

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Eichhornia crassipes* Y *Lemna gibba* FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS EN ANIMALES DE PRODUCCIÓN

MARÍA ALEJANDRA CAVIEDES CARDOZO

DANIELA CRUZ GARCÍA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

NEONATURE-CEPARIUM



INTRODUCCIÓN

las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en animales

Alta tasa de resistencia de patógenos microbianos

Fitoquímicos y metabolitos antimicrobiano con propiedades protectoras o preventivas de enfermedades

falta una reglamentación oficial que determine los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal

poco conocimiento sobre el uso de las plantas macrofitas



Fuente: Autoras, 2017

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de las plantas Buchón de agua *Eichhornia crassipes* y Lenteja de agua *Lemna gibba* frente a bacterias patógenas de importancia en animales de producción.

Objetivos específicos

Establecer el protocolo para la obtención de extractos orgánicos en las plantas macrófitas (*Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*).

Comparar la actividad antibacteriana de los extractos frente a los patógenos aislados.

ANTECEDENTES

Residuos de fármacos,
Lozano, Arias, 2008

Actividad antibacteriana Gülçin y
colaboradores, turkya, 2010

Extractos organicos, rodriguez, zarate,
sanchez, Colombia, 2017

Efectos de *Eichhornia
crassipes*, Shanap y
colaboradores, India, 2010

Estudios fitoquimicos, Thamaraiselvi,
Jayanthi, india 2012



Fotografías tomadas por las autoras, 2017

METODOLOGÍA

Materiales y métodos

Obtención de extractos vegetales

Elaboración del protocolo para la obtención de extractos orgánicos en las plantas macrófitas (*Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*)

Conservación de cepas ATCC

Actividad antibacteriana



Recolección y clasificación del material vegetal

Recolección de las muestras (Vereda chicaque, laguna seca), material vegetal que no presente, manchas, quemaduras, signos de infección en hojas, tallo, raíz y flores.

Identificación de la especie por medio de sus características morfológicas, según la descripción botánica. Las muestras se conservaron en refrigeración hasta la preparación de extractos.

Transporte en bolsas negras, con nivel de humedad adecuado, conservando lo mejor posible las muestras.

METODOLOGÍA

Secado y fragmentación

Lavado a chorro 1. Secado en horno a una temperatura entre 45 - 50 °C (Muestra 1) 2. Secado a través de una prensa biológica (Muestra 2). 3. Secado en invernadero (Muestra 3): Secada en horno (muestra 2 a) y la otra a temperatura ambiente (Muestra 2 b)



Fuente: Autoras, 2017

Preparación y alistamiento de los extractos

236 g de hojas secas, 200 g de tallos, 439g de raíz, referente al Buchón de agua y 78 g de Lenteja de agua. Solvente CH₄O: CH₂Cl₂ 1:1. Extracción por Método Soxhlet. Rotaevaporadores equipos EYELA y Heidolph a 71 mbar, 134 rpm y 35.2°C.

Elaboración de protocolo para la obtención de extractos orgánicos en las plantas macrófitas (*Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*)

METODOLOGÍA



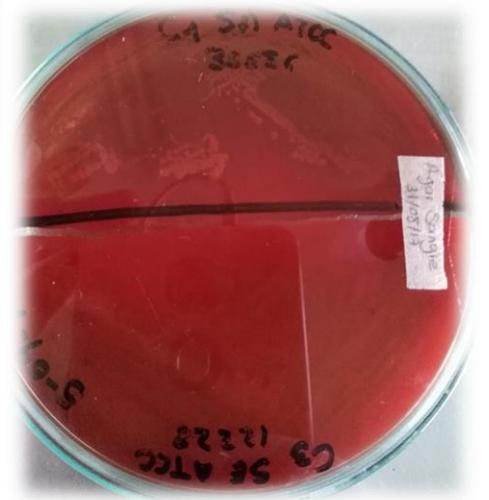
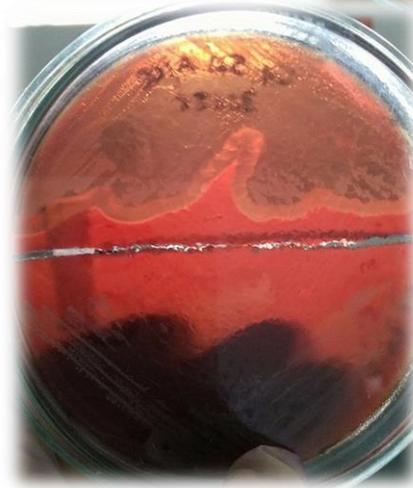
Conservación de cepas ATCC



Donadas y escogidas teniendo en cuenta que son de origen animal y patógenos en animales de producción. También se incluyeron cepas control ATCC.



