



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS
HOJAS de *Crinum amabile* (Linneo) FRENTE A CEPAS DE REFERENCIA
INTERNACIONAL.**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al grado de Licenciada en Bioanálisis.

www.bdigital.ula.ve

Autora:

Ania Hernández
C.I: V-23.493.465

Tutora:

Prof. Janne Rojas, *PhD.*

Cotutor:

Prof. Alexis Buitrago, *Dr.*

Mérida, Marzo de 2020.

DEDICATORIA

A Dios por bendecir cada paso que doy, por darme la fuerza necesaria para salir adelante a pesar de las dificultades.

A mi madre, quien siempre es y será mi fuente de inspiración y superación, pilar fundamental para la obtención de mis objetivos. Por brindarme su apoyo incondicional por su amor infinito, por luchar cada día por mi bienestar y felicidad.

Ania Hernández

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por guiarme en mis pasos, brindarme salud y entendimiento para realizar mis estudios, fortaleza y voluntad para no rendirme, sobre todo por poner a mí alrededor personas maravillosas que hicieron posible cumplir esta meta.

Quiero expresar mi gratitud a toda mi familia por darme las raíces que me sostienen y enseñarme valores para caminar por la vida, pero en especial:

A mi madre Carmen, mi compañera, mi guía, mi motor e impulso, ejemplo de lucha y perseverancia. Por salir triunfante junto a mí ante todas las adversidades, por todo su esfuerzo y trabajo duro para que nunca me falte nada pero principalmente por su amor infinito. Todo lo que soy es por ella.

A mi hermano Brayan David, quien destaca sabiduría a pesar de su corta edad enseñándome a ver la vida de manera diferente. Por brindarme siempre su paz ternura e inocencia.

A mi padrastro Jean Carlos, quien se comportó como un verdadero padre a largo de mi carrera, por ser parte importante de mi vida, por el apoyo y cariño demostrados.

Deseo expresar mi agradecimiento a mis profesores y guías, principalmente a mi tutora *PhD.* Janne Rojas, por haberme aceptado bajo su tutoría, por su excelente desempeño como tutora, por su dedicación y paciencia al momento de asesorarme, así como por los conocimientos adquiridos y su valiosa colaboración en mi trabajo.

A mi cotutor, Dr. Alexis Buitrago, por su ayuda durante la parte experimental de la investigación, por sus enseñanzas sobre de la fitoquímica. Gracias por tener siempre palabras de apoyo elocuentes y divertidas haciendo más felices los días de trabajo.

A la profesora Judith Velasco, por su valiosa colaboración paciencia y dedicación al momento de realizar las pruebas bacterianas.

A mis amigos, Carol, Susana, Yessika, Yasmely y José, que han sido mi compañía a lo largo de la carrera y apoyo más allá de las aulas. Gracias por el cariño brindado, por los gratos momentos, por estar en siempre de forma incondicional, porque simplemente a su lado el camino fue más llevadero.

A Hervin Peñaloza por su compañía y ayuda durante toda la carrera. Por estar para mí siempre que lo necesito, por su paciencia y dedicación al ayudarme en muchas materias, por brindarme su apoyo incondicional, confiar en mí y animarme siempre a seguir adelante a pesar de los obstáculos.

A todas aquellas personas que me brindaron su ayuda durante la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
<u>ÍNDICE DE CONTENIDO</u>	V
<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	Viii
<u>ÍNDICE DE TABLAS</u>	iX
<u>RESUMEN</u>	X
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>CAPÍTULO I EL PROBLEMA</u>	3
<u>Planteamiento del Problema</u>	3
<u>Justificación de la Investigación</u>	5
<u>Objetivos de la Investigación</u>	7
<u>Objetivo general</u>	7
<u>Objetivo específicos</u>	7
<u>Alcances de la investigación</u>	7
<u>Limitaciones de la investigación</u>	8
<u>CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO</u>	9
<u>Trabajos previos</u>	9
<u>Antecedentes Históricos</u>	12
<u>Bases Teóricas</u>	13
<u>Familia Amaryllidaceae</u>	13
<u>Género <i>Crinum</i></u>	15
<u>Especie <i>Crinum amabile</i></u>	16
<u><i>Determinación Taxonómica de la especie Crinum amabile</i></u>	17
<u><i>Composición química de la especie Crinum amabile</i></u>	17
<u>Productos naturales</u>	17
<u>Metabolitos primarios</u>	18
<u>Metabolitos secundarios</u>	18
<u>Extracto</u>	21

<u>Métodos de obtención</u>	22
<u>Maceración</u>	22
<u>Percolación</u>	22
<u>Tamizaje Fitoquímico</u>	22
<u>Bacterias</u>	23
<u>Tinción de Gram</u>	23
<u>Antibióticos</u>	24
<u>Resistencia</u>	24
<u>Mecanismos de resistencia bacteriana</u>	25
<u>Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana</u>	25
<u>Método de difusión en disco según Kirby Bauer</u>	26
<u>Método de dilución en caldo o agar</u>	27
<u>Cepa de Referencia Internacional</u>	27
<u>Cepas bacterianas en estudio</u>	28
<u>Determinación de la concentración mínima inhibitoria</u>	30
<u>Definición operacional de términos</u>	31
<u>Operacionalización de las variables</u>	32
<u>Hipótesis</u>	33
<u>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO</u>	35
<u>Tipo de investigación</u>	35
<u>Diseño de investigación</u>	35
<u>Población y Muestra</u>	36
<u>Unidad de investigación</u>	36
<u>Selección del tamaño de la muestra</u>	36
<u>Sistema de variables</u>	37
<u>Instrumento de recolección de datos</u>	37
<u>Materiales y métodos</u>	37
<u>Material vegetal</u>	37
<u>Preparación de los extractos</u>	38

<u>Tamizaje fitoquímico</u>	38
<u>Actividad antibacteriana</u>	46
<u>Diseño de análisis</u>	47
<u>CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	49
<u>Estudio del tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de <i>Crinum amabile</i></u>	49
<u>Análisis de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>Crinum amabile</i></u>	52
<u>CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u>	56
<u>CONCLUSIONES</u>	56
<u>RECOMENDACIONES</u>	57
<u>Cronograma de actividades</u>	58
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	59

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<u>Figura 1. Alcaloides de Amaryllidaceae representativos de nueve grupos.</u>	14

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<u>Tabla 1. Taxonomía de <i>Crinum amabile</i>.</u>	17
<u>Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente: actividad antibacteriana</u>	32
<u>Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de la especie vegetal.</u>	33
<u>Tabla 4. Procedimiento del tamizaje fitoquímico para el extracto de <i>Crinum amabile</i>.</u>	40
<u>Tabla 5. Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de <i>Crinum amabile</i></u>	50
<u>Tabla 6. Actividad antibacteriana del extracto de <i>Crinum amabile</i>.</u>	53
<u>Tabla 7. Comparación de los estudios antes realizados</u>	55

www.bdigital.ula.ve



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS
HOJAS de *Crinum amabile* (Linneo) FRENTE A CEPAS DE REFERENCIA
INTERNACIONAL.**

Autora:

Ania Hernández
C.I: V-23.493.465

Tutora:

Prof. Janne Rojas, *PhD.*

Cotutor:

Prof. Alexis Buitrago, *Dr.*

RESUMEN

Las plantas contienen sustancias activas con utilidad terapéutica, encontrar nuevos principios activos que puedan ser el origen de nuevos fármacos es una necesidad, debido a que las bacterias pueden evadir los efectos letales de los antibióticos a través de varios mecanismos; la especie *Crinum amabile* es utilizada en la medicina tradicional, razón por la cual el objetivo de esta investigación es analizar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* en cepas de referencia internacional. El diseño de esta investigación es de campo y de tipo experimental. El extracto fue obtenido mediante el proceso de extracción sólido-líquido por maceración en frío (solvente metanol) y se concentró destilando el metanol a presión reducida, luego se procedió al tamizaje fitoquímico. La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó empleando el método de difusión en agar con discos de papel, utilizando cepas de referencia internacional. El diseño de análisis se realizó mediante un enfoque cualitativo más que cuantitativo. En el tamizaje se determinó la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, saponinas, glicósidos, terpenoides, esteroides, fenoles, antraquinonas, cumarinas, saponinas y taninos. Para el extracto metanólico de la especie *Crinum amabile* se demostró que hubo actividad frente a dos cepas, *S. aureus* (**ATCC 25923**) donde a una concentración de 470 mg/ mL presentó un diámetro de inhibición equivalente a 7 mm y para la cepa de *E.coli* (**ATCC 25922**) a una concentración de 300 mg/ mL se obtuvo un halo de inhibición de 10 mm de diámetro. Llegando a la conclusión que dicho extracto puede utilizarse como alternativa terapéutica.

Palabras Clave: extracto, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana, *Crinum amabile*, cepas de referencia.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas por el hombre desde la antigüedad para un gran número de aplicaciones como fármacos, pigmentos y sabores (Macias, Galindo & Galindo, 2007). Los metabolitos de las plantas se han convertido en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre (Torres, 2004). Son la principal fuente de diversidad química en la elaboración de medicamentos. Sin embargo, a pesar de la intensa investigación de la flora, se estima que sólo el 5-15% de las especies de plantas superiores han sido estudiadas sistemática, química y farmacológicamente (Macias *et al.*, 2007).

Los análisis actuales han enfocado sus estudios en la búsqueda de compuestos que posean usos como agentes terapéuticos, con la finalidad de controlar las diferentes enfermedades infecciosas (Gibbons, 2005). Solo el descubrimiento y desarrollo continuo de nuevos fármacos y nuevas aplicaciones puede sobrellevar este problema según la Organización Mundial de la Salud (2016). Por tal motivo, resulta necesario encontrar nuevos compuestos que tengan efectos antibacterianos debido a que para las infecciones microbianas, el desarrollo de resistencia es el resultado inevitable del uso indiscriminado de antibióticos, lo que limita la eficacia y el tiempo de vida útil de cada uno; y aunque el uso correcto de compuestos con actividad antibacteriana, disminuirá el desarrollo de resistencias, no lo evitará. Solo el descubrimiento y desarrollo continuo de nuevos fármacos y nuevas aplicaciones puede sobrellevar este problema (Gibbons, 2005).

Por otra parte, como las bacterias pueden evadir los efectos letales de los antibióticos a través de varios mecanismos, lo que se requiere actualmente son agentes antibacterianos con mecanismos de acción novedosos; por

ende, las fuentes naturales pueden ayudar a la obtención de varias sustancias o mezclas de estas (Albado, Saez & Grabiél, 2001).

De acuerdo a la inclinación mundial en el desarrollo de investigaciones sobre actividades biológicas con utilidad social, se han realizado gran cantidad de estudios sobre la familia Amaryllidaceae, en investigaciones previas sobre las especies vegetales de dicha familia, en especial se destaca el género *Crinum* ya que se ha demostrado la presencia de alcaloides isoquinolínicos con actividades antimicrobianas, antitumorales y anticolinérgicas (Marmolejo, 2018).

En tal sentido, en la presente investigación se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico proveniente de las hojas de *Crinum amabile*, dicho extracto se obtuvo por el método de maceración a temperatura ambiente, se analizó cualitativamente la presencia de los metabolitos secundarios para posteriormente evaluar su actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar con discos de papel (Kirby-Bauer) en cepas ATCC.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Desde los albores de la humanidad, el hombre ha utilizado las plantas como un recurso de importancia para cubrir sus necesidades terapéuticas, saber que se ha ido transmitiendo de generación en generación (Soto & Leiva, 2015) a tal punto que, según la Organización Mundial de la Salud (2002), alrededor de 80% de la población mundial confía en las plantas para resolver sus problemas de salud.

Las plantas elaboran productos denominados fitoconstituyentes, los cuales se pueden dividir en metabolitos primarios y secundarios. Los primeros son abundantes en la naturaleza, se encuentran presentes en grandes cantidades y son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta. Son de fácil extracción y su explotación es relativamente económica además, estos conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios, los cuales son de distribución limitada; aunque más interesantes para la ciencia por sus diversas propiedades biológicas (García, 2008).

