

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN
PARÓTIDA DE DOS POBLACIONES DE *Rhinella marina* (BUFONIDAE)
SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *Escherichia coli*, *Pseudomonas
aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.**



LIZETH CAROLINA RODRÍGUEZ BENAVIDEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2018

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN
PARÓTIDA DE DOS POBLACIONES DE *Rhinella marina* (BUFONIDAE)
SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *Escherichia coli*, *Pseudomonas
aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.**

LIZETH CAROLINA RODRÍGUEZ BENAVIDEZ

Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de Bióloga

DIRECTOR

JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS, Ph.D

ASESORA

LILIANA CALDAS ARIAS, Esp.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2018

Nota de aceptación

Director

Jimmy Alexander Guerrero Vargas Ph.D

Jurado

Mg. Clara Inés Giraldo

Jurado

Biol. Paola Andrea Arciniegas Grijalba

DEDICATORIA

A mis padres, Nubía Estela Benavidez y Segundo Rodríguez, por ser las personas que me guiaron y ayudaron a llegar hasta este punto de mi vida y carrera profesional, por sus buenos consejos y ejemplos.

A mi hermana, María Camila Rodríguez, por estar siempre a mi lado apoyándome.

AGRADECIMIENTOS

A la universidad de Cauca y a los docentes del departamento de Biología por todas sus enseñanzas durante estos años.

Al profesor Jimmy Alexander Guerrero, por sus aportes en este trabajo y por todos los consejos a lo largo de la carrera.

A la profesora Liliana Caldas, Por su colaboración en el laboratorio y por guiar parte de este trabajo para que se pudiera realizar con éxito.

Al grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxicológicas, por facilitar su laboratorio y personal para cumplir los objetivos de este trabajo.

Al laboratorio de inmunología de la facultad de ciencias de la salud, por su colaboración y aportes en el desarrollo de la investigación.

Al personal de la estación piscícola, por su gran colaboración y apoyo en las jornadas de colecta.

Al personal de laboratorio de biología, por su gran colaboración.

Alexandra Lazo Idrobo, agradezco todos tus aportes, paciencia y tiempo que dedicaste para colaborarme durante esta investigación.

Deibi Fabián Muñoz, Agradezco tu apoyo y colaboración durante las jornadas de campo.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de alguna manera participaron y aportaron para culminar con éxito este proyecto investigativo.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	5
4. OBJETIVOS.....	7
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
5. MARCO TEÓRICO.....	8
5.1 GENERALIDADES DE LOS ANFIBIOS.....	8
5.1.1 Secreción de anfibios.....	8
5.1.2 Generalidades de <i>Rhinella marina</i>	9
5.1.3 Estatus taxonómico de <i>Rhinella marina</i>	10
5.2 GENERALIDADES DE BACTERIAS.....	10
5.2.1 Membrana celular.....	11
5.2.2 Pared celular.....	11
5.2.3 <i>Escherichia coli</i>	12
5.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
5.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
5.2.6 Susceptibilidad antimicrobiana.....	14
5.2.7 Concentración mínima inhibitoria.....	14

5.2.8 Concentración inhibitoria 50.....	15
6. ANTECEDENTES.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1 DESCRIPCIÓN DE LAS ZONAS DE MUESTREO DE <i>Rhinella marina</i>	19
7.2 COLECTA DE <i>R. marina</i> EN EL CAMPO Y MANEJO DE ESPECÍMENES.....	20
7.3 PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN IN VITRO.....	21
7.3.1 Extracción de la secreción de las glándulas parótidas.....	21
7.3.2 Liofilización de la secreción de las glándulas parótidas.....	22
7.3.3 Condiciones adecuadas para replicar las cepas de las bacterias patógenas.....	22
7.3.4 Evaluación de la actividad antibiótica de la secreción de las glándulas parótidas de <i>R. marina</i> sobre las cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	22
7.3.4.1 Prueba de susceptibilidad bacteriana por el método de microdilución en caldo y bioensayos en microplaca para cultivo celular.....	22
7.3.4.2 Cantidad mínima inhibitoria.....	25
7.3.5 Evaluación de la actividad hemolítica de la secreción de las glándulas parótidas de <i>R. marina</i> sobre eritrocitos humanos.	25
7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
8. RESULTADOS.....	28

8.1 SECRECIÓN PARÓTIDA de <i>R. marina</i>	28
8.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	28
8.2.1 Efecto de la secreción parótida de los anuros colectados en Timbío.....	29
8.2.1.1 Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	30
8.3.1.2 Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
8.3.1.3 Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
8.2.2 Efecto de la secreción parótida de los anuros colectados en Patía.....	32
8.2.2.1 Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	32
8.2.2.2 Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
8.2.2.3 Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
8.2.3 Comparación del efecto de la secreción parótida de las dos poblaciones en estudio sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	35
8.3 CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA.....	36
8.4 CL ₅₀ DE LA SECRECIÓN PARÓTIDA DE LOS ANUROS COLECTADOS EN TIMBÍO.....	36
8.4.1 Porcentaje de crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	36
8.4.2 Porcentaje de crecimiento de <i>S. aureus</i>	37
8.5 CL ₅₀ DE LA SECRECIÓN PARÓTIDA DE LOS ANUROS COLECTADOS EN PATÍA.....	38
8.4.1 Porcentaje de crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	38
8.4.2 Porcentaje de crecimiento de <i>S. aureus</i>	38

8.6 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.....	39
8.6.1 Secreción parótida de los anuros colectados en Timbío.....	39
8.6.2 Secreción parótida de los anuros colectados en Patía.....	40
9. DISCUSIÓN.....	41
10. CONCLUSIONES.....	45
11. RECOMENDACIONES.....	46
12. BIBLIOGRAFÍA.....	47

1. INTRODUCCIÓN

La piel de los anfibios es una rica fuente de compuestos biológicamente activos que tienen diversas funciones fisiológicas y de defensa, resaltando los péptidos con un potencial antimicrobiano y farmacológicamente activos (Barra and Simmaco, 1995).

Colombia presenta una riqueza de 766 especies de anfibios (Cardona-Botero *et al.*, 2013), correspondiente al 10% de las descritas a nivel mundial, dentro de las cuales sobresale el orden de los anuros, del cual hacen parte los sapos y ranas, con 746 especies (Acosta and Cuentas, 2013). Puntualmente, la familia *Bufo* posee 33 géneros con 471 especies en total, y su principal género *Rhinella* contiene alrededor de 258 especies (Ferreira *et al.*, 2013), incluyendo *Rhinella marina*, la cual es una especie que habita en áreas abiertas y boscosas, se caracterizan por cráneos muy bien osificados (Maciel *et al.*, 2010), y presenta unas glándulas en sus hombros conocidas como parótidas que le proporcionan una mezcla única de bufadienólidos, catecolaminas y proteínas con poderosos efectos contra depredadores y microorganismos (Rash *et al.*, 2011).

Por otra parte, las bacterias son células procariotas de tamaños muy reducidos, que carecen de membrana nuclear, y en ellas se pueden encontrar estructuras como la pared bacteriana, membrana citoplasmática, citoplasma, ribosomas, flagelos, vellosidades, entre otros (Rodríguez and Picazo, 2000). Dentro de este grupo encontramos a *Escherichia coli*, una bacteria Gram negativa que coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002). *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo Gram negativo que ocasiona graves infecciones crónicas que resultan fatales para pacientes hospitalizados, especialmente los inmunocomprometidos, incluyendo víctimas de quemadura, enfermos de fibrosis quística y aquellos con cáncer neutropénicos o SIDA (Soheili *et al.*, 2015). *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram positiva,

patógeno importante del ser humano, las infecciones por este coco pueden ir desde intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas leves hasta infecciones graves que ponen en riesgo su vida (Jawetz *et al.*, 2008).

Asimismo, diversos microorganismos han variado su susceptibilidad grandemente en los últimos años, y algunas cepas que habían sido consistentemente susceptibles a los agentes antimicrobianos por décadas, ahora han desarrollado resistencia a estas terapias clásicas, y tienen la habilidad de desarrollar rápidamente resistencia a los antimicrobianos más nuevos (Echevarria and Iglesias, 2003)

Por lo anterior se hace necesario buscar en fuentes naturales moléculas con potencial antibiótico, donde las secreciones parótidas y cutáneas de anfibios son de gran importancia, debido a que tienen un potencial como base para el desarrollo de nuevos agentes proteicos, buscando de esta manera alternativas biológicas que reduzcan el uso de derivados químicos que afectan tanto mamíferos como otros grupos de animales. Además, cabe resaltar, que el estudio de las secreciones de este tipo de especie como *R. marina* es de sumo interés porque aporta otra razón para su protección y conservación.

Considerando las necesidades para el control de microorganismos y en base a los antecedentes bibliográficos se propone determinar la actividad antibiótica de la secreción parótida de dos poblaciones de *R. marina* sobre las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de morbilidad a nivel mundial y lamentablemente uno de los grandes problemas que se enfrenta en la actualidad es la creciente resistencia de los microorganismos a los antibióticos convencionales (Echevarria and Iglesias, 2003), apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad, las muertes y la prolongación de la enfermedad (OMS, 2018a).

La mayoría de los fármacos que se están desarrollando son modificaciones de antibióticos ya existentes que ofrecen soluciones solamente a corto plazo, además hay muy pocas opciones terapéuticas posibles para tratar las infecciones resistentes a los antibióticos señaladas por la OMS como las mayores amenazas para la salud, que incluyen por ejemplo la tuberculosis farmacorresistente, que causa alrededor de 250 000 fallecimientos cada año (OMS, 2017), como solución a este problema los anuros y sus secreciones han sido implementados en tratamientos terapéuticos por diversas culturas alrededor del mundo, lo que ha generado que se realicen numerosos estudios con el fin de conocer los componentes farmacológicamente activos presentes en dichas secreciones (Carvalho *et al.*, 2015).

Es importante resaltar que Colombia, debido a su mega diversidad biológica, es un país que tiene un elevado número de organismos productores de diferentes compuestos bioactivos, en los que es posible encontrar una gran cantidad de moléculas con aplicaciones biotecnológicas (Guerrero Vargas, *et al.*, 2008.), y específicamente en anfibios los péptidos bioactivos son componentes importantes distribuidos en las glándulas de la piel (Wang *et al.*, 2010), que forman parte integral de sus sistemas de defensa y de la regulación de la acción fisiológica dérmica. En respuesta a una variedad de estímulos, los compuestos de defensa

del huésped que incluyen péptidos, son secretados por glándulas especializadas sobre la superficie dorsal y en el intestino, los cuales exhiben una gama de bio actividades, incluyendo antimicrobianos (Bowie and Tyler, 2006).

Aunque los péptidos antimicrobianos de anfibios y sus posibles aplicaciones son muy numerosas, solo una minoría de especies de anfibios ha tenido sus péptidos aislados, y la caracterización es a menudo limitada a la determinación de estructuras primarias, a pesar de la existencia de características superpuestas entre los repertorios peptídicos de diferentes especies de anfibios, cada uno de ellos muestra características distintivas que pueden conducir al descubrimiento de bioactividades y especificidades, así como a la identificación de nuevos motivos estructurales que podrían mejorar el diseño de péptidos para uso terapéutico (Nascimento *et al.*, 2003)

Por otra parte, El departamento del Cauca se encuentra dividido en cinco regiones geográficas dentro de las cuales están la pacífica y la andina, que albergan una gran riqueza en cuanto a anfibios, que se hallan distribuidos de la siguiente manera, la región andina alberga la mayor riqueza del país con 485 especies y la región pacífica 154 especies (Galeano *et al.*, 2006), convirtiéndose en un lugar estratégico para el desarrollo de estudios que permitan aumentar el conocimiento en el campo de antibióticos, enfocando la búsqueda en las secreciones de anfibios; por ello se desarrolló la presente investigación en la que se pretendió determinar y comparar si la secreción parótida de dos poblaciones de *R. marina* tienen potencial antibiótico y si tienen toxicidad en las células de mamífero, ya que la presencia de potencial inhibitorio ayuda a identificar sustancias con aplicación farmacológica y antibiótica.