Se realizaron 10 viales por cepa en BHI , adicionando glicerol al 10%, y congelando los viales a -80°C.



Fotografías tomadas por las autoras, 2017

PANEL DE CEPAS

CÓDIGO	BACTERIA	PROCEDENCIA (ANIMAL)	LUGAR DE PROCEDENCIA
REC 581-H	E. Coli	AVIAR	INCUBACOL
MC2	E. coli K88	PORCINO	CEPARIUM U.C.M.C
ME3	Salmonella spp	EQUINO	CEPARIUM U.C.M.C
MB4	Staphylococcus aureus	BOVINO	MUESTRA DIRECTA
C1	S. aureus 35556	CONTROL ATCC	CEPARIUM U.C.M.C
C2	E. coli 35218	CONTROL ATCC	CEPARIUM U.C.M.C
C3	S. epidermidis 12228	CONTROL ATCC	CEPARIUM U.C.M.C



Orozco (2004). Es de gran importancia la recolección y selección de la planta a estudiar en el mejor estado físico y peso de la especie, se conservarían mejor los compuestos a extraer

1

En bolsas negras de basura limpias se depositan los especímenes, rotulado con el nombre del material colectado, datos geográficos del sitio de origen, fecha, hora.

2

Si el procesamiento no se realiza de inmediato se conserva el material en un sitio refrigerado y con poca luz, se recomienda el procesamiento antes de 48 horas, evitando la pérdida de metabolitos.

3

Lavado a chorro de agua del material vegetal y eliminación de contaminantes macroscópicos que puedan interferir en el producto final.

4

Lemna gibba, permitió obtener una separación de las partes vegetales de interés (hojas, tallo, raíz, etc) obtenido por *Eichhornia crassipes*.

5

Los extractos ya concentrados en viales ámbar para guardarlos de la luz, se pueden guardar en refrigeración de 4-8 °C hasta 4 meses sin perder sus características antibacterianas.

6

Si el material vegetal es menor a 10 kg se debe realizar un secado en prensa bilógica las primeras 72 horas y seguir con el secado en horno según protocolo. Si es mayor a 10 kg se debe realizar un secado en invernadero de 72 a 168 horas, si se necesita de más rapidez se debe a las 72 horas puede realizar un secado en horno según protocolo.

7

La biomasa seca por método mecánico se fragmenta y se guarda separada en papel kraft, evitando temperaturas mayores a 18°C con alto porcentaje de humedad.

8

Implementar solventes que de diferente polaridad, se relaciona con la obtención de fitoquímicos como flavonoides, taninos, glicosidos, lípidos, etc. Percolación, Lixiviación y Percolación extractiva que son compuestos que pertenecen a los compuestos apolares.

9

Protocolo para la obtención de extractos orgánicos en las plantas macrófitas (*Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*).

realiza el proceso de rotaevaporación, programado a 71 mbar, 134 rpm y 35.2°C.

11

Los extractos ya concentrados en viales ámbar para guardarlos de la luz, se pueden guardar en refrigeración de 4-8 °C hasta 4 meses sin perder sus características antibacterianas.