En las plantas, los principios activos o fitoconstituyentes, se hallan biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que, no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, aún no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades. En tal sentido las hojas de las plantas constituyen uno de sus órganos más interesantes, pues en ellas tienen lugar la mayoría de los procesos metabólicos de la planta; parte de estas hojas que reciben la savia bruta a través del tallo,

mediante la acción de unos complejos enzimáticos o fermentos que contienen, elaboran dos clases de compuestos nitrogenados: las proteínas (nutrientes indispensables para la vida) y los alcaloides (principios activos de acción fisiológica específica y energética) (Muñoz, 1996). Las hojas además del agua del suelo reciben energía solar, absorben el anhídrido carbónico del aire y realizan fotosíntesis de compuestos orgánicos dando origen a sustancias como glúcidos. Una parte de estos constituyen los elementos de reserva de la planta y otra parte se transforma en compuestos secundarios (Vélez, 2015).

Las plantas también elaboran en su metabolismo los taninos, vitaminas, sustancias antibióticas y concentran los elementos minerales (Muñoz, 1996). Es por ello que los extractos de plantas medicinales han sido utilizados desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias (Pharmacopea, 2007) así como también se han utilizado los compuestos orgánicos en el tratamiento de la infección (Cruz, 2001). Estos se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. Para la industria farmacéutica las plantas medicinales son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, que son utilizables directamente y que permiten obtener productos farmacéuticos con menores efectos secundarios y satisfacer las necesidades crecientes del uso de productos naturales (Pharmacopea, 2007).

Como puede inferirse el uso de las plantas medicinales sigue siendo parte importante de las investigaciones farmacológicas, ya que proporcionan alternativas para el tratamiento de múltiples enfermedades, además, son una opción para el desarrollo de fármacos; el presente trabajo de investigación es una revisión bibliográfica de la especie *Crinum amabile*, planta herbácea originaria de la India, que debido a sus propiedades inhibidoras de la

colinesterasa puede ser adecuado como tratamiento para la enfermedad de Alzheimer (Alpizar & Morales, 2003). Los alcaloides de esta especie se usan ampliamente en la medicina tradicional existen varias investigaciones realizadas sobre estos componentes en Asia, África y América del sur. La actividad antimicrobiana, ha sido muy estudiada con una gran cantidad de especies vegetales y *Crinum amabile* no podía ser la excepción. Además, dicha planta está constituida por una gran variedad de alcaloides, los cuales son de gran importancia por su actividad antimicrobiana, demostrados en investigaciones anteriores en la familia Amaryllidaceae y el género *Crinum* (Mahady, 2005).

Es por esto que, una vez analizada la problemática, se llegó a la siguiente interrogante: ¿El extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* presenta actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional, actividad que se realizará en el Laboratorio B “Antonio Morales”, en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Junio de 2018 a Febrero de 2020?

Justificación de la Investigación

La presente investigación se justifica desde el punto de vista fitoquímico, ha sido basada en las propiedades aportadas por los metabolitos secundarios de la planta, ya que una de las acciones planteadas con la especie *Crinum amabile* estuvo dirigida a usos antimicrobianos y terapéuticos; en tal sentido, la misma servirá de soporte teórico para futuras investigaciones sobre el tema.

Para las condiciones analíticas y microorganismos empleados en este trabajo, se utilizaron bacterias Gram positivas y Gram negativas, pudiéndose identificar la mayor eficacia contra estas y las concentraciones necesarias para que actúe el agente antimicrobiano.

El tema de investigación fue seleccionado considerando que la especie *Crinum amabile* perteneciente a la familia Amaryllidaceae, según estudios previos, es conocida por sus diversas propiedades entre ellas actividad antimicrobiana. Finalmente, dicha investigación permitió conocer la composición del extracto metanólico de las hojas de la especie *Crinum amabile*, a partir de allí se probó su actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional para ser utilizado con fines terapéuticos alternativos.

www.bdigital.ula.ve

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la actividad antibacteriana de extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* en cepas de referencia internacional, en el Laboratorio B “Antonio Morales”, en el Instituto de Investigaciones de la Universidad de Los Andes, desde Junio de 2018 a Febrero de 2020.

Objetivos Específicos

- Extraer los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Crinum amabile* por el método de maceración a temperatura ambiente con metanol.
- Identificar cualitativamente por tamizaje fitoquímico los tipos de metabolitos secundarios presentes.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de la especie en estudio por el método de difusión en agar con discos de papel.

Alcance de la Investigación

Según Hernández, Fernández y Baptista (2010) el alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos. Del alcance depende la estrategia de investigación, así, el diseño, los procedimientos y otros componentes del proceso serán distintos en estudios con alcances descriptivo, exploratorio, correlacional.

La profundidad de lo que se quiso alcanzar en esta investigación fue analizar la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de *Crinum amabile* y en qué medida actuó sobre algunas cepas de referencia internacional. El criterio de estudio se representó por la obtención del extracto, donde el

material vegetal fue secado y pulverizado, para luego macerarse en un solvente adecuado obteniendo así una mezcla de metabolitos secundarios de la planta, que fue puesto en diversas concentraciones en discos de papel de filtro determinándose así la actividad inhibitoria frente a algunas cepas de bacterias patógenas.

Limitaciones de la Investigación

Para llevar a cabo esta investigación fueron presentadas algunas limitaciones en cuanto a la adquisición de materiales y reactivos, el trabajo en el laboratorio se encontró sujeto a cambios constantes debido su alto costo y escases en el mercado, lo que pudo haber afectado el desarrollo de la presente investigación.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRIO

Para fundamentar teóricamente la presente investigación, en este apartado se seleccionaron diferentes estudios citados en orden temático, dentro de cada apartado los antecedentes han sido descritos cronológicamente del más reciente al más antiguo y en orden jerárquico de acuerdo a la relación que guardan con el tema en estudio, los cuales hacen referencia a algunas experiencias de estudios realizados sobre el género *Crinum* y sus efectos como agente antimicrobiano.

Trabajos Previos

Marmolejo Anderson (2018). Publicó un estudio titulado: Evaluación de la actividad antimicrobiana *In vitro* de los extractos de *Crinum amabile*, en el cual se recolectó el material vegetal en el cantón Muisne perteneciente a la provincia de Esmeraldas- Ecuador. Realizó el tamizaje fitoquímico de los bulbos de la planta, la fracción de alcaloides fue analizada por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) obteniendo el perfil para los alcaloides. El ensayo de la actividad antimicrobiana fue ejecutado mediante el método de microgotas y difusión de discos contra los microorganismos: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, esta actividad fue comparada con los discos de antibióticos de Gentamicina® (10 µg), Ampicilina® (10 µg) y el antimicótico comercial Fluconazol® (2mg/mL). Con la CG-EM se obtuvo como alcaloide mayoritario a la licorina con una abundancia superior (44%), seguido por la assoanina con un 11,63%. En cuanto a la actividad antimicrobiana se obtuvieron los siguientes resultados: en el extracto bruto de alcaloides en las concentraciones analizadas a 700 µg/ ml contra *K.*

pneumoniae (8mm), *P. aeruginosa* (9 mm) y *S. typhi* (9mm), además se observaron diámetros de inhibición de 10 mm y 6 mm para *E. coli* y *C. albicans* respectivamente, mientras que para el extracto bruto metanólico a la misma concentración los resultados fueron: *K. pneumoniae* (9mm), *P. aeruginosa* (9 mm), *S. typhi* (6mm) y *E.coli* (9 mm), *C. albicans* no presentó inhibición. En el método de microgotas no se obtuvieron buenos resultados debido a las bajas concentraciones empleadas.

El estudio de los alcaloides de N-óxido de *Crinum amabile* (Amaryllidaceae) fue una investigación realizada por Tallini, Torras-Claveria, Borges, Kaiser, Viladomat, *et al* (2018) en la Facultad de Farmacia, Universidad Federal de Rio Grande, Puerto Alegre-Brasil, basados en la premisa de que los productos naturales juegan un papel importante en el desarrollo de nuevos medicamentos y que en este contexto, los alcaloides de Amaryllidaceae han atraído considerable atención en vista de sus características estructurales únicas y diversas actividades biológicas. En este estudio a través de GC-MS (Cromatografía de Gases-Masas) identificaron 23 alcaloides ya conocidos de *Crinum amabile* y dos estructuras nuevas (N-óxido de augustina y N-óxido de buphanisina) dilucidadas estructuralmente por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) que se compararon con fármacos de referencia. También determinaron las actividades inhibitorias antiparasitarias y de colinesterasa (AChE y BuChE) de seis alcaloides aislados de esta especie, incluidos los dos nuevos compuestos. Ninguno de los alcaloides aislados de *C. amabile* dio mejores resultados que los fármacos de referencia, por lo que fue posible concluir que el grupo N-óxido no aumenta su potencial terapéutico.

En el trabajo presentado por Portero (2017) titulado: Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica *In vitro* de *Crinum amabile*. Trabajaron con la especie vegetal *Crinum amabile* recolectada en el cantón Muisne, Ecuador, los extractos brutos fueron obtenidos por separado mediante

maceración durante 72 horas de las hojas y bulbo de *Crinum amabile*, usando como solvente de extracción metanol. Por otra parte, los extractos alcaloidales de hojas y bulbos de la especie estudiada lo obtuvieron mediante extracción líquido-líquido usando solventes orgánicos. Las actividades antiinflamatoria y citotóxica *In vitro* fueron evaluadas mediante el modelo de neutrófilos aislados, mismo que está basado en la reducción de una sal de tetrazolio (WST-1). Los resultados obtenidos del ensayo de actividad antiinflamatoria demuestran que el extracto bruto del bulbo de *Crinum amabile* a una concentración de 200 ppm posee una marcada actividad antiinflamatoria con un 56,35% \pm 0,24 de inhibición inflamatoria. Sin embargo, el valor obtenido es inferior al exhibido por la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico®), 70,28% \pm 0,24 de inhibición inflamatoria. Los resultados de la actividad citotóxica demuestran que el extracto alcaloidal del bulbo de *Crinum amabile* a una concentración de 12,5 ppm presenta mayor viabilidad celular con un 65,71%.

Con el propósito de contribuir al conocimiento científico de las especies endémicas del Perú, Soto y Leiva (2015) realizaron el estudio exomorfológico y fitoquímico de los bulbos de *Clinanthus microstephium* (Ravenna) Meerow e *Ismene amancaes* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae), los cuales fueron recolectados en El Tablón y Rayanpampa, al oeste de Salpo, provincia Otuzco, región La Libertad, Perú. Las descripciones exomorfológicas se hicieron con plantas *In situ*. El tamizaje fitoquímico se realizó mediante una extracción sucesiva con solventes de polaridad ascendente (diclorometano, etanol y agua) y se procedió a realizar la identificación del tipo cualitativo haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación. Los bulbos de ambas especies presentan una gran variedad de metabolitos secundarios, entre ellos alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianidinas, triterpenos, esteroides, azúcares reductores, aceites y grasas, aminoácidos,

resinas y mucílagos; mientras que solo se encontraron lactonas y cumarinas en la especie *Clinanthus microstephium*.

Las investigaciones antes mencionadas propusieron objetivos similares a los planteados en la presente investigación, llegando a conclusiones favorables que dieron base para la elaboración del mismo y pueden servir de guía para realizar comparaciones.

Antecedentes Históricos

El nombre de la familia Amaryllidaceae fue originado por el considerado creador de la clasificación de los seres vivos Carlos Linneo (Anderson, 1997), es un grupo monofilético, reconocido como familia desde inicios del siglo XIX, en la delimitación actual incluye 73 géneros y cerca de 1650 especies en (Chase, Reveal y Fay 2009), la historia taxonómica de esta familia es bastante extensa está caracterizada por diversas interpretaciones y definiciones (Anderson, 1997).

Históricamente las Amarilidoideas representan uno de los elementos del grupo linneano Hexandra monogynia (Linneaus, 1764). Desde 1764, los géneros de esta subfamilia han sido clasificados dentro de las liliáceas o como una familia separada, las amarilidáceas. Siete de los 51 géneros de dicha familia que Carlos Linneo dispuso en su tratado “Hexandra monogynia” han sido siempre incluidos dentro de una misma unidad taxonómica (Lindley, 1836). Pero fue la clasificación de Hutchinson la primera re-circunscripción radical de Amaryllidaceae, en la que se definía el carácter que unificaba a todos los miembros de la familia: la presencia de inflorescencias en umbelas rodeadas de un involucre de una o más brácteas (Meerow, Fay & Chase. 1999).

