



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE LOS BULBOS DE *Crinum moorei* (Linn.) EN
CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Licenciados en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

María Fernanda García Cañizalez

C.I: V- 21.366.884

Nureidy Rico Luna

C.I: V- 23.493.978

Tutor:

Doctor. Alexis A. Buitrago D.

Cotutor:

PhD. Janne Rojas

Mérida, marzo de 2021



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LOS BULBOS DE *Crinum moorei* (Linn.) EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL

Autoría: María Fernanda García Cañizalez C.I 21.366.884
Nureidy Rico Luna C.I 23.493.978

Resumen

Desde hace tiempo las plantas medicinales se han utilizado como agentes terapéuticos, debido a la presencia de estructuras químicas denominadas metabolitos secundarios. En la actualidad, existen algunos microorganismos como las bacterias que han desarrollado mecanismos de resistencia frente a los antibióticos, por lo cual se ha retomado el uso de plantas en búsqueda de nuevas alternativas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) en cepas de referencia internacional, realizada en el laboratorio C de productos naturales “Dr. Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Un primer estudio permitió determinar con el tamizaje fitoquímico la presencia en altas concentraciones de antraquinonas y glicósidos cardiotónicos. De igual manera se encontraron en moderadas proporciones quinonas, esteroides, flavonoides, taninos y saponinas; así como también bajas cantidades de alcaloides, triterpenoides y fenoles. Finalmente, la actividad antibacteriana demostró su efectividad contra las cepas *Staphylococcus aureus* (**ATCC 25923**) con un halo de inhibición de 10 milímetros y una concentración mínima inhibitoria (**CIM**) de 100 mg/mL; *Enterococcus faecalis* (**ATCC 29212**) presentó un halo de inhibición de 12 milímetros a la concentración mínima inhibitoria (**CIM**) de 500 mg/mL. Para las demás cepas en estudio no se obtuvo ningún efecto inhibitorio.

Palabras claves: *Crinum moorei* (Linn.), extracto, tamizaje fitoquímico, Concentración Inhibitoria Mínima (**CIM**).

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DEDICATORIA	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación de la Investigación	4
Objetivos de la Investigación	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	5
Alcances de la Investigación	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
Trabajos Previos	7
Antecedentes Históricos	10
Bases teóricas	11
Familia Amaryllidaceae	11
Género <i>Crinum</i>	12
Especie <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	12
Metabolitos secundarios	13
Alcaloides	14
Cumarinas	14
Compuestos fenólicos	15
Flavonoides	15
Quinonas y antraquinonas	16
Saponinas	16

Taninos	17
Mucilagos	18
Extracto vegetal	19
Técnica de extracción	19
Extracción por maceración	19
Destilación	20
Tamizaje fitoquímico	20
Características generales de las bacterias	21
Clasificación bacteriana	22
Técnicas de coloración bacteriana: Coloración de Gram	22
Bacterias grampositivas	22
<i>Staphylococcus aureus</i>	23
<i>Enterococcus faecalis</i>	23
Bacterias gramnegativas	23
<i>Escherichia coli</i>	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
Mecanismos de resistencia bacteriana	25
Cepas de referencia internacional	26
Pruebas de Susceptibilidad	27
Antibiograma	28
Método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer)	28
Método de dilución en caldo o en agar (Concentración Inhibitoria Mínima)	29
Definición de Términos	31
Fitoquímica	31
Solvante	31
Antibiótico	31
Aislamiento	32

Agar	32
Inóculo	32
Operacionalización de las Variables	34
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	36
Tipo de Investigación	36
Diseño de la Investigación	36
Población y Muestra	37
Unidad de Estudio	37
Selección y tamaño de la Muestra	38
Sistema de Variables	38
Metodología de la Investigación	39
Recolección de la Especie	39
Diseño de Análisis de los datos	46
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
Conclusiones	53
Recomendaciones	54
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Taxonomía de la especie <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	13
2	Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	34
3	Operacionalización de la variable independiente: Metabolitos secundarios del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	35
4	Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	40
5	Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	49
6	Actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Estructura química de una Cumarina	15
2	Estructura química de una Flavona	16
3	Estructura química de una Antraquinona	16
4	Estructura química de una Saponina	17
5	Estructura química de un Tanino	18
6	Estructura química de un Mucílago	18

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** Padre todopoderoso, y a la **SANTISIMA VIRGEN MARÍA** por guiarnos y mantenernos siempre de pie con sabiduría, amor y perseverancia en este largo camino. Gracias.

A nuestros queridos **PADRES**, por su dedicación, cariño, amor, comprensión y sacrificio. Gracias a ellos hoy logramos cumplir nuestra meta, y ser lo que hoy somos. Los amamos.

A nuestras **HERMANOS**, por acompañarnos y darnos sus consejos a lo largo de nuestra carrera. Las queremos.

A nuestros **SOBRINOS**, por llenarnos de alegría y darnos las fuerzas necesarias para no decaer en este difícil camino.

A nuestros **AMIGOS INCONDICIONALES**, quienes han caminado con cada una de nosotras durante estos largos años.

A nuestra ilustre **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES** por ser nuestra casa de estudios, abrirnos sus puertas y permitirnos lograr tan anhelada meta.

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen por permitirme la vida, darme salud y fortaleza para lograr esta meta. Además, a toda mi familia especialmente a mis papás por su apoyo incondicional y a cada una de las personas que formaron parte de esta etapa. Los Quiero.

Maria Fernanda Garcia Cañizalez.

A Dios Padre y Espíritu Santo, por guiarme y mantenerme siempre en el camino del bien. A mis Padres, por ser constantes y dedicados para cumplir nuestra meta. A mi Novio por ser mi amigo y brindarme su compañía. A mis hermanas y sobrina por siempre estar cuando más las necesite. Gracias por ser y estar. Los amo y logramos una de nuestras metas.

www.bdigital.ulaval.

Nureidy Rico Luna.

INTRODUCCIÓN

Hasta comienzos del siglo XX los productos naturales ocuparon el principal lugar en los tratamientos de salud, pero fueron desplazados por el desarrollo de drogas sintéticas, particularmente por la producción de antibióticos. Actualmente microorganismos como las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia frente a estos fármacos, por lo cual se ha retomado el uso de plantas medicinales en búsqueda de nuevas alternativas.

Un género de gran interés es *Crinum* perteneciente a la familia Amaryllidaceae; estas plantas se caracterizan por poseer un bulbo ovoide con un cuello corto. Además, son productoras de un número importante de metabolitos secundarios como alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glicósidos cardiotónicos, taninos y mucílagos; identificados en los extractos crudos obtenidos con diferentes solventes.

Por lo tanto, se han empleado extractos de plantas ya que muchas veces su composición presenta actividad frente a ciertas bacterias. Debido a la baja efectividad que presentan algunos antibióticos, se ha propiciado el uso de plantas medicinales que constituyen un recurso para encontrar fármacos ante nuevas afecciones microbiológicas.

La presente investigación estuvo estructurada por cinco capítulos denominados: Capítulo I: El Problema, que comprende el planteamiento, objetivos de la investigación tanto general como específicos, justificación y alcances, luego se presenta el Capítulo II: Marco teórico, que contiene los antecedentes de la investigación, las bases teóricas donde se describieron las teorías que sustentaron la investigación, definición de términos y operacionalización de las variables. Capítulo III: Marco Metodológico, en el que se precisa el tipo y diseño de la investigación, la población y muestra, unidad de estudio, selección y tamaño de la muestra, sistema de variables,

metodología de la Investigación. Capítulo IV: el cual contiene los resultados y discusión. Capítulo V: conclusiones y recomendaciones.

En general, el trabajo tuvo como objetivo evaluar la relación entre los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional, realizada en el laboratorio C de productos naturales “Dr. Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde junio de 2018 hasta marzo de 2021.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

En la actualidad, la resistencia bacteriana se ve aumentada debido al uso irracional que se les ha dado a los fármacos, así lo expresa Quiñones (2017) “la resistencia antimicrobiana es uno de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana en este siglo, al constituir una de las mayores amenazas para la salud mundial”.

Es por ello, que hoy en día se buscan antibióticos distintos y los productos naturales son una terapia alterna en el tratamiento de algunas patologías, por lo que se consideran una fuente importante de nuevos fármacos. Al mismo tiempo, constituyen la solución a diferentes problemáticas gracias a su utilidad en el nivel industrial y medicinal.

Según Marcano y Hasegawa (2002), entre las virtudes que presentan las plantas está “la capacidad de inhibir el crecimiento de un número importante de microorganismos patógenos, producto de la diversidad de metabolitos secundarios”. Actualmente, se preparan extractos obtenidos por maceración de la planta en un solvente adecuado, el cual contiene diversas sustancias como metabolitos secundarios con características químicas y estructurales definidas.

Se puede decir que, los metabolitos secundarios (**MS**) son compuestos de bajo peso molecular con gran importancia ecológica, porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente y también las protege de condiciones adversas. “Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato” (Marcano y Hasegawa, 2002).

Cabe resaltar que, estos cumplen en las plantas funciones de protección contra el ataque de animales herbívoros, defensa frente a los microorganismos patógenos, atracción de polinizadores y dispersadores de semillas (Sepúlveda, 2004). Después de describir la situación actual del problema, los autores de esta investigación formularon el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.), y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional, realizada en el laboratorio C de productos naturales “Dr. Antonio Morales”, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde junio de 2018 hasta marzo de 2021?

Justificación de la Investigación

Las plantas tienen gran importancia en el área de fitoquímica por ser reservorios de sustancias bioactivas, las cuales son utilizadas por la industria farmacéutica pues sus atributos medicinales pueden proporcionar tratamiento a muchas enfermedades. En los últimos años se han generado nuevas patologías, ya que las bacterias han adquirido la capacidad de producir cambios en su contenido genético, resultando mutaciones de gran relevancia (Refaat y cols., 2012).

En tal sentido, estos seres vivos al ingresar al organismo humano pueden producir un cuadro clínico grave, que no se contrarresta con los tratamientos farmacéuticos existentes. A pesar, del avance de la química orgánica sintética, hay un creciente enfoque en la importancia de los productos naturales para resolver diversos problemas de atención médica, mediante el acoplamiento de los conocimientos tradicionales con los principios científicos.

Con base a lo antes expuesto, se planteó evaluar la actividad antibacteriana de la especie *Crinum moorei* (Linn.), ya que ésta es una planta que tiene diversos compuestos orgánicos que pudieran generar efectos sobre bacterias resistentes. De igual manera, los autores eligieron este tema de investigación considerando que hay pocos estudios en Suramérica y Venezuela de la especie *Crinum moorei* (Linn.), a pesar de su gran potencial.

