



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES
“DR. ANTONIO MORALES MENDEZ”**



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
Crinum erubescens EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

Tesista:

Franyelly Paredes

C.I.: V- 20.709.635

Tutor:

PhD. Janne Rojas

Co-tutor:

Dr. Alexis Buitrago

Mérida, enero de 2024



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES
“DR. ANTONIO MORALES MENDEZ”**



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
Crinum erubescens EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

Tesis de pregrado presentada como requisito para optar al
Grado de LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

Tesista:

Franyelly Paredes

C.I.: V-20709635

Tutor:

PhD. Janne Rojas

Co-tutor:

Dr. Alexis Buitrago

Mérida, enero de 2024

DEDICATORIA

A **Dios**, primeramente, por llenarme de fe en los momentos difíciles, sin él nada hubiese sido posible.

A la Universidad de los Andes en especial a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y sus autoridades, por recibirme en sus aulas y permitirme incorporar nuevos conocimientos.

A mis padres, **Edén, Jesús**, por su apoyo y comprensión en cada momento.

A mi abuela **Sofía**, pilar fundamental, por su constancia y dedicación motor principal en este recorrido académico.

A mis hermanos, **Yohana, Maylin, Gladys, Mariangel, Julio, Cristian** y **Carlos** siempre he contado con ustedes, quienes me animaron a seguir adelante.

A mis personas especiales, **Víctor Acosta, Javier Dávila, Oraides Hernández**, quienes fueron apoyo de motivación en momentos difíciles y por ser una mano amiga cuando lo necesité.

A la **Dra. Janne Rojas**, con su conocimiento y experiencia, como tutora, me brindó la orientación necesaria durante todo el desarrollo de la investigación.

Al **profe Alexis Buitrago**, por compartir conmigo todos sus conocimientos y guiarme por este largo camino.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CONTENIDO	.iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	2
EL PROBLEMA	2
Planteamiento del problema.....	3
Justificación de la investigación.....	4
Objetivo Generales.....	5
Objetivo Especifico.....	5
Alcances y Limitaciones.....	6
CAPÍTULO II	7
MARCO TEORICO	7
Trabajos previos.....	7
Antecedentes Históricos.....	8
Bases Teóricas.....	12
Familia Amaryllidaceae.....	12
Características botánicas de la familia Amaryllidaceae.....	12
Género <i>Crinum</i>	13
Descripción botánica del género <i>Crinum</i>	13
Taxonomía.....	14
Generalidades de los Metabolitos Secundarios.....	14
Metabolitos Secundarios.....	15
Extractos.....	15
Extracto vegetal.....	18

Extracción.....	19
Preparación de los Extractos.....	19
Tipos de extracción.....	19
Antibiótico.....	21
Características Generales de las Bacterias.....	21
Bacterias.....	22
Bacterias Gram positivas.....	22
Bacterias Gram negativas.....	22
Actividad antimicrobiana.....	23
Microorganismos utilizados en el estudio.....	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	24
<i>Enterococcus faecalis</i>	24
<i>Escherichia coli</i>	24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
<i>Candida albicans</i>	25
Técnicas para determinar la resistencia bacteriana.....	25
Métodos para Determinar la Actividad Antibacteriana en extractos.....	26
Método de Difusión en Agar Kirby- Bauer.....	27
Método de Difusión con Pozos.....	27
Método en Dilución en medio Liquido.....	27
Método de Dilución e Medio Solido.....	28
Método de E-Test.....	28
Hipótesis.....	28
CAPÍTULO III.....	29
Tipo de investigación.....	29
Diseño de Investigación.....	29
Población y muestra.....	30
Sistema de Variables.....	30
Procedimiento de la Investigación.....	31

Material Botánico.....	31
Recolección.....	31
Preparación del Material vegetal.....	31
Métodos.....	32
Extracción por Maceración del Material Vegetal.....	32
Filtración del Extracto Metanólico y Concentración.....	32
Tamizaje fitoquímico.....	33
Evaluación de la Actividad Antibacteriana del Extracto.....	35
Preparación de las Placas de Petri.....	36
Adecuación de los Discos.....	36
Preparación del Inóculo.....	36
Inóculo.....	37
Incubación.....	37
Lectura de los Ensayos.....	37
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima.....	37
CAPÍTULO IV.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
Resultados	38
Discusión.....	41
CAPÍTULO V.....	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
CONCLUSIONES.....	44
RECOMENDACIONES.....	45
REFERENCIA BIBLIOHEMEROGRÁFIAS.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico en el extracto de la especie <i>Crinum erubescens</i>	33
Tabla 2. Determinación cualitativa de los compuestos químicos presentes en la especie <i>Crinum erubescens</i>	39
Tabla 3. Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de <i>Crinum erubescens</i>	41

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Crinum erubescens</i>	14
---	----

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES
“DR. ANTONIO MORALES MENDEZ”



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
Crinum erubescens EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL

Autora: Franyelly Paredes

Tutor: PhD. Janne Rojas

Co-tutor: Dr. Alexis Buitrago

RESUMEN

La medicina natural en el cuidado de la salud es una práctica que sobrepasa generaciones. Actualmente, como en la antigüedad se continúan empleando los productos naturales, en particular sus extractos usados para el tratamiento de diversas patologías, sin embargo, están condicionados por muchos factores como el incremento de la resistencia microbiana a algunos productos de origen sintético y la evidencia de efectos secundarios, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas terapias de origen vegetal. El objetivo de esta investigación fue estudiar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Crinum erubescens* en cepas de referencia internacional (ATCC) realizado en el laboratorio B “Antonio Morales” ubicado en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes desde noviembre del 2023 hasta enero del 2024. A través del método de extracción por maceración en frío, usando como solvente metanol, se realizó un tamizaje fitoquímico para determinar la presencia de algunos metabolitos secundarios; La actividad antibacteriana arrojó resultados positivos frente a las cepas Gram positivas de *S. aureus* (ATCC 25923) con una CIM de 100 mg/ml. Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la especie en estudio puede ser una alternativa para el descubrimiento de nuevos fitofármacos.

Palabras claves: *Crinum erubescens*, *S. aureus* actividad antimicrobiana, tamizaje fitoquímico.

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas en la medicina tradicional se remonta a tiempos prehistóricos, pero la ciencia actual ha permitido identificar, aislar y producir cientos de principios activos para la elaboración de fármacos utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente en sociedades poco industrializadas con dificultades de acceso a medicamentos ya que estos compuestos son generados para prolongar la vida misma; la acción antibacteriana que poseen sus extractos, permite la cura eficaz de infecciones bacterianas agudas y algunas enfermedades crónicas (Mederos, 2019).

Las propiedades medicinales de las plantas vienen dadas por sustancias o principios activos que pueden encontrarse en la composición química que estos poseen, los cuales cumplen una función de gran importancia. (White LB, et al 2004).

La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, así como, también el descubrimiento de nuevos fármacos, lo que ha impulsado una revalorización de su empleo en muchas partes del mundo, representando una forma complementaria de tratamiento (Avello, y Cisternas, 2010).

Las especies del género *Crinum* son utilizadas como plantas decorativas y ornamentales, también tienen grandes utilidades en el mundo de la medicina; ya que muchas de sus especies han proporcionado compuestos químicos con efectos anti cancerígenos, sedantes y antivirales (Mederos, 2019).

La presente investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la especie *Crinum erubescens* en cepas de referencia internacional.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

El uso terapéutico de plantas medicinales, como sustitutas de las medicinas farmacéuticas, se aplica desde la antigüedad para curar o aliviar las enfermedades. En la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional y, dentro de esta, la medicina herbaria, que ha generado numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones (Gallegos, 2016). Si bien es cierto, el uso de plantas medicinales es el medio de tratamiento más común en la medicina tradicional y la medicina complementaria en todo el mundo. Las plantas medicinales se obtienen mediante la recolección de plantas silvestres o el cultivo de especies domésticas. Muchas comunidades dependen de los productos naturales recolectados en los ecosistemas para fines medicinales, culturales, y alimentarios (OMS 2015).

Además de esto, la utilización de hierbas medicinales constituye una importante alternativa terapéutica para las poblaciones rurales, donde tratan de solucionar casi todos sus problemas de salud con extractos de plantas, especialmente en sectores de poco acceso a la medicina especializada (Miranda, et al., 2005).

Cabe destacar que las plantas medicinales son una fuente relevante para el descubrimiento de nuevos fármacos que luego se sintetizan, pero también permiten un conocimiento más profundo de las plantas que conduce a que muchos productos naturales sean reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos por síntesis (Sánchez et al., 2009).

Si bien es cierto, la actividad antimicrobiana que poseen los extractos vegetales han revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes terapéuticos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico

de las especies vegetales medicinales con una base científica (López et al., 1997).

Así mismo, en una investigación reciente, se ha comprobado la actividad de diferentes partes de la planta *C. erubescens* sobre los microorganismos patógenos, donde la familia Amaryllidaceae es bien conocida por contener un grupo exclusivo de alcaloides (Bastidas et al., 2011).

Por otra parte *C. erubescens* es una planta terrestre, se cultiva como ornamental, valorada especialmente por sus flores. La acción antibacteriana que poseen los extractos de las plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, los hacen candidatos para ser usados como alternativas para el control de agentes patógenos y de diversas infecciones provocadas por microorganismos. (Montero, 2010).