Bases Teóricas

Familia Amaryllidaceae

Según Henriette y Dutilh (2005) las Amarilidáceas representan un grupo de plantas con una considerable importancia económica y cultural, muy utilizadas como condimento y con fines ornamentales, hortícolas y medicinales. Se distribuyen principalmente en zonas tropicales subtropicales y holárticas, con una considerable diversidad en África y Suramérica seguida de Asia y Australia (Meerow & Snijman, 1998).

Son hierbas perennes o bienales con bulbos cubiertos por catáfilas, ocasionalmente con rizomas, las hojas basalmente dispuestas con un escapo terminal, generalmente aplanadas, dorsiventrales y lineares, envainadas en la base, paralelinervias, usualmente glabras. Posee una pseudomembrana escaposa, glabra, formada por una o varias cimas helicoideas con los ejes suprimidos, asociadas a un involucre constituido por brácteas libres o basalmente connadas; actinomorfas a débilmente zigomorfas, bisexuales, los pétalos en dos series de tres, sub-iguales, usualmente unidos en la base formando un tubo, de color blanco, amarillo, rosado, púrpura o rojo; seis estambres, en dos series, los filamentos angostos o aplanados e insertos en la base de los lóbulos del perianto o en la parte apical del tubo, en ocasiones los filamentos expandidos y ordenados en su base para formar una corona estaminal, las anteras dorsifijas o basifijas, generalmente alargadas y con dehiscencia longitudinal; ovario ínfero tricarpelar, trilocular, provisto de nectarios septales, el estilo simple, el estigma puntiforme, capitado o trilobado. Fruto generalmente una cápsula, raramente carnoso e indehiscente; semillas por lo general más o menos aplanadas, con fitomelano (López & Serna, 2002).

Los alcaloides de Amaryllidaceae tienen múltiples efectos biológicos, que son de interés para la industria farmacéutica. Hasta el momento se han

identificado más de 600 alcaloides sintetizados por la familia Amaryllidaceae (Hotchandani, Villers y Desgagné, 2019). La enorme cantidad de alcaloides diversos de Amaryllidaceae se clasifica en diferentes grupos principalmente según sus características estructurales. Los alcaloides representativos son norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemanthamina, narciclasina, pretazettina, montanina y galantindol (Figura 1.) (Maomao, Chunrong, Oude, Xianming y Xuechuan, 2015).

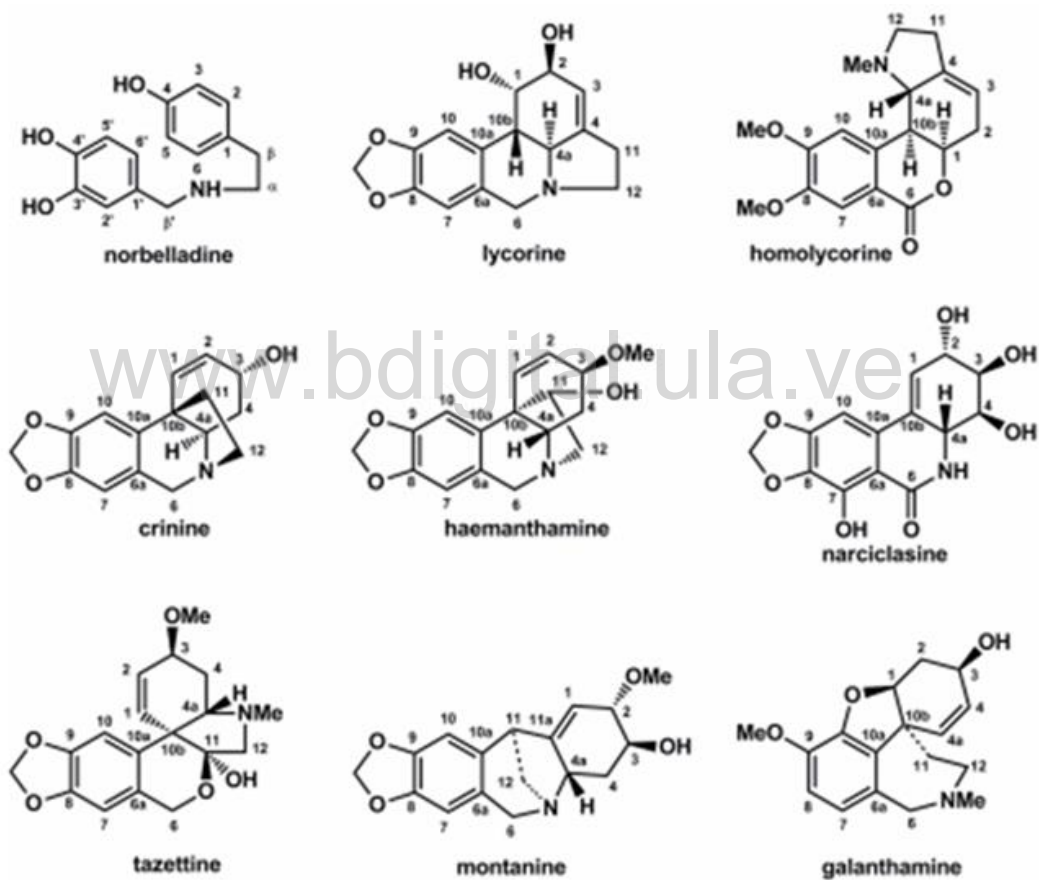


Figura 1. Alcaloides de Amaryllidaceae representativos de nueve grupos. Copiado de Ruschel, L. 2018.

Género *Crinum*

Es un género de plantas perteneciente a la familia Amaryllidaceae con flores vistosas similares a los lirios (Calderón, 2010). Comprende aproximadamente 160 especies, se halla ampliamente distribuido, encontrándose en América, África, Asia y Australia, con especies representativas en cada uno de estos continentes (Alzate, Lesmes, Cortés, Varela & Osorio, 2019). En Venezuela, el género está representado por unas pocas especies nativas y diversas especies introducidas como cultivo ornamental, las cuales provienen fundamentalmente del este de África (Raymúndez, *et al.*, 1993).

En general las plantas del género *Crinum* destacan por sus usos como inductor emético, antirreumático, tratamiento para la otitis, tratamiento para VIH, antimalárico, tos, resfriados, trastornos renales y hepáticos, tratamiento en afecciones de la piel, antibacteriano, antiparasitario y antiviral (Thi Ngoc Tram, 2002)(Walk, 1995). Las raíces frescas se utilizan por su capacidad de inducir emesis, las semillas se utilizan como purgantes, diuréticos y tónicos, además las hojas como expectorantes, tratamiento en afecciones de la piel y procesos inflamatorios (Thi Ngoc Tram *et al.*, 2002).

Son hierbas perennes, 0.6-1.5 m de altura. Bulbos blancos, con túnica marrón, voluminosos, 6-30 cm de diámetro. Poseen de 6 a 15 hojas, arrosetadas, espiraladas, sésiles, liguladas; su lámina foliar va de linear a lanceolada, larga, plana, 30-150 cm x 3-12 cm. Inflorescencia umbelada, o flor solitaria; escapo terete, macizo, 0.3-1.5 m de largo, con 2 o más brácteas estrechamente triangulares. Flores numerosas 7-100, actinomorfas o zigomorfas, hermafroditas, aromáticas; perigonio campanulado, infundibuliforme, hipocrateriforme o rotado, tubo del perianto largo; pétalos 6, fusionados en la base, 5-18 cm x 1-1.7 cm, blancos, verdes, rosados o rojos, vistosos; pedicelo 1-12 cm de largo. Estambres 6, libres; filamentos blancos, insertos; anteras dorsifijas, marrones. Ovario ínfero, trilocular; estigma

subcapitado. Frutos en cápsulas dehiscentes, globosas. Semillas numerosas, verrugosas, aplanadas o voluminosas, testa blanca, verde a marrón (Alzate, *et al.*, 2019).

Especie *Crinum amabile*

Es una planta herbácea perteneciente a la familia Amaryllidaceae. Derivado del griego *krinon*=un lirio y del epipeto latino *amabile*=digno de amor. Es un híbrido entre *Crinum asiaticum* y *Crinum zeylanicum*. (Calderón, 2010).

También llamada lirio de araña púrpura, lirio de *Crinum* rosado o lirio de araña gigante rosado, se encuentra ampliamente distribuida en Asia, América y África, especialmente en países con climas tropicales y calurosos, no solo es considerada como una planta decorativa, puesto que presenta llamativos colores, también es usada en la medicina ancestral como emético, antimalárico, antimicrobiano y para tratar el reumatismo (De La Torre, 2008).

Es una especie de vegetales perennes que está formada por bulbos gruesos alcanzando hasta 15 cm en su diámetro. Sus hojas son muy largas, planas y dispuestas en rosetas. Tiene flores grandes de coloraciones rojas, rosadas o blancas que acompañan a los bulbos, son intensamente atractivas, hermafroditas y actinomorfas; el perigonio está formado por seis sépalos ensamblados, integrando un tubo abierto o cilíndrico, los estambres exponen filamentos y anteras inestables (Gilman, 2014).

Determinación taxonómica de la especie *Crinum amabile*.

Tabla 1. *Taxonomía de Crinum amabile*

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

Nota. Recuperado de Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica *In vitro* de *Crinum amabile*, de Portero, S., 2017, p.7.

Composición química de la especie *Crinum amabile*.

Entre los alcaloides representativos hallados en *Crinum amabile* están: licorina, crinamabina, 4 α -Dehidroxicrinamabina, bufanisina, ambellina, flexitina y augustina, a los que se señala como responsables de los efectos terapéuticos de la planta (Pham, 1998). A estos alcaloides de los bulbos les acompañan resinas y polisacáridos cuantificados en 5,4% de 11 sacáridos solubles en agua, 8,7% de pectinas y 8,2% de hemicelulosa. Además de glicósidos como el amabilosido (3-hidroxi-4-O - \ beta-D-glucopiranosilbenzaldehído) (Thi Ngoc Tram, 2002).

Productos naturales

Los productos naturales son aquellos que se han extraído de la naturaleza, ya sea provenientes de otro organismo vivo, del suelo o de algún otro elemento de la tierra (Higuchi, 2015). La maquinaria química de un

vegetal es tan ingeniosa que asombra al estudiar en su profundidad, si no cuenta con el mecanismo de evasión y encontrarse ancladas al suelo o algún otro sustrato, las variadas especies vegetales desarrollan mecanismos químicos de defensa que posibilitan su supervivencia frente al ataque de parásitos y herbívoros. A dichos mecanismos ha contribuido, sin lugar a dudas, el amplio espectro de sustancias orgánicas propias de los organismos vegetales. A toda esa diversidad de compuestos que el hombre extrae de un vegetal y aprovecha o intenta darle alguna utilización son denominados productos naturales vegetales (Ringuelet & Viña, 2013). Los compuestos químicos celulares (metabolitos) pueden ser primarios y secundarios.

Metabolitos primarios.

Los compuestos primarios son todos aquellos que son esenciales para el funcionamiento de la materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción. Comprenden los glúcidos o hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.

Metabolitos secundarios.

Los compuestos secundarios cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo. No están, en general directamente involucrados con el crecimiento y desarrollo, ni participan en procesos tales como la obtención de energía. Muchos de ellos son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer insectos y otros polinizadores, repeler predadores o seres dañinos, impedir la competencia con otras plantas, adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima, cumpliendo preferiblemente con funciones ecológicas (Ringuelet *et al*, 2013).

En muchos casos los metabolitos secundarios pueden ser materia prima para sintetizar otros compuestos útiles, originando productos de semisíntesis. La utilidad de los mismos está solamente limitada por la imaginación humana o por el avance de los conocimientos científicos (Bandoni & Czepak, 2008). A fin de establecer un ordenamiento, estos compuestos se clasifican teniendo en cuenta: su ruta biosintética, las características estructurales comunes y las propiedades de solubilidad (Macías, 2007). Como ejemplos se pueden citar:

Alcaloides: son bases orgánicas nitrogenadas, generalmente con un anillo heterocíclico de algún tipo y derivan biológicamente de aminoácidos. Presentan estructuras muy diversas por lo que no constituyen un grupo homogéneo en términos de su estructura, propiedades y fuentes de obtención. Se han clasificado de acuerdo a la fuente de donde se han aislado, según la actividad fisiológica, o con base en la estructura química. Al utilizarse con propósitos taxonómicos debe considerarse su biogénesis o biosíntesis en las plantas que las producen (Montiel, 19978).