3. JUSTIFICACIÓN

Los animales pueden producir una gran cantidad de sustancias conocidas como venenos que significan peligro para el ser humano, pero que pueden ser fuentes de sustancias benéficas aisladas por medio de estudios concernientes a la toxinología, la cual se puede definir como una ciencia interdisciplinar de la biología, que se encarga del estudio de los productos metabólicos especiales conocidos como venenos y sus aplicaciones biotecnológicas (Guerrero - Vargas *et al.*, 2008.)

La piel de los anfibios es fuente de una gran variedad de sustancias con actividad biológica que constituyen una barrera inicial contra las infecciones microbianas debido a su actividad frente una gran variedad de microorganismos, los péptidos presentes en la secreción tienen un notable interés farmacéutico y tecnológico, ya que matan selectivamente a los microorganismos y es poco probable que induzcan resistencia en patógenos (Nascimento *et al.*, 2003). Estos péptidos son componentes antiguos del sistema inmune innato, han sido aislados de organismos que abarcan todo el espectro filogenético, demostrándose su potencia frente a microorganismos diana altamente mutables (Yount *et al.*, 2006).

El uso de tratamientos alternativos es una práctica que se ha aplicado desde hace muchos años tanto por países desarrollados como por países sub desarrollados con el fin de enfrentar diferentes enfermedades (Qi *et al.*, 2011), dentro de las que se incluyen las infecciones por microorganismos resistentes, que se han tornado difíciles de remediar con los tratamientos farmacéuticos convencionales (Echevarria and Iglesias, 2003).

Teniendo en cuenta lo anterior, las secreciones de anuros han demostrado tener una cantidad significativa de compuestos biológicamente activos con funciones fisiológicas y de defensa (Barra and Simmaco, 1995), que permiten un tratamiento efectivo contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos que afectan la salud humana (Kim *et al.*, 2007); el aislamiento de los compuestos y el ensayo de estos tratamientos en países como Colombia son escasos (Galeano *et al.*,

2006), (Guerrero *et al.*, n.d.), lo que amerita desarrollar proyectos encaminados a este tema teniendo en cuenta la mega diversidad presente en nuestro país.

En este estudio se analizó la secreción de las glándulas parótidas de dos poblaciones de *R. marina* con el objetivo de determinar la capacidad antimicrobiana de las mismas, a fin de contribuir en el conocimiento tanto a nivel departamental comonacional para una posible aplicación biotecnológica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibiótico de la secreción parótida de dos poblaciones del anuro *Rhinella marina* contra cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

4.2 Objetivos específicos

- Establecer la capacidad antibiótica de la secreción parótida de *R. marina* por la prueba de dilución.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la secreción de glándulas parótidas de *R. marina*
- Comprobar la actividad hemolítica de las secreciones de *R. marina* sobre eritrocitos humanos.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Generalidades de los anfibios

Existen más de 6.000 especies de anfibios que son miembros de la clase Amphibia, vertebrados tetrápodos; el orden Anura se compone de las ranas (y su subgrupo, los sapos), y es el que posee el mayor número de especies, con 5.208 especies vivas actualmente reconocidas (Stuart *et al.*, 2008). Aunque los anuros tienen una gran variedad de formas de cuerpo, las ranas y sapos adultos son siempre sin cola y tienen cuatro miembros, poseen una forma corporal limitada y especializada que incluye un cuerpo muy corto, una pelvis alargada, cabeza relativamente grande, y dos piernas traseras bien desarrolladas utilizadas para saltar y / o nadar (Stuart *et al.*, 2008).

5.1.1 Secreciones de anfibios

Existen dos tipos fundamentales de glándulas cutáneas que deben ser observadas en los anfibios: las glándulas mucosas y las granulares (seroso o veneno). Las glándulas granulares se componen generalmente de un alvéolo formado por una capa secretora que está cubierta exteriormente por una capa mioepitelial (Toledo and Jared, 1995).

Entre los distintos tipos de sustancias secretadas por las glándulas dérmico granulares de los anfibios, hay una amplia gama de péptidos y proteínas, presentando a menudo actividades antimicrobianas potentes y proporcionando un sistema de defensa eficaz contra la infección por parásitos (Prates *et al.*, 2004). Su actividad antimicrobiana de amplio espectro y su selectividad para células bacterianas sobre células eucariotas las convierten en candidatas atractivas para nuevos compuestos de fármacos. Aunque los péptidos antimicrobianos de anfibios y sus posibles aplicaciones son muy numerosos, sólo una minoría de especies de anfibios ha tenido sus péptidos aislados, y la caracterización se limita a menudo a la determinación de estructuras primarias (Haney and Hancock, 2014).

5.1.3 Estatus taxonómico de *Rhinella marina*

Reino: Animalia

Filum: Chordata

Clase: Amphibia

Orden: Anura

Familia: *Bufo*nidae

Género: *Rhinella*

Especie: *Rhinella Marina* (Linneaus,1758)



Fig. 2 *Rhinella marina*. Tomada de Schmeda-Hirschmann *et al.* 2016

5.2 Generalidades de bacterias

La palabra bacteria se deriva del griego bacterion- baston pequeño. Son células procariotas de tamaños muy reducidos, carecen de membrana nuclear, en ellas se pueden encontrar estructuras como la pared bacteriana, membrana citoplasmática, citoplasma, ribosomas, flagelos, vellosidades, entre otros. Las bacterias en algunos casos llegan a representar el origen de enfermedades en animales y plantas (Rodriguez and Picazo, 2000)

5.2.1 Membrana celular

Es una bicapa lipídica similar a otras membranas biológicas, compuesta por fosfolípidos anfipáticos, como las bacterias no poseen membranas internas todos los sistemas de fosforilación, oxidación y transporte de electrones (citocromos) para la producción de energía se encuentran a nivel de la membrana celular; además tiene las enzimas necesarias para la síntesis de lípidos, de la pared celular (por ejemplo, el bactoprenol), de la cápsula, etc. Finalmente la membrana contiene moléculas receptoras especiales que ayudan a las bacterias a detectar y responder a sustancias químicas del medio externo (Pérez and Mota, 2010).

5.2.2 Pared Celular

Ubicada por fuera de la membrana plasmática, es una estructura vital para las bacterias que la poseen. Los fármacos que bloquean su formación producen la lisis y muerte de las bacterias susceptibles; puede proteger a la célula de las sustancias tóxicas y es el sitio de acción de algunos antibióticos.

Su importancia clínica deriva de su susceptibilidad a la acción de los antibióticos, dado que éstos actúan sobre un blanco que no es propio del hombre y que es vital para la vida bacteriana (poseen toxicidad selectiva). También actúa como filtro, impidiendo el ingreso de algunas moléculas y permitiendo la entrada de metabolitos imprescindibles y agua. Contiene determinantes patogénicos y estructuras antigénicas que sirven para identificar y clasificar a la bacteria (antígeno O de las enterobacterias o polisacárido C del *Streptococcus* sp.). Podríamos decir entonces, que la pared bacteriana es un gran mosaico de antígenos que son usados en la clasificación y en la identificación bacteriana (Pérez and Mota, 2010).

5.2.3 *Escherichia coli*

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichi*

Es una bacteria Gram negativa, de la familia *Enterobacteriaceae* muy común en tracto gastrointestinal de los humanos, aunque posee algunas cepas altamente patógenas como enterohemorrágica, enteropatógena, enteroinvasiva, entre otras. Además este organismo está asociado con enfermedades como gastroenteritis, infecciones del tracto urinario y meningitis (Murray *et al.*, 2013)

La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo, algunas de ellas, como *E. coli* productora de toxina Shiga, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (OMS, 2018b). Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (OMS, 2018c)

5.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Es un bacilo Gram negativo, con movilidad y metabolismo aerobio, que posee una amplia distribución en la naturaleza y con mayor frecuencia en los hospitales. Esta bacteria tiende a producir infecciones en personas con defensas anormales como por ejemplo en heridas y quemaduras produciendo invasión local y enfermedad sistémica; debido a su resistencia a muchos antimicrobianos se vuelven dominantes e importantes cuando se suprimen las bacterias más susceptibles de la microflora normal (Jawetz *et al.*, 2008).

La transmisión se produce principalmente a través del contacto de la piel lesionada o reblandecida y de las mucosas con el agua o con los objetos contaminados. En el ámbito sanitario, constituyen una fuente de infección para los pacientes el instrumental quirúrgico, los respiradores, los catéteres o las manos del personal sanitario contaminadas, entre otros.(Trabajo, 2008)

5.2.5 *Staphylococcus aureus*

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

La bacteria *Staphylococcus aureus* está presente en la nariz (por lo general de forma temporal) de cerca del 30% de los adultos sanos y en la piel de cerca del 20% de estos; Las infecciones por esta bacteria varían de leves a mortales, las bacterias tienden a infectar la piel, a menudo causando abscesos. Sin embargo, pueden viajar por el torrente sanguíneo (lo que se denomina bacteriemia) e infectar prácticamente cualquier parte del organismo, especialmente válvulas cardíacas (endocarditis) y los huesos (osteomielitis), también tienden a acumularse en el material sanitario implantado en el organismo, como válvulas

cardíacas artificiales o prótesis articulares, marcapasos y catéteres insertados en los vasos sanguíneos a través de la piel.(Bush, 2018)

Los estafilococos son relativamente resistentes a la desecación, al calor (resisten un a temperatura de 50°C durante 30 minutos) y al cloruro de sodio al 9%; además son resistentes a antimicrobianos como la naflicina , metilicina, oxalicina y algunas cepas a la vancomicina (Jawetz *et al.*, 2008).

5.2.6 Susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se han convertido en procedimientos de rutina en la práctica clínica y la información generada a partir de ellas es fundamental para la vigilancia de los perfiles de sensibilidad y la detección de nuevos patrones de resistencia por el laboratorio. (Secretaría distrital de salud, 2010); estas pruebas están divididas en dos grupos: La prueba de difusión, cuyo principio involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión, y la prueba de dilución en caldo o agar, las cuales se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad “in vitro” de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 hs. A 35°C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (Malbrán, 2001).

5.2.7 Concentración mínima inhibitoria

Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es

importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos (Andrews, 2001).

5.2.8 Concentración inhibitoria 50

Concentración de un compuesto necesaria para reducir el crecimiento de la población de organismos, incluyendo células eucarióticas, en un 50% in vitro. Aunque a menudo se usa para denotar actividad antibacteriana in vitro, también se utiliza como estándar para la citotoxicidad de células eucarióticas en cultivo (Tesauro, 2013)

6. ANTECEDENTES

(Matutte *et al.*, 2000), en este estudio se quiso evaluar la inducción de la síntesis de un péptido antimicrobiano en la piel de un anfibio en respuesta a un cambio ambiental de temperatura; se tomaron extractos de piel de dos grupos de especímenes de la rana de madera, tolerante a la congelación, *Rana sylvatica*. Uno de los grupos se mantuvo a 5 °C y el otro a 30 °C, los resultados obtenidos en este caso fueron diferencias en la presencia del antimicrobianos en su piel; el primer grupo careció de actividad antimicrobiana detectable, mientras que el extracto de piel tomado de las muestras a 30°C contenía una alta concentración (aproximadamente 4 nMol / g) de un único péptido antimicrobiano de la familia brevinina-1. El péptido inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* (CMI 45 µM) y *Staphylococcus aureus* (CIM 7 µM). Los datos sugieren que la síntesis del péptido se induce cuando el animal se encuentra en un entorno que promueve el crecimiento de microorganismos consistentes con un papel en la estrategia de defensa del animal.

(Mangoni *et al.*, 2001), en este artículo desarrollaron experimentos in vivo con el fin de estudiar la síntesis de péptidos antimicrobianos en *Rana esculenta*, para este estudio, un primer grupo se mantuvo en agua en presencia de bacterias de la flora natural a 10^6 ufc / mL, y se mantuvo un segundo grupo durante la misma cantidad de tiempo en agua que contenía tetraciclina y eritromicina a una concentración final de 80 y 150 µg / mL, respectivamente; pasadas dos semanas, en las ranas mantenidas en condiciones estériles, la cantidad de péptidos antimicrobianos disminuye a niveles muy bajos, cuando estas ranas fueron posteriormente re-expuestas a las bacterias de la flora natural, se restauró la síntesis de péptidos antimicrobianos en la piel. En conclusión, el estudio demostró que la síntesis de péptidos antimicrobianos en las glándulas cutáneas de *R. esculenta* depende de la presencia de microorganismos. Sin embargo, la naturaleza y la cantidad de péptidos sintetizados en las glándulas cutáneas parecen ser independientes de las especies microbianas a las que están expuestas las ranas.