Objetivos de la investigación

www.bdigitalula.ve

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- ✓ Obtener el extracto crudo de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) empleando la técnica de extracción sólido-líquido por maceración en frío con metanol.
- ✓ Determinar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico aplicando el método del tamizaje fitoquímico.
- ✓ Evaluar la sensibilidad bacteriana del extracto metanólico, utilizando el método de difusión en agar con discos de papel.

Alcances de la Investigación

Los alcances de esta investigación se relacionaron con la profundidad del conocimiento que los investigadores pretendieron obtener, en tal sentido, se consideró la propuesta de Hernández-Sampieri y cols. (2010), quienes refirieron lo siguiente: “Si hemos decidido, una vez hecha la revisión de la literatura, que nuestra investigación vale la pena y debemos realizarla, el siguiente paso consiste en visualizar el alcance que tiene”.

Por lo tanto, esta investigación tuvo un alcance relacionado con el grado de elaboración evaluativo, ya que el objetivo general propuesto fue apreciar la relación entre la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de los bulbos de la especie *Crinum moorei* (Linn.) en cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRIO

Trabajos Previos

Rojas, J. Buitrago, A. Possamai, L. Timmers, L. Tallini, L. Bastida, J. (2021) publicaron una investigación titulada perfil alcaloidal y actividad inhibitoria de la colinesterasa de cinco especies de la familia Amaryllidaceae recolectadas en el estado Mérida-Venezuela, su objetivo fue identificar los alcaloides y el efecto inhibidor del extracto sobre la acetilcolinesterasa (**AChE**) y butirilcolinesterasa (**BuChE**) de las especies *Crinum amabile*, *Crinum erubescens*, *Crinum moorei*, *Amaryllis belladonna* y *Zephyranthes carinata*.

Para determinar el perfil alcaloidal de las hojas y los bulbos de estas especies, emplearon cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (**CG-EM**), donde los resultados revelaron que la licorina y los compuestos relacionados como la 11,12-deshidro-anhidrolicorina y la 1-O-acetilcolina estuvieron presentes en todas las muestras analizadas.

En cuanto, a la capacidad de inhibición de la AChE y BuChE de los extractos, fue de elevado a moderado en ambas enzimas. El extracto de las hojas de *Crinum amabile* mostró mayor actividad para la AChE a 0,88 µg/mL, así como BuChE a 4,46 µg/mL, en comparación a los valores observados para Galantamina® utilizada como control positivo. Las hojas de *Crinum erubescens* también mostraron una buena inhibición enzimática con valores de 1,75 µg/mL y 8,72 µg/mL, respectivamente.

De igual manera, se observó actividad moderada para los bulbos de *Crinum amabile* donde el valor de AChE IC₅₀ 2,44 µg/mL, *Crinum erubescens* IC₅₀ 3,27 µg/mL y para BuChE IC₅₀ 9,03 µg/mL. Para las especies *Crinum moorei* y *Zephyranthes carinata* la inhibición también fue moderada en comparación con el control positivo. Con dichos resultados los autores concluyeron que las muestras tienen un alto potencial sobre la inhibición de la AChE y BuChE. Además, constituye el primer informe *In Silico* sobre las interacciones de bufanisina con los sitios activos de AChE y BuChE.

Shorinwa, A. Ebong, O. Obianime, A. Siminalayi, I. (2018) diseñaron un estudio denominado evaluación de la actividad antioxidante y antiplasmodial *In Vivo* del extracto de acetona de los bulbos de *Crinum jagus*. Su objetivo fue evaluar los efectos del extracto y la actividad antioxidante; empleando el método de captura del radical (**DPPH**) y un ensayo de eliminación de radicales libres de óxido nítrico.

Mientras que la actividad antiparasitaria se estudió *In Vivo* contra *Plasmodium berghei* a 250 mg/kg y 500 mg/kg, a través de la ruta oral en ratones albinos suizos. El aislamiento y la caracterización de los principios activos se realizaron mediante técnicas de cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masa (**CG-EM**). El análisis fitoquímico del extracto reveló la presencia de alcaloides, flavonoides y esteroides en altas concentraciones, mientras que los taninos en moderadas cantidades y las saponinas en bajas proporciones.

Además, el extracto en acetona de los bulbos de *Crinum jagus* reveló actividad inhibitoria relacionada con la dosis comparable contra DPPH; en donde la dosis de 25 µg/mL tuvo una inhibición de 19,7%; mientras, que a la concentración de 100 µg/mL mostró una actividad inhibitoria de 66,4%.

Por otra parte, observaron un 43,02% de supresión de la parasitemia a una dosis de 250 mg/kg, pero a una concentración de 500 mg/kg exhibió 61,42% de actividad antiplasmodial, esta dosis fue significativa ($p<0,05$) en comparación con la Cloroquina®. También, el estudio reveló actividad

quimioprofiláctica de 52,5% y 70,08% a la dosis de 250 mg/kg y 500 mg/kg, respectivamente, en comparación con la Cloroquina®; sin embargo, el extracto no posee actividad curativa ya que la densidad del parásito fue mayor.

Tallini, L. Torras, L. De Souza, W. Kaiser, M. Viladomat, F. Zuanazzi, J. Bastida, J. (2018) realizaron un trabajo titulado alcaloides del N-óxido de *Crinum amabile* (Amaryllidaceae), con el objetivo de identificar los alcaloides presentes en la planta, utilizando resonancia magnética nuclear (**RMN**) como método espectroscópico y cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (**CG-EM**).

Identificaron veintitrés alcaloides por CG-EM, además aislaron y caracterizaron químicamente dos nuevos alcaloides (N-óxido augustina y N-óxido bufanisina), estos fueron determinados estructuralmente por RMN. Se compararon los tiempos de retención, patrones de fragmentación y los datos espectrofotométricos de la base de datos.

Debido al potencial de los alcaloides de Amaryllidaceae en el tratamiento clínico de la enfermedad de Alzheimer, así como la actividad contra malaria decidieron comprobar su efecto sobre la colinesterasa-acetilcolinesterasa (**AChE**) y butirilcolinesterasa (**BuChE**) y la capacidad antiprotozoario de seis alcaloides aislados de *Crinum amabile*.

La actividad inhibitoria de la AChE fue moderada con el compuesto augustina ($45,26 \pm 2,11 \mu\text{g mL}^{-1}$) y baja con bufanisina ($183,31 \pm 36,64 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por otro lado, concluyeron que ningún metabolito presentó actividad inhibitoria para BuChE ya que su concentración fue mayor a $200\mu\text{g mL}^{-1}$.

En cuanto a la actividad antiprotozoaria el extracto no mostró mejores efectos que los fármacos empleados, aunque la bufanisina tuvo inhibición significativa contra *Plasmodium falciparum* de $4,28 \pm 0,18\mu\text{g mL}^{-1}$, al compararlo con el fármaco de referencia Cloroquina®. Los autores concluyeron que el grupo N-óxido presente en algunas de las estructuras aisladas no aumenta su potencial terapéutico.

Carrasco (2017) determinó la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa (**AChE**) y butirilcolinesterasa (**BuChE**) del extracto alcaloidal de *Crinum amabile*. El extracto del bulbo seco se obtuvo triturando y macerando en metanol, para luego realizar la extracción de los alcaloides basado en cambios de pH y uso de diferentes solventes orgánicos.

El extracto purificado se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (**CG-EM**), la actividad inhibitoria de la AChE y BuChE fue determinada por el método modificado de Ellman. En total, identificaron dieciocho alcaloides siendo la licorina el más abundante con un porcentaje de 44,01%, seguido de asoanina con un 11,63%.

De igual manera, aislaron alcaloides de tipo galantamina y tres alcaloides no identificados (287 masa/carga (m/z), 315 m/z, 280 m/z). Los resultados de inhibición enzimática para el extracto de alcaloides, lo expresaron con valores de concentración inhibitoria media máxima (**IC₅₀**), mostrando un efecto significativo sobre AChE de $IC_{50} 2,24 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$, resultado cercano al compuesto de referencia Galantamina® $IC_{50} 0,27 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$. Por otra parte, observaron una baja inhibición contra BuChE ($IC_{50} 116,59 \pm 2,85 \mu\text{g/mL}$) al compararlo con la Galantamina® ($IC_{50} 4,88 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$).

Antecedentes Históricos

El estudio de las plantas de la familia Amaryllidaceae se inició por Carolus Linnaeus y fue publicado en 1753 en Species Plantarum 1, páginas 291–292, donde se estableció el género *Crinum* con cuatro especies (Refaat y cols., 2012). Por otro lado, en 1837 Herbert fue el primero en redefinir el género reconociendo 46 especies y lo dividió en dos secciones los Patentes y semi Patentes (Thi Ngoc Tram y cols., 2002).

El investigador Baker en 1888 subdividió el género en tres subgéneros que fueron *Stenaster*, *Platyaster* y *Codonocrinum*, pero luego Pax y Hoffmann en 1930 restablecieron los tres subgéneros propuestos

anteriormente. En 1936 Traub cambio el nombre del subgénero *Platyaster* a *Crinum* (Thi Ngoc Tram y cols., 2002).

Desde 1950 el género *Crinum* ha sido sometido a investigaciones químicas y citológicas debido a sus riquezas en principios farmacológicos como alcaloides y fenoles. La utilización de extractos de plantas se remonta desde hace décadas, siendo empleados para múltiples finalidades entre las cuales se puede mencionar la elaboración de antibacterianos, destinados a controlar el crecimiento de ciertos microorganismos (Refaat y cols., 2012).

Bases teóricas

Familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae se caracteriza por ser un grupo uniforme de especies monocotiledóneas, que incluye alrededor de ochocientos sesenta a mil cien especies en ochenta y cinco géneros. Se encuentra extensamente distribuida en los trópicos, centros de Sudáfrica, así como, en menor escala en los Andes de Suramérica y el Mediterráneo (Refaat y cols., 2012).

Es importante acotar la división de la familia, correspondiente a cuatro subfamilias: *Agavoideae*, *Amaryllidoideae*, *Camp Nematoides* e *Hypoxidaceae*. Donde la subfamilia Amaryllidoideae es la que contiene mayor cantidad de metabolitos secundarios reportados del tipo alcaloide (Refaat y cols., 2012).

