



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LOS
BULBOS DE *Crinum amabile* EN CEPAS DE REFERENCIA
INTERNACIONAL

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Márquez Yaribay.

C.I. V-19.670.340

Rojas Yexi.

C.I.V-23.497.239

Tutor:

Dr. Alexis Buitrago

Co-tutor:

PhD. Janne Rojas

Mérida, febrero 2020



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LOS
BULBOS DE *Crinum amabile* EN CEPAS DE REFERENCIA
INTERNACIONAL**

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

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Márquez Yaribay

C.I. V-19.670.340

Rojas Yexi

C.I.V-23.497.239

Tutor:

Dr. Alexis Buitrago

Co-tutor:

PhD. Janne Rojas

DEDICATORIA

La vida puede parecer corta pero también es lo suficientemente larga como para que podamos hacer que pasen cosas grandiosas. Aquí está el fruto de nuestro esfuerzo en los que muchos creyeron que fuese posible, hoy queremos dedicarle este logro que con gran esfuerzo cumplimos, a personas que consideramos claves en nuestras vidas.

A Dios principalmente, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres Marisol y José quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer a las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mis hermanos Deibis, Sofía, Yenifer por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A mi sobrina hermosa Vanessa Sophía por estar con nosotros y alegrarnos la vida, cada día te amamos más.

A toda mi familia y amigos porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A ti Luis, por tus consejos y apoyo incondicional en cada momento y por siempre creer en mí.

A la ilustre Universidad de los Andes y a todas esas personas que fueron clave en mi formación profesional.

Yaribay Márquez

A Dios, primeramente, por darnos vida y salud y guiarnos por el camino para llegar al éxito y alcanzar este logro tan anhelado, por llenarnos de fe en los momentos difíciles, sin el nada hubiese sido posible.

A nuestra madre, Nelly, por ser el motor principal en este camino desde el principio, por apoyarme en cada momento de tristezas, alegrías y triunfos recorridos durante este tiempo. Sin duda alguna eres parte de mi inspiración para luchar día a día por nuestro sueño, que hoy se convierte en realidad.

A mi hija Arantza Victoria, que fue parte de mi recorrido y de lucha, además que se convirtió en mi mayor inspiración para seguir día a día con todas las labores para alcanzar tan anhelada meta.

A personas especiales, Victor, Coromoto, Yanitza, quienes fueron apoyo de motivación en este recorrido, por impulsarnos de manera positiva y ser esa mano amiga cuando los necesitaba.

A la ilustre Universidad de los Andes y a todas esas personas que fueron clave en mi formación profesional

Yexi Rojas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser la luz incondicional que ha guiado mi camino.

A mi familia, por haberme dado la oportunidad de formarme en esta prestigiosa universidad y haber sido mi apoyo durante todo este tiempo.

A mis padres quienes son mi motor y mi mayor inspiración, que, a través de su amor, paciencia, ayudan a trazar mi camino.

Y por supuesto a mi querida Universidad y a todas las autoridades, por permitirme concluir con una etapa de mi vida, gracias por la paciencia, orientación y guiarme en el desarrollo de esta investigación.

De manera especial a mi tutor de tesis, por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo, sino a lo largo de mi carrera universitaria y haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente y seguir cultivando mis valores.

A las profesoras Yudith Velazco y Janne Rojas, quienes fueron parte de este proyecto aportando sus conocimientos.

A nuestros amigos que de una u otra manera nos brindaron su colaboración y apoyo en este proyecto.

Gracias.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA -----	iii
AGRADECIMIENTOS -----	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO -----	v
ÍNDICE DE TABLAS -----	viii
ÍNDICE DE FIGURAS -----	viii
RESUMEN -----	ix
INTRODUCCIÓN -----	1
CAPÍTULO I EL PROBLEMA -----	3
Justificación -----	5
Objetivo General-----	7
Objetivos Específicos-----	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación-----	8
Alcances de la Investigación-----	8
Limitaciones de la investigación-----	8
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO -----	9
Trabajos Previos-----	9
Antecedentes Históricos-----	12
Bases Teóricas-----	14
Aspectos taxonómicos de la familia Amaryllidaceae-----	14
Familia Amaryllidaceae-----	14
Características botánicas de la familia Amaryllidaceae----	15
Género <i>Crinum</i> -----	16
Descripción botánica del género <i>Crinum</i> -----	17
Generalidades metabolitos secundarios-----	18
Metabolito secundario-----	19
Extracto-----	22
Extractos en plantas-----	23
Preparación de los extractos-----	23
Métodos extractivos para las plantas medicinales-----	24

Características generales de las bacterias -----	26
Bacterias-----	26
Bacterias Gram positivas-----	27
Bacterias Gram negativas-----	27
Técnicas diferenciales de tinción utilizadas para identificar las bacterias. -----	28
Actividad antimicrobiana-----	29
Microorganismos utilizados en el estudio-----	29
<i>Staphylococcus aureus</i> -----	29
<i>Enterococcus faecalis</i> -----	30
<i>Escherichia coli</i> -----	30
<i>Klebsiella pneumoniae</i> -----	31
<i>Candida albicans</i> -----	31
<i>Candida krusei</i> -----	32
Enfermedades causadas por las cepas bacterianas usadas en el presente estudio-----	32
Antibióticos-----	34
Clasificación de agentes antibacterianos-----	35
Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular-----	35
Antibióticos que dañan la membrana citoplasmática-----	36
Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos---	36
Antibióticos que inhiben la función ribosomal-----	36
Antibióticos inhibidores de beta-lactamasas-----	37
Resistencia bacteriana-----	37
Resistencia natural-----	38
Resistencia adquirida-----	38
Resistencia cromosómica-----	38
Resistencia extracromosómica-----	39
Técnicas para determinar la actividad antibacteriana-----	40
Métodos para determinar la actividad antimicrobiana en extractos-----	41

Definición operacional de términos-----	44
Hipótesis-----	45
Hipótesis Alternativa (Ha)-----	45
CAPÍTULO III MARCO METODOLÓGICO-----	46
Enfoque de la Investigación-----	46
Tipo de Investigación-----	46
Diseño de la Investigación-----	47
Población y muestra-----	48
Sistema de variable-----	49
Materiales y Métodos-----	49
Actividad antimicrobiana: -----	57
Diseño de análisis-----	60
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	61
1. Determinación Fitoquímico del Extracto-----	61
2. Determinación Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de <i>Crinum amabile</i> -----	64
CONCLUSIONES-----	67
Recomendaciones -----	68
BIBLIOHEMEROGRAFIA -----	69
ANEXOS-----	77

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Preparacion del Material Vegetal-----	25
Tabla 2. Procedimiento para el Tamizaje fitoquímico en los extractos de <i>Crinum amabile</i> -----	52
Tabla 3. Tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de <i>Crinum amabile</i> -----	63
Tabla 4: Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de <i>Crinum amabile</i> -----	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Especie vegetal <i>Crinum amabile</i> -----	17
Figura 2: Membrana Celular de las Bacterias -----	28
Figura 3: Impregnación de los discos con los extractos -----	77
Figura 4: Incubación de Discos -----	77
Figura 5: Preparacion de los inoculo -----	
Figura 6: Se colocan en la superficie del agar inoculado, los discos previamente impregnados con el extracto -----	77 78
Figura 7: Preicuban los medios de cultivo durante 18 h a 4 °C -----	78
Figura 8: Incuban los medios37 °C durante 24 a 48 h-----	78
Figura 9: Lecturas de los halos de inhibición a las 24 y 48 h -----	79

RESUMEN

En el presente estudio se describe la extracción, análisis y determinación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Crinum amabile*. De esta manera, el estudio fitoquímico y farmacológico han revelado que este género presenta actividad antibacteriana y antifúngica. La especie fue recolectada en La Mucuy baja, Municipio Santos Marquina del Estado Mérida, ubicado a 1898 m s. n. m. para posteriormente ser llevada a la facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Para la obtención del extracto de *Crinum amabile* se sometió a extracción por maceración en frío, usando como solvente metanol, y con la muestra resultante se realizó un tamizaje Fitoquímico para determinar la presencia de algunos compuestos de tipo: alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, taninos, mucilagos. Además, se determinó la actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia internacional: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudónomas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Candida albicans* (CDC-B385), *Candida krusei* (ATCC 6258), en el cual cinco cepas presentaron resistencia y solo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); por el contrario, arrojó sensibilidad frente al extracto.

Palabras claves: actividad antimicrobiana, bulbos de *Crinum amabile*, extracto metanólico, tamizaje Fitoquímico.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales es todo aquel vegetal que tiene la propiedad de contribuir a la recuperación o mejora del estado de salud de un individuo con algún tipo de enfermedad. El uso de estas sustancias se conoce ya desde la antigüedad de hecho, aunque el uso de plantas medicinales parece algo del pasado, según la OMS el porcentaje de población que utiliza algún tipo de hierba medicinal es bastante elevada (White y Staff ,2004).

Hasta el siglo XVIII se conocieron las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y su modo de aplicación desconociendo en muchos de los casos la composición y caracterización de principios activos. Con el desarrollo de las teorías de la evolución, herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de ciencias como la fitoquímica, fue posible el reconocimiento y aislamiento de principios activos de muchas especies vegetales (Lizcano L, et al 2015). Además de esto, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (avalos y Pérez ,2009).

En los últimos años se han realizado investigaciones dirigidas a buscar nuevas terapias antimicrobianas, como opción alternativa a los tratamientos con antibióticos conocidos, debido a la alta tasa de resistencia que presentan los patógenos microbianos en todo el mundo, ya que este importante problema de salud pública involucra a todos los países a nivel

mundial debido a su impacto en la salud, como en el costo-beneficio que implica tratar ciertas patologías (Pava, Sanabria y Leal, 2017).

El género *Crinum* es utilizado como plantas decorativas y ornamentales, también tienen grandes utilidades en el mundo de la medicina; ya que de muchas de sus especies han proporcionado compuestos químicos con efectos anti cancerígenos, antivirales (Mederos, 2019). Por lo que actualmente la especie *Crinum amabile* es objeto de estudio ya que existe el interés de evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico en cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Las plantas medicinales, actualmente son utilizadas por al menos el 80 % de la población Mundial para el cuidado de la salud (O M S), con una tendencia creciente en los países industrializados. Este significativo aumento en la utilización de los vegetales, constituyen una importante alternativa terapéutica, obedece no solo a los cambios culturales de muchos pueblos, sino también fundamentalmente al elevado costo de los medicamentos. El estudio científico de las plantas medicinales es una fuente relevante para el descubrimiento de nuevos fármacos que luego se sintetizan, pero también permite un conocimiento más profundo de los vegetales que conduce a que muchos productos naturales sean reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos de síntesis (Vivot, Sánchez, Cacik y Sequin, 2012).