(Nascimento *et al.*, 2003), este artículo se presenta una revisión general de los péptidos antimicrobianos que se encuentran en las secreciones de la piel de los anuros, las cuales constituyen una barrera inicial contra las infecciones microbianas debido a su actividad contra una amplia gama de microorganismos. Como conclusión se obtiene que los péptidos antimicrobianos de anfibios y sus posibles aplicaciones son muy numerosos, sólo una minoría de especies de anfibios ha tenido sus péptidos aislados, y la caracterización se limita a menudo a la determinación de estructuras primarias. Otras investigaciones sobre las relaciones estructura-función se concentran en magaininas y dermaseptinas, que pertenecen a la misma familia, por lo que existen lagunas de conocimiento en lo que concierne a otros grupos de péptidos. Además, hay una serie de aspectos poco claros sobre la acción de los péptidos antimicrobianos y elucidar estos aspectos puede conducir a una optimización de las propiedades útiles de los péptidos antimicrobianos.

(Mechkarska *et al.*, 2010) En este trabajo se realizó la purificación y caracterización de algunos péptidos de la secreción de la rana africana *Xenopus laevis*, los cuales fueron ensayados frente a cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Candida albicans* (ATCC 90028), se evaluó la concentración mínima inhibitoria, la dosis letal media y la actividad hemolítica en eritrocitos humanos; como resultado de los ensayos se obtuvieron diez péptidos antimicrobianos, que presentaban actividad antimicrobiana frente a los microorganismos evaluados, y mostraron muy baja actividad hemolítica (LC 50 > 200 M) contra eritrocitos humanos.

(Rash *et al.*, 2011), en esta investigación se utilizó una RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF para analizar y determinar las primeras secuencias de péptidos de la secreción parotídea de *B. marinus*. La secreción parotídea se obtuvo a partir de especímenes hembras adultas de *B. marinus* apretando suavemente la glándula parótida y recogiendo la secreción directamente en 50% de acetonitrilo (ACN) / 0,1% de ácido trifluoracético, pH 2,0 (para ayudar a la solubilidad de los componentes hidrófobos e inhibir la actividad proteasa) y se

liofilizo. Un hallazgo sorprendente de este estudio fueron los niveles extremadamente bajos de péptidos presentes en la secreción parótida de esta especie. Se determinó que la presencia de péptidos en esta secreción era en pequeñas cantidades y en ocasiones estaban ausentes por lo que probablemente no contribuyan a la toxicidad de esta especie.

(Hettyey *et al.*, 2017) Este estudio tenía como objeto investigar experimentalmente, si los cambios cualitativos y / o cuantitativos en las defensas químicas de los renacuajos de *Bufo bufo* son inducidos por diferencias en la microbiota de su entorno; se criaron animales usando dos tratamientos, uno en agua del grifo purificada, y otro en agua del estanque que contiene cantidades reducidas o naturales de la microbiota natural; se midió el número de compuestos y la cantidad total de bufadienólidos en tres etapas ontogenéticas durante el desarrollo de la larva, así como 10 días después de la metamorfosis. La producción de toxinas en la piel de los sapos cambio durante la ontogenia temprana pero no se ajustó a la microbiota del medio ambiente acuático.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 DESCRIPCIÓN DE LAS ZONAS DE MUESTREO DE *Rhinella marina*

Las zonas de muestreo fueron previamente seleccionadas de acuerdo a sus diferencias en cuanto a precipitación, altitud y condiciones físicas en las que se encontraban los individuos de dicha especie, de esta manera los municipios elegidos para realizar el muestreo fueron: Timbío y Patía.

Timbío

Este municipio pertenece al departamento del Cauca, clasificado como un ecosistema de bosque muy húmedo premontano (bmh-PM) (Holdridge, 1978), La colecta de los individuos de la especie *R. marina* se realizó específicamente en la Estación Piscícola de Pambio, que presenta un sistema de lagos DE PESCA artificiales, y se ubica a una altura de 1850 msnm, con una temperatura media de 16 y 23 °C y localizada entre los 02° 21' 01" de latitud norte y 76° 41' de longitud oeste.



Fig. 2. Estación Piscícola de Pambio. Timbío- Cauca. Foto: Lizeth Rodríguez, 2017

Patía

El corregimiento del estrecho Patía, se encuentra ubicado al sur del departamento del Cauca a una altitud de 1.167 msnm, se localiza a los 01°58'02" de latitud norte y 77°07'08" de longitud oeste, considerado como un ecosistema de bosque muy seco tropical (bms-T) (Holdridge, 1978), particularmente la colecta de individuos de *R. marina* se desarrolló en un sector abierto con presencia de pastizales que en ocasiones eran transitados por ganado vacuno.



Fig 3. Sitio colecta en el Estrecho. Patía-Cauca. Foto: Lizeth Rodríguez, 2017

7.2 COLECTA DE *R. marina* EN EL CAMPO Y MANEJO DE ESPECÍMENES.

Para la colecta de los individuos de *R. marina* se realizó una salida de campo a la Estación Piscícola de Pambío - Timbío e igualmente una salida de campo al Corregimiento del Estrecho-Patía, durante el mes de septiembre del año 2017, con el fin de obtener un número suficiente de especímenes que permitieran llevar a cabo el estudio

Todos los individuos fueron colectados en estado adulto, sin discriminar por géneros, la búsqueda se realizó efectuando la técnica de búsqueda libre a partir de las 17:00 hasta las 22:00 horas, considerando que es una especie nocturna y terrestre que habita áreas húmedas con cobertura vegetal adecuada (Valarezo and Herrera, 2015). Luego de obtener la colecta de los individuos vivos, 24 para cada sitio, éstos fueron dispuestos en grupos de 8 individuos en recipientes plásticos con tapa, los cuales fueron adecuados con orificios para la entrada de oxígeno, y agua para conservar la humedad. Posteriormente, los individuos fueron transportados hasta el centro de investigaciones biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), donde permanecieron por 24 horas, lapso en el cual se realizó la extracción de la secreción de las glándulas parótidas. Finalizando esta actividad los especímenes fueron regresados a su hábitat natural.

7.3 PROCEDIMIENTOS DE EXPERIMENTACIÓN IN VITRO

Los procesos de extracción y liofilización se realizaron en el laboratorio de ciencias biomédicas de la Universidad del Cauca. Por otro lado, las pruebas antibióticas y hemolíticas con eritrocitos humanos se llevaron a cabo en el laboratorio de enfermedades infecciosas de la Universidad del Cauca. Todas las actividades se efectuaron en condiciones controladas de laboratorio y con estrictas medidas de asepsia para evitar contaminación.

7.3.1 Extracción de la secreción de las glándulas parótidas.

La extracción de la secreción se realizó de un total de 24 de individuos de cada sitio, mediante una estimulación manual de las glándulas parótidas, se suspendió en agua destilada, desionizada y estéril, fueron recogidos 29,7 y 24,3 g de secreción para Timbío y Patía respectivamente, en recipientes plásticos tapa rosca y a continuación se procedió a la liofilización.

7.3.2 Liofilización de la secreción de las glándulas parótidas

La secreción recogida en recipientes pasticos fue cubierta con papel Parafilm y liofilizada el mismo día de la extracción en el equipo LABCONCO de serial número 061061654F siguiendo para ello, un protocolo estandarizado por Coral, 2010 específicamente para secreciones de anfibios, de una duración de 04 horas. Finalmente, el producto del liofilizado fue almacenado a -20 °C.

7.3.3 Condiciones adecuadas para replicar las cepas de las bacterias patógenas.

Las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, fueron previamente obtenidas del Laboratorio de Enfermedades infecciosas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca, las cuales fueron obtenidas de las cepas madre con una sola replicación, lo que aseguraba su patogenicidad.

Estas cepas fueron replicadas y cultivadas, en Agar Mueller- Hinton y se incubaron a 37°C, para obtener cantidad suficiente de cultivo un buen material biológico como fuente de inóculo para el desarrollo del estudio. La metodología que se siguió para mantener el cultivo de las cepas bacterianas se indica en el protocolo de (Coral, 2010).

7.3.4 Evaluación de la actividad antibiótica de la secreción de las glándulas parótidas de *R. marina* sobre las cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

7.3.4.1 Prueba de susceptibilidad bacteriana por el método de microdilución en caldo y bioensayos en microplaca para cultivo celular.

Para evaluar la capacidad antibiótica, considerando el efecto de la secreción, se usó la técnica de microdilución en microplaca para cultivo celular, teniendo en cuenta las normas del Comité Nacional de estándares de laboratorios clínicos

(NCCLS) y el protocolo descrito por (Coral, 2010). Para ello, se establecieron dos sistemas de control y cinco tratamientos: (1) Control positivo (medio de cultivo + inóculo); (2) Control negativo (medio de cultivo + Cloranfenicol para la cepa *P. aeruginosa*) y (medio de cultivo + Trimetropin para *E. coli* y *S. aureus*); (3) Medio de cultivo + secreción de las glándulas parótidas (1 mg/mL); (4) Medio de cultivo + secreción de las glándulas parótidas (0.5 mg/mL); (5) Medio de cultivo + secreción de las glándulas parótidas (0.25 mg/mL); (6) Medio de cultivo + secreción de las glándulas parótidas (0.125 mg/mL); (7) Medio de cultivo + secreción de las glándulas parótidas (0.065 mg/mL). Estas cantidades se prepararon a partir de una solución de 2 mg/mL. Por otra parte, es importante aclarar que los antibióticos Cloranfenicol y Trimetropin fueron tomados como referentes en el estudio, ya que estos son los antibióticos comerciales usados comúnmente para combatir estas bacterias en el campo clínico.

Para llevar a cabo el experimento se preparó un inóculo con bacterias frescas de las cepas *E.coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, obtenidas de una resiembra en Agar Mueller Hinton 24 horas antes de los ensayos. Transcurridas las 24 horas se tomaron entre tres y cinco colonias de cada cepa bacteriana e independientemente se introdujeron en tubos que contenían 5 mL de medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion), posteriormente se incubaron a 37°C durante 4-6 horas, hasta alcanzar un valor de 0,5 de la escala de Mc Farland, este ajuste de concentración se realizó por medio del equipo Densimat. En los 15 minutos previos al desarrollo de la prueba de microdilución, se ajustó la turbidez de la suspensión 0.5 Mc Farland, de la cual se diluyeron 2 mL de suspensión en 38 mL de agua destilada desionizada y esterilizada (dilución 1:20) para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL en cada pozo de la placa de la microplaca para cultivo celular.

El inóculo se preparó con bacterias frescas de las cepas *E.coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, obtenidas de una resiembra en Agar Mueller Hinton 24 horas antes de los ensayos; Transcurridas las 24 horas se tomaron entre tres y cinco colonias de cada cepa bacteriana e independientemente se introdujeron en tubos que

contenían 5mL de medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion), posteriormente se incubaron a 37°C por 4-6 horas, hasta alcanzar un valor de 0.5 de la escala de Mc Farland, este ajuste de concentración se realizó por medio del equipo densimat.

En los 15 minutos previos al desarrollo de la prueba de microdilución, se ajustó la turbidez de la suspensión 0.5 Mc Farland, diluyendo 2 mL de dicha suspensión en 38 mL de agua destilada desionizada y esterilizada (dilución 1:20) para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL en cada pozo de la placa de Elisa.

