



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro***  
**DE LOS EXTRACTOS DE *Crinum x amabile*.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Para optar por el título de:**  
**BIOQUIMICO FARMACEUTICO**

**AUTOR: ANDERSON JAIR MARMOLEJO BARRENO**  
**TUTOR: BQF. DIEGO R. VINUEZA TAPIA, M.Sc**

**Riobamba – Ecuador**

**2018**

**© 2018, Anderson Jair Marmolejo Barreno**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA in vitro DE LOS EXTRACTOS DE *Crinum x amabile*”, de responsabilidad del señor, Anderson Jair Marmolejo Barreno ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de titulación, quedando autorizada su presentación

**FIRMA**

**FECHA**

BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO**

**DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra. Verónica Cando, M.Sc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Anderson Jair Marmolejo Barreno, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 20 de febrero del 2018

Anderson Jair Marmolejo Barreno

Cédula de identidad 050304983-5

Yo, Anderson Jair Marmolejo Barreno, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

---

**ANDERSON JAIR MARMOLEJO BARRENO**

## **DEDICATORIA**

A mis padres que siempre serán mi fuente de inspiración y superación, y son el pilar fundamental para la obtención de mis objetivos.

A mis hermanos que son parte importante de mi vida

A los maestros que guiaron en este camino del aprendizaje.

Anderson

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco mis padres Milton y Sara, por ser mi ejemplo de superación y lucha, puesto que ellos fueron los principales responsables de la culminación de esta etapa tan importante en mi vida,

A mis hermanos que siempre me apoyaron y estuvieron cuando los necesite.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, mi alma mater, por permitirme desarrollarme como profesional.

Al BQF. Diego Vinueza por su gran apoyo y guía en la elaboración de este trabajo de titulación y por haber estado presente como maestro en la etapa formación compartiendo sus conocimientos y su tiempo

A la Dra. Verónica Cando por brindarme su soporte y enseñanzas en el desarrollo del presente trabajo

Anderson

## ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μg</b>	Microgramos
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>C. a.</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMB</b>	Concentración mínima bactericida
<b>CFI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfoxido
<b>E.c.</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ESPOCH</b>	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
<b>EBM</b>	Extracto bruto metanólico
<b>EBA</b>	Extracto bruto de alcaloides
<b>g</b>	Gramos
<b>CG.EM</b>	Cromatografía de gases acoplado a masas
<b>h</b>	Horas
<b>INEC</b>	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
<b>ITU</b>	Infección de tracto urinario
<b>K.p.</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

<b>mL</b>	Militros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>NCLLS</b>	National Health Interview Survey
<b>PABA</b>	Ácido paraaminobenzóico
<b>P.a.</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Ph</b>	Potencial de hidrogeno
<b>Ø</b>	Diámetro
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>R</b>	Resistente
<b>RAMS</b>	Reacción adversa de medicamento
<b>S</b>	Sensible
<b>S.t.</b>	<i>Salmonella typhi</i>
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias

## TABLA DE CONTENIDOS

### CAPÍTULO I

<b>1.</b>	<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Especies vegetales como antimicrobianos .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Fitoterapia .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Métodos de extracción de componentes.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Actividad Antibacteriana de Plantas .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.5</b>	<b>Alcaloides .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2</b>	<b>Crinum x amabile .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Descripción botánica.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Taxonomía .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Alcaloides de Crinum x amabile.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Utilidad terapéutica .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3</b>	<b>Enfermedades infecciosas.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Mecanismos de transmisión .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Mecanismos de respuesta ante la infección .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Tipos de enfermedades infecciosas .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Agentes infecciosos.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.5</b>	<b>Bacterias .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.6</b>	<b>Hongos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.7</b>	<b>Cepas microbianas en estudio.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4</b>	<b>Antibióticos.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Agentes bacteriostáticos y bactericidas.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Clasificación de los antibióticos .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5</b>	<b>Antimicóticos .....</b>	<b>32</b>

## CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO .....	33
2.1.	Lugar de la investigación .....	33
2.2	Recolección del material vegetal.....	33
2.3	Identificación botánica. ....	33
2.4	Materia vegetal.....	33
2.5	Material Biológico.....	34
2.6	Material Farmacológico .....	¡Error! Marcador no definido.
2.7	Técnicas y métodos .....	34
2.7.1	Tamizaje fitoquímico .....	34
2.7.2	Elaboración de los extractos vegetales .....	40
2.7.3	Identificación del perfil de alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) .....	40
2.7.4	Evaluación de la actividad antimicrobiana .....	41
2.7.5	Preparación de los extractos. ....	43
2.7.6	Ensayo de esterilidad de extractos. ....	43
2.7.7	Activación y acondicionamiento de cepas microbianas.....	43
2.7.8	Ensayo antimicrobiano mediante el método de difusión de disco .....	44
2.7.9	Ensayo antimicrobiano mediante el método de microgotas.....	44

## CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS ..	45
3.1	Tamizaje fitoquímico .....	45
3.2.	Resultados del proceso de extracción de los bulbos de <i>Crinum x amabile</i>	46
3.5	Perfil de alcaloides identificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. ....	47
3.4	Actividad Antimicrobiana.....	49
	CONCLUSIONES .....	56
	RECOMENDACIONES .....	57

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1.</b> Taxonomía de <i>Crinum x amabile</i> .....	<b>8</b>
<b>Tabla 2-1.</b> Utilidad terapéutica de alcaloides de <i>Crinum amabile</i> .....	<b>9</b>
<b>Tabla 3-1.-</b> Algunas enfermedades infecciosas causadas por bacterias.....	<b>10</b>
<b>Tabla 4-1.</b> Clasificación bacteriana.....	<b>14</b>
<b>Tabla 5-1.</b> Principales hongos y sus infecciones en el ser humano.....	<b>17</b>
<b>Tabla 6-1.</b> Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana.....	<b>27</b>
<b>Tabla 7-1-</b> Antibióticos que interfieren con la estabilidad de la membrana celular..	<b>28</b>
<b>Tabla 8-1.</b> Antibióticos que inhiben de la síntesis de proteínas.....	<b>29</b>
<b>Tabla 9-1</b> Antibióticos que inhiben la síntesis del ácido desoxirribonucleico.....	<b>29</b>
<b>Tabla 10-1.</b> Antibióticos inhibidores del metabolismo del ácido fólico.....	<b>29</b>
<b>Tabla 11-1.</b> Principales Fármacos antimicóticos y sus características.....	<b>30</b>
<b>Tabla 12-3.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico de los bulbos de <i>C. amabile</i> .....	<b>43</b>
<b>Tabla 13-3.</b> Resultados de rendimiento del proceso de extracción de <i>C. amabile</i> ...	<b>44</b>
<b>Tabla 14-3.</b> Perfil de alcaloides identificados por C.G-EM de <i>C. amabile</i> .....	<b>45</b>
<b>Tabla 15-3</b> Concentración y dilución de extractos.....	<b>47</b>
<b>Tabla 16-3</b> Resultados de la esterilidad de los extractos.....	<b>48</b>
<b>Tabla 17-3.</b> Resultados del control de actividad antimicrobiana en solventes.....	<b>49</b>
<b>Tabla 18-3.</b> Resultados del ensayo antimicrobiano por difusión de disco.....	<b>49</b>
<b>Tabla 19-3.</b> Resultados del ensayo antimicrobiano por el método de microgotas....	<b>49</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1.</b> Alcaloides representativos de <i>Crinum x amabile</i> .....	8
<b>Figura 2-1.</b> Estructura Bacteriana interne y externa.....	13
<b>Figura 3-1.</b> Tinción Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
<b>Figura 4-1.</b> Crecimiento de <i>S. aureus</i> en agar sangre de cordero.....	20
<b>Figura 5-1.</b> Tinción Gram de <i>Escherichia coli</i> .....	20
<b>Figura 6-1.</b> Crecimiento de <i>E. coli</i> sobre agar sangre de cordero.....	22
<b>Figura 7-1.</b> Microfotografía de las células de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ....	22
<b>Figura 8-1.</b> Crecimiento de <i>K. pneumoniae</i> sobre agar MacConkey.....	23
<b>Figura 9-1.</b> Cultivo de <i>P. aeruginosa</i> en agar Mueller Hinton.....	24
<b>Figura 10-1.</b> Crecimiento de <i>S. typhi</i> en agar McConkey.....	24
<b>Figura 11-1.</b> <i>Candida albicans</i> en forma de levadura, hifas y pseudohifas.....	25

## INDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfico 1-2.</b> Realización de extractos para tamizaje fitoquímico.....	<b>33</b>
<b>Gráfica 2-2.</b> Reacciones realizadas correspondientes al extracto etéreo.....	<b>33</b>
<b>Gráfica 3-2.</b> Reacciones realizadas correspondientes al extracto alcohólico.....	<b>34</b>
<b>Gráfica 4.2.</b> Reacciones realizadas correspondientes al extracto acuoso.....	<b>34</b>
<b>Gráfica 5-2.</b> Proceso de extracción del extracto bruto de alcaloides (EBA).....	<b>39</b>
<b>Gráfica 6-3.</b> Porcentajes de rendimiento del proceso de extracción del EBM.....	<b>45</b>
<b>Gráfica 7-3.</b> Rendimiento de extracción del extracto de alcaloides.....	<b>45</b>
<b>Gráfica 8-3.</b> Resultados del ensayo antimicrobiano por difusión de disco.....	<b>50</b>
<b>Gráfica 9-3.</b> Resultados del ensayo antimicrobiano por microgotas.....	<b>51</b>

## **INDICE DE ANEXOS**

**ANEXOS A.** Tamizaje fitoquímico de los bulbos de *Crinum x amabile*

**ANEXOS B:** Obtención del extracto bruto de alcaloides

**ANEXO C:** Concentración de los extracto

**ANEXO D:** Preparación de los medios de cultivos

**ANEXO E:** Preparación de cepas de microorganismos

**ANEXOS F:** Evaluación de la actividad antimicrobiana

**ANEXOS G:** Resultados de la actividad antimicrobiana

**ANEXOS H:** Incubación de los medios de cultivo sembrados

**ANEXO I.** Autorización de movilización de muestras colectadas

## RESUMEN

El objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de *Crinum x amabile*, se recolectó la materia vegetal en el cantón Muisne perteneciente a la provincia de Esmeraldas, el acondicionamiento se lo ejecutó en los laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Se realizó un tamizaje fitoquímico de los bulbos de la planta. Se elaboró para el desarrollo de los ensayos un extracto metanólico mediante maceración y baño de ultrasonido y otro en el cual se purificó la fracción de alcaloides mediante el uso de solventes orgánicos y cambio de pH, fueron desecados con un rotavapor a 40°C. La fracción de alcaloides fue analizada por cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (CG-EM) para obtener el perfil de alcaloides. El ensayo de la actividad antimicrobiana se ejecutó mediante el método de microgotas y difusión disco de discos utilizando los extractos disueltos en una solución de Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 10% en agua destilada contra los microorganismos: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, esta actividad fue comparada contra discos de antibióticos de gentamicina (10 µg), ampicilina (10 µg) y el antimicótico comercial fluconazol (2mg/mL) y como controles negativos agua destilada y la solución de DMSO al 10%. Con la CG-EM se obtuvo como alcaloide mayoritario a la licorina con una abundancia superior (44%), le precede la assoanina con un 11,63%. En cuanto a la actividad antimicrobiana por el método de difusión de discos se obtuvieron mejores halos de inhibición en los extracto bruto de alcaloides en las concertaciones analizadas de 700 µg contra *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*, se observó un diámetro de inhibición mínimo para *E. coli* y *C. albicans*. En el método de microgotas no se consiguió buenos resultados debido a las bajas concentraciones empleadas.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA>, <LIRIO (*Crinum x amabile*)>, <MÉTODO DE MICROGOTAS>, <MÉTODO DE DIFUSIÓN DE DISCOS>

## SUMMARY

The purpose of the research was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of *Crinum x amabile* extracts, the vegetal matter was collected in Muisne County belong to Esmeraldas Province, the conditions was carried out in the laboratories of Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. A phytochemical screening of the plant bulbs was carried out. For the development of the test, it was necessary to elaborate a methanolic extract through maceration and ultrasonic bath and other in which the fraction of alkaloids was purified with the use of organic solvents and change the pH; these were dried with a rotatory evaporator at 40°C. The fraction of alkaloids was analyzed through gas chromatography coupled to mass spectroscopy (CG-EM) to obtain the alkaloids profile. The test of antimicrobial activity was carried out with the micro drop and disc diffusion method, using the extracts solved in a Dimethyl Sulfoxide solution (DMSO) at 10% as well as distilled water for *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, and *Candida albicans* microorganisms. This activity was compared with antibiotics discs of gentamicin (10 ug), ampicillin (10 ug), and fluconazole (commercial anti-fungal agent) (2 mg/ml), and as negative controls were distilled water and the DMSO solution at 10 %. With the CG-EM, it was possible to obtain lycorine with higher abundase of 44% as the principal alkaloid, followed by the assoanine with halos were obtained in the gross extract of alkaloids in the concentrations analyzed of 700 ug for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. typhi*, a minimal diameter for *E.coli* and *C. albicans* also observed. The micro drops method did not reflect good results due to low concentrations used.

**Key words:** <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <ANTIMICROBIAL ACTIVITY>, <LILY (*Crinum x amabile*)>, <MICRO DROPS METHOD>, <DISC DIFUSSION METHOD>

## INTRODUCCIÓN

Según la OMS las diarreas, infecciones nosocomiales y del tracto respiratorio conforman los principales motivos de muerte en países en vía de desarrollo.(World Health Organization, 2015). Las enfermedades infecciosas son la causa más común de mortalidad en la población ecuatoriana, siendo la neumonía y la influenza en el 2006 la segunda causa de muerte (5,5%) lo cual representa el principal motivo de las consultas médicas, estas infecciones generalmente son causadas por virus, bacterias y hongos.(OPS, 2006)

En nuestro país el conocimiento ancestral sobre la utilización de las plantas medicinales se ha transmitido con el paso del tiempo entre los habitantes de las diferentes etnias y razas como: indígenas, mestizos y afro ecuatorianos. Estos conocimientos representan la cultura y sabiduría de cada región, lo cual es el pilar fundamental del desarrollo de la etnobotánica.

La frecuencia elevada de enfermedades infecciosas en la población mundial obliga al hombre a relacionarse con su medio ambiente, en varias oportunidades estas infecciones son tratadas con medicina natural, gracias al conocimiento de sus propiedades terapéuticas, hace que surja la pregunta: ¿Cuáles son esos principios activos capaces de combatir y subyugar a los microorganismos responsables?

La finalidad de este trabajo es proporcionar una herramienta para futuras investigaciones en el tratamiento de enfermedades infecciosas, siendo las principales causas de morbi/mortalidad en el país

Cabe recalcar que las enfermedades infecciosas afectan en mayor cantidad a las poblaciones susceptibles tales como ancianos y niños debido a que sus sistemas inmunológicos en el caso de los niños están disminuidos y en el de los ancianos se encuentran muy debilitados.

Además actualmente existen problemas con la resistencia múltiple a los antibióticos lo cual se ha producido debido al uso indiscriminado los mismos, medicamentos que son usados para el tratamiento de enfermedades infecciosas (PAHO Publications, 2004). Esto ocurre debido a la falta de profesionales farmacéuticos en la dispensación también a la inexistencia de sanciones en la regulación de la venta de antimicrobianos en las farmacias.

Los antibióticos están asociados directamente con la resistencia antimicrobiana aparte de los efectos adversos tales como problemas renales y reacciones alérgicas (Ilavenil, S, B.

Kaleeswaran, B. and Ravikumar, 2010). Debido a estos problemas se ha visto la necesidad de realizar investigaciones para buscar nuevas sustancias con actividades antimicrobianas en fuentes de origen vegetal.

De acuerdo a la inclinación mundial en el desarrollo de investigaciones sobre actividades biológicas con utilidad social, se ha direccionado realizar estudios sobre la familia vegetal de las amarilidáceas, puesto que en este país no existen antecedentes de trabajos sobre efectos terapéuticos en esta familia, por lo tanto es muy importante redirigir la atención de los programas de investigación en estudiantes de bioquímica y farmacia.

Con respecto a las líneas de investigación propuestas por el Ministerio de Salud del Ecuador 2013 -2017, se encuentra como una de sus prioridades el desarrollo de nuevas investigaciones para la lucha contra enfermedades infecciosas comunes en especial las que afectan a las vías respiratorias altas y bajas (Organización Mundial De La Salud, 2017). De esta forma la realización de este trabajo evidentemente contribuirá con el cumplimiento del plan nacional del buen vivir, contribuyendo con el objetivo de la mejora en la calidad de vida de la población.

Por estas razones se ha visto la necesidad de realizar esta investigación sobre esta especie vegetal, dado que en la cual existe la evidencia científica de presentar actividades antimicrobianas basados en la etnobotánica ecuatoriana (De La Torre et al., 2008) y de acuerdo a investigaciones previas sobre las especies vegetales de la familia Amarillidaceae en especial se destaca para este trabajo el género *Crinum* debido a que se ha de mostrado la presencia de alcaloides isoquinolínicos con actividades antimicrobianas, antitumorales y anticolinérgicas (Pham et al., 1998).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de bulbos de *Crinum x amabile*.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico.
- Obtener los extractos metanólico y extracto bruto de alcaloides mediante el uso de solventes con cambios de pH.
- Determinar el perfil de alcaloides mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG.EM).
- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos de *Crinum x amabile* contra patógenos humanos a través de los métodos de difusión de discos y microgotas.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Especies vegetales como antimicrobianos

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).