Se describe como una hierba perenne con bulbo carnoso subterráneo, hojas planas y dorsiventrales. Su floración es otoñal o primaveral; presenta flores actinomorfas y perfectas, dispuestas en umbelas soportadas por un largo escapo que se encuentra reducida a una flor solitaria y de colores variados; los frutos son cápsulas y las semillas son variadas (Cabrera, 1968).

Género *Crinum*

El género *Crinum* está formado por alrededor de ciento treinta especies, distribuidas en África, América, Australia y el sur de Asia, por lo general, se ubican a lo largo de lagos y fuentes de agua. Su nombre deriva del griego "krinon" que significa lirio o azucena. Son plantas herbáceas, perennes y con flores vistosas parecidas a los lirios; crecen a partir de bulbos gruesos de hasta quince centímetros de diámetro, sus hojas son planas muy largas y arrosetadas (Refaat y cols., 2012).

Este género es un representante importante de la familia Amaryllidaceae, siendo considerada una planta ornamental y muy vistosa; la presencia de diferentes alcaloides ha sido el foco de muchas investigaciones debido a sus diversas propiedades como: antitumoral, inmunoestimulante, analgésico, antiviral, antipalúdica, antibacteriana y antifúngica (Elgorashi y cols., 2002).

www.hdigitalula.ve
Especie *Crinum moorei* (Linn.)

Posee un bulbo ovoide de siete a diez centímetros de diámetro, con un cuello corto; produce una docena de hojas que disminuyen gradualmente hasta el ápice. Alcanza una longitud de noventa centímetros y una anchura de siete centímetros con seis a doce flores o más formando una umbela (Refaat y cols., 2012). En la Tabla 1 se hace una descripción taxonómica para la especie en estudio.

Tabla 1. Taxonomía de la especie *Crinum moorei* (Linn.) (Refaat y cols., 2012).

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Liliidae
Orden	Asparagales
Familia	Amaryllidaceae
Tribu	Amaryllideae
Subtribu	Crininae
Género	<i>Crinum</i>
Especie	<i>Crinum moorei</i>

Metabolitos secundarios

Son compuestos biosintetizados por diferentes rutas en las plantas que provienen de la degradación de los metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos y proteínas); de bajo peso molecular. Existen alrededor de veinte mil estructuras de metabolitos secundarios, que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados (Sepúlveda, 2004).

De igual manera, Sepúlveda (2004) dice que “los que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. Y los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides”. Su potencial radica en la defensa de la planta frente a microorganismos, además de atraer a organismos simbiontes. A continuación, se describen los principales metabolitos secundarios:

Alcaloides

Son una serie de combinaciones nitrogenadas y compuestos heterocíclicos, que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides. También se pueden derivar de purinas y del acetato de los policétidos (Sepúlveda, 2004).

Se caracterizan por ser moléculas que participan en la transmisión de las señales del sistema nervioso; el efecto tóxico de los alcaloides radica en su capacidad de bloquear neuroreceptores, por lo que actúan como intermediarios de la transducción de la señal neuronal y canales iónicos en vertebrados e insectos (Sepúlveda, 2004).

Mientras, que sus efectos inhibitorios en el crecimiento de microrganismos patógenos, están dados por su capacidad de intercalarse con el ADN, y detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Sepúlveda, 2004).

Cumarinas

Pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas; formadas por un anillo bencénico unido a un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y cinco de carbonos (Figura 1). Es un compuesto cristalino, incoloro, con punto de fusión de sesenta y ocho grados centígrados, que pueden ser consideradas lactonas del ácido o-hidroxicinámico (Rejia, 2007).

Se conocen casi un millar de cumarinas de estructuras muy variadas, desde moléculas simples a otras más complejas. Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, principalmente en las familias Asteráceas, Fabáceas, Apiáceas y Rutáceas, siendo en las dos últimas donde aparecen estructuras más complejas (Ferraro, 2015).

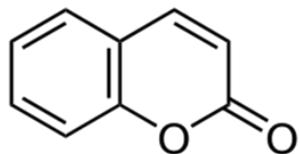


Figura 1. Estructura química de una Cumárina (Ferraro, 2015)

Compuestos fenólicos

Lock, (1994) plantea que son un “grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, relativamente polares y tienden a ser solubles en agua”. Junto con las vitaminas, los compuestos fenólicos se consideran importantes antioxidantes en la dieta, por ejemplo, se encuentran presentes en frutas, hortalizas, raíces y cereales. Ellos son responsables del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos (Peñarrieta y cols., 2014).

Flavonoides

Entre las sustancias distribuidas en el reino vegetal se encuentran los flavonoides que, según Tomás y cols., (2009) son “sustancias que se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, responsables de una gran parte de la pigmentación en los vegetales” (Figura 2). Siendo un elemento importante para el desarrollo normal de las plantas y para su propia defensa; es consumible en ciertos alimentos como frutas, hortalizas, granos, aportando beneficios para la salud.

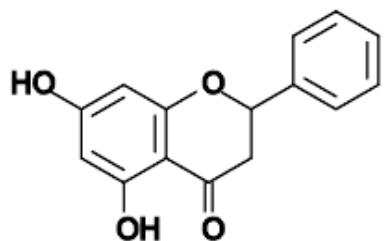


Figura 2. Estructura química de una Flavona (Tomás y cols., 2009)

Quinonas y antraquinonas

Las quinonas están presentes ampliamente en la naturaleza, y son importantes por el rol biológico que juegan en el ciclo de vida de los organismos vivientes. De allí que, se estimuló la investigación química y bioquímica de estos compuestos dando énfasis en el estudio de sus propiedades y comportamiento. Entre los compuestos fenólicos cabe destacar las antraquinonas, “son el grupo más amplio de las quinonas naturales con una importante cantidad de colorantes” (González y cols., 1971) (Figura 3).

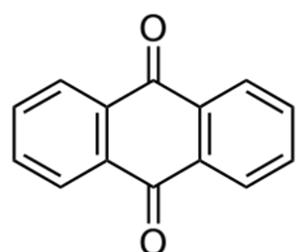


Figura 3. Estructura química de una Antraquinona (González y cols., 1971)

Saponinas

Constituyen un amplio grupo de glicósidos encontrados en las plantas, su nombre proviene del género Saponaria, cuya raíz se utilizó como jabón

(Sparg y cols, 2004); son sustancias químicas que se encuentran en una gran cantidad de vegetales. Esta definición se basa en las propiedades tensoactivas que presentan, las cuales se pueden observar en algunos extractos crudos utilizados como detergentes y para la producción de espumas estables (Figura 4).

Sin embargo, estas propiedades no son comunes a todas las saponinas y es conveniente definirlas por sus características estructurales; “están formadas por una aglicona policíclica unida a una o más cadenas laterales de azúcares. La aglicona se denomina sapogenina o genina, y puede ser un esteroide, un alcaloide o un triterpeno” según Hostettman y Marston (1995).

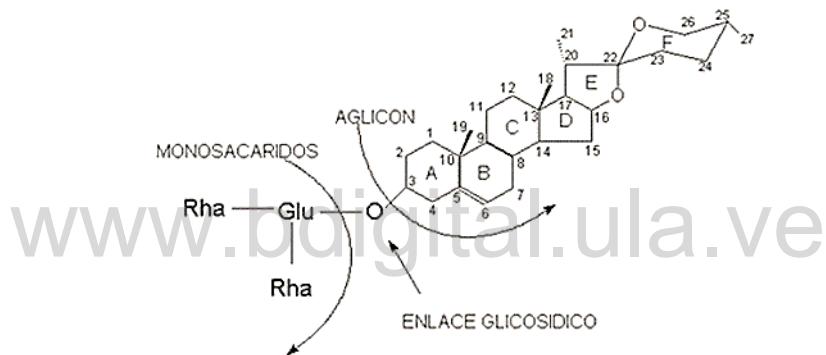


Figura 4. Estructura química de una Saponina (Hostettman y Marston, 1995)

Taninos

El nombre tanino deriva del francés “tanin” (sustancia de bronceado), desde la antigüedad se sabe que ciertas sustancias orgánicas como el tanino, tienen propiedades como colorantes sobre la piel de animales para formar el cuero (Khanbabae y Van, 2001).

Estos son metabolitos secundarios polifenólicos de origen vegetal, con masa molecular relativamente elevada, sabor astringente característico cuando se une a las proteínas salivales, también pueden ser inhibidores enzimáticos efectivos (Figura 5). Pueden encontrarse en todas las partes de

la planta, por ejemplo, en tallos, cortezas, hojas, semillas, frutos y cúpulas. Dentro de los vegetales los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con proteínas (Colina, 2016).

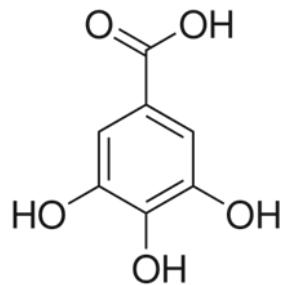


Figura 5. Estructura química de un Tanino (Colina, 2016)

Mucílagos

Barrera y cols., (2004) describen que estas sustancias “son polisacáridos solubles en agua, pero no todos contienen ácidos urónicos, se encuentran en un amplio número de plantas y también en algunos microorganismos”. Estos no son efectos de estímulos, ni de productos patológicos, sino que son producidas a lo largo del crecimiento normal y pueden estar presentes en cualquier parte de la estructura de la planta como la corteza, tegumento o los tejidos interiores de los tubérculos o semillas (Figura 6).

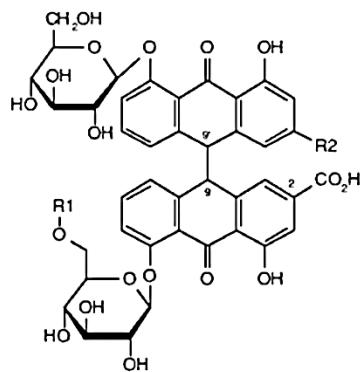


Figura 6. Estructura química de un Mucílago (Barrera y cols., 2004).

Extracto vegetal

Es el producto resultante del proceso de extracción y evaporación de una suspensión, en el cual se somete la forma concentrada de la materia prima. En general se obtiene de la extracción sólido-líquido, colocando en contacto la materia vegetal (flores, brotes, bulbos, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces) con un solvente seleccionado según su polaridad (Ortuño, 2006; Bautista, 2002).

Técnica de extracción

Consiste en la separación de un compuesto a partir de una mezcla sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes se agregan en un disolvente adecuado. Constituye una de las técnicas más usadas en el laboratorio, es frecuente utilizar mezclas complejas de diferentes compuestos. Se tienen que plantear procesos eficientes de separación que permitan la recuperación máxima del producto (Angurell y Casamitjana, 2013).