Es importante aclarar, que la medicina natural toma como principal aliado a la naturaleza frente a ciertas crisis que afronta la medicina oficial debido a la atención despersonalizada de los enfermos con la pérdida gradual de una adecuada relación médico-paciente (Bartolotta,2014). Actualmente la mayor parte de antimicrobianos utilizados son de procedencia natural esto ocurre debido a los mecanismos de defensa que usan los organismos vivos para adaptarse al medio, en estos mecanismos se involucran la producción de muchos metabolitos secundarios que

desempeñan múltiples funciones, que a lo largo del tiempo el ser humano voluntaria o involuntariamente los ha utilizado, extraídos e identificados con el fin de asegurar su supervivencia (Escalona, 2011).

Paralelo a ello la emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas (Pava, Sanabria y Leal, 2017). La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes terapéuticos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica (López et. al 1997).

En ese sentido, *Crinum amabile* es una planta herbácea perteneciente a la familia de las amarilidáceas, comprendida por más de 160 subespecies, se encuentra ampliamente distribuida a lo largo del mundo en Asia, América y África, especialmente en países con climas tropicales y calurosos., no solo es considerada como una planta decorativa, puesto que presenta llamativos colores, también es usada en la medicina ancestral como emético, antimicrobiano (De La Torre et.al 2008).

Muchas especies de *Crinum* han sido usadas comúnmente en la medicina tradicional alrededor del mundo a lo largo del tiempo, por ejemplo, los indígenas ecuatorianos utilizaban las flores de *C. amabile* para tratar afecciones como la gripe y las hojas para el tratamiento de infecciones

intestinales (De La Torre et.al 2008). Las culturas vietnamitas utilizan esta misma especie para tratar el reumatismo, el dolor de oído (Fennell y Van Staden, 2001).

Al observar la enorme variedad de efectos terapéuticos de distintas especies del género *Crinum* es lógico pensar que existan algunas propiedades medicinales que aún faltan por conocer, por ejemplo, no se han realizado estudios de las propiedades antimicrobianas del género *Crinum amabile*, lo que nos motivó a realizar el presente estudio sobre cepas de referencia Internacional, para lo cual nos planteamos el siguiente problema de investigación:

¿Hasta qué punto será efectiva la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum amabile*, que se estudiará en el laboratorio C de Productos Naturales del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis entre diciembre de 2019 hasta febrero de 2020?

Justificación

En la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional ya, que ha generado numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones. Pero, hay poco uso de los medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud; sus tratamientos están basados únicamente en la medicina alopática (Ávila y López ,2013).

Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce

la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios. Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente en la eliminación directa de los microorganismos patógenos o restringiendo su reproducción (Jiménez, Ducoing y Sosa, 2003). Las tendencias de volver a lo natural para llevar una vida más sana, ha estimulado a quienes se dedican en la industria farmacéutica a la investigación y desarrollo de formulaciones innovadoras que permitan el empleo de productos naturales de origen vegetal para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por patógenos que han desarrollado resistencia múltiple (Luján, 2006).

Varios autores han citado el continuo incremento de las bacterias clínicamente importantes que han desarrollado resistencia a una amplia gama de antimicrobianos, en ese sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Unión Europea, se han expresado en torno al incremento de la resistencia bacteriana, haciendo un llamado para que sean implementados más y mejores estudios sobre la supervivencia bacteriana (Paredes y Roca, 2004).

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

Objetivo General

Evaluar la Actividad Antimicrobiana del extracto metanólico obtenido de los bulbos de *Crinum amabile* en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

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

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

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

Limitaciones de la investigación

Para desarrollar este proyecto de investigación se considera como limitante acceso al material e instrumentos debido a los altos costos, recolección de la muestra vegetal y la disponibilidad de libros y artículos en el área actualizados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Durante muchos siglos el ser humano ha hecho uso de las plantas medicinales principalmente en su alimentación y como agentes terapéuticos hasta la evolución de los fármacos sintéticos, sin embargo, actualmente las plantas siguen siendo tendencia en la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos, tal es el caso de la planta del género *Crinum* que aportan una gran cantidad de compuestos químicos con diversas actividades biológicas. Las cuales pueden ser utilizadas directamente como base para la síntesis de nuevos principios útiles en el tratamiento de las infecciones (Domingo y López, 2003).

En un estudio realizado por Carrasco A, 2017, titulado: Determinación de la Actividad Inhibitoria de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa del extracto de Alcaloides de *Crinum x amabile*. El objetivo fue: determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*, El método utilizado fue, mediante maceración durante 72 horas de las hojas y bulbo de *Crinum x amabile*, usando como solvente de extracción metanol. El extracto de alcaloides totales de *Crinum x amabile* se probó para evaluar su actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE, usando galantamina como control positivo. Los

resultados son expresados en valores de IC50 ($\mu\text{g/mL}$) que representa la concentración del extracto necesaria para inhibir la acetilcolinesterasa/butirilcolinesterasa en al menos un 50%. (Cortes et al, 2015, p.224). Sin embargo, Los resultados de inhibición enzimática del extracto de alcaloides se expresaron como valores de IC50, mostrando una actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa significativa ($\text{IC}_{50} 2.24 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$), resultado cercano al compuesto de referencia galantamina ($\text{IC}_{50} 0.27 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$). Por otra parte, se mostró una débil inhibición de butirilcolinesterasa ($\text{IC}_{50} 116.59 \pm 2.85 \mu\text{g/mL}$), observando menos actividad que el compuesto de referencia ($\text{IC}_{50} 4.88 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$); resultado que evidencia una baja selectividad de los alcaloides del extracto hacia esta enzima. Se considera esta especie vegetal como un posible candidato para la búsqueda de nuevos inhibidores selectivos de AChE, con un potencial uso para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer; por ello, se recomienda la realización de más estudios fitoquímico y farmacológicos de *Crinum x amabile*.

Gastaldi C. Andrade Jean P.(2015) Publicaron un estudio en el Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal, Edafológica, Facultad de Farmacia, Barcelona-España, titulado: alcaloides de *Crinum erubescens Aiton*. El objetivo fue: determinar los alcaloides presentes en la planta *C. erubescens* recolectada en Costa Rica. Las hojas frescas de *C. erubescens* fueron triturada y colocadas a macerar durante 48 h con metanol a temperatura ambiente, posteriormente la solución fue filtrada y se evaporó a sequedad bajo presión reducida para eliminar el solvente. Donde

identificaron los alcaloides: Ismina, Trisfaeridina, 11,12-deshidroanhidrolicorina, crinamina, 1- Epidemetoxicodedensina, Macromina, Bowdenssine, 1- epidemetilbowdensina, por comparación con los índices de retención GC-MS.

Marmolejo J, (2018) evaluó la actividad antimicrobiana mediante la aplicación del método de difusión en disco y el método de microgotas. Los resultados de la actividad de los extractos de los bulbos de *Crinum x amabile* frente a los microorganismos, donde indica que el extracto bruto de alcaloides posee mejores zonas de inhibición comparado con el extracto bruto metanólico. El potencial antimicrobiano fue analizado sobre microorganismos patógenos tales como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*. Los extractos fueron analizados a diferente rango de concentración de extracto seco sobre un disco realizado con papel filtro, entre ellos 300, 500 y 700 µg partiendo de una disolución madre de 20mg/mL. Los mejores resultados en ambos extractos testeados en la ejecución de la actividad microbiana por el método de difusión de discos fueron los de 700 µg concentración contra las bacterias Gram negativas y la *C. albicans*. Sin embargo, las concentraciones menores también tienen zonas de inhibición en la mayoría de los microorganismos monitores, pero en menor diámetro de inhibición.

Ribeiro J. y Salgueiro M. (2011). Publicaron un estudio en La Universidad Estatal de Londrina Brasil, titulado: Potencial Alelopático de *Crinum americanum* en diferentes condiciones de extracción. El objetivo del trabajo fue determinar la temperatura y el tiempo de extracción del alelo

químico de *C. americanum* evaluaron el efecto del tiempo en el proceso de extracción, luego de mezclar las hojas pulverizadas de *C. americanum* en agua destilada y dejadas con agitación a temperatura de 25°C. El agua fue usada como solvente porque los experimentos demostraron su eficiencia para extraer los alelos químicos de esa especie. De esta manera se puede evidenciar que no ha habido diferencia en el rendimiento del potencial alelopático entre los extractos obtenidos en los diferentes tiempos de extracción, esta además decir que los aleloquímicos de muchas especies son considerado posibles materias primas para el desarrollo de herbicidas orgánicos.

Antecedentes Históricos

El uso de los agentes antimicrobianos en la terapia de las enfermedades infecciosas, ha constituido un acontecimiento sin precedentes, para el tratamiento y control de las infecciones, permitiendo modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad en la población. Es por esta razón, el interés por el descubrimiento de nuevas sustancias de origen natural, que permitan un eficaz tratamiento de las infecciones bacterianas agudas y algunas enfermedades crónicas.

Se puede afirmar que, desde la segunda mitad del siglo XX, el empleo generalizado de los antibióticos ha cambiado radicalmente el panorama de la salud, haciendo que enfermedades infecciosas como la gonorrea, la sífilis, el tétanos, el cólera, la neumonía o la tuberculosis dejen de ser la primera causa de muerte en el mundo. El empleo de los antibióticos también ha

revolucionado el campo de la cirugía, ya que la profilaxis antibiótica ha permitido reducir enormemente el riesgo de muerte por septicemia luego de procedimientos quirúrgicos mayores o menores. El número de muertes perinatales de niños y madres también ha caído enormemente tras el uso generalizado de los antibióticos.

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

Bases Teóricas

Aspectos taxonómicos de la familia Amaryllidaceae

Las plantas pertenecientes a esta familia cumplen con las siguientes características taxonómicas:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales

Familia: Amaryllidaceae

Género: *Crinum*

Especie: *Crinum amabile*

Fuente: (Maryori, 2016).

Familia Amaryllidaceae

Amaryllidaceae es una familia de plantas monocotiledóneas, conocidas por su atractivo hortícola y ornamental, se caracterizan por ser herbáceas, perennes, con flores muy atractivas y la mayoría presentan bulbos. Existen aproximadamente 85 géneros y 1100 especies, que se distribuyen ampliamente en las regiones tropicales y templadas de todo el

mundo, particularmente en África, América del Sur, en la región andina y el Mediterráneo. (Fan-chiang, Wang y Hsieh ,2016).

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

Características botánicas de la familia Amaryllidaceae

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

- **Porte:** hierbas perennes o bienales con bulbo carnoso subterráneo, raro con rizoma.
- **Hojas:** planas y dorsiventrales, lineares a orbiculares, envainadoras, glabras, caducas, en pocos casos perennes, provistas de estomas amonocíticos y células mucilaginosas o elongados sacos con rafidios, se originan directamente del bulbo.
- **Flores:** epíginas, trímeras, actinomorfas y perfectas, dispuestas en umbelas soportadas por un largo escapo, comprimiendo de una a muchas cimas helicoidales, aunque en muchos casos se encuentra reducida a unas pocas flores o a una sola flor solitaria.