La familia de las amarilidáceas en particular el género *Crinum* el cual está constituido de aproximadamente 160 especies distribuidas en regiones tropicales y cálidas de todo el mundo (Thi Ngoc Tram et al., 2002).

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 las usaba para el tratamiento de infecciones intestinales (De La Torre et al., 2008), las culturas vietnamitas utilizan esta misma especie (*C. amabile*) para tratar el reumatismo, el dolor de oído (Fennell y Van Staden, 2001). En la India se usa los bulbos de la *C. asiaticum* como laxante, expectorante y en el tratamiento de infecciones urinarias (Fennell y Van Staden, 2001; Thi Ngoc Tram et al., 2002).

Varias de estas especies ha sido involucradas en numerosos estudios fitoquímicos debido al valor biológico y actividades terapéuticas que son características de su familia, en la cual se han analizado los componente químicos que presenta, los componentes que según Jeralt, Nair y colaboradores han resaltado son los alcaloides, los más representativo que se han estudiado son lycorina, galanthamina y bufasinisina (Thi Ngoc Tram et al., 2002; Donatien Gatsing, et al, 2009).

Un estudio realizado por Pham, L y colaboradores, sobre conformación alcaloidal de la *C. Amabile* procedente de Vietnam, este estudio muestra que esta especie está constituidas principalmente por Lycorina, bufasinisina, augustina. Además se demuestra que en esta especie se han hallado dos nuevos alcaloides con una estructura crinan-triol y diol los cuales fueron denominados crinamabina (Pham et al., 1998).

### ***1.1.2 Fitoterapia***

Ciencia encargada de la investigación de efectos terapéuticos en agentes de orígenes vegetales con la finalidad de aliviar, prevenir o paliar enfermedades en su mayoría leves y el uso como coadyuvantes en afecciones crónicas, con base en la etnobotánica de las diferentes regiones del mundo.

Es imprescindible identificar la definición de planta medicinal y droga vegetal puesto que son contextos distintos. como definición de planta medicinal se ha establecido que es aquella planta que posee o supone actividad biológica en un o todos sus órganos y es usada con fines terapéuticos, por otro lado se entiende por droga vegetal a la parte u órgano de la planta medicinal con actividad terapéutica (Baulies Romero y Torres Castilla, 2012, pp.149-153 ).

Las plantas medicinales contienen una serie de sustancias activas con utilidad terapéutica en los cuales se basa la existencia de la fitoterapia, el uso de drogas vegetales en tratamientos suponen la causa de menos efectos negativos y una agresividad mínima para el paciente. La investigación de estos principios activos han demostrado la existencias de propiedades terapéuticas y de sustancias sinérgicas que son extraídos y utilizadas a partir de plantas medicinales en forma de fitomedicamentos en su mayoría o solo como en forma de drogas vegetales. (Baulies Romero y Torres Castilla, 2012b)

### ***1.1.3 Métodos de extracción de componentes***

Para hacer uso de los beneficios de las plantas medicinales o potenciar sus efectos es importante realizar la extracción o separación del principio activo del resto de componentes de la droga vegetal. Para realizar estos procedimientos es necesario hacer uso de métodos físicos o la utilización de solventes químicos donde se implica el fenómeno de difusión, en el cual participa la ley de Fick, en el cual componentes activos inmersos en la célula migrarán al solvente de extracción.

La extracción con disolventes es el método más usado en la purificación de estas sustancias activas está basado en la utilización de solventes orgánicos de extracción de naturaleza semejante a las sustancias activas a extraer, En el desarrollo de extracciones de este tipo es necesario controlar parámetros tales como la temperatura, el tiempo de extracción y en algunos casos la presión atmosférica.

Existen diferentes tipos de extracción con disolventes orgánicos donde destacan las siguientes: las extracciones discontinuas y continuas.

Se entiende por extracción discontinua al procedimiento en donde la droga vegetal es inmersa completamente en el disolvente orgánico, donde los componentes que se encuentra en el interior de las células migran hacia el disolvente orgánico hasta conseguir un equilibrio, como ejemplo de ello se tiene a la maceración, mientras que en la extracción continua está basada en el arrastre de los principios activos por el uso de disolventes, como ejemplo del se tiene a el método de soxhlet y el uso del evaporador rotatorio (Bruneton, 2001).

#### ***1.1.4 Actividad Antibacteriana de Plantas***

Durante muchos siglos el ser humano ha hecho uso de las plantas medicinales en 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.

Las plantas producen un gran número de sustancias de bajo peso molecular denominadas metabolitos secundarios distintos a las moléculas de la vida ya conocidas, dentro de estos metabolitos secundarios, en los cuales se resaltan a los metabolitos con acción antimicrobiana, en donde se diferencian dos tipos las fitoanticipinas presentes durante toda la vida de la planta y las fitoalexinas que son sustancias producidas a causa de estímulos provocados por el microorganismos, dichas sustancias durante la ejecución de un análisis o identificación tienden a variar su concentración debido a su origen y a las especie vegetal.

Las fitoalexinas pueden producirse en grandes cantidades en presencia de microorganismos patógenos con el objetivo de eliminarlos. Estas descripciones corresponden a la actividad antimicrobiana en vivo puesto que in vitro como lo explicado anteriormente surgen complicaciones relacionadas en la concentración de las fitoalexinas (Domingo y Lopez-brea, 2003).

#### ***1.1.5 Alcaloides***

La expresión alcaloide se estableció para distinguir las sustancias de origen vegetal que reaccionan como bases, como los álcalis, etimológicamente proviene de los términos árabes al kaly, significa sosa y del griego eidos, el aspecto.

Generalmente son metabolitos secundarios nitrogenados naturales. Se definen como sustancias nitrogenadas, de carácter básico, de origen natural y de distribución particular, estas sustancias tienen una estructura compleja. El nitrógeno de su estructura forma un sistema heterocíclico y es el responsable de la actividad farmacológica, los aminoácidos son precursores naturales de alcaloides

Los alcaloides rara vez se encuentran en las bacterias (piocianina en *Pseudomonas aeruginosa*), son muy escasamente en hongos (psilocina en los hongos alucinógenos americanos). Los alcaloides se hallan básicamente en las Angiospermas, en porcentajes entre el 10-15% del peso total de la planta.

Cierto tipo de familias tienen una evidente predilección para producir alcaloides; esto sucede tanto en las Monocotiledóneas (*Amaryllidaceae*, *Liliaceae*) como en las Dicotiledóneas, (*Fumariaceae*, *Lauraceae*, *Loganiaceae*, *Magnoliaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, etc.). Varios géneros en estas familias contienen alcaloides mientras que otros se encuentran carentes de ellos.

Además existen alcaloides que son propios limitados de géneros pertenecientes a una familia (hiosciamina) o de un conjunto de especies de un mismo género (tebaína); también constan alcaloides son muy específicos como los opiáceos (morfina). La cantidad de alcaloides presentes en las especies vegetales varía ampliamente entre una y otra. En las plantas casi nunca domina un único alcaloide: en algunos casos existe uno en cantidades mayores a los demás, pero normalmente se encuentran presentes cantidades numerosas.

Generalmente, todos los alcaloides de una misma planta sufren un origen idéntico aunque sus estructuras presenten muchas diferencias. También, la producción y concentración de alcaloides puede ser distinta en cada órgano de la planta. Se observan variaciones cualitativas frecuentes: no es raro que los diferentes órganos de una planta contengan alcaloides diferentes (Bruneton, 2001).

En el interior de la células vegetales, los alcaloides están presentes en forma soluble, es decir en sales o combinados con taninos. La alcalinidad y las acciones antimetabólicas de la mayoría de estas sustancias implican que se almacenen normalmente en las vacuolas de la célula. Habitualmente la biosíntesis de los alcaloide ocurre fuera del lugar de almacenamiento y consecutivamente son distribuyen a su zona de almacenamiento (Bruneton, 2001).

## **1.2 *Crinum x amabile***

### 1.2.1 Descripción botánica

La *Crinum x amabile* es una herbácea perteneciente a la familia de las amarilidáceas, está 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, antimalárico, antimicrobiano y para tratar el reumatismo (De La Torre *et al.*, 2008; Pham *et al.*, 1998).

Es una especie vegetales perennes que están formada por bulbos gruesos alcanzando hasta 15 cm en su diámetro. Hojas son muy largas, planas y dispuestas en rosetas. Tiene flores grandes de coloraciones rojas, rosadas o blancas que acompañan a los bulbos, son intensamente atractivas, hermafroditas y actinomorfas; el perignio está formado por 6 téalos ensamblados, integrando un tubo abierto o cilíndrico, los estambres exponen filamentos y anteras inestables

### 1.2.2 Taxonomía

Tabla 1-1. Taxonomía de *Crinum x amabile*

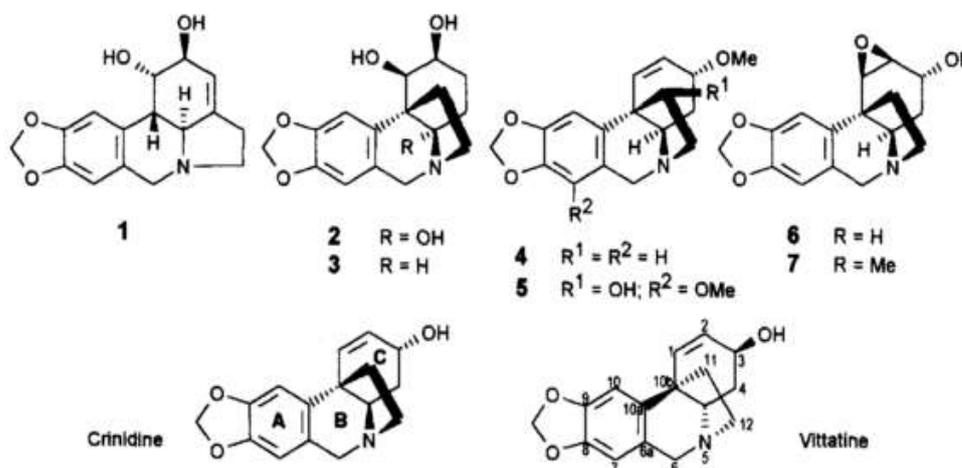
Taxonomía	
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Subreino:</b>	Tracheobionta
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Subclase:</b>	Liliidae
<b>Orden:</b>	Asparagales
<b>Familia:</b>	Amaryllidaceae
<b>Género:</b>	<i>Crinum</i>
<b>Especie:</b>	<i>Crinum x amabile</i> Donn ex Ker Gawl.

**Fuente:** (Maroyi, 2016)

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018

### 1.2.3 Alcaloides de *Crinum x amabile*

De acuerdo con investigaciones realizadas se ha descrito aislamiento de alcaloides con actividades antitumorales, antivíricas, antimicrobianas y anticolinérgicas de los bulbos secos de *C. amabile* de los cuales se destacan: licorina, buphanisine, amabellina, augustina, flexinina, crinamina y crinamabina que son los principales (Pham et al., 1998).



**Figura 1-1.** Alcaloides representativos de *Crinum x amabile* (1. Licorina; 2. Crinamabina; 3. Crinamina; 4. Buphanisine; 5. Amabellina; 6. Flexinina; 7. Augustina.)

Fuente: (Pham et al., 1998)

#### 1.2.4 Utilidad terapéutica

Los alcaloides de esta especie se usan en ampliamente en la medicina tradicional existen varias investigaciones realizadas sobre estos componentes en Asia, África y América del sur, la siguiente tabla muestra las actividades terapéuticas basadas en estudios previos de los principales alcaloides de *Crinum x amabile* (Maroyi, 2016; KITTISAK et al., 1993).

**Tabla 2-1.** Utilidad terapéutica de alcaloides de *Crinum amabile*.

Alcaloide	Acción
Amebellina	inmunoestimulante moderada
Crinamina	Antineoplásica moderada sobre leucemia
Crinasiadina	Bacteriostática
Crinasiatina	Bacteriostática
Licorina	Antiprotozoaria, antivírica, inmunomoduladora
Ungeremina	antineoplásica, antibacteriana

Fuente: (Fuster, 1994; Maroyi, 2016; Fennell y Van Staden, 2001)

Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018

### **1.3 Enfermedades infecciosas**

Estas patologías se definen como las interacciones entre microorganismos, el huésped humano y el medio ambiente, la cual causa daños fisiológicos en el tejidos celular con la aparición de expresiones clínicas mediante la capacidad de estos microorganismos de generar la infección dependen de sus factores virulentos, aspectos inmunitarios del huésped, la sensibilidad genética, además de las características físicas de las condiciones de vida del individuo. Estas enfermedades son transferibles de forma directa o indirectamente en la población humana (Restrepo et al., 2003).

#### ***1.3.1 Mecanismos de transmisión***

Ocurren principalmente por dos maneras tales como: Transmisión directa y transmisión indirecta.

El movimiento de la patología del origen de la infección al individuo saludable, sin interrupción y de modo inmediata se denomina como transmisión directa, mientras que cuando existe un fase de tiempo y espacio entre contagio de la enfermedad desde el origen de infección hacia una individuo susceptible se conoce como transmisión indirecta (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005).

#### ***1.3.2 Mecanismos de respuesta ante la infección***

La defensa innata es la primera protección contra todas las infecciones, este mecanismo es muy importante pero sin especificidad, está constituido por barreras físicas en las cuales destacamos a la piel, cabello, bellos y uñas como los principales, también constan de fluidos corporales y células del sistema inmune. La deficiencia de este mecanismo es la dificultad para desarrollar una memoria inmunológica (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005; Restrepo et al., 2003).

La piel y los fluidos corporales al ser las primeras barreras de interacción con los microorganismos presentan diferentes tipos de mecanismos como en el caso los desmosomas se encargan de unir fuertemente las células epiteliales manteniéndolas herméticos para así evitar el paso de microorganismos. También la piel al mantener un pH ácido destruye gran parte de las bacterias que intentan entrar (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005).

Un caso similar sucede en el aparato gastrointestinal que posee un pH muy ácido el cual resulta ser una eficiente barrera bactericida para varios tipos de microorganismos que ingresan por esta vía. De la misma manera la vagina esta se encuentra protegida por la acidez de su medio la cual es causada por la microbiota natural (Restrepo et al., 2003).

Las defensas adaptativas, también denominados específicos o adquiridos, como los señala su nombre, son aquellos capaces de reconocer los materiales foráneos con un alto grado de especificidad.

La propiedad más llamativa que poseen los mecanismos adaptativos es la capacidad de proveer una adaptación al medio, es decir, de mostrar respuestas inmunes cada vez mayores y más eficientes ante el estímulo repetido por parte de un mismo antígeno, o cuando un organismo se va poniendo en contacto con diferentes agentes patógenos y no es hereditaria.. Esta propiedad es conocida como la memoria inmunológica, un ejemplo específico es el uso de vacunas (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005).

### 1.3.3 Tipos de enfermedades infecciosas

Las patologías infecciosas son causadas por el paso y proliferación de bacterias, virus y hongos patógenos. Este trabajo se basa en el estudio de las infecciones bacterianas y fúngicas.

La mayor cantidad de infecciones bacterianas son causadas por bacterias ajenas a las de la microbiota normal del ser humano, como es el caso de la *Klebsiella pneumoniae* la cual es responsable de las neumonía. La *Escherichia coli* debido a su capacidad para erradicarse en el colon y vías urinarias es la principal causantes de enteritis y de infecciones en las vías urinarias. Asimismo como es el caso del *Streptococcus pyogenes* que son los responsables de causar infecciones en el tracto respiratorio alto y *Staphylococcus aureus* que producen la escarlatina en los seres humanos (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005).

**Tabla 3-1.-** Algunas enfermedades infecciosas causadas por bacterias.

<b>BACTERIAS</b>	<b>ENFERMEDADES</b>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Clostridium Difficile</i>	colitis psudomembranosa
<i>Staphilococcus aureus</i>	Enteritis, Síndrome de shock séptico, síndrome de piel estalada
<i>Staphilococcus pyogenes</i>	Escarlatina
<i>Pseudomona auroginos</i>	Infecciones variadas
<i>Shigella dysenteriae</i>	Enteritis

Fuente: (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005)

Las infecciones fúngicas son poco frecuentes debido a que el ser humano se encuentra en constante contacto con hongos y sus esporas, pero existen hongos patógenos que generan infecciones en el individuo tales como la *Candida albicans*, *Dermatophytes*, y hongos dimórficos (PAHO Publications, 2004).

Estos hongos principalmente causan infecciones en los tejidos epiteliales y las mucosas en zonas cutáneas húmedas y roce, estos problemas son causados principalmente por dermatofitos y *Candida*. Ciertos hongos presenta una efecto de acción infecciosa dimórfica, lo cual quiere decir que estos hongos invaden y se adaptan a ciertos tejidos del cuerpo formando filamentos en forma de levaduras, donde se proliferan, estos hongos son los causantes de infecciones pulmonares por la inhalación de sus esporas, los hongos responsables de estos efectos son el *Histoplasma* o *Coccidioides* los cuales crecen en forma filamentosa (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005).