Extracción por maceración

Método empleado para la extracción de sustancias en las plantas a temperatura ambiente, que consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente (González, 2004).

Se coloca el material vegetal junto con el disolvente en el envase tapado, dejándolo en reposo por un período de dos a catorce días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido y recupera el solvente utilizando un rotavapor hasta obtener el extracto (González, 2004).

Destilación

Proceso en el cual una mezcla de vapor de al menos dos sustancias son separados, por la aplicación o remoción de calor. La destilación está basada en el hecho de que el vapor de una mezcla hirviente es más rico en componentes de bajo punto de ebullición, en consecuencia, cuando el vapor es enfriado y condensado contendrá los componentes más volátiles. Al mismo tiempo, la mezcla original contendrá en mayor cantidad los componentes menos volátiles (Rodríguez, 2015).

Las columnas de destilación son diseñadas para alcanzar la separación de manera eficiente, es una de las técnicas más comunes existiendo varios tipos como destilación simple, destilación fraccionada y destilación a presión reducida, entre otras (Rodríguez, 2015).

Tamizaje fitoquímico

www.bdigital.ula.ve

El extracto total de una planta se puede separar en diversas categorías o grupos de sustancias. Una manera de realizar este proceso es mediante el denominado tamizaje fitoquímico, que consiste en una partición líquido-líquido con solventes, donde se determina la existencia de un tipo de compuesto químico (Albornoz, 1980).

La bioactividad trata de descubrir cual parte de la planta es responsable de la actividad biológica utilizando algunos métodos que permiten fraccionar o separar los distintos compuestos de la planta según una regla de afinidad. El tamizaje fitoquímico de los extractos vegetales es una secuencia de aislamientos y purificaciones de los compuestos presentes en la muestra vegetal. Permite a su vez que las moléculas presentes den reacciones con determinados reactivos, afirmando o descartando su presencia (Albornoz, 1980).

Características generales de las bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que se clasifican dentro del grupo de las procariotas, miden entre uno a mil micrómetros; pueden ser móviles o inmóviles, de vida libre, parásitos o saprófitos. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno se dividen en aeróbicas o anaeróbicas (Tortora y cols., 2007).

Es importante mencionar, que las bacterias se clasifican de acuerdo a su morfología en tres grupos: cocos (forma esférica), bacilos (forma de bastón) y espirilos (espiral o saca corcho). Según su agrupación en diplococos, estreptococos y estafilococos y por la tinción de Gram (grampositivas y gramnegativas) (Tortora y cols., 2007).

Además, presentan elementos esenciales como el citoplasma, el nucleoide, la membrana citoplasmática, ribosomas y los mesosomas; pero también elementos no esenciales como: cápsula, fimbrias, flagelos, plásmidos, inclusiones intracitoplasmáticas y la pared celular. La pared celular está catalogada no esencial, ya que existe un género bacteriano que no la posee como el *Mycoplasma* (Tortora y cols., 2007).

También, se multiplican por fisión binaria dando lugar a un aumento en progresión geométrica del número de células, en cada período de tiempo se duplica esta cantidad. Existen cuatro fases básicas de crecimiento: inicia con la fase de retraso, durante un tiempo el número de células cambia muy poco, debido a que las células no se reproducen de inmediato en un medio nuevo (Tortora y cols., 2007).

La segunda fase es la logarítmica o exponencial, donde las células comienzan a dividirse y entran en un período de incremento logarítmico. Luego, en la fase estacionaria, la tasa de crecimiento disminuye, el número de muertes microbianas compensa la cantidad de células nuevas y la población se estabiliza. Finalmente, en la fase de declinación, la cifra de

muertes supera el número de nuevas células formadas y la población entra en la fase de declinación logarítmica (Tortora y cols., 2007).

Clasificación bacteriana

Técnicas de coloración bacteriana: Coloración de Gram

En el año 1884, se desarrolló una tinción importante para el área de la bacteriología, fundamentada en la diferenciación de las bacterias grampositivas y gramnegativas. Las bacterias cuya pared celular es más densa, constituida principalmente por peptidoglicano (grampositivas) permanecen de color púrpura, al absorber el complejo violeta de genciana-yodo; mientras que las bacterias gramnegativas debido a su alto contenido de lípidos toman el colorante de contraste safranina, por lo que se observan de color rosado (Ramírez y cols., 2006).

Bacterias grampositivas

Su pared celular está constituida principalmente por una capa grande de peptidoglicano y ácidos teicoicos unidos a lípidos. El peptidoglicano tiene varias funciones, es responsable de la forma bacteriana, protege contra la presión osmótica y sirve de sitio de reacción a antígenos. También tienen ácidos lipoteicoicos que pueden actuar como antígenos (Tortora y cols., 2007).

El ácido teicoico funciona como antígeno de superficie regulando la concentración de iones magnesio y activación de enzimas autolíticas; además afecta la capacidad de captar ADN externo y promueve la supervivencia pues actúa como adhesinas (Tortora y cols., 2007). Dentro de las bacterias grampositivas se encuentran dos especies importantes, tales como:

Staphylococcus aureus

Son células esféricas, dispuestas en racimos irregulares, inmóviles, aerobios facultativos, catalasa positiva, fermentan carbohidratos y miden aproximadamente un micrómetro de diámetro. El género *Staphylococcus* contiene al menos treinta especies, siendo las de mayor importancia clínica *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Cervantes y cols., 2014).

En tal sentido, *Staphylococcus aureus* pertenece al reino protista, habita en el ambiente y coloniza tanto al hombre como a los animales. Es la única especie capaz de producir la enzima coagulasa, crecen rápidamente y son metabólicamente activas; en algunos casos forma parte de la microbiota habitual de la piel y mucosas de humanos, pero otras veces causan abscesos, supuraciones hasta septicemias mortales (Cervantes y cols., 2014).

Enterococcus faecalis

Es una de las especies más comunes, siendo una bacteria inmóvil, fermentadora de la glucosa sin producir gas, anaeróbica facultativa, se resguarda en el tracto gastrointestinal de mamíferos. Además, crecen en condiciones extremas causando afecciones graves en humanos, es una de las causantes más comunes de infecciones nosocomiales; ya que son resistentes a los antibióticos por presentar resistencia intrínseca (Díaz y cols., 2010).

Bacterias gramnegativas

Son bacterias formadas por una capa de peptidoglicano delgada, un espacio periplásmico y la membrana externa contentiva de lipopolisácaridos. La bicapa lipídica funciona como filtro molecular al igual que la membrana celular, además sirve de soporte a los lipopolisácarido y a las proteínas de

superficie que pueden actuar como receptores a los fagos (Tortora y cols., 2007).

En la superficie de la membrana externa se encuentran los lipopolisácaridos, los cuales son una molécula importante de la patogénesis de las bacterias gramnegativas, están constituidos por dos componentes: antígeno O y lípido A (endotoxina bacteriana) (Tortora y cols., 2007). Es importante mencionar tres especies gramnegativas de gran relevancia como:

Escherichia coli

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo corto anaeróbico facultativo, que mide medio micrómetro de ancho por tres micrómetros de largo. Se caracteriza por ser catalasa positiva, oxidasa negativa y por reducir nitratos a nitritos; además, fermenta la glucosa con producción de gas y ácido sulfúrico; no forma esporas, son móviles por medio de sus flagelos perítricos (Rodríguez, 2002)

Cabe destacar, que este género se encuentra como microbiota habitual del tracto gastrointestinal y presenta estructuras antigénicas complejas que producen afecciones del aparato excretor, vías urinarias, meningitis e incluso septicemias (Rodríguez, 2002).

Pseudomonas aeruginosa

Pertenece a la familia Pseudomonadaceae, son bacilos o diplococos, aerobios no esporulados, que no utilizan hidratos de carbono y pueden tolerar condiciones de alcalinidad, además pueden reducir nitratos a nitritos. En los medios de cultivo se observan colonias lisas, grandes y brillantes, que producen pigmentos con olores característicos a fruta. Es un patógeno oportunista, que en pacientes inmunocomprometidos produce infecciones en vías respiratorias, vías urinarias y tejidos (Paz y cols., 2019).

Klebsiella pneumoniae

Es un bacilo que asimila y fermenta la lactosa; en el agar MacConkey se observa como colonias de color rosado, y en el medio Kliger es fermentador de la lactosa con producción de gas. Por último, sus condiciones óptimas de cultivo son en agar nutritivo a treinta y siete grados centígrados (González y cols., 2013).

Es cierto que, *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno bacteriano importante, asociado a infecciones en la comunidad y nosocomiales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Las cepas tienen el potencial para causar morbilidad y mortalidad, particularmente en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos (Revillas, 2019).

Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia, éstos son adquiridos y transmisibles. Consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos, así como aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos, del mismo modo éste puede ser inactivado por distintos mecanismos y diversas especies bacterianas (Pérez, 1998).

Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:

- 1) Inactivación del antibiótico por enzimas:** La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las betalactamasas. En las grampositivas suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares, mientras que en las gramnegativas son de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas.

También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos, aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia. El Cloranfenicol®, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas (Pérez, 1998).

- 2) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana:** Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared, que impiden la entrada de ciertos antibióticos de tipo betalactámicos o alteran los sistemas de transporte para el caso de los aminoglucósidos por parte de los anaerobios. En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente (Pérez, 1998).
- 3) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico:** Contempla las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, lo cual complica el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos (Pérez, 1998).

Cepas de referencia internacional

Las cepas de referencia ATCC (Colección de Cultivos Tipo Americano, por sus siglas en inglés), son cultivos conservados y distribuidos por colecciones según sus características fenotípicas-genotípicas definidas, que son empleadas como control para las determinaciones microbiológicas. Éstos

microorganismos se relacionan con su medio, se reproducen, mutan, mueren, debido a que en estos casos el material de referencia es un ser vivo (Rojas, 2013).

Es necesario que el laboratorio gestione la conservación de las cepas de forma adecuada, estandarizando los lotes de reserva y de trabajo, cuantificando la concentración microbiana con métodos apropiados y garantizando las condiciones de conservación más adecuadas (Rojas, 2013).

Pruebas de susceptibilidad

El estudio de la sensibilidad para los microorganismos con los agentes antimicrobianos, es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Se desarrolla mediante las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, cuyo objetivo principal es evaluar en el laboratorio (*In Vitro*) el comportamiento de un microorganismo ante uno o varios antimicrobianos. Los resultados obtenidos proporcionan una valiosa información acerca de la posibilidad de tratar con éxito mediante un agente antimicrobiano específico a un paciente infectado (Ramírez y cols., 2006).

