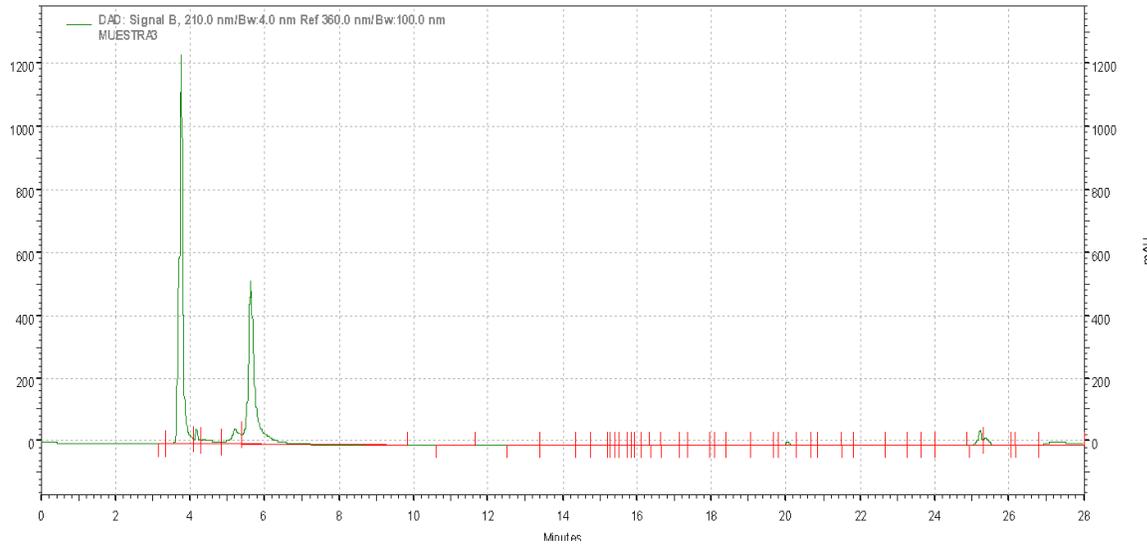


Figura 57. Muestra3: Extracto B Hoja (*Eichhornia crassipes* hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 210 nm

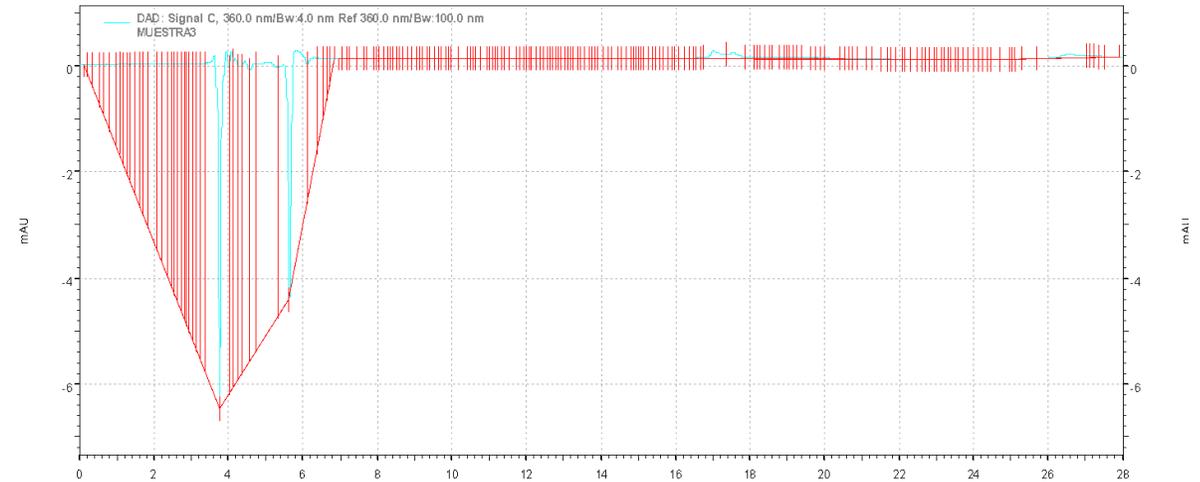


Figura 59. Muestra3: Extracto B Hoja (*Eichhornia crassipes* hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 360 nm