Las especies del género *Crinum* contienen una amplia variedad de metabolitos secundarios, entre otros compuestos. Algunas de estas sustancias bioactivas podrían promover el proceso de curación de heridas por su efecto antimicrobiano y antioxidante. Afortunadamente, la mayoría de las pruebas confirman los elevados márgenes de seguridad de los extractos de las diferentes partes de la planta por lo que se afirma su efectividad (Oda et al., 2010).

De acuerdo con lo antes mencionado, se propone el siguiente planteamiento del problema de investigación: ¿Hasta qué punto será efectiva la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la especie de *Crinum erubescens*, que se estudiará en el laboratorio B de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis entre noviembre del 2023 hasta enero del 2024?

Justificación

El uso de plantas en el cuidado de la salud, es una práctica que sobrepasa generaciones y está muy ligado a la cultura de la población; se fundamenta en la experiencia empírica y, en numerosos estudios dedicados a la promoción, prevención de la salud y tratamiento (Heisler et al., 2015).

La medicina tradicional ha jugado un papel importante y de gran interés en numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones. Pero, hay poco uso de los medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud; donde sus tratamientos están basados únicamente en la medicina alopática (Martínez y Gómez ,2011).

En ese sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Unión Europea, se han expresado en torno al incremento de la resistencia bacteriana, haciendo un llamado para que sean implementados más y mejores estudios sobre la supervivencia bacteriana (Cueva et al., 2004).

En tal sentido se denominan productos medicinales a los derivados de origen vegetal utilizados como drogas o medicamentos para el tratamiento de alguna afección o enfermedad que padece un individuo o animal. Son capaces de actuar sobre determinados procesos produciendo un efecto terapéutico, o bien servir como materia prima en la producción de medicamentos (Fuentes y Granda, 1997).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico obtenido de la especie *Crinum erubescens* en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de la especie *C. erubescens* empleando la técnica de extracción sólido-líquido por maceración con metanol.
- Determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *C. erubescens* a través de un tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto utilizando el método de difusión en agar con discos de papel.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la investigación

Según Hernández Sampieri, Fernández y Baptista (2010), el alcance de una investigación está relacionado con la profundidad que se adquirirá sobre la problemática de estudio, durante el proceso de investigación. Además, Hurtado (2010), refirió que un evento de estudio se puede investigar desde varios grados de elaboración, tales como: exploratorio, descriptivo, analítico, comparativo, explicativo, predictivo, proyectivo, interactivo, confirmatorio, y evaluativo. En este sentido, esta investigación permitió evaluar la actividad antimicrobiana del extracto obtenido de la especie *C. erubescens*. Por lo tanto, el alcance de esta investigación fue evaluativa.

Durante la investigación se consideró como limitante la recolección del material vegetal, la poca cantidad de cepas que ofrece el cepario, los constantes cortes de electricidad, de agua, e internet, el deterioro de la infraestructura de los laboratorios donde se llevó a cabo la investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

En un estudio publicado por Rojas, Buitrago, y Velasco, (2021). Titulado: Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* Hook F. El objetivo fue: determinar cualitativamente la presencia de algunos metabolitos secundarios en el extracto metanólico de los bulbos de *C. moorei*, así como, evaluar la actividad antibacteriana frente a bacterias de referencia internacional. El método utilizado: Extracción liquido- sólido por maceración de la especie *Crinum moorei* Hook F usando como solvente metanol. El ensayo cualitativo preliminar para el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* Hook F consistió en una serie de reacciones colorimétricas y separaciones cromatográficas que permitieron identificar de forma cualitativa la presencia de alcaloides, antraquinonas, glucósidos, saponinas, flavonoides, cumarinas, mucílagos, taninos, esteroides y fenoles. La actividad antibacteriana para el extracto de los bulbos de *C moore* Hook F, lo realizaron siguiendo el método de difusión en agar con discos de papel observándose que es activo frente a las bacterias grampositivas *S. aureus* y *E. faecalis*, con valores de CIM de 100µg/mL y 500µg/mL, respectivamente. Los resultados obtenidos estimulan el aislamiento e identificación de nuevas moléculas activas contra bacterias grampositivas, las cuales tienen importancia clínica como causantes de diferentes procesos infecciosos.

Una investigación realizada por Rojas, Buitrago, Possamai, Timmers, Tallini, (2021). Denominada como Perfil de alcaloides y actividad inhibidora de la colinesterasa de cinco especies de la familia Amaryllidaceae recolectadas

en el estado Mérida-Venezuela. Esta familia se caracteriza por su capacidad de biosintetizar alcaloides con estructura tipo isoquinolina.

Con actividades biológicas para estos alcaloides, tales como: antipalúdica, antitumoral, analgésica, antimicrobiana, citotóxica, inhibidora de la acetilcolinesterasa, entre otras. La presente investigación, realizada con cinco especies de la familia Amaryllidaceae, *Crinum amabile*, *Crinum erubescens*, *Crinum moorei*, *Amaryllis belladonna* y *Zephyranthes carinata*, recolectadas en diferentes localidades del estado Mérida-Venezuela y analizadas por GC-MS, mostró el perfil de alcaloides de hojas y bulbos de estas especies.

Los resultados revelaron que la licorina y compuestos relacionados, como la 11,12-deshidro-anhidrolicorina y la 1-O-acetillicorina, estaban presentes en casi todas las muestras analizadas, con predominio de la licorina. La capacidad de inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE) de estos extractos alcaloides mostró un efecto inhibidor fuerte a moderado sobre ambas enzimas. Las hojas de *C. amabile* fue el extracto con mayor actividad inhibidora contra AChE con 0,88 µg/mL, así como BuChE con 4,46 µg/mL, seguido de las hojas de *Crinum erubescens* con valores de 1,75µg/mL y 8,72µg/mL, respectivamente, en comparación a los valores observados para la galantamina utilizada como control. La presente investigación constituye el primer informe sobre las interacciones de bufanisina con los sitios activos de AChE y BuChE.

Un estudio realizado por: Barreno, Jair, (2018). Titulado: Evaluación de la actividad antimicrobiana *In vitro* de los extractos de *Crinum x amabile*. El objetivo fue: evaluar la actividad antimicrobiana *In vitro* de los extractos de *Crinum x amabile*, en el cantón Muisne perteneciente a la provincia de Esmeraldas, en los laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Se realizó un tamizaje fitoquímico de los bulbos de la planta. Se elaboró para el desarrollo de los ensayos un extracto metanólico mediante maceración y baño de ultrasonido y otro en el cual se purificó la fracción de

alcaloides mediante el uso de solventes orgánicos y cambio de pH, fueron desecados con un rotavapor a 40°C. La fracción de alcaloides fue analizada por cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (CG-EM) para obtener el perfil de alcaloides.

El ensayo de la actividad antimicrobiana se ejecutó mediante el método de microgotas y difusión de discos utilizando los extractos disueltos en una solución de Dimetil Sulfóxido (DMSO) al 10% en agua destilada contra los microorganismos: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, esta actividad fue comparada contra discos de antibióticos de Gentamicina® (10ug), Ampicilina® (10ug) y el antimicótico comercial Fluconazol® (2mg/mL) y como controles negativos agua destilada y la solución de DMSO al 10%. Con la CG-EM se obtuvo como alcaloide mayoritario a la licorina con una abundancia superior (44%), le precede la assoanina con un 11,63%. En cuanto a la actividad antimicrobiana por el método de difusión de discos se obtuvieron mejores halos de inhibición en el extracto bruto de alcaloides en las concentraciones analizadas de 700ug contra *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*, se observó un diámetro de inhibición mínimo para *E. coli* y *C. albicans*. En el método de microgotas no se consiguió buenos resultados debido a las bajas concentraciones empleadas.

Un estudio realizado por Carrasco A, Acosta K 2017, titulado: Determinación de la Actividad Inhibitoria de Acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de Alcaloides de *Crinum x amabile*. El objetivo fue: determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*. El método utilizado fue, maceración durante 72 horas de las hojas y bulbo de *Crinum x amabile*, usando como solvente de extracción metanol. Las actividades antiinflamatoria y citotóxica *In vitro* fueron evaluadas mediante el modelo de neutrófilos aislados, mismo que está basado en la reducción de la sal de tetrazolio (WST-1). La actividad antioxidante fue desarrollada mediante el método de captación de radicales libres DPPH. Los resultados obtenidos del

ensayo de actividad antiinflamatoria demuestran que el extracto crudo del bulbo de *Crinum x amabile* a una concentración de 200 ppm posee una marcada actividad antiinflamatoria con un $56,35\% \pm 0.24$ de inhibición inflamatoria. Sin embargo, el valor obtenido es inferior al exhibido por la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico[®]), $70,28\% \pm 0.24$ de inhibición inflamatoria.