#### ***1.3.4 Agentes infecciosos***

Los agentes causantes de estas patologías se dividen en dos grupos lo que forman parte de la microbiota normal del individuo y los patógenos externos que son los responsables de las principales enfermedades infecciosas los cuales ingresan del medio ambiente al huésped susceptible, entre los agentes infecciosos tenemos las bacterias, hongos (principales grupos de estudio) y virus

#### ***1.3.5 Bacterias***

Son organismos unicelulares constituidos por células procariotas de tamaño entre 0,2 – 5  $\mu\text{m}$ , poseen reproducción binaria, además presentan mecanismos de producción de energía y material genético. Son considerados como los organismos más abundantes que existen en la tierra. Estos organismos debido a sus características estructurales pueden cohabitar con otros tipos de organismos y además con organismos superiores. (Gray Young, 1969; Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005).

##### ***1.3.5.1 Estructura bacteriana***

Las bacterias están constituidas principalmente por: pared celular, la membrana celular, citoplasma, periplasma, ribosomas y nucleóide, también por estructuras variables que se

encuentran generalmente en la pared celular las cuales son: los pilis, flagelos, la cápsula y los poros (Tortora, Funke y Case, 2007).

La pared celular o bacteriana es de gran utilidad para la bacteria, es la que le brinda las propiedades de rigidez y elasticidad por ende son las responsables de la forma de la bacteria, es la principal barrera de protección de la bacteria (Montoya Villafane, 2008), Algunos antibióticos impiden su crecimiento causando una lisis en la célula bacteriana.

Para identificar la pared bacteriana se utiliza la llamada tinción Gram desarrollada en 1883 por Christian Gram mediante la cual se distingue entre las Gram positivas y Gram negativas, que difieren entre sí por su contenido de aminoazúcares tales como N-Acetil murámico (NAM) y N-acetil glucosamina (NAG) entrelazados con péptidoglicanos, en la cual difieren en el grosor de la capa del NAM, puesto que en las bacterias Gram positivas esta capa oscila entre 15 a 80 nm y en las Gram negativas esta entre 5 – 10 nm (Madigan, John y Parker, 2009). Además los compuestos fundamentales para que ocurra la tinción son los ácidos teicoicos que se encuentra en las bacterias Gram positivas (Tortora, Funke y Case, 2007).

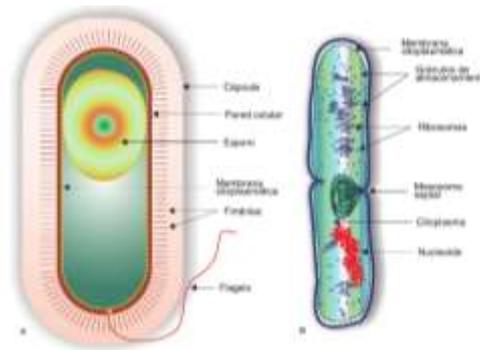
La cápsula o glucocalix es una sustancia pegajosa y viscosa, proveen protección a la bacteria evitando que algunas sustancias penetren a la célula como antibióticos, interfiere en la fagocitosis de las células de defensa del organismo y su capacidad antigénica (antígeno K) este mecanismo favorece la virulencia de las bacterias debido a que va a facilitar su multiplicación en el organismo (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005; Montoya Villafane, 2008).

Los flagelos son fibras proteicas que poseen algunas bacterias, son apéndice que se utilizan para la locomoción de las bacterias, están compuestos por un filamento largo externo de proteína globular conocida como flagelina formando un largo cilindro hueco y este se encuentra unido a la pared celular por el cuerpo basal la proteína presente en los flagelos le confiere funciones inmunes a la bacteria (antígeno H) (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005).

Las pili fimbrias son apéndices externos filamentosos huecos formados por la acumulación de muchas subunidades de proteínas, cumplen funciones muy importantes como la fijación y transporte de ADN además de la motilidad, además contiene un carácter antigénico (Tortora, Funke y Case, 2007).

La membrana celular o citoplasmática se encuentra recubierta por la pared, es una estructura indispensable para la vida bacteriana, está formada por una bicapa lipídica (fosfolípidos), proteínas y glucolípidos en menor proporción, esta membrana posee un espesor de 7,6 nm,

corresponde al 20 y 30 % del peso total de la célula (Montoya Villafane, 2008). En las bacterias la principal función de la membrana es controlar el paso de sustancias del interior al exterior y viceversa, además en la membrana citoplasmática ocurre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones los cuales son procesos generadores de energía (Madigan, John y Parker, 2009).



**Figura 2-1.** Estructura Bacteriana interna y externa

**Fuente:** (Montoya Villafane, 2008)

El citoplasma es una sustancia que se encuentra limitada por la membrana celular, está constituido principalmente por agua en un 80%, además contiene proteínas en su mayoría enzimas, hidratos de carbono, lípidos, iones metálicos y compuestos de bajo peso molecular. Es una sustancia semi-transparente, elástica, acuosa y espesa. En el citoplasma se encuentra la zona nuclear, que está constituida por ADN, ribosomas y nucleóide (Tortora, Funke y Case, 2007).

Los ribosomas se encuentran en células eucariontes y procariontes, constituyen el 25-30% del peso celular, su función principal es la síntesis de proteínas. Los ribosomas están formados por dos subunidades las cuales están constituidas por proteína y al ARN-ribosómico (ARN-r), los ribosomas de las células bacterianas se denomina 70 S, la letra S alude a la unidad Svedberg basada en la medición de velocidad de sedimentación durante una centrifugación ultrarrápida, por ende el ribosoma se divide en dos sub unidades un menor tamaño de 30S la cual posee una molécula de RNA-r y otra subunidad mayor tamaño 50S que tiene dos moléculas de RNA-r (Tortora, Funke y Case, 2007).

Algunos antibióticos inhiben la formación de estas proteínas, como es el caso de los aminoglucósidos los cuales atacan a la subunidad 30S y los macrólidos los cuales ejercen su acción sobre las subunidades 50S (Tortora, Funke y Case, 2007; Montoya Villafane, 2008).

En el nucleóide conocido también como zona nuclear se encuentra el ADN bacteriano, habitualmente esta zona contiene una sola fibra dispuesta circularmente la cual es llamada cromosoma bacteriano, esta estructura tiene como función almacenar el material genético responsable de todas las estructuras y funciones de la bacteria. Las bacterias son haploides y pese a la forma circular del ADN se transfiere en forma lineal a cada célula hija por fisión binaria (Gamazo, Sánchez y Camacho, 2013; Tortora, Funke y Case, 2007).

### 1.3.5.2 Clasificación

Las clasificaciones más comunes de las bacterias se basan en la forma de su pared bacteriana y su tipo de tinción Gram.

Tabla 4-1. Clasificación

bacteriana

TINCIÓN GRAM	FORMA
<b>Gram positivas</b>	Cocos
<b>Gram negativas</b>	bacilos
	espirilos

**Fuente:** (Montoya Villafane, 2008)

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

### 1.3.5.3 Enfermedades bacterianas más comunes en el Ecuador.

Según datos del Ministerio de Salud del Ecuador las infecciones respiratorias altas (IRAs) y las infecciones de las vías urinarias son las más prevalentes, mientras que en las zonas rurales y urbanas de la provincia de Chimborazo, las IRAs y las enfermedades diarreicas agudas son las principales causantes de la morbilidad y mortalidad infantil, sin dejar de lado el aumento de las infecciones nosocomiales en los últimos años lo cual eleva la probabilidad de generar resistencias bacterianas (Ministerio de Salud. MSP, 2015).

La enfermedad diarreica aguda se detalla como una modificación en la evacuación normal intestinal aumentando su frecuencia de deposición causando cambios en la consistencia de la materia fecal con una duración menor a 10 días, las causas de las EDA son las infecciones causadas por microorganismos relacionado con el consumo de alimentos intoxicados, siendo la infección de *Escherichia coli* la más común, la cual es responsable del 70% de estas enfermedades (Restrepo et al., 2003).

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) se sitúan entre las principales causas de morbilidad en la población general, y dentro de las 3 primeras causas en el Ecuador, por lo que es considerado un problema de salud pública. La mayor parte de estas infecciones afectan principalmente al tracto respiratorio produciendo enfermedades como: rinitis, faringitis, laringitis, epiglotitis y traqueobronquitis, de las infecciones causadas por bacterias como: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* entre otras, necesitan atención médica u hospitalaria debido a que puede generar enfermedades de carácter mortal como la neumonía.

Las infecciones respiratorias causadas por virus son más frecuentes pero en su mayoría son benignas y no requieren de un tratamiento específico debido a que tiene un tiempo de duración establecido, excepto (PAHO Publications, 2004; Restrepo et al., 2003; Prats, 2005).

Las infecciones nosocomiales son una importante causa de morbilidad principalmente en pacientes que se encuentran en unidades de cuidados intensivos, postquirúrgicas y pacientes muy graves que ingresan al hospital, la resistencia antimicrobiana es el principal problema que generan este tipo de infecciones causando repercusiones en el estado del paciente y en el hospital en los que refiere a costes y seguridad del personal.

Entre de las infecciones nosocomiales más comunes tenemos a: Bacteriemia primaria causada por *Staphylococcus aureus*, infección de las vías urinarias por *Pseudomonas aeruginosa*, neumonía nosocomial por bacterias Gram positivas y negativas e infecciones post quirúrgicas (Olaechea et al., 2010).

### **1.3.6 Hongos**

De manera distinta a las bacterias los hongos poseen una estructura más compleja, son microorganismos formados por células eucariotas, puesto que contienen un núcleo bien definido, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, difieren de otros organismos eucariotas por poseer una pared celular formada por glucano y quitina y también en su membrana contiene ergosterol en lugar de colesterol como la mayor parte de organismos eucarióticos. La mayor parte de estos organismos son aerobios obligados o facultativos, además son quimiotrofos.

Los hongos pueden encontrarse de manera un unicelular (levaduras) y en filamentos (moho) existen hongos que pueden encontrarse de estas dos formas son denominados dimórficos, se reproducen asexualmente y sexualmente en menor grado (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2006; Brooks et al., 2011).

### 1.3.6.1 Estructura y clasificación de hongos.

De acuerdo a su aspecto morfológico y su forma de crecimiento los hongos se dividen en levaduras y mohos. Las levaduras son hongos unicelulares de forma ovalada o esférica de diámetro que varía entre 3 – 16 micrómetros, su reproducción ocurre por gemación o fisión, algunas levaduras se reproducen por yemas (brotes) por ende no se separan de la célula madre formando una especie de cadena corta denominada pseudohifa. Se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, son colonias opacas de color crema con aspecto pulverulento (Brooks et al., 2011).

Mientras que los mohos son organismos pluricelulares que están dispuestas en forma de cadenas o filamentos de células unidas integradas por túbulos cilíndricos denominados hifas, poseen un diámetro de 3 a 10 micrómetros, al conjunto de hifas se le denomina micelio. Algunas hifas se encuentran divididas por tabiques o septos, estas hifas se conocen como tabicadas o septadas, mientras que las hifas que no poseen divisiones se denominan cenocíticas. Las hifas que intervienen en la absorción de nutrientes se denominan vegetativas, mientras que las estructuras que participan en la reproducción se nombran hifas reproductivas o aéreas (Tortora, Funke y Case, 2007; Brooks et al., 2011).

Los hongos presentan con una pared celular rígida que le proporciona su forma, están compuesta por carbohidratos glucoproteínas y lípidos. Durante los procesos infecciosos la pared proporciona fijación a la célula hospedera y los polisacáridos desencadenan los procesos inflamatorios, también la pared produce antígenos inmunodominantes que generan respuestas inmunitarias de tipo celular que son útiles en el diagnóstico (Brooks et al., 2011).

Localización	Infección	Hongos Responsables
<b>Superficiales</b>	Tiña	<i>Hortaea wenckii</i>
	Piedra blanca	<i>especies de trichosporon</i>
	Piedra negra	<i>Piedraia hortae</i>
<b>Cutaneas</b>	Dermatofitosis	<i>Microsporum, Trichosphyton</i>
	Candidiasis dérmica	<i>Candida sp.</i>
<b>Subcutaneas</b>	Esporotricosis	<i>Sporothrix schenckii</i>
	Micetoma	<i>Madurella mycetomatis</i>

<b>Endémicas</b>	Coccidioidomicosis	<i>Coccidioides sp</i>
	Histoplasmosis	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	Blastomicosis	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
<b>Oportunistas</b>	Candidosis sistémica	<i>Candida albicans sp</i>
	Criptococosis	<i>Cryptococcus neoformans y gattii</i>
	Aspergilosis	<i>Aspergillus fumigatus y otras</i>

**Tabla 5-1.** Principales hongos y sus infecciones en el ser humano

**Fuente:** (Brooks et al., 2011)

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018

Además de su reproducción vegetativa los hongos producen esporas sexuales o conidios que son fácilmente distribuibles en el medio ambiente, son muy resistentes y germinan cuando las condiciones de proliferación son adecuadas, los conidios son de producto de la reproducción sexual o asexual de los hongos (Brooks et al., 2011).

Aunque el ser humano se encuentra continuamente en contacto con esporas y hongo es poco frecuente obtener una micosis en el caso de un individuo sano, los casos más comunes en infecciones fúngicas están localizadas en la piel y en mucosas cutáneas húmedas (vaginal y oral), son causadas en su gran mayoría por dermatofitos, trichophyton, Microsporum, cándidas y otros hongos dimórficos, son infecciones que se caracterizan por no ser destruir las capas queratinizadas de la piel y mucosas.

Las micosis afectan en el plano estético como es el caso de la pitiriasis versicolor, que son lesione en forma de máculas en la piel, generalmente manchas oscuras, decoloraciones y descamaciones. También es el caso de afecciones como la piedra negra y blanca las cuales causan la aparición de nódulos en el cabello (Ausin Ruiz y Moreno Guillén, 2005; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2006).

#### 1.3.6.2 Infecciones fúngicas más comunes en Ecuador

Según datos del ministerio de salud ecuatoriano las micosis superficiales son las principales causas de morbilidad, de las cuales la candidiasis vaginal y oral destaca con mayor incidencia dentro de este grupo (Ministerio de Salud. MSP, 2015).

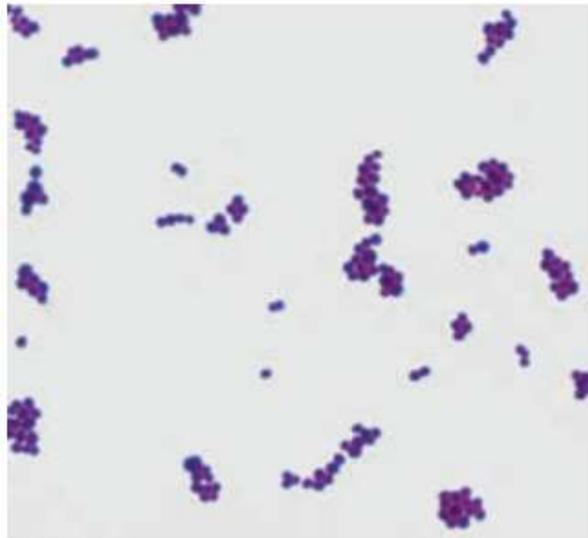
La vaginitis micótica causada generalmente por *Candida albicans* presenta principalmente prurito y secreciones amarillentas, estas infecciones están relacionadas al uso de antibióticos y otros factores como los de higiene y ambientales, estos factores también se asocian a la candidiasis oral. En pacientes que tienen su sistema inmunológico comprometido como es el caso de pacientes con sida y otros, pueden presentarse candidiasis orales y esofágicas muy graves (Prats, 2005).

Las dermatofitosis son unas de las micosis superficiales más comunes, las cuales se caracterizan por causar daños estéticos en cabellos y uñas, dando lugar a diferentes tipos e lesiones epiteliales tales como: eritematosas, hiperqueratinosas, vesiculares, agrietadas y entre otras (Prats, 2005).

### ***1.3.7 Cepas microbianas en estudio***

En este trabajo de investigación se estudiaron seis tipos de cepas de microorganismos las cuales son: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*.

#### ***1.3.7.1 Staphylococcus aureus***



**Figura 3-1.** Tinción Gram de *Staphylococcus aureus*

**Fuente:** (Harvey, Champe y Fisher, 2008).

#### ***1.3.7.1.1 Morfología y virulencia***

*S. aureus* son cocos Gram positivos que pertenece a un grupo heterogéneo de bacterias muy virulentas para el ser humano. Presenta colonias circulares de 0,7 a 12 micrómetros en forma de racimo irregular de color dorado, son catalasa positivos debido a que poseen enzimas que desdoblan el peróxidos de hidrogeno en agua y oxigeno gaseoso, además tienen la capacidad de coagular el plasma sanguíneo puesto que poseen una enzima llamada coagulasa que cataliza la transformación de los factores sérico de fibrinógeno en fibrina formando un coagulo, este tipo de bacterias son conocidas como coagulasa positivas.

Posee una capa gruesa de péptido glucanos cubierta de polisacáridos y proteínas las cuales contribuyen a su factor de virulencia, entre estas proteínas se encuentran las enzimas cogulasas y catalasas, también en esta cubierta se encuentra la proteína A que aporta en la virulencia evitando que el *S. aureus* sea fagocitado.

Entre las toxinas producidas por el *S. aureus* las más comunes son denominadas exotoxinas citolíticas, superantigénicas y las enterotoxinas. Las toxinas citolíticas causan daños en la pared celular de las células humanas, estas toxinas también son conocidas hemolisinas debido a su capacidad por romper la membrana de hematíes, leucocitos, plaquetas y macrófagos. En cuanto a las toxinas superantigénicas estafilocócicas estas estimulan el efecto inmunitario de respuesta de los linfocitos T aumentando la producción de citosinas, que se destaca la toxina del síndrome del shock toxico (TSST-1) la cual es la principal causante del mismo síndrome.