Enseguida, la técnica de microdilución se desarrolló en cuatro microplacas para cultivo celular de 96 pozos, dos para cada población. El primer paso para proceder al montaje fue colocar 100 ul del medio de cultivo en cada uno de los pozos de la placa a emplear. Luego se colocan 100 ul de la solución madre de la solución de la secreción, teniendo en cuenta que estamos haciendo una dilución 1: 2, por lo que si la solución madre 2 mg/mL, en el primer pozo tendríamos una concentración real de 1mg/mL, luego procedemos a realizar diluciones dobles hasta los pozos F y se descartan los últimos 100 ul. Por último, se colocan 10 ul del inóculo bacteriano estandarizado. Finalmente, las microplacas fueron selladas e incubadas a 37°C por 24 horas, después de este lapso de tiempo, se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda igual a 630 nm, en el espectrofotómetro para microplatos, las lecturas de absorbancia altas indicaban mayor densidad de la solución lo que indica un mayor número de células bacterianas en suspensión.

Las distribuciones se realizaron de la siguiente manera (figura 4), en la microplaca 1: los pozos 1A y 2A fueron pozos vacíos (Blanco), 3A-12A: Pozos con medio de cultivo (Rojo), 1B-1F: Control Positivo *E. coli*, 2B-2F: Control negativo *E. coli* (Azul), 3B-3F: Control Positivo *S. aureus*, 4B-4F: Control negativo *S. aureus* (Rosado), 5B-5F: Control Positivo *P. aeruginosa*, 6B-6F Control negativo *P. aeruginosa* (Verde), 7A-7H pozos vacíos (Blanco). Desde la columna 8 hasta la columna 12 se encuentran las diluciones de la secreción parótida incubadas con *E. coli*: 8B-12B: dilución 1 mg/mL, 8C-12C: dilución 0.5 mg/mL, 8D-12D: dilución

0.25 mg/mL, 8E-12E: dilución 0.125 mg/mL, 8F-12F: dilución 0.0625 mg/mL (Naranja); La microplaca 2: distribuida de la siguiente manera: 1A y 2A: Pozos vacíos (Blanco), 3A-11A: Pozos con medio de cultivo (Rojo), Desde la columna 1 hasta la columna 5 se encuentran las diluciones de la secreción parótida incubadas con *S. aureus*: : 1B-5B: dilución 1 mg/mL, 1C-5C: dilución 0.5 mg/mL, 1D-5D: dilución 0.25 mg/mL, 1E-5E: dilución 0.125 mg/mL, 1F-5F: dilución 0.0625 mg/mL (Violeta); Desde la columna 7 hasta la columna 11 se encuentran las diluciones de la secreción parótida incubadas con *P. aeruginosa*: 7B-11B: dilución 1 mg/mL, 7C-11C: dilución 0.5 mg/mL, 7D-11D: dilución 0.25 mg/mL, 7E-11E: dilución 0.125 mg/mL, 7F-11F: dilución 0.0625 mg/mL (Amarillo).

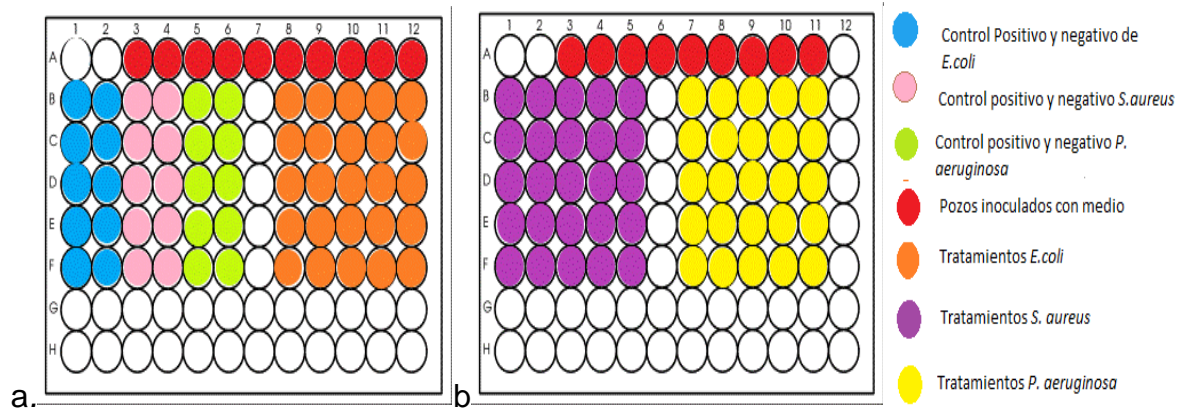


Figura 4. Ilustración que representa el diseño de los bioensayos para evaluar la capacidad antibiótica de la secreción de las glándulas parótidas de *R. marina* sobre las cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Cada tratamiento se realizó con cinco repeticiones.

7.3.4.2 Cantidad mínima inhibitoria

Teniendo en cuenta que los valores altos de absorbancia indicaron mayor crecimiento bacteriano, la CMI se determina como la menor concentración en la que se observó una disminución del crecimiento, comparando los valores de los tratamientos con los valores del control positivo, en el cual se sabe que existe crecimiento bacteriano.

7.3.5 Evaluación de la actividad hemolítica de la secreción de las glándulas parótidas de *R. marina* sobre eritrocitos humanos.

La citotoxicidad de la secreción parótida de *R. marina* en células de mamíferos se determinó sobre eritrocitos humanos, calculando la hemólisis de los glóbulos rojos mediante la lectura de absorbancia, donde a mayor absorbancia mayor número de células en suspensión, que indicaría mayor lisis celular. Todos los procedimientos se desarrollaron a temperatura ambiente, la solución salina usada fue solución salina fisiológica y el agua destilada se encontraba esterilizada.

Para esta prueba se emplearon 4 mL de sangre de tipo O+ obtenidos de un donante femenino sano; a continuación se procedió a la separación de las células para lo cual se centrifugó la muestra de sangre a 4000 rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante, y seguido se desarrolló el lavado de eritrocitos tomando 1 mL del precipitado anterior, al cual se le adicionaron 3 mL de solución salina fisiológica repitiendo este proceso 3 veces; del botón de eritrocitos obtenido finalmente se diluyó en solución salina hasta tener una solución al 3%.

La secreción parótida de *R. marina* fue diluida en solución salina fisiológica y se usaron las mismas concentraciones que en la prueba de microdilución (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.065 mg/mL) , estas diluciones se hicieron en tubos plásticos tapa rosca a partir de una solución madre de 2 mg/mL.

A continuación se incubaron 4,5 mL de solución de la secreción con 0,5 mL de la solución de eritrocitos al 3%, se homogenizó y se incubó por 1 hora, pasado este tiempo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos.

Finalmente, se tomó 200 µL del sobrenadante para cada pozo a servir en microplacas y se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento, incluyendo el control positivo (Agua destilada con eritrocitos) y el control negativo (solución salina fisiológica con eritrocitos), seguido se realiza la lectura de absorbancias

7.4 Diseño experimental

Se realizaron pruebas de ajuste a la curva normal y homogeneidad de varianzas entre los diferentes tratamientos, en los casos que se cumplían estos criterios se realizó una prueba de ANOVA de una vía y en el caso contrario se desarrolló la prueba de Kruskal Wallis, se compararon cinco (5) concentraciones de la secreción de las glándulas parótidas de *R. marina*, (1) control negativo, (1) control positivo y el testigo (medio), que constituyeron los tratamientos considerados en el estudio (8 en total), cada uno con 5 repeticiones; usando el software Bioestat 5.0.

La comparación del efecto de la secreción de las dos poblaciones se efectuó mediante una Anova de dos vías.

Se determinó la CL_{50} para la prueba de dilución empleando una regresión logarítmica, con el software GraphPad Prism 5.

8. RESULTADOS

8.1 SECRECIÓN PARÓTIDA DE *R. marina*

La secreción obtenida de las glándulas parótidas de *R. marina* en el sector de Timbío fue una sustancia líquida y de color blanco en su gran mayoría. Para el caso de Patía, la secreción tuvo algunas diferencias en la textura y de color debido a que predominó una sustancia cerosa de color amarillo; sin olor perceptible en las dos situaciones.

8.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Con el fin de confirmar la asepsia de los procedimientos, en cada placa se usaron pozos inoculados únicamente con el caldo nutritivo en los cuales no se evidenció crecimiento bacteriano transcurridas las 24 horas de incubación y que sirvió de referencia para diferenciar el crecimiento bacteriano en los tratamientos donde se usaron las cepas bacterianas.

La secreción parótida de las dos poblaciones de *R. marina* presentaron similitudes en los efectos sobre las cepas bacterianas analizadas, mostrando inhibición en el crecimiento de las cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus*.

8.2.1 Efecto de la secreción parótida de los anuros colectados en Timbío - Cauca

La secreción parótida de los individuos de esta población presentó efectos diferentes sobre las tres cepas bacterianas como se muestra a continuación.

8.2.1.1 Efecto inhibitorio del crecimiento de *Escherichia coli*

Transcurridas 24 horas después del inicio de la prueba de microdilución la secreción parótida inhibió el crecimiento de la cepa de *E. coli*, para este caso hubo diferencias significativas entre los tratamientos con un valor de $p < 0,001$ como se evidencia en la figura 2, logrando en algunos casos inhibición de crecimiento similares a los arrojados por el antibiótico comercial Trimetropin, usado como control negativo, además el efecto inhibitorio se incrementó en las concentraciones de 0.125 mg/mL a 1 mg/mL

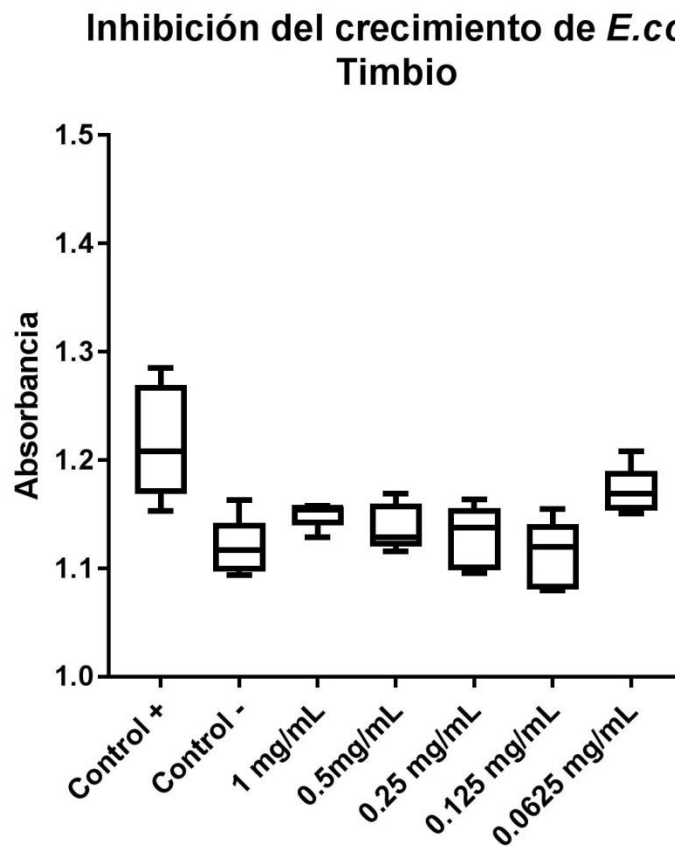


Fig 5. Inhibición del crecimiento de *E. coli* con la secreción parótida de *R. marina* (población Timbio) $p < 0.0001$, $F=7.6961$.

8.2.1.2 Efecto inhibitorio del crecimiento de *Staphylococcus aureus*

El efecto que muestra la secreción frente a la cepa de *S. aureus* es similar a la presentada para *E coli*, al analizar los datos por la prueba paramétrica de Anova, las diferencias entre los tratamientos comparados con el control positivo fueron significativas, con un valor de p igual a 0.0007. La mayor inhibición del crecimiento se logró con la concentración de 1mg/mL.

