



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES  
DR. "ANTONIO MORALES MENDEZ"



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Amaryllis belladonna* L.  
(Amaryllidaceae) EN CEPAS DE REFERENCIA  
INTERNACIONAL (ATCC)**

Trabajo presentado como requisito para optar por el título de  
Licenciado en Bioanálisis

**Autores:**

Moreno T, María D.

C.I: 23.781.360

Torres Y, Yanni M.

C.I: 23.778.565

**Tutor:**

Prof. Alexis Buitrago

**Cotutor:**

Prof. Janne Rojas

Mérida, Febrero de 2020



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES  
DR. "ANTONIO MORALES MENDEZ"



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Amaryllis belladonna* L.  
(Amaryllidaceae) EN CEPAS DE REFERENCIA  
INTERNACIONAL (ATCC)

**Autores:**

Moreno T, María D.  
C.I: 23.781.360  
Torres Y, Yanni M.  
C.I: 23.778.565

**Tutor:**

Prof. Alexis Buitrago

**Cotutor:**

Prof. Janne Rojas

Mérida, Febrero de 2020

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
DEDICATORIA	xi
AGRADECIMIENTOS	xii
RESUMEN	xiv
GLOSARIO	xv
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO I : EL PROBLEMA	18
Planteamiento del problema	18
Justificación de la investigación	20
Objetivos de la investigación	20
<i>Objetivo general</i>	20
<i>Objetivos Específicos</i>	21
Alcances de la investigación	21
Limitaciones de la investigación	22
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	23
Antecedentes previos	23
Antecedentes Históricos	25
Bases Teóricas	26
<i>Familia Amaryllidaceae</i>	26
<i>Amaryllis belladona</i>	27
<i>Taxonomía de la especie Amaryllis belladona</i>	29
<i>Fitoquímica de Amaryllis belladona</i>	29
<i>Técnicas de Extracción</i>	30
Maceración	30
Lixiviación	31
Digestión	31
Infusión	31
Decocción	31

<b><i>Técnicas de destilación</i></b>	31
<b>Evaporación simple</b>	31
<b>Evaporación a presión reducida</b>	32
<b><i>Tamizaje fitoquímico</i></b>	32
<b>Metabolitos primarios</b>	32
<b>Metabolitos secundarios</b>	33
<b>Alcaloides</b>	33
<b>Flavonoides</b>	34
<b>Saponinas</b>	35
<b>Cumarinas</b>	36
<b>Antraquinonas</b>	36
<b>Glicósidos y glicósidos cardiotónicos</b>	37
<b>Taninos</b>	37
<b>Mucilagos</b>	38
<b>Compuestos fenólicos</b>	38
<b>Triterpenoides y esteroides</b>	39
<b><i>Bacterias</i></b>	40
<b>Bacterias grampositivas</b>	40
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	40
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	41
<b>Bacterias gramnegativas</b>	42
<b><i>Escherichia coli</i></b>	42
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	43
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	44

<i>Técnicas de coloración bacteriana</i>	45
Coloración de Gram	45
<i>Actividad antibacteriana</i>	46
<i>Agar Mueller Hinton</i>	46
<i>Patrón de McFarland</i>	47
<i>Pruebas de Susceptibilidad</i>	47
Método de Difusión en Agar con Discos o prueba de Kirby-Bauer	47
Método de dilución en caldo o agar para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	48
Método de la cinta o Epsilómetro	48
Definición de Términos	49
<i>Aislamiento</i>	49
<i>Agar</i>	49
<i>Alcaloide</i>	49
<i>Bulbo</i>	49
<i>Extracto</i>	49
<i>Fitoquímica</i>	49
<i>Inóculo</i>	50
Operacionalización de Eventos	50
Hipótesis	51
<b>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO</b>	52
Tipo de investigación	52
Diseño de investigación	52
Población y muestra	53
<i>Unidad de Investigación</i>	53
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i>	53
Instrumentos de Recolección de Datos	54

<b>Materiales y Métodos</b>	54
<b>Material utilizado en el ensayo químico</b>	54
<b>Recolección del material botánico e identificación</b>	
<b>Taxonómica</b>	54
<b>Métodos aplicados a la especie botánica</b>	54
<b>Preparación del material botánico</b>	54
<b>Secado, molienda y pesada del material botánico</b>	54
<b>Extracción por maceración del material botánico</b>	55
<b>Tamizaje fitoquímico</b>	56
<b>Método de difusión en agar con discos de papel</b>	60
<b>Preparación del medio de cultivo</b>	61
<b>Preparación de los discos</b>	61
<b>Reactivación de los microorganismos</b>	62
<b>Preparación de los inóculos</b>	62
<b>Siembra</b>	63
<b>Preincubación e Incubación</b>	63
<b>Lectura de los ensayos</b>	64
<b>Determinación de la CIM</b>	64
<b>CAPÍTULO IV</b>	66
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	66
<b>Identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en la especie</b>	
<b><i>Amaryllis belladonna</i></b>	66
<b>Tamizaje Fitoquímico</b>	66
<b>Actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de la especie <i>Amaryllis belladonna</i></b>	68
<b>CAPÍTULO V</b>	70
<b>CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES</b>	70
<b>ANEXOS</b>	71
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Planta <i>Amaryllis belladonna</i>	28
<b>Figura 2:</b> Licorina	30
<b>Figura 3:</b> Galantamina	30
<b>Figura 4:</b> Pancracina	30
<b>Figura 5:</b> Diversos núcleos básicos de alcaloides	34
<b>Figura 6:</b> Estructura de Flavonoides	35
<b>Figura 7:</b> Estructura química de Saponinas	36
<b>Figura 8:</b> Estructura química de Cumarinas	36
<b>Figura 9:</b> Estructura química de Antraquinonas	37
<b>Figura 10:</b> Estructura química de Taninos	38
<b>Figura 11:</b> Estructura química de Mucilagos	38
<b>Figura 12:</b> Estructura química de Compuestos fenólicos	39
<b>Figura 13:</b> Estructura de Triterpenos y esteroides	39
<b>Figura 14:</b> <i>Enterococcus faecalis</i>	41
<b>Figura 15:</b> <i>Staphylococcus aureus</i>	41
<b>Figura 16:</b> <i>Escherichia coli</i>	43
<b>Figura 17:</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44
<b>Figura 18:</b> Placa con crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
<b>Figura 19:</b> Pared celular de Bacterias grampositivas y gramnegativas.	45
<b>Figura 20:</b> Filtrado	55
<b>Figura 21:</b> Extracto	55
<b>Figura 22:</b> Medio de cultivo	61
<b>Figura 23:</b> Preparación del medio de cultivo	61

<b>Figura 24:</b> Discos en las placas de Petri	62
<b>Figura 25:</b> Esterilización en lámpara UV	62
<b>Figura 26:</b> Bacterias en agar semiconservación	62
<b>Figura 27:</b> Preparación del inóculo	63
<b>Figura 28:</b> Preparación del inóculo	63
<b>Figura 29:</b> Inoculación de placas	63
<b>Figura 30:</b> Preincubación a 4°C	64
<b>Figura 31:</b> Incubación a 37°C	64
<b>Figura 32:</b> Lectura de halos de inhibición	64
<b>Figura 33:</b> Lectura de halos de inhibición	64
<b>Figura 34:</b> Diluciones del extracto	65
<b>Figura 35:</b> Determinación de CIM	65

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Taxonomía de la especie <i>Amaryllis belladonna</i> (“Trópicos org.”, 2019)	29
<b>Tabla 2:</b> Operacionalización del evento actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>Amaryllis belladonna</i> (Amaryllidaceae)	50
<b>Tabla 3:</b> Protocolo general aplicado en el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de <i>Amaryllis belladonna</i>	56
<b>Tabla 4:</b> Microorganismos y antibióticos de referencia utilizados en las pruebas de susceptibilidad	60
<b>Tabla 5:</b> Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de <i>Amaryllis belladonna</i>	66
<b>Tabla 6:</b> Actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>Amaryllis belladonna</i>	68

## DEDICATORIA

Primeramente a mi Dios Todopoderoso por regalarme la vida e iluminarme en cada momento de éste gran camino recorrido como lo ha sido mi carrera profesional, por darme la fuerza necesaria de superar cada obstáculo y haber alcanzado este paso tan importante en mi vida.

A ti mamá por ser mi pilar fundamental, demostrándome tu gran amor y apoyo incondicional desde el primer día hasta hoy sigues estando para mí en cada momento difícil, alentándome siempre a superarme y salir adelante. ¡ESTE LOGRO ES PARA TI!

A mi abuelita, por ser como una segunda madre para mí, y brindarme tan valiosos consejos que me han llevado siempre por el buen camino.

Tíos, primos y mi familia en general, porque su motivación fue esencial para poder obtener este gran logro, y haber creído en mí a pesar de todas las circunstancias.

*Ma Daniela.*

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

A cada sueño le antecede una inspiración, mis padres, hermanos y sobrinos lo son para mí, el dedicarles este sueño, que ya se convierte en realidad, es poco. Ustedes, familia son mi pilar fundamental, mi motor, mi columna vertebral. El continuar en este camino, lleno de tantas barreras y obstáculos, en su compañía me han dado la fuerza suficiente para sonreír en cada derrota y celebrar en cada victoria. Los amo con todo mí ser. Este logro es de todos, mi dicha la comparto con ustedes, el mejor regalo que Dios me ha permitido tener.

A mis amigos, Jesús Reinaldo, Jesús Castillo, Georgina, Alba, Yaliseth, Ma Andreina y Elmer, por estar siempre para mí, por ser ese apoyo incondicional, esa alegría en cada momento de tristeza, por ser tan nobles de corazón y enseñarme que la vida es mejor vivirla en buena y grata compañía. Los adoro y este logro también les pertenece.

A todas las personas que sin saberlo dejaron en mí una huella, les agradezco por su compañía, el aprecio y cariño que les tengo es inquebrantable.

*Yanní.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios y la Santísima Virgen María por protegerme a lo largo de éste camino y llenarme de sabiduría e inteligencia necesaria en mi formación profesional.

A mi mamá Marlene por estar a mi lado durante todo este trayecto; brindándome su confianza, celebrando mis triunfos, pensando siempre en mi bienestar y apoyándome en cada circunstancia presentada.

A mi tía Silene por ser como una madre para mí; ayudándome, aconsejándome en mis momentos difíciles y estando siempre con la mejor disposición en cualquier cosa que necesitara. ¡MILLONES DE GRACIAS TÍA!

A mi tío Enrique por ser mi figura paterna, gracias por brindarme apoyo a lo largo de este camino y cuidarme en todo momento preocupándose siempre por mi bienestar.

A mi primo Jesús Manuel, para mí un hermano mayor, por ser tan servicial desde el primer día hasta hoy, gracias por tus sabios consejos.

A mi prima Johana, muchas gracias por tu gran y valiosa ayuda en éste sueño y siempre creer en mi a pesar de todo.

A mi familia la más maravillosa del mundo, no tengo como agradecerles todo lo que han hecho por mí; abuela, tíos, primos, sin ustedes esto no hubiese sido posible. ¡LOS AMO!

A mi compañera de tesis y hermana que me regaló la universidad Yanni, éste logro es de las dos, juntas desde el principio hasta el final, infinitas gracias por ser tan comprensiva y por tu maravillosa amistad, agradezco a Dios por haberte puesto en mi camino, la mejor compañera que pude tener. ¡TE ADOROOO!

A mis amigos y casi colegas María José, Yessire, Katty, Andreina y Elmer; su apoyo ha sido fundamental, gracias por su sincera amistad, por las risas y todo lo bonito que hemos compartido juntos.

A mi tutor Alexis Buitrago por su entrega y dedicación en la realización de éste trabajo de investigación, su colaboración fue esencial para lograr éste proyecto. ¡Gracias por todo profe!

A la Universidad de los Andes por ser mi mentora, mil gracias a esta maravillosa casa de estudios por brindarme tan valiosos conocimientos y formarme de la mejor manera como futura profesional del Bioanálisis.

*Ma Daniela.*

## AGRADECIMIENTOS

En la vida aprendes a valorar cada detalle, por más mínimo que éste sea, cada persona sin importar de donde provenga, del color de su piel o incluso de su modo de expresarse, cada una de ellas sólo se me ha hecho posible de apreciar gracias a ti, mí Dios, sin duda el aferrarme a ti en cada momento de mi vida me ha permitido dar pasos firmes, el agradecerte por esta meta que hoy culmino me llena de una enorme alegría, esto no hubiese sido posible sin ti a mi lado, eres mi compañía en momentos de soledad, mi felicidad en momentos de triunfos.

Agradezco a la respetable Universidad de Los Andes, por abrirme sus puertas, por cada enseñanza, por cada profesor que en ella se forma día a día, es un orgullo para mí decir que pertenezco a la mejor casa de estudio.

Al Profesor Alexis Buitrago, por tanta entrega, por guiarnos en este camino, y sobre todo hacer posible que se culminara de la mejor manera, gracias por la paciencia, los momentos de alegría y de tanto compartir, por mostrarnos que no hay límites cuando las cosas se hacen de corazón.

A las mejores amigas, compañeras y hermanas que me ha regalado la vida, Yessire, Katty y Lizber, por ser cómplice en cada aventura, gracias por cada palabra de aliento, por cada consejo, por abrirme la puerta de sus casas y ser parte de sus familias, sin duda tesoro cada momento vivido con ustedes, este caminar no hubiese sido igual sin su presencia, la humildad y el cariño que me brindan es mi mejor regalo. Las adoro.!

A Carolina, Ninoska, Yudith y Loemit, por su apoyo incondicional, por ser tan únicas, ha sido una dicha enorme conocerlas, las llevare siempre en mi corazón y siempre que sea posible estaré a su lado para apoyarlas. Las quiero!

Personas con un corazón tan puro, humilde y noble no se consiguen a diario, son como esas limitadas bendiciones que sólo Dios te puede dar, y tú, Ma Daniela eres una de ellas, hoy te agradezco no sólo porque esto lo comenzamos y terminamos juntas, sino por todo lo que me has dado, por creer en mí, por lograr esta meta que nos va unir siempre. Te adoro inmensamente, contar contigo ha sido y será siempre una gran dicha. Gracias!!