Como no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos, en la actualidad se dispone de varios métodos para determinar el patrón de susceptibilidad de una bacteria a los antibióticos entre los métodos más utilizados podemos mencionar:

- **Antibiograma (ATB);**
- Método de la difusión del disco en agar (prueba de Kirby-Bauer);
- Método de dilución en caldo o en agar (Concentración Inhibitoria Mínima [CIM])) (Ramírez y cols., 2006).

Antibiograma

Los métodos fenotípicos como el antibiograma son los más utilizados; éste consiste en enfrentar un inóculo bacteriano estandarizado a una única o a diferentes concentraciones del antibiótico. La interpretación de los resultados obtenidos permite clasificar a los microorganismos en categorías clínicas: sensibles, intermedios o resistentes (Cercenado y Saavedra, 2009).

En ese sentido, si un microorganismo es sensible, indica que con la dosis habitual se espera una inhibición favorable de la infección. Por el contrario, si el microorganismo es intermedio o resistente, es probable que la inhibición sea desfavorable (Cercenado y Saavedra, 2009).

Entre los métodos fenotípicos, las técnicas de dilución determinan la Concentración Inhibitoria Mínima (**CIM**) utilizando un medio líquido (dilución en caldo) o un medio sólido (dilución en agar) para disolver las diferentes concentraciones del antimicrobiano. El medio estandarizado para la realización del antibiograma es el medio Müller-Hinton, al que se le añade sangre u otros suplementos para bacterias con limitaciones de crecimiento en este medio de cultivo (Cercenado y Saavedra, 2009).

Método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer)

Es el método utilizado con mayor frecuencia para evaluar la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos, esta técnica fue estandarizada por Kirby-Bauer en 1966, de allí su nombre. Es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina, aunque solo brinde información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado. Sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibioticoterapia (Ramírez y cols., 2006).

El método de Kirby-Bauer consiste en depositar en la superficie del agar de Müller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda, se produce la absorción del agua y la correspondiente difusión del antibiótico. Este difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas dieciocho a veinticuatro horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Ramírez y cols., 2006).

Método de dilución en caldo o en agar (Concentración Inhibitoria Mínima [CIM])

Esta técnica forma un gradiente decreciente de la concentración de un antibiótico dado y se prueba contra un inóculo bacteriano estandarizado. Al igual que la técnica de difusión, en las de dilución, hay que controlar el medio de cultivo, el inóculo bacteriano y el antibiótico. De este tipo de técnicas podemos mencionar tres: la dilución en agar, la dilución en tubo y la microtitulación (Herrera, 1999).

La dilución en tubo sigue siendo el estándar dorado de las pruebas de sensibilidad, es la técnica de referencia, a pesar de presentar problemas con la contaminación y dificultad para detectarla. En el método de dilución en agar, se preparan tubos con la concentración definida de antibiótico y se le agrega a cada uno cantidades conocidas del agar Müller-Hinton, este tubo se homogeniza y se vierte en una placa de Petri vacía junto con el antibiótico diluido a una concentración determinada (Herrera, 1999).

Generalmente se inicia a una concentración de ciento veintiocho $\mu\text{g/mL}$ y se hacen diluciones dobles hasta obtener el gradiente decreciente en la concentración de antibiótico (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 μg de droga activa). La escogencia de la concentración en la que se inicia el

gradiente, depende del antibiótico y del tipo de cepa a ensayar (Herrera, 1999).

También, se emplea el inoculador de Steer, el cual comprende una placa de metal de 32 pozos y una lámina de metal con 32 proyecciones que toman, cada una, 20 µL del inóculo estandarizado del agente y que se coloca sobre la superficie del agar con antibióticos. Adicional a esto, se inocula una placa de Mueller-Hinton sin antibiótico, que sirve como control positivo de crecimiento. La placa se incuba a treinta y cinco grados centígrados por dieciocho a veinticuatro horas y se revisa el crecimiento, siempre contra el control positivo (Herrera, 1999).

Un crecimiento de la cepa en la superficie del medio de cultivo, se reporta como resistente a esa concentración del antibiótico. Al contrario, sino existe proliferación bacteriana, se reporta como sensible a esa concentración de antibiótico. Con esta técnica, se puede obtener la Concentración Inhibitoria Mínima (**CIM**), la que se define como la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento de una cepa bacteriana (Herrera, 1999).

Preparar todo un gradiente de medios de cultivo con una concentración decreciente de antibiótico, hace que esta técnica sea muy engorrosa por lo que en realidad se utilizan sólo dos diluciones, por encima y abajo del punto de quiebre del antibiótico.

El punto de quiebre es un valor matemático, que expresa un punto o concentración arriba del cual la cepa se debe interpretar como resistente al antibiótico. Basándose en este criterio, al escogerse dos concentraciones, una abajo y otra arriba del punto de quiebre, si la cepa crece en las dos concentraciones es resistente, si crece sólo en la concentración baja es intermedia y sensible si no crece en ninguna (Herrera, 1999).

Definición de términos

Fitoquímica

Ciencia responsable del estudio de los componentes químicos de las plantas, involucra la determinación de su estructura química molecular y las propiedades biológicas, también el análisis de los principios activos, los olores, pigmentos, entre otros. Las sustancias fitoquímicas son encontradas en varios alimentos consumidos por los seres humanos como los vegetales, frutas, legumbres, granos y semillas; además, sirven de protección contra varias enfermedades como el cáncer y problemas cardíacos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Solvente

Son sustancias procedentes en su mayoría de la destilación del petróleo, también a partir de otras materias primas que se preparan sintéticamente. Siendo compuestos orgánicos volátiles que se utilizan solos o en combinaciones con otros agentes para disolver materias primas, productos o materiales residuales; utilizándose para la limpieza, modificación de viscosidad o como agente tensoactivo (Pimentel, 2016).

Antibiótico

Se refiere a toda sustancia o molécula sintética producida por la industria farmacéutica, para inhibir el crecimiento de microorganismos o destruirlos. Algunos antibióticos son sintetizados por microorganismos como bacterias u hongos que poseen esta misma actividad; cabe resaltar, su ineeficacia contra las infecciones víricas (Araque, 2000).

Aislamiento

Aislar es separar un tipo de microorganismo a partir de una población heterogénea. En hábitats naturales raramente encontramos un solo tipo de microorganismo en una muestra, por lo tanto, es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar e identificar los distintos tipos. El objetivo del aislamiento es obtener colonias bien separadas a partir de una sola unidad formadora de colonias de las que se conseguirá un cultivo puro (Valera, 2018).

Agar

El agar fue sugerido por primera vez para propósitos microbiológicos en 1881 por Fannie Hesse; es un agente de solidificación usado en la preparación de medios de cultivo. No está destinado a ser utilizado en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos (Balows, 2012).

Se presenta como un gel a temperatura ambiente, manteniéndose firme a temperaturas por encima de sesenta y cinco grados centígrados, incluye características como buena claridad, temperatura de gelificación y fusión controlada, buenas características de difusión, ausencia de inhibidores bacterianos tóxicos, relativa ausencia de minerales y compuestos metabólicamente útiles (Balows, 2012).

Inóculo

El inoculo se refiere a la dilución de colonias en un medio líquido, las colonias pueden tomarse de un cultivo puro o bien ser colonias aisladas. Para la preparación de éste conviene asegurarse de la pureza del cultivo, y por eso se prefiere trabajar con colonias aisladas. En general, la densidad

microbiana del inóculo es de aproximadamente 1×10^7 - 10^8 UFC/mL, o de turbidez equivalente al punto 0,5 de la escala de Mac Farland (0,5 mL de cloruro de bario 0,048M añadidos a 99,5mL de ácido sulfúrico 0,36M). Este inóculo se consigue efectuando diluciones a partir de un cultivo en caldo en fase estacionaria de crecimiento y ajustando la turbidez (Garcia y cols., 1994).

www.bdigital.ula.ve

Operacionalización de las Variables

Las variables se operacionalizaron con el fin de medirlas. Por eso, se definen y se categorizan para relacionar el indicador específico. A continuación, se presentan en las tablas:

Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.).

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual
Actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	Dependiente y discreta	Son los efectos que se producen sobre las bacterias para inhibir su crecimiento.
4. Definición operacional	5. Dimensiones	6. Indicador
Se determinó mediante el método de difusión en agar, a través de discos de papel impregnados con el extracto.	Presencia de actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.) Ausencia de actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	Se observa si existe o no inhibición en el crecimiento de las bacterias mediante el halo de inhibición.

Buitrago, García y Rico, 2020.

Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente: Metabolitos secundarios del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.).

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual
Metabolitos secundarios del extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	Independiente	Son sustancias orgánicas sintetizadas por las plantas, que tienen como función defenderlas contra el ataque microbiano.
4. Definición operacional	5. Dimensiones	6. Indicador
Se determinó mediante el tamizaje fitoquímico.	Metabolitos secundarios presentes o ausentes en el extracto metanólico de los bulbos de <i>Crinum moorei</i> (Linn.)	Se observa si existe o no efecto de los metabolitos secundarios contra las cepas de referencia internacional.

Buitrago, García y Rico, 2020.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Hurtado (2010) refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo qué se quiere saber. Esto marca en general lo que se desea conseguir durante el proceso de la investigación, en consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro.

Específicamente durante esta investigación se quiso saber si existe relación entre los elementos del evento de estudio, es decir, se buscó la probable relación entre los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional. Por lo tanto, este trabajo correspondió a una investigación evaluativa.

Diseño de la Investigación

El diseño de investigación comprende las estrategias necesarias para recolectar los datos, específicamente se relacionan con el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se recolectará (Hurtado, 2010). Con respecto, a este trabajo fue de campo, de laboratorio, contemporáneo y multivariable.

De campo porque los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) se recolectaron directamente en la localidad del Valle en el estado Mérida. Asociado al laboratorio, ya que se realizó un ensayo con el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) en cepas de referencia internacional para medir el efecto antibacteriano.

Los datos del evento de estudio se recolectaron en el lugar donde ocurrió el fenómeno, específicamente en el laboratorio C de productos naturales “Dr. Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones y el laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (**SGU**) “Profesora. Luisa Vizcaya” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

En cuanto, al cuándo tuvo un diseño contemporáneo, debido a que se recolectaron durante el período de desarrollo del trabajo; los datos se tomaron en un solo momento. Además, considerando la amplitud de la información a recolectar presentó un diseño multivariable, relacionado con la actividad antibacteriana y el extracto metanólico de los bulbos de la especie *Crinum moorei* (Linn.). También, incluyó un diseño experimental ya que se usó una concentración del extracto.