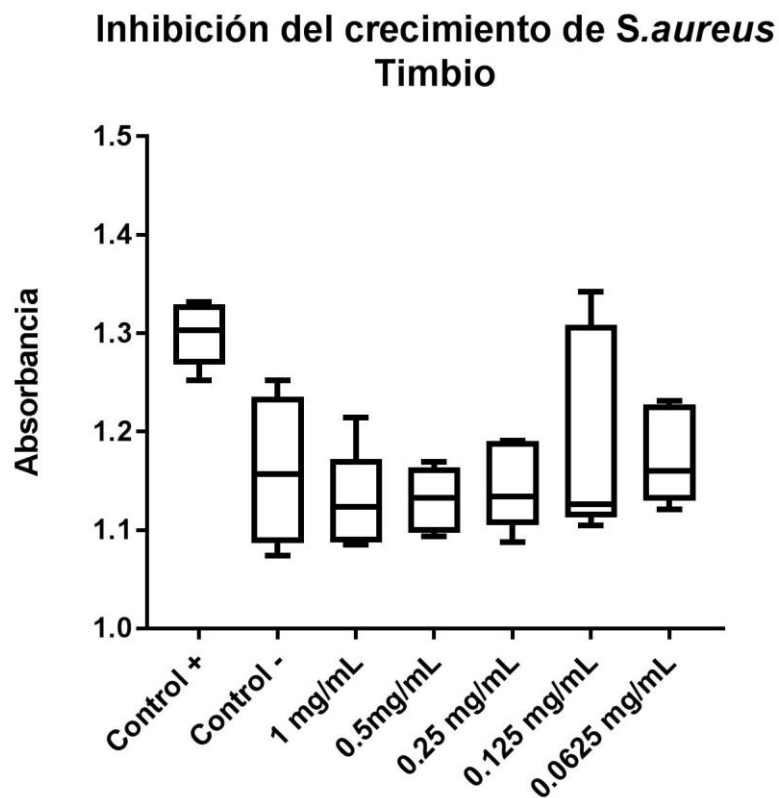


Fig.6 Inhibición del crecimiento de *S. aureus* con la secreción parótida de *R. marina* (población Timbio) $p = 0.0007$, $F = 5.4742$

8.2.1.3 Efecto inhibitorio del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Transcurridas las 24 horas de incubación de la prueba, la secreción parótida de *R. marina* no tuvo efecto inhibitorio en el crecimiento de esta bacteria, y las diferencias entre los tratamientos y el control positivo no fueron significativas según la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis con un valor de p : 0.0007.

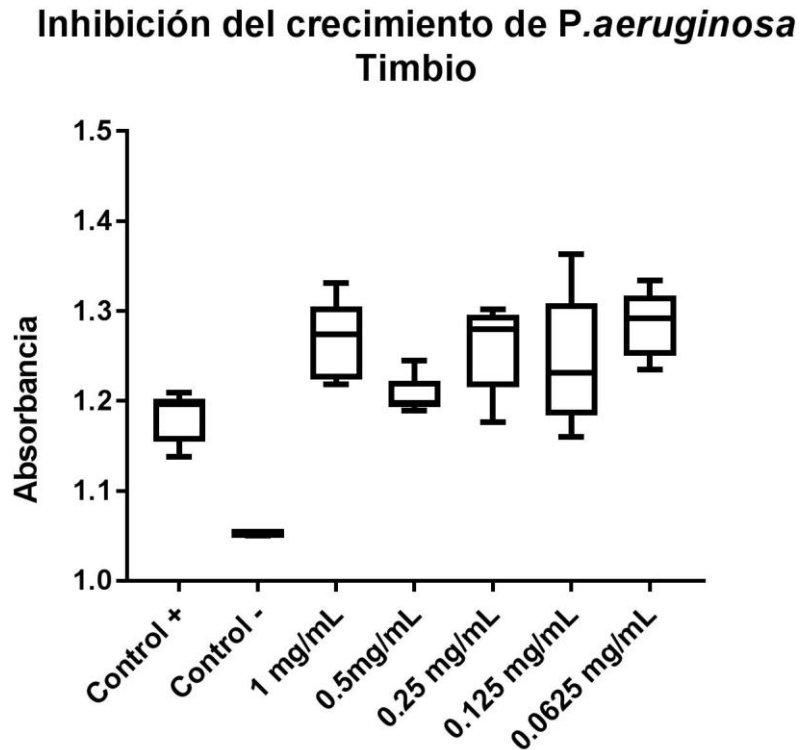


Fig. 7 Efecto en el crecimiento de *P. aeruginosa* de la secreción parótida de *R. marina* (población Timbio) $p = 0.0008$, $H = 22.8506$

8.2.2 EFECTO DE LA SECRECIÓN PARÓTIDA DE LOS ANUROS COLECTADOS EN PATÍA

8.2.2.1 Efecto inhibitorio del crecimiento de *Escherichia coli*

La secreción parótida de esta población mostró diferencias en cuanto a la inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas, sobre *E. coli* se observaron diferencias significativas, arrojadas por la prueba de Kruskal-Wallis con un valor de p igual a 0.0097 para las concentraciones usadas, exceptuando las concentraciones de 0.0625 y 0.25 mg/mL donde el crecimiento, a pesar de que fue menor comparado con el control positivo no mostró diferencias significativas.

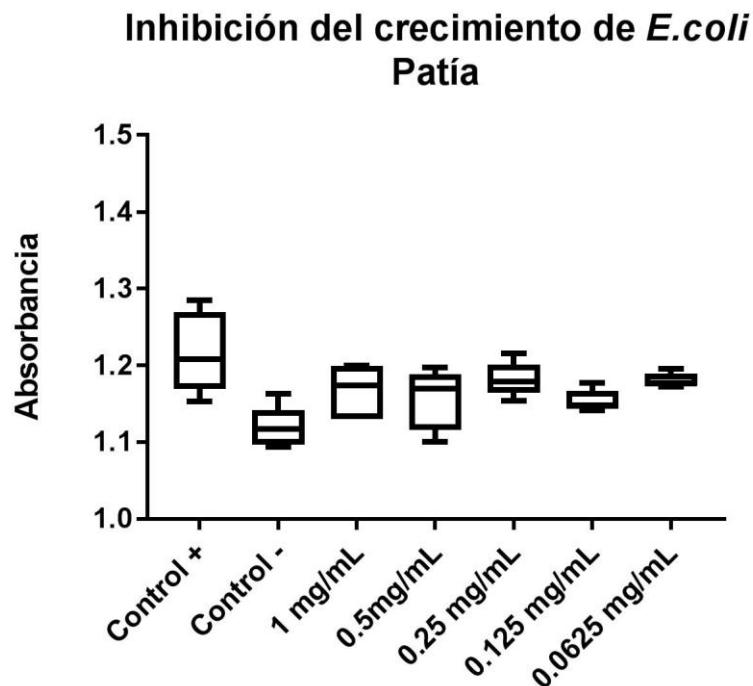


Fig 8. Inhibición del crecimiento de *E. coli* con la secreción parótida de *R. marina* (población Patía) $p = 0.0097$, $H = 16.8800$

8.2.2.2 Efecto inhibitorio del crecimiento de *Staphylococcus aureus*

El efecto que tuvo la secreción parótida sobre el crecimiento de *S. aureus* mostro diferencias significativas para todas las concentraciones, con un p-valor de 0.0124 en la prueba de Kruskal-Wallis, obteniendo valores similares a los logrados en el tratamiento con el antibiótico.

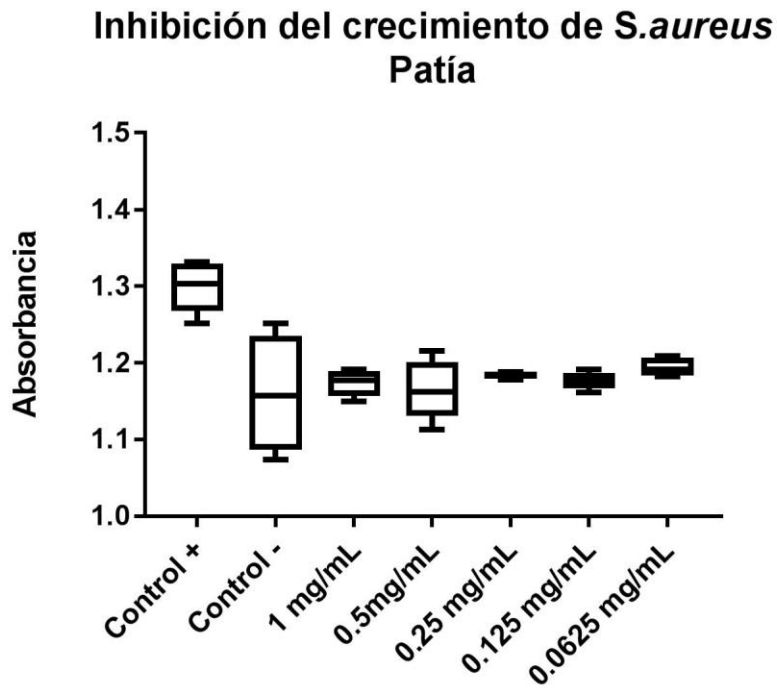


Fig 9. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* con la secreción parótida de *R. marina* (población Patía) $p = 0.0124$, $H = 16.2668$

8.2.2.3 Efecto inhibitorio del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Para esta cepa bacteriana la secreción parótida de *R. marina* no mostro un efecto inhibitorio en ninguna de las concentraciones, la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis arrojó un valor de p menor a 0.0001, mostrando diferencias significativas entre el control positivo y las concentraciones de 0.25 mg/mL y 0.0625mg/mL con un valor de $p < 0.05$

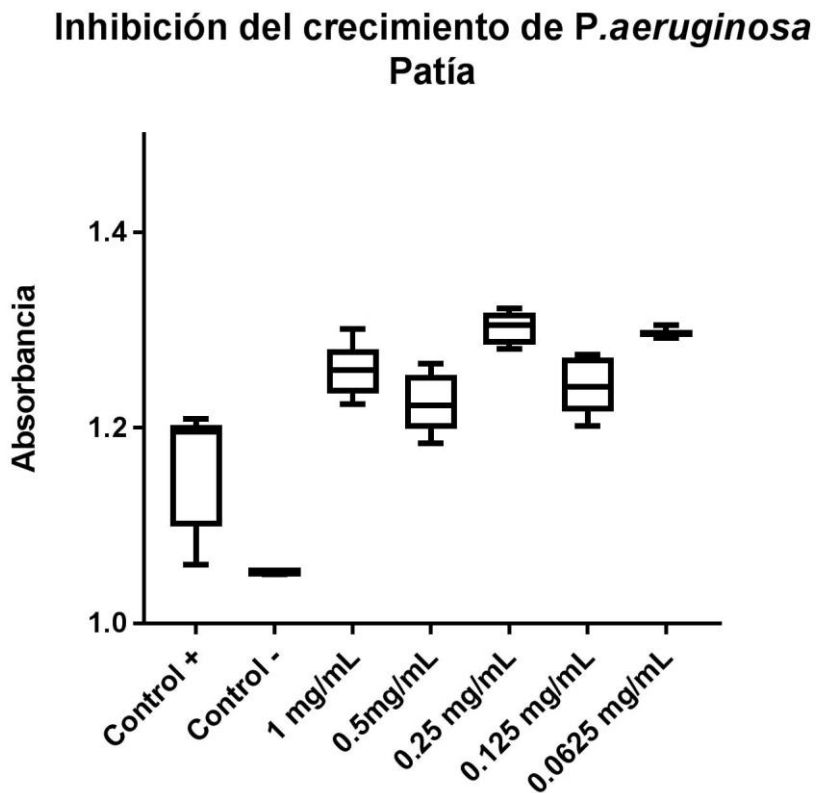


Fig. 10 Efecto en el crecimiento de *P. aeruginosa* de la secreción parótida de *R. marina* (población Patía) $p < 0.0001$, $H= 29.23578$.**2.3 Comparación del efecto**

inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* por la secreción parótida de las dos poblaciones.

La comparación del efecto inhibitorio de las secreciones sobre las cepas bacterianas mencionadas anteriormente, arrojó diferencias significativas únicamente para la cepa *E. coli* (Figura 11), lo que nos sugiere que el efecto presentado sobre *S. aureus* fue similar para las dos secreciones.