Mientras que las enterotoxinas son las principales contaminantes de alimentos, son la inductoras de los síntomas gastrointestinales como el vómito en animales y humanos, estas toxinas son muy importantes debido a que unas ves formadas son estables a las temperaturas de ebullición y a los ácidos gástricos (Harvey, Champe y Fisher, 2008; Kenneth J et al., 2011).

#### *1.3.7.1.2 Epidemiología*

El *S. aureus* forma parte de la microbiota normal de la piel y mucosas del ser humano, por ende las infecciones son por contacto directo del portador, debido a que se propagan por deficiencias en la higiene de los individuos, de esta forma también ocurre la contaminación en la manipulación de alimentos (Harvey, Champe y Fisher, 2008).

La propagación hospitalaria de *S. aureus* genera gran importancia debido a la existencia de cepas resistentes a los antibióticos, puesto que existen muchos paciente que se encuentran en estado de riesgo como recién nacidos, pacientes postquirúrgicos y de cuidados intensivos, puede

generar estados críticos y mortales en esta población de pacientes, además de causar grandes pérdidas para económicas en los sistemas de salud (Brooks et al., 2011).

#### 1.3.7.1.3 Condiciones de crecimiento

Las cepas de *S. aureus* crecen con facilidad en el agar sangre de cordero a una temperatura de 37 °C aproximadamente, después de 18 horas se puede observar las colonias ya formadas con hemólisis y con su coloración específica de gris a dorado. Es posible aislar estas bacterias utilizando como complemento manitol y cloruro de sodio al 7,5 % (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2006).



**Figura 4-1.** Crecimiento de *S. aureus* en agar sangre de cordero.

**Fuente:** (Brooks et al., 2011)

#### 1.3.7.2 *Escherichia coli*



**Figura 5-1.** Tinción Gram de *Escherichia coli*

**Fuente:** (Brooks et al., 2011)

#### 1.3.7.2.1 Morfología y virulencia

Son bacterias Gram negativas que pertenecen a la familia de enterobacterias, se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, forman parte de la microbiota natural del organismo específicamente la mayor cantidad de estas bacterias radican en el colon. Son bacilos de 2 a 3 micrómetros, poseen cápsula o microcápsula, además poseen fimbrias pili que sirven para fijarse a las superficies celulares de organismo hospedero. Son anaerobias facultativas reductoras de nitritos a nitratos.

Esta bacteria da resultados positivos para el test de indol, lisina descarboxilada, fermentación de manitol, en la prueba de citocromo oxidasa da como resultado negativo, debido a la falta de esta enzima en su estructura, genera gases con el metabolismo de lactosa y glucosa. La *E. coli* es responsable de la mayor parte de las infecciones urinarias y gastroenteritis, también enfermedades como septicemia y meningitis (Luis, García y Cortina, [sin fecha]; Brooks et al., 2011; Harvey, Champe y Fisher, 2008).

La virulencia de *E. coli* se caracteriza principalmente por las toxinas que produce, esta bacteria es capaz de producir la mayor parte de toxinas que hay entre las enterobacterias las cuales incluyen: inhibidores de la síntesis de proteínas, citotoxinas formadoras de poros y varias sustancias que intervienen en la transmisión de mensajeros de las células del organismo hospedero.

En los últimos años se han descubierto que existen diferentes cepas de esta misma bacteria las se dominan *E. coli*: Enteropatógena (EPEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enterotóxicas (ETEC) y Enteroadherentes (EAEC), siguen siendo la misma bacteria pero presentan características distintivas en la producción de ciertas sustancias (Kenneth J *et al.*, 2011; Harvey, Champe y Fisher, 2008).

#### 1.3.7.2.2 Epidemiología

La *E. coli* es la principal causante de las infecciones de vías urinarias y gastroenteritis en el mundo, además son responsables de causar meningitis y septicemias en neonatales, Suelen ser transmitirse al ser humano por vía fecal y oral a través de alimentos y bebidas contaminadas, también pueden producirse enfermedades cuando el organismo presenta alteraciones en sus defensas puesto que forman parte de la microbiota normal (Harvey, Champe y Fisher, 2008).

### 1.3.7.2.3 Condiciones de Crecimiento

El agar más comúnmente utilizado para el crecimiento de *E. coli* es el Agar Mc Conkey, también pueden crecer en agar sangre de cordero y agar eosina azul de metileno (E.M.B) (BASUALDO y COTO, 2006).

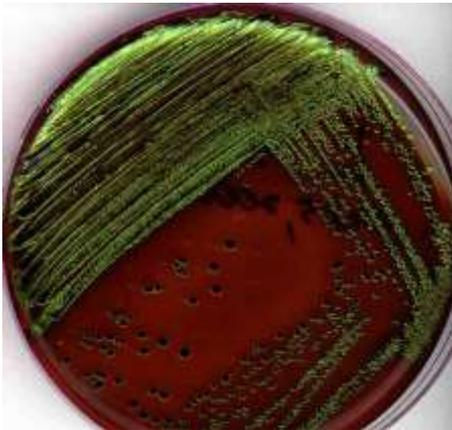


Figura 6-1. Crecimiento de *E. coli* sobre agar sangre de cordero

Fuente. (Harvey, Champe y Fisher, 2008)

### 1.3.7.3 *Klebsiella pneumoniae*

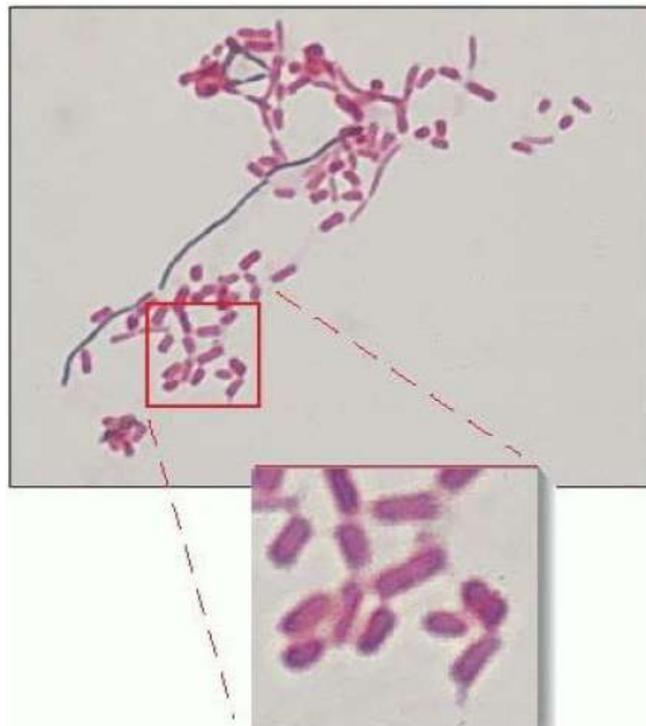


Figura 7-1. Microfotografía de las células de *Klebsiella pneumoniae*

Fuente. (Harvey, Champe y Fisher, 2008)

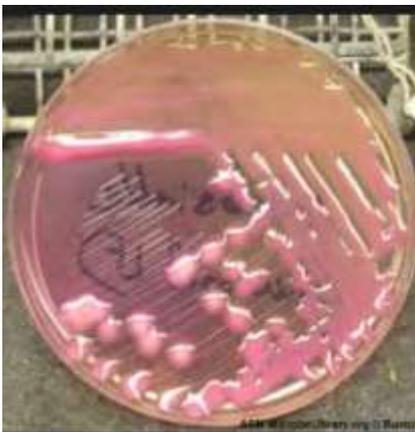
#### 1.3.7.3.1 Morfología y virulencia

Bacteria anaerobia facultativa no tiene la capacidad de moverse, es Gram negativa, posee un tamaño aproximado de 0.3-0.5µm. *Klebsiella pneumoniae* presenta una cápsula de polisacáridos, que le brinda un semblante mucoso y brillante a las colonias que frecuentemente tiene una tonalidad rosa a blanquecina (Harvey, Champe y Fisher, 2008).

Este bacilo es el principal responsable de provocar infecciones urinarias de heridas y en casos graves neumonías (Kenneth J *et al.*, 2011).

#### 1.3.7.3.2 Epidemiología

*Klebsiella pneumoniae* se halla extensamente distribuido en el medio ambiente, específicamente cerca de las mucosas de animales mamíferos y en las regiones del tracto gastrointestinal y la nasofaringe del ser humano. Generalmente los pacientes hospitalizados tiene mayor probabilidad de contraer una infección provocada por la *K. pneumoniae* puesto que tiene una relación directa al periodo de hospitalización (Brooks *et al.*, 2011).



**Figura 8-1.** Crecimiento de *K. pneumoniae* sobre agar McConkey

**Fuente:** (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2006)

#### 1.3.7.3.3 Condiciones de crecimiento

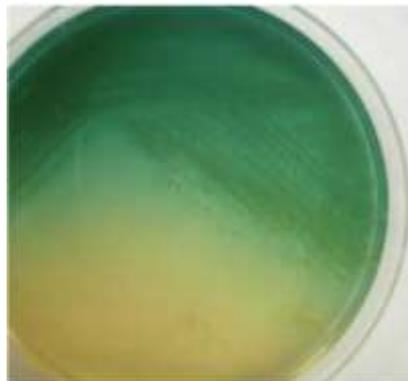
Generalmente su crecimiento se lo realiza sobre agar McConkey a 37°C (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2006).

#### 1.3.7.4 *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.3.7.4.1 Morfología y virulencia

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

Posee unas fimbrias que favorecen la adherencia a las células huésped. Producen toxinas y enzimas como: exotoxina, piociamina y fosfolipasa C que es sensible a temperaturas elevados. *Pseudomonas aeruginosa* sólo causan infecciones sobre lesiones de mucosas que se encuentra carentes de defensas inmunológicas, en las cuales puede provocar, infecciones urinarias, enfermedades respiratorias infecciones a nivel de tejidos blandos. (Brooks et al., 2011)



**Figura 9-1.** Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en agar Mueller Hinton

**Fuente.** (Brooks et al., 2011)

#### 1.3.7.4.2 Epidemiología

Se despliegan generalmente en ambientes húmedos intrahospitalarios como: lava manos, baño (duchas), respiradores, inclusive en dispositivos de diálisis y de manera momentánea puede causar infecciones sistémicas y locales en los pacientes internados en el hospital (Kenneth J *et al.*, 2011).

#### 1.3.7.4.3 Condiciones de crecimiento

Esta bacteria crece en ambiente aerobio estrictos, tiene la capacidad de crecer en múltiples medios de cultivos a un temperatura de 37 a 42°C, produce un olor dulce característico similar al de las uvas, son oxidasa positiva, es característico en su crecimiento la presencia de pigmentos fluorescentes.

#### 1.3.7.5 *Salmonella typhi*



**Figura 10-1.** Crecimiento de *S. typhi* en agar McConkey

**Fuente:** (Brooks et al., 2011).

#### 1.3.7.5.1 *Morfología y virulencia*

*S. typhi* es una bacteria Gram negativa anaerobia facultativa que pertenece a un grupo heterogéneo de bacterias muy virulentas para el ser humano. Presenta flagelos peritricos alrededor de la célula por tienen la facultad de moverse. Tiene forma de bacilos gruesos que no generan esporas, tienden a estar agrupados en pares algunas veces forman cadenas cortas. También no poseen capsula. Su tamaño aproximados es de 2 a 3 micras Son fermentadores de glucosa, maltosa y sorbitol produciendo ácido, además también es fermentadora de lactosa, no es productora de gas (Harvey, Champe y Fisher, 2008; Kenneth J et al., 2011).

#### 1.3.7.1.2 *Epidemiología*

Esta bacteria es la principal causante de la fiebre entérica o también llamada fiebre tifoidea en los seres humanos quienes son los únicos hospedantes, La *Salmonella typhi* es un bacteria que se transmite por medio de alimentos o agua contaminados con heces y orina de personas portadoras. Es resistente a bajas temperaturas lo que le permite transmitirse a través de alimentos conservados a refrigerados o congelados. (Harvey, Champe y Fisher, 2008).

#### 1.3.7.1.3 *Condiciones de crecimiento*

Las cepas de *S. typhi* crecen con facilidad en medios simples como generalmente en agar McConkey o en el EMB a una temperatura de 37 °C aproximadamente. El medio de sulfito de bismuto permite la detección rápida de salmonelas que forman colonias negras a causa de la producción de ácido sulfhídrico.(Murray, Rosenthal y Pfaller, 2006).

#### 1.3.7.5 *Candida albicans*



**Figura 11-1.** *Candida albicans* en forma de levadura, hifas y pseudohifas

**Fuente:** (Brooks et al., 2011)

##### 1.3.7.5.1 Morfología y virulencia

Este hongo es capaz de crecer de distintas formas, generalmente se encuentra como levadura por gemación produciendo blastoconidias, también puede producir hifas, estos crecimientos se encuentran mediados por los medios en los que se encuentre la *C. albicans* como los es el pH, la temperatura y los nutrientes presentes. Sus levaduras tienen forma oval de 3 a 6 µm, suelen presentarse en forma de hifas y pseudo hifas largas tabicadas entre células pudiendo formar micelios verdaderos, debido a estos aspectos la *C. albicans* es considerado como un hongo dimórfico (Brooks et al., 2011).

En medios de cultivo especialmente en agares este hongo se observa en forma de colonias circulares blandas de color crema con olor a levadura, en cuanto a las hifas y pseudohifas estas crecen en la parte inferior del agar. Generalmente se encuentran en las superficies mucosas, la patología y virulencia inicia cuando existe un incremento de células de *C. albicans* y las células inmunológicas no pueden evitar su proliferación, también se asocia que el potencial virulento

aumenta cuando el hongo cambia de su forma de levadura a hifa, estas invasiones ocurren en frecuentemente en tejidos y mucosas superficiales (Kenneth J et al., 2011; Brooks et al., 2011).

#### *1.3.7.5.1 Epidemiología*

La *C. albicans* forma parte de la microbiota normal del individuo, se localiza frecuentemente en las regiones orofaríngea, genitales femeninos y gastrointestinales. Generalmente las infecciones ocurren por contaminaciones internas, es poco frecuentes la transmisión de este hongo (Kenneth J et al., 2011).

#### *1.3.7.5.2 Condiciones de crecimiento*

Las cepas de *Candida albicans* pueden desarrollarse sobre agar Sabouraud con cloranfenicol a una temperatura de 37°C o 28°C (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2006).

### **1.4 Antibióticos**

Los antibióticos denominados también como antimicrobianos, son sustancias producidas por microorganismos (como bacterias, hongos o actinomicetos) o desarrolladas químicamente (como sulfas, quinolonas) que poseen como actividad la capacidad de destruir, inhibir o retrasar la reproducción de otros microorganismos (PAHO Publications, 2004).

La actividad varía de acuerdo a las propiedades físicas, químicas y farmacológicas de las sustancias, son estos factores los cuales modifican el espectro antimicrobiano y su mecanismo de acción, parámetros que definen la funcionalidad de cada sustancia antibiótica (Brunton, Lazo y Parker, 2007)

#### *1.4.1 Agentes bacteriostáticos y bactericidas*

Los agentes bacteriostáticos son sustancias que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento y propagación bacteriana (tetraciclina, macrólidos lincosamidas, sulfonamidas etc). Cuando se suspende la exposición de un agente bacteriostático, sobre las células bacterianas la multiplicación celular podría volver a empezar, por lo tanto la aplicación de terapias usando a estos agentes es necesaria la ayuda del sistema inmunitario de organismo infectado (huésped). (PAHO Publications, 2004)

Con respecto a los agentes bactericidas, estas sustancias no solo inhiben el crecimiento de las células sino que además desatan procesos en el interior de la célula que la destruyen como ejemplo tenemos a las fluoroquinolonas, los beta-lactámicos, los aminoglucosidos etc .(Florez, 1997) .

#### **1.4.2 Clasificación de los antibióticos**

Los antibióticos se clasifican de acuerdo a sus mecanismos de acción y su estructura química. Entonces se clasifican de la siguiente manera:

- Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana por ejemplo los Beta-lactámicos.
- Antibióticos que interfieren con la estabilidad de la membrana celular.
- Antibióticos que inhiben de la síntesis de proteínas en las funciones de las subunidades de ribosomas 30 S y 50 S como los macrólidos, aminoglucosidos, tetraciclinas y fenicoles.
- Antibióticos que interfieren con la síntesis o metabolismo de los ácidos nucleicos como las quinolonas, rifampicinas.
- Antibióticos que inhiben una ruta metabólica o llamados también antimetabolitos los principales representantes de este grupo son las sulfonamidas.

Estos mecanismos de acción actúan de forma similar contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas conforme a su especificidad (Brunton, Lazo y Parker, 2007, pp.1095-1096).

Dentro de los antibióticos que causan interferencia con la síntesis de la pared celular bacteriana se encuentran el grupo de los beta-lactámicos los cuales bloquean la síntesis del péptidoglicano al unirse en los en las proteínas de unión de penicilina (PBPs), enzima responsables de esta función, por tanto impiden la proliferación bacteriano en efecto son bactericidas. El grupo estructural de los beta-lactámicos se subdivide en: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos.