Población y Muestra

Unidad de Estudio

Hernández-Sampieri y cols. (2010), refieren que una población es el conjunto de todos los casos, que concuerdan con una serie de especificaciones. La población conduce hacia el conjunto finito o infinito de elementos, que presentan características comunes con el fenómeno que se investiga.

Una vez conociendo lo citado al principio la población que se estudió es finita, integrada por las cepas de referencia internacional, éstas se estudiaron

en el laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (**SGU**) “Profesora. Luisa Vizcaya” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Selección y tamaño de la Muestra

Los instrumentos que se utilizan para la obtención de la información deben ser aprobados por los expertos, con el objetivo de determinar la validez del contenido. De hecho, se estima que la eficacia constituye el procedimiento que determina la consistencia interna de los instrumentos, en cuanto a lo que se propone medir, de ahí que la validez se refiere al grado en que un instrumento realmente mida la variable según Hernández-Sampieri y cols., (2010). Es por esto, que en la presente investigación se emplearon los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) para la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto obtenido usando como solvente el metanol.

Sistema de Variables

Las variables que se relacionaron con el propósito de esta investigación son las siguientes: variable dependiente (**VD**): Actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.). Y la variable independiente (**VI**): Metabolitos secundarios del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.). Estas variables correspondieron a los núcleos semánticos del problema de investigación y a la vez, permitieron la verificación del fenómeno de estudio en la unidad de investigación.

Metodología de la Investigación

Recolección de la especie vegetal: La especie *Crinum moorei* (Linn.) se recolectó en su estado natural con los implementos recomendados, en la localidad del Valle ubicado en el Municipio Libertador del estado Mérida. Una vez tomada, se transportó el material a temperatura ambiente al laboratorio C de productos naturales “Dr. Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, para su posterior estudio.

Determinación taxonómica de la especie vegetal: La especie fue identificada por el Doctor Pablo Meléndez, dejándose una muestra testigo en el Herbario “Dr. Luis Ruíz Terán” (**MERF**), de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo el código JR 70.

Selección, división y preparación del material vegetal: Posteriormente se seleccionaron los bulbos de la especie que se encontraron en buen estado y en una cantidad suficiente para iniciar la preparación del extracto.

Secado, molienda y pesada del material vegetal: Los bulbos fueron secados, por setenta y dos horas a cuarenta grados centígrados utilizando un horno eléctrico ubicado en el Herbario “Dr. Luis Ruíz Terán”. Transcurrido este tiempo se procedió a verificar que se encontraran totalmente secos, sin humedad para ser molidos hasta obtener un polvo fino que atravesara un tamiz de malla número veinte. La muestra equivalente a cien gramos fue almacenada en un recipiente limpio, seco y rotulado.

Extracción por maceración del material vegetal: El material vegetal se sometió a una extracción sólido-líquido por maceración en frío utilizando como solvente el metanol durante un período de diez días, divididos en dos ciclos de cinco días, transcurrido este tiempo se filtró y concentró la solución a presión reducida usando un rotavapor a la temperatura de cuarenta y cinco grados centígrados. El extracto crudo obtenido fue pesado y envasado en un

frasco de color ámbar, previamente rotulado; colocándose en un lugar fresco y seco.

Tamizaje Fitoquímico: Para la tipificación de los metabolitos secundarios se realizó el tamizaje fitoquímico, en el laboratorio C de productos naturales “Dr. Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión del Doctor. Alexis Buitrago.

El estudio permitió a través de diferentes pruebas colorimétricas que se describen en la tabla 4, la identificación cualitativa de los diferentes metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glicósidos y glicósidos cardiotónicos, flavonoides, cumarinas, taninos, mucílagos, compuestos fenólicos, triterpenoides y esteroides.

Tabla 4. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.)

Alcaloides				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Wagner	Solución I ₂ y KI	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de HCl al 5%.	Adicionar gotas del reactivo	Precipitado color rojo pardo
Mayer	Solución HgCl ₂ y KI	Luego se agitaron en vórtex y filtraron.		Precipitado color blanco o amarillento
Hager	Solución saturada de ácido pícrico			Precipitado color blanco
Dragendorff	Bi (NO ₃) ₃ -5H ₂ O y KI			Precipitado color rojo o anaranjado

Quinonas y antraquinonas				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con Amonio	NH ₄ OH concentrado		Adicionar 1 gota del reactivo	Color rojo (antraquinonas)
Reacción con ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄ Concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en	Adicionar 1 gota del reactivo	Color rojo (quinonas)
Reacción de Borntráger	Agua destilada KOH 5%, CHCl ₃ y H ₂ O ₂ 6%		Adicionar 3 mL de la base, llevar a ebullición	Color rojo, amarillo o verde (benzoquinonas) Color rojo

		vórtex y filtraron.	durante 3 minutos. Extraer con el solvente orgánico y alcalinizar con 2 mL de la base. Agregar gotas del agente oxidante	(derivados de antronas)
Reacción con Benceno	Benceno y NH ₃ 10%		Adicionar 1mL del solvente orgánico y alcalinizar con base	Color rosa, rojo o violeta (antraquinonas)

Glicósidos y glicósidos cardiotónicos				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con hidróxido de sodio	Solución de NaOH 2N	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego, se agitaron en vórtex y filtraron	Añadir 5 gotas de la base	Color amarillo (glicósidos)
Keller-Killiani	H ₂ SO ₄ concentrado, CH ₃ COOH glacial y FeCl ₃		Adicionar el reactivo con cinco gotas de ácido fuerte	Interfase de color marrón (azúcar 2-desoxigenados)
Reacción de Legal	Piridina, nitroprusiato de sodio al 5% NaOH 2N		Agregar 3 gotas de la base débil, una gota de la solución de la sal y tres gotas de la base fuerte	Color amarillo (cardenolídos o lactonas α, β-insaturados)

Saponinas				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Prueba de la altura de la espuma	Agua destilada	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de agua. Luego, se agitaron en vórtex y filtraron	El extracto acuoso se agitará vigorosamente y se medirá la altura de la espuma	Altura de la espuma entre 8 a 10mm, estable por 30 minutos
Prueba de Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Se disolvió una porción del extracto con 50 mL de agua. Luego, se agitó en vórtex y filtro	Añadir gotas de sal y agitar vigorosamente durante 3 minutos	La formación de espuma en forma de panal de abeja (saponinas)

Tomado de Buitrago, A. 2018. Modificado por García y Rico.

Tabla 4. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) (Continuación)

Flavonoides				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción de Shinoda	HCl concentrado y magnesio metálico	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vórtex y filtraron.	Añadir 2 gotas del ácido Adicionar virutas del metal	Color rojo (auronas o chalconas) Color anaranjado a rojo, (flavonas) Color rojo (flavonoles). Color magenta (flavononas)
Reacción de Pew's	Polvo de zinc y HCl 5 N		Adicionar gotas del ácido y una porción del polvo	Color rojo purpura o rojo cereza (dihidroflavonas). Color rosa o café (flavononas y dihidrochalconas).
Reacción de Hidróxido de Sodio	NaOH 10%		Añadir 3 gotas de la base fuerte	Color amarillo a rojo (xantonas y flavonas). Color café a purpura rojizo (chalconas). Color azul (antocianinas)
2-aminoetildif enil-borato (2-AEDB)	Solución AEDB al 2% en MeOH		Aplicar la muestra en una placa cromatografía. Revelar con el reactivo	Manchas de color amarillo con fluorescencia intensa a 365 nm.

Cumarinas				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con hidróxido de amonio	NH ₄ OH concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vórtex y filtraron.	Adicionar 2 gotas de la base débil	Fluorescencia de color azul, verde o amarillo a una longitud de onda de 365 nm

Tomado de Buitrago, A. 2018. Modificado por García y Rico.

Tabla 4. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) (Continuación)

Taninos				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Control	Agua destilada, CH ₃ CH ₂ OH y NaCl	Se disolvió 100mg del extracto en 10 mL de etanol y se agitó durante 5 minutos. Luego se realizó una extracción con 25 mL de agua destilada, la solución resultante se calentó hasta ebullición durante 15 minutos. A la solución se le adicionó 0,2 mL de NaCl al 10 % y se filtró. Se rotularon 5 tubos de ensayo y se le adicionaron 3 mL del filtrado	Tubo 1: control	Sin reacción
Gelatina 1%	Gelatina		Tubo 2: agregar 5 gotas de la solución gelatina	Precipitado de color blanco (taninos)
Gelatina (1%) Sal (10%)	Gelatina y NaCl		Tubo 3: agregar 5 gotas de la solución salina en gelatina	Precipitado de color blanco (taninos)
Tricloruro férrico	FeCl ₃ 10%		Tubo 4: agregar 3 gotas de la solución de la sal férrica	Color rojo-vino (compuestos fenólicos). Color verde intenso (taninos pirocatecólicos). Color azul (taninos pirogalatánicos)
Ferricianuro de potasio	K ₃ Fe (CN) ₆ 1%		Tubo 5: agregar 1 gota de la cuaternaria	Color azul (fenólicos)

Mucílagos				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Enfriamiento a 0-5 °C	Agua destilada	Se disolvieron en 3 tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de agua. Luego, se agitaron en vórtex y se filtraron	Enfriar a una temperatura de 0-5 °C	Consistencia gelatinosa (mucílago)

Tomado de Buitrago, A. 2018. Modificado por García y Rico.

Tabla 4. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) (Continuación)

Triterpenoides y esteroides				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción de Lieberman Bouchard	H ₂ SO ₄ concentrado y CH ₃ COOH glacial	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vórtex y filtraron.	Añadir 2 gotas del ácido débil y esterificar con 2 gotas del ácido fuerte	Interfase de color azul o verde (esteroides). Color amarillo anaranjado (triterpenoides)
Reacción de Rosenthaler Vainillina Triterpenoides	Vainillina y H ₂ SO ₄ Concentrado		Adicionar 2 gotas reactivo con 2 gotas del ácido fuerte	Interfase de color violeta (triterpenoides)
Prueba de Salkowski (Esteroides)	H ₂ SO ₄ Concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de CHCl ₃ . Luego se agitaron en vórtex y filtraron.	Adicionar lentamente 2 mL del ácido fuerte	Interfase de color marrón rojizo (anillo esteroideo)
Prueba de Komarowsky	A: 25 mL de 4-hidroxibenzaldehido en CH ₃ CH ₂ OH al 2% B: 5 mL H ₂ SO ₄ y CH ₃ CH ₂ OH 1:1	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vórtex y filtraron.	Aplicar la muestra en una placa cromatografía. Eluir con una mezcla cloroformo metanol y agua (70:30:5). Revelar con el reactivo	Mancha de color rojo (triterpenos). Mancha de color verde (esteroides)

Compuestos fenólicos				
Ensayo	Reactivos	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Prueba de FeCl ₃	FeCl ₃ , solución de NaCl 0,9% m/v y CH ₃ COO ⁻	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vórtex y filtraron.	Adicionar 3 gotas del acetato, neutralizado con 3 gotas la sal férrica en solución fisiológica	Color rojo vino, verde o azul (compuestos fenólicos)

Tomado de Buitrago, A. 2018. Modificado por García y Rico.