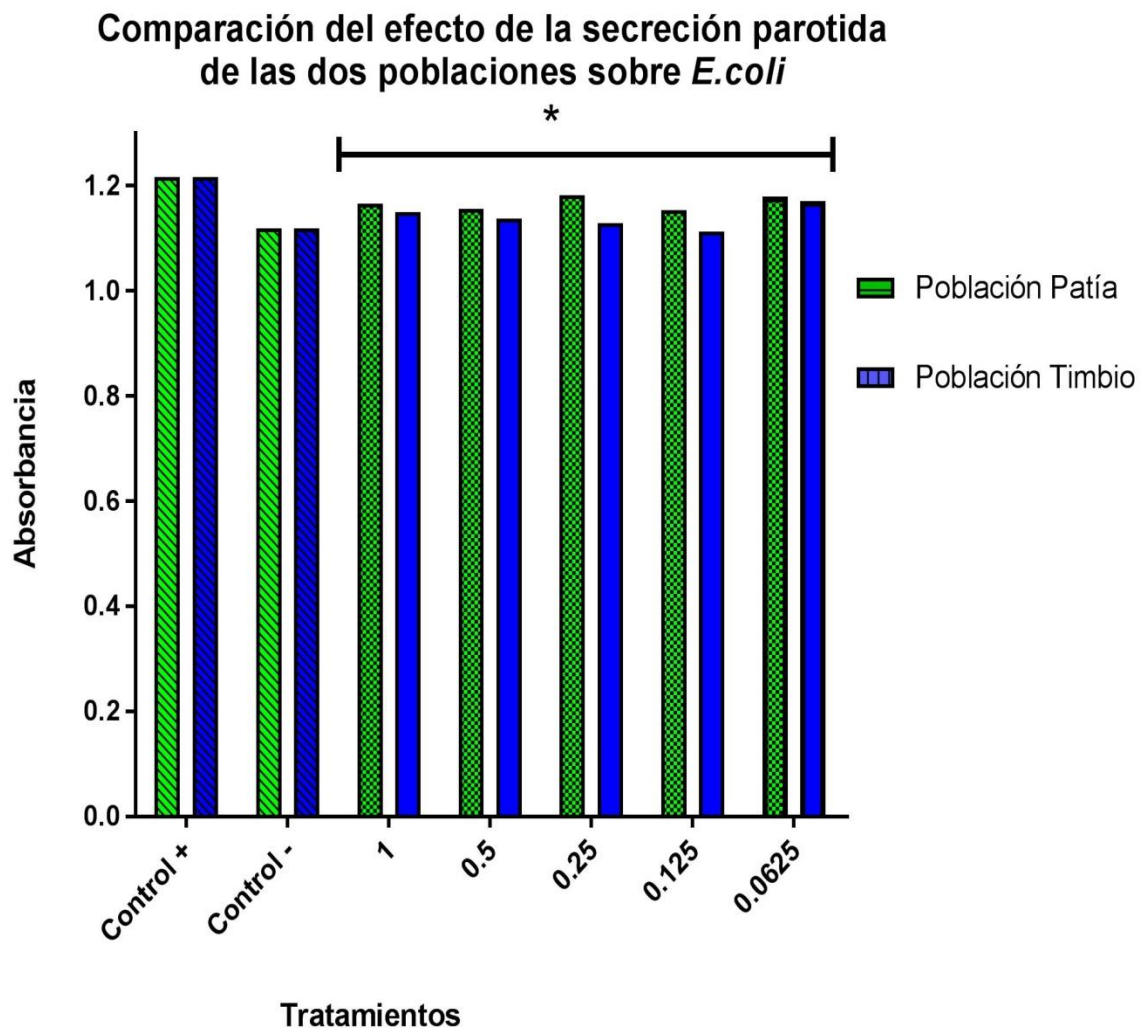


Fig. 11 Comparación del efecto inhibitorio de la secreción parótida de las dos poblaciones de *R. marina* sobre la cepa *E. coli*, mediante la prueba de Anova de dos vías, P: 0.011.

8.3 CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue considerada como la menor concentración en la que se observó una disminución en los porcentajes de crecimiento para las cepas bacterianas sobre las cuales tuvo efecto inhibitorio la secreción.

SECRECIÓN	BACTERIA	PORCENTAJE DE	
		INHIBICIÓN	VALOR CIM (mg/mL)
1167 msnm	<i>E. coli</i>	6.9%	0.0625
	<i>S. aureus</i>	11.05%	0.0625
	<i>P. aeruginosa</i>	-4.65%	No encontrado
1850 msnm	<i>E. coli</i>	9.1%	0.0625
	<i>S. aureus</i>	13.12%	0.0625
	<i>P. aeruginosa</i>	-3.57%	No encontrado

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de las dos poblaciones de *R. marina*

8.4 CL₅₀ DE LA SECRECIÓN PARÓTIDA DE LOS ANUROS COLECTADOS EN TIMBÍO

8.4.1 Porcentaje de crecimiento de *Escherichia coli*

La concentración mínima inhibitoria para la cepa *E. coli* obtenida mediante regresión logarítmica tiene un valor de 0.13 mg /mL

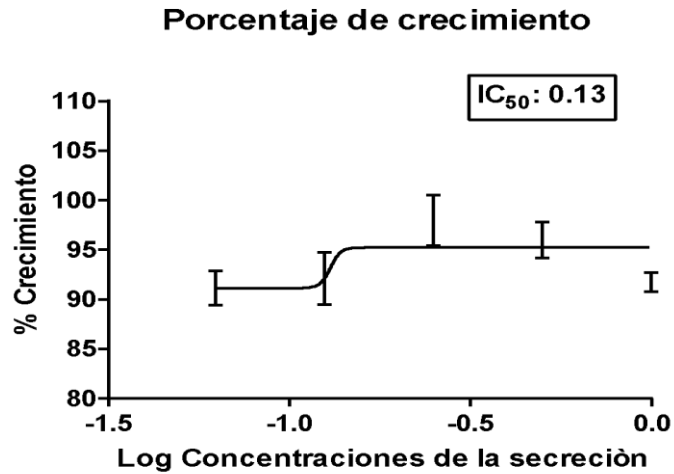


Fig 12. Porcentaje de crecimiento de la cepa *E. coli* dependiente de la concentración de la secreción parótida de *R. marina*.

8.4.2 Porcentaje de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Mediante regresión logarítmica se logró hallar la concentración inhibitoria mínima con un valor de 0.24 mg/mL

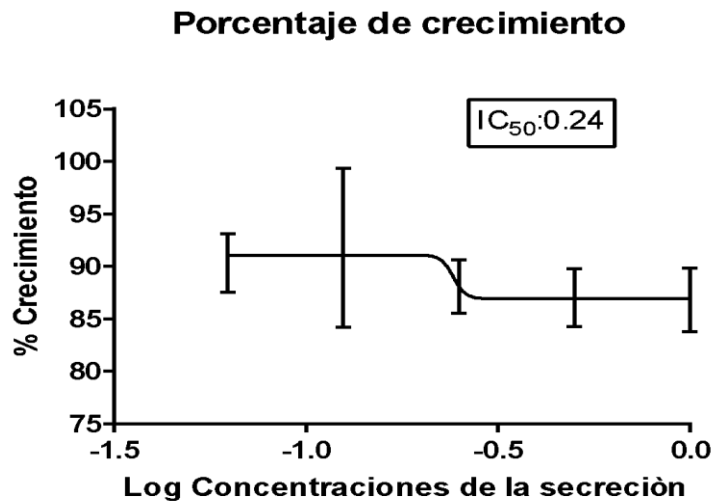


Fig. 13 Porcentaje de crecimiento de la cepa *S.aureus* dependiente de la concentración de la secreción parótida de *R. marina*

8.4.2 CL₅₀ DE LA SECRECIÓN PARÓTIDA DE LOS ANUROS COLECTADOS EN PATÍA

8.4.2.1 Porcentaje de crecimiento de *Escherichia coli*

La concentración mínima inhibitoria para la cepa *E. coli* obtenida mediante regresión logarítmica tiene un valor de 0.123 mg /mL

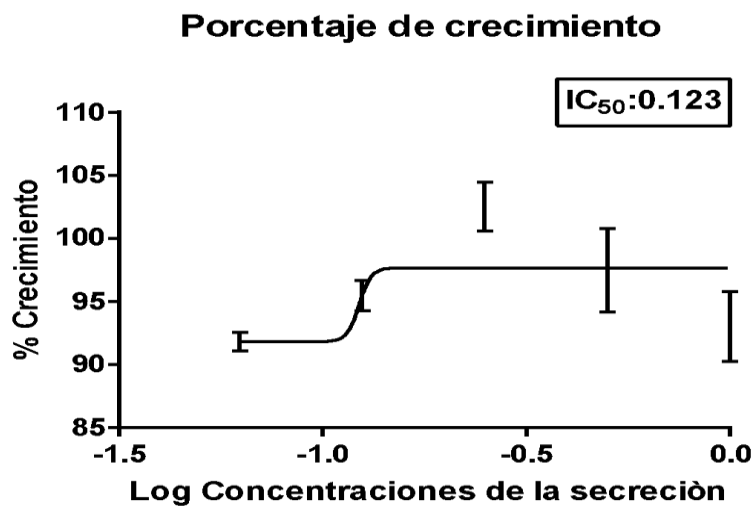


Fig.14 Porcentaje de crecimiento de la cepa *E. coli* dependiente de la concentración de la secreción parótida de *R. marina*

8.4.2.2 Porcentaje de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

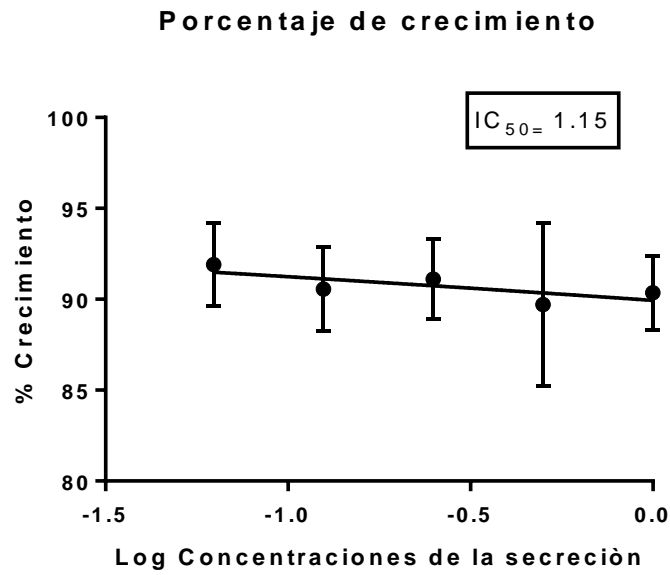


Fig.15 Porcentaje de crecimiento de la cepa *S. aureus* dependiente de la concentración de la secreción parótida de *R. marina*.

8.5 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

La citotoxicidad de la secreción parótida de *R. marina* probada en eritrocitos humanos no presentó una actividad hemolítica sobre estas células como se muestra en las figuras 16 y 17.