Glicósidos: son compuestos orgánicos formados por un azúcar simple (comúnmente un monosacárido) en el cual el átomo de hidrogeno de un grupo (-OH) es reemplazado por otra molécula que generalmente presenta actividad biológica. Los glicósidos se presentan en abundancia en las plantas, algunos de ellos como pigmentos, usados en farmacología y en la industria de los colorantes, por mencionar algunos ejemplos (Ringuelet & Viña, 2013).

Flavonoides: son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales. Se conocen como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema $C_6H_3C_6$, en el cual dos anillos aromáticos están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo (Macías, 2007). Se emplean desde hace mucho tiempo como

colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas (Vélez, 2015).

Triterpenos: son compuestos con treinta átomos de carbono, que resultan de la ciclación del epoxiscualeno la mayoría con estructura tetra o pentacíclica. Dentro de este grupo se incluyen los esteroides (moléculas con estructura perhidrociclopentano-fenantreno) (Vélez, 2015).

Mucilagos: son compuestos con estructura de tipo polisacárido, que forman un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae (Vélez, 2015).

Compuestos fenólicos: son un grupo muy diverso de metabolitos secundarios que se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo unidos a uno o más anillos aromáticos en su estructura química, la mayoría hidrosolubles. Muchas sustancias fenólicas aparecen como derivados formados a partir de condensación o adición (Macías, 2007).

Quinonas: se reconocen por sus propiedades tintóreas, su coloración puede ir desde el amarillo hasta casi el negro. Se encuentran frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz, y en algunos casos en las hojas donde su color está enmascarado por pigmentos. Para su mejor estudio las quinonas se subdividen en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas isopropenoides. Pueden además contener diversos grupos funcionales, anillos de furano o pirano, encontrarse como dímeros y ser parcialmente reducidas como los antranoles y antronas (Look, 2001).

Cumarinas: son los metabolitos C_6C_3 , más característicos. Son lactonas aromáticas cuya biosíntesis suele producirse a partir de ácidos cinámicos. Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, se encuentran en todas sus partes, desde la raíz a flores y frutos, siendo más

abundantes en estos últimos; se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos (Vélez, 2015).

Saponinas: son sustancias heterósidas cuya genina puede ser triterpenica o esteroídica, pueden tener una estructura pentacíclica. En general son espumantes en soluciones acuosas y hemolíticas.

Taninos: son una variedad de polifenoles vegetales que aparecen en altas concentraciones en la corteza y leño de algunos árboles y en agallas vegetales. Sus principales características son su capacidad antioxidante y la capacidad que tienen de unirse a proteínas. Químicamente hay dos tipos de taninos hidrolizables y no hidrolizables (Vélez, 2015).

Extracto

Los extractos son una mezcla compleja de compuestos químicos, obtenibles por procesos físicos o químicos a partir de una fuente natural y utilizables en cualquier campo de la tecnología (Pardo, 2002). Ahora bien, los extractos vegetales son mezclas complejas de metabolitos secundarios, pueden ser aislados de las plantas por diversos métodos como la destilación por arrastre de vapor, por expresión de los frutos o por otros métodos. Los principales componentes químicos de estas mezclas son: mono y sesquiterpenos incluyendo carbohidratos, alcoholes, éter, aldehídos y cetonas, los cuales son responsables de las fragancias y de las propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales. Además los extractos vegetales cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos (Kalemba & Kunicka, 2003).

De una misma planta, dependiendo de la parte utilizada, del solvente y de la técnica de extracción, se puede obtener una diferente gama de sustancias (Santamaría, *et al.*, 2015). Otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia cantidad de microorganismos como

bacterias, hongos, virus, protozoarios insectos y plantas (Kalemba & Kunicka, 2003).

Métodos de obtención.

- ***Maceración.***

Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente, consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que los largos tiempos de extracción en el agua pueden propiciar a la fermentación o formación de mohos) hasta que el mismo penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente y tapado se deja en reposo por un periodo de 2 a 14 días con agitación esporádica, luego se filtra el líquido, se extra el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (González, 2004).

- ***Percolación.***

También conocido como lixiviación es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener ese material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. En este proceso se requiere agregar solvente constantemente. (González, 2004).

Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Sharapin, 2000). Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de

reacción de color y precipitación. Es una técnica de evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Palacios, M. 2008).

Bacterias

Son organismos unicelulares constituidos por células procariotas de tamaño entre 0,2 – 5 μm , poseen reproducción binaria, además presentan mecanismos de producción de energía y material genético. Son considerados como los organismos más abundantes que existen en la tierra. Estos organismos debido a sus características estructurales pueden cohabitar con otros tipos de organismos y además con organismos superiores (Ausin & Moreno, 2005).

Las bacterias están constituidas principalmente por: pared celular, la membrana celular, citoplasma, periplasma, ribosomas, núcleo y nucleoide, también por estructuras variables que se encuentran generalmente en la pared celular las cuales son: los pilis, flagelos, la cápsula y los poros (Tortora *et al*, 2007). La pared celular o bacteriana es de gran utilidad, le brinda las propiedades de rigidez y elasticidad a la bacteria por ende son las responsables de su forma, siendo la principal barrera de protección (Montoya, 2008).

Tinción de Gram

La tinción de Gram o coloración de Gram, debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884 (Jatin, 2011). Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas a las que se visualizan de color morado, y bacterias Gram negativas a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella (Gram, 1884).

Estas bacterias se diferencian entre las paredes celulares, de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, la pared celular de las bacterias

Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglicano, además de dos clases de ácidos teicoicos, anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicóico que está anclado solamente en el peptidoglicano (también conocido como mureína).

Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las bacterias Gram negativas es delgada, se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido (Jatin, 2011).

Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a estas discrepancias constitutivas de su pared. La clave es el peptidoglicano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mayor proporción que las Gram negativas (Aulton, E. 2004).

Antibiótico

Según la Real Academia Española un antibiótico es la “sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos, por su acción bactericida”. Dicho de otra manera, son sustancias que matan a las bacterias o hacen que éstas dejen de crecer.

Resistencia bacteriana

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos. La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en

la secuencia de bases de cromosoma) y por la trasmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias.

En el primer caso, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la trasmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Fernández, López, Ponce & Machado, 2003). La resistencia es un problema continuo que se hace aun mayor cuando el microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene a facultad de transmitirlo a otros microorganismos de su misma o diferente especie (Moreno, González & Beltrán, 2009).

Mecanismos de resistencia bacteriana

Entre los mecanismos de resistencia principales destacan; la alteración de la permeabilidad, cambiando el número de porinas, bloqueando así el ingreso del antimicrobiano; modificando el sitio activo o diana, se transforman sitios específicos de la pared celular generando un blanco diferente, disminuyendo así la afinidad de unión por el antimicrobiano; expulsión de bombas de eflujo, donde transportan el antimicrobiano al exterior de la célula evitando su acción; producción de enzimas que hidrolizan al antimicrobiano evitando la posibilidad de actuar sobre el microorganismo, como por ejemplo la producción de β - lactamasas que actúan contra los antibióticos β -lactámicos impidiendo la acción de estos sobre el microorganismo (Moreno, *et al.*, 2009).

Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana

Bajo las condiciones adecuadas, la actividad de los antibióticos puede demostrarse por su efecto inhibitor sobre los microorganismos (Martínez,

2005). Las bacterias tienen diferente sensibilidad a distintos agentes antibacterianos, por ello es de gran importancia realizar este tipo de pruebas, las cuales se basan en el enfrentamiento *In vitro* de la bacteria con distintas concentraciones del agente. La evaluación de esta sensibilidad sirve para la selección del compuesto más adecuado en el tratamiento de una infección bacteriana (Gamazo, 2000).

Los métodos más utilizados para determinar la sensibilidad de una bacteria a agentes microbianos son la difusión en agar y la dilución en caldo o agar.

Método de difusión en agar según Kirby Bauer

Es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco; es un método cualitativo que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas para estas cepas) (Ferraro, 2000).

El método de difusión en disco consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Müller Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Cantón R, et al García J., 2000).

Método de dilución en caldo o agar

Consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobiano, y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la concentración mínima inhibitoria (CIM) (Taroco, Seija, y Vingoli, 2008).

Este método depende de la inhibición del crecimiento de un cultivo microbiano, en una solución uniforme del antibiótico (diluciones), en un medio fluido (caldo), que es favorable para el crecimiento del microorganismo, en ausencia del antibiótico. Se realiza para sustancias antimicrobianas que se evalúen con microorganismos de rápido crecimiento, se mide la turbidez del caldo de cultivo por métodos espectrofotométricos o colorimétricos y finalmente se realiza una curva que refleja la cantidad de microorganismos que han crecido, contra las respectivas diluciones de antibiótico (Martínez, 2005).

Cepa de Referencia Internacional

Es un material biológico de referencia certificado, se trata de un cultivo puro, en el cual se han observado las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes (Montoya, 2000).

Las cepas ATCC (Cepas de Colección de Tipo Americano) son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética o ambiental. Sus características genotípicas y fenotípicas garantizan la identidad del microorganismo y al tener esta documentación, el laboratorio evitará realizar pruebas adicionales para la identificación de las cepas, lo que se traduce en ahorro de tiempo y recursos (Triantafilo & Vjera, 2002).

Cepas bacterianas en estudio

En este trabajo de investigación se estudiaron cinco tipos de cepas bacterianas de referencia internacional, las cuales son: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- *Enterococcus faecalis*.

Bacterias clasificadas como cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos (Ortega, 2010). Son células esféricas u ovoides, de tamaño 0,6-2,0 × 0,6-2,5 μm, no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no móviles, anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Presentan requerimientos nutricionales complejos. Crecen usualmente en un caldo de cultivo a 10 °C y 45 °C, aunque el crecimiento óptimo es a 37 °C. Pueden crecer a pH 9,6 con 6,5 % de NaCl y con 40 % de bilis (Brooks, Butel, Carroll, Morse y Mietzner, 2011).

- *Staphylococcus aureus*.

Son cocos Gram positivos de 0,5 – 1 micrómetros de diámetro, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo, son coagulasa negativos. Poseen una capa gruesa de péptidoglicano en su cubierta de polisacáridos y proteínas las cuales contribuyen a su factor de virulencia. Crecen a una temperatura optima de 37 °C y se desarrolla mejor a un pH de 7,6, la adición de glucosa favorece su crecimiento (Gil, 2000).

- *Escherichia coli*.

Bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia de enterobacterias. Son bacilos de 2 a 3 micrómetros, poseen cápsula o microcápsula, además poseen fimbrias que sirven para fijarse a las superficies celulares del

organismo hospedero. Son anaerobias facultativas reductoras de nitritos a nitratos (Brooks, 2011). El agar más comúnmente utilizado para el crecimiento de esta es el Agar Mc Conkey, también pueden crecer en agar sangre de cordero y agar eosina azul de metileno (Farfán, Ariza, Vargas & Vargas, 2016).

- *Klebsiella pneumoniae*.

Bacteria anaerobia facultativa no tiene la capacidad de moverse, es Gram negativa, posee un tamaño aproximado de 0.3-0.5 μ m, presenta una cápsula de polisacáridos, que le brinda un semblante mucoso y brillante a las colonias que frecuentemente tiene una tonalidad rosa a blanquecina. Generalmente su crecimiento se lo realiza sobre agar McConkey a 37 °C (Brooks *et al.*, 2011; Kenneth *et al.*, 2011).

- *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacteria aerobia estricta móvil debido a sus flagelos, posee forma de bastón, tiene un tamaño aproximado de 0,6 a 0,2 μ m se encuentra dispuesta en células individuales formando pequeñas cadenas o alguna veces en pares, es Gram negativa, no fermentan hidratos de carbono en algunos casos oxidan glucosa, crecen en el agua. Forma colonias lisas y redondas con un color verde fluorescente y secreta una sustancia coloreada fluorescente denominada pioverdina que es responsable del color verde en los cultivos.