**Tabla 6-1.** Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana

<b>Familia</b>	<b>Grupos</b>	<b>Fármacos Representativos</b>
<b>Betalactámicos</b>	Penicilinas	Penicilina G, Amoxicilina
	Cefalosporinas	Cefalexina, Cefazolina
	Carbapenémicos	Impenem, Meropenem

	Monobactámicos	Aztreonam
<b>No- Beta lactámicos</b>	otros	Vancomicina Bacitracina

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

**Fuente:** (Kenneth et al., 2011, pp.328).

Con respecto a los antibióticos que generan interferencia con la membrana citoplasmática como principal representante se encuentra la polimixina B la cual se propagan a través de la membrana externa y pared celular de células susceptibles causando alteraciones y desestabilizando dicha membrana. Como consecuencia genera el derramamiento del citoplasma hacia el exterior de la célula causándole la muerte. Estas sustancias que interfieren con la membrana citoplasmática poseen actividad bactericida (Cavalieri *et al.*, 2009, pp.5-50).

**Tabla 7-1- •Antibióticos que interfieren con la estabilidad de la membrana celular**

Fármaco	Característica
Polimixina B	Activos contra bacterias algunas Gram negativas y Gram positivas
Daptomicina	

**Fuente:** (Kenneth et al., 2011, pp.328).

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

En cuanto a los antibióticos que tiene la propiedad de interferir con la síntesis de proteínas se identifican dos mecanismos que se diferencian en la subunidad ribosómica en la cual actúan. Los antibióticos que ejercen su actividad sobre la subunidad ribosómica 30S ejerciendo su actividad sobre los diferentes tipos de ácido ribonucleico (ARN) son las tetraciclinas y los aminoglucósidos, mientras que los antibióticos que impiden la síntesis de proteínas al unirse a la subunidades ribosomas 50S son los macrólidos, lincosamidas y el cloranfenicol. En ambos casos estos antibióticos tienen actividad bacteriostática (Brunton, Lazo y Parker, 2007, pp. 1095-1112).

**Tabla 8-1. Antibióticos que inhiben de la síntesis de proteínas.**

Familia de antibióticos	Fármacos representativos	Modo de acción
<b>Aminoglucósidos</b>	Gentamicina, neomicina, amikacina, estreptomina	Previenen que la subunidad 30S se adhiera al RNA mensajero (mRNA).
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina, doxiciclina,	Impiden la adhesión del RNA de transferencia (tRNA)

<b>Macrólidos</b>	Eritromicina, azitromicina, claritromicina	Se adhieren a la subunidad ribosómica 50S provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica
<b>Lincosamidas</b>	Clindamicina	
<b>Otros</b>	Cloranfenicol	
<b>Oxazolidinonas</b>	Linezolid	Actúa sobre las unidades ribosómicas 50S, mecanismo desconocido
<b>Streptograminas</b>	Quinupristina, dalfopristina	Ejercen su acción sobre las subunidades ribosómicas 50S Inhibiendo la peptidil transferasa

Fuente: (Kenneth et al., 2011, pp.328).

Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

En lo que refiere a los antibióticos que inhiben la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) se encuentra a las fluoroquinolonas que interfieren con la síntesis de la enzima ADN girasa impidiendo la replicación del ADN produciendo la muerte celular. También se encuentra la rifampicina que se une a la ARN polimerasa ADN dependiente causando la inhibición de la síntesis de ARN generando como resultado la destrucción celular (Cavalieri *et al.*, 2009, pp. 5- 50 ).

**Tabla 9-1** Antibióticos que inhiben la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN)

<b>Familia de antibióticos</b>	<b>Fármacos representativos</b>	<b>Modo de acción</b>
<b>Fluoroquinolonas</b>	Ciprofloxacino, ofloxacino, enofloxacino	Inhiben la síntesis de la enzima ADN girasa
<b>Rifampicina</b>	Rifampicina	Inhiben la replicación del ARN

Fuente: (Kenneth et al., 2011, pp.328).

Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

Las sulfonamidas y trimetoprim son los antibióticos que actúan inhibiendo el metabolismo del ácido fólico el cual es un importante metabolito precursor de la síntesis de algunas proteínas y ácidos nucleicos componentes imprescindibles en la vida celular bacteriana. Las sulfonamidas junto con el trimetoprim poseen este mismo mecanismo por ende al usarse en conjunto potencian su actividad. Ambos antibióticos son bacteriostáticos (Cavalieri *et al.*, 2009, pp.5-50).

**Tabla 10-1.** Antibióticos inhibidores del metabolismo del ácido fólico.

<b>Familia de antibióticos</b>	<b>Fármacos representativos</b>	<b>Modo de acción</b>
<b>Sulfonamidas</b>	Sulfametoxazol, sulfadiazina	Inhiben la dihidropteroata

		sintetasa
<b>Trimetoprim</b>	trimetoprim	Inhiben la dihidrofolato reductasa

**Fuente:** (Kenneth et al., 2011, pp.328).

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

## 1.5 Antimicóticos

Los fármacos antimicóticos también denominados antifúngicos son sustancias químicas usadas en los tratamientos de infecciones causadas por mohos y levaduras las cuales son poco frecuentes en los seres humanos. A diferencia de los antibióticos los antimicóticos son más tóxicos, existen en menor cantidad y poseen características farmacocinéticas deficientes. Los principales antifungicos de uso actual se clasifican de acuerdo a su estructura química de la siguiente manera: polienos, azólicos, alilaminas, equinocandinas y otros.

**Tabla 11-1.** Principales Fármacos antimicóticos y sus características.

Estructura química	Fármaco representante	Modo de acción
<b>Polienos</b>	Nistatina y anfotericina B	Porvocan poros en la membrana citoplasmática
<b>Azólicos</b>	Fluconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol	Inhiben la síntesis del ergosterol
<b>Alilaminas</b>	Terbinafina, naftifina	Inhiben la síntesis del ergosterol
<b>Equinocandinas</b>	Caspofungia, micafungia, anidulafingia	Inhiben la síntesis de glucanos
<b>otros</b>	Griseofulvina	Altera los microtubulos

**Fuente:** (Kenneth et al., 2011, pp.328).

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

## **CAPÍTULO II**

### **2. MARCO METODOLÓGICO**

#### **2.1. Lugar de la investigación**

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Productos Naturales y el laboratorio Clínico y Microbiológico de la Escuela de Bioquímica y Farmacia perteneciente a la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, Ecuador. Además se contó con la colaboración del laboratorio de Productos Naturales de la Universitat de Barcelona, localizada en Barcelona, España.

#### **2.2 Recolección del material vegetal**

La recolección de la materia prima se realizó en el cantón Muisne localizado al oeste en la provincia de Esmeraldas, a una altura aproximada de 0 msnm, realizado bajo el contrato marco de acceso a los recursos genéticos del Ministerio del Ambiente N° MAE-DBN-CM-2015-0054 y la autorización de movilización de muestras colectadas N° MAE-DPAE-2017-1676-O. Para el análisis se utilizaron los bulbos de las plantas.

#### **2.3 Identificación botánica.**

Cumpliendo con las leyes establecidas por los órganos reguladores del país se tramitó los permisos pertinentes para la ejecución de la investigación científica, efectuando lo parámetro establecidos por el ministerio del ambiente del Ecuador.

Además, se llevó una muestra seca y prensada de la planta completa al Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para que su encargado el Ing. Jorge Caranqui realice la respectiva identificación.

#### **2.4 Materia vegetal**

Se utilizó los bulbos de la planta *Crinum x amabile*, los bulbos fueron secados a una temperatura aproximada a 30 grados, protegidos de la luz solar, luego fueron triturados hasta obtener partículas de 2 a 3 mm en un molino de cuchilla giratoria de marca Arthur H, Tomas

C.O, La muestra tritura y seca se fue almacenada en fundas de papel sellados herméticamente en un lugar seco, oscuro y fresco

## 2.5 Material Biológico

Para los ensayos de la actividad antimicrobiana se utilizaron las siguientes bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Candida albicans*, los cuales se obtuvieron del laboratorio Clínico y Bacteriológico de la facultad de ciencias de la ESPOCH.

## 2.6 Técnicas y métodos

### 2.6.1 Tamizaje fitoquímico

Para identificar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en la los bulbos de *Crinum x amabile* se procedió a realizar extracciones sucesivas con diferentes solventes y se ejecutó reacciones de coloración y caracterización, este tipo de análisis es sencillo de bajo costo y altamente reproducible. Su finalidad es establecer la línea de compuestos activos que se relación directamente con los objetivos de la investigación. A continuación en la gráfico 1-2 se explica el procedimiento empleado.

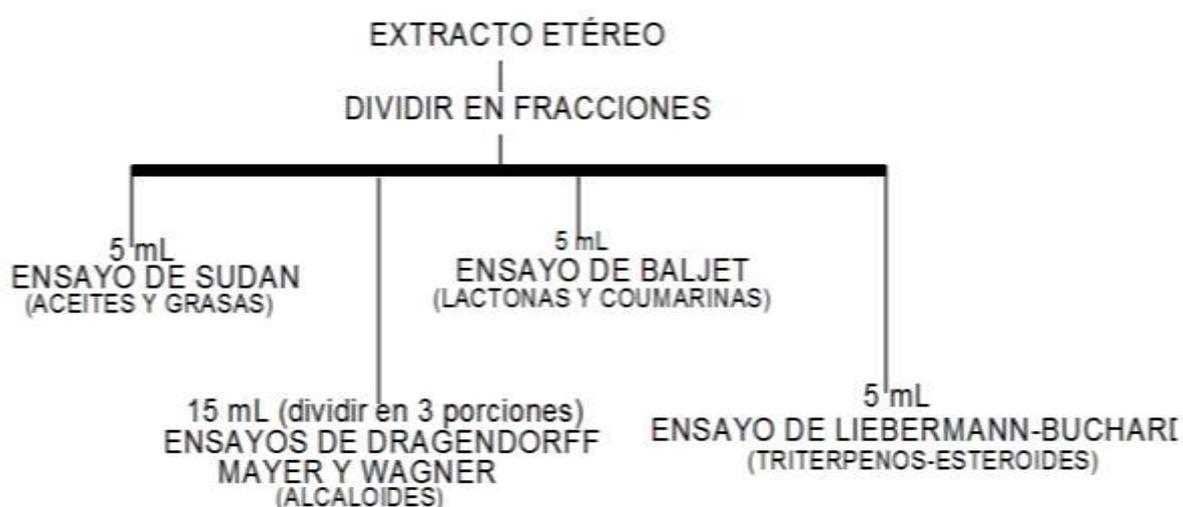


**Gráfico 1-2.** Realización de extractos para tamizaje fitoquímico

**Realizado por:** Anderson Marmolejo

Posteriormente se procedió a realizar en cada extracto las reacciones de caracterización respectivas para cada metabolito secundario las cuales se encuentra especificadas en los gráficos 2-2, 3-2, 4.2.

Dichas reacciones fueron necesarias para identificar las principales compuestos activos presentes en los bulbos de *Crinum x amabile*.



**Gráfica 2-2.** Reacciones realizadas correspondientes al extracto etéreo

Fuente: (Miranda y Cuéllar, 2006)



**Gráfica 3-2.** Reacciones realizadas correspondientes al extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda y Cuéllar, 2006)



**Gráfica 4.2.** Reacciones realizadas correspondientes al extracto acuoso.

Fuente: (Miranda y Cuéllar, 2006)

#### 2.6.1.1 *Ensayo de Sudan*

Este ensayo consiste en identificar compuestos grasos, se lo realizó, colocando 1 mL de una solución del colorante Sudan III o Sudan IV. a 3 mL de la del extracto, posteriormente se calentó en baño de agua hasta la evaporación del solvente. El ensayo es considerado positivo cuando se observa la presencia de gotitas de coloración rojiza o la formación de una película del mismo color sobre la solución. (Miranda y Cuéllar, 2006)

#### 2.6.1.2 *Ensayo de Dragendorff:*

Esta reacción tiene la finalidad de identificar alcaloides en un extracto, se lo ejecutó, evaporando el solvente orgánico en baño de agua de la fracción del extracto, consecuentemente en el residuo se agrega 1 mL de una solución de ácido clorhídrico al 1% en agua, si el extracto fuese acuoso se agregaría 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, a esta disolución se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff. El ensayo se estima que es positivo cuando se aprecia opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado (+++) (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### 2.6.1.3 *Ensayo de Mayer:*

Siguiendo un proceso similar al ensayo anterior, hasta alcanzar la solución ácida. Se añadió una pequeña cantidad de polvo de cloruro de sodio, se agitó luego se filtró. Al final se agregó 3 gotas del reactivo de Mayer, Si se visualiza opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++) el ensayo se considera positivo (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.4 Ensayo de Wagner*

Similarmente al ensayo anterior, a la disolución ácida, se añadió 3 gotas del colorante de Wagner, los resultados son iguales a los detallados en el ensayo previo (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.5 Ensayo de Baljet*

Tiene la finalidad de identificar compuestos de estructura lactónica, específicamente coumarinas en los extractos, no obstante este ensayo posee baja sensibilidad cuando existen otros compuestos lactónicos, se realizó evaporando el solvente de una alícuota del extracto en baño de agua y el residuo se disolvió en aproximadamente 2 mL alcohol. Finalmente se añadió 1mL del reactivo de Baljet, EL ensayo se supone como positivo cuando existe la coloración o precipitado rojo (++ y +++) (Bruneton, 2001).

#### *2.6.1.6 Ensayo de Borntrager*

Este ensayo consiente en determinar la presencia de quinonas en un extracto. Se lo ejecutó evaporando el solvente de la alícuota en baño de agua, después el residuo se disolvió en 1 mL de cloroformo. Posteriormente se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en solución acuosa. Finalmente se agitó mezclando las fases y se dejó en inmovilidad hasta su posterior disociación. EL ensayo resulta positivo si la fase acuosa alcalina se atenúa de rosado (++) o rojo (+++) (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.7 Ensayo de Liebermann-Burchard*

Esta reacción tiene la finalidad de identificar triterpenos y/o esteroides en un extracto. Este ensayo se realizó evaporando el solvente del extracto en baño de agua, después el residuo se disolvió con 1 mL de cloroformo. A disolución anterior se adiciono 1 mL de anhídrido acético y se mezcló bien. Finalmente se dejó desplazar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado por la pared del tubo de ensayo evitando movimientos bruscos. El ensayo se considera positivo cuando se aprecia un cambio rápido de coloración: un cambio de color apresurad desde rosado a un azul, o a su vez de verde intenso a un verde visible aunque rápido o también de verde oscuro a una coloración final negra (Bruneton, 2001)

#### *2.6.1.8 Ensayo de catequinas*

Este ensayo se llevó a cabo partiendo del extracto alcohólico, en el cual se colocó usando un capilar una gota de dicho extracto sobre papel filtro. Sobre el rastro de la gota se aplicó unas gotas de solución de carbonato de sodio. El ensayo se estima positivo si existiera la presencia de una mancha verde carmelita bajo la luz UV (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.9 Ensayo de resinas*

Esta determinación se realizó adicionando a 2 mL del extracto alcohólico, sobre 10 mL de agua destilada. La presencia de un precipitado, estima un resultado positivo (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.10 Ensayo de Fehling*

Este ensayo detecta la presencia de azúcares reductores en el extracto. Se ejecutó evaporando el solvente orgánico del extracto en baño de agua, luego el residuo se disolvió en 2 mL de agua. Seguidamente se adicionó 2 mL del reactivo y se calentó en baño de agua durante 5-10 minutos en constante agitación. El resultado supone positivo cuando la solución se tiñe de color rojo o se observa un precipitado rojizo (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.11 Ensayo de la espuma*

La finalidad de este ensayo es identificar unos compuestos denominados saponinas que son derivados triterpénicos. El cual se realizó de la siguiente forma, si la cantidad de extracto se encuentra en alcohol, se disolverá con 5 veces su volumen en agua. La mezcla se agitó fuertemente durante 5-10 minutos, el resultado es positivo si se observa una cierta cantidad de espuma luego de la agitación (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.12 Ensayo del cloruro férrico*

Este ensayo determina la existencia de compuestos fenólicos y/o taninos en el extracto vegetal. A una cantidad del extracto se agregó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica. Los posibles resultados positivos se manifiestan mediante:

- La formación de una coloración rojo ovino, para sustancias fenólicas en general.
- La formación de coloración verde intensa, para taninos del tipo pirocatecolícos.
- La formación de una coloración azul, en el caso taninos pertenecientes a los pirogalotánicos (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.13 Ensayo de la ninhidrina*

Identifica aminoácidos en estado libre o de aminas en general. Se ejecutó tomando una alícuota del extracto alcohólico, o su residuo concentrado y se mezcló con 2 mL de solución acuosa de ninhidrina al 2 %. Después se calentó la mezcla durante 5-10 minutos en baño de agua. EL resultado será positivo si observa una coloración azul violácea (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.7.1.14 Ensayo de Shinoda*

Este ensayo determina la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. Se realizó diluyendo la fracción del extracto con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y una pequeña porción de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se esperó por 5 minutos, se añadió 1 mL de alcohol amílico, finalmente se combinó las fases y se dejó reposar hasta su separación. El resultado se estima positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, anaranjado, carmelita o rojizo (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.15 Ensayo de antocianidinas*

Este ensayo detecte compuestos de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides en los extractos vegetales. Se calentó 2 mL del extracto alcohólico durante 10 minutos con 1 mL de HCL concentrado. Luego se dejó enfriar y se adiciono 1 mL de agua destilada y 2 mL de alcohol amílico. Finalmente se mezcló y se dejó separar las dos fases. Este ensayo se considera positivo cuando se observa un color rojo que tiende marrón en la fase del alcohol amílico (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2.6.1.16 Ensayo de mucílagos*

Determina la existencia de estos compuestos tipo polisacárido que forman un coloide hidrófilo con alto contenido de agua en los extractos de vegetales. Una alícuota del extracto acuoso se llevó a congelación a -10 °C. El resultado se considera positivo cuando se observa una consistencia gelatinosa (Miranda y Cuéllar, 2006).