8.5.1 Secreción parótida de los anuros colectados en Timbío

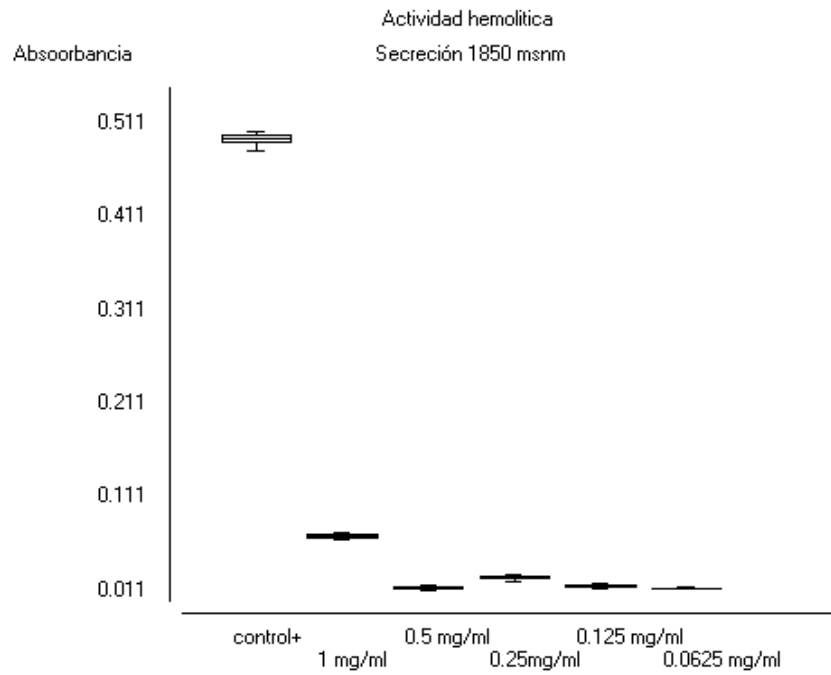


Fig 16 Efecto hemolítico en eritrocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de la secreción parótida de *R. marina*, 1850 msnm. H: 22.6588, p : 0.0004

8.5.2 Secreción parótida de los anuros colectados en Patía

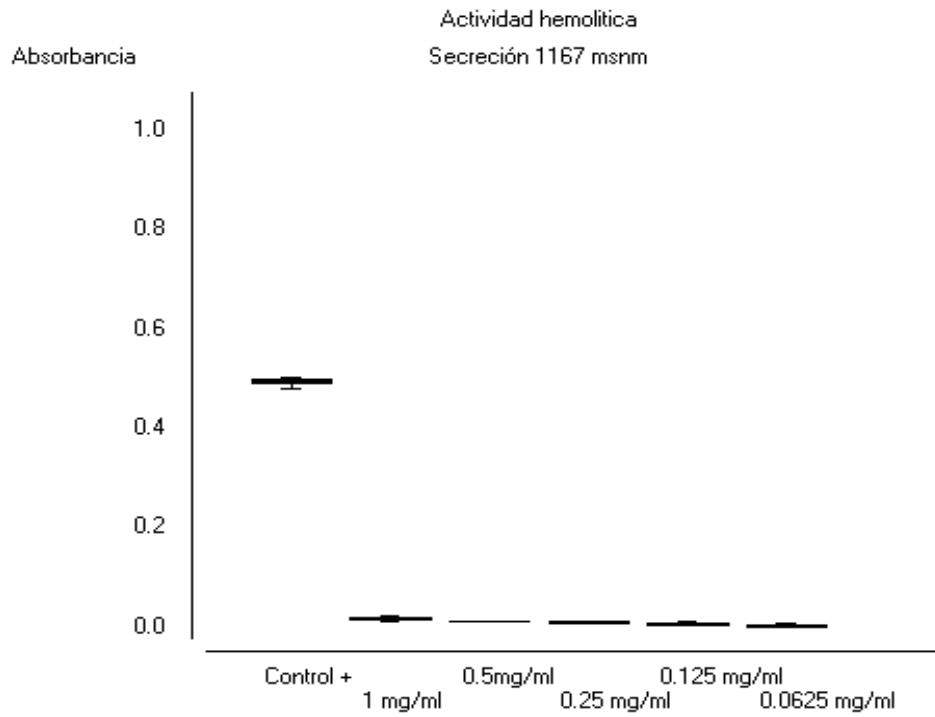


Fig 17 Efecto hemolítico en eritrocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de la secreción parótida de *R. marina*, 1167 msnm. H: 31.0050; p : < 0.0001.

9. DISCUSIÓN

Los anfibios poseen un par de acumulaciones glandulares en cada lado de la región dorsal de la cabeza conocidas como macro glándulas parótidas; que cuando se ven amenazados apuntan hacia el agresor y expulsan una sustancia venenosa usada como mecanismo de defensa (Regis *et al.*, 2017). La secreción parótida de *R. marina* logró inhibir el crecimiento de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, debido a que estas sustancias son una fuente importante de bufadienólidos, compuestos que exhiben características estructurales interesantes y propiedades biofarmacológicas (Cunha-Filho *et al.*, 2010), además esta especie de anuro presenta un amplio rango de distribución lo que permite que se generen o se perfeccionen mecanismos de defensa contra los depredadores o microorganismos que conciban riesgo en su sobrevivencia.

Una explicación para el efecto inhibitorio de la secreción, puede darse mediante la composición de la misma, la cual contiene Bufadienólidos y sus conjugados que se pueden encontrar en formas libres y conjugadas en los tejidos y fluidos corporales de sapos del género *Bufo* (Geraldino, *et al.*, 2005); la secreción de *R. marina* está constituida aproximadamente por 29 compuestos entre los cuales el principal bufadienolido libre es marinobufagin 7, marinobufotoxina 15 y bufalitoxina 9 (Schmeda-Hirschmann, 2016), los cuales exhiben una variedad de actividades biológicas entre las cuales se encuentra la actividad antimicrobiana (Geraldino, *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se reporta la inhibición en el crecimiento de cepas bacterianas como *E. coli* y *S. aureus* por la secreción parótida de *R. marina* a dos altitudes diferentes sobre el nivel del mar, lo que sugiere que el medio donde habitan estas poblaciones se encuentra expuesto a estas bacterias lo que induce la capacidad de sintetizar péptidos antimicrobianos en la secreción de la piel con el fin de evitar que afecten sus procesos vitales (Mangoni *et al.*, 2001), como también lo nombra (Matutte *et al.*, 2000) al demostrar que la síntesis de un péptido

antimicrobiano en la piel de rana se induce en respuesta a las influencias ambientales, proporcionando evidencia de que dichos péptidos juegan un papel fisiológicamente importante en la defensa del organismo contra la invasión por microorganismos.

Además, Esta secreción no presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. aeruginosa*, a pesar de que es una bacteria Gram negativa como *E. coli* frente a la cual tuvo una acción inhibitoria, situación que se explica debido a que la membrana externa de esta bacteria limita la penetración de pequeñas moléculas hidrofílicas y excluye las moléculas más grandes, por lo que juega un rol principal en la resistencia a los antibióticos; sin embargo pequeños antibióticos hidrofílicos tales como los β -lactámicos y las quinolonas pueden atravesar la membrana externa pasando a través de canales acuosos constituidos en el interior de unas proteínas designadas porinas (Lujan, 2014).

La actividad de la secreción parótida de *R. marina* tuvo pocas variaciones según el sitio de colecta. Para la cepa de *E. coli* las diferencias fueron significativas entre los sitios, debido a la exposición que presentan los individuos a esta bacteria, en la estación piscícola los anuros conviven con los peces en los estanques donde hacen sus necesidades fisiológicas, y es común encontrar esta bacteria; mientras que la otra población estaba menos expuesta a sustancias que contengan la bacteria.

Para las otras dos cepas no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas lo que indica que el poder inhibitorio fue similar para las dos poblaciones, aunque el número de compuestos de bufadienólidos y su cantidad total cambia durante la ontogenia temprana, la microbiota circundante no tiene un efecto significativo sobre estos cambios en ninguna de las características de defensa química (Hettyey *et al.*, 2017), además estos compuestos desempeñan un papel importante en los mecanismos de defensa inmunitaria de los insectos y las plantas y son un componente importante de la respuesta inmune innata de los

animales, incluidos los crustáceos, los mamíferos y los seres humanos (Haney and Hancock, 2014).

Teniendo en cuenta el efecto inhibitorio de la secreción frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, fue posible calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI) donde se comparan con valores encontrados en péptidos aislados de secreciones totales (Tabla 1).

<i>Péptido – Secreción Total</i>	<i>CIM</i>		<i>Autor</i>
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>HSP1</i>	0,032	0.008	Prates, <i>et al</i> (2004)
<i>PGL_a</i>	0.032	0.064	Lonher & Proddnigg (2009)
<i>Mag2</i>	0.064	0,256	Lonher & Proddnigg (2009)
<i>Caerin1</i>	>0.1	0.003	Fernandez, <i>et al</i> (2009)
<i>Secreción total Dendropsophus. Colombianus</i>	8.61	4.60	Coral (2010)
<i>Secreción total Colomascirtus. larinopygion</i>	0.1531	0.075	Lazo (2017)
<i>Secreción total de R. marina. (Timbio)</i>	0.0625	0.0625	Este trabajo
<i>Secreción total de R. marina. (Patia)</i>	0.0625	0.0625	Este trabajo

Tabla 2. Comparación de las CIM (mg/mL) para péptidos aislados de secreciones totales y CIM de secreciones totales de anuros. Tomado y modificado de (Coral, 2010; Lazo, 2017; Prates *et al.*, 2004)

Como se observa en la tabla anterior, la secreción parótida *R. marina* presenta valores de CIM similares a los expuestos por *C. larinopygion* para la cepa *E. coli*, teniendo en cuenta similitudes en el rango de distribución (1950 a 2100 msnm) lo que le permite compartir tanto microorganismos como condiciones climáticas de los medios en los cuales habitan; sin embargo, la secreción de la especie de este estudio es menor a la de *C. larinopygion* y *D. colombianus* las cuales son secreciones totales igualmente a las de nuestro estudio.

Por último, la secreción parótida de *R. marina* no presentó una actividad hemolítica, con valores muy cercanos a cero en todas las concentraciones, (Patia: $IC_{50}=0.004$; Timbio: $IC_{50}=0.0035$) lo que nos permite inferir que la secreción no causa la lisis de eritrocitos humanos; explicado a partir de las diferencias en la constitución de las células, los eritrocitos, tienen membranas enriquecidas en fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (SM), mientras que las membranas citoplásmicas bacterianas son generalmente mucho más electronegativas, con proporciones mayores de fosfolípidos hidroxilados fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) aniónicos, que típicamente están presentes en niveles extremadamente bajos, o totalmente ausentes de las membranas de los mamíferos (Yeaman and Yount, 2003), lo que permite la diferenciación para atacar o no las células por parte de los compuestos de la secreción.

10. CONCLUSIONES

- La secreción parótida de *Rhinella marina* presenta efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus*.
- La secreción parótida de *Rhinella marina* no presenta efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa bacteriana de *P. aeruginosa*.
- La Concentración Inhibitoria mínima (CIM) para la cepa *E. coli* para la población a 1160 y 1850 msnm es 0.123 y 0.13 mg/mL respectivamente.
- La Concentración Inhibitoria mínima (CIM) para la cepa *S. aureus* para la población a 1160 y 1850 msnm es 1.15 y 0.24 mg/mL respectivamente.
- La secreción parótida total de *Rhinella marina* presenta un nivel bajo de hemólisis en eritrocitos humanos.
- La actividad presentada por la secreción de este anuro brinda un mayor valor biológico debido a sus aplicaciones biotecnológicas y una razón más para la creación de acciones con el fin de conservar el hábitat que los alberga.

11. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios posteriores que permitan identificar las sustancias causantes del efecto inhibitorio de la secreción parótida de *Rhinella marina*.
- Es preciso, estimar el potencial de la secreción frente a otros agentes infecciosos tales como parásitos, hongos y virus, además de otras cepas bacterianas, con el propósito de encontrar más potencialidades biotecnológicas.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A., Cuentas, D., 2013. No Title [WWW Document]. Batrachia. URL <https://www.batrachia.com/>
- Acosta Galvis, A.R., Huertas Salgado, C., Rada, M., 2006. Aproximación al conocimiento de los Anfibios en una localidad del Magdalena Medio (Departamento de Caldas, Colombia). *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* 30, 291–301.
- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1, 5–16.
- Barra, D., Simmaco, M., 1995. Amphibian skin : a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol.* 13, 2166–2170.
- Bowie, J.H., Tyler, M.J., 2006. Host Defense Peptides from Australian Amphibians: Caerulein and Other Neuropeptides. *Handb. Biol. Act. Pept.* 283–289. <https://doi.org/10.1016/B978-012369442-3/50046-5>
- Bush, L., 2018. Infecciones por *Staphylococcus aureus*. *Man. MSD*.
- Cardona-Botero, V.E., Viafara-Vega, R.A., Valencia-Zuleta, A., Echeverry-Bocanegra, A., Hernandez-Córdoba, O.D., Jaramillo-Martinez, A.F., Galvis-Cruz, R., Gutierrez-Zuñiga, J.A., Castro-Herrera, F., 2013. Diversidad de la herpetofauna en el Valle del Cauca (Colombia): un enfoque basado en la distribución por ecorregiones, altura y zonas de vida. *Biota Colomb.* 14, 156–233.
- Carvalho, A.C., Márquez, C.A.P., Azevedo, R.B., Joanitti, G.A., Pires Júnior, O.R., Fontes, W., Castro, M.S., 2015. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of crude skin secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in vitro melanoma cells. *Toxins (Basel).* 7, 3989–4005. <https://doi.org/10.3390/toxins7103989>

- Echevarria, J., Iglesias, D., 2003. Estafilococo Meticilino resistente , un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered* 14, 195–203.
- Ferreira, P.M.P., Lima, D.J.B., Debiasi, B.W., Soares, B.M., Machado, K. da C., Noronha, J. da C., Rodrigues, D. de J., Sinhorin, A.P., Pessoa, C., Vieira Júnior, G.M., 2013. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. *Toxicon* 72, 43–51.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.009>
- Galeano, S.P., Urbina, J.C., Gutiérrez-C., P.D.A., Rivera-C., M., Páez, V.P., 2006. Los anfibios de Colombia, diversidad y estado del conocimiento. *Inf. Nac. sobre el Av. en el Conoc. y la Inf. la Biodivers.* 1998 - 2004. Tomo II. 2004, 92–104.
- Guerrero, J., Da Silva, M., De Souza, M., n.d. Aplicación biotecnológica de la toxinología.
- Haney, E., Hancock, R., 2014. Peptide Design for Antimicrobial and Immunomodulatory Applications. *Biopolymers* 100, 572–583.
<https://doi.org/10.1002/bip.22250>.Peptide
- Jawetz, M., Brooks, G.F., Blumenfeld, O.S., Enríquez Cotera, G., Martínez Moreno, M., 2008. *Microbiología médica*, 19a ed. Manual Moderno, Mexico.
- Kim, S.S., Shim, M.S., Chung, J., Lim, D., Lee, B.J., 2007. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretion of *Rana dybowskii*. *Peptides* 28, 1532–1539.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.07.002>
- Maciel, N.M., Collevatti, R.G., Colli, G.R., Schwartz, E.F., 2010. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 787–797. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.025>

Malbrán, C., 2001. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Seimc.Org 69.

Mangoni, M.L., Miele, R., Renda, T.G., Barra, D., Simmaco, M., 2001. The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms. *FASEB J.* 15, 1431–1432. <https://doi.org/10.1096/fj.00>

Matutte, B., Storey, K.B., Knoop, F.C., Conlon, J.M., 2000. Induction of synthesis of an antimicrobial peptide in the skin of the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica*, in response to environmental stimuli. *FEBS Lett.* 483, 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02102-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02102-5)

Mechkarska, M., Ahmed, E., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H., King, J.D., Conlon, J.M., 2010. Antimicrobial peptides with therapeutic potential from skin secretions of the Marsabit clawed frog *Xenopus borealis* (Pipidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 152, 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.007>

Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller., M., 2013. *Medical microbiology*, 7th ed. Elsevier. Saunders., Philadelphia.

Nascimento, A.C.C., Fontes, W., Sebben, A., Castro, M.S., 2003. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein Pept. Lett.* 10, 227–238. <https://doi.org/10.2174/0929866033478933>

OMS, 2018a. Resistencia a los antimicrobianos.

OMS, 2018b. *E.coli*.

OMS, 2018c. *Escherichia coli*.

OMS, 2017. Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos.

- Pérez, M., Mota, M., 2010. Morfología y estructura bacteriana. Rev. Actual. Clínica Investig. 49, 1–9.
- Prates, M. V., Sforça, M.L., Regis, W.C.B., Leite, J.R.S.A., Silva, L.P., Pertinhez, T.A., Araújo, A.L.T., Azevedo, R.B., Spisni, A., Bloch, C., 2004. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. J. Biol. Chem. 279, 13018–13026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310838200>
- Qi, F., Li, A., Inagaki, Y., Kokudo, N., Tamura, S., Nakata, M., Tang, W., 2011. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor. Int. Immunopharmacol. 11, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.12.007>
- Rash, L.D., Morales, R.A. V, Vink, S., Alewood, P.F., 2011. De novo sequencing of peptides from the parotid secretion of the cane toad, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*). Toxicon 57, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.012>
- Rodriguez, G., 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública México 45, 464–475.
- Rodriguez, J.A., Picazo, J.J., 2000. Compendio de microbiología medica 22–30.
- Secretaria distrital de salud, 2010. Manual De Actualizacion En Resistencia Bacteriana Y Normas Clsi M100 – S20 1–78.
- Soheili, V., Bazzaz, B.S.F., Abdollahpour, N., Hadizadeh, F., 2015. Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signaling system for identifying multiple inhibitors using molecular docking and structural analysis methodology. Microb. Pathog. 89, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.017>
- Stuart, S., Hoffmann, M., Cox, N., Berridge, R., Ramani, P., Young, B., 2008. THREATENED AMPHIBIANS OF THE WORLD, 1st ed.

Tesauro, 2013. Concentración Inhibitoria 50. Bibl. Agrícola Nac. los Estados Unidos.

Toledo, R.C., Jared, C., 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol. 111, 1–29.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)98515-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)98515-1)

Trabajo, I. nacional de seguridad e higiene en el, 2008. Pseudomonas aeruginosa. Вестник Харьковского Национального Университета Имени Вн Каразина. Серия «Медицина». <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/269001>

Wang, M., Wang, Y., Wang, A., Song, Y., Ma, D., Yang, H., Ma, Y., Lai, R., 2010. Five novel antimicrobial peptides from skin secretions of the frog , Amolops loloensis. Comp. Biochem. Physiol. Part B 155, 72–76.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.10.003>

Yount, N.Y., Bayer, A.S., Xiong, Y.Q., Yeaman, M.R., 2006. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. Biopolym. - Pept. Sci. Sect. 84, 435–458. <https://doi.org/10.1002/bip.20543>

Batrachia Colombia. Distribución de *Rhinella marina*. Tomado de <http://www.batrachia.com/orden-anura/bufonidae/rhinella-marina>. 2016.

ANEXOS

Anexo 1. Resolución para trabajo de grado titulado: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN PARÓTIDA DE DOS POBLACIONES DE *Rhinella marina* (BUFONIDAE) SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.



Facultad de Ciencias Naturales,
Exactas y de la Educación
Consejo de Facultad

8.5.2-90.4
RESOLUCIÓN No. 514
(16 de mayo de 2017)

Por la cual se aprueba la inscripción de un Trabajo de Grado y se nombra su Director(a)

EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA, en uso de sus Facultades legales, y

CONSIDERANDO QUE:

1. La reglamentación vigente sobre trabajos de grado en la Universidad del Cauca se recoge en los Acuerdos 033 de 1985, 051 de 2001 y 074 de 2009.
2. El Acuerdo 027 del 25 de julio de 2012, expedido por el Consejo Superior de la Universidad del Cauca, reglamentó el Trabajo de Grado en los Programas de Pregrado en la Universidad del Cauca.
3. Es un deber de la Facultad hacer cumplir las disposiciones vigentes que tengan que ver con los aspectos académicos.

RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO: Autorizar la inscripción del Trabajo de Grado en la modalidad investigación titulado "**Determinación de la actividad antibiótica de la secreción parótida de dos poblaciones de *Rhinella marina* (Bufonidae) sobre las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus***", presentado por el (la) estudiante del programa de Biología: Lizeth Carolina Rodríguez Benavidez.

ARTÍCULO SEGUNDO: Nombrar al (la) Dr. Jimmy Alexander Guerrero Vargas, como director(a) del trabajo de grado en mención.

ARTÍCULO TERCERO: Según lo establece el Artículo 12 del Acuerdo 027 de julio 25 de 2012, el tiempo límite para la realización de todas las modalidades de trabajo de grado será el aprobado por el Consejo de Facultad respectivo, sin que exceda de un año. En caso de presentarse una situación de fuerza mayor que retrase la terminación del trabajo y demande mayor tiempo del estipulado en el cronograma, el estudiante podrá solicitar ante el Consejo de Facultad una única prórroga por un máximo de tres (03) meses.

PARÁGRAFO. La prórroga debe ser solicitada quince días antes del vencimiento del tiempo establecido para la terminación del Trabajo de Grado, y debe contar con el visto bueno del director(a) del trabajo y coordinador(a) del programa. En caso de no realizar el trámite a tiempo, el trabajo se considera No Aprobado y el (la) estudiante deberá iniciar el



Universidad
del Cauca

Facultad de Ciencias Naturales,
Exactas y de la Educación
Consejo de Facultad

trámite para la aprobación de un nuevo proyecto de Trabajo de Grado por una segunda y única oportunidad.

ARTÍCULO CUARTO: Reiterar a la estudiante el cumplimiento de lo estipulado en los Acuerdos antes señalados, expedidos por el Consejo Superior de la Universidad del Cauca y el Consejo de Facultad, respectivamente.

ARTÍCULO QUINTO: Enviar copia de la presente providencia vía e-mail al director(a), y original a la hoja de vida del (la) estudiante: Lizeth Carolina Rodríguez Benavidez.

ARTÍCULO SEXTO: La presente Resolución rige a partir de la fecha de su expedición.

COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Popayán, en el salón de sesiones del Consejo de Facultad, a los dieciséis (16) días del mes de Mayo del año Dos Mil Diecisiete (2017).

Pedro Anibal Yanza Mera
Presidente Consejo

Ruth Isabel Gámez Farías
Secretaria Consejo

En la fecha 26-Mayo-2017 notifico personalmente a Lizeth Carolina Rodríguez Benavidez, con documento de identidad número 406177450 de Popayán, el texto de la Resolución No. 514 del 16 de mayo de 2017, que antecede advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición ante el Consejo de Facultad dentro de los CINCO (5) días hábiles siguientes a la fecha de la presente notificación.

FIRMA

Teléfono:

Correo:

Carolina Rodriguez

3109746752

lizethrodriguez@unicauca.edu.co

Proyectó: Valentina B.
Revisó y aprobó: Edna A.

Anexo 2 Consentimiento informado



Universidad
del Cauca

CONSENTIMIENTO INFORMADO

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA SECRECIÓN PARÓTIDA DE DOS POBLACIONES DE *Rhinella marina* (BUFONIDAE) SOBRE LAS CEPAS BACTERIANAS *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos

- Establecer la capacidad antibiótica de la secreción parótida de *R. marina* por la prueba de dilución.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la secreción de glándulas parótidas de *R. marina*
- Comprobar la actividad hemolítica de las secreciones de *R. marina* sobre eritrocitos humanos.

¿Que se propone con este estudio?

Para cumplir con el tercer objetivo de la investigación es necesaria la obtención de una muestra sanguínea de humano (5 mL) con la cual será posible desarrollar la prueba de hemólisis de la secreción de *R. marina*.

Características del participante:

Se requiere únicamente un donante, de género masculino o femennino, joven y sano.

Riesgos y beneficios:

El estudio no conlleva ningún riesgo y el paciente no recibe ningún beneficio.

Compensación:

No se dará ninguna compensación económica por participar.

Participación voluntaria:

La participación es estrictamente voluntaria.



Derecho de retirarse del estudio:

El participante tendrá el derecho de retirarse de la investigación en cualquier momento. No habrá ningún tipo de sanción o represalias.

A quién contactar en caso de preguntas:

Investigadora: estudiante Lizeth Carolina Rodríguez Benavidez del programa de biología, Universidad del Cauca, teléfono 3107746752.

Director: Profesor Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Ph D. Departamento de Biología, Universidad del Cauca, teléfono 321-781 5067.

Yo, Yuly Cristina Muñoz, con documento de identidad N° 1061720031 de Popayán, certifico que he sido informado con la claridad y veracidad debida respecto a la prueba de hemólisis a la que la estudiante Lizeth Carolina Rodríguez, me ha invitado a participar; que actúo consecuente, libre y voluntariamente como donador de la muestra de 5 mL de sangre para esta investigación.

Yuly Muñoz A.

Yuly Cristina Muñoz.

CC. 1061720031

Carolina Rodríguez B.

Lizeth Carolina Rodríguez.

CC. 1061774950, Popayán