Esta bacteria crece en ambientes aerobios estrictos, tiene la capacidad de crecer en múltiples medios de cultivos a una temperatura de 37 a 42°C, produce un olor dulce característico similar al de las uvas (Brooks *et al.*, 2011).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI)

Es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. De igual manera es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica en donde es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias: S (sensible), I (intermedia) R (resistente) y no sensible. (Amsterdam, 1996; CLSI, 2018).

- **Sensible.** Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio se puede tratar apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubieran contraindicaciones.
- **Intermedia.** Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que se pueda aumentar la dosis, o que la droga concentre fisiológicamente en el tejido infectado. También nos indica una “zona buffer” que debería evitar que pequeños factores técnicos difíciles de controlar causen mayores discrepancias de interpretación.
- **Resistente.** Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana y la eficacia clínica no ha sido comprobada.
- **No sensible.** Esta categoría se utiliza microorganismos que solo tienen categoría de identificación sensible, debido a la ausencia o a la rara aparición de cepas resistentes. Aquellos aislamientos con halos de inhibición menores al punto de corte sensible se denominan “no sensibles” (CLSI, 2018).

Definición operacional de términos.

Una definición operacional constituye el conjunto de procedimientos que describen las actividades que un observador debe realizar para recibir las impresiones sensoriales, las cuales indican la existencia de un concepto teórico en mayor o menor grado. En otras palabras especifica que actividades deben realizarse para medir una variable e interpretar los datos obtenidos (Hernández, *et al*, 2010).

Metabolito

Es cualquier sustancia producida durante el metabolismo (digestión u otros procesos químicos) (MedlinePlus).

Alcaloide

Compuesto orgánico nitrogenado, como la morfina o la cocaína, producido casi exclusivamente por vegetales (RAE).

Antibacteriano

Dicho de un medicamento, de una sustancia ó de un procedimiento que se utiliza para combatir las bacterias (RAE).

Halo de inhibición

Zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen (Martínez, 2005).

Agar Mueller Hinton

Medio para el ensayo de sensibilidad, o para resistencia de agentes patógenos médicamente importantes frente a antibióticos y sulfamidas. Este medio es utilizado para la realización del ensayo de difusión en placas (Merck, 1994).

Operacionalización de las variables

La operacionalización de las variables consiste en la degradación de elementos más abstractos hasta llegar a un hecho concreto, permite la elaboración de los instrumentos de medida convirtiendo los indicadores en ítems o elementos de observación (Grajales, 1996); por lo general se representa en un cuadro (Ver tablas 2-3).

Tabla 2.

Operacionalización de la variable dependiente: actividad antibacteriana

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana	Dependiente Cuantitativa Continua	La actividad de una sustancia antibacteriana se define como: la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado y se basa en la medición de su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (halo de inhibición) se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos (Martínez, 2005).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
A través del método de difusión en agar con discos empleando la determinación de la concentración mínima inhibitoria.	Sensible	Presencia de halo de inhibición marcado
	Intermedio	Presencia de halo de inhibición intermedio
	Resistente	Ausencia de halo de inhibición o presencia poco perceptible

Tabla 3.

Operacionalización de la variable independiente: extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química del extracto metanólico de las hojas de <i>Crinum amabile</i>	Independiente Cualitativa Discreta	Los metabolitos secundarios son sustancias que tienen una estructura compleja, que pueden presentarse en una especie o especies a fines. Están presentes en bajas concentraciones, muchos ejercen un efecto fisiológico y farmacológico sobre el hombre. Son usados comercialmente como compuestos activos para la elaboración de productos farmacéuticos (Vega, 2001).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Pruebas químicas cualitativas también conocidas como tamizaje fitoquímico.	-Metabolitos secundarios presentes -Metabolitos secundarios ausentes	La aparición de turbidez, precipitados, cambios de color, formación de espuma y presencia de fluorescencia que dependen del metabolito a identificar.

Hipótesis

Las hipótesis son proposiciones tentativas acerca de las relaciones entre dos o más variables y se apoyan en conocimientos organizados y sistematizados (Hernández Sampieri *et al*, 2014). En base al alcance de esta investigación y a las variables antes presentadas fue formulada la siguiente hipótesis: “El extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* presenta actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional, actividad que se realizará en el Laboratorio B “Antonio Morales”, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Junio de 2018 a Febrero de 2020.

Hipótesis alternativa (H(A))

Es posible que el extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* presente actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional, actividad que se realizará en el Laboratorio B “Antonio Morales”, en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes , desde Junio de 2018 a Febrero de 2020.

Hipótesis nula (H(0))

Es posible que el extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* no presente actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional, actividad que se realizará en el Laboratorio B “Antonio Morales”, en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Junio de 2018 a Febrero de 2020.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Una vez enunciado el problema de investigación, establecidos los objetivos y conceptualizadas las bases teóricas que fundamentan el estudio, se procedió a diseñar la metodología que permitió alcanzar los objetivos propuestos. En esta sección están descritos los tópicos relacionados con la metodología de este trabajo, tales como, alcance y diseño de investigación. De igual forma son mencionados los ejemplares biológicos utilizados, las variables, técnica e instrumentos de recolección de datos, materiales, procedimiento, cronograma de actividades y análisis estadístico.

Tipo de Investigación

Hurtado (2010), refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo que se quiere saber, pues esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso e identifica el tipo de investigación. En consecuencia el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro. Específicamente, en esta investigación se analizó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* en cepas de referencia internacional (bacterias Gram positivas y Gram negativas) en función de un periodo y contexto determinado, por lo tanto se puede decir que esta investigación fue de tipo analítica.

Diseño de Investigación

La estrategia que se implementa para recolectar los datos de un proceso de investigación constituye el diseño (Hurtado, 2010). De tal manera, esta investigación fue de campo, ya que los datos del evento de estudio se recolectaron en el lugar donde ocurre el fenómeno, específicamente en el Laboratorio B “Antonio Morales”, ubicado en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Con

respecto al tiempo de recolección de datos, esta investigación se realizó de manera evolutiva contemporánea, debido a que se recolectaron durante el periodo de desarrollo del trabajo.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Hernández, Fernández y Baptista (2004), señalaron 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. En base a esto, al principio la población a estudiar fue finita, integrada por la especie *Crinum amabile* que se recolectó en el estado Mérida, en el sector La Mucuy Baja, la obtención del extracto de las hojas de la planta fue realizada en el Laboratorio B de productos naturales “Antonio Morales”, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes y la actividad antimicrobiana fue analizada en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios Profesora Luisa Vizcaya de la Universidad de Los Andes.

Selección del Tamaño de Muestra

Según Varios autores una decisión importante en cualquier investigación es la selección adecuada del tamaño muestral, sostienen que la estimación del este puede considerarse un instrumento del que dispone el investigador para evaluar la factibilidad y la necesidad de recursos de su proyecto. No es ético realizar un estudio con un tamaño de muestra que no ofrezca un poder estadístico suficiente, ya que, desde el punto de vista de la metodología científica, el diseño no es adecuado (Kerlinger & Lee 2002). Para efectos del presente estudio, se evaluaron las hojas de la especie *Crinum amabile* por medio de su extracto utilizando como solvente metanol, con el fin de determinar la actividad antibacteriana de dicho extracto.

Sistema de Variables

Las variables relacionadas con el propósito de esta investigación fueron las siguientes:

- Variable dependiente (VD): actividad antibacteriana.
- Variable independiente (VI): extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile*.

Instrumento de Recolección de Datos

Los instrumentos que se utilizaron para la obtención de la información debieron ser evaluados por los expertos, con el objetivo de determinar el valor del contenido. De hecho, se estima que la validez constituye el procedimiento que permite determinar la consistencia interna de los instrumentos en cuanto a que midan lo que se propone medir, de ahí se dice que se refiere al grado en que un instrumento realmente mida la variable según Hernández & Cols (2010).

Materiales y métodos

Material vegetal

Recolección de la especie botánica.

La muestra vegetal de la especie *Crinum amabile*, fue recolectada en el año 2018 durante el periodo comprendido desde Enero a Mayo, en el sector La Mucuy Baja, municipio Santos Marquina, Estado Mérida ubicado a los 1687 m s. n. m. (coordenadas 8° 36' 0" N, 70° 57' 5.04" W).

Determinación taxonómica de la planta.

El material vegetal colectado fue identificado por el Dr. Pablo Meléndez. Una muestra testigo fue depositada en el Herbario "Dr. Luis Ruiz Terán" (MERF) Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. La misma reposa en el inventario con el código: **JR69**.

Selección, división y preparación del material vegetal.

El material vegetal recolectado de la especie *Crinum Amabile*, fue sometido, a un proceso de selección para eliminar las impurezas y partes en descomposición de las hojas. Luego se seleccionó una muestra representativa destinada a la preparación del extracto.

Secado, molienda y pesada del material vegetal.

El material vegetal seleccionado de la especie *Crinum amabile*, se secó en un horno eléctrico ubicado en el herbario, a una temperatura no superior a 40 °C, durante al menos 72 horas. Transcurrido este tiempo, se verificó que la muestra se encontrara libre de humedad y quebradiza al tacto, para luego realizar el proceso de molienda, hasta obtener un polvo fino capaz de traspasar un tamiz de malla número 20. La muestra obtenida con un peso de 1.500 g, se colocó en un envase rotulado, para luego colocarse en un lugar seco y fresco, hasta la realización de las diferentes pruebas.

Preparación de los extractos

Extracción por maceración del material vegetal

La muestra seca y molida de *Crinum amabile* fue sometida a extracción sólido-líquido por maceración en frío, utilizando como solvente metanol, durante un período de 10 días divididos en dos ciclos de cinco días. El extracto metanólico obtenido se filtró por gravedad y concentró destilando el metanol a presión reducida, utilizando un rotavapor a la temperatura de 40 °C. El producto seco se pesó (200g) y colocó en un envase de color ámbar rotulado y sellado, conservándose en un lugar seco y fresco hasta la realización de los ensayos.

Tamizaje Fitoquímico

El estudio fitoquímico preliminar para el extracto metanólico se realizó en el Laboratorio B de Productos Naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad

de Los Andes, bajo la supervisión del Dr. Alexis Buitrago. Los diferentes ensayos colorimétricos y cromatográficos utilizados reportados en la tabla 4, permitieron identificar de forma cualitativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, cumarinas, esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, taninos y mucilagos (Marcano & Hasegawa, 2002; Trease & Evans, 2002; Tiwari, 2011; Shyamala-Gowri & Vasantha, 2010).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 4.

Procedimiento del tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico Crinum amabile.

Alcaloides				
Ensayo	Reactivo	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 %. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adicionar gotas del reactivo	Precipitado color rojo pardo
Dragendorff	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O y KI		Precipitado color rojo o anaranjado	
Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con hidróxido de sodio	Solución de NaOH 2 N	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron vortex y filtraron	Anadir 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 del ácido fuerte	Interfase de color marrón (azúcares 2-desoxigenados)

Nota. Recuperado de Buitrago, A. 2018 modificado por Hernández, A. 2019

Tabla 4.

Procedimiento del tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de Crinum amabile (continuación).

Flavonoides				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción de Pew's	Polvo de cinc y HCl 5 N	Se disolvieron en tubos de ensayo, tres porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adicionar gotas del ácido y una porción del polvo	Color púrpura o rojo cereza (dihidroflavonas). Color rosa o café (flavanonas 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 púrpura rojizo (chalconas). Color azul (antocianinas)
Esteroides				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción de Lieberman Bouchard	H ₂ SO ₄ concentrado CH ₃ COOH glacial	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Añadir 2 gotas del ácido débil y 2 gotas de ácido fuerte	Interfase de color azul o verde (esteroides). Color amarillo anaranjado (triterpenoides)

Nota. Recuperado de Buitrago, A. 2018 modificado por Hernández, A. 2019.

Tabla 4.

Procedimiento del tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de Crinum amabile (continuación).