10

RESULTADOS

Control de crecimiento

Tabla 7. Control de crecimiento de la cepas control ATCC y cepas patógenas

Microorganismo	Tiempo de incubación	Crecimiento
C1: <i>S. aureus</i> 35556	24-28 horas	+
C2: <i>E. coli</i> 35218	24-28 horas	+
C3: <i>S. epidermidis</i> 12228	24-28 horas	+
REC 581-H: <i>E. Coli</i>	24-28 horas	+
MC2: <i>E. coli</i> K88	24-28 horas	+
ME3: <i>Salmonella spp</i>	24-28 horas	+
MB4: <i>Staphylococcus aureus</i>	24-28 horas	+

RESULTADOS

<i>E. coli</i>	Amikacina (AK)	Ampicilina (AMP)	Cefotaxima (CTX)	Gentamicina (CN)	Ceftriaxona (CRO)	Cephazolin (KZ)
C2. <i>E. coli</i> 35218	28	0 mm	28mm	20mm	28mm	24mm
MC2. <i>E. coli</i> K88	32	0mm	32mm	10mm	30 mm	23mm
REC 581-H <i>E. Coli</i>	13	0mm	34 mm	18 mm	30mm	24mm

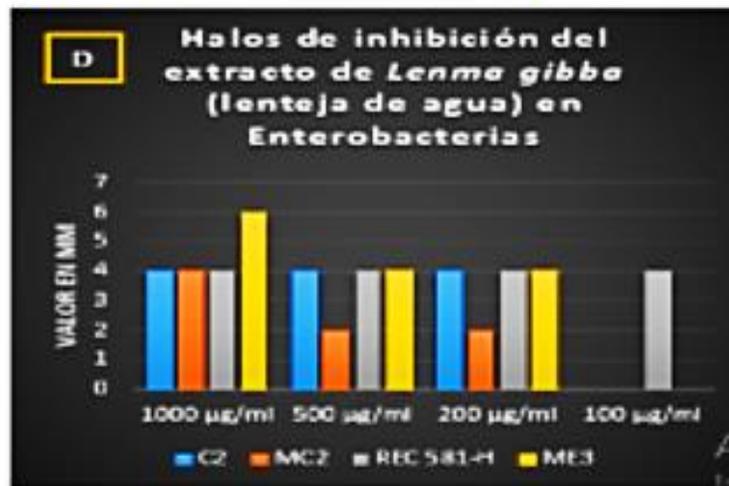
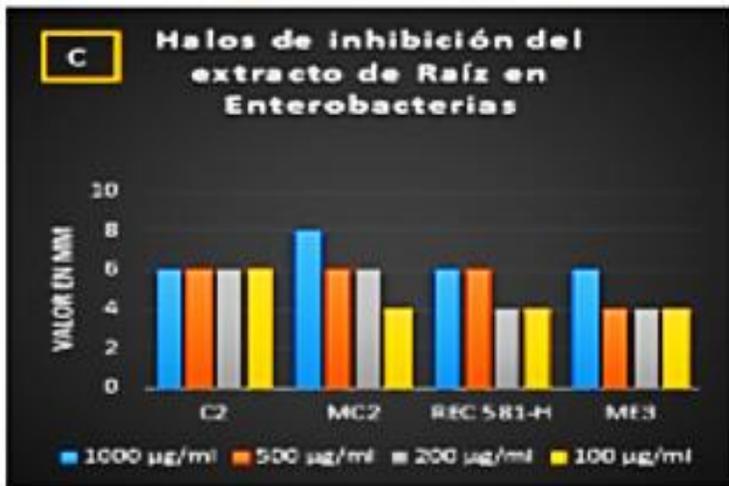
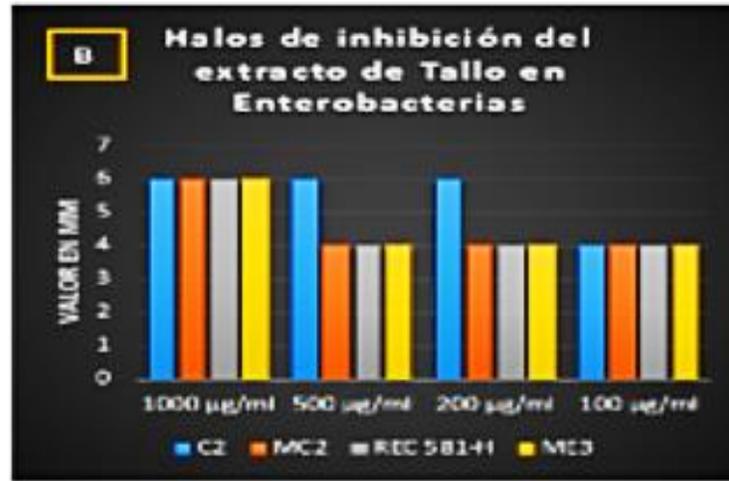
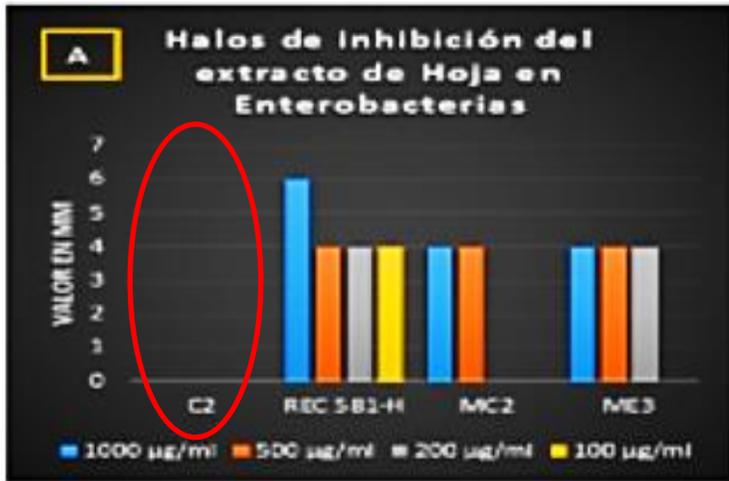
<i>Salmonella</i>	Amikacina (AK)	imipenem (IMP)	Tetraciclina (TE)	Sulfatrimetropin (SXT)	Cephazolin (kz)	Ampicilina (AMP)
ME3. <i>Salmonella</i> spp	17 mm	26mm	18mm	30mm	23mm	0 mm