*Yanní.*



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES  
DR. "ANTONIO MORALES MÉNDEZ"



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS  
HOJAS DE *Amaryllis belladonna* L. (Amaryllidaceae) EN CEPAS DE  
REFERENCIA INTERNACIONAL (ATCC)**

**Trabajo de Grado**

**Autores:**

**Moreno T, María D.**

**C.I: 23.781.360**

**Torres Y, Yanni M.**

**C.I: 23.778.565**

**Tutor:**

**Prof. Alexis Buitrago**

**Cotutor:**

**Prof. Janne Rojas**

**RESUMEN**

La especie botánica *Amaryllis belladonna* es una planta perteneciente a la familia Amaryllidaceae, la cual tiene un uso significativo en la medicina tradicional. Dicha especie ha sido objeto de estudio, dando como resultado su acción contra hongos, parásitos y bacterias. En la presente investigación se ha confirmado que el extracto metanólico de las hojas de *Amaryllis belladonna* contiene diversos metabolitos secundarios que presentan actividad antibacteriana. Para su extracción se utilizó la técnica de maceración en frío con metanol, obteniéndose mediante destilación a presión reducida y consecutivamente a través del tamizaje fitoquímico, se logró revelar la presencia de elementos como: alcaloides, antraquinonas, compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, glicósidos, saponinas, taninos, triterpenos y esteroides. El ensayo antibacteriano se evaluó *in vitro* sobre cinco cepas bacterianas, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) empleando el método de difusión en agar con discos de papel o Kirby-Bauer. El extracto metanólico demostró ser efectivo para *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 7 mm, siendo su CIM de 320 mg/mL.

**Palabras claves:** Amaryllidaceae, *Amaryllis belladonna*, extracto metanólico, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana.

## GLOSARIO

**Ab:** *Amaryllis belladonna*

**ATCC:** American Type Culture Collection

**AZ:** Aztreonam

**CE:** Cefepima

**CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**Cm:** Centímetros

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**GM:** Gentamicina

**LSGU:** Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios

**mL:** Mililitros

**Mg:** Miligramos

**Mm:** Milímetros

**m.s.n.m:** Metros sobre el nivel del mar

**NA:** No activo

**NE:** No ensayado

**NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standards

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**TP:** Trimetoprim sulfametoxazol

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**ug:** Microgramos

**uL:** Microlitros

**UV:** Ultra Violeta

**VA:** Vancomicina

## INTRODUCCIÓN

Durante miles de años las plantas han ocupado un papel muy importante en la vida del hombre; en diferentes épocas y culturas han sido utilizadas en la prevención y tratamiento de diversas patologías. No se conoce con exactitud cuando se comenzó el uso de las plantas con la finalidad de aliviar enfermedades, puede que el inicio de su utilidad se remonte hacia 60.000 años. (Divinorum, 2013)

Las plantas medicinales son aquellas que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias o compuestos químicos que al entrar en contacto con el organismo humano son capaces de actuar sobre determinados procesos, produciendo un efecto terapéutico, o bien servir como materia prima en la producción de medicamentos. (Divinorum, 2013)

Por esta razón en la actualidad se cuenta con una gran variedad de plantas con dichos fines, entre ellas las pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, las cuales se caracterizan por ser plantas herbáceas, en gran parte provistas de bulbos, con hojas en espiral, normalmente todas en la base, y sin estípulas. Esta familia comprende géneros y especies muy apreciadas como plantas ornamentales, hortícolas y medicinales con gran importancia económica y cultural; es así que entre éstos se encuentra el género *Amaryllis* básicamente de clima tropical y subtropical aunque también pueden ser encontradas en alturas. (Izco, 2004)

En relación a éste género se conocen dos especies *Amaryllis paradisicola* y *Amaryllis belladonna*, siendo ésta última el objetivo de la presente investigación. Coloquialmente también recibe el nombre de “Dama Desnuda” debido a que sus flores atrompetadas aparecen antes que las hojas, se trata de una planta perenne y bulbosa nativa de Sudáfrica, donde tiene un uso significativo en medicina tradicional de los pueblos originarios. (Veeraballi, 2014). Estudios aplicados a las hojas de ésta planta han demostrado tener

contenido de alcaloides que poseen propiedades antimicrobianas. (Bastida, de Andrade, Kaiser, Nair, Tallini, Viladomat y Zuanazzi, 2017)

Es por ello que la identificación de dichos alcaloides presentes en la especie *Amaryllis belladonna* orienta a especular si podrían existir en ella otros elementos o componentes que generen una posible actividad antibacteriana. Por tal motivo es importante acotar que las bacterias son causantes de diversas enfermedades, siendo capaces de afectar a cualquier individuo e inducir la manifestación de cuadros clínicos que podrían ser fatales. (Murray y col., 2009)

Este trabajo de investigación ha sido constituido en V capítulos. El Capítulo I, denominado El problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del problema, Justificación, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la investigación. El Capítulo II, llamado Marco teórico abarca: Trabajos previos, Bases teóricas y Operacionalización de Eventos e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo de investigación, Diseño de investigación, Población y muestra, Instrumento de recolección de datos y Procedimientos de la investigación. El Capítulo IV nombrado Resultados y Discusión y finalmente el V Capítulo conformado por la Conclusión y Recomendaciones.

Esta investigación se realizará con la finalidad de Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de *Amaryllis belladonna* (Amaryllidaceae) frente a cepas de referencia internacional (ATCC) en el laboratorio B “Antonio Morales”, del Instituto de Investigaciones y en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Lic. Luisa Vizcaya”, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes desde Octubre de 2017 a Agosto de 2019.

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del problema**

En la actualidad, la medicina natural ha dado inicio al estudio científico de diversas plantas con propiedades medicinales, siendo la naturaleza la que proporciona el origen para los futuros medicamentos. Es por ello que los productos naturales son menos tóxicos que los sintéticos, debido a que los mismos carecen de la adición de ciertos principios activos industriales. (Albornoz, 1980)

La búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal mediante la recolección de nuevas especies y el correspondiente análisis químico, han proporcionado suficientes evidencias de sustancias con comprobada actividad farmacológica en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como: cardíacas, digestivas, metabólicas, entre otras. De tal manera, que al conocer los principios terapéuticamente activos y también las sustancias inertes que las acompañan, se logra un mayor rendimiento en el proceso de extracción y purificación, así como también, en la elaboración del producto industrial, el cual contendrá la actividad esperada de la droga aislada del vegetal. (Albornoz, 1980)

En vista de los grandes beneficios de los productos naturales, en la actualidad es necesario recurrir al uso de la medicina tradicional, ya que en algunas zonas rurales e indígenas, son el único tratamiento disponible, debido a la falta de instituciones médicas y recursos monetarios para la adquisición de los medicamentos alopáticos. (Escamilla y Moreno, 2015)

De este modo, diversas familias de plantas son usadas con fines medicinales entre ellas encontramos las pertenecientes a la familia

Amaryllidaceae, que comprende cerca de 50 géneros y unas 870 especies en zonas templadas y templado-cálidas del mundo. Entre éste gran número de especies destacan características tales como: flores muy llamativas debido a los colores y a su presentación en forma de umbela, motivado a esto tienen un alto valor ornamental, como es el caso del narciso de la sierra nevada (*Narcissus nevadensis*), comestibles como la cebolla (*Allium cepa*) y el Puerro (*Allium ampeloprasum*), así como también pueden ser medicinales como el *Narcissus tazetta* el cual es utilizado en la medicina tradicional, ya que posee propiedades analgésicas y anticancerígenas. (Izco, 2004)

Una de las especies más resaltantes es *Amaryllis belladonna*, con una distribución geográfica que abarca principalmente el sur de África. Es bien conocida por sus componentes alcaloides aislados como la pancracina, la vittatina, licorina, galantamina, entre otros, que exhiben una amplia gama de actividades biológicas, destacando actividades antimicrobianas. (Bastida y col, 2011)

Actualmente, la medicina moderna, se enriquece con el aporte de nuevos agentes terapéuticos extraídos de las plantas y dada su efectividad los mismos son utilizados en varios campos de la medicina. En ese sentido, el descubrimiento de nuevos agentes naturales con posible actividad antimicrobiana, están siendo utilizados para el tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas; los cuales son obtenidos luego de la extracción con un solvente orgánico (metanol), separación cromatográfica, identificación y determinación estructural empleando diferentes técnicas espectroscópicas. Por otra parte, el incremento en la resistencia de algunas cepas bacterianas a los medicamentos, ha provocado una disminución en la eficacia de los tratamientos convencionales, lo que conlleva a la búsqueda de nuevas drogas para el tratamiento de este tipo de patología y así contribuir con la salud de la población. (OMS, 2017)

Una vez descrita la situación actual del problema en estudio, se da lugar al siguiente enunciado holopráxico:

¿El extracto metanólico de las hojas de *Amaryllis belladonna* (Amaryllidaceae) obtenido en el laboratorio B “Antonio Morales”, del Instituto de Investigaciones y en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Lic. Luisa Vizcaya”, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes presenta actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional (ATCC)?

### **Justificación de la investigación**

Diferentes estudios realizados a las plantas del género *Amaryllis* han demostrado que poseen en mayor proporción, compuestos con núcleo de tipo alcaloide, que presentan diversas propiedades medicinales; siendo los mismos de interés para la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos, para el tratamiento de diversas patologías que afectan a la población; en ese sentido, nuestro interés es realizar un ensayo fitoquímico preliminar con las hojas de *Amaryllis belladonna*, con el propósito de evaluar su efecto sobre determinadas cepas bacterianas.

### **Objetivos de la investigación**

#### ***Objetivo general***

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de *Amaryllis belladonna* (Amaryllidaceae) frente a cepas de referencia internacional (ATCC) en el laboratorio B “Antonio Morales”, del Instituto de Investigaciones y en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Lic. Luisa Vizcaya”, del Departamento de Microbiología y

Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes desde Octubre de 2017 a Julio de 2019.

### **Objetivos Específicos**

- ✓ Obtener el extracto crudo de las partes aéreas de *Amaryllis belladonna* empleando la técnica de extracción sólido-líquido por maceración con metanol.
- ✓ Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico por el método del tamizaje fitoquímico.
- ✓ Evaluar la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional (ATCC) por medio del método de difusión en agar con discos de papel (Kirby-Bauer).

### **Alcances de la investigación**

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 exploratorio, descriptivo, correlacional, o explicativo. (Baptista, Fernández y Hernández, 2003)

La profundidad que se quiere alcanzar es evaluar la actividad antibacteriana que presentará el extracto metanólico obtenido de las hojas de la planta *Amaryllis belladonna* (Amaryllidaceae). El criterio de estudio será representado mediante procesos como la maceración para obtención del extracto metanólico, de la técnica de destilación a presión reducida de las hojas de la planta, seguido de un análisis fitoquímico y finalizando con la

comprobación de la actividad antibacteriana de la especie, a través del método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer).

### **Limitaciones de la investigación**

Para el desarrollo de ésta investigación se presentaron algunas limitaciones tales como la búsqueda de los trabajos previos relacionados con el tema de investigación, así como también el presupuesto para la adquisición de reactivos y solventes necesarios en la aplicación de las técnicas a realizar. Es por tal motivo que el alcance de ésta investigación es de tipo evaluativa.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes previos

Bastida, de Andrade, Kaiser, Nair, Tallini, Viladomat y Zuanazzi, en el año 2017, realizaron una investigación titulada: Constituyentes alcaloidales de la planta *Amaryllidaceae Amaryllis belladonna* L. El objetivo de esta investigación fue realizar un estudio detallado de los alcaloides en la planta *Amaryllis belladonna*, cuya recolección fue realizada en Canela (Rio Grande do Sul, Brasil). Los autores utilizaron como métodos para la obtención del extracto la maceración, filtración y destilación a presión reducida, el mismo fue sometido a una combinación de técnicas cromatográficas (cromatografía líquida y cromatografía en capa fina semipreparativa), así como también, técnicas espectroscópicas y espectrométricas. El cribado *In vitro* con el extracto metanólico mostró efecto contra *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum*. Los resultados que obtuvieron permitieron identificar veintiocho alcaloides, asociados con sus respectivas rutas biosintéticas; por otra parte, se reporta por primera vez el aislamiento de tres alcaloides con actividad antiparasitaria. La relación que existe entre este trabajo de investigación y el presente estudio es debido a que los autores utilizaron como técnica de extracción la maceración y la destilación a presión reducida aplicada a las hojas de la misma especie en estudio, para lograr la obtención de sus distintos alcaloides.

Faizan Ullah, Hafiz Ullah Khan, Iqbal, Rasheed y Ullah Khan en 2017, publicaron una investigación titulada: Evaluación *In vitro* del perfil fitoquímico y el potencial farmacológico del colorante natural, extraído de las flores de *Amaryllis belladonna*. El objetivo de esta investigación fue identificar los constituyentes fitoquímicos y su acción farmacológica, en el extracto metanólico de la flor de *Amaryllis belladonna*. Al extracto que obtuvieron le realizaron pruebas de orientación química (Dragendorff, Sand y Maeyer) para

la identificación de alcaloides; de igual manera, estudiaron la susceptibilidad bacteriana del extracto sobre cuatro cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, utilizando el método de difusión de pozos de agar. Los resultados obtenidos mostraron un alto contenido de fenoles (17,95 %) y alcaloides (6,16 %); así como en menor proporción flavonoides (0,12 %) y taninos (0,031 %). Por otra parte, la actividad antibacteriana mostró su mayor inhibición contra *M. luteus* y *S. aureus* (5,33 mm) a una concentración de 1,5 mg / mL, un diámetro de zona inhibitoria de 5,1 mm contra ambos *M. luteus* y *S. aureus* se lograron a 7,5 mg/ mL del extracto. Este trabajo de investigación guarda relación con este tema ya que su estudio se basó en la especie *Amaryllis belladonna* mediante las técnicas de filtración, pruebas aplicadas a los diferentes alcaloides que demostraron presentar actividad antibacteriana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas.

Abou-Donia, Andolfi, Evidente, Hammuda, Motta, Shawky y Touema, en el año 2004, publicaron una investigación titulada: Amarbellsina, un alcaloide de tipo licorina de *Amaryllis belladonna* L. que crece en Egipto. El objetivo de esta investigación se fundamentó en aislar y caracterizar los alcaloides obtenidos de la especie *Amaryllis belladonna* recolectada y cultivada en Alejandría. Los compuesto químicos obtenidos del extracto fueron separados cromatografía líquida de alta eficacia y caracterizados por diferentes métodos espectroscópicos. Con el estudio lograron identificar seis alcaloides como: licorina, pancracina, vittatina, 11-hidroxivittatina, hippeastrina y un nuevo compuestos denominado amarbellisina. Los resultados del estudio antibacteriano mostraron que la amarbellisina (22mm a 125 µg/mL), la pancracina (22mm a 188 µg/mL), vittatina (19mm a 63 µg/mL) y 11-hidroxivittatina (17mm a 219 µg/mL) tienen actividad contra *Staphylococcus aureus*; por su parte la vittatina exhibió actividad contra *Escherichia coli* gramnegativa (22 mm), mientras que la pancracina mostró actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* (16 mm). De igual manera, los alcaloides, la

amarbellisina (24mm a 63 µg/mL) y la hipeastrina (25mm a 125 µg/mL ) mostraron actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Este trabajo de investigación guarda relación con este tema ya que su estudio se basó en la especie *Amaryllis belladonna* mediante las técnicas de filtración y destilación a presión reducida, por otra parte se demostró que los alcaloides identificados presentaron actividad antibacteriana ya sea frente a bacterias grampositivas como a gramnegativas.