- **Perigonio:** seis tépalos similares en ambos verticilos que varían de libres a conados en la base formando un corto o largo tubo. Pueden ser blancas, amarillas, púrpuras o rojas (violeta en *Grittonia*).
- **Androceo:** filamentos delgados o planos insertos en la base de los tépalos o en el tubo formado por la fusión de esto últimos.
- **Gineceo:** tres carpelos soldados en un ovario ínfero y trilocular, con nectarios septales más o menos distinguibles como un surco, primordios seminales numerosos con placentación axial. El estilo es simple con un estigma apical puntiforme, capitado o trilobado, generalmente con superficie seca y papilosa.
- **Frutos y semillas:** cápsula loculicida o baya; con semillas altamente variables, los géneros concentrados en Europa son globosas, elipsoidales u ovoides mientras que los géneros extra europeos son en su mayoría lisos o chatos.

Género *Crinum*

El género *Crinum* representa un importante sector en la familia Amaryllidaceae con amplia distribución geográfica en regiones cálidas y templadas del mundo. El nombre *Crinum* se origina del griego Krinon, que significa "lirio" y *amabile* del epíteto latino "digno de amor". (Meerow y Snijman, 1998). Abarca 130 especies, la mayoría de esta especie vegetal es usada para dolores abdominales y contusiones en el cuerpo, colocando las hojas y bulbos en el fuego y luego en el sitio afectado durante un largo periodo de tiempo, las flores son usadas para tratar los resfriados, también

los alcaloides de sus extractos pueden tener un efecto inhibitor de la acetilcolinesterasa. (De La Torre et.al 2008).

Descripción botánica del género *Crinum*

Las especies pertenecientes a este género son muy utilizadas como plantas ornamentales en muchos países del mundo por sus enormes y hermosas flores. Se caracterizan por ser plantas perennes, con bulbos que pueden abarcar grandes superficies de terreno, las hojas que se disponen en roseta en estas especies son lineales, de color verde intenso o algunas veces más claras, aplanadas y más largas que anchas y pueden alcanzar más de 30 cm de largo por cinco a seis cm de ancho. Las flores de este género surgen de los laterales de la planta, las mismas se disponen en la región terminal de un pedúnculo que en algunos casos alcanza más de medio metro, tal como se muestra en la (figura 1.0). Muchas flores pueden tener un diámetro superior a los diez cm siendo actinomorfas y hermafroditas. El pedúnculo floral puede tener al menos seis flores.



Figura 1: Especie vegetal *Crinum amabile*.

Realizado por: Ángel Carrasco. 2017.

Son plantas muy resistentes que pueden crecer sobre distintos tipos de sustrato, existen especies que crecen en terrenos muy húmedos y otras en terrenos desérticos. Su reproducción es tanto por semillas y bulbos (reproducción asexual o vegetativa). Los Lirios de Río se distribuyen por todo el mundo con una mayoría de especies presentes en zonas tropicales de África (De La Torre et.al 2008). Estas plantas están muy bien adaptadas a temperaturas cálidas y su desarrollo en los trópicos se ve favorecido.

Generalidades metabolitos secundarios

Hasta el año 1800, apenas se había progresado en el campo de la fitoquímica, solo se conocían unas cuantas sustancias como el azúcar de caña, almidón, alcanfor, y ácido benzóico, debido a que su preparación era sumamente sencilla. Mezclas complejas como grasa, aceite, esencias, resinas, se habían utilizado y elaborado, aunque prácticamente no se sabía nada acerca de su composición. Los primeros investigadores en el campo de la fitoquímica, no llegaron a apreciar la extrema complejidad de las materias con que se realizaban sus investigaciones y carecieron casi por completo de la técnica necesaria para conseguir un proceso auténtico (Torres et.al 2004).

En el siglo XIX se progresa con más rapidez siendo así que en año 1803 se aisló el primer alcaloide, la narcotina, posteriormente la morfina, estricnina, emetina, entre otros. No obstante, Chevreul en (1813-1823) descubre la naturaleza química de las grasas y los aceites fijos (Torres et.al

2004). Hasta mediados del siglo XX el principal objetivo, en cuanto a la química de los productos naturales, siguió siendo el aislamiento y determinación de la estructura de una amplia gama de compuestos.

Metabolito secundario

Con el paso de los años los metabolitos secundarios obtenidos de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente de compuestos químicos y complejas sustancias activas que desde hace años han sido explotadas por el hombre. Un Metabolito secundario son todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales. Estas moléculas no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen con un papel muy importante en el reino vegetal (Torres et.al 2004). A continuación, se menciona las características de algunos metabolitos secundarios:

- **Alcaloides:** reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos que pertenecen a este grupo, entre las sustancias se pueden mencionar a la morfina, heroína y cocaína. El mecanismo de acción en las bacterias de los alcaloides es debido a la intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo, (Domingo y López, 2003).
- **Antraquinonas** constituyen el grupo más numerosas de las quinonas naturales y son la base y fuente de una importante cantidad de colorantes. Son compuestos orgánicos polihidroxilados más o menos

metilados (posición C-2 o C-3), el estado de oxidación de los átomos de carbono puede variar en un alcohol, aldehído, ácido carboxílico o formar moléculas complejas. Según la posición de los OH tienen actividad como colorante por sustitución en 1,2 y como laxante en los carbonos 1,8 (Domingo y López, 2003).

- **Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos:** son compuestos que presentan un núcleo esteroideo con sustituyentes del tipo lactónico (α , β , γ) insaturado. De igual manera, presenta una porción glicosídica, sensible a la hidrólisis en medio ácido (Domingo y López, 2003).
- **Triterpenos y Esteroides:** se derivan de la fusión de unidades de cinco átomos de carbono llamada isopreno (C5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En las plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se lleva a cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta Desoxixilulosa fosfato (DXP). Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos (Jiménez, Ducoing y Sosa, 2003).
- **Flavonoides:** los flavonoides constituyen un grupo amplio de fenoles naturales, se encuentran tanto como agliconas libres o en forma de heterósidos. En la actualidad se conocen más de 2000 de estos

compuestos, de los cuales unos 500 se encuentran en estado libre. Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y policétidos. Están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores y frutos (Carrión, 2010).

- **Cumarinas:** son compuestos derivados del núcleo benzopirona como la cumarina, esculetina, umbeliferona y escopoletina. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras. Su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Domingo y López, 2003).
- **Saponinas:** las saponinas son Glicósidos esteroidales con un núcleo estirostano, que presentan la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y producir abundante espuma cuando se agitan sus soluciones acuosas. La hidrólisis con ácidos minerales, divide la molécula en carbohidrato y sapogenina con esqueleto esteroideo o triterpenico (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Taninos:** son compuestos químicos de carácter fenólico con alto peso molecular, que forman con el agua soluciones coloidales. Se distinguen dos grupos básicos de taninos que difieren por su estructura y su origen biogenético, a saber: taninos hidrolizables y condensados (catéquicos). Los taninos hidrolizables por tratamiento con ácido se descomponen en azúcares y ácidos fenólicos, además, son compuestos reductores que forman sales complejas coloreadas con

tricloruro de hierro, además, precipitan con acetato de plomo y alcaloides (Shyamala - Gowri y Vasantha, 2010).

- **Mucílagos:** los mucílagos son considerados un grupo de hidrocoloides, conformados principalmente de polisacáridos y proteínas, que tienen la propiedad de hidratarse al contacto con el agua. Se clasifican en compuestos neutros y ácidos, que precipitan con la presencia de alcohol y metales pesados (Shyamala-Gowri y Vasantha, 2010).
- **Compuestos fenólicos** son aquellos que presentan en su estructura al menos un anillo aromático con funciones hidroxiladas. Son sustratos muy reactivos a la sustitución aromática electrofílica en las posiciones *orto* y/o *para*, condición ideal para las reacciones de halogenación, nitración, sulfonación, entre otras. En ese sentido, la prueba con tricloruro férrico genera un complejo estable de color azul a violeta, que se origina por el ataque del ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al ion férrico (Shyamala-Gowri y Vasantha, 2010).

Extracto

Es una solución preparada en alcohol o glicerina vegetal que permite extraer los diferentes compuestos químicos presentes en una planta. Se elaboran para obtener un concentrado de principios activos y existen como extractos secos y líquidos (Carrión, 2010).

Extractos en plantas

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

Preparación de los extractos

En la preparación del extracto de una planta que se disuelve en cualquier solvente, es necesario realizar una evaporación del líquido excedente y/o extracciones repetidas del mismo líquido hasta obtener la mayor cantidad de la muestra por agotamiento del solvente. En los extractos sólidos o secos se hace una evaporación total (Carrión, 2010).

Métodos extractivos para las plantas medicinales

- **Extracción Mecánica:** permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios de la planta, los cuales una vez extraídos se denominan jugo.
- **Destilación:** permite separar los componentes volátiles de una planta medicinal de aquellos activos que son menos o nada volátiles. En este método se utiliza una fuente de calor, por lo que no es aplicable a principios activos sensibles al calor. El líquido obtenido se compone de dos fases inmiscibles: aceite y agua.
- **Extracción con gases:** proceso selectivo, es relativamente sencillo eliminar el gas extractor, se puede controlar la temperatura y presión que se ejerce en la extracción.
- **Extracción con disolventes:** consiste en poner contacto la parte de la planta que contiene el principio activo, con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos. En la siguiente tabla se mencionan algunas generalidades de los procesos de extracción (Carrión A. 2010).

Tabla 1: Preparación del Material Vegetal

Extracción con disolventes	Temperatura	Tiempo	Disolventes
Infusión	Mayor a 50°C y menor de 100°C	De 1 a 2 minutos hasta 1 hora.	Agua.
Decocción	Temperatura a 100 °C	De 15 a 30 minutos de ebullición.	Agua.
Maceración	Temperatura ambiente	Puede ser de horas a días.	Agua, mezclas hidroalcohólicas, glicerina, vinagre, entre otros.
Digestión	Mayor a 30°C y menor a 50°C	Puede ser de horas a días.	Agua, mezclas hidroalcohólicas, glicerina, vinagre, entre otros.
Percolación	Temperatura ambiente	Dependerá del tiempo en que se demora en pasar el disolvente por la droga.	Variados
Soxhlet	Temperatura a 100 °C	Dependerá del tiempo en que se demora en pasar el disolvente por la droga.	Disolventes orgánicos como la acetona.

Fuente: (Valenzuela, 2004).