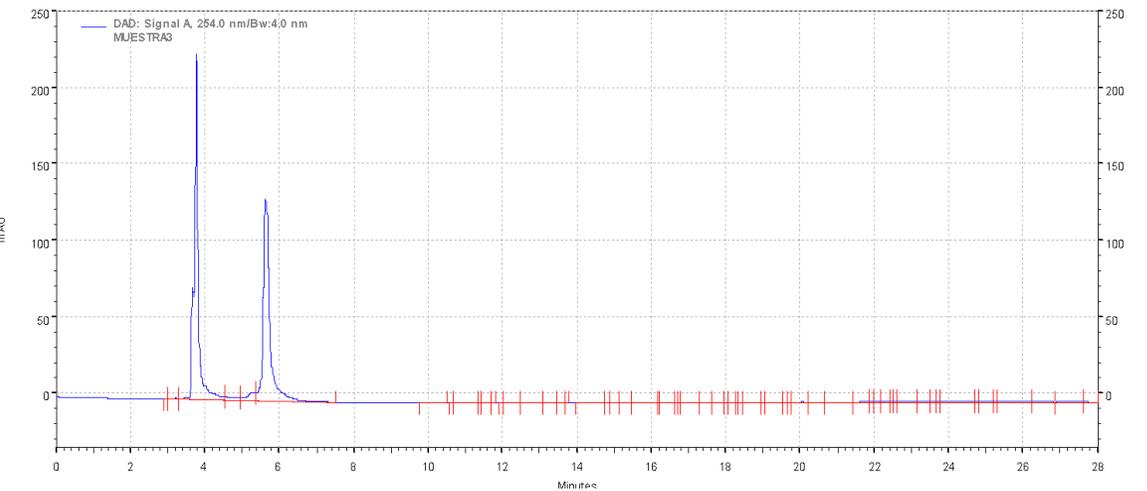
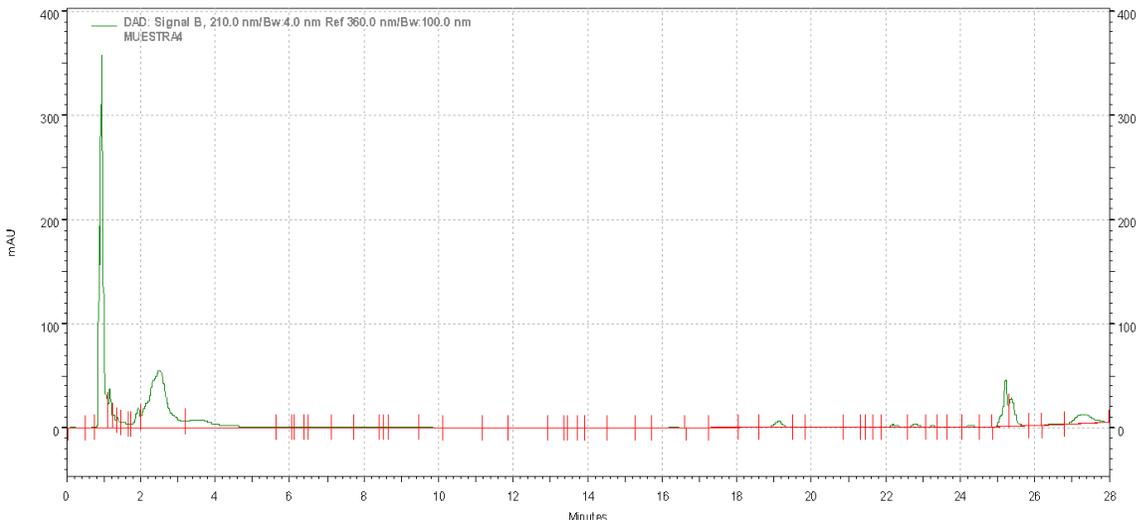