Antecedentes Históricos

El hombre ha usado los productos de la naturaleza desde tiempos inmemorables, no solo para satisfacer su hambre, sino también con el fin de sanar sus enfermedades, cicatrizar sus heridas y elevar su estado de ánimo. Hipócrates considerado el padre de la medicina, otorga extrema importancia a la medicina natural. La práctica de la medicina natural y tradicional se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales, como sustitutas de las medicinas farmacéuticas o en combinación. Se utiliza de las plantas, sus extractos en diversas formas de preparación para mejorar el estado de salud (White, et al., 2002).

En todos los tiempos el tratamiento de enfermedades con plantas medicinales ha sido una práctica muy común en las comunidades rurales, práctica que se mantiene hasta la actualidad en muchos países del mundo, como lo evidencian numerosos estudios (Ansaloni, 2010).

La medicina natural se utiliza desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, dando lugar a los fitofármacos, y es apreciada por su bajo costo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis (Casamayor, 2014).

Según la OMS en el 2016, reportó que los medicamentos naturales contienen principios activos provenientes de algunas partes de las plantas, u

otros materiales vegetales, o combinaciones de ellos y su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz (Muñoz, J. 2010).

Por otro lado, la segunda mitad del siglo XX, el empleo generalizado de los antibióticos ha cambiado radicalmente el panorama de la salud, haciendo que enfermedades infecciosas como la gonorrea, la sífilis, el tétanos, el cólera, la neumonía o la tuberculosis dejen de ser la primera causa de muerte en el mundo. El empleo de los antibióticos también ha revolucionado el campo de la cirugía, ya que la profilaxis antibiótica ha permitido reducir enormemente el riesgo de muerte por septicemia luego de procedimientos quirúrgicos mayores o menores. El número de muertes perinatales de niños y madres también ha caído enormemente tras el uso generalizado de los antibióticos (Casamayor, 2014).

Los antibióticos se incluyen entre los medicamentos más recetados en todo el mundo y constituyen, sin duda, uno de los grandes avances de la medicina y la farmacología modernas. Aunque el mecanismo mediante el cual actúan los antibióticos no se caracterizó de manera científica sino hasta el siglo XX, desde la antigüedad se han empleado diversos compuestos orgánicos, como extractos de raíces o de hongos, para tratar empíricamente las infecciones. El primer antibiótico fue descrito por el bacteriólogo británico Alexander Fleming, en 1928 encontrando la penicilina, producida por el hongo *Penicillium notatum* y descubierta de manera casual (Ansaloni, 2010).

Bases Teóricas

Familia Amaryllidaceae

Amaryllidaceae es una familia de plantas monocotiledóneas, conocidas por su atractivo hortícola y ornamental, se caracterizan por ser herbáceas, perennes, con flores muy atractivas y la mayoría presentan bulbos. Existen aproximadamente 85 géneros y 1100 especies, que se distribuyen ampliamente en las regiones tropicales y templadas de todo el mundo, particularmente en África, América del Sur, en la región andina y el Mediterráneo (Cabezas, et al., 2007).

Los alcaloides que se encuentran en este tipo de plantas poseen interesantes actividades biológicas y frecuentemente usos etnobotánicos. Estos compuestos resultan del metabolismo de los aminoácidos tirosina y fenilalanina, ambos dan lugar al precursor base de todos los alcaloides de las Amaryllidaceae (Cabezas, et al., 2007).

Características botánicas de la familia Amaryllidaceae

Según Cabrera y De La Plata en 1968, las plantas pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, se caracterizan por ser terrestres, raramente acuáticas epifitas, herbáceas y presentan bulbos. Las especies de esta familia se reconocen por:

Porte: hierbas perennes o bienales con bulbo carnoso subterráneo, raro con rizoma.

Hojas: planas y dorsiventrales, lineares a orbiculares, envainadoras, glabras, caducas, en pocos casos perennes, provistas de estomas amonocíticos y células mucilaginosas o elongados sacos con rafidios, se originan directamente del bulbo.

Flores: epíginas, trímeras, actinomorfas y perfectas, dispuestas en umbelas soportadas por un largo escapo, comprimiendo de una a muchas cimas helicoidales, aunque en muchos casos se encuentra reducida a unas pocas flores o a una flor solitaria.

Frutos y semillas: cápsula loculicida o baya; con semillas altamente variables; los géneros concentrados en Europa son globosos, elipsoidales u ovoides mientras que los géneros extra europeos son en su mayoría lisos o chatos (Cabrera, et al.,1968).

Género *Crinum*

El género *Crinum* representa un importante sector en la familia Amaryllidaceae con amplia distribución geográfica en regiones cálidas y templadas del mundo. El nombre *Crinum* se origina del griego *Krinon*, que significa "lirio" (Meerow y Snijman, 1998). Esta especie vegetal es usada para dolores abdominales y contusiones en el cuerpo, colocando las hojas y bulbos en el fuego y luego en el sitio afectado durante un largo periodo de tiempo, las flores son usadas para tratar los resfriados, también los alcaloides de sus extractos pueden tener un efecto inhibitor de la acetilcolinesterasa. (De La Torre y cols., 2008).

Descripción botánica de la especie *Crinum erubescens*

Las especies pertenecientes a este género son muy utilizadas como plantas ornamentales en muchos países del mundo por sus enormes y hermosas flores y hojas alargadas. Se caracterizan por ser plantas perennes, con pequeños bulbos. Son plantas muy resistentes que pueden crecer sobre distintos tipos de sustrato, existen especies que crecen en terrenos muy húmedos y otras en terrenos desérticos. Su reproducción es por semillas y bulbos (reproducción asexual o vegetativa). Los Lirios de Río se distribuyen

por todo el mundo con una mayoría de especies presentes en zonas tropicales de África (De La Torre y cols., 2008), Figura 1.



Figura 1. *Crinum erubescens* (Cabezas, y cols., 2007).

Taxonomía de *Crinum erubescens*

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales

Familia: Amaryllidaceae

Género: *Crinum*

Especie: *Crinum erubescens* (Carolus Linnaeus, 1753).

Generalidades de los metabolitos secundarios

Hasta el año 1800, apenas se había progresado en el campo de la fitoquímica, solo se conocían unas cuantas sustancias como el azúcar de caña, almidón, alcanfor, y ácido benzoico, debido a que su preparación era sumamente sencilla. Mezclas complejas como grasa, aceite, esencias, resinas, se habían utilizado y elaborado, aunque prácticamente no se sabía nada acerca de su composición. Los primeros investigadores en el campo de

la fitoquímica, no llegaron apreciar la extrema complejidad de las materias con que se realizaban sus investigaciones y carecieron casi por completo de la técnica necesaria para conseguir un proceso autentico (Torres, 2004).

En el siglo XIX se progresa con más rapidez siendo así que en el año 1803 se aisló el primer alcaloide, la narcotina, posteriormente la morfina, estricnina, emetina, entre otros. No obstante, Chevreul en (1813-1823) descubre la naturaleza química de las grasas y los aceites fijos (Torres C, 2004). Hasta mediados del siglo XX el principal objetivo, en cuanto a la química de los productos naturales, siguió siendo el aislamiento y determinación de la estructura de una amplia gama de compuestos.

Metabolito secundario: Son todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales. Estas moléculas no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen con un papel muy importantes en el reino vegetal (Torres, 2004). A continuación, se mencionan las características de algunos metabolitos secundarios:

- **Alcaloides:** reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos que pertenecen a este grupo, entre las sustancias se pueden mencionar a la morfina, heroína y cocaína. El mecanismo de acción en las bacterias de los alcaloides es debido a la intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo, (Domingo y López, 2003).
- **Antraquinonas:** son un grupo de quinonas naturales y son la base y fuente de una importante cantidad de colorantes. Son compuestos orgánicos polihidroxilados más o menos metilados (posición C-2 o C-3), el estado de oxidación de los átomos de carbono puede variar en un alcohol, aldehído, ácido carboxílico o formar moléculas complejas. Según la posición de los OH tienen actividad como colorante por

sustitución en 1,2 y como laxante en los carbonos 1,8 (Domingo y López, 2003).

- **Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos:** son compuestos que presentan un núcleo esteroideo con sustituyentes del tipo lactónico (α , β , γ) insaturado. De igual manera, presenta una porción glicosídica, sensible en medio ácido (Domingo y López, 2003).
- **Terpenoides o isoprenoides:** se derivan de la fusión de unidades de cinco átomos de carbono conocidas con el nombre de isopreno (C5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En las plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se lleva a cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta Desoxixilulosa fosfato (DXP). Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos (Jiménez, et al., 2003).
- **Flavonoides:** los flavonoides constituyen un grupo amplio de fenoles naturales, se encuentran tanto como agliconas libres o en forma de heterósidos. En la actualidad se conocen más de 2000 de estos compuestos, de los cuales unos 500 se encuentran en estado libre. Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y policétidos. Están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores y frutos (Carrión, y Gómez, 2010).
- **Cumarinas:** son compuestos derivados del núcleo benzopirona como la cumarina, esculetina, umbeliferona y escopoletina. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras. Su mecanismo de

acción antimicrobiana es mediante interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Domingo y López, 2003).