<i>Staphylococcus</i>	Teicoplanin (TEC)	Gentamicina (CN)	Clindamicina (DA)	Rifampicina (RRR)
C1. <i>S. aureus</i> 35556	14 mm	15 mm	24 mm	34 mm
C3. <i>S. epidermidis</i> 12228	15mm	30mm	21 mm	40 mm
MB4 <i>Staphylococcus aureus</i>	22 mm	24 mm	24 mm	26 mm

Famigietti (2014). La sobre expresión de la β -lactamasa Ampc, presentes de forma natural ó la adquisición por plásmidos.

La resistencia presentada por MC2 (*E. coli* K88) Y REC 581-H (*E. coli*) frente a los sensibilizadores de gentamicina y amikacina respectivamente, se presenta como una discordancia

RESULTADOS

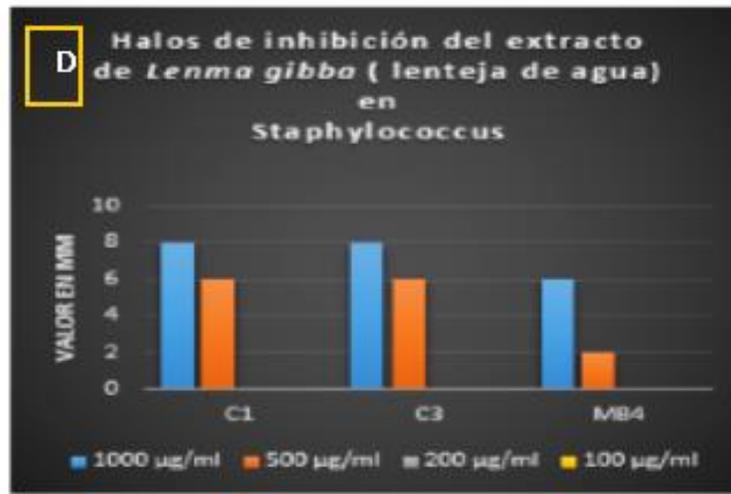
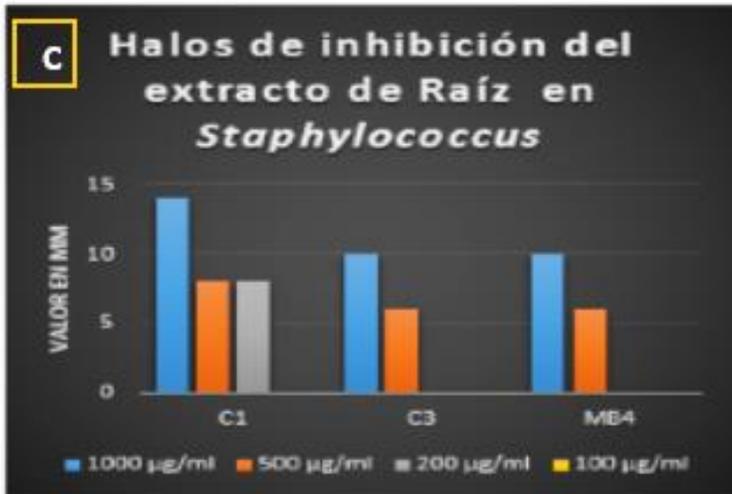
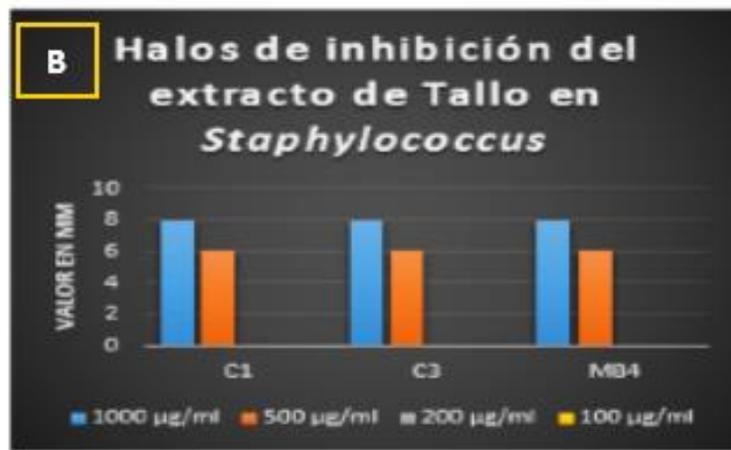
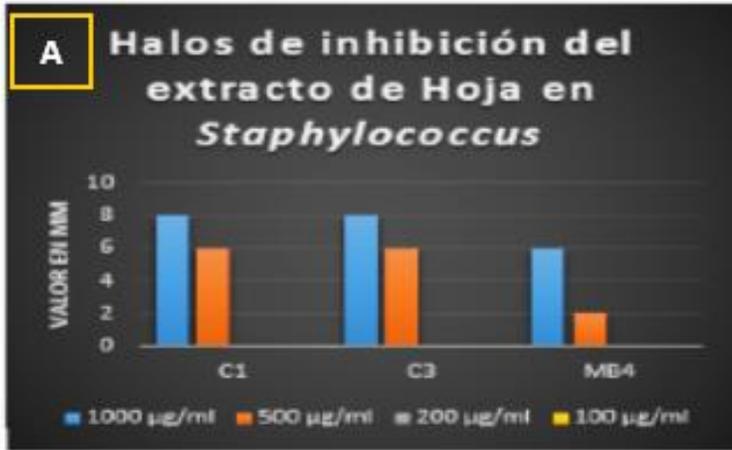


C2: *E. coli* 35218. REC 581-H: *E. coli*. MC2: *E. coli* K88. ME3: *Salmonella* spp

La mayoría de los extractos mostró actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones frente a algunas de Torres y colaboradores (2016). Los extractos de bacterias, a excepción del extracto de hoja frente a la cepa C2 (*E. coli* ATCC 35218), frente a la cepa de *E. coli*, presentó un halo en promedio de 5.5 mm. El método de difusión en agar puede no presentar halo de inhibición, mientras que en la prueba de CMI se puede ver mejor la actividad antimicrobiana. Rojas y colaboradores (2019) describen que los flavonoides tienen una actividad antimicrobiana frente a las Enterobacterias desde 0 a 4 mm.

Kumar y colaboradores (2014). *Eichhornia crassipes* tiene una actividad citotóxica frente a células asociadas a cáncer de pulmón y a cáncer de mama, por la presencia de flavonoides. Así Araya I y colaboradores (2013) *E. coli* ATCC 35218 posee β lactamasa por lo que se caracteriza por inhibir el efecto hepatotóxicos de ciertos medicamentos.