#### *2,6,1,17 Ensayo de principios amargos y astringentes*

Este ensayo se realizó catando 1 gota del extracto acuoso del vegetal y inspeccionando el sabor estos compuestos activos característicos de la droga vegetal utilizada (Miranda y Cuéllar, 2006).

### ***2.6.2 Elaboración de los de extractos vegetales***

Se pesó 16 gramos aproximadamente de muestra seca y triturada, se colocó en un envase de color ámbar con 800 mL de metanol, se dejó macerar durante 72 horas, después se llevó baño de ultra sonido por aproximadamente 4 horas, para así obtener un extracto bruto metanólico, posteriormente se filtró el extracto bruto líquido y mediante el uso del evaporador rotatorio con vacío a 40°C de temperatura, se concentró la solución macerada y se obtuvo el extracto sólido bruto metanólico donde se apartó una fracción que se utilizó después en la investigación (Ilavenil, S, B. Kaleeswaran, B. and Ravikumar, 2010).

Consecutivamente se usó el extracto bruto metanólico seco para obtener un extracto bruto de alcaloides mediante los procesos especificados en el gráfico 5-2. La fase de interés a obtenerse fue la fracción del acetato de etilo la cual fue concentrada en el evaporador rotario con vacío para eliminar el solvente orgánico y aislar específicamente el compendio de alcaloides que se encuentren en la material vegetal, Se utilizó también sulfato de sodio anhídrido y goma arábiga para eliminar resto acuoso de la fracción de interés.

### ***2.6.3 Identificación del perfil de alcaloides por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM)***

Partiendo del extracto crudo como del extracto purificado disuelto en acetato de etilo y metanol, se procedió a la preparación de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

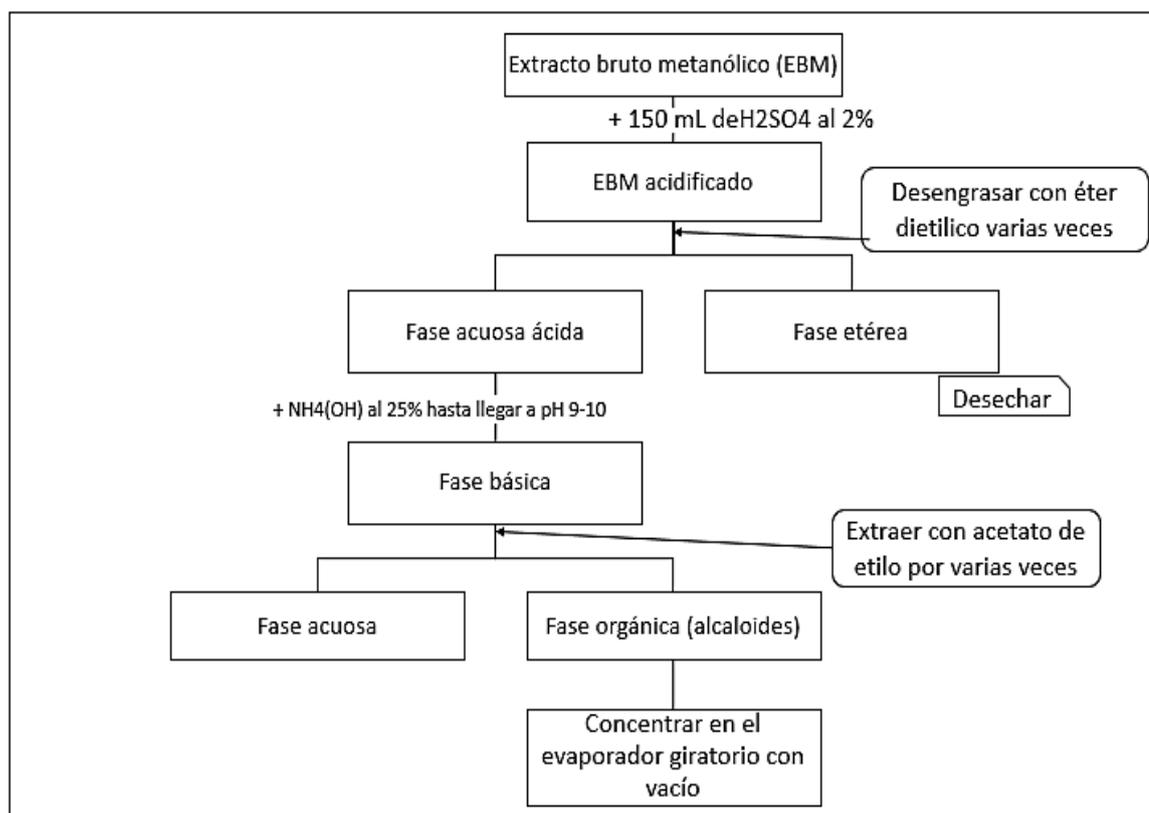
Se utilizó el Cromatógrafo de Gases de Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (modelo 5975) que maniobra a 70eV a una temperatura de 230°C en la fuente iónica. El cromatógrafo posee una columna SAPIENS-X5-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), siendo su fase estacionaria la fenilmetilsilicona al 5%.

El protocolo de temperatura usado fue el siguiente:

1. Aumento inicial desde 55°C a 100°C (60 °C/min).
2. 2 minutos a 100°C.
3. Elevación desde 100 °C a 180 °C (15 °C/min).
4. 1 minuto a 180°C.
5. Aumento desde 180°C a 300°C (5 °C/min).

Se manejó una temperatura de 280 °C en el inyector y el flujo de He fue de 0,8 ml/min y se utilizó el modo splitless. Como alcaloide estándar de referencia para todos los análisis se empleó codeína.

En la obtención y el análisis de los datos espectrales se utilizó el software AMDIS 2.71 (NIST), el cual permitió verificar la pureza de las señales y el cálculo de índices de retención (RI).



**Gráfica 5-2.** Proceso de extracción del extracto bruto de alcaloides (EBA).

Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018

## 2.6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana

### 2.6.4.1 Estándares de antibióticos

Para el ensayo de la actividad antimicrobiana se utilizaron discos de sensibilidad de los antibióticos gentamicina de 10 ug y ampicilina de 10 ug, también se utilizó al fluconazol IV de concentración de 0,2 g/ 100 mL, estos antimicrobianos se usaron como control positivo durante el ensayo.

#### 2.6.4.2 Preparación de los medios de cultivo

De manera preliminar a la ejecución del análisis antimicrobiano se elaboró los medios de cultivo imprescindibles para el desarrollo de dicho análisis.

A continuación se detalla el proceso de elaboración de los medios de cultivo Agar Mueller – Hinton y Agar Sabouraud en Placa de Petri.

1. El Agar fue preparado partiendo del medio comercial deshidratado y de acuerdo a las especificaciones del envase. Para la preparación se utilizó un matraz erlenmeyer.
2. Se procedió al autoclavado del medio por 30 minutos a 15 psi de presión.
3. Seguidamente después del proceso de esterilización de los medios de cultivo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 10 – 15 minutos hasta lograr manipular con las manos al matraz erlenmeyer, para así evitar cualquier riesgo de contaminación del medio de cultivo, este proceso se efectuó en la cámara de flujo laminar.
4. Se colocó el medio de cultivo ligeramente tibio en las placa de Petri de plástico estéril de fondo plano hasta conseguir uniformidad en la superficie y un volumen cercano a los 4 mm (25-30 mL/caja).
5. Después haber colocado el medio de cultivo en las placas de Petri se dejó enfriar en el interior de la cámara de flujo laminar hasta observar una contextura sólida, durante un tiempo de 15 -20 minutos, posteriormente las placas fueron protegidas y almacenadas en refrigeración a una temperatura 2-8 °C para ensayos próximos.

Con un proceso similar se elaboró el Agar en Pico de Flauta, el cual se describe a continuación:

1. Se elaboraron agares en picos de flauta usando el medio de cultivo deshidratado Mueller Hinton y Soja Trypticasa.
2. Se utilizó un matraz erlenmeyer, para mezclar y disolver apropiadamente el medio de cultivo con agua destilada, homogeneizando con movimiento constantes, impidiendo la sedimentación del medio de cultivo, cumplido el procedimiento de disolución. Se comenzó con el proceso de esterilización el cual se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 30 minutos a 121 OC (15 psi de presión).
3. El matraz erlenmeyer se retiró del autoclave y llevó a la cámara de flujo laminar, se dejó descansar por 10 – 15 minutos con la finalidad de reducir la temperatura del medio de cultivo, subsiguientemente se colocó el medio hasta la mitad de cada tubo tapa rosca esterilizados previamente, cubriéndolos ligeramente.

4. Los tubos fueron inclinados en un ángulo aproximado de 100 grados hasta su solidificación por 10 a 20 minutos.
5. Ya solidificados los medios de cultivo en los tubos con tapa rosca, fueron almacenados en refrigeración 2-8 °C.

Además fue necesario la preparación de tubos con caldo nutritivo: Agua de Peptona y Soya Tripticasa.

1. Los medios nutritivos fueron pesados conforme a las especificaciones del fabricante.
2. Se colocó de 4-5 mL en cada tubo manteniendo agitación constante para así impedir la sedimentación del caldo, posteriormente se cerró ligeramente los tubos con tapas y se auto clavaron por 30 min a 121 °C de temperatura y 15 psi de presión.
3. Después, se retiró los tubos del autoclave, se dejó al ambiente por varios minutos para posteriormente ser almacenados en refrigeración.

#### ***2.6.5 Preparación de los extractos.***

Se probó tres concentraciones del extracto bruto metanólico y del Extracto bruto alcaloideo, los cuales se partieron de una disolución madre para los dos extractos en viales utilizando como solvente una solución al 10% de DMSO en agua destilada estéril, La concentración la solución madre fue de 20mg/mL de la cual tomó alícuotas de 15, 25 y 35 uL para posteriormente colocarlos en los discos de papel filtro para realizar el análisis, para el ensayo de microgotas se tomó de la solución madre 3 uL, utilizando ambos extractos antes mencionados.

Las disoluciones de los extractos fueron homogeneizados en un vortex durante 3 a 4 minutos en su respectivos viales, después fueron cubiertos de la luz y almacenados en congelación a temperaturas menores a -4 °C.

#### ***2.6.6 Ensayo de esterilidad de extractos.***

Se realizó colocando 2 µL de cada extracto y de la solución al 10% de DMSO en agua destilada en una caja de Petri con agar Mueller Hinton y se incubó durante 24 horas a 37°C.

#### ***2.6.7 Activación y acondicionamiento de cepas microbianas***

Cada cepa microbiana fue conservada a 2°C en pico de flauta se tomó un inóculo mínimo con la ayuda del asa bacteriológica y se activó en tubos con caldo soya tripticasa (*Candida albicans*) y

agua de peptona para el resto de microorganismos en una estufa por 24 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación las cepas activas fueron estandarizadas mediante el uso de un patrón 0.5 McFarland para obtener una cantidad aproximadamente de  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL.

La estandarización de cepas se realizó colocando 2- 3 colonias bacterianas recogidas con el asa estéril en un volumen de 10 mL de agua destilada en un tubo de ensayo el cual fue comparado con el estándar de turbidez Mcfarland sobre un contraste de líneas negras de 1 cm, para su inmediata utilización (Cavaliere *et al.*, 2009).

#### ***2.6.8 Ensayo antimicrobiano mediante el método de difusión de disco***

Se comenzó sembrando cada una de las cepas activas en estudio estandarizadas a 0,5 McFarland en placas de Petri con agar (Mueller Hinton y Saboraud), se colocó discos comerciales antibióticos y de papel filtro (Qualitative Filter Paper 101 Fast) ( $\varnothing$  5 mm), con la apoyo de una plantilla numerada, sobre cada disco se secó (15  $\mu$ L, 25  $\mu$ L y 35  $\mu$ L) de los extractos y sus respectivas diluciones, control de solventes (Agua estéril, DMSO) y control de antimicrobianos, los resultados se estimaron midiendo el diámetro de los halos de inhibición, esto se incubó en una estufa por 24 horas a 37°C, este procedimiento se lo realizó por triplicado

#### ***2.6.9 Ensayo antimicrobiano mediante el método de microgotas.***

Se utilizó placas de Petri con agar Mueller Hinton y Saboraud, donde se estrió las cepas microbianas activas con una concentración estandarizada 0.5 McFarland, se colocó (3  $\mu$ L) cada extracto con sus respectivas diluciones, control de solventes (Agua estéril, DMSO) y control de antimicrobianos por triplicado, haciendo uso de una plantilla con numeración útil en la colocación e identificación de cada microgota, posteriormente se incubó en una estufa por 24 horas a 37°C, este procedimiento se lo realizó por triplicado.

## CAPÍTULO 3

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Tamizaje fitoquímico

**Tabla 12-3.** Resultados del tamizaje fitoquímico de los bulbos de *Crinum x amabile*

Determinación de metabolitos	Indicadores	Tipo de extracto		
		ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
SUDAN (Aceites - grasas)	Coloración roja (+)	(+)		
BALJET (Lactonas - cumarinas)	Rojo (++) Precipitado rojo (+++)	(-)	(-)	
DRAGENDORFF (Alcaloides)	Opalescencia (+) Turbidez definida	(-)	(+++)	(++)
WAGNER (Alcaloides)	(++) Precipitado (+++)	(-)	(++)	(++)
MAYER (Alcaloides)		(-)	(+++)	(-)
LIEBERMANN BURCHARD (Triterpenos- esteroides)	Rosado-azul Verde intenso Verde oscuro negro (+)	(-)	(-)	
CATEQUINAS	Mancha verde carmelita (+)		(-)	
RESINAS	Precipitado (+)		(-)	
FEHLING (Azucres reductores)	Rojo Precipitado rojo (+)		(+)	(+)
CLORURO FÉRRICO (Fenoles -taninos)	Rojo vino Verde intenso Azul (+)		(-)	(-)
ESPUMA (Saponinas)	Presencia de espuma por más de 2 minutos.		(-)	(+)
NINHIDRINA (Aminoácidos libres o aminas )	Azul violáceo (+)		(NA)	
BORNTRAGER (Quinonas)	Rosado (++) Rojo (+++)		(-)	

SHINODA	Amarillo -	(+)	(-)
(Flavonoides)	Naranja Carmelita o Rojo (+)		
ANTOCIANIDINAS	Rojo (++)	(+)	
(Secuencias de grupos de flavonoides)	Marrón (+++)		
MUCÍLAGOS	Consistencia gelatinosa (+)		(-)
PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES			(-)

+++ (Abundante), ++ (Moderado), + (Escaso), - (Ausencia)

Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

En la tabla 11-3 se encuentran los resultados obtenidos a partir de las determinaciones del tamizaje fitoquímico de los bulbos de *Crinum x amabile*, los cuales indican que en el extracto etéreo destacan compuestos grasos como aceites o grasas en cantidades mínimas, puesto que al utilizar como solvente al éter dietílico se intensifica la prueba de sudan brindando un resultado positivo coincidiendo con resultados de especies similares en estudios realizados por Vishnu Priya y Srinivasa Rao (2017, pp 3).

En el caso de extracto alcohólico se evidencia la presencia de alcaloides con resultados de alta intensidad concordando con los análisis realizados por Ilavenil, S, B. Kaleeswaran, B. and Ravikumar (2010, pp 4) y J. Solanki, A. Dhiman (2011, pp 3223) en los cuales se destacan especialmente la presencia de alcaloides en especies vegetales del género *Crinum*.

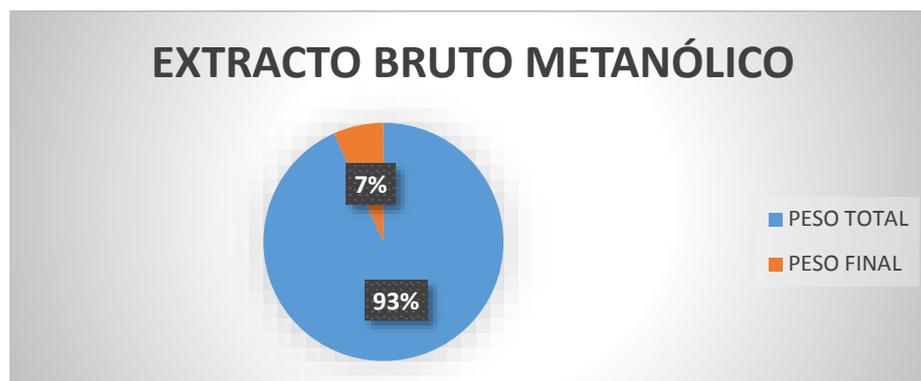
Además en este extracto también se identifican azúcares reductores flavonoides y antocianidinas, descritos de manera similar por Fennell y Van Staden (2001), todos estos resultados se asemejan a los obtenidos en el extracto acuoso con la excepción de las saponinas que se identificaron mediante el ensayo de la espuma.

