

# UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



## FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

### EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL LÁTEX DE *Croton lechleri* Müll. Arg. (SANGRE DE GRADO) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico y  
Bioquímico

#### TESISTAS:

Bach. Espinoza Rivera, Clarivel Margot

Bach. Serna Quispe, Zulma Danitza

#### ASESOR:

Mg. Q.F. Muguruza López Oscar Alberto

Lima – Perú

2018

EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL LÁTEX DE ***Croton***  
***lechleri*** Müll. Arg. (SANGRE DE GRADO) FRENTE A  
***Staphylococcus aureus***

## **DEDICATORIA**

A nuestro creador por guiar mis pasos en el logro de mis metas y proyectos.

A los seres más importantes de mi vida, mis padres, por ser mi fortaleza y empuje para hacer realidad este proyecto, por su comprensión e infinito amor.

A mi tía Clarita, mi segunda madre; quien me motivo y apoyó constantemente durante mi formación universitaria.

A mis hermanas por brindarme su apoyo y consejos para ser una persona de bien.

**Clarivel Espinoza**

A nuestro señor por ser el pilar fundamental en el logro de mis objetivos.

A mis padres, por su amor, apoyo incondicional y modelo de perseverancia y constancia.

A mi hermano, por su cariño y por incentivarme a perseverar para el logro de mi carrera profesional.

A mi tío, Luis Arturo; por el cariño y apoyo constante durante el proceso de mis estudios universitarios.

**Danitza Serna**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, quien guía y bendice nuestros planes y proyectos.

A nuestra primera casa de estudios, la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, alma Máter, en cuyas aulas se forman grandes profesionales.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, por la formación académica brindada en los cinco años de estudio

A nuestra querida amiga, Rosa Ramírez Heredia, por motivarnos durante el proceso de investigación.

Al Dr. Q.F. Erik Olivar Gallegos por su apoyo en la ejecución del estudio.

A la plana docente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, por brindar sus conocimientos.

Al personal del Laboratorio de especialidad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica por su predisposición durante la ejecución del proyecto.

A nuestros familiares, que aportaron en la ejecución de este trabajo.

**Clarivel y Danitza**

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus***. La muestra vegetal fue 500 ml de látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.**, recolectada en la provincia de Tingo María, Departamento de Huánuco. En el análisis fitoquímico del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg.** se identificó algunos constituyentes químicos carbohidratos, compuestos fenólicos, antocianinas, catequinas, flavonoides, saponinas, polifenoles, iridoides, alcaloides, triterpenoides esteroides, aminoácidos y taninos. Para la determinación del efecto antibacteriano *in vitro* se empleó el método de difusión en agar cilindro-placa, con 6 grupos de análisis: concentraciones del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** al 25%, 50%, 75%, 100%; control (+) Oxacilina y control (-) agua destilada, con 5 repeticiones en placas de agar Müeller-Hinton, incubadas a 37°C por 24 horas. Los resultados se determinaron en función a la medida del diámetro de los halos de inhibición, los que fueron procesados estadísticamente en el programa Excel 2016 mediante las pruebas de análisis de un factor (ANOVA) Tukey, normalidad según el estadístico de Anderson Darling con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ). Se concluyó que el látex ***Croton lechleri* Müll. Arg.** tiene efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus***.

Palabras clave: Látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.**, efecto antibacteriano, Oxacilina, halo de inhibición, Agar Müeller-Hinton.

## ABSTRACT

The objective of this work was to determine the in vitro antibacterial effect of ***Croton lechleri latex Müll. Arg.*** (Blood grade) versus ***Staphylococcus aureus***. The plant sample was 500 ml latex from ***Croton lechleri Müll. Arg.***, Collected in the province of Tingo María, Department of Huánuco. In the phytochemical analysis of latex ***Croton lechleri Müll. Arg.*** Identified some chemical constituents carbohydrates, phenolic compounds, anthocyanins, catechins, flavonoids, saponins, polyphenols, iridoids, alkaloids, steroid triterpenoids, amino acids and tannins. For the determination of the antibacterial effect in vitro, the cylinder-plate agar diffusion method was used, with 6 analysis groups: ***Croton lechleri Müll Arg.*** latex concentrations. At 25%, 50%, 75%, 100%; control (+) Oxacillin and control (-) distilled water, with 5 repetitions on Müeller-Hinton agar plates, incubated at 37°C for 24 hours. The results were determined according to the measurement of the diameter of the inhibition halos, which were statistically processed in the Excel 2016 program by means of the Tukey one-way analysis (ANOVA) tests, normality according to the Anderson Darling statistic with a level 95% confidence ( $p < 0.05$ ). It was concluded that latex ***Croton lechleri Müll. Arg.*** Has antibacterial effect against ***Staphylococcus aureus***.

Key words: Latex from ***Croton lechleri Müll. Arg.***, Antibacterial effect, Oxacillin, inhibition halo, Müeller-Hinton Agar.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	3
1.2 Formulación del problema.....	5
1.2.1 Problema general.....	5
1.2.2 Problemas específicos.....	6
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
1.4 Justificación e importancia del estudio .....	6
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>9</b>
2.1 Antecedentes del estudio.....	9
2.1.1 Antecedentes nacionales.....	9
2.1.2 Antecedentes internacionales.....	11
2.2. Bases teóricas.....	13
2.2.1 <b><i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg.</b> .....	<b>13</b>
2.2.1.1 Nombre Científico.....	13
2.2.1.2 Taxonomía.....	13
2.2.1.3 Descripción botánica.....	14
2.2.1.4 Hábitat.....	17
2.2.1.5 Historia.....	18
2.2.1.6 Extracción del látex.....	19
2.2.1.7 Composición química.....	21
2.2.1.8 Actividad farmacológica.....	24
2.2.1.9 Aplicación y mecanismo de acción.....	27
2.2.2 <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>28</b>
2.2.2.1 Taxonomía.....	29