Terpenoides				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Prueba de Salkowski	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 vortex y filtraron	Adicionar lentamente 2 mL del ácido fuerte	Interfase de color marrón rojizo (anillo esteroideo)
Reacción de Rosenthaler vainillina triterpenoides	Vainillina y H ₂ SO ₄ concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Añadir 2 gotas reactivo con 2 gotas del ácido fuerte	Interfase de color violeta (triterpenoides)
Mucilago				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Enfriamiento a 0-5 °C	Agua destilada	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de agua. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Enfriar a una temperatura de 0-5 °C	Consistencia gelatinosa (mucilago)

Nota. Recuperado de Buitrago, A. 2018 modificado por Hernández, A. 2019.

Tabla 4.

Procedimiento del tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de *Crinum amabile* (continuación).

Compuestos fenólicos				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Prueba de FeCl ₃	FeCl ₃ , solución de NaCl 0,9 % m/v y CH ₃ COONa	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron.	Adicionar 3 gotas de la sal de acetato, neutralizada con 3 gotas la sal férrica en solución fisiológica	Color rojo vino, verde o azul (compuestos fenólicos)
Antraquinonas				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con Amonio	NH ₄ OH concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron.	Adicionar 1 gota del reactivo	Color rojo (antraquinonas)
Reacción con ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄ concentrado			Color rojo (quinonas)

Nota. Recuperado de Buitrago, A. 2018 modificado por Hernández, A. 2019.

Tabla 4.

Procedimiento del tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de Crinum amabile (continuación).

Cumarinas				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con hidróxido de amonio	NH ₄ OH concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayos, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego, se agitaron en vortex y filtraron	Adicionar 2 gotas de la base débil.	Fluorescencia de color azul, verde o amarillo a una longitud de onda a 365 nm
Saponinas				
Ensayo	Reactivo	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 vortex y filtraron	El extracto acuoso se agitará vigorosamente y se medirá la altura de la espuma	Altura de espuma entre 8 y 10 mm, 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 vortex y filtró	Añadir gotas de la sal y agitar vigorosamente durante 3 minutos.	La formación de espuma en forma de panal de abeja (saponinas)

Nota. Recuperado de Buitrago, A. 2018 modificado por Hernández, A. 2019.

Tabla 4.

Procedimiento del tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de *Crinum amabile* (continuación).

Taninos				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Control	Agua destilada, CH ₃ CH ₂ OH y NaCl		Tubo 1: control	Sin reacción
Gelatina 1%	Gelatina	Se disolvió 100 mg del extracto en 10 mL de etanol y se agitó durante 5 min. 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 2: agregar 5 gotas de solución de gelatina	Precipitado 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)

Nota. Recuperado de Buitrago, A. 2018 modificado por Hernández, A. 2019.

Actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profesora Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo; empleando el método de difusión en agar con discos de papel. Para el ensayo se utilizaron las bacterias de referencia internacional *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

El método permitió medir la susceptibilidad *In Vitro* de las bacterias frente al extracto obtenido. El protocolo experimental que se utilizó se presenta a continuación:

Preparación del medio de cultivo.

Para las bacterias se colocaron aproximadamente 20 mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri. Una vez solidificada la placa, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4 °C hasta el día del ensayo.

Preparación de los discos.

Los discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, se impregnaron con 20 µL del extracto metanólico de *Crinum amabile*, el cual fue preparado con el solvente de extracción a la concentración de 500 mg/ mL. Luego se colocaron en placas de Petri y esterilizaron bajo luz **UV**, durante 90 minutos previo al ensayo.

Reactivación de los microorganismos.

Las bacterias se mantuvieron en medio de conservación a temperatura ambiente, a partir de este medio, se reactivaron las cepas y se verificó su pureza.

- **Preparación de los inóculos:** los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton, hasta lograr una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).
- **Siembra:** los inóculos de cada microorganismo, se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril. Seguidamente, se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro impregnados con la muestra, con el solvente metanol (control negativo) y fármacos de referencia para cada microorganismo (controles positivos).

Pre-incubación e Incubación.

Con el propósito de permitir que los componentes presentes en los extractos y compuestos puros difundan sobre el agar inoculado, se realizó una pre-incubación durante 18 h a la temperatura de 4 °C. Por otra parte, el crecimiento bacteriano se llevó a cabo incubando las placas en una estufa a la temperatura de 37 °C, durante 48 h.

Lectura de los ensayos.

Se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 24 h y 48 h, expresando el diámetro de la zona de inhibición en milímetros (mm). La prueba se consideró negativa cuando se observó crecimiento bacteriano alrededor de los discos.

Diseño de análisis

Hernández y Cols (2010) refirieron que existen dos tipos de enfoques de investigación: cuantitativo y cualitativo. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático. Esta investigación tiene un enfoque cuantitativo así como también cualitativo, ya que se aplicaron técnicas cualitativas de tamizaje

fitoquímico para conocer sus productos secundarios y en base a esto mediante la técnica de CMI se evaluó numéricamente la concentración en que la especie *Crinum amabile* presentaba actividad antibacteriana frente a diferentes cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio del tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de *Crinum amabile*

Para detectar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto con actividad antibacteriana se realizó tamizaje fitoquímico, empleando técnicas simples, rápidas y selectivas. Se determinó en el extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* compuestos orgánicos que de acuerdo a su solubilidad podían ser obtenidos en este solvente, la extracción fue realizada por maceración, mientras que el tamizaje fitoquímico de acuerdo a la metodología descrita por Buitrago (2018) modificado, realizando así los siguientes ensayos: Wagner y Dragendorff (alcaloides), hidróxido de sodio concentrado y Keller Killiani Baljet (glicosidos), Pew's e hidróxido de sodio (flavonoides), Liebermann-Burchard (esteroides), Rosenthaler y Salkowski (terpenoides), enfriamiento 5°C (mucilagos), cloruro férrico y cloruro de sodio (compuestos fenoles), reacción con amonio y ácido sulfúrico concentrados (antraquinonas), reacción con hidróxido de amonio (cumarinas), altura de la espuma y bicarbonato de sodio (saponinas) y por ultimo gelatina, solución gelatina, tricloruro férrico y ferricianuro de potasio (taninos). Se utilizó el sistema de cruces, como criterio de medida, para la identificación de los metabolitos secundarios.

En la tabla 5 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a las hojas de la especie *C. amabile*, se ve expresada la presencia una gran variedad de fitoconstituyentes, estos indican que el extracto para esta especie mostró de forma cualitativa alta presencia de metabolitos secundarios como alcaloides y flavonoides, moderada presencia de

saponinas en la prueba de bicarbonato de sodio, baja presencia de glicosidos, terpenoides, esteroides, fenoles, antraquinonas, cumarinas, saponinas y taninos, excepto en el caso de la prueba de tricloruro férrico para taninos donde marcó una alta presencia, por el contrario se determinó la total ausencia de mucilagos.

Tabla 5.

Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de Crinum amabile

Metabolitos secundarios	Pruebas	Resultado
Alcaloides	Wagner	+++
	Dragendorff	+++
Glicosidos	NaOH _{CONC}	+
	Keller Killiani	-
Flavonoides	Pew's	+++
	NaOH 10%	+
Esteroides	Lieberman Bouchard	+
Terpenoides	Rosenthaler	+
	Salkowski	+
Mucilagos	Enfriamiento 5°C	-
Compuestos Fenoles	FeCl ₃ 5%	+
	NaCl 0,9%	+
Antraquinonas	NH ₄ OH _{CONC}	+
	H ₂ SO ₄ _{CONC}	+
Cumarinas (fluorescencia)	NH ₄ OH	+
Saponinas	Altura de la espuma	+
	NaHCO ₃	++
Taninos	Gelatina 1%	+
	Solución gelatina 1%	+
	FeCl ₃	+++
	K ₃ Fe(CN) ₃	+

LEYENDA:

Identificación: (+) presencia, ausencia (-).

Intensidad: baja (+); moderada (++); alta (+++).

Las plantas, gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico (OMS, 2002); contienen una serie de sustancias activas con utilidad terapéutica (Ringuelet & Viña, 2013), en tal sentido existe evidencia en estudios realizados con anterioridad que se encuentran una gran variedad de metabolitos para la familia Amaryllidaceae

y el género *Crinum*.

En el estudio realizado por Soto y Leiva (2015) determinaron en varios géneros pertenecientes a la familia una gran variedad de fitoconstituyentes, al realizar comparaciones entre las plantas concluyeron que a pesar de la igualdad de familia y género en estas siempre existe disparidad notoria de metabolitos entre cada una de ellas. Al indagarse más a fondo respecto a la especie en estudio, son encontrados datos que afirman la utilización de sus alcaloides con gran amplitud en la medicina tradicional, existen además varias investigaciones sobre estos componentes en Asia, África y América del Sur (Maroyi, 2016).

En 2018 en Ecuador, mediante el tamizaje fitoquímico en los bulbos de *Crinum x amabile* identificaron de forma cualitativa la presencia de alcaloides, flavonoides y antocianidinas (secuencias de grupos de flavonoides) a través del estudio de la fracción alcohólica por la técnica de CG- EM, trabajo realizado por Marmolejo Anderson, este estudio concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación a pesar del uso de técnicas de tamizaje distintas.

Además se han realizado estudios más a fondo respecto a la composición química de *Crinum amabile*, debido a la gran búsqueda de sustancias factibles para la creación nuevos medicamentos pero los resultados no han sido totalmente satisfactorios, como es el caso del estudio realizado por Tallini, *et al.*,(2018) en el cual identificaron dos estructuras nuevas (N- óxido de augustina y N- óxido de buphanisina), dilucidadas estructuralmente por RMN, pero al ser comparadas con fármacos de referencia no reflejó mejores resultados.

Análisis de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Crinum amabile*

El extracto obtenido de la especie *Crinum amabile* fue sometido a pruebas para determinar su potencial antibacteriano frente a diferentes cepas de referencia internacional. Los microorganismos seleccionados fueron tres especies representativas de bacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; como también dos especies Gram positivas: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Dicho extracto fue analizado y puesto a diferentes rangos de concentración (500-20 mg/mL) sobre discos de papel de filtro partiendo de una solución madre de 490 mg/mL.

La actividad antibacteriana fue evaluada mediante la aplicación del método modificado de difusión en agar con discos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6, considerándose como negativa cuando hubo crecimiento bacteriano alrededor del disco y positiva cuando no existió crecimiento alrededor del disco de papel, para este caso se realizaron mediciones del diámetro de los halos. En tal sentido los resultados fueron positivos para la cepa bacteriana Gram positiva *S. aureus* (**ATCC 25923**) donde a una concentración de 470 mg/ mL y un diámetro de inhibición equivalente a 7 mm, de igual manera el extracto presentó actividad contra la cepa Gram negativa de *E.coli* (**ATCC 25922**) se obtuvo un halo de inhibición de 10 mm de diámetro con un CIM de concentración de 300 mg/ mL.

Por el contrario para las cepas bacterianas *E. faecalis* (**ATCC 29912**), *K. pneumoniae* (**ATCC 23357**) y *P. aeruginosa* (**ATCC 27853**) el resultado fue negativo, razón por la cual se puede afirmar que el extracto no presenta actividad frente a dichas cepas.

Tabla 6.

Actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de Crinum amabile.

Microorganismos	Extracto Met	Zona de inhibición (mm)					CMI
		Antibióticos de referencia					(mg /mL)
		OX	VAN	TOB	ATM	FEP	DMSO
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	7mm	≥22	-	-	-	-	470
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29912)	NI	-	≥17	-	-	-	NE
<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	10mm	-	-	≥15	-	-	300
<i>K.pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NI	-	-	-	≥21	-	NE
<i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NI	-	-	-	-	≥18	NE

LEYENDA: mm: milímetros; Met: metanol; NI: no presentó inhibición; OX: oxacilina® 1 µg; VAN: vancomicina® 30 µg; TOB: tobramicina® 10 µg; ATM: aztreonam® 30 µg; FEP: cefepime® 75 µg; CMI: concentración inhibitoria mínima; DMSO: dimetilsulfóxido, NE: no ensayado.

Los antibióticos han salvado millones de vidas, además han supuesto una revolución en la medicina, sin embargo una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos y es la resistencia bacteriana a los antibióticos (Alós, 2015); para contrarrestar esto se realizan múltiples estudios y se buscan diversas alternativas, *Crinum amabile* es una especie muy útil en este sentido, ha demostrado tener desde actividad antiinflamatoria y citotóxica a concentraciones de 12,5 ppm presentando mayor viabilidad celular como se evidenció en el trabajo realizado por Portero Santiago (2017), además de propiedades anticolinérgicas y las que más destacan son sus propiedades antimicrobianas.