### 3.2. Resultados del proceso de extracción de los bulbos de *Crinum x amabile*

**Tabla 13-3.** Resultados de rendimiento del proceso de extracción de *Crinum x amabile*

TIPO DE EXTRACCIÓN	PESO INICIAL	PESO FINAL	RENDIMIENTO
EXTRACTO METANOLICO	17 g	1,234g	7,05%
EXTRACTO DE ALCALOIDES	17g	0,13g	0,812%

Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.



**Grafica 6-3.** Porcentajes de rendimiento del proceso de extracción del Extracto Bruto Metanólico

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

La grafica 6-3 indica el porcentaje de rendimiento que se alcanzó el cual corresponde al 7% del peso inicial de la muestra después de haber sido sometido al proceso anteriormente descrito, este rendimiento se equipara al obtenido en un análisis realizado por (Rahman et al., 2011) en el que utilizan condiciones de extracción similares-



**Gráfica 7-3.** Rendimiento de extracción del extracto de alcaloides

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

Consecuentemente en la gráfica 7-3 muestra el porcentaje de rendimiento del proceso de extracción de la fracción de alcaloides el cual se realizó mediante el uso de solventes orgánicos y cambios en el pH, el resultado de este rendimiento fue del 1% correspondiente al peso inicial que fueron 17 gramos, este resultado se aprecia también en el trabajo publicado por Ilavenil, S. B. Kaleeswaran, B. and Ravikumar (2010, pp 36) en el cual se utiliza como muestra vegetal a los bulbos de un especie del mismo género.

### 3.5 Perfil de alcaloides identificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

**Tabla 14-3.** Perfil de alcaloides identificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto purificado del bulbo de *Crinum x amabile*

ALCALOIDE	Rt	RI	% TOTAL
Galantamina	23.378	2430.3	0.68
Sanguinina	23.806	2458.1	3.35
Bufanisina	23.960	2468.0	6.53
<i>N</i> -dimetilgalantamina	24.110	2477.8	<0.1
Vittatina	24.699	2516.0	3.39
m/z 287	24.815	2523.5	0.87
8- <i>O</i> -dimetilmaritidina	25.135	2544.2	5.41
Anhidrolicorina	25.147	2545.0	<0.1
m/z 315	25.222	2549.8	0.98
3- <i>O</i> -acetilsanguinina	25.358	2558.7	0.58
Caranina	25.427	2563.1	<0.1
Kirkina	25.824	2588.9	0.64
Augustina	26.099	2607.1	2.61
11,12- dihidroanhidrolicorina	26.663	2646.2	1.51
Hemantamina	27.284	2689.3	5.94
Flexinina	27.448	2703.4	0.89
Sternbergina	28.064	2743.6	1.18
Licorina	29.077	2813.6	44.01
Ambelina	29.166	2819.8	0.82
Assoanina	30.229	2893.5	11.63
m/z 280	30.701	2926.2	0.61

**Interpretación:** RT (Tiempo de retención), RI (Índice de retención), %Total (Porcentaje de abundancia respecto a la mezcla total), m/z (relación masa/carga)

**Realizado por:** Luciana Tallini, 2017.

**Fuente:** Universitat de Barcelona

En los resultados del análisis con Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas del extracto de alcaloides se observa la presencia de sólo alcaloides lo cual confirma que el proceso de purificación fue el adecuado, puesto que se empleó los solventes adecuados para llevar a cabo dicha extracción.

De los alcaloides más abundante encontramos a la licorina con un porcentaje del 44, 01 % con respecto a los demás, seguido de assoanina con un 11,63%. También se detectaron alcaloides con cantidad significativa, de entre el 3 y el 10% de abundancia, como son los casos de la Hemantamina, bufanisina, vitatina, 8-O-demetilmaritidina, sanguinina y augustina, estos resultados coinciden con investigaciones previas realizadas sobre muestras de *Crinum amabile* obtenidas de Vietnam aplicado métodos similares en este caso la espectroscopia de masas, destacando como alcaloides mayoritarios a la licorina, hemantamina y bufanisina (Pham et al., 1998).

Además, se identificó una variedad considerable de alcaloides en menores porcentajes (< 2%) como la Ambelina, Galantamina, Sternbergina, Flexinina, Kirkina, Caranina, 3-O-acetilsanguinina, 8 Anhidrolicorina, kirkina, didehidroungwedina, crinamina, narwedina, pancratina, N-dimetilgalantamina,

### 3.4 Actividad Antimicrobiana

**Tabla 15-3** Concentración y dilución de extractos.

EXTRACTOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	ALÍCUOTA (VOLUMEN) (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL (μg)
Metanólico	20mg/mL	15	300
		25	500
		35	700
Alcaloides		15	300
		25	500
		35	700

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

La concentración y el volumen de los extractos que se utilizaron en el ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de difusión de disco se muestran en la gráfica 13-3 estas soluciones se realizaron a partir de los extractos secos, ambos casos se preparó una solución madre de mayor concentración de 20 mg/mL, partiendo de esta disolución se tomaron las alícuotas con los volúmenes indicados en la tabla sabiendo la concentración real que se aplicara disco de sensibilidad realizado con papel filtro en el ensayo de la actividad antimicrobiana.

**Tabla 16-3** Resultados de la esterilidad de los extractos

MUESTRA	*ESTERILIDAD (UFC)
Agua destilada estéril	0
Extracto bruto metanólico	0
Extracto bruto de alcaloides	0
Solución de DMSO 10% en agua	0

Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

No se reportó la existencias de crecimiento de microorganismos en los extractos y los solventes utilizados, los extractos fueron sometidos a la eliminación del solvente con un evaporador rotatorio con vacío y congelados hasta el instante de su utilización, motivo por el cuál no se observó el crecimiento microbiano puesto que no estuvieron presentes los factores necesario para que este hecho ocurra, debido a que la temperatura de congelación desacelera la actividad enzimática e interrumpió el metabolismo, deteniendo así los procesos de degradación en los extractos

**Tabla 17-3.** Resultados del control de actividad antimicrobiana en solventes

Microrganismos	Sol. DMSO al 10% en agua (UFC)	agua destilada (UFC)
<i>Salmonella typhi</i>	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0

E.c = *Escherichia coli*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; K.p = *Klebsiella pneumoniae*; S.t = *Salmonella typhi*; C.a = *Candida albicans*

Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

**Tabla 17-3.** Resultados del actividad antimicrobiana de los controles positivos

Microrganismos	Gentamicina 10 ug (mm)	Ampicilina 10ug (mm)	Fluconazol tazo (mm)	Fluconazol microgota (mm)
<i>Salmonella typhi</i>	20	22	NA	NA
<i>Escherichia coli</i>	17	18	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	NA	NA	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	20	NA	NA

<i>Candida albicans</i>	NA	NA0	20	15
-------------------------	----	-----	----	----

E.c = *Escherichia coli*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; K.p = *Klebsiella pneumoniae*; S.t = *Salmonella typhi*; C.a = *Candida albicans*; NA = No aplica

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

**Tabla 18-3.** Resultados del ensayo antimicrobiano por el método de difusión de disco

M.O	EBM1 (300µg) (mm)	EBM2 (500µg) (mm)	EBM3 (700µg) (mm)	EBA1 (300µg) (mm)	EBA2 (500µg) (mm)	EBA3 (700µg) (mm)
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	6	0	0	8
<i>Escherichia coli</i>	0	7	9	0	7	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	6	9	0	7	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	9	0	0	8
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	6

M.O = Microorganismos; EBM1 = Extracto bruto metanólico 300µg; EBM2 = Extracto bruto metanólico 500µg; EBM3 = Extracto bruto metanólico 700µg EBA1= Extracto bruto de alcaloides 300µg; EBA2= Extracto bruto de alcaloides 500µg; EBA3= Extracto bruto de alcaloides 700µg CP = Control positivo; E.c = *Escherichia coli*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; K.p = *Klebsiella pneumoniae*; S.t = *Salmonella typhi*; C.a = *Candida albicans*.

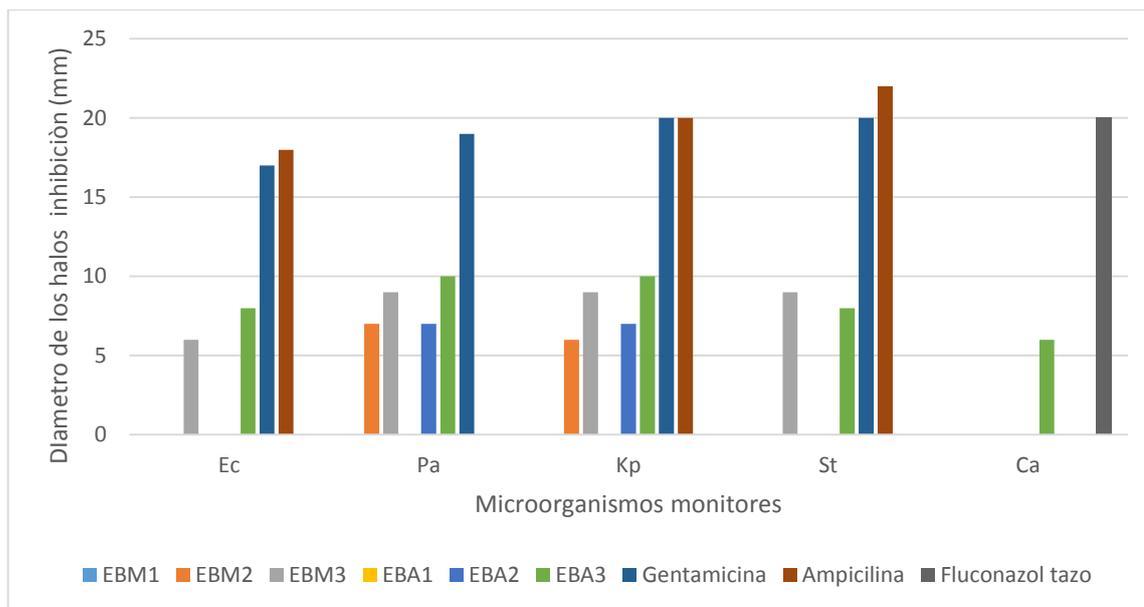
\*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado.,  
**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

**Tabla 19-3.** Resultados del ensayo antimicrobiano por el método de microgotas

Microorganismos	EBM 3µL (mm)	EBA 3µL (mm)
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	6
<i>Candida albicans</i>	0	6
<i>Escherichia coli</i>	0	0

M.O = Microorganismos; EBM1 = Extracto bruto metanólico; EBA= Extracto bruto de alcaloides; CP = Control positivo; E.c = *Escherichia coli*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; K.p = *Klebsiella pneumoniae*; S.t = *Salmonella typhi*; C.a = *Candida albicans*. \*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.



**Gráfica 8-3.** Representación de los resultados del ensayo antimicrobiano por difusión de disco.

M.O = Microorganismos; EBM1 = Extracto bruto metanólico 300µg; EBM2 = Extracto bruto metanólico 500µg; EBM3 = Extracto bruto metanólico 700µg EBA1= Extracto bruto de alcaloides 300µg; EBA2= Extracto bruto de alcaloides 500µg; EBA3= Extracto bruto de alcaloides 700µg CP = Control positivo; E.c = *Escherichia coli*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; K.p = *Klebsiella pneumoniae*; S.t = *Salmonella typhi*; C.a = *Candida albicans*.

\*Promedio del diámetro de la zona de inhibición en mm del ensayo realizado por triplicado

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

La actividad antimicrobiana fue evaluada 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, utilizando el método de difusión en disco se encuentran en la Tabla 18-3 en la cual se tomaron mediciones del diámetro de los halos en este método. El presente estudio realizado 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, los rangos fueron de 300, 500 y 700 µg partiendo de una disolución madre de 20mg/mL.

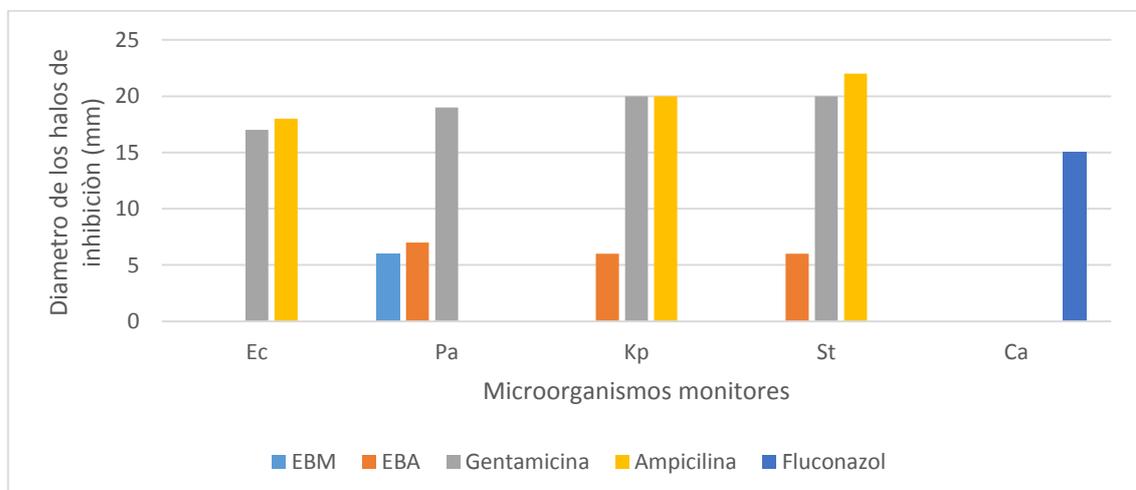
Los mejores resultados en ambos extractos testados en la ejecución de la actividad microbiana por el método de difusión de discos fueron los de 700 µg concentración contra los bacterias Gram negativas y la *C. albicans*. Sin embargo las concentraciones menores también tienen

zonas de inhibición en la mayoría de los microorganismos monitores pero en menor diámetro de inhibición.

La máxima zona de inhibición fue observada con el extracto bruto de alcaloides de 700 µg con un diámetro de 10 mm enfrente a *P. aeruginosa* y 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 y 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. De acuerdo a los análisis realizados sobre la esta actividad en muestras vegetales del genero *Crinum* se puede estimar que los alcaloides específicamente la sanguinina es los responsables del efecto inhibitorio (De La Torre *et al.*, 2008; Pham *et al.*, 1998).

Con respecto al extracto bruto metanólico se aprecian mejores resultados en los zona de inhibición de la actividad antimicrobiana frente a *S typhi*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* Con unos diámetros aproximados de 9 mm. También se identificaron zonas menores de inhibición contra *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* con diámetros de 7 y 6 en sus halos de inhibición consecutivamente de los extractos con una concentración de 500 µg.

Estos resultados se pueden comprar en investigaciones anteriores realizados sobre muestras vegetales de especies del mismo género muy similares en los cuales se ha identificado una compatibilidad en sus metabolitos secundarios, investigaciones como la realizada sobre los bulbos de *Crinum jagus* por Linn, Maduagwu y Kehinde( 2017, p 32) y también sobre los bulbos de *Crinum asiaticum* elaborado por Rahman *et al.*(2011, p 3) donde se puede apreciar la relación existente en los resultados de esta investigación



**Gráfica 9-3.** Representación de los resultados del ensayo antimicrobiano por microgotas

M.O = Microorganismos; EBM1 = Extracto bruto metanólico; EBA= Extracto bruto de alcaloides; CP = Control positivo; E.c = *Escherichia coli*; P.a = *Pseudomonas aeruginosa*; K.p = *Klebsiella pneumoniae*; S.t = *Salmonella typhi*; C.a = *Candida albicans*.

**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

Por otro lado los resultados obtenidos por el método de microgotas fueron difíciles de medir, debido al volumen utilizado que fue muy pequeño 3  $\mu$ L que se pipeteó, no existió una adecuada resolución de las zonas de inhibición, también se apreció que existe una marcada diferencia en este aspecto con el método de difusión de disco en el cual se obtuvieron mejores resultados.

La mejor actividad mostrada en este método por el extracto bruto de alcaloides de concentración de 700  $\mu$ g la cual fue sobre *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* con un diámetro en los halos de inhibición mínimo de 6 mm. (Ilavenil, S, B. Kaleeswaran, B. and Ravikumar, 2010) Con este método se suprimieron actividades observadas en el extracto bruto metanólico frente a *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. typhi*

Los resultados mostraron evidencia de actividad antimicrobiana, siendo mayor el efecto antibacteriano que el antifúngico, de confirmándose en los estudios realizados por Linn, Maduagwu y Kehinde (2017, pp 4) la capacidad antimicrobiana obedece mucho a las especies del género *Crinum*, del solvente y el proceso utilizado para la extracción de sus componentes y de las cepas microbianas contra las que se vaya a analizar. Motivos por la que existe contradicciones en resultados.

Así, todos los extractos fueron eficaces en frente de algún tipo de microorganismo analizado, excepto a la levadura *C. albicans* en la cual se observó una actividad inhibitoria mínima, Debido a que este hongo cuenta con una estructura celular compleja y con condiciones de vida particulares a las distintas bacterias utilizadas en este ensayo, dato que coincide en investigaciones previas elaborada por (Rahman et al., 2011).