2.2.2.2 Hábitat .....	29
2.2.2.3 Morfología .....	30
2.2.2.4 Estructura .....	30
2.2.2.5 Patogenia .....	32
2.2.2.6 Manifestaciones clínicas .....	34
2.2.2.7 Pruebas diagnósticas de laboratorio .....	34
2.2.2.8 Tratamiento .....	36
2.2.3 Método de difusión en agar .....	37
2.2.3.1 Método difusión en agar Cilindro – Placa .....	38
2.2.4 Categorías interpretativas para antibiograma en estudios <i>in Vitro</i> .....	40
2.3. Formulación de hipótesis .....	42
2.3.1 Hipótesis general .....	42
2.3.2 Hipótesis específicas .....	42
2.3.3 Variables .....	43
2.3.4 Cuadro de operacionalización de variables .....	43
2.4 Marco Conceptual .....	44
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b> .....	<b>46</b>
3.1 Tipo del estudio .....	46
3.2. Diseño a utilizar .....	46
3.3. Población .....	46
3.4. Muestra .....	46
3.5 Técnica e instrumentos de la recolección de datos .....	47
3.5.1 Técnica de recolección de datos .....	47
3.5.2 Instrumentos de recolección de datos .....	47
3.5.3 Materiales e instrumentos del laboratorio .....	48
3.5.4 Equipos .....	48
3.5.5 Reactivos .....	49
3.6 Procedimiento experimental .....	49
3.6.1 Obtención del material vegetal .....	49
3.6.2 Identificación botánica .....	49
3.6.3 Determinación fisicoquímica de la muestra .....	50
3.6.3.1 Análisis organoléptico .....	50
3.6.3.2 Prueba de solubilidad .....	50



3.6.3.3 Marcha Fitoquímica .....	51
3.6.3.4 Prueba de cromatografía en capa fina .....	52
3.6.3.5 Prueba de espectrofotometría en el UV-VIS para la cuantificación de Polifenoles.....	53
3.6.3.6 Prueba de espectrofotometría en el UV-VIS para la cuantificación total de flavonoides totales .....	55
3.6.3.7 Método de difusión en agar cilindro - placa para determinar efecto antibacteriano.....	55
<b>CAPÍTULO IV: PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
4.1 Presentación de resultados.....	62
4.1.1 Resultados de prueba de análisis organoléptico .....	62
4.1.3 Resultados de marcha fotoquímica .....	64
4.1.4 Resultados de la cromatografía en capa fina.....	65
4.1.5 Resultado de la espectrofotometría en el UV-VIS para la cuantificación de polifenoles totales .....	66
4.1.6 Resultados de la cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría en el UV-VIS .....	67
4.1.7 Determinación del efecto antibacteriano por el método difusión en agar cilindro – placa.....	68
4.2 Contrastación de hipótesis .....	70
4.2.1 Contrastación de hipótesis general .....	70
4.2.1.1 Contrastación de la hipótesis especifica 1 .....	71
4.2.1.2 Contrastación de la hipótesis especifica 2 .....	72
4.2.1.3 Contrastación de la hipótesis especifica 3 .....	77
4.3 Discusión de resultados .....	84
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>89</b>
5.1 Conclusiones.....	89
5.2 Recomendaciones.....	90
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01. Especies de <b>Croton</b> reportadas en el Perú, Macbride (1964) .....	18
Tabla N° 02. Especificaciones del látex de <b>Croton lechleri</b> .....	20
Tabla N° 03. Resumen de los compuestos presentes en <b>Croton lechleri</b> .....	27
Tabla N° 04. Aplicaciones del Látex de <b>Croton lechleri Müll. Arg.</b> .....	28
Tabla N° 05. Cuadros Clínicos más importantes causados por <b>S. aureus</b> .....	34
Tabla N° 06. Materiales para el método cilindro - placa.....	39
Tabla N° 07. Procedimientos del método de difusión en agar.....	39
Tabla N° 08. Antibióticos y diámetros críticos para <b>Staphylococcus spp-</b> INS.....	41
Tabla N° 09: Cuadro de operacionalización de variables.....	43
Tabla N° 10. Materiales e instrumentos del laboratorio.....	48
Tabla N° 11. Equipos .....	48
Tabla N° 12. Características del análisis organoléptico .....	50
Tabla N° 13. Solventes para prueba de solubilidad .....	50
Tabla N° 14. Marcha fitoquímica .....	51
Tabla N° 15. Fase móvil y reveladores .....	52
Tabla N° 16. Estándar de ácido gálico a partir de una dilución concentrada de 100 mg/L. ....	53
Tabla N° 17. Formulación de las concentraciones del látex de <b>Croton lechleri Müll. Arg</b> ....	57
Tabla N° 18. Resultados del análisis organoléptico del látex de <b>Croton lechleri Müll. Arg</b> ..	62
Tabla N° 19. Resultados de la prueba de solubilidad del látex de <b>Croton lechleri Müll. Arg</b>	63
Tabla N° 20. Resultados de la Marcha fitoquímica del látex de <b>Croton lechleri Müll. Arg</b> ....	64
Tabla N° 21. Resultados de la CCF del látex de <b>Croton lechleri Müll. Arg</b> .....	65
Tabla N° 22. Escala interpretativa Duraffourd y Lapraz (1983) .....	68
Tabla N° 23. Resultados de la lectura de los halos de inhibición en mm en 100 µL.....	68
Tabla N° 24. Efecto antibacteriano del látex de <b>Croton lechleri Müll. Arg</b> frente a <b>S. aureus</b> ATCC 6538, en función a los diámetros de halos de inhibición (promedios).....	73
Tabla N° 25. Análisis de varianza.....	73
Tabla N° 26. Prueba DHS de TUKEY.....	74
Tabla N° 27. T de una muestra: Tto. 25% 50% 75% y control (+) Oxacilina.....	79
Tabla N° 28. Prueba de clasificación con signo de Wilcoxon: Tto. 100%.....	80
Tabla N° 29. Efecto antibacteriano del látex <b>Croton lechleri Müll. Arg</b> frente <b>S. aureus</b> , según porcentaje de inhibición .....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01. Árbol del <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> .....	14
Figura N° 02. Corteza del <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> .....	15
Figura N° 03. Látex del <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> .....	15
Figura N° 04. Hojas de <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> .....	16
Figura N° 05. Flor de <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> .....	17
Figura N° 06. Distribución de la familia <b>Euphorbiaceae</b> en el Mundo .....	18
Figura N° 07. Proceso de extracción del látex .....	19
Figura N° 08. Extracción del látex <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> .....	20
Figura N° 09. Estructura de la Taspina.....	21
Figura N° 10. Estructura del polifenol .....	22
Figura N° 11. Índices de portación <b><i>S aureus</i></b> en diferentes sitios corporales .....	29
Figura N <sup>a</sup> 12. Tinción de Gram,100X. <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	30
Figura N° 13. Mecanismos de daño de <b><i>S. aureus</i></b> .....	33
Figura N° 14. Cultivo de <b><i>S. aureus</i></b> en Agar sangre .....	35
Figura N° 15. Colonias de <b><i>S. aureus</i></b> en agar manitol salado. ....	35
Figura N° 16. Clasificación del método de difusión en agar .....	37
Figura N° 17. Método de difusión en agar Cilindro- placa.....	38
Figura N° 18. Modo de siembra de inóculo en superficie del agar .....	40
Figura N° 19. Esquema de metodología.....	40
Figura N° 20. Etapas de la CCF .....	52
Figura N° 21. Cepa <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> ATCC 6538.....	55
Figura N° 22. Activación de la cepa de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> ATCC 6538 .....	56
Figura N° 23. Preparación del inóculo .....	56
Figura N° 24. Preparación del Agar Müller-Hinton.....	57
Figura N° 25. Inoculación de las placas (sembrado).....	58
Figura N° 26. Dispensación de los cilindros en las placas Petri.....	59
Figura N° 27. Esquema de distribución del método cilindro – placa (A).....	59
Figura N° 28. Esquema de distribución del método cilindro – placa con (B) .....	60
Figura N° 29. Incubación de placas Petri.....	60
Figura N° 30. Lectura de los diámetros de halos de inhibición.....	61
Figura N° 31. Cromatografía en capa fina del látex de <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> .....	65
Figura N° 32. Resultado de la espectrofotometría en Uv-Vis de la cuantificación de Polifenoles totales.....	66
Figura N° 33. Resultados de la cuantificación en Uv-Vis de Flavonoides totales por espectrofotometría.....	67