- **Saponinas:** las saponinas son Glicósidos esteroidales con un núcleo espirostano, que presentan la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y producir abundante espuma cuando se agitan sus soluciones acuosas. La hidrólisis con ácidos minerales, divide la molécula en carbohidrato y sapogenina con esqueleto esteroideo o triterpénico (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Taninos:** son compuestos químicos de carácter fenólico con alto peso molecular, que forman con el agua soluciones coloidales. Se distinguen dos grupos básicos de taninos que difieren por su estructura y su origen biogenético, a saber: taninos hidrolizables y condensados (catéquicos). Los taninos hidrolizables por tratamiento con ácido se descomponen en azúcares y ácidos fenólicos, además, son compuestos reductores que forman sales complejas coloreadas con tricloruro de hierro, además, precipitan con acetato de plomo y alcaloides (Shyamala y Vasantha, 2010).
- **Mucílagos:** los mucílagos son considerados un grupo de hidrocoloides, conformados principalmente de polisacáridos y proteínas, que tienen la propiedad de hidratarse al contacto con el agua. Se clasifican en compuestos neutros y ácidos, que precipitan con la presencia de alcohol y metales pesados (Shyamala y Vasantha, 2010).

Compuestos fenólicos son aquellos que presentan en su estructura al menos un anillo aromático con funciones hidroxiladas. Son sustratos muy reactivos a la sustitución aromática electrofílica en las posiciones *orto* y/o *para*, condición ideal para las reacciones de halogenación, nitración, sulfonación, entre otras. En ese sentido, la prueba con tricloruro férrico genera un complejo estable de color azul a violeta, que se origina por el ataque del ion cloruro al hidrógeno del grupo hidróxilo,

provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al ion férrico (Shyamala y Vasantha, 2010).

Extracto

Es una solución preparada en alcohol o glicerina vegetal que permite extraer los diferentes compuestos químicos presentes en una planta. Se elaboran para obtener un concentrado de principios activos y existen como extractos secos y líquidos (Jawetz, 2012).

Extracto vegetal: Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca. Álzate en 1990, descubrió la consistencia ideal que debían tener los extractos, de acuerdo con este aspecto, comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos. Según Corpas y Barriga (1993), la conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:(a) se conservan protegiéndolos de la luz, (b) los envases deben estar bien tapados y (c) es necesario conservarse en un medio ambiente seco (Barreto, 1997).

Extracción

Para la elaboración de medicamentos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido

extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo (Carrión y García, 2010).

Preparación del extracto: En la preparación del extracto de una planta que se disuelve en cualquier solvente, es necesario realizar una evaporación del líquido excedente y/o extracciones repetidas del mismo líquido hasta obtener la mayor cantidad de la muestra por agotamiento del solvente. En los extractos sólidos o secos se hace una evaporación total (Jawetz, 2012).

Tipos de extracción

Percolación: Proceso físico para la obtención de extractos vegetales líquidos mediante el flujo de disolventes. A menudo se hace fluir un disolvente orgánico o agua a través de plantas o partes de plantas. Este tipo de extracción se realiza en recipientes (percoladores) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95% de sustancias extraíbles).

Maceración: consiste en la obtención de extractos, gracias al duradero tiempo de contacto con solvente y el material vegetal, este debe estar pulverizado o molido para lograr una mayor superficie de contacto con el solvente, este proceso es realizado a temperatura ambiente. Es conveniente realizar agitaciones frecuentes para la homogenización del procedimiento y así tratar de influenciar el rendimiento de la extracción, el poder de extracción del solvente va disminuyendo a medida que pasa el tiempo de contacto con el material vegetal; para la realización de este tipo de extractos es conveniente la protección del recipiente de extracción de la luz solar, ya que esta puede llegar a descomponer sustancias foto lábiles. Después de la realización del

extracto por medio de un filtrado es necesario lavar el material vegetal restante con más solvente para la obtención del extracto total (Valenzuela, 2004).

Digestión: Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60° C". Al aumentar mediante la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos. (Selles, 1992).

Infusión. Consiste en colocar la planta en agua hirviendo para obtener su extracto de forma similar a cuando se prepara un té casero, pero para producción industrial. Es un método utilizado para plantas sensibles a la degradación térmica, como el té verde o la manzanilla. Utilizado frecuentemente en la preparación del té casero, pero en grande escala (Jawetz, 2012).

Decocción: denominado también como reflujo, es un método en el que el líquido extractor entra en estado de ebullición junto con la planta. Se recomienda para extraer las propiedades de las partes más rígidas de las plantas como raíces, tallos y semillas (Carrión y García, 2010).

Soxhlet: es un proceso físico continuo que sirve para extraer ingredientes solubles de los sólidos. Es un aparato diseñado para la extracción total de los principios activos de las plantas medicinales. Se pueden obtener extractos muy concentrados ya que el disolvente realiza más de diez extracciones sucesivas sobre la misma planta. El disolvente que se utiliza es alcohol de caña o remolacha, que se recupera después de cada proceso para ser utilizado de nuevamente en futuras extracciones. Los extractos que se obtienen son de gran calidad y los principios activos se pueden concentrar hasta diez veces eliminando el alcohol. (Selles, 1992).

Antibióticos

Etimológicamente viene del griego anti: “contra” y bios: “vida”. Sustancia química producida por un ser vivo o elaborada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos por su acción bacteriostática y/o bactericida. (Moran, 2014).

Bacterias

Tal como lo expresan Munrray y Rosenthal en la cuarta edición de Microbiología Medica del año 2002, una bacteria es un microorganismo de estructura simple, de tipo procariota (unicelular) provista de membrana celular, mitocondrias, retículo endoplasmático, generando que su producción sea por la vía asexual. A pesar de esto si poseen pared celular, la cual es bastante compleja y permite que se clasifiquen como Gram positivas o Gram negativas. Según su composición algunas no poseen dicha pared por lo cual solo pueden lograr sobrevivir en el interior de la célula hospedadora y manteniéndose en un medio hipotónico. Pueden tener morfologías diversas de cocos o bacilos, su clasificación basada en la pared celular permitirá distinguirlas debido a que cada una tomará una pigmentación diferente a la hora de la coloración (Beveridge, 2001).

Características generales de las bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que, además, no poseen un núcleo. Suelen medir alrededor de un micrómetro, aunque se han encontrado algunas bacterias realmente gigantes, las cuales han llegado a medir cerca de un milímetro, presentando así diversas formas incluyendo esferas (coco), espirales (espirilos) y otras con forma de bastoncillo (bacilos).

Las bacterias generalmente poseen una pared celular y uno o varios flagelos que utilizan para desplazarse por el entorno, esta capacidad de movilidad les otorga un gran beneficio ya que pueden moverse hacia zonas más favorables para su crecimiento, donde las condiciones o la disponibilidad de alimento son mejores. Las bacterias pueden clasificarse como aerobias, las cuales requieren oxígeno para respirar, y otros como anaerobias, lo que significa que pueden vivir en ausencia de oxígeno e incluso mueren en presencia de oxígeno (Moyes, et al., 2009).

Bacterias Gram positivas: Las bacterias Gram positivas retienen el colorante cristal violeta y la tinción azul oscura o púrpura durante el proceso de tinción de Gram. Una de las características primarias que clasifica a una especie de bacterias como Gram positivas es la ausencia de una membrana externa, poseen una capa gruesa de varios niveles compuesta de peptidoglicano y que forma algo similar a una malla de azúcares y aminoácidos, esta capa es parte de su pared celular. También carecen de espacio periplásmico, que es un espacio entre las membranas interna y externa. Además, las bacterias Gram positivas se clasifican por su alta resistencia a la ruptura física. (Moyes, et al., 2009).

Bacterias Gram negativas: Las bacterias se clasifican como Gram negativas si poseen una membrana externa y una capa delgada, de un solo nivel, de peptidoglicano. Durante el proceso de tinción de Gram las bacterias reaccionan decolorándose para aceptar la tinción de safranina, hasta obtener un color rojo. Poseen una baja resistencia a la ruptura física y una baja resistencia al secado (Moyes, et al., 2009).

Tinción de Gram: Es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en

dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas (Beveridge, 2001). Fue desarrollada por el científico Hans Christian Gram en 1884; hoy en día, sigue siendo una de las tinciones utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta (Kaplan, 1993). En microbiología clínica resulta de gran utilidad, ya que a partir de muestras clínicas directas provenientes de sitios estériles se puede saber de manera rápida las características de la muestra y hacer una diferencia de los potenciales microorganismos causantes de una infección (Nagata, 2010).

Actividad antimicrobiana

Se refiere a toda sustancia ya sea natural o sintética capaz de eliminar e inhibir el crecimiento bacteriano sin incurrir en el daño del organismo que las porta siendo estas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos y virus) sintetizados por métodos de laboratorio. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Jawetz E, 2012).

Microorganismos utilizados en el estudio

***Staphylococcus aureus*:** El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa que es una enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre (Cervantes, García, y Salazar, 2014).

***Enterococcus faecalis*:** Microorganismo que forma parte de la microbiota de las vías intestinales y biliares, pero recientemente fue clasificado en su propio género denominado *Enterococcus*. Son microorganismos anaerobios facultativos, inmóviles, catalasa negativo o débilmente positivo con capacidad para fermentar glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido láctico, pero sin gas. Además, presentan capacidad para formar biopelículas. Los *Enterococcus* se diferencian de los *Streptococcus* en que pueden crecer en un rango de temperatura de 10°C a 45°C, estos son cocos de tamaño 0,6-2,0 × 0,6-2,5 µm, Gram positivos que se distribuyen en cadenas cortas o en pares y no forman esporas (Moreno, 1988).