Características generales de las bacterias

En general, todas las bacterias constituyen organismos unicelulares, formados por una sola célula que, además, no posee un núcleo. Suelen medir alrededor de un micrómetro, aunque se han encontrado algunas bacterias realmente gigantes, las cuales han llegado a medir cerca de un milímetro. Presentando así diversas formas incluyendo esferas (coco), espiral (espirilos) y otras con forma de bastoncillo (bacilos). Las bacterias generalmente poseen una pared celular y uno o varios flagelos que utilizan para desplazarse por el entorno, esta capacidad de movilidad les otorga un gran beneficio ya que pueden moverse hacia zonas más favorables para su crecimiento, donde las condiciones o la disponibilidad de alimento son mejores. Las bacterias pueden clasificarse como aerobias, las cuales requieren oxígeno para respirar, y otros como anaerobias, lo que significa que pueden vivir en ausencia de oxígeno e incluso mueren en presencia de oxígeno.

Bacterias

Tal como lo expresan Munrray y Rosenthal en la cuarta edición de Microbiología Medica del año 2002, una bacteria es un microorganismo de estructura simple, de tipo procariota (unicelular) de membrana celular, mitocondrias, ni retículo endoplasmático, generando que su producción por vía asexual. A pesar de esto si posee pared celular, la cual es bastante compleja y permite que se clasifiquen como Gram positivas o Gram

negativas según su composición algunas no poseen dicha pared por lo cual solo pueden lograr sobrevivir en el interior de la célula hospedadora y manteniéndose en un medio hipotónico. Pueden tener diversas morfologías como cocos o bacilos, su clasificación basada en la pared celular permitirá distinguirlas debido a que cada una tomará una pigmentación diferente a la hora de la coloración.

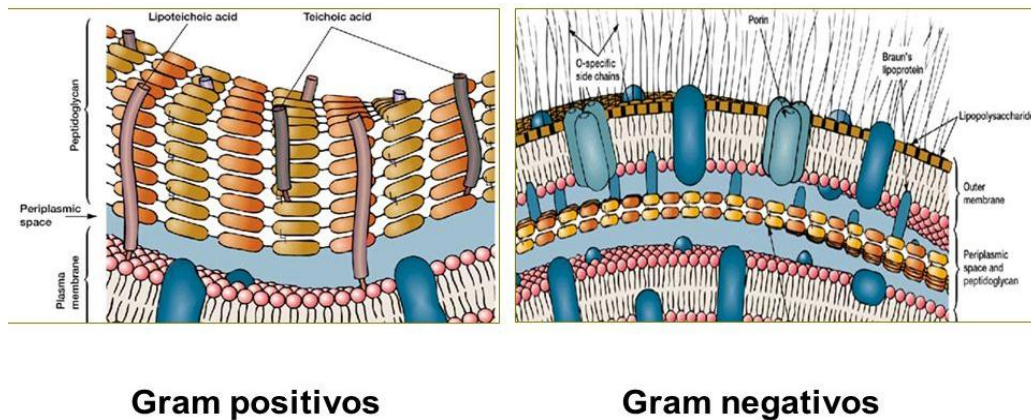
Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas retienen el colorante cristal violeta y la tinción azul oscura o púrpura durante el proceso de tinción de Gram. Una de las características primarias que clasifica a una especie de bacterias como Gram positivas es la ausencia de una membrana externa tal como se muestra en la (figura 2). Poseen una capa gruesa de varios niveles compuesta de peptidoglicano y que forma algo similar a una malla de azúcares y aminoácidos, esta capa es parte de su pared celular. También carecen de espacio periplásmico, que es un espacio entre las membranas interna y externa. Además, las bacterias Gram positivas se clasifican por su alta resistencia a la ruptura física. (Breakwell , Moyes y Reynolds,2009).

Bacterias Gram negativas

Las bacterias se clasifican como Gram negativas si poseen una membrana externa y una capa delgada, de un solo nivel, de peptidoglicano

así como se muestra en la (figura 2). Durante el proceso de tinción de Gram las bacterias reaccionan decolorándose para aceptar la tinción de safranina, hasta obtener un color rojo. Poseen una baja resistencia a la ruptura física y una baja resistencia al secado (Breakwell, Moyes y Reynolds,2009).



Gram positivos **Gram negativos**

Figura 2: Membrana Celular de las Bacterias.
www.bdigital.ula.ve

Técnicas diferenciales de tinción utilizadas para identificar las bacterias.

- **Tinción de Gram:** es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas (Beveridge, 2001). Fue desarrollada por el científico Hans Christian Gram en 1884; hoy en día, sigue siendo una de las tinciones utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta (Kaplan, 1993). En microbiología clínica resulta de gran utilidad, ya que a partir de

muestras clínicas directas provenientes de sitios estériles se puede saber de manera rápida las características de la muestra y hacer una diferencia de los potenciales microorganismos causantes de una infección (Nagata, 2010).

- **Tinción de Ziehl-Neelsen:** es una técnica rápida, fácil y de bajo costo (Selva kumarlo, 2002) que se pueda realizar en cualquier laboratorio clínico y permite diferenciar a las bacterias que son capaces de resistir la decoloración alcohol-ácido, como por ejemplo las micobacterias (Selvakumar, 2002).

Actividad antimicrobiana

Se refiere a una sustancia cuyas propiedades son capaces de eliminar e inhibir el crecimiento bacteriano sin incurrir en el daño del organismo que las porta siendo estas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos y virus) sintetizados por métodos de laboratorio, Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Lujan, 2006).

Microorganismos utilizados en el estudio

Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , agrupados como células únicas, en pares,

tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa que es una enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre (Cervantes, García y Salazar, 2014).

Enterococcus faecalis

Antiguamente denominado *Streptococcus faecalis* perteneció al género *Streptococcus* del Grupo D; es un microorganismo que forma parte de la microbiota de las vías intestinales y biliares, pero recientemente fue clasificado en su propio género denominado *Enterococcus*. Son microorganismos anaerobios facultativos, inmóvil, catalasa negativo o débilmente positiva, con capacidad para fermentar glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido láctico, pero sin gas. Además, presenta capacidad para formar biopelículas. Los *Enterococcus* se diferencian de los *Streptococcus* en que pueden crecer en un rango de temperatura de 10°C a 45°C, estos son cocos de tamaño 0,6-2,0 × 0,6-2,5 µm, Gram positivos que se distribuyen en cadenas cortas o en pares y no forman esporas.

Escherichia coli

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el

intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Castro, 2013).

Morfológicamente, las colibacterias son bacilos rectos generalmente flagelados peritricos y por tanto móviles. Pueden multiplicarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias y son fácilmente cultivables en medios nutritivos sencillos. Catabolizan glucosa, lactosa y otros azúcares, mientras que no pueden utilizar urea ni citratos (Castro, 2013).

Klebsiella pneumoniae

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

Candida albicans

Candida albicans es un hongo dimórfico que se desarrolla de forma distinta según la temperatura de crecimiento, por su dimorfismo puede

presentarse como levadura y hongo. Este suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura (Samsom J, 1990).

Candida krusei

Candida krusei es una levadura perteneciente al género *Candida*, con formas cilíndricas de hasta 25 mm de largo. Las colonias separadas exceden con frecuencia los 5 mm de diámetro sobre malta-glucosa a 25 °C.

Enfermedades causadas por las cepas bacterianas usadas en el presente estudio.

Entre los diversos microorganismos que han causado resistencia antimicrobiana:

❖ Bacterias Gram positivas:

- ***Staphylococcus aureus***: síndrome de piel escaldada (descamación diseminada del epitelio, generalmente en lactantes), shock tóxico (intoxicación multisistémica), impétigo, foliculitis, fórunculos, carbuncos, bacteriemia, endocarditis, neumonía, osteomielitis, artritis séptica, entre otras (Murray, 2009).
- ***Enterococcus faecalis***: patógeno caracterizado en pacientes inmunocompetentes, por tanto se comporta como un patógeno

oportunista, una vez colonizado el microorganismo puede invadir otras regiones anatómicas hasta alcanzar el sistema linfático o circulatorio. De esa manera puede producir infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis, infecciones intra abdominales, pelvianas, infecciones de tejidos blandos, heridas, sepsis neonatal y en ciertas ocasiones meningitis. Las cepas de *Enterococcus* virulentas que colonizan la mucosa intestinal pueden trasladarse desde la luz intestinal hacia los nódulos linfáticos, hígado y bazo, después de ser endocitados por las células del íleon, colon o por macrófagos intestinales (Murray, 2009).

❖ **Baterías gram negativas:**

- ***Klebsiella pneumoniae*:** desempeña un importante papel como causa de enfermedades infecciosas oportunistas. Está implicada principalmente en infecciones nosocomial como infección del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de heridas quirúrgicas. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de Cuidados intensivos y Neonatos (Toro I. Muñoz et al. 2009).
- ***Escherichia coli*:** causante de las infecciones urinarias, sepsis, gastroenteritis e Insuficiencia renal. Resistente a múltiples antibióticos (Forbes,2007).

❖ **Levaduras resistentes:**

- ***Candida albicans*:** es un organismo comensal que forma parte de manera natural de la flora intestinal de individuos sanos. Para que

dicho organismo pueda llevar a cabo una infección sistémica, en el organismo humano, se deben cumplir varios factores de riesgo. Dichos factores van desde el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro (AINES), corticoides o anticonceptivos orales; hasta padecer enfermedades inmunosupresoras como la diabetes mellitus, el VIH, entre otros. Como la *Candida albicans* tiene la capacidad de sobrevivir como comensal en varios sitios anatómicamente distintos (intestinos, cavidad oral, vagina, entre otros.) en cuanto se le presenta la oportunidad puede causar una enfermedad.

- ***Candida krusei***: Es un patógeno nosocomial que principalmente afecta a los pacientes inmunodeprimidos y aquellos con neoplasias hematológicas. Se encuentra con mayor frecuencia en pacientes que han tenido exposición previa al fluconazol®. La infección por *C. krusei* es una fungemia que rara vez se presenta en áreas relativamente visible, tales como la boca, los genitales, las orejas, la piel o el cuero cabelludo.

Antibióticos

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

Clasificación de agentes antibacterianos

Los agentes antimicrobianos pueden interferir diferentes funciones que lleva a cabo la bacteria, tales como la síntesis de sus ácidos nucleicos, de proteínas, o para el procesamiento de aminoácidos o azúcares del medio, necesarios para la biosíntesis de sus paredes o membranas celulares. Las drogas antibacterianas pueden actuar en una o más áreas del funcionamiento del microorganismo y producir dos principales efectos (Paredes y Roca ,2004).

Su acción como bactericida produce la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso. Pertenecen a este grupo los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina®, vancomicina®, polimixinas®, fosfomicina®, quinolonas y nitrofurantoínas®. Por otra parte, la actividad como bacteriostático es la de Inhibir el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse (Paredes y Roca ,2004).

Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

Actúan a distintos niveles de la biosíntesis del peptidoglicano, capa esencial para la supervivencia de las bacterias, y el daño se produce por la pérdida de la rigidez de la célula bacteriana que puede causarle la muerte; por lo tanto, son considerados como agentes bactericidas. La síntesis del

peptidoglicano se lleva a cabo en tres etapas y los distintos antimicrobianos pueden afectar cada una de ellas. Los representantes de este grupo son las penicilinas y cefalosporinas (Basualdo, Coto y Torres ,2006).