Figura N <sup>a</sup> 34. Resultados de la lectura de lo halos de inhibición en mm por el método de difusión en agar cilindro-placa en 100 µL .....	69
Figura N <sup>o</sup> 35. Efecto antibacteriano del látex <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> frente a <b><i>S. aureus</i></b> , en función a los diámetros de halos de inhibición (promedios) .....	75
Figura N <sup>o</sup> 36. Resultados de la prueba de normalidad según estadístico Anderson Darling ..	78
Figura N <sup>o</sup> 37. Efecto antibacteriano del látex <b><i>Croton lechleri Müll. Arg.</i></b> frente <b><i>S.aureus</i></b> ATCC 6538, según porcentaje de inhibición.....	82

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°01. Matriz de consistencia.....	98
Anexo N°02. Certificación botánica .....	99
Anexo N° 03. Certificado de la cepa <b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</b> .....	100
Anexo N° 04. Obtención y recolección de la muestra vegetal.....	101
Anexo N° 05. Análisis organoléptico del látex <b><i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.</b> .....	102
Anexo N° 06. Prueba de solubilidad del látex <b><i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.</b> .....	103
Anexo N° 07. Marcha fitoquímica del látex <b><i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.</b> .....	104
Anexo N° 08. Cromatografía en capa fina del látex <b><i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.</b> .....	105
Anexo N° 09: Espectrofotometría en el UV-VIS del látex <b><i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.</b> .....	106
Anexo N° 10. Formulación de las concentraciones del látex de <b><i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.</b> .....	108
Anexo N° 11. Efecto antibacteriano del látex de <b><i>Croton lechleri</i> Müll. Arg.</b> por el método de difusión en agar cilindro – placa.....	109
Anexo N° 12. Lectura de los resultados de los halos de inhibición .....	111
Anexo N° 13: Instrumentos de recolección de datos del análisis organoléptico.....	115
Anexo N° 14. Ficha de validación del instrumento de análisis organoléptico.....	115
Anexo N° 15: Instrumentos de recolección de datos para la prueba de solubilidad.....	116
Anexo N° 16. Ficha de validación del instrumento de la prueba de solubilidad.....	116
Anexo N° 17: Instrumentos de recolección de datos de la marcha fitoquímica .....	117
Anexo N° 18. Ficha de validación del instrumento de la marcha fitoquímica.....	117
Anexo N° 19. Instrumentos de recolección de datos para la determinación del efecto antibacteriano.....	118
Anexo N° 20. Ficha de validación para la determinación del efecto antibacteriano .....	118
Anexo N° 21. Equipo de medida para los halos de inhibición .....	119

## INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con una variedad de flora medicinal con propiedades curativas, empleadas en la medicina tradicional. Esta realidad hace necesaria investigaciones que demuestren cualidades terapéuticas que podrían convertirse en alternativas de tratamiento de diversas enfermedades que padece la población, ya que existe mucha resistencia a fármacos sintéticos.

Actualmente, se vienen desarrollando investigaciones dirigidas al descubrimiento de nuevos componentes con acciones farmacológicas provenientes de origen natural. Múltiples estudios fueron dirigidos hacia la investigación de propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes de la flora medicinal y aromática.

Existen cerca de 52 especies del genero **Croton**, donde **C. lechleri Müll. Arg.** es una especie ubicada en Perú en los departamentos de Huánuco, Ucayali, San Martín, Loreto y Junín; empleada en la medicina tradicional. El látex de esta especie se conoce comúnmente como "Sangre de grado o drago".<sup>10</sup>

El látex ha sido empleado de forma empírica por los pobladores de la Amazonía. Su utilización se relaciona por las propiedades para el tratamiento de múltiples patologías como infecciones de origen bacteriano, dérmico, gastrointestinal, cáncer. Diversas investigaciones refieren que la especie en estudio (látex) posee propiedades inmunomoduladores, antiinflamatorias, antivirales, antibacterianas, antiparasitarias y antioxidantes, entre otras.<sup>17</sup>

Dentro de sus cualidades terapéuticas atribuidas en diversas investigaciones pre-clínicas, son la acción antibacteriana, antiinflamatoria, cicatrizante, antiulcerosa frente a bacterias Gram positiva, como **Staphylococcus aureus**, por la actividad de metabolitos secundarios como: compuestos fenólicos, flavonoides, polifenoles, proantocianidina, taspina (alcaloide), entre otros.