### **Antecedentes Históricos**

Desde el inicio de la humanidad, el ser humano ha hecho uso de las distintas propiedades curativas de diversas hierbas y plantas medicinales, entre las cuales suelen destacar la alcaravea, el tomillo y el laurel como las mejores plantas curativas de esa época, también figuran los antiguos egipcios, los cuales encontraron el uso medicinal del aceite de ricino, el opio, el ajo, el añil, la menta, el cilantro y otras hierbas más. (Divinorum, 2013)

Durante el siglo XVIII, la medicina experimentó un gran cambio puesto que adquiere carácter científico, con la aparición de la Farmacognosia, la misma se estableció como una ciencia fundamentada en el estudio de la composición química de las drogas de origen natural, el mecanismo de acción y la interacción con las diferentes enfermedades. (Divinorum, 2013)

Según expresa Fonnegra y Jiménez (2007)

Con el desarrollo de las teorías de la evolución y herencia genética, el uso del microscopio, y el nacimiento de ciencias como la fitoquímica y de técnicas como el análisis instrumental, fue posible el reconocimiento y el aislamiento de los principios activos de muchas plantas medicinales. La gran mayoría de estos principios activos se ha obtenido sintéticamente en el laboratorio y posteriormente ha sido utilizada en la preparación de medicamentos químicos; el consumo de estos medicamentos se incrementó desplazando cada vez más el uso directo de las plantas

medicinales de las cuales proceden; el hombre se fue alejando así de la medicina tradicional (p.11).

En el Antiguo Egipto, se reporta la primera utilización de las plantas para propósitos cosméticos, terapéuticos y medicinales. Con el transcurrir del tiempo, el hombre ha adquirido diversos conocimientos sobre las propiedades medicinales de las plantas, basados en su propia experiencia, transmitiendo sus beneficios de generación en generación. (Martínez, 2003)

En otro orden de ideas, en la actualidad se estima que alrededor del 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional, esto es debido a que las plantas medicinales despliegan características curativas, imprescindibles en el alivio de patologías, pues su objetivo es principalmente alcanzar fines terapéuticos; entre las características más resaltantes, se destaca que cuentan con una diversidad de metabolitos secundarios, llamados principios activos, que ejercen una acción farmacológica beneficiosa sobre el organismo vivo. (Fretes, 2010)

### **Bases Teóricas**

#### ***Familia Amaryllidaceae***

Bastida y col., (2011), mencionan que las Amaryllidaceae, se encuentran en los trópicos, ciertas regiones de África y Sudamérica, de igual manera, se reporta la presencia en el Mediterráneo y zonas templadas del continente Asiático. Y se han hallado centros de diversidad en Sudáfrica y la región andina. Algunos géneros también se encuentran en el área mediterránea y las regiones templadas de Asia.

Las plantas pertenecientes a este género se caracterizan por presentar bulbos, con raíces contráctiles, rara vez rizomatosas, con hoja lineares, paralelinervias y envainantes, planas y generalmente caedizas. Las mismas comienzan directamente del bulbo, una vez que la floración ha tenido lugar durante el otoño. Las flores son hermafroditas y actinomorfas o

débilmente zigomorfas. Poseen un extraordinario interés hortícola, ampliamente cultivadas como plantas ornamentales en parques y viviendas. (Izco, 2004)

Una característica particular de los miembros de la familia Amaryllidaceae es la presencia de un grupo exclusivo de alcaloides del tipo isoquinolínicos, que en la actualidad se encuentran en expansión, aislados en todos los géneros que conforman la familia. Desde el aislamiento del primer alcaloide, licorina, proveniente de *Narcissus pseudonarcissus* en 1877, se ha avanzado en el estudio de las plantas de esta familia, aunque todavía siguen siendo una fuente fitoquímica relativamente sin explotar. (Bastida y col., 2011)

En la actualidad, se han aislado más de 300 alcaloides de plantas de ésta familia y, aunque sus estructuras varían, se considera que estos alcaloides están relacionados biogenéticamente. (Bastida y col., 2011)

### ***Amaryllis belladonna***

*Amaryllis belladonna*, tiene una distribución geográfica que abarca principalmente el sur de África, donde tiene un uso significativo en la medicina tradicional de los pueblos originarios. Es también conocida como "belladona-lirio" y "mujer desnuda", además se le conoce con otros muchos nombres comunes y como ejemplos de ellos podemos citar el Amarilis, Amariles, Azucena de San Miguel, Azucena rosa, Azucena de Santa Paula, Azucena de Marzo, Azucena Rosada, Belladona; ha sido utilizada durante varios siglos en las tradiciones medicinales de los pueblos Sotho, Xhosa y Zulú de Sudáfrica y en Java para el tratamiento de la "hinchazón" (un presunto sinónimo de cáncer). (Bastida y col., 2017)



**Figura 1:** Planta *Amaryllis belladonna*

El género *Amaryllis* a veces se confunde con el género *Hippeastrum*, ya que las plantas pertenecientes al mismo, se conocen comúnmente como *Amaryllis*. Aunque la disputa sobre el nombre todavía continúa (Dandy y Fosberg, 1954; Traub, 1983), el nombre de *Amaryllis belladonna* se ha asignado internacionalmente. (Veeraballi, 2014)

Se cultiva en patios, terrazas y zonas verdes, son de fácil propagación. Cada uno de sus bulbos puede medir de 5 a 10 cm de diámetro, en cuanto a sus hojas se encuentran entre 30 a 50 cm de longitud y 2 a 3 cm de ancho, arregladas en dos filas, las cuales se producen en otoño y eventualmente caen en primavera. Fue descrita por Carlos Linneo; durante mucho tiempo se la consideró la única especie del género *Amaryllis*, hasta que la botánica Dierdre Snijman describió en 1998 a *Amaryllis paradisiicola*. (Veeraballi, 2014)

Es bien conocida por sus componentes alcaloides únicos, que exhiben un amplio grado de actividades biológicas; 31 alcaloides se han identificado previamente en *Amaryllis belladonna* y los efectos antibacterianos, antifúngicos y antineoplásicos están asociados con algunos aislados de dicha especies. (Bastida y col., 2017)

### ***Taxonomía de la especie Amaryllis belladonna***

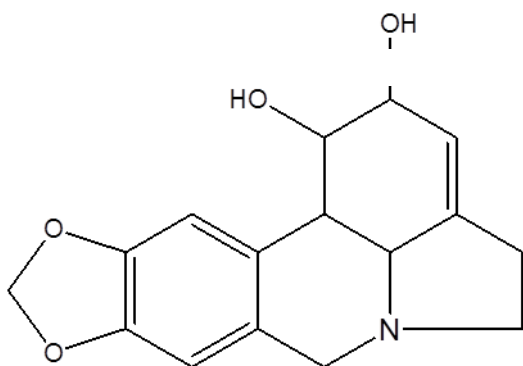
Según la ordenación jerarquizada y sistemática, ésta especie descrita por Carlos Linneo en el año 1753, desde el punto de vista científico presenta una taxonomía que se clasifica de la siguiente manera:

**Tabla 1:** Taxonomía de la especie *Amaryllis belladonna* (“Trópicos org.”, 2019)

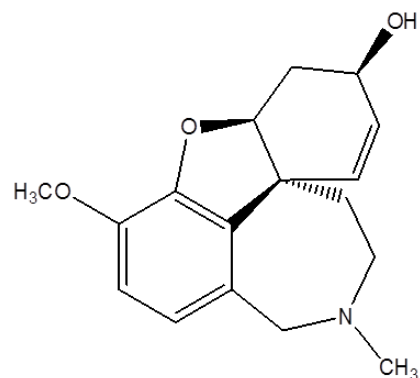
<u>Taxonomía</u>	
<u>Reino:</u>	<u>Plantae</u>
<u>Orden:</u>	<u>Asparagales</u>
<u>Familia:</u>	<u>Amaryllidaceae</u>
<u>Género:</u>	<u>Amaryllis</u>
<u>Especie:</u>	<u>A. belladonna L.</u>

### ***Fitoquímica de Amaryllis belladonna***

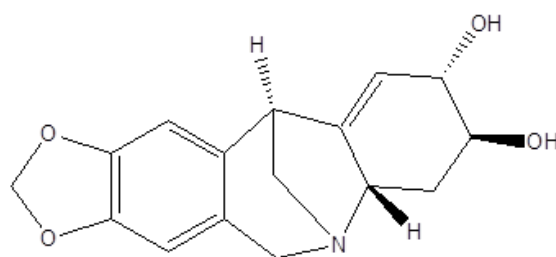
Las investigaciones realizadas para la especie, revelan principalmente la presencia de metabolitos secundarios del tipo alcaloide, los cuales se derivan de los aminoácidos precursores (ornitina, lisina, tirosina, fenilalanina), constituyen el grupo más numeroso y de compuestos químicos activos biosintetizados, repartidos ampliamente en los distintos órganos de las plantas (raíces, tallos, flores). Entre los principales alcaloides, se pueden mencionar: licorina (Figura 2), galantamina (Figura 3), pancracina (Figura 4), entre otros. (Izco, 2004)



**Figura 2:** Licorina



**Figura 3:** Galantamina



**Figura 4:** Pancracina

Entre las actividades reportadas para los alcaloides aislados para la especie, se destacan su efecto antiparasitario (Bastida y col., (2017), antibacteriano y antimicótico Komienko y Evidente, 2008; Evidente y col., 2004)

Al conocer los grandes beneficios que se han obtenido, hay que tener en cuenta que al someterse a estudios otras partes de esta planta existen posibilidades de que presenten mayores ventajas desde el punto de vista terapéutico.

### ***Técnicas de Extracción***

Son las más empleadas para la separación y purificación de los componentes de una mezcla o para aislar un compuesto orgánico de sus fuentes naturales. Entre ellas se encuentran: (Albornoz, 1980)

**Maceración:** Consiste en sumergir el material vegetal fragmentado, con el solvente, para que éste penetre la estructura celular y disuelva las

sustancias, se agita el material por un periodo mínimo de dos días, y hasta por semanas, al cabo del cual se decanta el líquido, filtrando y exprimiendo el residuo. (Albornoz, 1980)

**Lixiviación:** o también conocida como percolación, se realiza colocando el material vegetal pulverizado en un percolador, haciendo pasar continuamente el solvente, el cual arrastra por afinidad las sustancias solubles. (Albornoz, 1980)

**Digestión:** es una variante de la maceración, en donde se aplica calor moderado al material pulverizado, lo cual incrementa la capacidad de extracción; de igual manera la utilización continua del solvente. Se emplean materiales de vidrio tan sencillos como un condensador acoplado a un balón de digestión. (Albornoz, 1980)

**Infusión:** se fundamenta en un ligero cocimiento de las partes tiernas de la planta (hojas y flores) con agua caliente, utilizando un recipiente cerrado durante unos treinta minutos. (Albornoz, 1980)

**Decocción:** Se lleva a cabo sometiendo a ebullición con agua las partes crudas de la planta, dependiendo de la consistencia de éstas, varía el tiempo de cocción, si se trata de las partes blandas (hojas, flores y raíces) se someten a un menor tiempo a diferencia de aquellas partes duras (ramas y tallos) que requieren de un mayor plazo de ebullición. (Albornoz, 1980)

### ***Técnicas de destilación***

Una vez obtenido el extracto se filtra y concentra para reducir su volumen evaporando el solvente, obteniendo como resultado un residuo no volátil. La concentración puede lograrse mediante dos modalidades: (Albornoz, 1980)

**Evaporación simple:** se efectúa generalmente bajo campana con baño maría de temperatura regulable; debido a que estos solventes en su

mayoría son inflamables y tóxicos, por lo tanto los vapores se dejan escapar sin que se condensen. (Albornoz, 1980)

**Evaporación a presión reducida:** utiliza un rotavapor, acoplado a un balón contentivo del filtrado, el mismo rota en ángulo sobre la superficie del agua caliente, lo cual permite que el solvente se disemine sobre las paredes del balón, ofreciendo mayor superficie de evaporación y obteniendo así dicho solvente mediante su condensación. (Albornoz, 1980)

### ***Tamizaje 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)

El tamizaje fitoquímico consiste en un método cualitativo, basados en la aplicación de diferentes reacciones de color y precipitación. Las mismas son consideradas como pruebas de rápida evaluación, sensibles y reproducibles, además, con un bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación que guía a la continuación de los estudios. (Sharapin, 2000)

La aplicación de esta técnica en la investigación científica ha permitido descubrir un amplio número de principios activos, que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas, los cuales se ubican en dos grupos: (Palacios, 2008)

**Metabolitos primarios:** son sustancias necesarias para el funcionamiento adecuado de las células y organismos. Comprende los procesos químicos que cada planta debe realizar cada día para sobrevivir y reproducirse como la fotosíntesis, glicolisis, reproducción celular, absorción de nutrientes, entre otros. (Palacios, 2008)

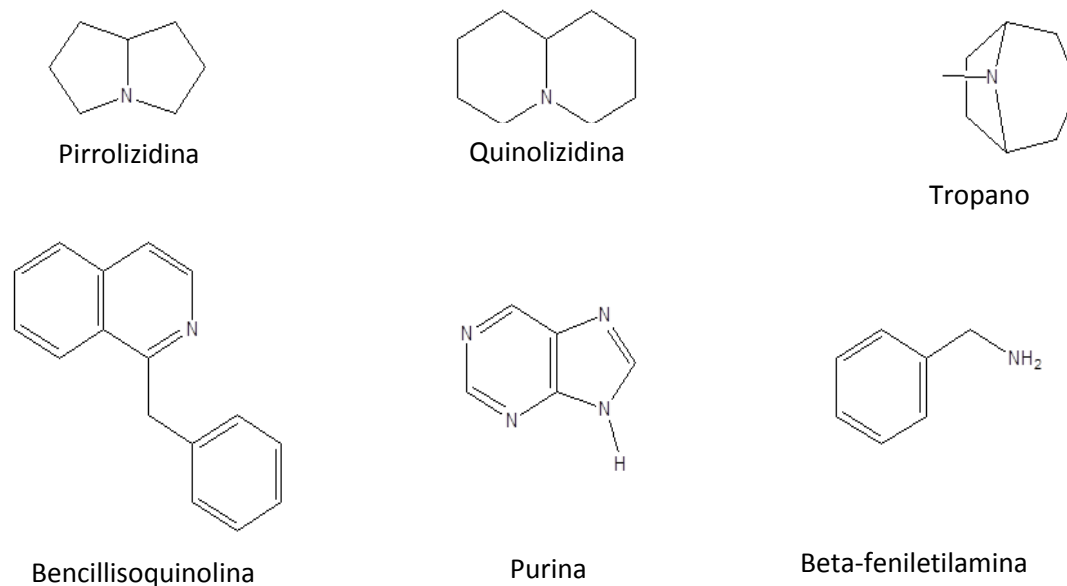
**Metabolitos secundarios:** Son moléculas orgánicas que cumplen un rol de polinización, prevención frente ataques de predadores; importante en su crecimiento y el desarrollo. Generalmente se encuentran en cantidades relativamente pequeñas y su producción puede ser extendida o restringida a familias, géneros, o especies particulares. (Palacios, 2008)

Comprende los procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales. Representa el conjunto de reacciones químicas que da lugar a la formación de un producto natural. (Palacios, 2008)

Partes de estas reacciones químicas son comunes a un cierto número de diferentes plantas o familias de plantas, pero el resultado obtenido (producto natural) generalmente es diferente de una planta a otra. Los metabolitos secundarios no parecen ser necesarios (en la mayor parte de los casos) para la supervivencia de la planta, pero pueden conferirle una ventaja competitiva. Entre ellos los más destacados son: alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas, antraquinonas, glicósidos y glicósidos cardiotónicos, taninos, mucilagos, compuestos fenólicos, triterpenoides, entre otros. (Palacios, 2008)

**Alcaloides:** Constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, con alta acción fisiológica sobre los animales y vegetales; estos aparecen en muy diversas familias de plantas, unos 256 en los hongos, algas y otros vegetales inferiores. La mayoría son sólidos incoloros, aunque algunos son líquidos (nicotina), otros con colores como el amarillos (berberina) o rojos (queliretrina) a su vez también se originan a partir de aminoácidos (Domínguez, 1973).