El efecto antimicrobiano fue contrastado con estándares de referencia de antibióticos propuestos por el manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano establecido para cada microorganismo monitor los cuales fueron, gentamicina (10  $\mu$ g), ampicilina (10 $\mu$ g) para bacterias y Fluconazol (25 $\mu$ g) para la cepa fúngica, como se muestra en la Tabla 17-3, estos estándares tuvieron mayor efecto antimicrobiano (mayor  $\emptyset$  de los halos de inhibición) que los extractos sometidos al análisis.

Para los controles negativos como la solución al 10% de DMSO en agua y agua destilada, no se observó efecto alguno razones por la cuales se entiende que no existe ninguna interferencia en la

actividad por parte del uso de estos solventes tal como se muestra en la Tabla 16-3 (The Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016; Cavalieri *et al.*, 2009)

En la tabla 15-3 se muestran los resultados de la evaluación de la esterilidades de los extractos usados en la ejecución de este análisis, controlando así la veracidad de esta evaluación, estos resultados fueron negativos en lo que refiere al crecimiento de microorganismos, por ende se confirma la viabilidad de esta determinación permitiendo así cumplir con los objetivos planteados.

## CONCLUSIONES

El extracto bruto tanto metanólico y de alcaloides lograron obtener un rendimiento de extracción elevado, siendo el 7,05% y 0,812% respectivamente.

Mediante el tamizaje fitoquímico en los bulbos de *Crinum x amabile* se identificó de forma cualitativa la presencia de alcaloides, flavonoides y antocianidinas en la fracción alcoholica, de igual manera la fracción acuosa y eterea se encontraron otros tipos de metabolitos tales como triterpenos, compuestos grasos, saponinas, catequinas, lactonas, , aceites y azúcares reductores.

Mediante cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masa se consiguió constatar la presencia de una gran variedad de alcaloides en los bulbos de *Crinum x amabile* dentro del rango de 20 y 30 minutos del tiempo de retención, aspecto habitual de este tipo de compuestos. De todos los alcaloides, aquél que destaca en abundancia, sin lugar a duda, es la licorina presentando un porcentaje de 44,01% muy por encima de los demás alcaloides además el segundo alcaloide con mayor concentración es la assoanina

También es importante destacar la presencia de alcaloides con abundancia de 1 a 5% tales como las sanguinina, bufanisina, Hemantamina de los cuales se estima la actividad antimicrobiana, todo estos encontrados en los bulbos de *Crinum x amabile* lo cual coincidió con estudio previos realizados una especie similar en Vietnam según Pham et al. (1998, pp 6).

Los extractos de bulbos de *Crinum x amabile* presentaron mayor actividad antimicrobiana que antifúngica. Fue relevante frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y con resultados mínimos sobre: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* de los cuales resalto el extracto bruto de alcaloides a una concentración de 700 µg con mejores halos de inhibición mediante el método de difusión de discos.

Mientras que los halos de inhibición que se obtuvieron mediante el uso del método de microgotas fueron poco apreciables debido a la concentración de extractos en la microgota que fueron insignificantes, pero dicha actividad comparada con las antibióticos de referencia no es suficiente para establecer una decisión final puesto que en el mejor de los casos queda en pie como una opción viable la ampliación de estudios en este tema sobre alcaloides aislados para así observar la actividad específica de cada uno.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda se profundice los estudios antimicrobianos en fracciones aisladas de alcaloides de los bulbos de *Crinum x amabile* puesto que se observó acción la actividad antimicrobiana contra los microorganismo patógenos estudiados.

Además es necesario que en el establecimiento se manejen técnicas y equipos adecuados para purificación de componentes específicos, lo cual mejorará la calidad de los trabajos de investigación.

También es muy importante establecer un área específica para el cultivo de cepas microbianas con su respectivo personal de control, puesto que es un área muy importante para el desarrollo de nuestra profesión.

## BIBLIOGRAFÍA

**AUSIN RUIZ, V. y MORENO GUILLÉN, S.**, *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Primera ed. Buenos Aires; Madrid: Sociedad Española de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2005. ISBN 9788578110796.

**BASUALDO, JUAN y COTO, CELIA**, *Microbiología biomédica: Bacteriología - Micología - Virología - Parasitología - Inmunología*. Segunda ed. Buenos Aires: Editorial Atlante, 2006. ISBN 950-9539-47-3.

**BAULIES ROMERO, Gemma y TORRES CASTELLA, Rosa María.** Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. En: NULL, *FMC Formacion Medica Continuada en Atencion Primaria* [en línea], vol. 19, no. 3, 2012 pp. 149-160. ISSN 11342072. DOI 10.1016/S1134-2072(12)70324-9. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1134-2072\(12\)70324-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1134-2072(12)70324-9).

**BAULIES ROMERO, Gemma y TORRES CASTELLA, Rosa María.** Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, vol. 19, no. 3, 2012 pp. 149-160. ISSN 11342072. DOI 10.1016/S1134-2072(12)70324-9.

**BROOKS, Geo., BUTEL, Janet S., CARROLL, Karen C., MORSE, Stephen A. y MIETZNER, Timothy A.**, *Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica*. 25 ed. México: McGraw-Hill, 2011. ISBN 9786071511355.

**BRUNETON, Jean.** Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. , vol. 1, no. Editorial Acribia S.A, 2001 pp. 1073.

**BRUNTON, Laurence, LAZO, John y PARKER, Keith**, *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. Undécima. México: McGraw-Hill, 2007. ISBN 9701057392.

**CAVALIERI, S.J., HARBERK, R.J., MCCARTER, Y.S., ORTEZ, J.H., RANKIN, I.D., SAUTTER, R.L., SHARP, S.E. y SPIEGEL, C.a**, *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano* [en línea]. S.l.: s.n., 2009. ISBN 155581347X. Disponible en: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Manual+de+Pruebas+de>

+Susceptibilidad+Antimicrobiana#0.

**DE LA TORRE, L., NAVARRETE, H., MURIEL M, P., MACÍA, M.J. y H. BALSLEV,** *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Primera ed. Quito, Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus, 2008. ISBN 9789978771358 9978771352.

**DOMINGO, Diego y LOPEZ-BREA, Manuel.** Revisión Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap.* 2003, vol. 16, no. 4, pp. 385-393.

**DONATIEN GATSING, VERONIQUE TCHAKOUTE1, DIEUDONNE NGAMGA, JULES-ROGER KUIATE, JEAN DE DIEU TAMOKOU, BRIDGET F. NJI-NKAH, FÉLICITÉ M. TCHOUANGUEP, Simeon P.C. Fodouop,** 2009. In Vitro Antibacterial Activity of *Crinum Purpurascens* Herb. Leaf Extract Against the *Salmonella* Species Causing Typhoid Fever and Its Toxicological Evaluation. *Iranian Journal of Medical Sciences*, vol. 34, no. 2, pp. 126-136.

**ECUADOR, MINISTERIO DE SALUD. MSP.** Perfil de morbilidad ambulatoria. *Dirección Nacional de Estadística y Análisis de información de salud - DNEAIS*, 2015 [en línea]. [Consulta: 20 marzo 2017]. Disponible en: <https://public.tableau.com/profile/publish/Perfildemorbilidadambulatoria2015/Men#!/publicsh-confirm>.

**ESCALONA, Julio.** *Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de Tamarindus indica L . como premisa para su introducción en la medicina complementaria.* 2011. [en línea]. S.l.: Universidad de Oriente. Disponible en: [http://tesis.repo.sld.cu/355/1/Julio\\_César\\_Escalona.pdf](http://tesis.repo.sld.cu/355/1/Julio_César_Escalona.pdf).

**FENNELL, C.W. y VAN STADEN, J.,** *Crinum species in traditional and modern medicine.* *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 78, no. 1, pp. 15-26. ISSN 03788741. DOI 10.1016/S0378-8741(01)00305-1.

**FLOREZ, J.,** *Farmacología humana.* tercera. Barcelona: Masson S.A, 1997. ISBN 9780874216561.

**FUSTER, Salvador Bergeñon,** 1994. Aislamiento y caracterización química de alcaloides del

tipo Amaryllidaceae . « in vitro » de *Narcissus confusus*. *Universidad de Barcelona*, pp. 290p.

**GAMAZO, Carlos, SÁNCHEZ, Susana y CAMACHO, Ana**, *Microbiología Basada en la Experimentación*. Primera ed. Barcelona: Elsevier, 2013. ISBN 9788490220856.

**GRAY YOUNG, Geneviene**, *WITTON'S MICROBIOLOGY*. tercera ed. Santiago de Chile: McGraw-Hill, 1969.

**HARVEY, Richard**, *et al Microbiología*. Segunda ed. Barcelona: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. ISBN 9788496921153.

**ILAVENIL, S, B. KALEESWARAN, B. AND RAVIKUMAR, S.**, 2010. EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Crinum asiaticum*. *International Journal of Current Research*, vol. 1, pp. 35-40.

**J. SOLANKI, et al**. PHARMACOGNOSTIC AND PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL EVALUATION OF THE LEAVES OF *CRINUM LATIFOLIUM L.* *Int J Pharm Sci Res*, vol. 2, no. 12. 2011, pp. 3219-3223.

**KENNETH J, Ryan, RAY, George, AHMAD, Nafees, DREW, W. Lawrance y PLORDE, James J.**, *Sherris: Microbiología Médica*. Quinta ed. México: McGraw-Hill, 2011. ISBN 978-607-15-0554-5.

**KITTISAK, LJKHITWRAYAWLJID, CINDY K. ANGERHOFER, CHAI, HEEBYUNG, PEZZUTO, JOHN M. y CORDELL, GEOFFREY A.,.** CYTOTOXIC AND ANTIMALARIAL ALKALOIDS FROM THE BULBS OF *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products*, vol. 56, no. August. 1993, pp. 1331-1338.

**LINN, Jagus, MADUAGWU, Akintola A.O. y KEHINDE, E.N. Adegoke A.O.**, 2017. Antimicrobial activities of crude methanolic extract and fractions of the bulb of *Crinum jagus* ( Linn ). , no. June 2016.

**LUIS, José, GARCÍA, Arredondo y CORTINA, Rolando J. Villicaña**, *No Title*. S.l.: s.n., [sin fecha]. ISBN 968906701X.

**MADIGAN, Michael; et al**, *Brock. Biología de los Microorganismos*. Duodécima. Madrid:

Pearson, 2009. ISBN 978-84-205-3679-8.

**MAROYI, Alfred**, 2016. A review of ethnobotany, therapeutic value, phytochemistry and pharmacology of *Crinum macowanii* Baker\_ A highly traded bulbous plant in Southern Africa. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], vol. 194, no. October, pp. 595-608. ISSN 0378-8741. DOI 10.1016/j.jep.2016.10.046. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.046>.

**MIRANDA, Migdalia y CUÉLLAR, Armando**, *Farmacognosia y Productos Naturales: Normas ramales de drogas crudas, extractos y tinturas*. sexta. La Habana: Editorial Poligráfica Félix Varela, 2006. ISBN 978-959-07-1794-9.

**MONTOYA VILLAFANE, Hugo Humberto.**, *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. segunda ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia, 2008. ISBN 9789587140903.

**MURRAY, Patrick R., ROSENTHAL, Ken S. y PFALLER, Michael A.**, *Microbiología médica*. Quinta ed. Madrid: Elsevier, 2006. ISBN 9788481749274.

**OLAECHEA, P.M., INSAUSTI, J., BLANCO, A. y LUQUE, P.**.. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. *Medicina Intensiva*, vol. 34, no. 4, pp. 256-267. ISSN 02105691. DOI 10.1016/j.medin.2009.11.013.

**ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD**, *Situación de Salud*. Primera ed. Quito: s.n., 2006.

**ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD**. Guía para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. *Organización panamericana de la salud*. 2004, pp. 306.

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD**, 2017. Prioridades de investigación en salud. En: NULL, *Ministerio de Salud Pública Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud Dirección de Inteligencia de la Salud* [en línea], pp. 5-6. Disponible en: <http://www.paho.org>.

**PHAM, L.A.M. Huong, et al.**.. ALKALOIDS FROM CRINUM AMABILE. *Phytochemistry*. 1998, vol. 48, pp. 371-376.

**PRATS, Guillem**, *Microbiología Clínica*. Primera ed. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana, 2005. ISBN 847903971X.

**RAHMAN, Atiar et al.** Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxic Properties of *Crinum asiaticum* Bulb Extract. *Bangladesh J Microbiology* 2011., vol. 28, no. 1, pp. 1-5. DOI 10.3329/bjm.v28i1.11801.

**RESTREPO, Angela, et al**, *Fundamentos de Medicina. Enfermedades infecciosas*. Sexta ed. Medellin: s.n., 2003. ISBN 958-9400-60-4.

**THE CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE**, *M100S Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. S.l.: s.n., 2016. ISBN 1562388657.

**THI NGOC TRAM, Nguyen, et al.** *Crinum L. (Amaryllidaceae)*. *Fitoterapia*, 2002, vol. 73, no. 3, pp. 183-208. ISSN 0367326X. DOI 10.1016/S0367-326X(02)00068-0.

**TORTORA, Gerard; et al.**, *Introducción a la microbiología*. Novena ed. Madrid: Médica Panamericana, 2007. ISBN 9789500607407.

**VISHNU PRIYA, P. y SRINIVASA RAO, A.**, 2017. Pharmacognostic and phytochemical screening of *Crinum Asiaticum* and *Pedaliium Murex*. *Journal of Natural Products and Plant Resources*, vol. 7, no. 1, pp. 1-8.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION**. World Health Statistics 2015 Indicator compendium. *Indicator Code Book*, 2015 [en línea], pp. 255. DOI ISBN:978 92 4 156444 1. : [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/WHS2013\\_IndicatorCompendium.pdf?ua=1](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/WHS2013_IndicatorCompendium.pdf?ua=1).

## ANEXOS

### ANEXOS A. Tamizaje fitoquímico de los bulbos de *Crinum x amabile*



**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

**ANEXOS B:** Obtención del extracto bruto de alcaloides



**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

### ANEXO C: Concentración de los extracto.



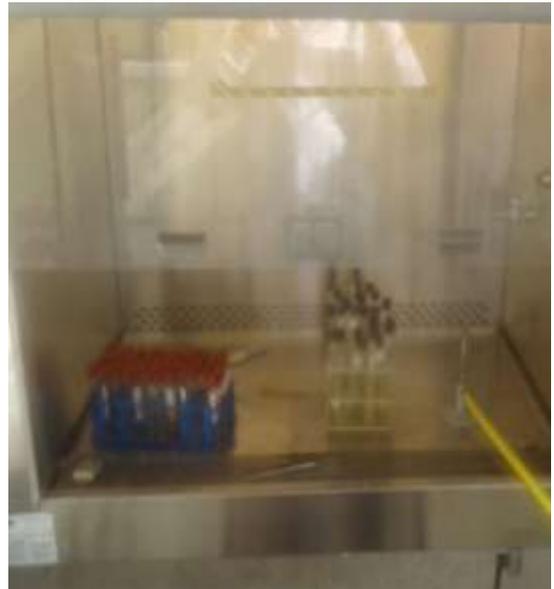
Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

### ANEXO D: Preparación de los medios de cultivos



Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

## ANEXO E: Preparación de cepas de microorganismos



Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

## ANEXOS F: Evaluación de la actividad antimicrobiana



Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

## ANEXOS G: Resultados de la actividad antimicrobiana



Realizado por: Anderson Marmolejo, 2018.

**ANEXOS H:** Incubación de los medios de cultivo sembrados



**Realizado por:** Anderson Marmolejo, 2018.

## ANEXO I. Autorización de movilización de muestras colectadas



Oficio Nro. MAE-DPAE-2017-1676-O

Esmeraldas, 13 de noviembre de 2017

**Asunto:** AUTORIZACIÓN DE MOVILIZACIÓN DE MUESTRAS COLECTADAS.

Licenciada  
Karen Lisseth Acosta León  
**Usuario**  
En su Despacho

De mi consideración:

En atención al Oficio s/n, de fecha 12 de octubre de 2017, ingresado a esta Cartera de Estado como Documento Nro. MAE-UAFE-DPAE-2017-1925-E y Documento Nro. MAE-UAFE-DPAE-2017-1926-E del 31 de octubre de 2017, con el cual realizan la solicitud de Autorización de Movilización de especímenes de flora colectados a través de la Autorización de Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos N° MAE-DBN-CM-2015-0054, del proyecto titulado: "La Biodiversidad de Amaryllidaceae como fuente de recursos naturales para su explotación sostenible".

El presente Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos, en la CLÁUSULA DÉCIMA, DE LA COLECTA en su punto 10.5 manifiesta textualmente: "Para la movilización de las muestras colectadas en este Contrato, la UTI deberá contar con la respectiva guía de movilización emitida por las Direcciones Provinciales del Ambiente del MAE".

Una vez analizada la solicitud por el Responsable de Vida Silvestre de esta cartera de Estado, habiendo cumplido con la documentación habilitante la Dirección Provincial del Ambiente de Esmeraldas, por este medio le concede la respectiva Autorización de Movilización.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

*Documento firmado electrónicamente*

Abg. Pablo Antonio De La Torre Ramírez  
**DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE ESMERALDAS**

Copia:  
Señor Ingeniero  
Johan Fabricio Ortega Cortez  
**Responsable de la Unidad de Patrimonio Natural**

Plantilla: colgador

Torrequevedo principal y Alacranes a lado de Torre Esmeraldas  
Torrequevedo - Esmeraldas - Ecuador  
Teléfono: (593 4) 2464929 - 2464205 fax: 015  
RUC: 08600340301  
[www.ambiente.gub.ec](http://www.ambiente.gub.ec)



1/2