En este entender; se requiere nuevas propuestas de antibiótico de origen natural que actualmente están centrando la atención por su bajo índice de eventos secundarios y a la promoción de su efecto benéfico, ejemplo de ello es la sangre de grado.

Actualmente el uso inapropiado de antibióticos conlleva a poner en riesgo la salud, por la expansión de microorganismos resistentes a fármacos de primera generación, económicos y efectivos. Evidenciándose, en el predominio de patologías infecciosas en hospitales y en la población.

La OMS sostiene que “la resistencia a medicamentos para el tratamiento por infecciones de ***Staphylococcus aureus*** es prevalente en los hospitales y la población. Se estima que hay una probabilidad de mortalidad en un 64% en pacientes infectados con cepas resistentes de ***Staphylococcus aureus***”.<sup>1</sup>

Por consiguiente; con la presente investigación se pretende demostrar el efecto antibacteriano del látex ***Croton lechleri Müll Arg.*** frente a ***Staphylococcus aureus***, ya que por ser un recurso natural del Perú requiere un estudio exhaustivo de las propiedades que posee y así plantear nuevas formas de tratamiento antimicrobiano que sustituyan o complementen tratamientos convencionales.

## **CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **1.1 Descripción de la realidad problemática**

Desde su aparición los antimicrobianos constituyen fármacos de uso frecuente en tratamientos de diversas patologías infecciosas en la población. Su empleo disminuyó, en gran medida, la morbimortalidad de muchas enfermedades. Años después, su uso inapropiado generó reacciones adversas; dando lugar a la proliferación de cepas bacterianas con resistencia, convirtiéndose en un problema de salud mundial.

Al respecto la OMS manifiesta que “van surgiendo nuevas formas de resistencia a nivel mundial que ponen en emergencia el manejo terapéutico de enfermedades infecciosas, generando la prolongación de la enfermedad y el aumento de muerte”.<sup>1</sup> Del mismo modo; el Ministerio de Salud (MINSA)<sup>2</sup> “A nivel mundial, se evaluó que los fármacos son inapropiadamente prescritos y dispensados; a raíz de ello, los pacientes confunden la forma correcta de tomar sus medicamentos”, constituyendo un problema mundial en países de Africanos, Asiáticos y Americanos.

El MINSA<sup>2</sup> (2007) en el Perú, varios estudios muestran el uso inadecuado de los medicamentos, donde los factores que influyen son la precaria formación profesional, con comportamiento que incumplen la normatividad de una correcta prescripción, otros factores son la automedicación no informada del paciente y la incesante promoción comercial que lejos de educar en salud, conllevan a usar irresponsablemente fármacos.

Otros estudiosos del tema como Maguiña<sup>3</sup> (2013), refieren que el uso inapropiado de antimicrobianos y su consecuente resistencia; radica en el prescriptor por:



El incorrecto diagnóstico, que lo obliga a utilizar algunos antibióticos con el fin de evitar la desconfianza de sus pacientes. También, la incesante difusión comercial de medicamentos propicia muchas veces a medicar con más de un fármaco para no perder al paciente. Por otro lado; los pacientes tienden a automedicarse al acceder a los medios de información de manera libre, y otros factores influyentes son aspectos de carácter religioso, cultural, social lo que conlleva al uso irracional de los medicamentos.

Por lo expuesto, en las últimas tres décadas el uso inapropiado de los antimicrobianos conlleva cada vez más a poner en emergencia la salud, por la proliferación de bacterias resistentes a fármacos de primera generación, económicos y eficientes. Evidenciándose, en la prevalencia de enfermedades infecciosas a nivel hospitalario y la comunidad como: infecciones diarreicas, infecciones respiratorias, incluyendo *Haemophilus influenzae*, meningitis, infecciones de transmisión sexual como *Neisseria gonorrhoeae* y *Staphylococcus aureus*.<sup>3</sup>

El Instituto Nacional de Salud<sup>4</sup> (2007), en su informe de resistencia antimicrobiana a nivel de los hospitales del Perú, manifiesta que los principales microorganismos infecciosos son: *S. aureus*, *S. coagulasa negativo*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella*. Asimismo, mencionan que los pacientes con mayor probabilidad de adquirir infecciones por cepas resistentes son lo que se encuentran en las Unidades de Cuidados Intensivos, y como consecuencia de ello se observa la ineficacia al tratamiento establecido, existiendo riesgo de muerte.

En el Perú se detectaron en hospitales y clínicas cerca de un 50% de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Estas cifras elevadas conllevan a gastos exorbitantes en los sistemas de salud.<sup>3</sup>

Al respecto, la OMS sostiene que “actualmente hay resistencia a medicamentos de primera generación, empleada frecuentemente en el tratamiento de las infecciones por ***Staphylococcus aureus*** a nivel hospitalario y de la comunidad, con una probabilidad de morir en un 64% más que los pacientes con infecciones no resistentes”.<sup>1</sup>

A nivel de las Infecciones intrahospitalarias, como señala el MINSA<sup>2</sup> (2007) “un 30 a 40% son causadas mediante intercambio cruzado de las manos del personal del hospital; un 20 a 25% por el uso irracional de antibióticos; un 20 a 25% por el ingreso de nuevos microorganismos y un 20% por otros medios”<sup>2</sup> En este sentido; ***Staphylococcus aureus*** es un patógeno importante que afecta la salud humana. Esta problemática motiva a diseñar medidas de control farmacoterapéutico a través del descubrimiento de principios activos de origen natural que reemplacen óptimamente a los fármacos antimicrobianos comúnmente empleados en el tratamiento, logrando así combatir la resistencia microbiana.

Como es de conocimiento, nuestra amazonia peruana es poseedora de una diversidad de flora silvestre, capaz de brindar una multiplicidad de metabolitos con actividad biológica a través de las diversas especies de plantas medicinales empleadas por la medicina tradicional. Por ello, mediante la presente investigación se pretende conocer y determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus***.

## 1.2 Formulación del problema

### 1.2.1 Problema general

¿Tendrá efecto antibacteriano *in vitro* el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus***?

### 1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Cuáles serán los constituyentes químicos presentes en el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado)?
2. ¿Será sensible ***Staphylococcus aureus*** frente al látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado)?
3. ¿Cómo será el efecto antibacteriano *in vitro* entre Oxacilina y el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus***?