Antibióticos que dañan la membrana citoplasmática

Dentro de los antibióticos que actúan a este nivel se encuentran la polimixina B[®] y la colistina[®] (polimixina E), inhibidores de bacterias Gran negativas que tienen lípidos de carga negativa en su superficie. Su acción es desorganizar la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de cationes de la célula bacteriana (Basualdo, Coto y Torres ,2006).

Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos

Muchos agentes antimicrobianos pueden interferir a diferentes niveles en la síntesis de los ácidos nucleicos. Pueden inhibir la síntesis de nucleótidos o causar una interconversión de nucleótidos, pueden interferir con polimerasas involucradas en la replicación y transcripción del ADN (Basualdo, Coto y Torres ,2006).

Antibióticos que inhiben la función ribosomal

Los ribosomas 70S bacterianos están constituidos por dos subunidades designadas como subunidad 30S y subunidad 50S. Estas

subunidades constituyen el sitio de acción de agentes antimicrobianos, localizándose en ellas proteínas específicas a las cuales se unen los fármacos. Los aminoglucósidos son azúcares complejos obtenidos de varias especies de *Streptomyces* e interfieren con la función ribosomal bacteriana, específicamente con la subunidad 30S. Las tetraciclinas® actúan también en la subunidad ribosomal 30S inhibiendo la unión del aminoacil RNA al ribosoma, sólo que esta unión no es definitiva sino temporal, por lo cual ejerce sólo un efecto bacteriostático (Basualdo, Coto y Torres ,2006).

Antibióticos inhibidores de beta-lactamasas

Las beta-lactamasas son enzimas producidas por algunas especies bacterianas y son las responsables de la resistencia que presentan dichas bacterias hacia antibióticos que en su estructura química presentan el anillo beta-lactámico (penicilinas y cefalosporinas), ya que las beta-lactamasas rompen ese anillo con lo cual bloquean la actividad antimicrobiana de esos compuestos. Los antibióticos inhibidores de las beta-lactamasas son el ácido clavulánico®, tazobactam® y sulbactam® (Basualdo, Coto y Torres ,2006).

Resistencia bacteriana

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. Son las bacterias, y no los seres humanos ni los animales, las que se vuelven

resistentes a los antibióticos. Estas bacterias fármaco resistentes pueden causar infecciones en el ser humano y en los animales y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes (OMS, 2018).

Resistencia natural

Es la que ofrecen las bacterias de una misma especie o cepa frente a un determinado antibiótico; todos los integrantes de la misma especie son resistentes al fármaco como ejemplo se puede mencionar la *Pseudomonas aeruginosa*, naturalmente resistente a las cefalosporinas (Basualdo, Coto y Torres ,2006)

Resistencia adquirida

Esta resistencia afecta a algunas bacterias de una misma especie o cepa, pero no a la totalidad; se logra en el transcurso del tiempo por dos mecanismos básicos: por mutación en un gen cromosómico (resistencia cromosómica) o por la adquisición de material genético extracromosómico (resistencia extracromosómica), (Basualdo, Coto y Torres ,2006).

Resistencia cromosómica

Se origina por mutación espontánea, hecho que lleva a un cambio genético estable. En una primera etapa aparecen pocas bacterias

resistentes, pero a medida que el antibiótico selecciona los microorganismos, se desarrollan células resistentes hasta transformarse en un cultivo puro antibiótico-resistente. La mutación espontánea puede acelerarse por acción de agentes físicos mutágenos o sustancias químicas, tal es el caso de la *Pseudomonas aeruginosa* frente a aminoglucósidos.

Resistencia extracromosómica

Se produce por incorporación de material genético por fuera del cromosoma bacteriano. Se la llama también resistencia transferida o resistencia mediada por plásmidos o transposones. El rápido aumento de la diseminación de la resistencia de un antibiótico dentro de una misma especie o entre especies está relacionado con la diseminación de plásmidos de resistencia. Los transposones son segmentos de ADN que se pueden trasladar desde una a otra zona del cromosoma bacteriano o entre el cromosoma y un plásmido o entre el cromosoma y el ADN de un bacteriófago; la transposición es un proceso siempre presente en las poblaciones bacterianas. El ingreso del material transferido puede realizarse por diferentes mecanismos denominados:

- **Conjugación:** consiste en la transferencia de genes entre bacterias sexualmente diferentes; requiere del contacto entre células a través de los pelos sexuales para la transmisión del factor R (gen extra cromosómico de la resistencia). Hay un puente citoplasmático de conjugación entre bacterias de distintas especies. La resistencia así

obtenida se extiende con rapidez, pues cada bacteria infectada se transforma en donante de genes de resistencia.

- **Transducción:** se realiza por medio de bacteriófagos, que transportan ADN de una bacteria a la otra.
- **Transformación:** se produce entre bacterias homólogas; al producirse la lisis de una bacteria resistente, una porción de ADN penetra la pared celular de una bacteria susceptible y ambos ADN se combinan.
- **Transposición:** consiste en el intercambio entre plásmidos, o de un plásmido hacia un cromosoma o hacia un bacteriófago sin necesidad de homología entre el donante y el receptor. Los elementos así actuantes son los denominados transposones, que seleccionan su propio sitio de inserción.

www.bdigital.ula.ve

Técnicas para determinar la actividad antibacteriana

Para la valoración y evaluación de actividad antimicrobiana de una sustancia de origen vegetal se utilizan diversos métodos, los cuales se rigen por diversos factores: técnicas de ensayo, el medio de cultivo y el material biológico o vegetal. La apropiada selección y uso de un agente antimicrobiano están basados en las características del organismo etiológico y en el patrón de susceptibilidad, el huésped y el fármaco. Los antibiogramas son reportes de test de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos y están indicados para cultivos bacterianos clínicamente relevantes (por ejemplo:

fluidos normalmente estériles o sitios clínicamente infectados) cuando la susceptibilidad no puede ser predicha. La determinación de la concentración mínima inhibidora (**CMI**) es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica, en donde es necesario utilizar cepas de control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece diferentes niveles de sensibilidad, a saber

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

Métodos para determinar la actividad antimicrobiana en extractos

Para la evaluación y valoración de una sustancia de origen vegetal se utilizan diversos métodos, los cuales se rigen de acuerdo a las técnicas de

ensayo, método de cultivo, material biológico y vegetal (Moreno 1988). Las más utilizadas son:

- **Método de difusión en agar según Kirby-Bauer:** es un método muy utilizado para el estudio de la sensibilidad de las bacterias, se basa principalmente en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco con un antimicrobiano que difunde en un medio sólido. La bacteria es sembrada en una superficie con un medio de cultivo, sobre el que se depositan unos discos de papel cargados con cierto antibiótico que difunde instantáneamente por el agar, formándose un gradiente de concentración alrededor del agar. Cuando el microorganismo crece se forman unos halos de inhibición, que luego son comparados con valores de referencia y se evalúa la sensibilidad (Moreno 1988).
- **Método de difusión con pozos:** emplea placas de Petri estériles con agar Müller Hinton® sin solidificar; a cada placa se le perforan cinco pozos de cuatro milímetros. de diámetro. Luego se inoculan las placas perforadas por medio de hisopos tomando una pequeña cantidad de la colonia bacteriana, posteriormente se añade el extracto en los pozos y se sellan con agar Müller Hinton®. Luego de un período de incubación determinado, se realiza la lectura, donde un resultado positivo (+) está dado por la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del pozo, en caso contrario se considera negativo (-) o resistente (Castro,2013).
- **Método de dilución en medio líquido:** la dilución en medio líquido es una técnica en la que se prueba una suspensión de bacterias de una concentración predeterminada, óptima y apropiada frente a varias.

Concentraciones de un agente antimicrobiano (normalmente mediante diluciones seriadas dobles) en un medio líquido de formulación documentada y predeterminada. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 mL (macro dilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de micro titulación (micro dilución) (Castro, 2013).

- **Método dilución en medio sólido:** la dilución en medio sólido implica la incorporación de concentraciones variadas de agentes antimicrobianos, en un medio solidificado con agar, utilizando generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inoculó bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. A menudo, los resultados derivados de estos ensayos se consideran como los más fiables para la determinación del valor **CMI** para una determinada combinación bacteria/antimicrobiano en una prueba concreta (Castro, 2013).
- **Método de E-Test:** consiste en aplicar sobre un medio de cultivo, donde se encuentra el microorganismo de referencia inoculado, unas tiras plásticas que llevan incluidas un gradiente de concentración de un determinado antibiótico determinando en el mismo estudio la **CMI**, luego se incuba por 24 horas a temperatura de 37 °C, donde se evidenciara el halo de inhibición en forma de elipse llegando hasta el marcador de la concentración del antibiótico (Castro, 2013).

Definición operacional de términos

- **Extracción:** Es la técnica más empleada para la separación y purificación de los compuestos que se encuentran en mezcla o para aislar un compuesto orgánico de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla utilizando un disolvente orgánico en contacto con una fase acuosa. Lo que en realidad se realiza en una extracción es la transferencia de una sustancia de una fase a otra, normalmente de una fase acuosa a una orgánica (Gómez y Valcárcel, 1988).
- **Solvente:** Se denomina solvente al medio dispersante del soluto, de igual manera se le conoce como un componente continuo o disgregador. Los más utilizados son solventes alifáticos, aromáticos, alcoholes, ésteres, cetonas e hidrocarburos (Velázquez y Ordorica, 2009).
- **Fitoquímica:** Es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales. Las plantas producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas son responsables de la coloración y aromas de las flores y frutos, otras vinculadas con las interacciones ecológicas, (Bruneton J, 2001).

Hipótesis

Hipótesis Alternativa (Ha)

Existe relación entre la actividad antimicrobiana y los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de los bulbos obtenido de la especie *Crinum amabile*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de la Investigación

Hernández, Fernández y Baptista (2010), refirieron que existen dos tipos de enfoque de investigación: cualitativo y cuantitativo. La metodología cualitativa se basó en métodos de recolección de datos sin medición numérica para descubrir o afinar preguntas de investigación y puede o no probar hipótesis en su proceso de interpretación. Por lo tanto, esta investigación tuvo un enfoque cualitativo, ya que se evaluaron las cualidades de los datos recolectados de la unidad de estudio, con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de los bulbos de *C. amabile*.

Tipo de Investigación

Según Hurtado (2010), los tipos de investigación están relacionados con el logro esperado durante el proceso de investigación. Un tipo de investigación proyectiva, consiste en la elaboración de una propuesta, un plan, un programa o un modelo, como solución a un problema o necesidad de tipo práctico, ya sea de un grupo social, o una región geográfica o en área particular del conocimiento. La investigación proyectiva involucra creación, diseño, elaboración de planes o de proyectos; sin embargo, no todo proyecto

es investigación proyectiva. Para que un proyecto se considere investigación proyectiva, la propuesta debe estar fundamentada en un proceso sistemático de búsqueda e indagación que requiere la descripción, el análisis, la comparación, la explicación y la predicción.