En el estudio realizado por Marmolejo en 2018 analizaron la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar con discos de papel (diámetro del disco = 5 mm) al extracto bruto metanólico y al extracto bruto de alcaloides de la especie *Crinum amabile* con concentraciones que iban desde 700 µg/ mL a 300 µg/ mL realizando comparaciones entre ambos. Con

respecto al extracto bruto metanólico se apreció actividad antimicrobiana frente a *S. typhi*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* con resultados de los halos de 6 mm de diámetro para la primera y 9 mm para las demás a una concentración de 700 µg/ mL, fueron considerados como halos mínimos, para *C. albicans* no presento actividad; al compararse con los resultados obtenidos para el extracto bruto de los alcaloides se observó que este si presentó actividad sobre el hongo, resaltó a una concentración de 700 µg/ mL con halo de inhibición 6 mm de diámetro, además a esta misma concentración se obtuvieron halos de 8mm (*S. typhi* y *K. pneumoniae*) 9 mm (*P. aeruginosa*) y 10 mm (*E. coli*) (Ver tabla 7)

El estudio realizado indicó que el extracto bruto de alcaloides posee mejores zonas de inhibición comparado con el extracto bruto metanólico. Resultados que difieren con los que se han obtenido del extracto metanólico en esta investigación puesto que al extracto bruto metanólico frente a las cepas de referencia *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* los resultados fueron negativos, pero la actividad frente a la cepa de referencia de *Escherichia coli* en este caso fue la de mejor pronóstico debido que a menor concentración generó un halo de inhibición mayor. Con base en esto se le puede atribuir la discrepancia a que las especies se han cultivado en zonas medioambientales totalmente diferentes, razón por la cual las plantas pueden desarrollar metabolitos secundarios de acuerdo a sus necesidades.

Tabla 7.

Comparación de los estudios antes realizados

	Marmolejo		ESTE ESTUDIO
	Extracto metanólico	Extracto alcaloidal	Extracto metanólico
<i>S. aureus</i>	-	-	7 mm
<i>E. faecalis</i>	-	-	0 mm
<i>E.coli</i>	9 mm	10 mm	10 mm
<i>K.pneumoniae</i>	9 mm	8 mm	0 mm
<i>P.aeruginosa</i>	9 mm	9 mm	0 mm

Al contrastar el efecto antimicrobiano del extracto metanólico de la especie *Crinum amabile* con estándares de referencia de antibióticos propuestos por el manual del CLSI para cada microorganismo de referencia (Oxacilina® 1 µg para *S. aureus* y Tobramicina® 10 µg para *E. coli*) se pudo observar claramente que los halos de inhibición son mayores en el caso de los antibióticos, pero que a elevadas concentraciones del extracto se puede aumentar su potencial antimicrobiano.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- El análisis fitoquímico cualitativo realizado al extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* reveló que en su composición química se encuentran en mayor proporción alcaloides, flavonoides y taninos, además de otros metabolitos en menor proporción como glicósidos, esteroides, terpenoides, compuestos fenólicos antraquinonas y cumarinas. Con base en los datos anteriores es importante resaltar que a la presencia abundante de alcaloides e incluso a la baja presencia de glicosidos, compuestos fenólicos y terpenos le es atribuida su actividad antibacteriana, lo cual coincide con estudios previos realizados.
- El análisis de la actividad antibacteriana mediante el procedimiento de difusión en agar con discos fue positivo frente a dos cepas bacterianas, una Gram negativa y una Gram positiva razón por lo cual se estima que el extracto metanólico de las hojas de *Crinum amabile* brinda una alternativa terapéutica. En tal sentido dicho extracto presentó actividad contra la cepa (ATCC) Gram positiva *Staphylococcus aureus* con una CIM de 470 mg/ mL mientras que no presentó actividad frente a *Enterococcus faecalis* a pesar de ser de su misma clasificación bacteriana. Además también se observó actividad frente a la cepa de *Escherichia coli* con una CMI de 300 mg/ mL pero no para las demás cepas: *Klebsiella.pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* siendo todas estas de la clasificación Gram negativas.

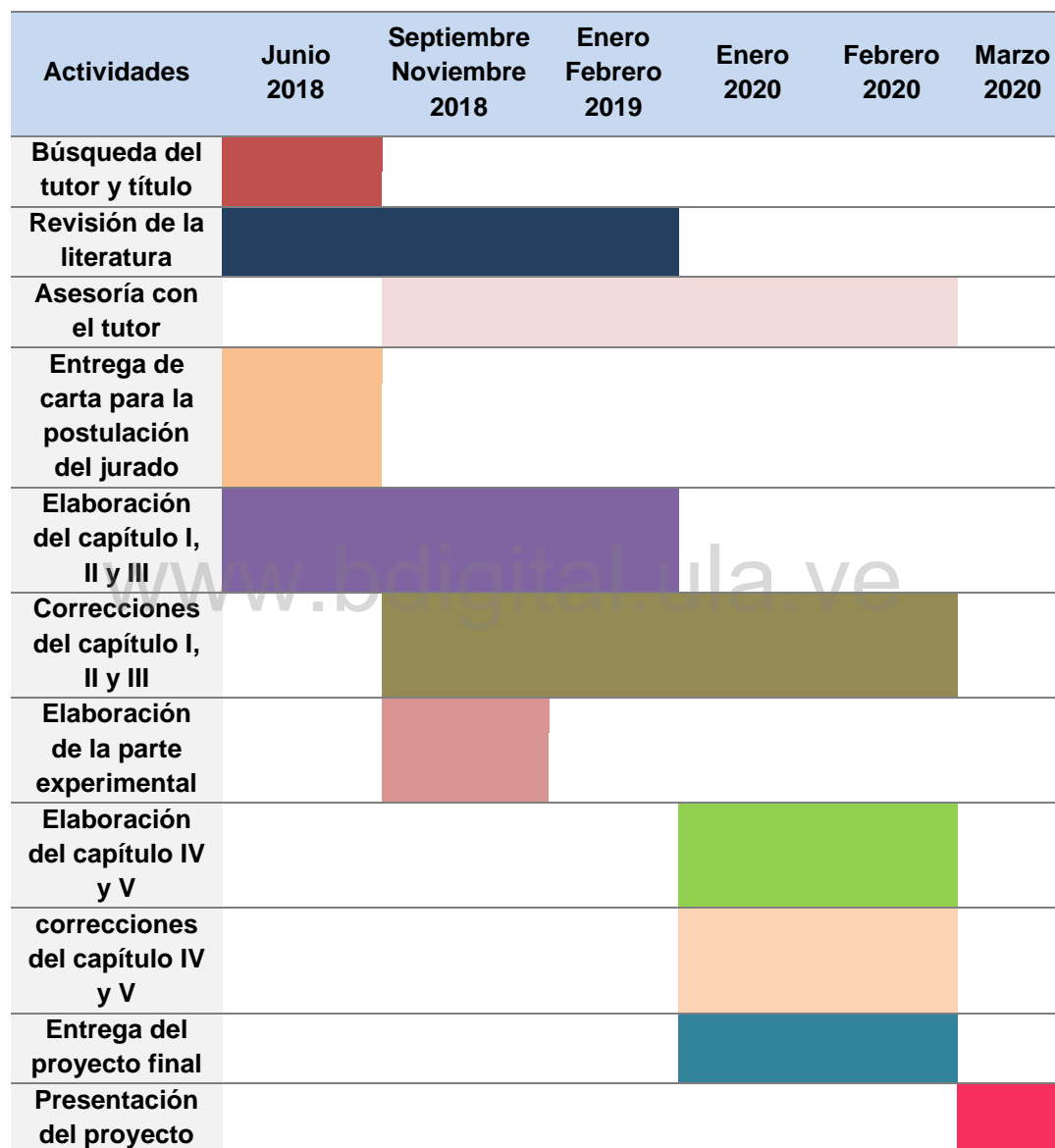
- Cabe destacar que a pesar de que la actividad presentada fue positiva para las dos cepas antes mencionadas, el resultado de los halos de inhibición obtenidos posee un diámetro menor al de los antibióticos utilizados como control positivo e incluso al de antibióticos de referencia estándar recomendados por el CLSI.

RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar el estudio antimicrobiano con otras cepas bacterianas y también micóticas de referencia, además profundizar el estudio en fracciones aisladas de fiticonstituyentes de las hojas de *Crinum* amabile, debido a que se observó actividad antibacteriana contra los microorganismos patógenos estudiados.
- Evaluar la actividad antibacteriana frente a extractos provenientes de diversas especies del género *Crinum*, con el fin de observar si con otra especie se logra alcanzar el potencial de los antibióticos de uso comercial.

ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

Cronograma de Actividades: Diagrama de Gantt



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Adams, R. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (6ta ed.). Carol Stream, USA: Allured Publishing Corporation.
- Albado, P.E., Saez, F.G. y Grabiél A. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Re Med Hered*, 12 (1), 6-9.
- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibioticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33: 692-699. DOI: 10.1016/j.eimc.2014.10.004.
- Alpízar-Quesada, C. y Morales-Alpízar, C. (2003). La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa. *Acta Médica Costarricense*, 45 (2), 50-56. Recuperado de: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000200005&lng=en&tlng=es.
- Alzate, F., Lesmes, M., Cortés, N., Varela, S., y Osorio, E. (2019). Sinopsis de la familia Amaryllidaceae en Colombia. *Biota colombiana*, 20(1), 2-20. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.21068/c2019.v20n01a01>
- Amsterdam, D. (1996). Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: Lorian V (ed) Cuarta edición. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. (pp. 52-111). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Anderson, M. J. (1997). *Carl Linnaeus: father of classification*. United States: Enslow Publishers.
- Aulton, M. (2004). *Ciencia y diseño de formas farmacéuticas*. Segunda edición. España: Elsevier.
- Austin, T. V. y Moreno G. S. (2005). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Primera edición. Madrid. Sociedad Española de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Bandoni, A.; Czepak, M. (2008). "Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Aspectos agrônômicos da produção de espécies aromáticas". Brasil: Univ. Fed. de Espírito Santo.

- Brooks, G., Butel, J., Carroll, K., Morse, S. y Mietzner, T. (2011) *Microbiología Médica*. 25 ed. México: McGraw-Hill ISBN 9786071511355.
- Buitrago, A., (2018). Estudio fitoquímico y evaluación de diversas actividades biológicas en las especies de *Vismia baccifera* y *Vismia macrophyla*. (Trabajo de investigación). Universidad de los Andes, Mérida.
- Buitrago, A., Rojas, J., Rojas, L., y Peñaloza, Y. (2016). *In Vitro* antioxidant activity and qualitative phytochemical analysis of two *Vismia* (Hypericaceae) species collected in Los Andes, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 6(4), 1431-1439.
- Calderón, A.I. (2010). Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panama as sources of acetylcholinesterase inhibitors. *Pharmaceutical biology*. 48, (9), 988-93. Recuperado de: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880200903418514>
- Cantón, R., García, J., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., García, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J. J. Recuperado de: <http://www.seimc.org>
- Chase, M., Reveal, J. & Fay, M. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 132-136.
- CLSI (Estados Unidos). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition. [Wayne, PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute. Recuperado de: https://www.clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf
- Cruz, A., (2004). Antibióticos naturales. (p16) México: Editorial selector S.A.
- De la torre, L., Navarrete, H., Muriel M, P., Macía, M.J. y H. Balslev, (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Primera edición. Quito, Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Farfán, A., Ariza, S., Vargas, Fabiola. y Varga, L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438-450. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>