Método de difusión en agar con discos de papel

La evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.), se desarrolló en el laboratorio de

Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (**SGU**) “Profesora. Luisa Vizcaya”, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Doctora Judith Velazco Carrillo, para esto se empleó el método de difusión en agar utilizando discos de papel.

Por consiguiente, las cepas de referencia internacional que se usaron fueron *Escherichia coli* (**ATCC 25922**), *Pseudomonas aeruginosa* (**ATCC 27853**), *Klebsiella pneumoniae* (**ATCC 23357**), *Enterococcus faecalis* (**ATCC 29212**) y *Staphylococcus aureus* (**ATCC 25923**). A continuación, se describe el protocolo experimental:

- a) Se inició con la preparación del medio de cultivo agar Müller Hinton (HIMEDIA®), aproximadamente veinte mililitros fueron colocados en las placas de Petri, una vez solidificadas se ejecutó el proceso de esterilidad y se conservaron hasta el día del ensayo a cuatro grados centígrados.
- b) Por otra parte, se cortaron los discos de papel de filtro con un diámetro de seis milímetros, los mismos fueron impregnados con veinte microlitros del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) y solvente (control), luego se colocaron en placas de Petri y esterilizaron bajo luz ultravioleta durante noventa minutos antes del ensayo antibacteriano.
- c) Las cepas de referencia se conservaron en los medios adecuados a temperatura ambiente, a partir de allí se reactivaron las bacterias y se verificó su pureza.
- d) Luego, se prepararon los inóculos en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl) hasta alcanzar la turbidez correspondiente al patrón de McFarland N°0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL); el inóculo se realizó desde un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo de agar Müller Hinton.

- e) Consecutivamente se sembró sobre la superficie del agar el inóculo de cada microorganismo utilizando un hisopo estéril realizando pequeños giros en la placa en ángulos de noventa grados. Luego se colocaron con una pinza los discos de papel de filtro impregnados con la muestra solvente (control negativo) y fármacos de referencia para cada microorganismo (control positivo).
- f) Se preincubó durante dieciocho horas a cuatro grados centígrados con el objetivo de que los compuestos presentes en el extracto se difundieran en el agar inoculado, tras este tiempo se incubaron nuevamente en la estufa a treinta y siete grados centígrados durante cuarenta y ocho horas para el crecimiento bacteriano.
- g) Finalmente, cumplido el tiempo de incubación (veinticuatro a cuarenta y ocho horas) se hicieron las lecturas de los halos de inhibición, expresando el diámetro de la zona de inhibición en milímetros (**mm**). Considerándose la prueba negativa cuando se observó crecimiento microbiano alrededor de los discos.
- h) La determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (**CIM**) se realizó para aquellos microorganismos que presentaron susceptibilidad al extracto. Para establecer la Concentración Inhibitoria Mínima se prepararon diluciones a diferentes rangos de concentración y se aplicó el procedimiento antes descrito, el cual permitió determinar la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (CLSI, 2018).

Diseño de Análisis de los datos

Los datos recolectados fueron analizados a través del enfoque cualitativo. Tal como lo han referido Hernández-Sampieri y cols., (2010), el dato será medido por escala con el fin de ser analizado. Las características que se miden tienen como punto de partida su naturaleza cualitativa o cuantitativa.

En tal sentido, las variables cualitativas tienen una escala de medida nominal y ordinal. Mientras que las variables cuantitativas tienen una escala de medida de intervalo y de razón.

El universo de esta investigación estuvo representado por el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.), que presentaron actividad antibacteriana en las cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.).

Para la identificación de los compuestos químicos presentes en el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.), se empleó el tamizaje fitoquímico con el que se cualificó la presencia de diferentes estructuras químicas, tales como: quinonas, antraquinonas, glicósidos, esteroides, triterpenoides, flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides y fenoles.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en donde las antraquinonas y glicósidos estuvieron presentes en altas proporciones; mientras que las quinonas, saponinas, taninos, esteroides y flavonoides en moderadas concentraciones. Asimismo, se encontraron en bajas concentraciones alcaloides, triterpenoides y fenoles.

Es importante señalar, que la prueba con Ácido sulfúrico e Hidróxido de amonio concentrado se utilizaron para determinar quinonas y antraquinonas, las mismas confirmaron la presencia de estos metabolitos en concentraciones moderadas y altas respectivamente. Por otra parte, los glicósidos fueron determinados mediante el ensayo con Hidróxido de sodio, observándose una coloración amarilla que indicó una elevada presencia de este tipo de compuesto.

Con relación a los triterpenoides se evidenció una baja presencia con la reacción de Rosenthaler, así como cantidades moderadas de esteroides con las pruebas de Salkowski y Lieberman Bouchard.

Tabla 5. Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.)

Metabolitos secundario	Pruebas	Cr
Antraquinonas Quinonas	NH ₄ OH conc	+++
	H ₂ SO ₄ conc	++
Glicósidos	NaOH conc	+++
	Keller Killiani	+
Triterpenoides	Rosenthaler	+
Esteroides	Lieberman Bouchard	++
	Salkowski	++
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	-
Mucílagos	Enfriamiento 5 °C	-
Fenoles	FeCl ₃ 5 % NaCl 0,9 %	+

Cr: *Crinum moorei*, Ausente (-) Baja (+) Moderada (++) Alta (+++)

Otros ensayos realizados permitieron identificar en bajas concentraciones flavonas y dihidrochalconas utilizando el reactivo de Pew's, de igual manera, con la reacción de Shinoda se identificaron moderadas proporciones de flavonas. Asimismo, se observaron moderadas cantidades de xantonas luego de adicionar Hidróxido de sodio a una porción del extracto.

Por otro lado, para la identificación de taninos se emplearon las pruebas de gelatina al 1% y Ferricianuro de potasio resultando bajas cantidades. Sin embargo, la reacción con la solución de gelatina-cloruro de sodio y Cloruro férrico al 10%, mostraron presencia moderada de este metabolito. Para el estudio de las saponinas se usó la prueba de la espuma y bicarbonato de sodio, donde resultaron concentraciones moderadas y bajas.

En cuanto a los fenoles se determinaron con las pruebas de Cloruro de hierro al 5% y Cloruro de sodio al 0,9% donde se observó en bajas

cantidades. Por su parte, la cantidad de alcaloides fue baja para la prueba de Dragendorff y no se encontró la presencia de mucílagos y cumarinas con las pruebas respectivas.

Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con el estudio reportado por Marmolejo, 2018; donde el tamizaje fitoquímico para los bulbos de *Crinum amabile* determinó la presencia de alcaloides en altas concentraciones, flavonoides, antocianidinas y azúcares reductores en escasas proporciones. Del mismo modo, el autor destacó la presencia de los alcaloides sanguinina, bufanisina y hemantamina con una abundancia de 1% a 5%.

Otro estudio fitoquímico realizado por Shorinwa y cols., 2018; con los bulbos de *Crinum jagus* reveló la presencia de alcaloides, flavonoides y esteroides en altas concentraciones; los taninos en moderadas proporciones mientras que las saponinas en bajas cantidades. Además, los investigadores hallaron alta presencia de carbohidratos y azúcares reductores.

Actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.).

El extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) fue ensayado para determinar su actividad antibacteriana, para ello se empleó el método de difusión en agar con discos de papel impregnados con el extracto frente a las diversas cepas de referencia internacional. En tal sentido, los microorganismos seleccionados para el ensayo fueron *Staphylococcus aureus* (**ATCC 25923**), *Enterococcus faecalis* (**ATCC 29212**), *Escherichia coli* (**ATCC 25922**), *Klebsiella pneumoniae* (**ATCC 23357**) y *Pseudomonas aeruginosa* (**ATCC 27853**).

Los resultados obtenidos para la actividad antibacteriana que se presentan en la tabla 6, indican que no hubo efecto de los metabolitos secundarios frente a las bacterias gramnegativas; pero si presentaron

actividad frente a las bacterias grampositivas. Para el caso de *Staphylococcus aureus* (**ATCC 25923**) se obtuvo un halo de inhibición de 10 milímetros y una concentración inhibitoria mínima (**CIM**) de 100 mg/mL; en cuanto a la especie *Enterococcus faecalis* (**ATCC 29212**) presentó un halo de inhibición de 12 milímetros y la concentración inhibitoria mínima fue de 500 mg/mL.

Tabla 6. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.)

MICROORGANISMOS	EXTRACTO	Zona de inhibición (mm)*					CIM
		LI	VA	CE	AZ	PI	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	10*	46*					100
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	12*		22*				500
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	NA			36*			NE
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA				46*		NE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA					26*	NE

LI: Linezolid® (30µg; Oxoid™); VA: Vancomicina® (30µg; Liofilchem s.r.l.); CE: Cefuroxima® (30µg; Oxoid™); AZ: Aztreonam® (30µg; BD BBL™), PI: Piperacilina® (100µg; Oxoid™) CIM: Concentración Inhibitoria Mínima; NA: No activo NE: No ensayado; *mm: milímetros de los halos de inhibición (disco de 6 mm de diámetro) / promedio 2 ensayos.

En el estudio para la sensibilidad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.), los resultados permitieron demostrar su potencialidad para la inhibición del crecimiento de las cepas grampositivas ensayadas. Así mismo lo expresaron Rahman y cols., (2011) en su investigación, donde el extracto de los bulbos de la especie *Crinum asiaticum*, mostró una zona de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* con un halo de 11 milímetros y la **CIM** de 250 µg/mL.

Sin embargo, el efecto inhibidor en los microorganismos gramnegativos fue para *Escherichia coli* un halo de inhibición de 10 milímetros y **CIM** 250 µg/mL, *Pseudomonas* sp con 9 milímetros y **CIM** de 500 µg/mL. Además,

expresaron que el éxito del ensayo se asocia al tipo de disolvente utilizado en el procedimiento de extracción, en donde los extractos de plantas obtenidos con solventes orgánicos como el metanol proporcionan mayor actividad antimicrobiana en comparación cuando realizaron la extracción con agua.