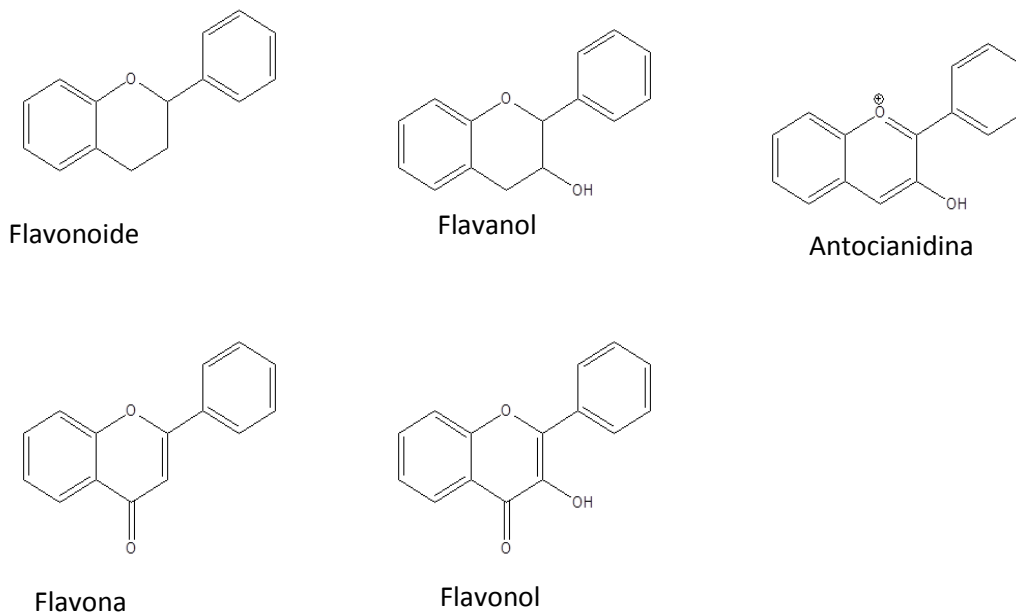
Estos compuestos pueden tener más de un nitrógeno con diferente funcionalidad en la misma molécula. (Marcano y Hasegawa, 2002); En la Figura 5 se aprecian diversos núcleos básicos de alcaloides.



**Figura 5:** Diversos núcleos básicos de alcaloides.

**Flavonoides:** son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado  $C_6 - C_3 - C_6$ , se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libres o como glicósidos; estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas. (Figura 6) (Domínguez, 1973)

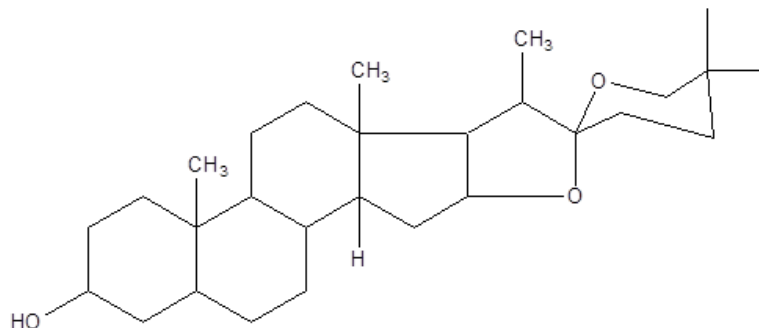
Son sintetizados por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flavonas localizadas en las alas de mariposa, probablemente por ingestión, se puede decir que no se les encuentran en animales. (Domínguez, 1973)



**Figura 6:** Estructura de Flavonoides.

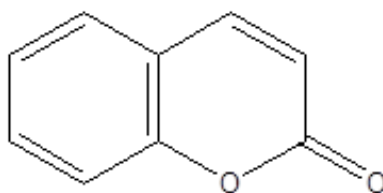
**Saponinas:** palabra que proviene del latín sapon= jabón; son glucósidos que contienen una o varias cadenas de azúcar en una columna vertebral aglicon triterpeno o esteroide llamado sapogenina. Se clasifican según el número de cadenas de azúcar en su estructura (mono, di o tri), incluyen también monosacáridos, siendo los más comunes *D*- glucosa, *D*- galactosa, ácido *D*- glucurónico entre otras. Se caracterizan por la habilidad de formar espuma jabonosa cuando se agitan en una solución. Este comportamiento propicia que se unan de manera fácil a nivel molecular con el agua y otras sustancias, tales como el colesterol y las grasas. (Ustundag y Mazza, 2007).

Poseen una amplia gama de actividades biológicas, tales como: analgésicas, antimicrobiano, antiinflamatorio, antialérgico, entre otros.(Figura 7) (Ustundag y Mazza, 2007)



**Figura 7:** Estructura de Saponinas.

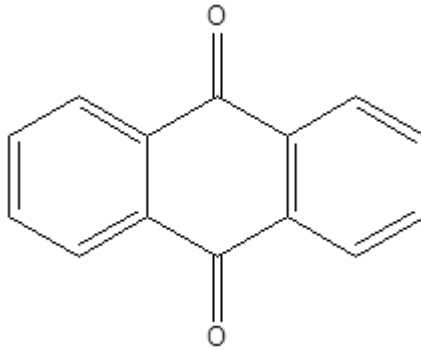
**Cumarinas:** constituyen un grupo importante de compuestos naturales; son considerados derivados de la lactona del ácido o-hidroxicinámico, usualmente llamada coumarina. La mayoría se encuentran libres en las plantas; pero se conocen glicósidos del psoraleno y otras cumarinas y se encuentran en forma abundante la umbeliferina. En la planta se ubican con frecuencias en los extractos de leguminosas, y en cualquiera de los órganos vegetales, desde raíces, flores y frutos; son sustancias fluorescentes, comúnmente fotosensibles. (Figura 8) (Domínguez, 1973)



**Figura 8:** Estructura de Cumarinas.

**Antraquinonas:** se consideran el grupo más numeroso de quinonas. Las cualidades tintoreras y purgantes de algunas plantas de diversas familias se debe a sus quinonas. La mayoría de las antraquinonas están hidroxiladas en C-1 y C-2 y con frecuencia están en forma de glicósidos, los que se

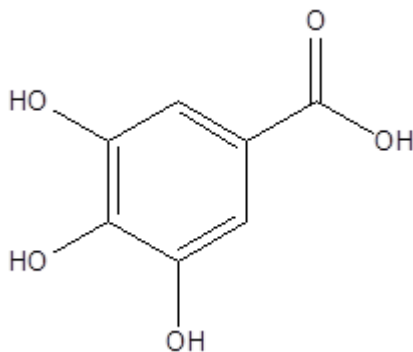
hidrolizan durante el aislamiento. Pueden extraerse con disolventes no polares, pero cuando están como glicósidos, se extraen con agua, etanol o mezclas hidroalcohólica. (Figura 9) (Domínguez, 1973)



**Figura 9:** Estructura de Antraquinonas

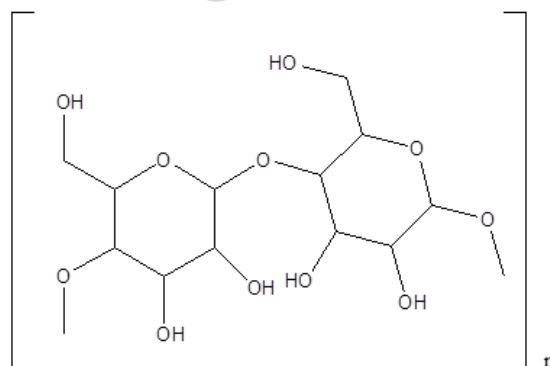
**Glicósidos y glicósidos cardiotónicos:** son un grupo de metabolitos formados por varias unidades de azúcares, y un núcleo esteroideo unido a un anillo lactónico-insaturado, se caracterizan por ser hidrolizados en soluciones ácidas. Son solubles en agua o alcoholes de bajo peso molecular; disminuyen la tensión superficial del agua y son insolubles en éter de petróleo, cloroformo y otros disolventes apolares. (Domínguez, 1973)

**Taninos:** son compuestos químicos de carácter fenólico, de alto peso molecular, no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales de reacción ácida y sabor astringente. Se distinguen dos grupos básicos de taninos, que difieren por su estructura y su origen biogénico en: taninos hidrolizables y condensados o catéquicos. Los taninos hidrolizables por tratamiento con ácidos se separan en azúcares y ácidos fenólicos, mientras que los condensados no se degradan. También poseen la propiedad de coagular la gelatina y curtir la piel. (Figura 10) (Domínguez, 1973)



**Figura 10:** Estructura de Taninos.

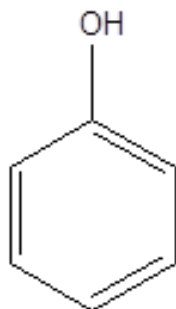
**Mucilagos:** son polisacridos heterogéneos de alto peso molecular que tienen la propiedad de hidratarse al contacto con el agua, dando masas gelatinosas o soluciones coloidales. Son constituyentes celulares normales, que facilitan la retención de agua en el interior del vegetal. Se clasifican en neutros y ácidos, y precipitan con la presencia de alcohol u metales pesados. (Figura 11) (Domínguez, 1973)



**Figura 11:** Estructura de Mucilagos.

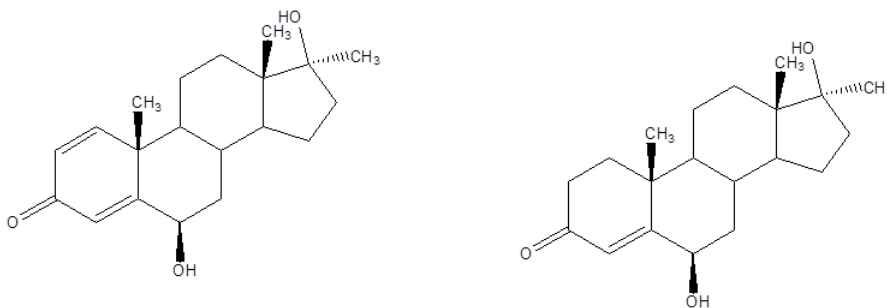
**Compuestos fenólicos:** sustancias químicas que se encuentran ampliamente distribuidas en frutas y vegetales. Se encuentran entre los metabolitos secundarios de mayor importancia, derivados en su mayoría de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina. Estos compuestos constituyen un amplio grupo de sustancias, presentes en las plantas con

diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas; en la actualidad existen reportados más de 8000 compuestos identificados. (Figura 12) (Shahidi y Nazk, 1995)



**Figura 12:** Estructura de Compuestos fenólicos

**Triterpenoides y esteroides:** no hay reacciones verdaderamente específicas para identificar los esteroides ya que otro tipo de sustancias tales como glicósidos cardiotónicos, triterpenos y saponinas también producen reacciones coloridas, por tener estructuras químicas comunes y/o análogas. Los requerimientos estructurales para la identificación cualitativa del núcleo esteroidal son los siguientes, un sustituyente  $-OH$  en posición tres y además en doble enlace en el anillo A o B por deshidratación genera con  $H_2SO_4$ . (Figura 13). (Shahidi y Nazk, 1995)



**Figura 13:** Estructura de Triterpenos y esteroides

## **Bacterias**

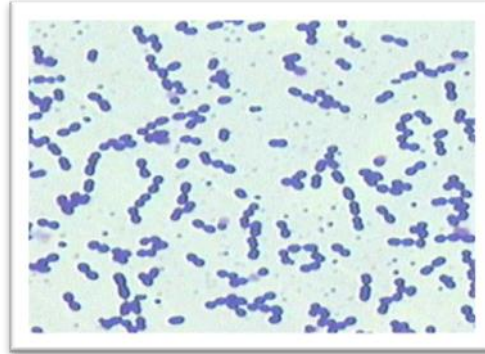
Las bacterias como bien se conoce, son causantes de muchas enfermedades infecciosas humanas, éstas producen síntomas de una enfermedad por dos mecanismos: la producción de toxinas (exotoxinas, endotoxinas) y la inducción de inflamación. (Murray y col., 2009)

Su clasificación depende de la naturaleza de la pared celular, de las características de tinción y la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno; según su forma se clasifican en tres grandes grupos básicos: cocos (esféricos), bacilos (bastones) y espiroquetas (espiral). (Díaz, Palá y Usano, 2014). Dentro de la clasificación bacteriana podemos conseguir: (Murray y col., 2009)

**Bacterias grampositivas:** poseen una pared celular gruesa que consta de varias capas formada principalmente por peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática. Éste es lo suficientemente poroso como para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática. También presentan como se puede apreciar en la Figura 20, otros componentes, como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, y polisacáridos complejos (polisacáridos C) (Murray y col., 2009). Al ser un grupo extenso de bacterias se encuentra una gran diversidad de géneros y especies, entre los más aislado y de importancia clínica podemos encontrar con más frecuencia:

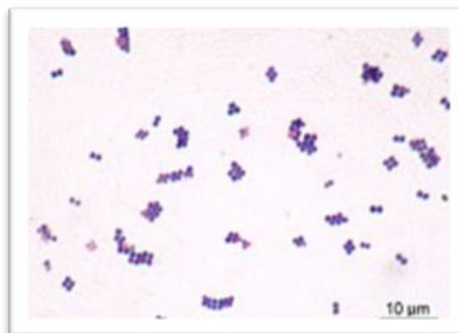
***Enterococcus faecalis*:** coco grampositivo que reside normalmente en el tubo digestivo y las vías biliares. Su importancia como causante de enfermedades humanas es cada vez mayor, en gran parte debido a su resistencia a los antibióticos. Constituyen la segunda causa en frecuencia de infección intrahospitalarias urinarias y de heridas, además, la tercera causa de bacteremia nosocomial. Las infecciones urinarias constituyen la infección enterocócicas más frecuentes que incluyen cistitis, pielonefritis y prostatitis; las cuales se asocian con anomalías estructurales e instrumentación de las

vías urinarias. (Winn, Allen, Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger y Woods, 2008) (Figura 14)



**Figura 14:** *Enterococcus*

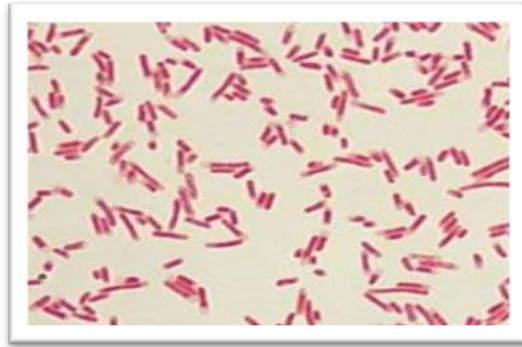
***Staphylococcus aureus*:** coco grampositivo, inmóvil, que no forma esporas, puede encontrarse sólo, en pares, cadenas cortas o racimos. Es un microorganismo que produce catalasa, coagulasa y crecimiento rápido en agar sangre, sus colonias miden de uno a tres milímetros. Aunque forma parte de la microbiota humana normal, puede causar infecciones oportunistas importantes en condiciones apropiadas o debido a un trauma, que van desde infecciones cutáneas relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas potencialmente mortales. Es frecuentes en neonatos, niños y adultos. (Winn y col., 2008) (Figura 15)



**Figura 15:** *Staphylococcus aureus*

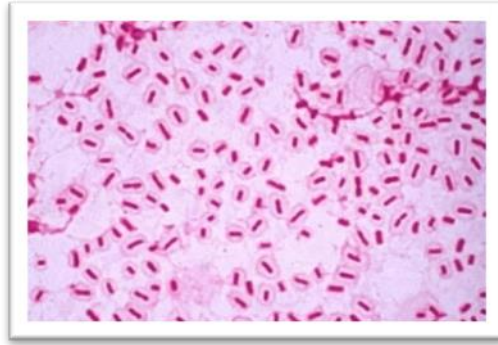
**Bacterias gramnegativas:** a diferencia de las bacterias grampositivas, estas no poseen ácidos teicoicos y lipoteicoicos y su contenido de peptidoglicano está representado en un 5 a 10 % del peso de la pared celular. Se destacan por poseer una membrana externa, la cual mantiene la estructura bacteriana, y constituye una barrera impermeable a moléculas de gran tamaño, está formada fundamentalmente por lipopolisacárido (Figura 19) y es conocido como endotoxina, que actúa como un potente estimulador de las respuestas inmunitarias. (Murray y col., 2009). Entre las bacterias gramnegativas que se encuentran con mayor frecuencia podemos mencionar:

***Escherichia coli:*** bacteria gramnegativa no posee esporas, su tamaño es aproximadamente de 1-2 x 30-30 micras (1 micra = 0,001mm), vive en movimiento, puede crecer fácilmente a 37 °C. Es el principal organismo anaeróbico facultativo del sistema digestivo, actúa como un comensal formando parte de la microbiota intestinal, ayudando así a la absorción de nutrientes. Este microorganismo es el más frecuente involucrado en la sepsis y shock inducido por endotoxinas, así como también, de las infecciones en las vías urinarias y las heridas, de igual manera esta asociado con la neumonía en pacientes inmunosuprimidos y meningitis en recién nacidos. Ciertas cepas de *E. coli* pueden producir enteritis o gastroenteritis. (Figura 16). (Winn y col., 2008)



**Figura 16:** *Escherichia*

***Klebsiella pneumoniae*:** bacteria de forma bacilar, gramnegativa, anaerobia facultativa, inmóvil y usualmente encapsulada (Figura 17), ampliamente esparcida en el ambiente y presente de manera especial en la superficie mucosa de mamíferos, en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. Forman colonias grandes con una consistencia mucóide en las placas de aislamiento primario, en agar MacConkey las colonias típicamente se presentan grandes, mucoides y rojas, y dicho pigmento suele difundirse en el agar, lo que indica fermentación de lactosa y producción de ácido. Básicamente es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de heridas quirúrgicas. Su cápsula hidrófila la protege de la fagocitosis por los polimorfonucleares y macrófagos y de los diversos factores bactericidas del hospedero. (Winn y col., 2008)



**Figura 17:** *Klebsiella pneumoniae*

***Pseudomonas aeruginosa*:** es un bacilo gramnegativo no fermentador, se caracteriza por la producción de un pigmento pioverdina hidrosoluble que va de una fluorescencia de color blanco a verde azulado (Figura 18), bajo luz ultravioleta. Aparece como grandes colonias grises, con una periferia en expansión y muestra betahemólisis, también un aspecto de piel de caimán y un brillo metálico. Se aísla con más frecuencia en muestras clínicas, prevalece principalmente en los pacientes con quemaduras, fibrosis quística, leucemia aguda, trasplantes de órganos, entre otros. Las infecciones suelen ocurrir en cualquier sitio donde tiende a acumularse la humedad: traqueostomías, catéteres permanentes, el oído externo (“oído de nadador”). También provoca infecciones de las vías urinarias y de las vías respiratorias altas, siendo estas últimas las más graves e incluso potencialmente mortales en los huéspedes inmunodeprimidos. (Winn y col., 2008)



**Figura 18:** Placa con crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

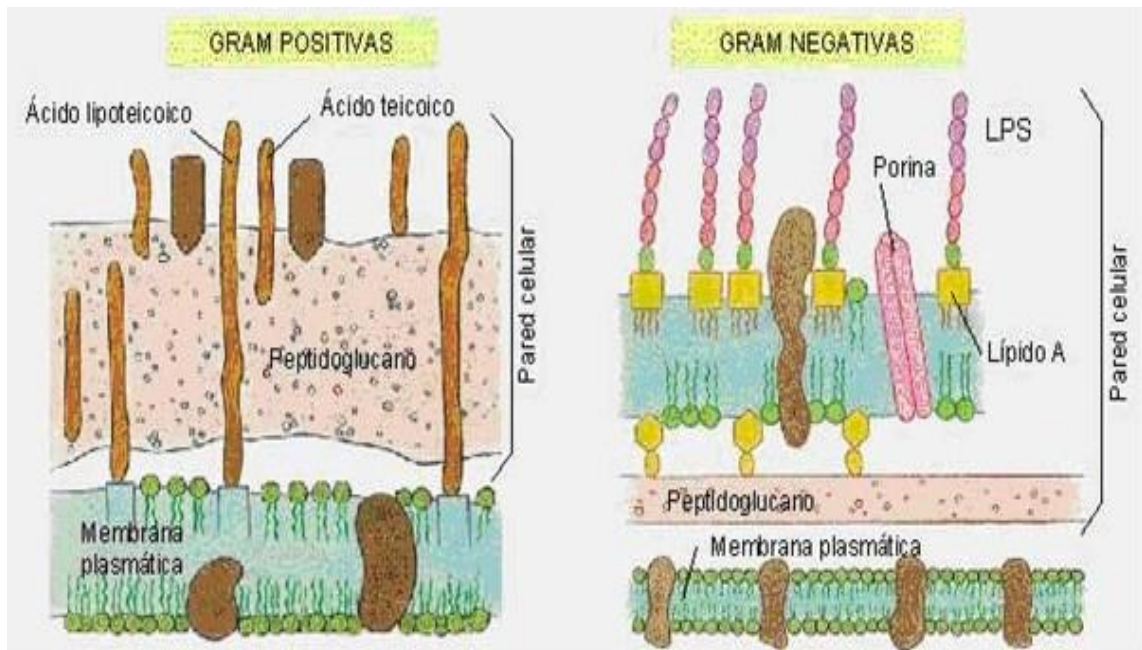


Figura 19: Pared celular de Bacterias grampositivas y gramnegativas.

www.bdigital.ula.ve

### ***Técnicas de coloración bacteriana***

**Coloración de Gram:** es una prueba rápida, potente y sencilla que permite al clínico distinguir entre dos clases fundamentales de bacterias, para establecer un diagnóstico inicial y así implementar el tratamiento basándose en las diferencias inherentes entre ellas. (Murray y col., 2009)

Es un procedimiento donde una vez fijada la muestra al portaobjeto, se añade una solución de violeta de genciana o cristal violeta (colorante primario) que penetra todas las bacterias de la preparación. Luego se agrega solución de lugol (mordiente), el yodo entra a la célula y forma una complejo insoluble con el colorante primario, posteriormente se procede a la decoloración con una mezcla de alcohol acetona; las bacterias cuya pared celular es más densa, constituida principalmente por peptidoglucano

(grampositivas), se deshidratan y cierran los poros de la pared, impidiendo la salida del complejo violeta de genciana-yodo, por lo tanto, estas bacterias permanecen de color púrpura; mientras que las bacterias gramnegativas debido a su alto contenido de lípidos, al decolorar quedan poros en la pared que permiten la salida del complejo violeta de genciana-yodo, y al adicionar el colorante de contraste (Safranina), estas toman dicho colorante por lo que se observan de color rosado. (Murray y col., 2009).

### ***Actividad antibacteriana***

Es la capacidad que tiene un fármaco de inhibir el crecimiento sin dañar el organismo infectado, es por esta razón que un agente con actividad antibacteriana es cualquier compuesto químico, natural o sintético, que posee mecanismos que evitan que dicho microorganismo logre su ciclo y en algún punto de control impide su replicación. (Díaz, Palá y Usano, 2014)

### ***Agar Mueller Hinton***

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes. The Clinical and Laboratory Standards Institute (por su siglas en inglés, CLSI), anteriormente conocida como National Committee for Clinical Laboratory Standards (por sus siglas en inglés, NCCLS), recomienda su uso en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a una serie de factores que se detallan a continuación: **a)** presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, **b)** la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente y **c)** una gran cantidad de datos han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, es útil para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de *Streptococcus*.

### ***Patrón de McFarland***

Se utiliza como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. El patrón 0,5 de McFarland equivale a  $10^8$  UFC/mL (unidades formadoras de colonia), tiene una aplicación especial en la preparación de inóculos bacterianos para la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, en dilución de agar estandarizado, procedimiento de macro y microdilución de caldo, de difusión en disco y pruebas de sensibilidad para organismos anaerobios. (Becton, Company and Dickinson, 2005)

### ***Pruebas de Susceptibilidad***

Métodos que evalúan la respuesta de una bacteria frente a concentraciones preestablecidas de antibióticos. Existen diversos métodos de laboratorio que puede ser utilizado para determinar dicha susceptibilidad, entre ellos: (Sherwood, Willey y Woolverton, 2009)

**Método de Difusión en Agar con Discos o prueba de Kirby-Bauer:** Es un método cualitativo de susceptibilidad, que permite determinar la capacidad de inhibición del crecimiento de los distintos microorganismos, bien sea bacterias, hongos, entre otros, por difusión en disco. Éste consiste en un disco de papel de filtro estéril que contiene una cantidad específica de antimicrobiano, que puede ser una sustancia de origen sintético o natural el cual se aplica en una superficie de agar contenida en una cápsula de Petri, inoculada con los determinados microorganismos en estudio. (Sherwood, Willey y Woolverton, 2009)

Posteriormente, la placa inoculada es almacenada durante un tiempo específico, para que ocurra la difusión del antimicrobiano, luego se procede a una incubación durante 24-48 horas bajo una temperatura alrededor de 37 °C. Transcurrido el tiempo estimado, se observaran los discos rodeados por una zona de inhibición llamada halos, dichos halos serán medidos con la

finalidad de conocer los resultados conocidos, los cuales dependiendo de la medida de éste pueden ser: sensible (S), intermedio o moderadamente sensible (I),

En caso contrario sino existen halos de inhibición alrededor de los discos de filtro se interpretará como resistente (R), es decir, en ausencia de actividad antimicrobiana (Araque, Gonzáles y Hernández, 2007)

**Método de dilución en caldo o agar para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Consiste en la preparación de diluciones seriadas de un antibiótico en un medio con nutrientes (caldo Mueller Hinton) y posteriormente se inoculan en una concentración estandarizada para la bacteria en estudio. Tras incubarlas el tiempo toda la noche, la menor concentración de antibiótico que consigue inhibir el crecimiento de la bacteria se le denomina CIM. (Murray y col., 2009)

**Método de la cinta o Epsilometro:** Basado en el grado de difusión del antibiótico (gradiente predefinido). Se compone de una tira sólida de un material inerte, con las iniciales del antibiótico y con un gradiente donde se encuentran la mayor y menor concentración. El gradiente obtenido cubre las concentraciones adecuadas para realizar la CIM del antimicrobiano. (Triantafilo, 2002)

La tira de E-test se coloca sobre una placa debidamente inoculada, igual que lo requerido en un antibiograma por difusión, y luego del período de incubación respectivo, es posible observar una elipse de inhibición cuyo borde intersecta longitudinalmente la tira en una posición donde una concentración específica del antimicrobiano causa la inhibición del crecimiento bacteriano. Este valor, llamado concentración inhibitoria, es una medición directa de la susceptibilidad del microorganismo al fármaco estudiado. (Triantafilo, 2002)

## **Definición de Términos**

### ***Aislamiento***

Consiste en separar de una población heterogénea, al microorganismo que se requiere estudiar para obtenerlo en estado puro. (Sánchez, 2010)

### ***Agar***

Es un agente solidificante, usado frecuentemente y formado por poligalactano sulfatado producido por ciertas algas marinas, es sólido a temperaturas de incubación ordinarias. (García, 2010)

### ***Alcaloide***

Son un grupo de sustancias que tienen en común la presencia de un anillo heterocíclico nitrogenado; en su mayor parte son derivados de aminoácidos precursores. (Izco, 2004)

### ***Bulbo***

Es un órgano subterráneo presentes en algunas plantas, que se ocupan de almacenar los nutrientes de reserva durante las épocas frías del año, para ser utilizadas en la brotación de nuevos tallos durante la primavera o el verano. (Bruneton, 2001)

### ***Extracto***

Sustancia muy concentrada que se obtiene de las diferentes partes de las plantas, empleando diversos procedimientos. (Albornoz, 1980)

### ***Fitoquímica***

Parte de las ciencias naturales que se encarga del aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias. (Albornoz, 1980)

## Inóculo

Se refiere a una porción de una población de microorganismos. Dicha porción de gérmenes, generalmente patógenos, son transportados por un vehículo cualquiera, para transferirlos a un organismo o a un substrato donde crecerá y multiplicará. (Sánchez, 2010)

## Operacionalización de Eventos

Se realiza con el fin de examinar la relación existente entre el evento de estudio y sus respectivos indicadores, tal como se explica en la Tabla 2

**Tabla 2:** Operacionalización del evento actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Amaryllis belladonna* (Amaryllidaceae)

1. Evento de estudio	2. Definición conceptual	3. Definición operacional
Actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>Amaryllis belladonna</i> (Amaryllidaceae)	Es la capacidad que tiene un fármaco de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado. (Díaz, Palá y Usano, 2014)	Los resultados de la actividad antibacteriana se derivan de la lectura del método de difusión en agar
4. Dimensiones	5. Indicadores	
<ul style="list-style-type: none"><li>- Sensible</li><li>- Intermedio o moderadamente sensible</li><li>- Resistente</li></ul>	Tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.	