### 1.3 Objetivos

#### 1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus***.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar algunos constituyentes químicos en el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado).
2. Establecer la sensibilidad del ***Staphylococcus aureus*** frente a concentraciones de 25%,50%,75% y 100% del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado).
3. Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* entre Oxacilina y el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus***.

### 1.4 Justificación e importancia del estudio

En los últimos 50 años el incremento de fármacos antibacterianos destinados a la farmacoterapia de infecciones nosocomiales y de la población, generó la resistencia de diversos microorganismos a los antibióticos; constituyendo un

problema mundial de salud pública. Entre las causas, la literatura señala al uso inapropiado, uso excesivo y la automedicación de los antibióticos. “la extensión a nivel mundial de la resistencia bacteriana trajo como consecuencia la resistencia a antibióticos, desencadenándose enfermedades prevalentes, como: EDA, IRA, infecciones intrahospitalarias, que le catalogan como un problema de salud pública prioritario”.<sup>5</sup>

Diversas entidades de salud catalogan como cepas resistentes a ***Staphylococcus aureus***, ***Streptococcus pneumoniae***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Micobacterium tuberculosis***; que requieren, por tanto, atención urgente para la búsqueda de alternativas terapéuticas innovadoras en el campo farmacológico.

Ante tal problemática el presente trabajo de investigación se centrará en estudiar el rol patogénico del ***Staphylococcus aureus***; agente causal de diversas infecciones nosocomiales y de la comunidad; que actualmente presenta una resistencia múltiple a antibióticos. Para tal efecto, se propone combatir la problemática de manera más natural y efectiva a través del estudio del efecto antibacteriano del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus***.

La sangre de grado, látex del ***Croton lechleri* Müll. Arg.**, es un recurso natural de nuestra selva peruana, empleado por nativos en diferentes regiones, coexistiendo también en países vecinos como Colombia, Ecuador, Paraguay, México, entre otros.<sup>6</sup> Tiene diferentes denominaciones: sangre de dragón, sangre de grado o sangre de drago. Su uso como cicatrizante es aplicándolo directamente a la herida de la piel, como también en picaduras de insectos, en quemaduras y abscesos. Asimismo, hay evidencias de su efecto sobre la inflamación, edema, gastritis y úlceras gástricas.

Jones<sup>7</sup> (2003), sustenta que sus propiedades se deben a metabolitos como: fenoles, alcaloides, proantocianidina SP-303, polifenoles con actividad antimicrobiana; entre ellos, el 2,4,6-trimetoxifenol efectivos frente a ***Bacillus subtilis***.

Yl *et al*<sup>8</sup> (2012), menciona que el látex fue empleado de generación en generación como parte de conocimientos ancestrales por los pobladores indígenas. Su utilización siempre estuvo relacionada para tratamientos como cáncer, infecciones dérmicas, infecciones gastrointestinales y dolores. Según investigaciones, el látex presenta propiedades antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatoria, antivirales e inmunomoduladoras.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes del estudio

#### 2.1.1 Antecedentes nacionales

Cayo C y Barrera R<sup>9</sup> (Huacho 2014), en la investigación titulada: “Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del ***Croton lechleri*** sobre cultivos de ***Streptococcus mutans***”. El objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del ***Croton lechleri*** en el crecimiento de cepas del ***Streptococcus mutans***. La metodología implicó el uso de diferentes concentraciones del ***Croton lechleri*** al 40%, 75% y 100% midiéndose el diámetro de los halos formados de cada una de las concentraciones empleadas. En los resultados se muestran que las concentraciones de 100% y 75% del ***Croton lechleri*** presentaron efecto inhibitorio frente a ***Streptococcus mutans***; en cambio la concentración del 40% no posee efecto inhibitorio. Como conclusión se expresa que la Sangre de grado (***Croton lechleri***) tiene efecto inhibitorio positivo frente a cultivos de ***Streptococcus mutans***.

Huapaya J *et al*<sup>10</sup> (Lima, 2012), en el artículo científico titulado: “Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de ***Croton lechleri*** (Sangre de grado)”, El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana del látex de ***Croton lechleri*** frente a ***Staphylococcus aureus***. Las muestras fueron 47, obtenidas en diferentes mercados de los distritos de Lima Metropolitana (Lima Cercado, Lince, Magdalena y Comas) Además, se examinaron 3 muestras del látex de las regiones de Huánuco (Tingo María), Ucayali (Pucallpa) y San Martín (Moyobamba). En este estudio se empleó el método de excavación en placa de cultivo, en diluciones 10%, 25%, 50% y 100% y como control positivo (Ciprofloxacino, 5mg/mL), negativos (suero fisiológico), con dos repeticiones por tratamiento; las cuales fueron incubadas a 37°C por 24

horas. Los resultados concluyen que hay mayor actividad antimicrobiana en concentraciones del 50% y 100% del látex de ***Croton lechleri***, observándose halos de inhibición similares al control positivo en las cepas de ***S. aureus***.

Carrión J *et al*<sup>1</sup> (2010) en la investigación titulada: “Evaluación de la actividad antioxidante, contenido de polifenoles totales y actividad antimicrobiana de fracciones de sangre de grado, ***Croton lechleri***”. Tuvo como objetivo evaluar el contenido de polifenoles, la actividad antibacteriana, la actividad antioxidante en diferentes extractos de ***Croton lechleri***. Cuyos resultados concluyen: Los extractos con fracción etanólica mostraron mayor actividad antioxidante, los extractos hidroalcohólicos mostraron mayor actividad antimicrobiana frente a ***S. aureus*** ATCC 6538 y finalmente el látex original contiene porcentaje de polifenoles totales.

León K y Santiago J<sup>12</sup> (Lima, 2007), en el artículo de investigación cuyo título es: “Preparación y caracterización de películas de alcohol poli vinílico embebidas con extracto de sangre de grado (***Croton lechleri***)”, tiene como propósito evaluar las propiedades antimicrobianas del látex de sangre de grado frente a ***S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa***. Los resultados obtenidos muestran que los hidrogeles preparados en base a Quitosano-PVA y embebidos en solución hidroalcohólicas tienen actividad antibacteriana frente a ***S. aureus* y no a *E. coli* y *P. aeruginosa***, estos resultados están relacionados con solubilidad de los elementos constituyentes del látex.