***Escherichia coli*:** Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta Bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

***Klebsiella pneumoniae*:** Esta especie, está provista de una cápsula prominente que le confiere el aspecto mucoso a las colonias aisladas y mayor virulencia *In Vitro*. Se encuentra implicada de forma poco frecuente en patologías respiratorias como neumonía lobular primaria, donde la bacteria destruye y necrosa los espacios alveolares provocando la formación de cavidades y producción de esputo hemoptísico y en algunos casos en infecciones del tracto urinario, heridas y tejidos blandos (Moreno, 1988).

***Candida albicans*:** *Candida albicans* es un hongo dimórfico que se desarrolla de forma distinta según la temperatura de crecimiento; por su dimorfismo puede presentarse como levadura y hongo. Este suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura (Samsom, 1990).

Resistencia bacteriana

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. Son las bacterias, y no los seres humanos ni los animales, las que se vuelven resistentes a los antibióticos. Estas bacterias fármaco resistentes pueden causar infecciones en el ser humano y en los animales y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes (OMS, 2018).

Técnicas para determinar la actividad antibacteriana

Para la valoración y evaluación de la actividad antimicrobiana de una sustancia de origen vegetal se utilizan diversos métodos, los cuales se rigen por diversos factores: técnicas de ensayo, el medio de cultivo y el material biológico o vegetal. La apropiada selección y uso de un agente antimicrobiano están basados en las características del organismo etiológico y en el patrón de susceptibilidad, el huésped y el fármaco. Los antibiogramas son reportes de test de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos y están indicados para cultivos bacterianos clínicamente relevantes (por ejemplo: fluidos normalmente estériles o sitios clínicamente infectados) cuando la susceptibilidad no puede ser predicha (López, et al., 2005).

La determinación de la concentración mínima inhibidora (**CMI**) es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica, en donde es necesario utilizar cepas de control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método ofrece diferentes niveles de sensibilidad, tales como:

- **Sensible (S):** si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- **Intermedia (I):** cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología). En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana, no sólo para hallar la potencia sino también la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos.
- **Resistente (R):** si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida, no es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuera el tipo de tratamiento (López, García, y Rojas, 2005).

Métodos para determinar la actividad antimicrobiana en extractos

Para la evaluación y valoración de una sustancia de origen vegetal se utilizan diversos métodos, los cuales se rigen de acuerdo a las técnicas de ensayo, método de cultivo, material biológico y vegetal (Janssen, et al.,1987).

Método de difusión en agar según Kirby-Bauer: es un método muy utilizado para el estudio de la sensibilidad de las bacterias, se basa principalmente en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco con un antimicrobiano que difunde en un medio sólido. La bacteria es sembrada en una superficie con un medio de cultivo, sobre el que se depositan unos discos de papel cargados con cierto antibiótico que difunde instantáneamente por el agar, formándose un gradiente de concentración alrededor del agar. Cuando el microorganismo crece se forman unos halos de inhibición, que luego son comparados con valores de referencia y se evalúa la sensibilidad (Blanco, 1998).

Método de difusión con pozos: Emplea placas de Petri estériles con agar Mueller Hinton[®] sin solidificar. A cada placa se le perforan cinco pozos de cuatro milímetros de diámetro, luego se inoculan las placas perforadas por medio de hisopos tomando una pequeña cantidad de la colonia bacteriana, posteriormente se añade el extracto en los pozos y se sellan con agar Mueller Hinton[®]. Luego de un período de incubación determinado, se realiza la lectura, donde un resultado positivo (+) está dado por la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del pozo, en caso contrario se considera negativo (-) o resistente (Blanco, 1998).

Método de dilución en medio líquido: la dilución en medio líquido es una técnica en la que se prueba una suspensión de bacterias de una concentración predeterminada, óptima y apropiada frente a varias concentraciones de un agente antimicrobiano (normalmente mediante diluciones seriadas dobles) en un medio líquido de formulación documentada y predeterminada. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 mL (macro dilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de micro titulación (micro dilución) (Forbes, 2007).

Método de dilución en medio sólido: la dilución en medio sólido implica la incorporación de concentraciones variadas de agentes antimicrobianos, en un medio solidificado con agar, utilizando generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. A menudo, los resultados derivados de estos ensayos se consideran como los más fiables para la determinación del valor **CMI** para una determinada combinación bacteria/antimicrobiano en una prueba concreta (Forbes, 2007).

Método de E-Test: consiste en aplicar sobre un medio de cultivo, donde se encuentra el microorganismo de referencia inoculado, unas tiras plásticas que llevan incluidas un gradiente de concentración de un determinado antibiótico, luego se incuba por 24 horas a temperatura de 37 °C, donde se evidenciará el

halo de inhibición en forma de elipse llegando hasta el marcador de la concentración del antibiótico (Koneman, et al., 2006).

Hipótesis

Una vez revisado la situación actual del problema de investigación, así como, los antecedentes previos y las bases teóricas, se plantea la siguiente hipótesis: ¿Existe relación entre la actividad antimicrobiana y los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de la especie *Crinum erubescens*?

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Según Hurtado (2010), los tipos de investigación están relacionados con el logro esperado durante el proceso de investigación. Un tipo de investigación proyectiva, consiste en la elaboración de una propuesta, un plan, un programa o un modelo, como solución a un problema o necesidad de tipo práctico, ya sea de un grupo social, o una región geográfica o en área particular del conocimiento. La investigación proyectiva involucra creación, diseño, elaboración de planes o de proyectos; sin embargo, no todo proyecto es investigación proyectiva. Para que un proyecto se considere investigación proyectiva, la propuesta debe estar fundamentada en un proceso sistemático de búsqueda e indagación que requiere la descripción, el análisis, la comparación, la explicación y la predicción.

A partir del estadio descriptivo se identifican necesidades y se define el evento a modificar; en los estadios comparativos, analítico y explicativo se identifican los procesos causales que han originado las condiciones actuales del evento a modificar, el estadio predictivo permitirá identificar tendencias futuras, probabilidades, posibilidades y limitaciones. En tal sentido este tipo de investigación fue proyectiva; ya que evaluó y exploró la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la especie de *C. erubescens*.

Diseño de la Investigación

Hurtado (2010), describió que el diseño de la investigación se debe determinar a través de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una

cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. Por ello se estipula que esta investigación adoptó un diseño mixto, es decir por un lado una investigación de campo ya que se recolectaron los datos directamente del sujeto involucrado con la unidad de estudio y por otro lado una investigación experimental; ya que dichos datos se llevaron al laboratorio B de Productos naturales “Antonio Morales”, ubicado en el instituto de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Población y muestra

Según Hurtado (2010), La población de una investigación está constituida por el conjunto de seres en los cuales se va a estudiar el evento, y que además comparten, como características comunes los criterios de inclusión; es la población a quien estará referida las conclusiones del estudio.

La población en este estudio fue la especie *Crinum erubescens* perteneciente a la familia Amaryllidaceae.

Por otro lado, Hurtado (2010) afirma que: “La muestra es una porción de la población que se toma para realizar el estudio, la cual se considera representativa”. La muestra se obtuvo del extracto metanólico de la especie *Crinum erubescens* donde se pudo apreciar sus propiedades antibacterianas.

Sistema de variable

Según Fidias Arias (2012), en su libro proyecto de investigación, expresa que una variable es una característica o casualidad, que puede sufrir cambios y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación. A sí mismo para llevar a cabo la siguiente investigación se presentaron las siguientes variables:

Variables independientes: son las causas que generan y explican los cambios en la variable dependiente (Arias, 2012). En el caso particular el objeto de estudio se define como variable independiente: La composición química del extracto metanólico de la especie *Crinum erubescens*, la cual será la causa.

Variables dependientes: Arias en el 2012, las define como; aquellas que se modifican por acción de la variable independiente. Constituyen los efectos o consecuencias que se miden y que dan origen a la investigación. En la actual investigación se define como variable dependiente la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la especie *Crinum erubescens*.

Procedimiento de la investigación

Material botánico:

Muestra: Bulbo, hojas, tallo de la especie *Crinum erubescens*.

Recolección

El material botánico se recolectó en La Mucuy baja, Municipio Santos Marquina del Estado Mérida, ubicado a 1898 m s. n. m. Una muestra representativa fue entregada al Profesor Pablo Meléndez para su correspondiente identificación y clasificación botánica, posteriormente un voucher espécimen identificado como JR 68 de la especie fue depositado en el Herbario “Dr. Luis Ruíz Terán” (MERF), Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en Mérida, Venezuela.

Preparación del material vegetal: el material vegetal recolectado fue seleccionado con la finalidad de eliminar impurezas y partes en

descomposición (tallos, hojas y frutos). El material vegetal reservado para la obtención de los extractos de *Crinum erubescens*, se secó en un horno eléctrico ubicado en el herbario MERF a una temperatura no superior a 40°C, durante al menos 72 horas. Transcurrido este tiempo, se verificó que las muestras se encontraran libre de humedad y quebradizas al tacto, para luego realizar un proceso de molienda hasta obtener un tamaño de partícula que traspasara un tamiz de malla número 20. La muestra se pesó, envasó, rotuló y colocó en un lugar seco y fresco.