(Torres, Moreno, Buitrago y Rojas, 2018).

## Hipótesis

En vista de la compleja disponibilidad y adquisición de medicamentos, el hombre se ha visto en la necesidad de buscar nuevas fuentes terapéuticas que permitan la restauración de la salud, aunado a esto la frecuente aparición de la resistencia por parte de microorganismos a los diferentes antibióticos, conllevan a implementar el uso de plantas medicinales, las cuales según estudios realizados expresan un amplio margen de propiedades curativas; tal es el caso de la plantas de la familia Amaryllidaceae que han reportado tener variedad de metabolitos secundarios, por lo cual es de esperar que la especie *Amaryllis belladonna* perteneciente a esta familia, presente actividad antimicrobiana contra algunas cepas bacterianas grampositivas y gramnegativas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### Tipo de investigación

La profundidad del conocimiento que se quiere adquirir tiene relación directa con el tipo de investigación. En tal sentido, se hace referencia que el tipo de investigación guarda relación con los niveles de complejidad del proceso de investigación. (Hurtado, 2010). Atendiendo a la naturaleza del problema y el propósito, la presente investigación es de tipo evaluativa, ya que el grado de elaboración es valorar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de *Amaryllis belladonna* (Amaryllidaceae) en cepas de referencia internacional.

#### Diseño de investigación

Es la estrategia que asume el investigador para responder al problema, es decir, la serie de actividades sucesivas y organizadas, que deben adaptarse a la particularidad de cada investigación y que indican el tipo de técnica e instrumentos para recolectar información. (Arteaga, 2011). Por lo tanto esta investigación adoptará un diseño mixto, es decir, un diseño de campo por lo que los datos se recolectarán directamente donde ocurre el fenómeno, y un diseño de laboratorio debido a que estos datos serán llevados en el Laboratorio B “Antonio Morales”, Instituto de Investigación así como también en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Lic. Luisa Vizcaya”, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Así mismo, también corresponde a un diseño transeccional ya que los datos que se recolectarán se realizarán en uno solo momento, en un tiempo único.

## **Población y muestra**

La población se define como el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones, es el conjunto finito (lo que se conoce) o infinito (lo que se desconoce) de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación, esta queda delimitada por el problema y por los objetivos del estudio. (Baptista, Fernández y Hernández, 2003).

Por otra parte, la muestra es un subgrupo de la población (Hernández y col., 2010). Por lo tanto, la población a estudiar es finita, integrada por la especie *Amaryllis belladonna*, que se recolectó en el estado Mérida, dicha especie se estudió en el Laboratorio B “Antonio Morales”, Instituto de Investigación e igualmente en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Lic. Luisa Vizcaya”, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes., desde Octubre de 2017 a Julio de 2019.

### ***Unidad de Investigación***

Está representada por las hojas de la especie *Amaryllis belladonna* conservadas en el laboratorio B “Antonio Morales”, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

### ***Selección del Tamaño de la Muestra***

La “n” muestral está representada por 100 gramos pulverizados de hojas de *Amaryllis belladonna*, además, se incluyen cepas de referencia internacional (ATCC) conservadas en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Lic. Luisa Vizcaya”, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

## **Instrumentos de Recolección de Datos**

El procedimiento para la recolección de información que se adapta al diseño del estudio, es la observación directa de los datos en el laboratorio, descrita como aquella que nos pone en contacto con los hechos, fenómenos y situaciones en el momento que acontecen y permite la búsqueda deliberada de datos necesarios para desarrollar el proceso investigativo. Se emplearan instrumentos tales como diarios de campo, libreta o cuaderno de notas, cámaras fotográficas o cámaras de video. (Arteaga, 2011).

## **Materiales y Métodos**

### **Recolección del material botánico e identificación taxonómica**

La especie *Amaryllis belladonna* fue recolectada durante el mes de mayo del 2018 en la localidad del Valle, Municipio Libertador del Estado Mérida, a una altitud de 2308 m s. n. m. (8°41'43" N -71°05'55" W). La muestra fue identificada por el Dr. Pablo Meléndez, una muestra testigo fue depositada en el Herbario "Dr. Luis Ruíz Terán" (**MERF**), de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. La misma reposa en el inventario botánico con el código **JR71**.

### **Preparación del material botánico**

El material botánico recolectado de la especie *Amaryllis belladonna* se sometió a un proceso para eliminación de impurezas y partes descompuestas de las hojas. Luego se seleccionó una muestra representativa destinada a la preparación del extracto metanólico.

### **Secado, molienda y pesada del material botánico**

El material botánico seleccionado de la especie *Amaryllis belladonna*, se secó en un horno eléctrico ubicado en el herbario **MERF**, a una temperatura no superior a 40°C, durante al menos 72 horas. Transcurrido

este tiempo, se verificó que 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 100 gramos, se colocó en un envase rotulado para ser utilizado en las diferentes pruebas.

### **Extracción por maceración del material botánico**

La muestra seca y molida de *Amaryllis belladonna*, luego de pesar una cantidad representativa, fue sometida a extracción sólido-líquido por maceración en frío, utilizando como solvente metanol, durante un periodo de 10 días divididos en dos ciclo de 5 días. El extracto metanólico obtenido se filtró por gravedad (Figura 20) y se concentró destilando el metanol a presión reducida, utilizando un rotavapor a una temperatura de 40°C. El producto seco se pesó (15 g) y se colocó en un envase de color ámbar, respectivamente rotulado y sellado (Figura 21), conservándose en un lugar seco y fresco.



**Figura 20:** Filtrado



**Figura 21:** Extracto

## 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 (Esquema 1). Los diferentes ensayos colorimétricos utilizados y reportados en la Tabla 3, permitieron identificar de forma cualitativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, antraquinonas, compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, glicósidos y glicósidos cardiotónicos, mucilagos, saponinas, taninos y triterpenos y esteroides. Es importante resaltar que para cada ensayo se toma una porción del extracto contenido en el envase ámbar y se trasvasa a los diferentes tubos de ensayo (Marcano y Hasegawa, 2002)

**Tabla 3:** Protocolo general aplicado en el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de *Amaryllis belladonna*

Metabolito	Ensayo	Procedimiento	Resultado
Alcaloides	<b>Wagner</b> (Solución de yodo- yoduro de sodio)	Se disuelve una porción del extracto en 2mL de HCl al 5%, se agitan en el vórtex, se filtran y se adiciona una gota de los reactivos correspondientes.	<b>Precipitado de color rojo pardo.</b>
	<b>Mayer</b> (Cloruro de mercurio, yoduro de potasio)		<b>Precipitado de color blanco o amarillento.</b>
	<b>Hager</b> (Solución saturada de ácido pícrico en agua)		<b>Precipitado color blanco.</b>
	<b>Dragendorff</b> (Nitrato de bismuto pentahidratado, yoduro de potasio)		<b>Precipitado color rojo o anaranjado.</b>
	<b>Reacción con amonio</b>	Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran y	<b>Color rojo (antraquinona)</b>

Antraquinonas	<b>Reacción con ácido sulfúrico</b>	se adiciona una gota de los reactivos correspondientes.	<b>Color rojo (quinona)</b>
	<b>Reacción de Borntrager</b> (Agua destilada, KOH 5%, cloroformo, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 6%)	Una pequeña porción del extracto se diluye en 3mL de agua destilada y luego se filtra, el líquido filtrado se le añade 3mL de KOH al 5%, se lleva a ebullición por 3min, se deja enfriar y se extraen 3mL de cloroformo. Se elimina la fase acuosa y a la fracción clorofórmica se le añade 2mL KOH al 5%.	<b>Color rojo, amarillo o verde (benzoquinona)</b> <b>Color rojo (derivado de antronas)</b>
	<b>Reacción con benceno</b> (Benceno y solución de amoniaco al 10%)	Una pequeña porción del extracto se agita con 1mL de benceno, se filtra y se adicionan 0,5mL de solución de amoniaco al 10%, y se agita nuevamente.	<b>Color rosa, rojo o violeta (antraquinonas)</b>
Compuestos fenólicos	<b>Prueba de FeCl<sub>3</sub></b> (Solución de NaCl 0,9% m/v y CH <sub>3</sub> COONa)	Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran. Se adicionan 3 gotas de acetato, se neutraliza con 3 gotas de la sal férrica en solución fisiológica.	<b>Color rojo, vino, verde o azul</b>
Cumarinas	<b>Reacción con hidróxido de amonio</b> (NH <sub>4</sub> OH concntrado)	Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran. Se adicionan 2 gotas de la base débil.	<b>Fluorescencia de color azul, verde o amarillo a una longitud de onda de 365nm.</b>
Flavonoides	<b>Reacción de Shinoda</b> (HCl concentrado y magnesio metálico)	Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran y se añade 2 gotas del ácido. Añadir virutas del metal.	<b>Color rojo (auronas o chalconas)</b> <b>Color anaranjado a rojo (flavonas).</b> <b>Color rojo (flavonoles).</b> <b>Color magenta (flavononas).</b>
	<b>Reacción de Pew's</b> (Polvo de zinc y HCl al 5N)	Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran y se añade gotas del ácido y una porción del polvo.	<b>Color rojo púrpura o rojo cereza (dihidroflavonas).</b> <b>Color rosa o café (Flavonas y dihidrochalconas).</b>

	<p><b>Reacción de Hidróxido de sodio</b> (NaOH 10%)</p> <p><b>2-aminoetildifenil - borato (2-AEDB)</b> (Solución de 2-AEDB al 2% de MeOH)</p>	<p>Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran y se añade 3 gotas de la base fuerte.</p> <p>Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran. Aplicar la muestra en una placa cromatográfica y revelar con el reactivo.</p>	<p><b>Color amarillo a rojo (xantonas y flavonas).</b> <b>Color café a púrpura rojizo (chalconas).</b> <b>Color azul (antocianinas).</b></p> <p><b>Mancha de color amarillo con fluorescencia intensa a 365nm.</b></p>
<b>Glicósidos y glicósidos cardiotónicos</b>	<p><b>Reacción con NaOH</b> (al 2N)</p> <p><b>Reacción de keller-killiani</b> (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, CH<sub>3</sub>COOH glacial y FeCl<sub>3</sub>)</p> <p><b>Reacción de Legal</b></p>	<p>Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran y se añade 5 gotas de la base.</p> <p>Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran. Adicionar el reactivo con 5 gotas del ácido fuerte.</p> <p>Se disuelve una porción del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran. Agregar 3 gotas de la base débil, una gota de la solución de sal y 3 gotas de la base fuerte.</p>	<p><b>Color amarillo (glicósidos).</b></p> <p><b>Interfase de color marrón (azúcares 2-desoxigenados).</b></p> <p><b>Color amarillo (cardenolidos o lactonas <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-insaturadas)</b></p>
<b>Mucilagos</b>	<p><b>Enfriamiento a 0-5°C</b> (agua destilada)</p>	<p>Se disuelve una porción del extracto en 2mL de agua, se agitan en el vórtex, se filtran. Someter a enfriamiento de 0-5°C.</p>	<p><b>Consistencia gelatinosa (mucilagos).</b></p>
<b>Saponinas</b>	<p><b>Prueba de la altura de la espuma</b> (agua destilada)</p> <p><b>Prueba de bicarbonato de sodio</b> (NaHCO<sub>3</sub>)</p>	<p>Se disuelve una porción del extracto en 2mL de agua, se agitan en el vórtex, se filtran. El extracto acuoso se agita vigorosamente y se medirá la altura de la espuma.</p> <p>Se disuelve una porción del extracto en 50mL de agua, se agitan en el vórtex, se filtran. Añadir gotas de la sal y agitar vigorosamente durante 3min.</p>	<p><b>Altura de la espuma entre 8-10mm estable por 30 min.</b></p> <p><b>La formación de espuma en forma de panal de abeja (saponinas).</b></p>
		<p>Se disuelve 100mgr del extracto en 10mL de etanol y se agita durante 5min. Luego se realiza</p>	

<b>Taninos</b>		una extracción con 25mL de agua destilada, la solución resultante se calienta hasta ebullición durante 15min. Se le adiciona 0,2mL de NaCl al 10% y se filtra. Se rotulan 5 tubos de ensayo y se le adiciona 3mL del filtrado a cada uno.	
	<b>Control</b> (agua destilada, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH y NaCl)	Tubo 1: Control.	<b>Sin reacción.</b>
	<b>Gelatina al 1%</b>	Tubo 2: agregar 5 gotas de solución de gelatina.	<b>Precipitado de color blanco (taninos).</b>
	<b>Gelatina al 1% - sal 10% (NaCl)</b>	Tubo 3: agregar 5 gotas de solución salina en gelatina.	<b>Precipitado de color blanco (taninos).</b>
	<b>Tricloruro férrico 10%</b>	Tubo 4: agregar 3 gotas de la solución de la sal férrica.	<b>Color rojo-vino (compuestos fenólicos). Color verde intenso (taninos pirocatecólicos). Color azul (taninos pirogalatánicos).</b>
	<b>Ferricianuro de potasio</b> (K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 1%)	Tubo 5: agregar 1 gota de la sal cuaternaria.	<b>Color azul (fenólicos).</b>
<b>Triterpenoides y esteroides</b>		Se disuelve 3 porciones del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran.	
	<b>Reacción de Lieberman Bouchard</b> (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado, CH <sub>3</sub> COOH glacial)	Añadir 2 gotas del ácido débil y esterificar con 2 gotas del ácido fuerte.	<b>Interfase de color azul o verde (esteroide). Color amarillo anaranjado (triterpenoides).</b>
	<b>Reacción de Rosenthaler Vainillina</b> (Vainillina y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado) Triterpenoides	Añadir 2 gotas del reactivo con 2 gotas de ácido fuerte.	<b>Interfase de color violeta (triterpenoides).</b>

<p><b>Prueba de Salkowskis</b> (esteroides) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado)</p>	<p>Se disuelve 3 porciones del extracto en 2mL de CHCl<sub>3</sub>, se agitan en el vórtex, se filtran. Adicionar lentamente 2mL del ácido fuerte.</p>	<p><b>Interfase de color marrón rojizo (anillo esteroideo).</b></p>
<p><b>Prueba de Komarowsky</b> (A: 25mL de 4-hidroxibenzaldehído en CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH al 2% B: 5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH 1:1)</p>	<p>Se disuelve 3 porciones del extracto en 2mL de metanol, se agitan en el vórtex, se filtran. Aplicar la muestra en una placa cromatográfica. Eluir con una mezcla cloroformo metanol y agua (70:30:5). Revelar con el reactivo.</p>	<p><b>Mancha de color rojo (triterpenos).</b></p> <p><b>Mancha de color verde (esteroides).</b></p>

(Torres, Moreno, Buitrago y Rojas, 2019)

### Método de difusión en agar con discos de papel

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Prof<sup>a</sup>. Luisa Vizcaya”, del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo; empleando el método de difusión en agar con discos de papel (Esquema 2). Para el ensayo se utilizaron (Tabla 4) las bacterias de referencia internacional con sus respectivos antibióticos de referencia.