- Fernández, F., López, J., Ponce, L. y Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1). Recuperado en 19 de febrero de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572003000100007&lng=es&tlng=es.
- Ferraro, M.J. (2000). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. CLSI 11th Edition. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. 2 (20).
- Gamazo, C., López, I. y Díaz, R. (2000). *Manual Práctico de Microbiología*. (p.p 40-47) Barcelona: MASSON S.A
- García, R. (2008). Diferencias entre metabolismo primario y secundario. Universidad Autónoma Chapingo. México. Recuperado de: <http://bioqui-mvegrosagar.wordpress.com/category/investigacion-metabolismo-primario>
- Gibbons, S., (2005). Plants as a source of bacterial resistance modulators and antiinfective agents. *Phytochemistry Reviews*. 4, (1) 63-78.
- Gil, M. (2000). Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista chilena de infectología*, 17(2), 145-152. Recuperado de: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182000000200010>
- Gilman, E.F. (2004). *Crinum x amabile* Giant Spider. University of Florida. (1) 1-2. Recuperado de: <http://edis.ifas.ufl.edu/fp156>
- González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas. [Trabajo en línea]. Trabajo de Investigación, Universidad Nacional de Colombia. Recuperado: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreaconzalezvilla.2004.pdf>
- Grajales, G. (1996). *Conceptos Básicos para la Investigación Social de la Serie Textos Universitarios*. Nuevo León, México: Publicaciones Universidad de Montemorelos.
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185-9. Recuperado de: <https://www.asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>
- Henriette, J. Dutilh, A. (2005) *Amaryllidaceae*. Recuperado de: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/107631?locale-attribute=es>

- Hernández, S.R., Fernández, C.C. y Baptista, L.M. (2014). *Metodología de la investigación*. Sexta edición. México D.F: Editorial McGraw-Hill.
- Hernández, S.R., Fernández, C.C. y Baptista, L.M. (2010). *Metodología de la Investigación*. Sexta edición. México D.F.: Editorial Mc Graw Hill
Recuperado de: <http://observatorio.epacartagena.gov.co/wp-content/uploads/2017/08/metodologia-de-la-investigacion-sexta-edicion.compressed.pdf>
- Higuchi, A. (2015). Características de los consumidores de productos orgánicos y expansión de su oferta en Lima. *Apuntes*, 42(77), 57-89. Recuperado en 07 de febrero de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0252-18652015000200002&lng=es&tlng=es.
- Hotchandani, T., de Villers, J., y Desgagné-Penix, I. (2019). Developmental Regulation of the Expression of Amaryllidaceae Alkaloid Biosynthetic Genes in *Narcissus papyraceus*. *Genes*, 10(8), 594. doi:10.3390/genes10080594.
- Hurtado, J. (2010). *El Proyecto de Investigación: Comprensión Holística de la Metodología y la Investigación*. Bogotá-Caracas: Ediciones Quiron.
- Jatin, M. (2011). Información de la salud tinción de Gram. (pag 2). Medline plus. Recuperado de: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007621.htm>
- Kalembe, D. and A. Kunicka (2003). "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." *Curr Med Chem* 10(10): 813-29.
- Kenneth, J., Ray, G., Ahmad, N., Drew, W. y Plorde J. (2011). *Microbiología Médica*. Quinta ed. México: McGraw-Hill.
- Kerlinger y Lee. (2002). "Investigación del Comportamiento", Cuarta Edición, p.17. México: McGraw Hill.
- Lindley, J. (1836). *A natural system of botany*. Segunda edición. London: Longman.
- Linnaeus, C. (1764). *Species Plantarum*, (4) p.p 356-359. Tercera edición. Stockholm. Recuperado: [https://books.google.co.ve/books?id=jy231V83lx8C&pg=PA638&lpg=PA638&dq=Linnaeus,+C.+\(1764\).+Species+Plantarum,+3rd+ed.+Stoc kholm.&source=bl&ots=p7aewqlmGk&sig=ACfU3U2wXicOlsnJidlOyIk o4yagz4J9kQ&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjZpaXhzLPgAhVP1VkkHSLfCz0Q6AEwA3](https://books.google.co.ve/books?id=jy231V83lx8C&pg=PA638&lpg=PA638&dq=Linnaeus,+C.+(1764).+Species+Plantarum,+3rd+ed.+Stoc kholm.&source=bl&ots=p7aewqlmGk&sig=ACfU3U2wXicOlsnJidlOyIk o4yagz4J9kQ&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjZpaXhzLPgAhVP1VkkHSLfCz0Q6AEwA3)

[oECAcQAQ#v=onepage&q=Linnaeus%2C%20C.%20\(1764\).%20Species%20Plantarum%2C%203rd%20ed.%20Stockholm.&f=false](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16026296)

- Look, O. (2001) *Manual de fitoterapia* (p 41-60). Perú: Es Salud
- López, A.R. y Serna, A. (2002). AMARYLLIDACEAE. FLORA DE VERACRUZ Publicada por el Instituto de Ecología, México. Recuperado de: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOVER/128-Lopez.pdf>
- Macias, F., Galindo, J. y Galindo, J. (2007). Evolution and current status of ecological phy-chemistry. *Phytochemistry*, 68. 22-24. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/5823002_Evolution_and_current_status_of_ecological_phytochemistry
- Mahady, G.B. (2005). Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. *Current Pharmaceutical Design*. 11, 2405-2427. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16026296>
- Malbran, C. (2006). Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Difusión. Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos. p.p 17-19. Recuperado de: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION 2012.pdf>
- Maomao He, Chunrong Qu ,Oude Gao , Xianming Hu y Xuechuan Hong (2015). Actividades biológicas y farmacológicas de alcaloides de amaryllidaceae. *Rev. Avances*. Recuperado de: <https://pubs.rsc.org/no/journals/journal/ra>
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Ediciones Vicerrectorado Académico UCV.
- Marmolejo, A. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana *In vitro* de los extractos de *Crinum x amabile*. Repositorio institucional de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Maroyi, A. (2016). A review of ethnobotany, therapeutic value, phytochemistry and pharmacology of *Crinum macowanii* Baker_ A highly traded bulbous plant in Southern Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 194 (pp 595-608) DOI 10.1016/j.jep.2016.10.046.
- Martinez, R. (2005). Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibiótico de

administración intravenosa a través de método *In vitro*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

MedlinePlus en español [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.) [actualizado 27 ago. 2019]. Metabolito; [actualizado 1 mayo 2019; revisado 30 oct. 2018; consulta 30 ago. 2019]; Recuperado de: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002258.htm>

Meerow, A. y Snijman, A. (1998). Amaryllidaceae. En Kubitzki, K. (Ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants III*. Pp. 83-110. Berlin: Springer-Verlag.

Meerow, A., Fay, M., Chase, M., Guy, Ch., y Q-B. Li. (1999). The New Phylogeny of the Amaryllidaceae. *Herbertia*. 54.180-203. Recuperado de: https://books.google.co.ve/books?id=oumyfO-NHuUC&pg=PA672&lpg=PA672&dq=The+New+Phylogeny+of+the+Amaryllidaceae.+Herbertia&source=bl&ots=iNgyS3Bvt0&sig=ACfU3U0LXycc2X_OFUQQrFUujQOcF7ppCw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi0iMSxxtTnAhXLxVkkHf6GCCgQ6AEwAHoECAgQAQ#v=onepage&q=The%20New%20Phylogeny%20of%20the%20Amaryllidaceae.%20Herbertia&f=false

Montoya, R. I. (2000). LAS CEPAS ATCC Herramienta indispensable en el Control de Calidad Interno en Microbiología. Instituto Colombiano de Medicina.

Montoya, V., Hugo, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Segunda edición. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia

Moreno, C., González, R. y Beltrán C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. **Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello**, 69 (p 185-192).

Muñoz, F. (1996). Plantas medicinales y aromáticas. *Estudio cultivo y procesado* (p175-176). Barcelona: Aedos S.A.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antimicrobianos. Centro de Prensa. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>.

Organización Mundial de la Salud OMS. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradi-cional 2002-2005. Ginebra.

Ortega, L. (2010). Enterococos: actualización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(4), 507-515. Recuperado de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000400010&lng=es&tng=es.

- Palacios, P.M. (2008). Farmacognosia y Fitoquímica Escuela de Farmacia y Bioquímica. Biblioteca digital. Universidad Católica "LOS ÁNGELES DE CHIMBOTE".
- Pardo Zapata, J. (2002). Patentabilidad de los extractos vegetales. Recuperado:
http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patente_sextractosplantas.pdf
- Pham, L.H. (1998). Alkaloids from *Crinum amabile*. *Phytochemistry*. 48, (2), 371-376. Recuperado:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942297010819>
- Portero, S. (2017). Evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica *In vitro* de *Crinum x amabile*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, p.p9-13. Porto Alegre. Brasil: EDIPUCRS.
- Poser, G. (2007) Taninos: actividades biológicas. En Cassel, E. y Figueiro R. (orgs). Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales: Productos y Procesos.
- Raymúndez, M., Huérfano, A. y Xena, N. (1993). Estudios citogenéticos de las Amaryllidaceae en Venezuela. *Acta Botánica Venezolánica*, Fundación Instituto Botánico de Venezuela, 2 (16)137-141. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/41740505>
- REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española, 23.^a ed., [versión 23.3 en línea]. Recuperado de:
https://dle.rae.es/alcaloide?m=30_2 <https://dle.rae.es/antibacteriano>
- Ringuelet, J. y Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. La Plata, Buenos Aires.
- Ruschel, L. (2018). Estudio de los alcaloides de las Amaryllidaceae como fuente de nuevas moléculas bioactivas. Recuperado de:
<https://www.tdx.cat/handle/10803/650349#page=8>
- Salas, F., Velasco, J., Rojas, J., Morales &, A. (2007). Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) collected in Venezuela. *Natural Product Communications*, 2(2), 185-188. Recuperado de:
https://www.researchgate.net/publication/286642332_Antibacterial_ac

[tivity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var *dealbata* Guttiferae collected in Venezuela](#)

- Santamaría, C., Gonzales, A. y Astorga, F. (2015). Extractos vegetales aplicación para la reducción del estrés. *European Natural Additives Bedson* pp77. Madrid:España Recuperado de <https://nutricionanimal.info/download/0315-ena-WEB.pdf>
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapeúticos*. Santafe de Bogotá: Roberto Pinzon.
- Soto, V. y Leiva, S. (2015). Estudio exomorfológico y fitoquímico de los bulbos de dos especies endémicas del Perú de la familia amaryllidaceae. *Revista del Museo de Historia Natural y Cultural Arnaldoa*. 22 (1): 269 – 288. Recuperado de: <http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/view/194>
- Tallini, L., Torras, L., Borges, W., Kaiser, M., Viladomat, F., Zuanazzi, J., y Bastida, J. (2018). Alcaloides de N-óxido de *Crinum amabile* (Amaryllidaceae). *Moléculas*, 23 (6), 1277. doi: 10.3390 / moléculas23061277.
- Taroco, R., Seija, V. y Vingoli, R. (2008) *Temas de Bacteriología y Virología médica. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*. Recuperado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Thi Ngoc Tram, N. (2002). En *Crinum L.* (Amaryllidaceae). A: *Fitoterapia*. 3 (73), 183-208. Recuperado de: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880200903418514>
- Torres, C. (2004). *Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe Técnico*. (pp 2-14.) Bogotá DC: Jardín Botánico José Celestino Mutis – Subdirección Científica.
- Torres, K. (2013). *Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Passiflora cumbalensis*, *P. manicata* y *P. indecora* con actividad citotóxica*. Tesis. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.
- Tortora y Gerard. (2007) *Introducción a la microbiología*. Novena edición. Madrid: Médica Panamericana.
- Triantafilo, V., Vjera. (2002). Evaluación e indicación de las técnicas de difusión-dilución (epsilometría). *Revista chilena de infectología*, 19(2), 85-87. Recuperado:

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019200003

- Trópicos org. (2019). Missouri Botanical Garden [en línea]: catálogo automatizado. Estados Unidos: Missouri Botanical Garden. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Home.aspx>
- Vega, M. (2001). *Etnobotánica de la amazonia peruana*. (p.50) Ecuador: Editorial Abya-Yala.
- Vélez, R. (2015). Evaluación comparativa de metabolitos secundarios. Actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos de *Cymbopogon citratus* y *Melissa officinalis*. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Walk, M. (1995). Amaryllidaceae, Sceletium, imidazole, oxazole, thiazole, peptide and miscellaneous alkaloids. 5. (18)1 Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245403>
- Wink, M. (2007). Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En K. Kayser & Q. Quax (Eds.), *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application* (pp. 97-116). Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. K.

www.bdigital.ula.ve