Métodos

Extracción por Maceración del Material Vegetal: El material vegetal seco y molido de *Crinum erubescens* se sometió a extracción por maceración en frío, usando como solvente metanol, durante un periodo de 10 días dividido en dos ciclos. Esta técnica de extracción sólido-líquido, consiste en colocar la muestra en un envase con tapa, junto con el solvente orgánico hasta lograr la saturación del mismo y luego ser sustituido, a los 5 días por un nuevo volumen de solvente. El mismo se realizó en el laboratorio B de Productos Naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Janne Rojas y Dr. Alexis Buitrago.

Filtración del Extracto Metanólico y Concentración: Transcurrido el período de maceración, se procedió a la filtración por gravedad. Procedimiento que consistió en utilizar un embudo cónico que contenía un papel de filtro con tamaño de poro adecuado, lo que permitió en forma simultánea retener la muestra sólida y dejar fluir el extracto metanólico. El extracto metanólico de *Crinum erubescens* se concentró destilando el metanol a presión reducida,

mediante el uso de un rotavapor a una temperatura no superior de 40-50°C. El producto seco obtenido fue pesado y rotulado.

Tamizaje Fitoquímico: el estudio fitoquímico para el extracto de *Crinum erubencesn*, se realizó con el propósito de identificar en forma cualitativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios, tales como; alcaloides, cumarinas, compuestos flavonoides, fenólicos, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, taninos y mucilagos. Los diferentes procedimientos de análisis colorimétricos reportados se realizaron como se describen a continuación:

Tabla 1: Tamizaje fitoquímico en el extracto de la especie *Crinum erubencens*.

Detección de	Prueba	Procedimiento	Resultado
Alcaloides	Wagner	Se adicionaron 2 gotas del reactivo	Precipitado color rojo pardo
	Mayer		Precipitado color blanco a amarillo
	Dragendorff		Precipitado color rojo o anaranjado
Cumarinas	NH ₄ OH	Se adicionaron 2 gotas de la base débil.	Fluorescencia de color azul, verde o amarillo a una longitud de onda de 365 nm.
Mucilagos	Enfriamiento de 0- 5 °C	Se enfrió a una temperatura de 0- 5 °C	Consistencia gelatinosa (Mucilago).

Rojas, Paredes (2023).

Tabla 1: Tamizaje fitoquímico en el extracto de la especie *Crinum erubescens*. (Continuación).

Detección de	Prueba	Procedimiento	Resultado
Flavonoides	Pew's	Se añadieron 2 a 3 gotas del ácido y una porción del polvo	Color purpura a rojo cereza (dihidroflavonas). Color rosa a café flavononas y dihidrochalconas.
	NaOH 10 %	Se añadieron 3 gotas de la base fuerte	Color amarillo a rojo (xantonas y flavonas).
	Shinoda	Se añadieron 2 gotas del ácido	Color anaranjado a rojo (flavonas). Color rojo (flavonoles). Color magenta (flavononas)
Compuestos fenólicos	FeCl_3	Se añadieron 3 gotas del acetato, se neutralizó con 3 gotas, la sal férrica en solución fisiológica	Color rojo vino, verde o azul (compuestos fenólicos)
Taninos	Gelatina 1 %	Se añadieron los extractos a una solución gelatinada 1 %.	Formación de un precipitado blanco.
	Gelatina (1%)- sal (10%)		
	FeCl_3 10 %		
	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 %		

Rojas, Paredes (2023).

Tabla 1: Tamizaje fitoquímico en el extracto de la especie *Crinum erubescens*. (Continuación).

Detección de	Prueba	Procedimiento	Resultado
Triterpenoides y esteroides	Lieberman-Burchard	Se añadieron 2 gotas del ácido débil, con 2 gotas del ácido fuerte	Interface de color azul o verde (esteroides). Color amarillo anaranjado (triterpenoides)
Vainillina y H₂SO₄ concentrado	Vainillina y H ₂ SO ₄	Se añadieron 2 gotas del reactivo con 2 gotas del ácido fuerte	Interface de color violeta (triterpenoides)
Prueba de Salkowski (esteroides)	H ₂ SO ₄ concentrado	Se adicionaron lentamente 2 mL del ácido fuerte	Interface de color marrón rojizo (anillo esteroideo)
Glicósidos y cardiotónicos	Reacción con hidróxido de sodio	Se añadieron 5 gotas de la base	Color amarillo (glicósidos)
Saponinas	Prueba de la altura de la espuma	El extracto acuoso se procedió a agitar vigorosamente	Altura de la espuma entre 8 y 10 mm, estable por 30 minutos
	NaHCO ₃	Se añadió 3 gotas de la sal y se agito vigorosamente durante 3 minutos	La formación de espuma en forma de panal de abeja (saponinas)

Rojas, Paredes (2023).

Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto: la evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profa. Luisa Vizcaya", del Departamento

de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo, empleando el método de difusión en agar con discos de papel. Para el ensayo se utilizaron bacterias y levaduras de referencia internacional, tales como: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (CDC-B385). El método empleado permitió medir la susceptibilidad *In Vitro* de las bacterias patógenas frente a una sustancia o mezcla de sustancias de origen vegetal (Velasco, et al., 2007). El protocolo experimental para esta investigación, se presenta a continuación:

Preparación de las placas de Petri: para las bacterias se depositó aproximadamente 20mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri, y para las levaduras 20mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®), suplementado con 2% p/v de glucosa y azul de metileno (0,05µg/mL). Una vez solidificada la placa, se realizaron los controles de esterilidad y se conservaron a 4°C hasta el día del ensayo.

Adecuación de los discos: los discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro correspondientes a los ensayos con el extracto, fueron impregnados con 20µL de la solución a una concentración de 500 mg/mL usando como solvente metanol, los mismos fueron esterilizados bajo luz UV durante 90 minutos previo al ensayo.

Preparación del inóculo: los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85% p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müller-Hinton, y las levaduras a partir de agar Sabouraud dextrosa con Cloranfenicol®, hasta lograr una turbidez correspondiente al

patrón de Mc Farland N° 0,5 ($1 \times 10^{6-8}$ UFC/mL) para las cepas bacterianas y en el caso de las levaduras al patrón de Mc Farland N°1 ($1 \times 10^{6-8}$ UFC/mL).

Inoculación: en el caso de las cepas bacterianas, una vez preparado el inóculo para cada microorganismo, se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril. Por otra parte, las levaduras una vez preparado el inóculo para cada microorganismo, se mezcló 1mL del mismo en 20mL de agar Mueller-Hinton modificado, mezclando en forma envolvente con la finalidad de depositarlos en placas de Petri. Luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro previamente impregnados con el extracto, además, se colocaron discos de papel de filtro impregnados con el control negativo (solvente), así como también, los fármacos de referencia para cada microorganismo, como controles positivos.

Incubación: los medios de cultivo con los extractos solubles y sus controles negativos (solventes), se pre incubaron durante 18 h a 4°C y luego a 37°C durante 24 a 48 h.

Lectura de los ensayos: se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 24 y 48 h. El diámetro de la zona de inhibición se expresó en milímetros (mm). La prueba se consideró negativa cuando se observó crecimiento microbiano alrededor del disco al igual que los controles negativos.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM): solo se determinó la CIM contra los microorganismos que presentaron susceptibilidad al extracto. Para determinar la CIM se prepararon diluciones en el solvente apropiado a diferentes rangos de concentración, luego se impregnaron los discos de papel de filtro con 20µL de cada solución.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2, se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado en la especie *Crinum erubescens*, notándose una gran variedad de compuestos fenólicos con la prueba de cloruro férrico, el cual, mostró un color negro azulado indicando su positividad. Los alcaloides fueron detectados al dar reacción positiva frente al reactivo de Dragendorff, mostrando un precipitado color naranja. La presencia de flavonoides se observó al dar positiva la prueba con el reactivo de Shinoda, los cuales, dieron (coloración naranja) y con el reactivo de Pew's mostrando un color púrpura (dihidroflavonas) y rosa café (flavononas). Así mismo, se determinaron xantonas y flavonas mediante la reacción con hidróxido de sodio.

Por otra parte, otros metabolitos encontrados en la especie en estudio son los glicósidos dando positividad para la reacción con hidróxido de sodio al mostrar una coloración amarilla. Respecto a los triterpenoides y esteroides, dieron reacción positiva con el reactivo de Liebermann-Burchard dando coloraciones de azul o verde (esteroides), y color amarillo-anaranjado para (triterpenoides).

De igual modo, se detectó la presencia de taninos, los cuales, dieron precipitado blanco al reaccionar con gelatina. Las saponinas fueron detectadas al dar positivo en la formación de espuma mediante la reacción de (NaHCO_3) . Además, los reactivos Vainillina y H_2SO_4 concentrado dieron reacción positiva para (triterpenoides) y la reacción de Salkowski para (esteroides). En el presente estudio no se observó la presencia de cumarinas y mucilagos.

Tabla 2. Determinación cualitativa de los compuestos químicos presentes en la especie *Crinum erubescens*.