RESULTADOS



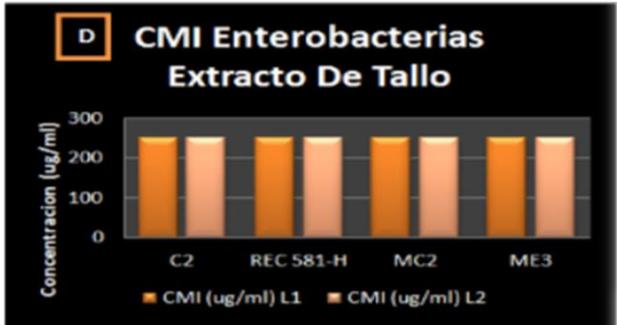
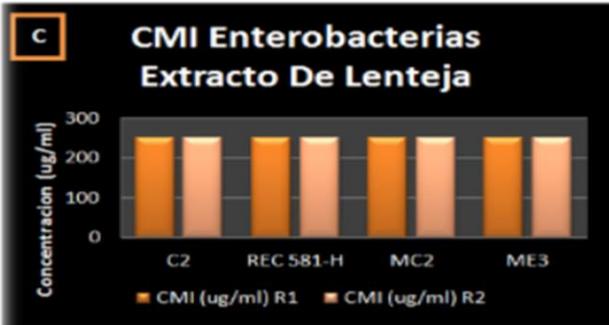
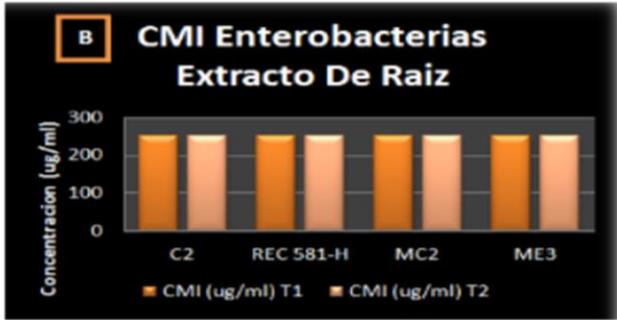
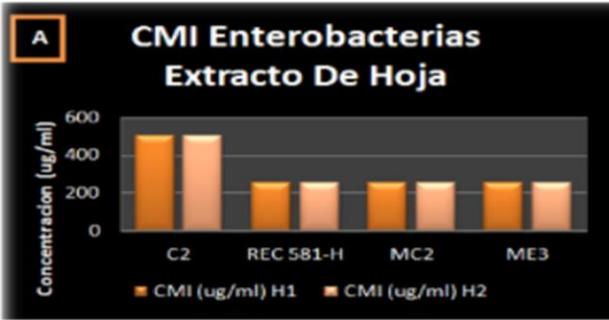
C1: *S. aureus* 35556. **C3:** *S. epidermidis* 12228. **MB4:** *Staphylococcus aureus*.

Torres y colaboradores (2016). los extractos de *Lenma gibba* por el método de Kirby-Bauer, frente a la cepa de *S. aureus* mostró un halo de 6.5 mm.

La raíz presenta mejor actividad frente a bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus*, con un halo de 10 a 14 mm.

Cristian y colaboradores (2017). Extracto de hoja de la misma planta, frente a *Staphylococcus hay* un halo de 6 a 12,5 mm, en las

RESULTADOS

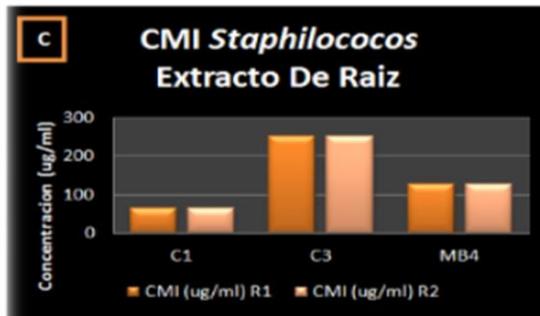


C2: *E. coli* 35218. REC 581-H: *E. coli*. MC2: *E. coli* K88. ME3: *Salmonella* spp

Se debe estudiar más a fondo, que el tipo de extracto (2009) y la abundancia de metales pesados en este tipo de extractos. La actividad antibacteriana de los extractos de la lenteja de agua está en un rango de 0.06 a 28.2 $\mu\text{g/ml}$.