Por otro lado, Lannello y cols., 2014; realizaron un estudio antibacteriano con el extracto de *Crinum angustum*, observando mayor actividad contra *Staphylococcus aureus* (**CIM**: 312 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (**CIM**: 625 µg/mL) y *Klebsiella pneumoniae* (**CIM**: 625 µg/mL); sin embargo, no hubo efecto contra las cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En otra investigación, Akintola y cols., 2016; estudiaron el efecto inhibitorio del extracto crudo de los bulbos de *Crinum jagus*. En ese sentido, demostraron su acción contra *Staphylococcus aureus* con una (**CIM**: 6,25 mg/mL) y un halo de inhibición de 6 milímetros, *Pseudomonas aeruginosa* (**CIM**: 50 mg/mL) y 10 milímetros, *Klebsiella pneumoniae* (**CIM**: 6,25 mg/mL) y 10 milímetros.

Por otra parte, Ivalenil y cols., 2010; realizaron un ensayo con extractos alcohólicos de las hojas de *Crinum asiaticum*, evidenciando su gran efecto sobre las cepas: *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 13 milímetros, *Pseudomonas aeruginosa* (16 milímetros), *Escherichia coli* (15 milímetros) y *Klebsiella pneumoniae* (18 milímetros); con una **CIM** promedio para todos los casos de 1,5 mg/mL.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El ensayo cualitativo para la determinación de los metabolitos secundarios en el extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.) permitió establecer la presencia de antraquinonas y glicósidos en altas concentraciones; quinonas, esteroïdes, flavonoides, taninos y saponinas en moderadas proporciones; además de alcaloides, triterpenoides y fenoles en bajas cantidades.

Con relación a la actividad antibacteriana, solo se observó efectividad contra las cepas *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 10 milímetros y una **CIM** de 100 mg/mL, *Enterococcus faecalis* presentó un halo de inhibición de 12 milímetros y la **CIM** fue de 500 mg/mL. Para las demás cepas en estudio no se obtuvo efecto inhibitorio.

Recomendaciones

- Para la especie *Crinum moorei* (Linn.) existen pocos reportes en la literatura especializada, se recomienda profundizar su investigación realizando la separación cromatográfica y elucidación de las estructuras químicas.
- Realizar otras actividades biológicas para determinar el potencial del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* (Linn.).

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Akintola, A. Maduagwu, E. Adegoke, A. Kehinde, B & Adenowo, O. (2016). Antimicrobial activities of crude methanolic extract and fractions of the bulb of *Crinum jagus* (Linn.). International Education & Research journal [IERJ], 6 (2), 32-34.
- Albornoz, A. (1980). Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas. Caracas-Venezuela: Ediciones OBE.
- Angurell, I. Casamitjana, N. (2013). Técnica de extracción. Operaciones básicas en el laboratorio de Química. Universidad de Barcelona, España.
- Araque, M. (2000). Antibióticos. Mérida-Venezuela: Universidad de Los Andes.
- Balows, A. (2012). Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos: técnicas actualizadas. Caracas-Venezuela. Editorial Médica Panamericana.
- Barrera, V. Tapia, C. Monteros, A. (Eds.). (2004). Raíces y tubérculos andinos: alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Quito, Ecuador–Lima, Perú: Editorial Copyright.
- Bautista, S. Barrera, I. Bravo, I. & Bermúdez, K. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidente of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. Mexican journal of phytopathology, 20 (5), 8-12.
- Buitrago, A. (2018). Estudio fitoquímico y evaluación de diversas actividades biológicas en las especies *Vismia baccifera* y *Vismia macrophylla* (Tesis doctoral). Universidad de Los Andes, Mérida.
- Cabrera, A. (1968). Flora de la Provincia de Buenos Aires parte I. Buenos Aires-Argentina: Edición: I.N.T.A.
- Carrasco, A. F. (2017). Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirílcolinesterasa del extracto de alcaloides de

- Crinum amabile* (Trabajo de investigación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Cercenado, E. Saavedra, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). Revista Anales de Pediatría Continuada, 7 (4), 214-217.
- Cervantes, E. García, R. Salazar, P. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio, 61 (1): 28-40.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). M100-S20. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Twentieth informational supplement. CLSI, Vol. 30, N° 1.
- Colina, A. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “*Muehlenbeckia hastulata*” de la zona de Yucay (Cusco). (Trabajo de investigación). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Díaz, M. Rodríguez, C. Zhurbenkoff, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 48 (2), 147-161.
- Elgorashi, E. Drewes, S. Morris, C. & Van Staden, J. (2002). Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. Biochemical systematics and ecology journal, 31 (1), 601-615.
- Ferraro, G. Martino. V. Bandoni. A. y Nadinic, J. (2015). Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales. Ciudad de Buenos Aires: Editorial Eudeba.
- García, P. Paredes, F. y Fernández, M. (1994). Microbiología clínica práctica. Caracas-Venezuela. Editorial UCA.

- González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas (Trabajo de investigación). Universidad Nacional, Colombia.
- González, A., Barroso, J., Cardona, R., Medina, J. y Rodríguez, F. (1971). Distribución de antraquinonas y compuestos naftalénicos relacionados en Rubiáceas, Bignoniaceas y Verbenaceas (Trabajo de investigación). Universidad de la Laguna.
- González, A. Nieves, B. Solórzano, M. Cruz, J. Puig, J. y Moreno, M. (2013). Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de β-lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. Revista Chilena de Infectología, 30 (4), 374-380.
- Hernández-Sampieri, Fernández C, Batista L. (2010). Metodología de la Investigación. 5^a ed. México: Mc Graw Hill.
- Herrera L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Metodología de laboratorio. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, (34).
- Hostettmann, K. & Marston, A. (1995). Chemistry and pharmacology of natural products: Saponins. Cambridge University Press, 1, 2-3.
- Hurtado, J. (2010). El Proyecto de investigación comprensión holística de la metodología y la investigación. Bogotá-Caracas: Ediciones Quirón.
- Ilavenil, S. Kaleeswaran, B. & Ravikumar, S. (2010). Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Crinum asiaticum*. International journal of current research, 1 (1), 35-40.
- Khanbabae, K. & Van, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. The Royal journal Society of Chemistry, 1, 641-648.
- Lannello, C., Bastida, J., Bonvicini, F., Antognoni, F., Gentilomi G. & Poli, F. (2014). Chemical composition, and *in vitro* antibacterial and antifungal activity of an alkaloid extract from *Crinum angustum* Steud. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, Doi: 10.1080/14786419.2013.877903.

- Lock, O. (1994). Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. Perú: Editorial PUCP.
- Marcano, D. Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. (2^a ed). Caracas-Venezuela: Editorial Torino. Pág 55-56.
- Marmolejo, A. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana *In Vitro* de los extractos de *Crinum amabile*. (Trabajo de investigación). Escuela superior politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Ortuño M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Caracas-Venezuela: Ediciones AIYANA.
- Paz, V. Mangwani, S. Martínez, A. Álvarez, D. Solano, S. y Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Revista Chilena de Infectología, 36 (2), 180-189.
- Peñarrieta, M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. y Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. Boliviana de Química, 31(2), 68-81. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- Pérez, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Revista de Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud, 22 (3), 57-67.
- Pimentel, R. (2016). Técnicas y procedimientos de limpieza con utilización de maquinaria. España: Ediciones Nobel, S.A.
- Quiñones, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". Revista Cubana de Medicina Tropical, 69 (3), 1-17.
- Rahman, A. Sharmín, R. Uddin, N. Rana, S. & Uddín Ahmed, N. (2011). Antibacterial, antioxidant and cytotoxic properties of *Crinum asiaticum* bulb extract. Bangladesh Journal Microbiology, 28 (1), 1-5.

- Ramírez, A. García, E. Longa, A. (2006). Manual práctico de bacteriología general. Mérida-Venezuela. Editorial CODREPRE.
- Refaat, J. Kamel, M. Ramadan, A. & Ali, A. (2012). *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review. Part 1- crinum alkaloids: lycorine-type alkaloids. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3 (7), 1883-1884.
- Rejia, B. (2007). Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes (Tesis de Doctorado). Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Ciencias Departamento de Química Física.
- Revillas, E. (2019). Así es la '*Klebsiella*', una superbacteria que resiste a muchos antibióticos y se contagia en los hospitales. Barcelona-España. Edición: S.L Henneo.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Revista Salud Pública de México, 44 (5), 464-475.
- Rodríguez, J. (2015). Obtención de las funciones de transferencia de las temperaturas del tope y fondo de una destilación binaria. Revista Digital de Investigación y Postgrado de la UNEXPO, 5 (2), 796.
- Rojas, F. (2013). Cepas: Materiales de referencia, manejo y aplicaciones en el área de microbiología. Departamento de Salud Ambiental. Santiago de Chile-Chile.
- Rojas, J. Buitrago, A. Possamai, L. Timmers, L. Tallini, L. & Bastida, J. (2021). Alkaloid profile and cholinesterase inhibition activity of five species of Amaryllidaceae family collected from Mérida state-Venezuela. South African Journal of Botany, 136, 126-136.
- Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. (2004). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 21 (3), 355-363.

- Shorinwa, O. Ebong, O. Obianime, A. & Siminalayi, M. (2018). Evaluation of *In-Vivo* antioxidant and antiplasmodial activites of the acetone extract of *Crinum jagus* (Liliaceae) (Linn). International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 9 (7), 2990-2998.
- Tallini, L. Torras, L. de Souza, W. Kaiser, M. Viladomat, F. S. Zuanazzi, J. & Bastida, J. (2018). N-oxide alkaloids from *Crinum amabile* (Amaryllidaceae). Molecules magazine, 23 (6), 1277.
- Thi Ngoc, N. Titorenkova, Tz. Bankova, V. Handjieva, N. & Popow, S. (2002). *Crinum L.* (Amaryllidaceae). Journal Fitoterapia, 73, 183-208.
- Tomás, F., Ferreres, F., Ortiz, A. y Fernández, M. (2009). Estudio sobre el contenido en flavonoides de las mieles de la alcarria: su aplicación a la caracterización Geográfico-Botánica. Murcia, España: CSIC.
- Tortora, G. Funke, B. Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. Caracas-Venezuela. Editorial Panamericana.
- Valera, R (2018). Técnicas de aislamiento y recuento microbiológico. Ecuador: Editorial UMH.