**Tabla 4:** Microorganismos y antibióticos de referencia utilizados en las pruebas de susceptibilidad.

MICROORGANISMOS	ANTIBIÓTICOS DE REFERENCIA
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	Vancomicina (30 µg HIMEDIA®)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Trimetoprim-Sulfametoazol® (23,7/1,25 µg)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Gentamicina® (10 µg)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	Aztreonam® (30 µg)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Cefepima® (30 µg)

El método permitió medir la susceptibilidad *in vitro* de las bacterias frente a una sustancia o mezcla de sustancias de origen vegetal (Sánchez, 2010). 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®) (Figuras 22 y 23) 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.



**Figura 22:** Medio de cultivo.

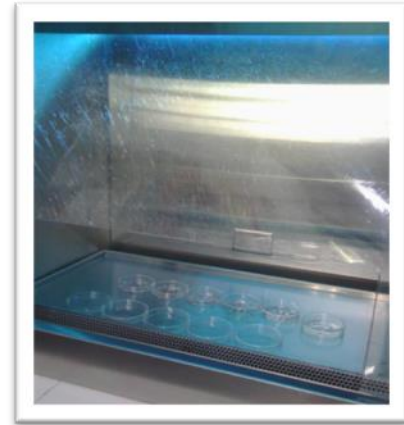


**Figura 23:** Preparación del medio de cultivo.

**Preparación de los discos:** los discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, se impregnaron con 20  $\mu$ L del extracto, los cuales fueron preparados con el solvente de extracción (metanol) a la concentración de 500 mg/mL. Luego se colocaron en placas de Petri (Figura 24) y esterilizaron bajo luz UV, durante 90 minutos previo al ensayo (Figura 25).

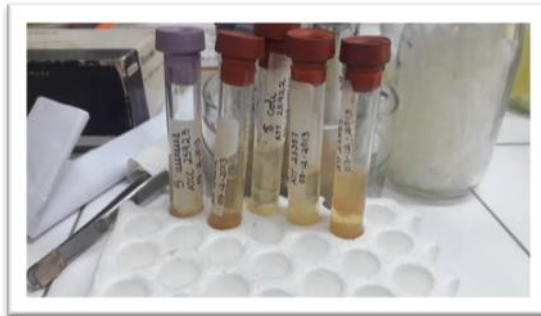


**Figura 24:** Discos en las placas de Petri.



**Figura 25:** Esterilización en lámpara UV.

**Reactivación de los microorganismos:** las bacterias se mantuvieron en medio de conservación (agar semiconservación semisólido) a temperatura ambiente (Weng-Aléman y col., 2003), a partir de este medio se reactivaron las cepas y se verificó su pureza (Figura 26).



**Figura 26:** Bacterias en agar semiconservación.

**Preparación de 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 0.5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) para las cepas bacterianas (Figuras 27 y 28).



**Figura 27:** Preparación del inóculo.



**Figura 28:** Preparación del inóculo.

**Siembra:** los inóculos de cada microorganismo, se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril (Figura 29). Seguidamente se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro impregnados con la muestra solvente (control negativo) y compuestos de referencia para cada microorganismo (control positivo).



**Figura 29:** Inoculación de placas.

**Preincubación e Incubación:** con el propósito de permitir que los componentes presentes en los extractos difundan sobre el agar inoculado, se realizó una preincubación durante 18 h a una temperatura de 4°C (Figura

30). Por otra parte, el crecimiento bacteriano se llevó a cabo incubando las placas en una estufa a una temperatura de 37 °C durante 48 h (Figura 31).

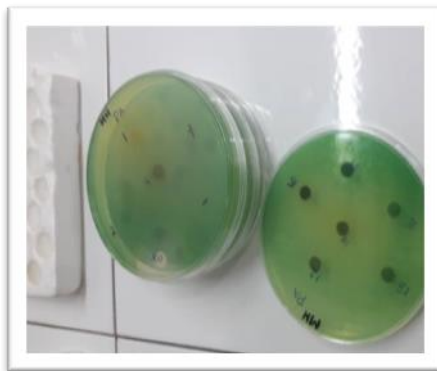


**Figura 30:** Preincubación a 4°C

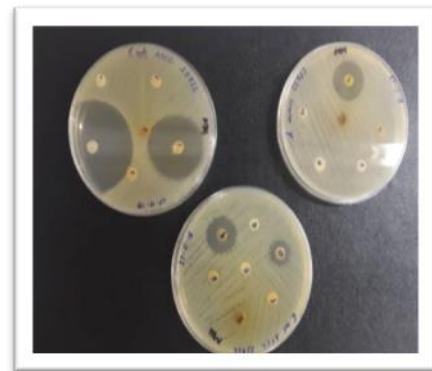


**Figura 31:** Incubación a 37°C.

**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 mm. La prueba se consideró negativa cuando se observó crecimiento bacteriano alrededor de los discos (Figuras 32 y 33).



**Figura 32:** Lectura de halos de inhibición.



**Figura 33:** Lectura de halos de inhibición.

**Determinación de la CIM:** se determinó en aquellos microorganismos que mostraron susceptibilidad al extracto. Para determinar la CIM se prepararon diluciones a diferentes grados de concentración (Figura 34), el control

negativo utilizado fue el DMSO, luego se impregnaron los discos de papel de filtro con 20  $\mu$ L de cada dilución y se aplicó el procedimiento antes descrito, el cual, permitió determinar la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (Figura 35). (CLSI, 2018)



**Figura 34:** Diluciones del extracto.



**Figura 35:** Determinación de CIM.

www.bdigital.ula.ve

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en la especie *Amaryllis belladonna*

##### Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de *Amaryllis belladonna* (**Ab**) permitió cualificar la presencia de algunos metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, antraquinonas, compuestos fenólicos, cumarinas, flavonoides, glicósidos y glicósidos cardiotónicos, mucílagos, saponinas, taninos, triterpenoides y esteroides (Tabla 5). Los resultados muestran una alta concentración de flavonoides, saponinas, taninos, triterpenoides y esteroides en dicha especie, así como, en cantidades moderadas antraquinonas, compuestos fenólicos, glicósidos y glicósidos cardiotónicos.

**Tabla 5:** Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de *Amaryllis belladonna*

Metabolitos secundarios	Ensayo	Ab
Alcaloides	Wagner	+
	Dragendorff	+
Antraquinonas	NH <sub>4</sub> OH Conc.	++
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Conc.	+
Compuestos Fenólicos	FeCl <sub>3</sub> 5 %	++
Cumarinas	NH <sub>4</sub> OH Conc.	+
Flavonoides	Pew's	+++
	NaOH 10 %	+
Glicósidos y glicósidos cardiotónicos	NaOH Conc.	++
	Keller Killiani	+
Mucílagos	Enfriamiento 5 °C	-
Saponinas	Altura de espuma	+++
	NaHCO <sub>3</sub>	+++
Taninos	FeCl <sub>3</sub> 10 %	+++
Triterpenoides Esteroides	Reacción Lieberman	+++
	Reacción Rosenthaler	++
	Prueba Salkowsky	++

**Ab:** *Amaryllis belladonna*. Ausente (-), Baja (+), Moderada (++), Alta (+++).

En relación a lo expuesto anteriormente en la Tabla 5, se logró apreciar que en el extracto obtenido a partir de las hojas de **Ab** existe una presencia-abundante de saponinas, confirmadas por el ensayo de la altura de espuma y la prueba de bicarbonato de sodio. . Por otra parte, la reacción de Pew's demostró una alta concentración de flavonoides, sin embargo con la prueba de hidróxido de sodio la presencia fue moderada; dicha discrepancia en los resultados es posible asociarlo a los diferentes sustituyentes presentes en estos tipos de compuestos. En cuanto a la prueba de tricloruro férrico al 10 %, se estableció una elevada concentración de taninos para el extracto en estudio.

Por otra parte, se observó una abundante proporción de triterpenoides y esteroides con la reacción de Lieberman Bouchard, sin embargo los resultados obtenidos para las reacciones de Rosenthaler y Salkowski indican cantidades moderadas para este núcleo. La prueba para la sal férrica al 5 % reveló moderadas concentraciones de compuestos fenólicos. Así mismo, se encontraron en cantidades de moderada a baja las antraquinonas, glicósidos y glicósidos cardiotónicos (Figura 36).

Finalmente, se comprobó la existencia en bajas concentraciones de alcaloides y cumarinas la ausencia de mucilagos cuando se colocó la solución bajo refrigeración a 5 °C.

En virtud de lo antes mencionado, algunas investigaciones han reportado principalmente la presencia de metabolitos secundarios de tipo alcaloides, flavonoides, taninos, fenoles, glicósidos, terpenoides entre otros; en la especie antes mencionada (Bastida y col., 2017; Faizan y col., 2017; Abou-Donia y col., 2004). Por otra parte, de *A. belladonna* se han aislado diferentes estructuras del tipo alcaloidal (Bastida y col., 2017; Faizan y col., 2017; Abou-Donia y col., 2004), así como también, se han logrado aislar algunos flavonoides, compuestos fenólicos y taninos (Faizan y col., 2017).

## Actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de la especie *Amaryllis belladonna*

La actividad antibacteriana se determinó utilizando el método modificado de difusión en agar con discos de papel, descrito por Velasco y col., (2005); el cual permitió establecer la acción del extracto metanólico de **Ab**, contra las bacterias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* (**ATCC 19433**), *Staphylococcus aureus* (**ATCC 25923**), y Gram-negativas *Escherichia coli* (**ATCC 25922**), *Klebsiella pneumoniae* (**ATCC 25955**) y *Pseudomonas aeruginosa* (**ATCC 27853**). De igual manera, se estableció la (**CIM**) para el extracto activo contra las diferentes cepas ensayadas.

Los resultados que se presentan en la Tabla 6, indican que el extracto **Ab** presento actividad solo contra la bacteria Gram-positiva *S. aureus*, con un diámetro de inhibición equivalente a 7 mm, de igual manera, se determinó en 320mg/mL el valor de **CIM** luego de sucesivas diluciones con **DMSO**; para este ensayo se utilizó como fármaco de referencia el Trimetoprim-Sulfametoaxol®. Por otra parte, el estudio no proporcionó un efecto de inhibición contra el crecimiento de las cepas *E. faecalis*, *E.coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

**Tabla 6:** Actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Amaryllis belladonna*

Microorganismos	Ab	Zona de inhibición (mm)*					CIM (µg/ mL)
		Antibióticos					
		TP	VA	GM	AZ	CE	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	7*	40*					320
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	NA		26*				NE
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	NA			34*			NE
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA				42*		NE
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA					38*	NE

**Ab:** extracto metanólico *A. belladonna*; **TP:** Trimetoprim-Sulfametoaxol® (23,7/1,25 µg), **VA:** Vancomicina® (30 µg), **GM:** Gentamicina® (10 µg), **AZ:** Aztreonam® (30 µg), **CE:** Cefepima® (30 µg), **CIM:** concentración mínima inhibitoria; **NA:** no activo; **NE:** no ensayado; \*mm: de los halos de inhibición (disco de 6 mm de diámetro)/ promedio 2 ensayos

Los resultados alcanzados en el estudio de sensibilidad *In vitro* con el extracto metanólico de *Amaryllis belladonna*, permitió establecer sus potencialidades como una posible alternativa a las enfermedades infecciosas, afirmación que se relaciona con las investigaciones reportadas hasta ahora en la literatura.

En tal sentido, el estudio antibacteriano realizado por Faizan y col., 2017, para el extracto en metanol obtenido de las flores de *A. belladonna* mostraron una elevada capacidad inhibitoria contra *M. luteus* (6 mm) y *S. aureus* (5 mm) a una **CIM** de 15 mg/mL. Por su parte, para las bacterias *M. luteus* (5 mm) y *S. aureus* (4,5 mm) obtuvieron a una **CIM** de 7,5 mg/mL.