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

www.bdigital.ula.ve **Diseño de la Investigación**

Hurtado (2010), describió que el diseño de la investigación se debe determinar a través de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. Por ello se estipula que esta investigación adopto un diseño mixto, es decir por un lado una investigación de campo ya que se recolecta los datos directamente del sujetos involucrados con la unidad de estudio y por otro lado una investigación experimental; ya que dichos datos serán llevados al laboratorio C de Productos naturales “Antonio Morales”, ubicado en el instituto de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de

Los Andes, donde se sometieron a cambios de condiciones buscando observar la relación de la variable dependiente. Así mismo, responde a un diseño de tipo transeccional, debido a que los datos que se recolectaron se realizó en un solo momento.

Población y Muestra

La base de toda investigación es un grupo de elementos que son distinguidos por ciertas características, que son previamente definidas al establecer los alcances de la misma; es así como esto se conoce como nombre de población, la cual se define según el autor (Fidias, 2012) de la siguiente manera: Un conjunto finito o infinito de elementos característicos comunes para las cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación.

En concordancia a lo antes expuesto por el autor, se definió como la población de la investigación las plantas con fines medicinales la familia Amaryllidaceae. Por otra parte, la muestra deriva de la población, ya que es un sub grupo de la misma, que será un conjunto representativo (Fidias,2012). Por ello se estableció como muestra la especie *Crinum amabile*. La cual se recolectó en el estado Mérida para su posterior estudio en el laboratorio C de los Productos Naturales “Antonio Morales” ubicado en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes; desde diciembre de 2019 hasta febrero del 2020.

Sistema de variable

En este sentido Fidias, arias en su libro: el proyecto de investigación del año 2012, expresa que una variable en característica o casualidad, pueden sufrir cambios y es por ello el motivo de análisis, medición manipulación o control de una investigación, para llevar a cabo la presente investigación se definieron las variables según su función, en la relación causal de la siguiente manera:

- **Variables independientes:** son las causas que generan y explican los cambios en la variable dependiente. (Fidias,2012). En el caso particular el objeto de estudio se define como variable independiente: La composición química del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum amabile*, la cual será la causa.
- **Variables dependientes** (Fidias, 2012) las define como; Son aquellas que se modifican por acción la variable independiente. Constituyen los efectos o consecuencias que se miden y que dan origen a la investigación. En la actual investigación se define como variable dependiente la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum amabile*.

Materiales y Métodos

- **Recolección y determinación de la Especies Botánica:** La especie *Crinum amabile* se recolectó en La Mucuy baja, Municipio Santos

Marquina del Estado Mérida, ubicado a 1898 m s. n. m. Una muestra representativa fue entregada al Profesor Pablo Meléndez para su correspondiente identificación y clasificación botánica, posteriormente un voucher espécimen identificado como JR 69 de la especie fue depositado en el Herbario “Dr. Luis Ruíz Terán” (MERF), Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en Mérida, Venezuela (Buitrago, Rojas y Peñalosa, 2009).

- **Selección, División y Preparación del Material Vegetal:** el material vegetal recolectado fue seleccionado con la finalidad de eliminar impurezas y partes en descomposición (tallos, hojas y frutos). El material vegetal reservado para la obtención de los extractos de *Crinum amabile*, se secó en un horno eléctrico ubicado en el herbario MERF a una temperatura superior a 40 °C, durante al menos 72 horas. Transcurrido este tiempo, se verificó que las muestras se encontraran libre de humedad y quebradizas al tacto, para luego realizar un proceso de molienda hasta obtener un tamaño de partícula que traspasara un tamiz de malla número 20. La muestra se pesó, envasó, rotuló y colocó en un lugar seco y fresco (Buitrago, Rojas y Peñalosa 2009).
- **Extracción por Maceración del Material Vegetal:** el material vegetal seco y molido de *Crinum amabile* se sometió a extracción por maceración en frío, usando como solvente metanol, durante un periodo de 10 días dividido en dos ciclos. Ésta técnica de extracción sólido-líquido, consiste en colocar la muestra en un envase con tapa,

junto con el solvente orgánico hasta lograr la saturación del mismo y luego ser sustituido, a los 5 días por un nuevo volumen de solvente (Lavabre, 1995). El mismo se realizó en el Laboratorio C de Productos Naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Janne Rojas y Dr. Alexis Buitrago.

- **Filtración del Extracto Metanólico y Concentración:** transcurrido el período de maceración, se procedió a la filtración por gravedad. Procedimiento que consistió en utilizar un embudo cónico que contendrá un papel de filtro con tamaño de poro adecuado, lo que permitirá en forma simultánea retener la muestra sólida y dejar fluir el extracto metanólico. El extracto metanólico de *Crinum amabile* se concentró destilando el metanol a presión reducida, mediante el uso de un rota vapor a una temperatura no superior de 40-50 °C. El producto seco obtenido fue pesado y rotulado (Buitrago, Rojas y Peñalosa,2015).
- **Tamizaje Fitoquímico:** el estudio fitoquímico para el extracto de *Crinum amabile*, se realizó con el propósito de identificar en forma cualitativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios, tales como; alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, taninos y mucilagos. (Buitrago, Rojas y Peñalosa,2009). Determinaron los diferentes procedimientos de análisis colorimétricos y cromatográficos

reportados en la literatura se realizarán como se describen a continuación.

Tabla 2. Procedimiento para el Tamizaje Fitoquímico en los extractos de *Crinum amabile*

Flavonoides		Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Ensayo	Reactivo			
Reacción de Shinoda	HCl concentrado y magnesio metálico	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron.	Añadir 2 gotas del ácido	Color rojo (auronas o chalconas)
			Adicionar virutas de metal	Color anaranjado a rojo (flavonas). Color rojo (flavonoles). Color magenta (flavononas)
Reacción de Pew-s	Polvo de zinc y HCl ₅ N		Adicionar gotas del ácido y una porción del polvo	Color purpura a rojo cereza (dihidroflavonas). Color rosa a café flavanonas y dihidrochalconas.
Reacción de hidróxido de sodio	NaOH 10 %		Añadir 3 gotas de la base fuerte	Color amarillo a rojo (xantonas y flavonas). Color café a purpura rojizo (chalconas). Color azul (antocianinas)
2-aminoetil-difenilborato(2-AEDB)	solución 2-AEDB AL 2 % en MeOH		Aplicar la muestra en una placa cromatográfica. revelar con el reactivo	Mancha de color amarillo con fluorescencia intensa a 365 nm

Tabla 2. Procedimiento para el Tamizaje Fitoquímico en los extractos de *Crinum amabile*. (Continuación)

Antraquinonas				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con amonio	NH ₄ OH concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron.	Adicionar 1 gota del reactivo	Color rojo (antraquinonas)
Reacción con ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄ concentrado		Adicionar 1 gota del reactivo	Color rojo (quinonas)
Reacción con Bortraguier	Agua destilada, KOH 5 %, CHCl ₃ , y H ₂ O ₂ 6%		Adicionar 3 mL de la base, llevara ebullición durante 3 min. Extraer con el solvente orgánico y alcalinizar con 2 mL de la base. Agregar gotas del agente oxidante.	Color rojo, amarillo o verde (benzoquinonas) Color rojo (derivado de antronas)
Reacción con Benceno	Benceno y NH ₃ al 10 %		Adicionar 1 mL del solvente orgánico y alcalinizar con la base.	Color rojo, rosa o violeta (antraquinonas)
Saponinas				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Prueba de la altura de la espuma	Agua destilada	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de agua. Luego se agitaron en vortex y filtraron	El extracto acuoso se agitará vigorosamente y se medirá la altura de la espuma	Altura de la espuma entre 8 y 10 mm, estable por 30 minutos
Prueba de bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Se disolvió una porción del extracto con 50 mL de agua. Luego se agito en vortex y se filtro.	Añadir gotas de la sal y agitar vigorosamente durante 3 minutos	La formación de espuma en forma de panal de abeja (saponinas).

Tabla 2. Procedimiento para el Tamizaje Fitoquímico en los extractos de *Crinum amabile*. (Continuación)

Taninos				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Control	Agua destilada, CH ₃ C H ₂ OH y NaCl	Se disolvió 100mg del extracto en 10 mL de etanol y se agito durante 5 minutos. Luego se realizó una extracción con 25 mL de agua destilada, la solución resaltante se calentó hasta ebullición durante 15 minutos. A la solución se le adicionó 0,2 mL de NaCl al 10 % y se filtró. Se rotularon 5 tubos de ensayo y se le adicionaron 3 mL del filtrado	Tubo 1: control	Sin reacción
Gelatina 1 %	Gelatina		Tubo 2: agregar 5 gotas de solución de gelatina	Precipitado color blanco (taninos)
Gelatina (1%)- sal (10%)	Gelatina y NaCl		Tubo 3: agregar 5 gotas de solución salina en gelatina	Precipitado color blanco (taninos)
Tricloruro férrico	FeCl ₃ 10 %		Tubo 4: agregar 3 gotas de la solución de la sal férrica	Color rojo vino (compuestos fenólicos). Color verde intenso (taninos pirocatecolicos). Color azul (taninos pirogalatánicos)
Ferrocianuro de potasio	K ₃ Fe(CN) ₆ 1 %		Tubo 5: agregar 1 gota de la cuaternaria	Color azul (8fenólicos).
Mucilagos				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Enfriamiento de 0- 5 °C	Agua destilada	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de agua. Luego se agitaron en vortex y filtraron.	Enfriara a una temperatura de 0- 5 °C	Consistencia gelatinosa (mucilago)

Tabla 2. Procedimiento para el Tamizaje Fitoquímico en los extractos de *Crinum amabile*. (Continuación)

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

Tabla 2. Procedimiento para el Tamizaje Fitoquímico en los extractos de *Crinum amabile*. (Continuación)

Compuestos fenólicos				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Prueba de FeCl ₃	FeCl ₃ , solución de NaCl 0,9 % m/v y CH ₃ COONa	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron	Adicionar 3 gotas del acetato, neutralizada con 3 gotas, la sal férrica en solución fisiológica.	Color rojo vino, verde o azul (compuestos fenólicos)
Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con hidróxido de sodio	Solución de NaOH ₂ N	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron	Añadir 5 gotas de la base	Color amarillo (glicósidos)
Keller-Killianl	H ₂ SO ₄ concentrado. CH ₃ COOH glacial y FeCl ₃		Adicionar el reactivo con cinco del ácido fuerte	Interface de color marrón (azucars 2-desoxigenados)
Reacción de Legal	Piridina, Nitroprusiato de sodio al 5 %, NaOH ₂ N		Agregar 3 gotas de la base débil, una gota de la solución de la sal y 3 gotas de la base fuerte	Color amarillo (cardenolidos o lactonas&-saturadas)
Cumarinas				
Ensayo	Reactivo	Preparación de la muestra	Procedimiento	Resultado
Reacción con hidróxido de amonio	NH ₄ OH concentrado	Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron.	Adicionar 2 gotas de la base débil	Fluorescencia de color azul, verde o amarillo a una longitud de onda de 365 nm.