Tamariz J *et al*<sup>3</sup> (Lima 2003), en el artículo de investigación cuyo título es “Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (***Croton lechleri***) frente al ***Helicobacter pylori***”. Esta investigación tuvo el propósito de determinar la actividad antibacteriana frente a ***Helicobacter pylori*** Se trabajó con 41 muestras del ***Helicobacter pylori*** de origen clínico y 4 muestras de ***Croton lechleri***. El estudio se dividió en 2 etapas; en la primera se determinó cualitativamente el efecto inhibitor del ***Croton***

**lechleri**; en la segunda cuantitativamente se determinó la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida. Dicha investigación llegó a la conclusión que la sangre de grado presenta efecto inhibitorio frente al **Helicobacter pylori** en altas concentraciones.

### 2.1.2 Antecedentes internacionales

Avilés I<sup>14</sup> (Quito, 2017), en la investigación titulada: “Efecto inhibitorio de **Croton lechleri** sobre cepas de **S. mutans**, estudio in-vitro”, tuvo como objetivo determinar el efecto inhibitorio del **Croton lechleri** en cepas de **S. mutans**. En el estudio se empleó concentraciones al 50 %, 75% y 100% de **Croton lechleri**, control positivo de clorhexidina y como control negativo agua destilada. El estudio llegó a la conclusión que las concentraciones al 75% y 100% de **Croton lechleri** presentan efecto inhibitorio *in vitro* frente a **S. mutans**, mientras la concentración al 50% no mostro efecto inhibitorio en cambio el control positivo clorhexidina tuvo mayor efecto inhibitorio en comparación a los otros grupos evaluados.

Altamirano<sup>15</sup> (Quito, 2015) en la investigación: “Evaluación de la actividad antioxidante de cuatro especies del género **Croton**”, cuyo objetivo fue evaluar la actividad antioxidante. Las especies analizadas fueron: **Croton menthodorus Benth.**, **Croton wagneri Müll. Arg.**, **Croton magdalenensis Müll. Arg.** y **Croton lechleri Müll. Arg.**, se utilizó el método de Capacidad Atrapadora del Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) a concentraciones de 50ug/ml, 100ug/ml, 150ug/ml, 200ug/ml. Como conclusión: las cuatro especies tienen mayor capacidad antioxidante que la vitamina C. y además tienen un compartimiento parecido, porque el porcentaje de inhibición del radical DPPH va de 90.87% a 93.71% en la cc. del 50 ug/ml, de 95.06% a 98.80% en la cc. de 100 ug/ml, de 97.75% a 99.10% en la concentración de 150 ug/ml y de 98.65 % a 99.55 % en la concentración de 200 ug/ml y la actividad antibacteriana se debe a la presencia de los compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides.



Allaica N<sup>16</sup> (Ecuador, 2015), cuya investigación: “Comparación del efecto cicatrizante de tinturas elaboradas a base de guarango (***Caesalpinia spinosa***) y sangre de drago (***Croton lechleri***) aplicados en ratones (***Mus musculus***)”. Se empleo el método de maceración para obtener tinturas de 2 plantas. Se analizaron 8 grupos de ratones a los cuales se aplicó las concentraciones de 100%, 70%, 50% y 30% de guarango y sangre de drago y como control positivo (crema Lamoderm y Eterol), y como control negativo (crema base); se administró 100µL cada 24 horas en la herida. Como conclusión hay actividad cicatrizante en las concentraciones al 100% de sangre de drago seguido por la tintura de guarango al 100%.

Corrales L *et al*<sup>17</sup> (Bogotá, 2013), cuya investigación titulada: “Evaluación del potencial antibacterial *in vitro* de ***Croton lechleri*** frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas”. Tuvo como propósito evaluar la potencia antibacteriana *in vitro* de ***Croton lechleri*** frente a aislamientos bacterianos aeróbicos de pacientes con úlceras cutáneas del Sanatorio de Agua de Dios, Colombia. La metodología usada fue difusión en disco, difusión en pozo y dilución en agar dicha investigación llego a la conclusión: ***Croton lechleri*** tiene actividad antibacterial frente a aislamientos bacterianos de úlceras cutáneas en los pacientes del estudio y la actividad antimicrobiana es debida a metabolitos como el: ácido clorequínico, las coberinas A y B y el 1,3,5-trimetoxibenceno y el 2,4,6-trimetoxifenol potentes frente a ***Bacillus subtilis***, entre otros. Asimismo, la que permitió presentar mejor sensibilidad y reproducibilidad fue la técnica de difusión en pozo.

Concepción G<sup>18</sup> (México, 2006), en la investigación titulada: “Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de ***Staphylococcus aureus*** con resistencia múltiple”. El propósito fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos vegetales hidroalcohólicos (tomillo, ruda, perejil, gobernadora) y 2 aceites esenciales (clavo y orégano) en varias cepas hospitalarias con resistencia múltiple de ***S. aureus***. se empleó en método cuantitativo de macrodilución

en caldo. El estudio llego a la conclusión que los aceites esenciales presentan actividad antibacteriana en mayor proporción que los extractos hidroalcohólicos.

## 2.2. Bases teóricas

### 2.2.1 *Crotón lechleri* Müll. Arg.

#### 2.2.1.1 Nombre Científico

Panduro<sup>19</sup> (2006), sostiene que la descripción fue realizada por Johannes Müller y publicada en Prodrromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis, determinando el nombre científico de la especie como ***Crotón lechleri* Müll. Arg.**

#### 2.2.1.2 Taxonomía

La Sangre de grado es uno de los árboles que se mantiene como objetivo de estudio por presentar un aspecto singular y poseer numerosas propiedades, el **Crotón** pertenece a la familia Euforbiáceas “cuenta con aproximadamente 1.300 especies, distribuidos en zonas tropicales.”<sup>20</sup>

Del género **Crotón** la especie más popular de la que se obtiene el látex se denomina ***lechleri***, se lo conoce en toda Sudamérica con múltiples nombres como sangre de drago, sangre de grado, palo de drago, balsa macho, entre otros. La parte que más se utiliza es el látex que segrega la corteza del árbol.