Metabolitos secundario	Pruebas	Ce
Quinonas Antraquinonas	NH ₄ OH CONC	+++
	H ₂ SO ₄ CONC	+++
Glucósidos y Glicósidos Cardiótonicos	NaOH CONC	+++
	Keller Killiani	-
Esteroides	Salkowski	++
Triterpenoides	Vainillina	++
	H ₂ SO ₄ CONC	
Flavonoides	Pew's	+++
	NaOH 10 %	+++
	Shinoda	++
Taninos	Gelatina 1 %	+
	Solución gelatina-NaCl	++
	K ₃ Fe(CN) ₆	+
	FeCl ₃ 10%	++
Saponinas	Altura de espuma	+++
	NaHCO ₃	++
Alcaloides	Dragendorff	+++
Cumarinas	NH ₄ OH	-
Mucilagos	Enfriamiento 5 %	-
Fenoles	FeCl ₃ 5 %	+
	NaCl 0,9 %	+

Ce: *Crinum erubescens*, Ausente (-), Bajo (+) Moderada (++) , Abundante (+++)

En un estudio previo para la evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica *In Vitro* de *Crinum x amabile*, según (Portero, 2017), demostró

mediante la prueba de Libermann-Burchard evidencia de triterpenos y esteroides, marcando elevada presencia en las hojas, contrario con el bulbo, en el cual, no se encontraron presente alguno de estos. Además, en el ensayo con cloruro férrico se detectaron fenoles y taninos en las hojas, sin embargo, estuvieron ausentes en el bulbo.

Según Marmolejo 2018, se identificó de forma cualitativa la presencia de alcaloides, flavonoides en la fracción alcohólica y acuosa de la especie *Crinum amabile*, donde se encontraron también, otros tipos de metabolitos; tales como triterpenos, compuestos grasos, saponinas, catequinas, lactonas, aceites y azúcares reductores.

Por otro lado, el autor Elsevier B.V. (2015), en su investigación "Alcaloides de *Crinum erubescens* Aiton" identificó ocho alcaloides en las hojas frescas de *Crinum erubescens* (Amaryllidaceae), donde elució el alcaloide 1-epidemetilbowdensina, a través de la técnica de GC-MS. En este estudio se reportó por primera vez y fue completamente caracterizado por métodos físicos y espectroscópicos.

Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de *Crinum erubescens*. La actividad antibacteriana del extracto fue ensayada por medio de la técnica de difusión en agar con disco de papel. El extracto de la especie *Crinum erubescens* fue probado en este estudio frente a cepas control ATCC (Tabla 3).

Tabla 3: Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de *Crinum erubescens*.

Microorganismos	C.e	Zona de inhibición(mm)					CIM (µg/ mL)
		Antibióticos					
		LI	VA	CE	AZ	PI	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	9	48					100
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	NA		22				NE
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	NA			36			NE
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA				45		NE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA					25	NE
<i>Candida albicans</i> (CDC-B385)	NA						NE

LI: Liezolid® (30 µg: OxoidTM), VA: Vancomicina® (30µg), CE: Cefuroxima® (30µg), AZ: Aztreonan® (30µg), PI: Piperacilina® (30 µg), FI: Fluconazol® (100 µg), VR: Voriconazol® (400 µg/mL), CIM: Concentración mínima inhibitoria, NA: No activo, NE: No ensayado, *mm: de los halos de inhibición (disco de 6 mm de diámetro) promedio 2 ensayos.

Los extractos obtenidos de la especie *Crinum erubescens* se sometieron a pruebas de susceptibilidad antibacteriana frente a diferentes cepas ATCC. Los microorganismos en estudio fueron: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Candida albicans* (CDC-B385). El extracto metanólico de la especie en estudio no mostró actividad antimicrobiana frente a cinco de estos microorganismos, presentando actividad frente a *Staphylococcus aureus*, donde se obtuvo una CIM de 100 µg/mL con un (halo de inhibición de 9 mm). Como control positivo para este microorganismo se utilizó Liezolid® (30 mg). En la tabla 3. Se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de la Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de la especie *Crinum erubescens*.

Por otra parte, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el extracto metanólico de *Crinum erubescens* presenta actividad similar a la obtenida en estudios previos. En este sentido, (Rojas, et al., 2021), reportaron el análisis fitoquímico del extracto metanólico de los bulbos concentrados de la especie *Crinum moorei* Hook F. En este estudio observaron la presencia de diversos compuestos oxigenados del tipo glicósidos, flavonoides, esteroides triterpenoides, taninos y saponinas, así como bajas proporciones de alcaloides y la ausencia de mucílagos. Además, el ensayo antibacteriano, realizado por el método de difusión en agar con discos frente a bacterias de referencia internacional, reveló efecto inhibitorio del desarrollo de las bacterias grampositivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, con valores de concentración inhibitoria mínima de 100 µg/mL y 500 µg/ml.

De igual forma, (Akintola, et al., 2016), reportaron la actividad antimicrobiana realizada por el método de difusión en agar con pozos del extracto metanólico crudo y sus diferentes fracciones (hexano, acetato de etilo y metanol) obtenidas de los bulbos de *C. jagus*, quienes señalan que el mismo mostró amplio espectro al inhibir bacterias y hongos. El extracto metanólico crudo fue activo frente a *S. aureus* y *Bacillus subtilis* a una concentración de 6,25 mg/mL, mientras que frente a las bacterias gramnegativas *P. aeruginosa*, *S. Typhi* y *K. pneumoniae*, fue de 50 mg/mL, 25 mg/mL y 6,25 mg/mL, respectivamente. Además, fue activo contra las especies de *Candida* ensayadas (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) y los mohos *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Penicillium notatum*, los valores de concentración oscilaron entre 50 y 200 mg/mL.

Del mismo modo, (Santos Gonzales, et al 2018) evaluaron actividades biológicas del extracto clorofórmico de los bulbos de *Sprekelia formosissima* (lirio azteca) donde, se encontró evidencia de actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 50,000 ppm y 100,000 ppm, con zonas de inhibición de 9,0 mm y 10 mm, respectivamente. El extracto también mostró inhibición contra *E. coli*, en donde la zona de inhibición más grande

(6,6 mm) se obtuvo a una concentración de 100,000 ppm. Las especies *P. aeruginosa* y *C. albicans* mostraron resistencia al extracto.

Cabe destacar que los resultados obtenidos representan un aporte al estudio de los productos naturales y específicamente a la investigación del potencial biológico de las especies del género *Crinum*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

CONCLUSIONES

El ensayo fitoquímico de los extractos vegetales de la especie *Crinum erubescens* permitió determinar la presencia de metabolitos secundarios tales como alcaloides, flavonoides, saponinas, triterpenoides y esteroides en mayor concentración, y en menor concentración fenoles y taninos; muchos de estos con numerosas propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

Al determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales se evidencia el potencial de muchas especies vegetales, tal es el caso de *C. erubescens* frente a cepas de referencia como: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), la cual mostró sensibilidad, con una CIM 100 µg/mL (halo de inhibición de 9 mm), de igual manera, para las demás bacterias ensayadas no se observó ningún efecto a través de los métodos antes descritos permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de esta especie. La relevancia de la presente investigación se debe a que no existen trabajos previos sobre la composición química y actividad antibacteriana de los extractos de la especie *C. erubescens*; siendo este el primer reporte que puede servir de base para futuras investigaciones sobre otras actividades biológicas.

Recomendaciones

- Continuar con el desarrollo de investigaciones para identificar otros principios activos en las especies del género *Crinum*.
- Desarrollar estudios de tipo etnofarmacológicos para aprovechar el extenso conocimiento de la medicina natural y la riqueza fitoterapéutica.
- Evaluar el extracto de la especie *Crinum erubescens* con otros microorganismos patógenos para aprovechar al máximo sus propiedades antimicrobianas.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIA BIBLIOHEMEROGRÁFIAS

- Akintola A., Maduagwu E., Adegoke A., Kehinde B., Ademowo O. (2017). Actividad antimicrobiana del extracto metanólico crudo y fracciones del bombillo de *Crinum jagus* (LINN) Revista internacional de educación e investigación. 2 (7): 254.
- Ansaloni R., Wilches I., León F., Peñaherrera E., Orellana, A., Tobar, V., De Witte, P. (2010). Estudio preliminar sobre plantas medicinales utilizadas en algunas comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para afecciones del aparato gastrointestinal. Revista Tecnológica-ESPOL, 23(1):211.
- Arias, F. (2004). El proyecto de investigación: introducción a la metodología científica. Caracas, Venezuela: Episteme.
- Barreno , M. y Jair, A. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de *Crinum x amabile*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Barreto, J. (1997). Extractos vegetales. Carrera de Bacteriología, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Batej, A. (2007). La Historia de los Extractos. Bogotá, Colombia.
- Berendsohn, W., Monterrosa, S. (2012). Arbolos Nativos e introducidos del Salvador. Revista Englera 29(2):257-300
- Beveridge, Terry J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. Biotechnic & Histochemistry. 76 (3): 111-118.
- Blanco, R. (1998). *Prontuario microbiológico*. Caracas, Venezuela: Editorial Disinlimed.
- Cabezas, F., Argoti, J., Martinez, S., Codina, C., Bastida, J., y Viladomat, F. (2007). Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. Scientia et technica, 1(33).