Tabla2. Procedimiento para el Tamizaje fitoquímico en los extractos de *Crinum amabile*. (Continuación)

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

Actividad antimicrobiana: la evaluación de la actividad antimicrobiana se realizará, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profa. Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo; empleando el método de difusión en agar con discos de papel. Para el ensayo se utilizaron bacterias y levaduras de referencia internacional, tales como: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (CDC-B385) y *Candida krusei* (ATCC 6258). El método empleado permitió medir la susceptibilidad In Vitro de las bacterias patógenas frente a una sustancia o

mezcla de sustancias de origen vegetal. El protocolo experimental que se utilizó se presenta a continuación:

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

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

c) Preparación de los inóculo: los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müller-Hinton, y las levaduras a partir de agar Sabouraud dextrosa con Cloranfenicol®, hasta lograr una turbidez correspondiente al patrón de Mc Farland N° 0,5 ($1 \times 10^{6-8}$ UFC/mL) para las cepas bacterianas y en el caso de las levaduras al patrón de Mc Farland N°1 ($1 \times 10^{6-8}$ UFC/mL).

d) Inoculación: en el caso de las cepas bacterianas, una vez preparado el inóculo para cada microorganismo, se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril. Por otra parte, las levaduras una vez preparado el inóculo para cada microorganismo, se mezcló 1 mL del mismo en 20 mL de

agar Müller-Hinton modificado, mezclando en forma envolvente con la finalidad de depositarlos en placas de Petri. Luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro previamente impregnados con el extracto, además, se colocaron discos de papel de filtro impregnados con el control negativo (solvente), así como también, los fármacos de referencia para cada microorganismo, como controles positivos.

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

f) Lectura de los ensayos: se realizarán las lecturas de los halos de inhibición a las 24 y 48 h. El diámetro de la zona de inhibición será expresado en milímetros (mm). La prueba se considerará negativa cuando exista crecimiento microbiano alrededor del disco al igual que los controles negativos.

g) Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI): solo se determinó la CIM contra los microorganismos que presentaron susceptibilidad al extracto. Para determinar la CMI se prepararon diluciones en el solvente apropiado a diferentes rangos de concentración, luego se impregnaron los discos de papel de filtro con 20 µL de cada solución. La CMI fue define como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible (NCCLS, 2014).

Diseño de análisis

El análisis de los datos fue realizado a través de un enfoque cuantitativo. Al respecto, Palella y Martins (2010) refirieron que el enfoque cuantitativo se refiere a la expresión numérica de los datos y al análisis realizado a través de operaciones matemáticas. En tal sentido, en esta investigación los datos fueron expresados en unidades de concentración, con el fin de obtener la información relacionada con el evento de estudio.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Determinación Fitoquímico del Extracto

En la tabla 3, se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizados a los bulbos de *Crinum amabile*, notándose una gran variedad de constituyentes, entre ellos, Alcaloides mediante la reacción de Dragendorff, donde la presencia de un precipitado color rojo pardo, blanco amarillento o anaranjado, indicó la positividad de la prueba, compuestos fenólicos, los cuales se evidenciaron con la aparición de color verde al reaccionar con tricloruro férrico. Además, la presencia de flavonoides los cuales dieron reacción positiva con el reactivo de Shinoda dando coloraciones de anaranjado, de igual manera reacción positiva con el reactivo de Pew's con un color purpura (dihidroflavonas) y rosa café (flavononas), por otro lado, se determinaron xantonas y flavonas mediante la reacción de hidróxido de sodio.

Según Marmolejo 2018, se identificó de forma cualitativa la presencia de alcaloides, flavonoides y antocianidinas en la fracción alcohólica, y en la fracción acuosa se encontraron otros tipos de metabolitos tales como triterpenos, compuestos grasos, saponinas, catequinas, lactonas, aceites y azúcares reductores, donde los ensayos realizados se correlacionan con estos reportes.

Otros metabolitos encontrados en los bulbos de la especie en estudio, son los glicósidos dando positividad para la reacción de hidróxido de sodio con una coloración amarilla. Respecto a los triterpenoides y esteroides, dieron reacción positiva con el reactivo de Liebermann-Burchard dando coloraciones de azul o verde (esteroides), y color amarillo-anaranjado (triterpenoides), además, el reactivo Vainillina y H_2SO_4 concentrado positivo para (triterpenoides) y la reacción de Salkowski (esteroides).

Por otro lado, se detectó la presencia de taninos, los cuales dieron precipitado blanco al reaccionar con gelatina, las saponinas también se han encontrado dando positivo en la formación de espuma en forma de panal de abeja mediante la reacción bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$). Por último, se mostró la presencia de mucilagos mediante el ensayo de Enfriamiento de 0-5 °C.

En un estudio previo para la evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica in vitro de *Crinum x amabile*, según (Portero, 2017) demostró mediante la prueba de Liebermann-Burchard evidencia de triterpenos y esteroides, marcando elevada presencia en las hojas, contrario con el bulbo en el cual no se encontró presencia alguna de estos. Además, en el ensayo de cloruro férrico demostró la presencia de fenoles y taninos presentando en hojas, pero que están ausentes en el bulbo.

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico para el extracto metanólico de *Crinum amabile*.

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

Ca: *Crinum amabile*, Ausente (-), bajo (+) Moderada (++) , Abundante (+++)

2. Determinación Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de *Crinum amabile*

El extracto obtenido de la especie *Crinum amabile*; fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana frente a diferentes cepas de referencia internacional. Los microorganismos de ensayo expuestos fueron: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudónomas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Candida albicans* (CDC-B385), *Candida krusei* (ATCC 6258) En el cual, no mostraron actividad antimicrobiana frente a seis de estos microorganismos, presentando actividad solo a *Staphylococcus aureus*, donde se obtuvo una **CMI** 100 µg/mL con un (halo de inhibición de 8mm). Como control positivo para este microorganismo se utilizó Linezolid (30 mg). En la tabla 4. Se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de la Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de *Crinum amabile*.

Los extractos vegetales con acción antibacteriana capaces de burlar los mecanismos de resistencia actuales, representan una gran alternativa para su uso clínico en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Concepción, 2006). De igual manera con el transcurrir del tiempo se ha demostrado estudios sobre las propiedades terapéuticas de las diferentes especies del genero *Crinum*.

En tal sentido, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el extracto metanólico de *Crinum amabile*, presentan actividad similar a

la obtenida en estudios previos. (Marmolejo, 2018) determinó la actividad antimicrobiana mediante la aplicación del método de difusión en disco y método de microgotas, analizando microorganismos patógenos tales como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*. Los extractos fueron analizados a diferente rango de concentración sobre un disco realizado con papel filtro, los rangos fueron de 300, 500 y 700 µg partiendo de una disolución madre de 20mg/mL. Presentando máxima zona de inhibición con el extracto bruto de alcaloides de **CMI** 700 µg / mL con un (halo de 10 mm) frente a *P. aeruginosa*, con un (halo de 9 mm) sobre *K. pneumoniae*, en el caso de *E. coli* y *S. typhi*, se observaron halos de inhibición menores de 8 y 9 mm respectivamente en el extracto de alcaloides de concentración de 500 µg. Además, en este extracto se visualizó un diámetro mínimo de 6 mm en los halos frente a *C. albicans* con el extracto de alcaloides de concentración de 700 µg / mL

Por otra parte, (Akintola et al., 2016) mostró que el extracto crudo y las fracciones del bulbo de *Crinum jagus* demostraron un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y hongos. El valor de **CMI** varió entre 0,20 y 3,125 µg / mL para aislamientos bacterianos y 0,39 a 3,125 µg / mL para aislamientos fúngicos. *Staphylococcus aureus* fue la bacteria más susceptible con un valor MIC de 0,20 µg / mL mientras que las levaduras; *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* fueron muy sensibles a con un valor CMI de 0,39 µg / mL.

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

Tabla 4: Actividad antimicrobiana para el extracto metanólico de *Crinum amabile*.

Microorganismos	C.a	Zona de inhibición (mm)					CIM (µg/mL)
		Antibióticos					
		LI	VA	CE	AZ	PI	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	8*	46*					100
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	NA		22*				NE
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	NA			36*			NE
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA				46*		NE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA					26*	NE
<i>Candida albicans</i> (CDC-B385)	NA						NE
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)	NA						NE

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

Conclusiones

- Las pruebas fitoquímicas del extracto metanólico de *Crinum amabile* revelaron la presencia de alcaloides y fenoles en menor concentración, por otra parte, los esteroides, taninos y triterpenoides se encontraron en moderadas concentraciones. De igual manera, se determinó en altas proporciones quinonas, antraquinonas, glicósidos, flavonoides y saponinas.
- Al evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólico *C. amabile*, se determinó su efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* a la CIM de 100 µg/mL. Por otra parte, no se observó ningún efecto contra las demás cepas ensayadas.

Recomendaciones

- Realizar la separación cromatográfica para la identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes en la especie *Crinum amabile*.
- Evaluar el potencial del extracto metanólico como agente antioxidante, antiinflamatorio, entre otros para la especie *Crinum amabile*.

www.bdigital.ula.ve

Bibliohemerografía

- Akintola, AO y Maduagwu, EN y Adegoke, AO y Kehinde, B. D y Ademowo, OG (2016) actividades antimicrobianas de extracto metanólico crudo y fracciones de la bombilla de *crinum jagus* (LINN). *Revista Internacional de Educación e Investigación*, 2 (6).
- Avalos García, Adolfo, & Pérez-Urria Carril, Elena. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3).
- Ávila, Yalexty Martínez, & López, Liliana Lourdes Gómez. (2013). Impacto social de una estrategia de intervención sobre prescripción racional de medicina verde en Céspedes durante 2011. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 609-618.
- Bartolotta, SA. (2014). Propuestas desde la Docencia. *IBERCIENCIA: Instituto Iberoamericano de Enseñanza De las Ciencias y la Matemática*.
- Basualdo, Juan Angel, Coto, Celia E, & Torres, Ramón Alberto de. (2006). *Microbiología biomédica: Bacteriología - micología - virología - parasitología - inmunología* (2a ed.): Atlante. Buenos Aires.
- Beveridge, Terry J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118.
- Breakwell, Donald P, Moyes, Rita B, & Reynolds, Jackie. (2009). Differential staining of bacteria: capsule stain. *Current protocols in microbiology*, 15(1), A. 3I.