Otro estudio antimicrobiano realizado por Abou-Donia y col., en 2004 llevado a cabo en la ciudad de Alejandría-Egipto, lograron aislar algunos alcaloides que fueron ensayados contra algunas cepas antibacteriana. Para el caso de los compuestos amarbellisina (22 mm; **CIM**: 125 µg/mL), pancracina (22 mm; **CIM**: 188 µg/mL), vittatina (19 mm; **CIM**: 63 µg/mL) y 11-hidroxivittatina (17 mm; **CIM**: 219 µg/mL) presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, los compuestos vittatina y pancracina mostraron un mínimo efecto contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

En base a las consideraciones antes descritas, es importante destacar la excelente actividad obtenida en nuestro estudio contra la bacteria *Staphylococcus aureus* (**CIM**: 320 mg/mL), comportamiento posiblemente atribuido a algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico, los cuales pueden actuar a través de varios mecanismos, a saber: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, alteración de la membrana citoplasmática, bloqueo de la síntesis de los factores metabólicos, inhibición de la síntesis de proteínas, entre otras. (Bakht y col., 2015; Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

#### CONCLUSIONES

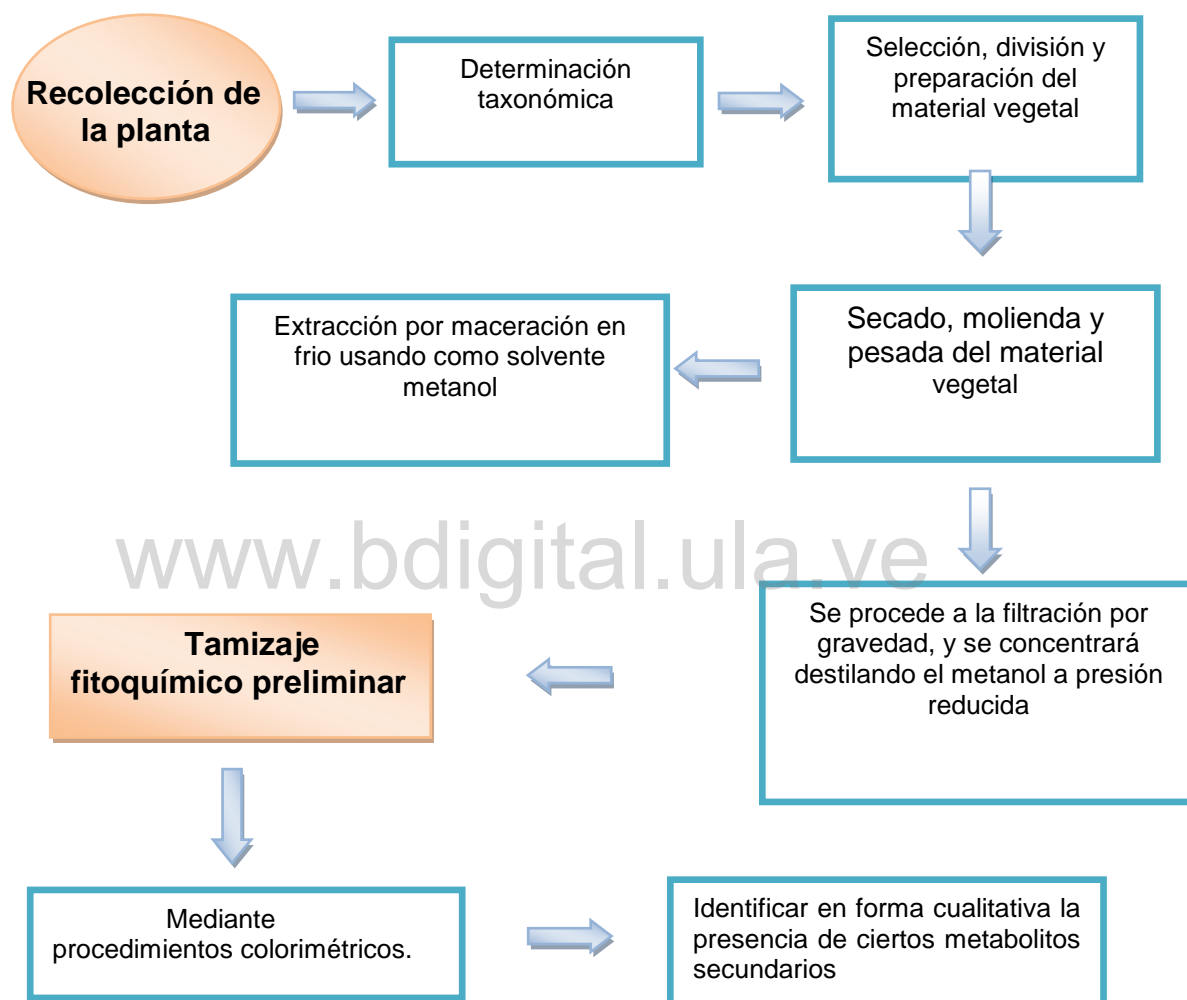
- En el extracto metanólico de **Ab** se evidenció la presencia de diversos metabolitos secundarios; en ese sentido, se encontraron en elevadas proporciones saponinas, flavonoides, taninos y triterpenoides
- Por otra parte, se hallaron de moderadas a bajas concentraciones de compuestos fenólicos, antraquinonas, glicósidos y glicósidos cardiotónicos mientras que en menor concentración fueron encontrados los alcaloides y cumarinas. De igual manera, se comprobó la ausencia de mucilagos.
- Con relación al ensayo antibacteriano, se estableció como **CIM** 320 mg/mL para la bacteria *Staphylococcus aureus*. Así mismo, no hubo un efecto sobre el crecimiento de las bacterias *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*

#### RECOMENDACIONES

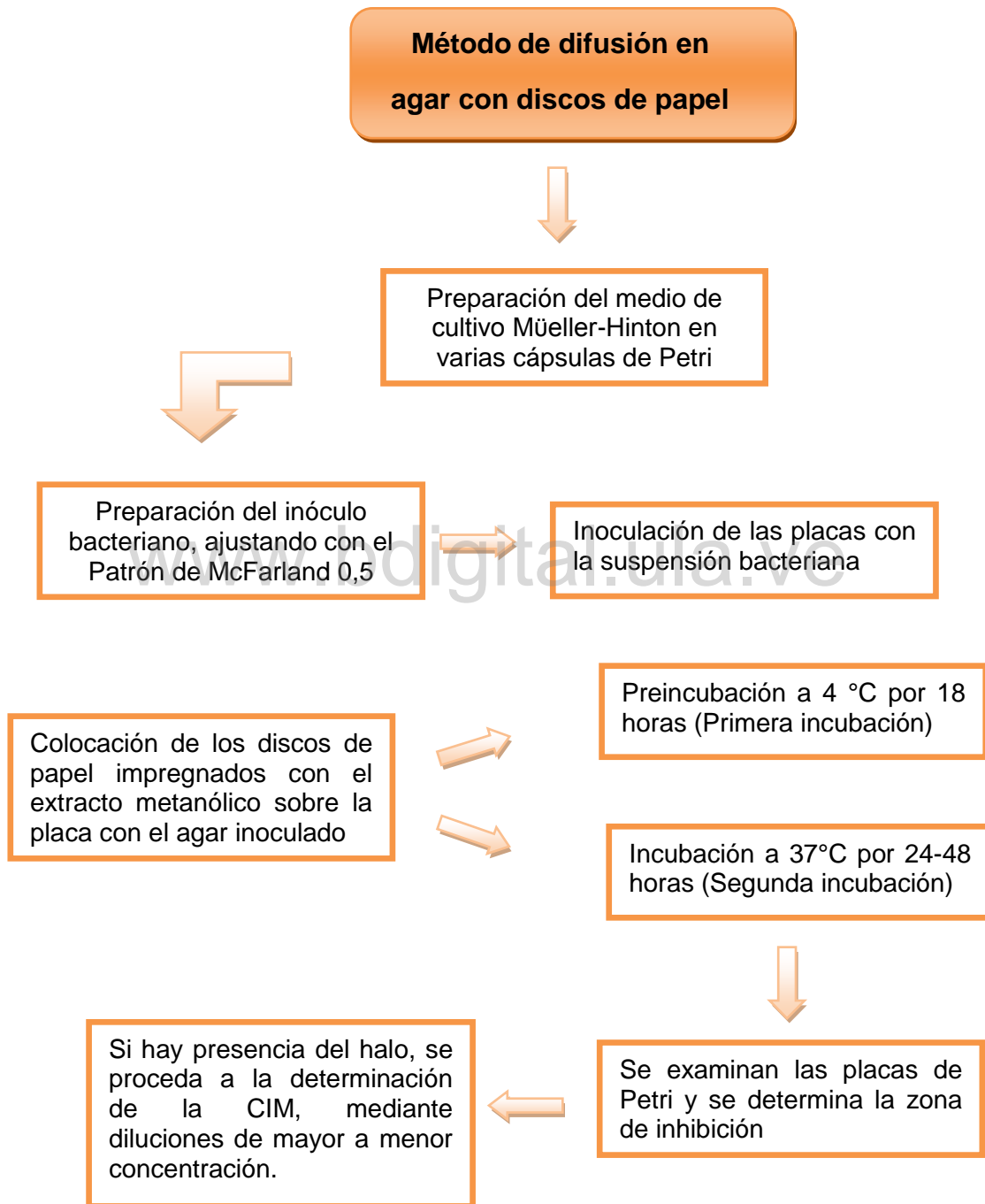
- Realizar un fraccionamiento del extracto metanólico utilizando la serie eluotrópica de solventes; para luego separar e identificar los diferentes metabolitos secundarios presentes en la especie *A. belladonna* recolectada en el estado Mérida.
- Ensayar el extracto metanólico contra otras cepas bacterianas de referencia internacional.
- Estudiar el efecto *in vivo* del extracto metanólico sobre ciertas muestras clínicas, para verificar su potencial antibacteriano.

## ANEXOS

**Esquema 1:** Procedimiento general realizado en el tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de *Amaryllis belladonna*



**Esquema 2:** Procedimiento general realizado en el ensayo microbiológico del extracto metanólico de las hojas de *Amaryllis belladonna*



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou-Donia, A., Andolfi, A., Evidente, A., Hammoda, H., Motta, A., Shawky, E, y Touema, S., (2004). *Amarbellisina, un alcaloide de tipo licoquina de Amaryllis belladonna L. que crece en Egipto*. **Phytochemistry**. 65 (14), 2113-8
- Albornoz, A., (1980). *Productos Naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Universidad Central de Venezuela, Caracas: Editorial Impresos Urbina, C.A. 22-26
- Araque, M., Gonzales F y Hernández, F., (2007). *Composición química y análisis comparativos de dos métodos de difusión para evaluar la actividad antibacteriana del aceite proveniente de Montanoa quadrangularis Sch. Bip. Ex C. Koch*. XXXI Jornadas Venezolanas de Microbiología “Dr. Sócrates Medina y Dra. Elba Aracelis Padrón”, 5 al 17 de Noviembre 2007, Ciudad Bolívar, Venezuela.
- Arteaga de M, P., (2011). *Metodología de la investigación I y II*. (11va. Edición). Mérida, Venezuela: FUNDESAPUB. 10-15
- Bakht y col., (2015). *Antimicrobial and anti-oxidant potential of Periploca hydaspidis*. **Bangladesh Journal of Pharmacology** 10(3):645
- Baptista, P., Fernández, C., Hernández, R., (2003). *Metodología de la investigación*. México: McGraw-Hill Interamericana S.A. 108-115
- Bastida, J., Belén N., Berkov, S., Codina, De Andrade, J., Martínez, V., Torras, L. y Viladomat, F. (2011). *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids*. **Transworld Research Network**, 37 (2) 661.
- Bastida, J., de Andrade, J., Kaiser, M., Nair, J., Tallini, L., Viladomat, K y Zuanazzi, A. (2017). *Constituyentes alcaloides de la planta*

*Amaryllidaceae Amaryllis belladonna*. **Revista Moleculas**, 22 (1437), 1-12.

Becton, Company and Dickinson. (2005). **Patrón de turbidez BBL preparado**. Tercera edición, Editorial McGraw-hill-USA.

Bruneton, J., (2001). **Farmacognosia Fitoquímica plantas medicinales**. (2da edición). Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.

Calvo, J y Martinez, L., (2009). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. **Dialnet**, 27 (1), 44-52

CLSI. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Díaz S., Palá J., Usano J., (2014). *Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana*. **Revista Reduca (Biología)**, 7 (2), 35-40.

Divinorum, S. (2013). **Breve Historia de las Plantas Medicinales**. Editorial Randon. México.

Dominguez, X., (1973). **Métodos de Investigación Fitoquímica**. México:Limusa.

Escamilla, B., Moreno, P. (2015). **Plantas Medicinales de La Matamba y El Piñonal, Municipio de Jamapa, Veracruz**. Primera Edición. Xalapa, Veracruz, México.

Faizan U, Hafiz K, Iqbal, Rasheed y Ullah K, (2017). *Evaluacion in vitro del perfil fitoquimico y el potencial farmacologia del colorante natural, extraído de las flores de amaryllis belladonna*. **ResearchGate**, 7 (2), 29-35.

Fonnegra, R., Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Revista Udea, segunda edición.

- Fretes, F., (2010). *Plantas medicinales y aromáticas una alternativa de producción comercial*. Paraguay. **USAID**. Pp 7-10
- Garcia, E., (2010). ***Manual práctico de bacteriología general***. Primera Edición. Mérida, Venezuela: Publicaciones Vicerrectorado Académico.
- Hernández, S y col. (2010). ***Metodología de la investigación***. 5ta edición. México: Editorial McGraw-Hill.
- Hurtado, J. (2010). ***El proyecto de investigación. Comprensión holística de la Metodología de la investigación***. 6<sup>ta</sup> Edición. Caracas, Bogotá: Ediciones Quirón.
- Izco, J., et al, (2004). ***Botánica***, Segunda Edición. España: McGraw- Hill- Interamericana.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). ***Fitoquímica orgánica***. Caracas, Venezuela: Ediciones Vicerrectorado Académico UVC.
- Martínez, A. (2003). ***Aceites Esenciales***. Universidad de Antioquia. Revista Udea. Pp 1-33
- Murray, P y col., (2009). ***Microbiología Médica***. Sexta Edición. Barcelona España. Editorial Elsevier. 235-450
- Organización Mundial de la Salud. (20 de Noviembre 2017). *La resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>.
- Palacios, M., (2008). ***Farmacognosia***. Universidad católica “los ángeles de chimbote” escuela de farmacia y bioquímica. 23-27
- Pérez, A. (2009). ***Guía Metodológica para Anteproyectos de Investigación***. 3ra. Ed. Caracas, Venezuela: FEDUPEL. 54-67
- Sánchez, K., (2010). ***Manual práctico de bacteriología general***. Primera Edición. Mérida, Venezuela: Publicaciones Vicerrectorado Académico.

- Shahidi y Nazk, (1995). *Food Fenolics*, sources, chemistry, effects, application. Technomic Publishing. Co. Inc. Pensilvania. EE.EE. 105-108.
- Sharapin, N., (2000). ***Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos***. Primera Edición. Santafe, Bogotá, Colombia: Quebecor- Impreandes.
- Sherwood, L., Willey J, Woolverton C. (2009) ***Microbiología de Prescott***. 7ma edición, Madrid: editorial Mc Graw Hill..
- Triantafilo, V., (2002). *Evaluación e indicación de las técnicas de difusión-dilución (epsilometría)*. **Revista Chil Infect** 19 (2), 85-87.
- Tropicos org. (Estados Unidos). ***Missouri Botanical Garden*** [en línea]: catálogo automatizado. [Saint Louis]: Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Home.aspx> [Consulta: 28 de abril de 2017]
- Ustundag, G., y Mazza, G. (2007). *Saponins: Properties, applications and processing*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 47(3), 231–258.
- Veeraballi, T., (2014). ***In vitro propagation studies in Amaryllis belladonna L.*** Tesis de máster de ciencia en horticultura. Colegio de horticultura Mandsaur (M.P.)
- Winn, Allen, Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger y Woods. *Enterobacteriaceae*. (2008). Koneman Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en color. 6a ed. Madrid: Editorial médica Panamericana, pp. 204-288.