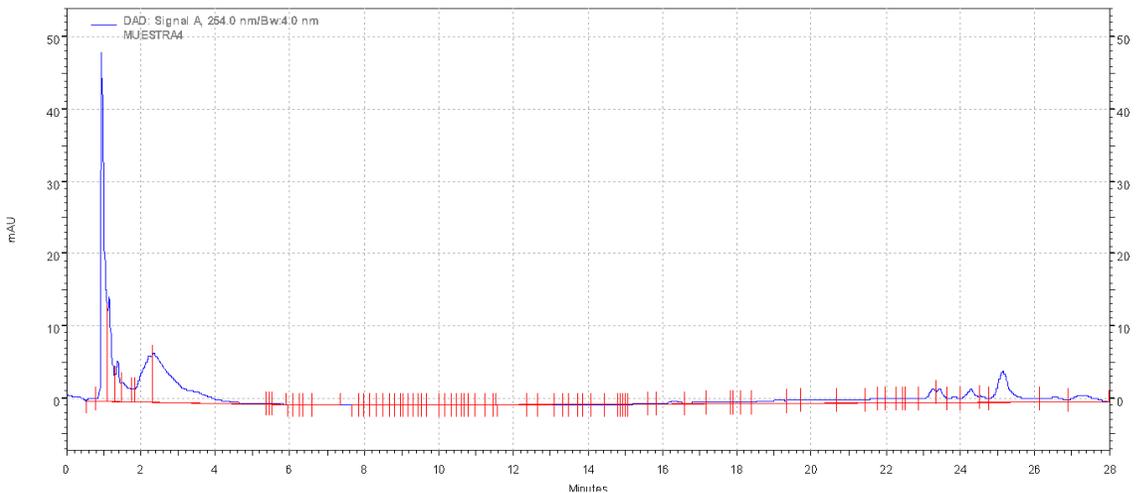
Figura 58. Muestra3: Extracto B Hoja (*Eichhornia crassipes* hoja) en espectrofotometría ultravioleta-visible UV - VIS 254 nm

Chávez en el 2018 en su estudios muestra que hay mayor actividad en el espectro, con los extractos que se hacen por la técnica de ultrasonido usando metanol como solvente permitiendo observar diferentes picos en las graficas

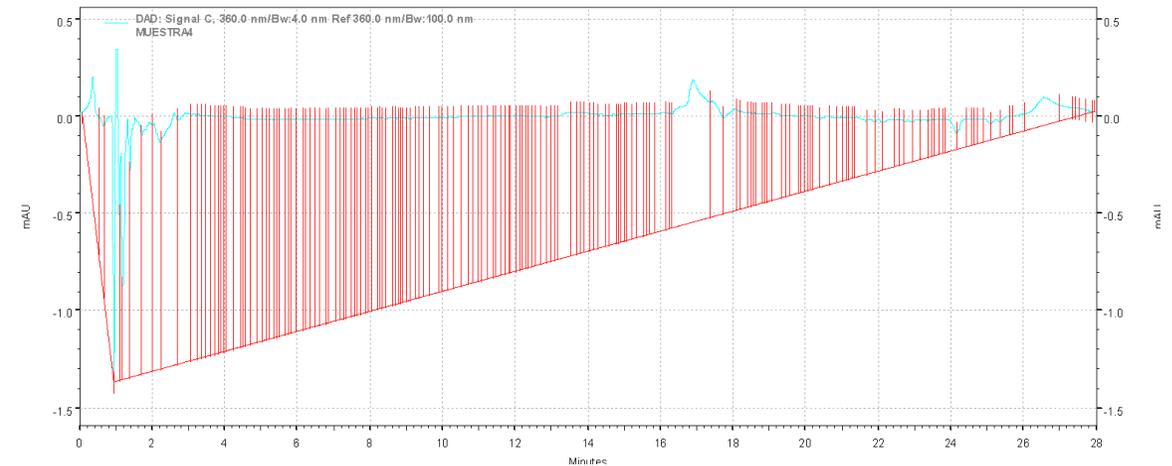
# Resultados y discusión



**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

- HPLC de extracto de Tallo (*Eichhornia crassipes* tallo)

# 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, presento 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.

# Recomendaciones



**Para próximos bioensayos en microplaca por concentración mínima inhibitoria (CMI), se debe considerar hacer el experimento en tubos 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, deben tener en cuenta las características del extracto y complementar con una Resonancia Magnética Nuclear para confirmar los posibles compuestos que están realizando la inhibición.**

# Agradecimientos



**M.Sc. Ligia Consuelo  
Sánchez Leal**



Universidad de  
**La Sabana**

**PhD. Edison Tello Camacho**