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales* (2ª ed.). Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.
- Buitrago, Alexis, Rojas, Janne, Rojas, Luis, Velasco, Judith, Morales, Antonio, Peñaloza, Yonel, & Díaz, Clara. (2015). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Vismia macrophylla* leaves and fruits collected in Táchira-Venezuela. *Natural product communications*, 10 (2), 375-377.
- Buitrago, Alexis, Rojas, Luis B, Rojas, Janne, Buitrago, Diolimar, Usubillaga, Alfredo, & Morales, Antonio. (2009). Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) collected in two different locations in Merida-Venezuela. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(6), 651-655.
- Cabezas, Fabio, Argoti, Juan, Martínez, Santiago, Codina, Carles, Bastida, Jaume, & Viladomat, Frances. (2007). Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphruria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. *Scientia et Technica*, 1(33).
- Cabrera, Mónica Graciela Lajous, & de La Plata, Museo. (1968). Provincia de Buenos Aires. *Flora de la Provincia de Buenos Aires: Pteridófitas, Gimnospermas y Angiospermas Monocotiledóneas (a excepción de Gramineas)*, 4, 101.
- Carrasco Ruiz, Angelo Fernando. (2017). Determinación de la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de

alcaloides de *Crinum x amabile*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba

Castro Alcocer, Gabriel Elías. (2013). *Determinación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico de las Hojas y Flores de Iso (Dalea mitisii)*. (Tesis de Licenciatura).

Carrion, A. (2010). Preparacion de Extractos vegetales y determinación de eficiencia metódica. Unniversidad de Cuenca Facultad de ciencias quimicas, Escuela de Bioquimica y Farmacia.

Cervantes-García, Estrella, García-González, Rafael, & Salazar-Schettino, Paz María. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.

De la Torre, Lucía, Navarrete, Hugo, Muriel, Priscilla, Macía, Manuel J, & Balslev, Henrik. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos)*: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia

Domingo, D, & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*, 16(4), 385-393.

Escalona, Julio (2011), Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complememntaria.

FAN-CHIANG, T; WANG, H; & HSIEH, J.(2016) "Synthesis of phenanthridine skeletal Amaryllidaceae alkaloids". *Tetrahedron (China)* 72(36), pp. 5640-5645.

- Fennell, CW, & Van Staden, J. (2001). Crinum species in traditional and modern medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(1), 15-26.
- Fidias G. Arias. El Proyecto de Investigación 6ta. Edición 2012
- Forbes, Betty A. (2007). *Diagnóstico microbiológico* (12a ed.). Madrid, España: Ed. Médica Panamericana S.A.
- Fuentes, Victor, & Granda, Manuel. (1997). *Conozca las plantas medicinales*: La Habana, CU: Edit. Científico-Técnica.
- Gastaldi C. Andrade Jean P.(2015). Determinación de Alcaloides de Crinum erubescens Átion. Departamento de productos naturales Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.
- Gómez, A, & Valcárcel, M. (1988). *Técnicas Analíticas de Separación* (1 ed.). Barcelona, España: Reverté SA.
- Hernández-Sampieri, R, Fernández, C, & Batista, P. (2010). *Metodología de la Investigación* (5ta ed.). México: Editorial Mc Graw Hill.
- Hurtado J. (2010). El “para qué”, o los objetivos de la Investigación. En: el proyecto de investigación. Comprensión holística de la Metodología y la Investigación (pp. 89-95). 6ta. Ed. Caracas , Bogotá: Ediciones Quirón
- Hurtado de Barrera, Jacqueline. (2010b). Metodología de la investigación. *Guía para la comprensión Holística de la ciencia. 4a edición. Bogotá, Colombia: Quirón Ediciones SA Cooperativa Editorial Magisterio. Caracas, Venezuela: Ciea-Sypal.*

- Jiménez, Gabriela Sepúlveda, Ducoing, Helena Porta, & Sosa, Mario Rocha. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Kaplan, ML, & Kaplan, Leah. (1933). The Gram stain and differential staining. *Journal of bacteriology*, 25(3), 309.
- Lavabre, Marcel. (1995). *Aromaterapia libro práctico*: Inner Traditions/Bear & Co.
- Lizcano, Leandro J, Siles, Maite, Trepiana, Jenifer, Hernández, M Luisa, Navarro, Rosaura, Ruiz-Larrea, M Begoña, & Ruiz-Sanz, José Ignacio. (2015). Piper and Vismia species from Colombian Amazonia differentially affect cell proliferation of hepatocarcinoma cells. *Nutrients*, 7(1), 179-195.
- Lopez-Brea, M, & Domingo, D. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393.
- López, Rivero, Alvarez, M, López, T, & González, J. (1997). Actividad antifúngica in vitro de Pinus caribaea. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1), 25-29.
- Luján, Concepción García. (2006). *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de " Staphylococcus aureus" con resistencia múltiple*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreoncohuila, Mexico.
- Marcano, Deanna, & Hasegawa, Masahisa. (2002). Fitoquímica orgánica. *Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, 2002*, 487-588.

- Marmolejo Barreno, Anderson Jair. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de *Crinum x amabile*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.
- Mederos Perugorria, Karel. Naturaleza tropical (Vol. 06 de Noviembre de 2019).
- Moreno, A. (1988). *Bacteriología y Virología Básica*. Caracas, Venezuela: Editorial Venezolana C.A. Caracas. Pag 39
- Murray, Patrick, Rosenthal, K, & Pfaller, MA. (2009). *Microbiología médica* (5ta ed.). España: Editorial Elsevier.
- Nagata, K, Mino, H, & Yoshida, S. (2010). Usefulness and limit of Gram staining smear examination. *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology*, 58(5), 490-497.
- Paredes, Fernando, & Roca, Juan José. (2004). Acción de los antibióticos: Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23(3), 116-124.
- Pava, Cristian Nicolás Rodríguez, Sanabria, Andrés Gabriel Zarate, & Leal, Ligia Consuelo Sánchez. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova*, 15(27), 119-129.
- Portero H. Santiago (2017). Evaluación de la actividad inflamatoria y citotóxica in vitro de *crinum ambile*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo facultad de ciencias. Rio Bamba Ecuador.

- Ramirez, Luz Stella, & Castaño, Darwin Marin. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
- Ribeiro J. y Salgueiro M. (2011) Potencial alelopático de *Crinum americanum* bajo diferentes condiciones de extracción. Ciencias Agrícolas Universidad Federal de Sao Carlos.
- Rojas, Jhon J, García, Aura M, & López, Alvin J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 4(2), 28-32.
- Shyamala-Gowri, S., & Vasantha, K. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. *International Journal of PharmTech Research*, 2, 1569-1573.
- Selvakumar N. et al. Inefficiency of 0.3% crystal violet in Ziehl-Neelsen stain detecting acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3041-3043.
25. Microbiology USA: McGraw-Hill;2002.
- Toro, Lina María Echeverri, Muñoz, Santiago León Atehortúa, & Restrepo, Jaime Robledo. (2009). *K. pneumoniae* y betalactamasas. Un problema creciente. *Medicina UPB*, 28(2), 135-141.
- Torres Jorge, Molina Pino Rodríguez Suley, Sylvia Prieto González, Pérez-Rodríguez Marta Elena. (2004). Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. Centro de Química Farmacéutica, Apartado Postal 16042, La Habana, Cuba. Unidad Irapuato, CINVESTAV-IPN. Apdo. Postal 629; 36500 Irapuato, Gto., México.

Velázquez, M, & Ordorica, M. (2009). Ácidos, bases, pH y soluciones reguladoras. *Material de apoyo. México: Instituto Politécnico Nacional, Bioquímica Médica I.*

Vivot, Eduardo P, Sánchez, Cecilia, Cacik, Francisco, & Sequin, Christian. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, docencia y tecnología*, 23(45), 165-185.

White, LB, Foster, S, & Staff, H. (2004). *for H. El Recetario Herbario: Las mejores alternativas naturales a los medicamentos. Emmaus: PA: Rodale Books.*

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS



Figura 3: Impregnación de los discos con los extractos.

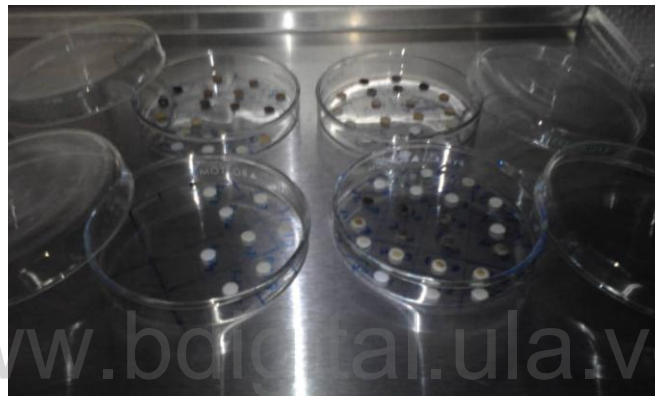


Figura 4: Incubación de Discos.

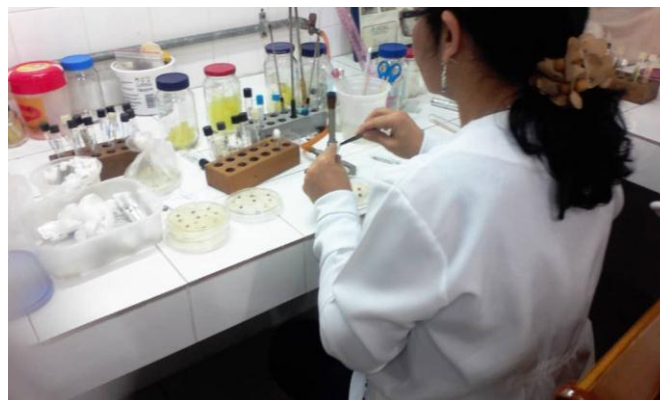


Figura 5: Preparación de los inoculo.



Figura 6: Se colocan en la superficie del agar inoculado, los discos previamente impregnados con el extracto.



Figura 7: Preicuban los medios de cultivo durante 18 h a 4 °C



Figura 8: Incuban los medios 37 °C durante 24 a 48 h.

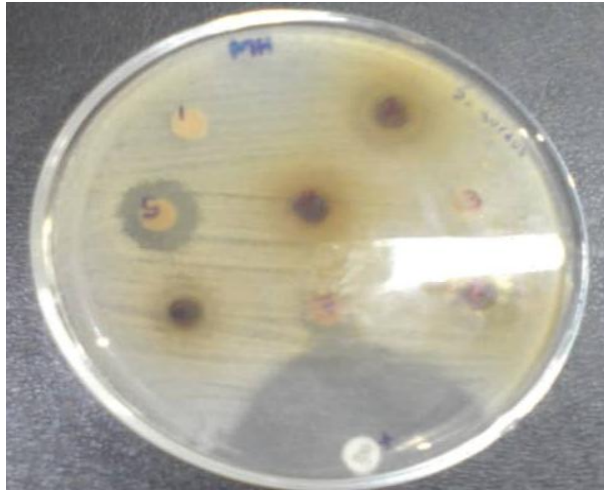


Figura 9: Lecturas de los halos de inhibición a las 24 y 48 h.

www.bdigital.ula.ve