- Cabrera, M. y De La Plata, M. (1968). Provincia de Buenos Aires. Flora de la Provincia de Buenos Aires: Pteridófitas, Gimnospermas y Angiospermas Monocotiledóneas (a excepción de Gramineas), 4(1):101.
- Callacondo, D., Quispe, Á., Lindo, S., y Vaisberg, A. (2008). Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* "keto" en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, 25(4): 380-385.
- Cardona, M., Fernández, M., Seoane, E., y Vidal, R. (1986). Nuevas xantonas y xantonolignoides adicionales de *Hypericum canariensis*. Revista de productos naturales. 49(1): 95-100.
- Carrión, A., y García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. 23(1): 417-419.
- Casamayor, P. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. Revista Medisan. 18(10): 1467-1474.
- Castro Alcocer, Gabriel Elías. (2013). Determinación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico de las Hojas y Flores de *Dalea mitisii*. (Tesis de Licenciatura).
- Cervantes, E., García, R., y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio, 61(1): 28-40.
- Chilpa, Ricardo Reyes, & Reyes, Maira Huerta. (2009). Compuestos naturales de plantas de la familia Clusiaceae: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. Interciencia, 34(6): 385-392.
- Crockett, S., y Robson, N. (2011). Taxonomía y quimiotaxonomía del género *Hypericum*. Ciencia y biotecnología de plantas medicinales y aromáticas. 5(1): 1-13.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., y Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles de Ecuador. (1era edición). Ecuador: Espíteme.

- Domingo, D, & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4): 385-393.
- Durst, H Dupont & Gokel, George W. (1985). *Química orgánica experimental*. Barcelona, España: Reverté.
- Epifano, Francesco, Genovese, Salvatore, Menghini, Luigi, & Curini, Massimo. (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68(7): 939-953.
- Errecalde, J. (1996). *Antimicrobiano en leche: Su importancia en Salud Publica*. Boehringer Ingelheim S.A. Buenos Aires, Argentina.
- Escalona, J. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria. (Doctoral dissertation), Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales.
- Fennell, C., y Van, J. (2001). Especies de *Crinum* en la medicina tradicional y moderna. *Revista de etnofarmacología*. 78 (1):15-26.
- Fernández, J., Hernández, J., Lucena, M. (2016). Definición operacional de las variables. (Proyecto de investigación). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes.
- Forbes, B. (2007). *Diagnóstico microbiológico* (12a ed.). Madrid, España: Edición. Médica Panamericana S.A.
- Fuentes, V., y Granda, M. (1997). *Conozca las plantas medicinales: La Habana*. (2a ed.). Cuba: Edit. Scientific-Técnica.
- Gallego, A., Torres, F., Robledo, S., Vélez, I., Carrillo, L., Munoz, D., y Valencia, L. (2006). Actividad leishmanicida y tripanocida de acacia *farnesiana*, *piper arieianum*, *P. subpedale*, *sphagnum recurvum* y *vismia baccifera subsp. ferruginea*. *Actual Biol*, 28(84): 39-49.
- Gallegos, M., (2015). Las plantas medicinales: usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo. (Trabajo de investigación). Facultad De Medicina. Babahoyo, Ecuador: Universidad Nacional Mayor De San Marcos.

- Garity, G. (2004). Bacteriology. *Klebsiella* spp. Washington, D.C. Second edition Page.73-75.
- Gastaldi C., Belen, N., Andrade P., Díaz, V., Binns, F., Souza, W., Viladomat, F., y Bastida, J. (2015). Alcaloides de *Crinum erubescens* Aiton. Revista árabe de química. 28 (6): 529-536.
- Gastaldi C., Belen, N., Andrade P., Díaz, V., Binns, F., Souza, W., Viladomat, F., y Bastida, J. (2015). Alcaloides de *Crinum erubescens* Aiton. Revista árabe de química. 9(5): 688-693.
- Gómez, A., y Valcárcel, M. (1988). Técnicas Analíticas de Separación (1 ed.). Barcelona, España: Reverté SA.
- Gómez, R., Espitia, C., Campos, M., Guzmán, S., Segura, E., Echeverría, G., Reyes, R. (2015). Actividad antimicrobacteriana y transcriptasa inversa del VIH-1 de especies de plantas Julianaceae y Clusiaceae de México. Medicina alternativa y complementaria basada en la evidencia.6(1): 688-693.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2010). Metodología de la investigación. México: Mc Graw Hill Interamericana.
- Hernández, R., Fernández, C., y Batista, P. (2010). Metodología de la Investigación (5ta ed.). México: Editorial Mc Graw Hill.
- Hurtado, J. (2010). Metodología de la investigación. Guía para la comprensión Holística de la ciencia. 4a edición. Bogotá, Colombia: Quirón Ediciones SA Cooperativa Editorial Magisterio. Caracas, Venezuela: Ciea-Sypal.
- Hurtado, J. (2010). Guía para la comprensión holística de la ciencia. Caracas, Venezuela: Fundación Sypal.
- Hurtado, J. (2010). Metodología de la investigación. Caracas, Venezuela: Fundación Sypal.
- Jawetz, E. (2012). Quimioterapia Antimicrobiana. Manual de Microbiología Médica. México, DF. Editorial El Manual Moderno. Pp. 44-53.

- Jiménez, G., Sepúlveda, D., Porta, H., y Sosa, M., (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Kaplan, M., y Kaplan, L. (1933). La tinción de Gram y la tinción diferencial. *Revista de bacteriología*, 25(3):309.
- Koneman, E., Allen, S., y Dowell, V. (2006). *Diagnóstico Microbiológico* (6ª ed.). México DF: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia*. Ediciones Omega S.A. España, Barcelona. Pp. 169-171.
- Linnaeus, C., (1753). *Species Plantarum* .2(1): 291–292.
- McCurry, John, Consuelo H., y Pozo, V. (2008). *Química orgánica* (Vol. 5): Cengage Learning México, DF.
- Mederos, K. (2019). *Revista Naturaleza tropical*. 6(1):11.
- Meerow, A. y Snijman, D., (1998). *Amaryllidaceae*. Kubitzki, K. Las familias y géneros de vasculares plantas. Plantas con flores monocotiledóneas. Springer-Vernag. 3 (1): 83-110.
- Morán, A., (2014). *Antibióticos*. Dciencia ciencia para todos. Madrid, España. Página web: <https://www.dciencia.es/antibioticos/es>.
- Moreno, A. (1988). *Bacteriología y Virología Básica*. Carcasa, Venezuela: Editorial Venezolana C.A.
- Mossman, Tim. (1983). Ensayo colorimétrico rápido para crecimiento y supervivencia celular: aplicación a ensayos de proliferación y citotoxicidad. *Revista de métodos inmunológicos*, 65(1-2):55-63.
- Moyes, R., Reynolds, J., Breakwell, D., (2009). Tinción diferencial de bacterias: tinción de Gram. *Protocolo actual Microbiología*. Revista internacional de investigación y revisión. 10(9): 336-341.
- Muñoz, A. (2000). *Evolución de los extractos de plantas*. Evolución de las plantas medicinales. Buenos Aires, Argentina.
- Muñoz, J. (2010). *Las plantas medicinales de la flora de la provincia de Entre Ríos*, Argentina: Ed. de la Univ. Nacional de Tucumán.

- Murray, P., y Pfaller, M. (2009). Microbiología médica (5ta ed.). España: Editorial Elsevier.
- Nagata, K., Mino, H., y Yoshida, S. (2010). Usefulness and limit of Gram staining smear examination. *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology*, 58(5): 490-497.
- Nepomuceno, J., y Salgueiro, M. (2011). Potencial alelopático de *Crinum americanum* bajo diferentes condiciones de extracciones. *Revista Ciencias Agrícolas*, 32(2): 465-4.
- Rivero, R. (2010). Cátedra de Farmacognosia y productos Naturales. Facultad de Química. Montevideo, Uruguay. Pp. 12-13.
- Rojas, J., Buitrago, A., Possamai, L., Timmers, L., Tallini, J. (2021). Perfil de alcaloides y actividad inhibidora de colinesterasa de cinco especies de la familia Amaryllidaceae recolectadas en el estado Mérida-Venezuela. *Revista Sudafricana de Botánica*, 136: 126-136.
- Shelles, F. (1992). Farmacia galénica. (1era Edición). Madrid, España: Selsea.
- Shyamala, S. y Vasantha K., (2010). Eliminación de radicales libres y actividad antioxidante de las hojas de Agathi (*Sesbania grandiflora*). *Revista americana-eurasiática de investigación científica* 5 (2):114-119.
- Taşkaya, A., Turan, M., y Değerli, Y. (2023). Estudio preliminar sobre el potencial antioxidante y antimicrobiano de los extractos de etanol de Celak de la familia Amaryllidaceae. *Revista de ciencia y tecnología*. 16(2):423-435.
- Torres, C. (2004). Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mutis – Subdirección Científica. Bogotá D. C.
- White, L., Foster, S., y Staff, H. (2004). El Recetario Herbario: Las mejores alternativas naturales a los medicamentos. Emmaus: PA: Rodale Books.