• **División: MAGNOLIOPHYTA**

• **Clase: MAGNOLIOPSIDA**

• **Sub clase: ROSIDAE**

• **Orden: EUPHORBIALES**

• **Familia: EUFORBIACEAE**

• **Género: Croton**

• **Especie: *Crotón lechleri*. Müll. Arg.**

Determinado por el Blgo Severo Baldeon Malpartida

Nombres comunes: “Sangre de grado”, “Sangre de drago” (Perú y Ecuador), Sangre de dragão (Brasil), Blood (USA), Sangre grado (Colombia y Bolivia) y balsa macho (Ecuador).<sup>21</sup>

### 2.2.1.3 Descripción botánica

**a. Árbol:** *Croton lechleri* Müll. Arg. es un árbol que alcanza los 10-20m de altura, Risco<sup>21</sup> (2005), sostiene que tiene copas globosas con ramas enlazadas hacia los laterales y con tendencia a separarse. Las ramas están cobijadas con pelos estrellados, hojas redondeadas y con flores pistiladas (flores femeninas). El árbol idóneo para la cosecha del látex es la que debe medir más de 18m y un diámetro con 0.5 m.



Figura N° 01. Árbol del *Croton lechleri* Müll. Arg.

**b. Raíz:** Arbildo<sup>22</sup> (2014) De forma cónica, la raíz principal es mucho más desarrollada que la raíz secundaria, tiene una peridermis constituido por súber o corcho.

**c. Corteza:** es de color grisáceo blanquecino, que segrega látex denso de color rojo vino de naturaleza viscosa, llamada habitualmente “sangre de grado”.



Figura N° 02. Corteza del *Croton lechleri* Müll. Arg.<sup>23</sup>

- d. **Látex:** Arbildo<sup>22</sup> (2014), menciona que contiene proantocianinas que es el principal metabolito que le da el color rojizo al látex.

El látex es una sustancia líquida levemente densa y de gran viscosidad. Artemio<sup>24</sup> (2008), considera que es semejante a la sangre humana y con algunas propiedades físicas que al interactuar con la corriente del aire tiende a solidificarse con rapidez generando una mancha visible en el lugar donde se aplicó; al ser friccionada en la piel genera espuma; con tendencia adherirse a la piel, con olor herbal, sabor amargo; soluble en agua y etanol a temperatura ambiente.

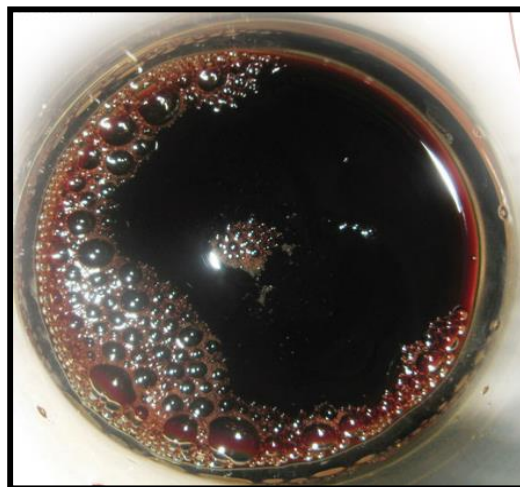


Figura N° 03. Látex del *Croton lechleri* Müll. Arg.<sup>25</sup>

Panduro<sup>19</sup> (2006), manifiesta que una de las formas para obtener el látex en mayor volumen, se debe considerar los siguientes factores: edad del árbol, ubicación de las incisiones, horas de extracción, épocas de cosecha, influencia lunar.

Para cosechar el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** es preferible realizarlo en épocas lluviosas y a primeras horas de la mañana por lo contrario su volumen disminuye. Panduro<sup>19</sup> (2006), menciona que existe diferentes tipos de extracción del látex una de ellas es la que se realiza mediante una incisión en forma de “v” en la corteza, este tipo de proceso es la que se denomina como sangrar, otro tipo extracción del látex es la de los machetazos son utilizados por los agricultores llegando a derribar los árboles para ellos toman encuentra el diámetro del árbol; mayores a 30 cm para que producen una óptima cantidad de látex.

- e. **Hojas:** Artemio<sup>24</sup> (2008), mide de 12 a 20 cm de largo y de 5 a 14 cm de ancho, con doble glándulas en la base, propia de la especie. Las ramas y hojas jóvenes tienen gran cantidad de indumento, de color marrón rojizo que van descendiendo conforme se vuelven adultas.



Figura N° 04. Hojas de ***Croton lechleri* Müll. Arg.**<sup>25</sup>

- f. **Inflorescencia:** en forma de racimos, y con flores de color ámbar con varios estambres.



Figura N° 05. Flor de ***Croton lechleri Müll. Arg.***<sup>26</sup>

- g. **Fruto:** “de forma capsular, con medidas de 4.5 mm de ancho por 3 mm de largo”.<sup>2</sup>
- h. **Semillas:** son lisas y endosperma oleaginoso.<sup>27</sup> Los meses donde germinan las semillas de los árboles de ***Croton lechleri Müll. Arg.*** son en Enero y Febrero (selva alta), pero en selva baja en Agosto a Setiembre. Panduro<sup>19</sup> (2006), manifiesta que después de 15 o 20 días la semilla germina siendo apta para una trasplantación.

#### 2.2.1.4 Hábitat

La especie ***Croton lechleri Müll. Arg.***, objeto de estudio de la presente investigación crece en la selva alta de Tingo María, Huánuco a 647 msnm. Al respecto, Panduro<sup>19</sup> (2006), refiere que ésta especie es parte de la amazonia peruana, ecuatoriana y colombiana; se distribuye en zonas tropicales y subtropicales. Risco<sup>21</sup> (2005), el género ***Croton*** está conformada por más de 250 géneros y 7500 especies; de ellas en el Perú sobresalen 52 especies y sólo 6 de ellas segregan látex.