Las muestra *Staphylococcus aureus* 35556 ATCC (C1), presenta la mayor CMI de 31.25 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$ y 15, 62 $\mu\text{g/ml}$ en los extractos de hoja, tallo, raíz y lenteja de agua respectivamente. Frente a lenteja de agua tiene un CMI de 15, 62 $\mu\text{g/ml}$.

Gülçin İ. Y colaboradores (2010). *Lemna gibba*, tiene capacidad antioxidante, antirradical y antimicrobiana, también posee compuestos fenólicos y flavonoides



C1: *S. aureus* 35556. C3: *S. epidermidis* 12228. MB4: *S. aureus*

RESULTADOS

CONCLUSIONES

Se establece un Protocolo para la obtención de extractos orgánicos en las plantas macrófitas y se comprueba la actividad antibacteriana de las plantas *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba*.

Todos los extractos evaluados presentaron cierto grado de actividad antimicrobiana, el cual varió dentro del grupo de cepas *Staphylococcus* y el grupo de cepas de Enterobacterias.

Se evidenció mayor sensibilidad en las pruebas realizadas con *Staphylococcus*, especialmente en la cepa C1 por los dos métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana con los mayores halos de inhibición y los CMI más bajos de 31,25 µg/ml a 62,5 µg/ml en los extractos de *Eichhornia crassipes* y 15, 62 en el extracto de *Lemna gibba*, lo que permite pensar que de este extracto puede llegar a ser una alternativa viable para el tratamiento de esta enfermedad en bovinos

Dentro de las cepas de Enterobacterias se mostró un comportamiento similar en la actividad antibacteriana de los extractos, lo que puede indicar que *Eichhornia crassipes* y *Lemna gibba* comparten ciertos fitoquímicos con actividad antibacteriana, que también podrían ser utilizados para este grupo de bacterias.

REFERENCIAS

1. Márquez Lara D. Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia [Internet]. Redalyc. 2008 [citado 7 Agosto del 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4499/449945024014.pdf>
2. Jramillo M, Flores E. Fitorremediación mediante el usos de dos especies vegetales lemna minor (Lenteja de agua) y Echornia crassipes (jacinto de agua) en aguas residuales producto de la actividad minera [Pregrado]. Universidad politécnica salesiana sede cuenca; 2012.
3. Calderón A, Rodríguez V. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia) [Internet]. Aprendeonline.udea.edu.co. 2008 [citado 8 de Agosto del 2017]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902008000400006
4. Martínez Rocha A. Uso de antimicrobianos en la avicultura: sus implicaciones en la salud pública [Internet]. Bdigital.unal.edu.co. 2012 [citado el 11 Agosto del 2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/11429/>
5. Leal M. Antibacterial efficacy of plant extracts: clinical application in bovine MASTITIS [Internet]. scielo.org.co. 2014 [citado 27 Febrero 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v17n1/v17n1a20.pdf>
6. De la Fuente-Salcido Norma Margarita, Villarreal-Prieto Jesús Ma., Díaz León Miguel Ángel, García Pérez Ada Patricia. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. Rev. mex. cienc. farm [revista en la Internet]. 2015 Jun [citado 03 Mayo 2017]; 46(2):7-16. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007&lng=es
7. ESPERBENT, CECILIE, MIGLIORATI, MARIO, Bacterias multirresistentes: una amenaza oculta que crece. RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias [en línea] 2017, 43 (Abril-Sin mes) : [Fecha de consulta: 5 de marzo de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86451165002> ISSN 0325-8718
8. Ramírez N, Gaviria G, Arroyave O, Sierra B, Benjumea J. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. Rev Col Cienc Pec. 2001;14(1):76-87
9. Camino Yusimy, Almague R. I, Tolón N, Ramírez N. Uso del ácido acético en la prevención y tratamiento de la colibacilosis porcina. Revista Computadorizada de Producción Porcina. 2004;11(2):46-52.
10. Lozano M, Arias D. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2008;21(1):121-135
11. Departamento de Ciencias Animales, Università degli Studi di Milano Instituto Cooperación Económica Internacional. El uso popular de las plantas medicinales en Uruguay. 1st ed. Uruguay: Lilia Grosso; 2010