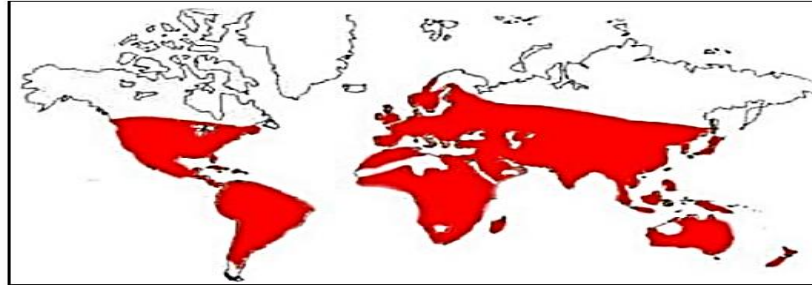


Figura N° 06. Distribución de la familia **Euphorbiaceae** en el Mundo <sup>20</sup>

Tabla N° 01. Especies de **Croton** reportadas en el Perú, Macbride (1964)<sup>28</sup>

ESPECIE	MACBRIDE(1964)
<b><i>C.draconoides</i> M. Arg.</b>	Selva Peruana
<b><i>C.erythrochilus</i> M. Arg</b>	Tumbes, Huánuco, Pozuso, Cuzco
<b><i>C.lechleri</i> M. Arg.</b>	Tarapoto, Huánuco , Yurimaguas, Quillabamba, San Gabán.
<b><i>C. perpeciosus</i> Croizat</b>	San Martin, Ayacucho, Cuzco, Pasco.
<b><i>C. palanostigma</i> Klotzsch.In Hook.</b>	Tarapoto, Morona Cocha, Misuyacu,
<b><i>C.sampatik</i> M. Arg.</b>	Chicoplaya ,La Merced.

### 2.2.1.5 Historia

En la antigua Roma, en siglo I se obtenía de Socotra, donde los habitantes de esta isla usaban la resina como una suerte para curar muchas enfermedades: heridas, diarreas, disentería, úlceras, infecciones virales, respiratorias, digestivas y dérmicas.

El látex fue usado en el Mediterráneo como una tintura y por los griegos, romanos y árabes por sus propiedades medicinales. Dioscórides (fue un médico, farmacólogo y botánico) y otros escritores griegos describían sus usos medicinales.



En el siglo XIX en tiempos medievales se utilizaba como magia ritual. En el siglo XVIII los luthiers italianos la usaban como fuente de barniz para violines y como cremas dentales.

En el siglo XXI perdura el uso en los violines como barniz y como inciensos o aceites corporales. Algunas veces se utilizaba la resina para ceremonias en la India. En la china se utiliza frecuentemente en eventos matrimoniales y el Año Nuevo Chino para pintar las superficies externas del papel en avisos y carteles.

En la medicina ancestral, la sangre de drago es usado de forma tópica para curar heridas y detener la hemorragia. Se usa internamente para los dolores. En rituales de brujería y chamanismo, lo usan como pociones de amor, incremento del poder de los conjuros de protección y para mejorar la actividad sexual.

#### 2.2.1.6 Extracción del látex

Para extraer el látex se debe realizar incisiones en espiral o en forma de V en la corteza. Luego, para una adecuada conservación debe ser envasado herméticamente y almacenado en lugares frescos con la finalidad de evitar su cristalización.



Figura N° 07. Proceso de extracción del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.





Figura N° 08. Extracción del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.

Tabla N°02. Especificaciones del látex de *Croton lechleri* <sup>24</sup>

ENSAYO	RANGO
<b>EQUIVALENTE EN PESO DE MUESTRA SECA</b>	0,237 – 0,282 g/mL
<b>GRAVEDAD ESPECÍFICA</b>	1,085 – 1,092
<b>VISCOSIDAD</b>	0,323 – 0,377 g/ms
<b>PORCENTAJE DE CENIZAS</b>	0,325 – 0,682 %
<b>PORCENTAJE DE TASPINA</b>	1,65 – 3,24 %
<b>PORCENTAJE DE TANINOS</b>	72 – 95 %

Artemio<sup>24</sup> (2008), menciona algunas posibles especificaciones que se encuentran en gran porcentaje en el látex y que posee propiedades antibacterianas, antitumorales y cicatrizantes de la Sangre de grado. Asimismo, manifiesta que hay investigaciones donde se evaluó la citotoxicidad y actividad antibacteriana del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg., cuyos resultados confirman ausencia de actividad citotóxica; evidenciándose que presenta compuestos polifenólicos y diterpenos que son encargados de la potente actividad antibacteriana.

### 2.2.1.7 Composición química

#### a. Látex:

**Alcaloides:** Altamirano<sup>15</sup> (2015), menciona que los alcaloides poseen 3 características: sabor amargo, que se forma a partir de los aminoácidos, contienen nitrógeno heterocíclico, lo que otorga propiedades básicas.

La presencia de éste metabolito en el látex es de suma importancia por poseer propiedades farmacológicas demostradas en diversas investigaciones, características atribuidas principalmente a la Taspina.

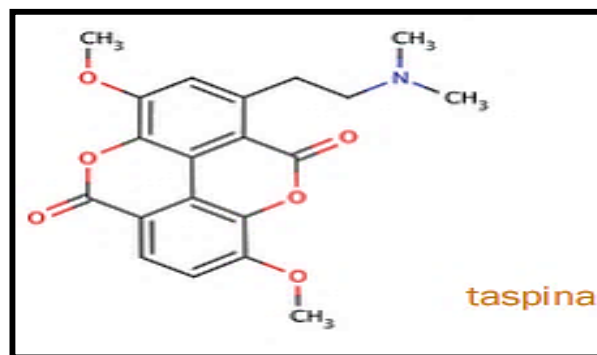


Figura N° 09. Estructura de la Taspina <sup>29</sup>

**Compuestos fenólicos:** provienen de la vía del ácido malónico.

Altamirano<sup>15</sup> (2015), menciona que son solubles en solventes orgánicos por la presencia glucósidos y cadenas ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua.

Blanco<sup>54</sup> (2015), describe que la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos (fenol, hexaclorofenol, timol, listerine, triclosan) están relacionada en función a su concentración. Su

mecanismo de acción consiste en destruir la pared y membrana celular inactivando los sistemas enzimáticos. Por tanto, los fenoles tienen actividad bacteriostática o bactericida, fungicida y viricida. Siendo potentes sobre las bacterias Gram positivas.

**Polifenoles:** son compuestos fenólicos derivados del fenol. La característica de los polifenoles es de poseer al menos un grupo aromático y una sustitución hidroxilo como mínimo, que puede estar libre o formando parte de otra función: éter, éster o heterósido.

Los polifenoles más relevantes son ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoles, dihidroflavonoles, antocianinas, monómeros de flavonoles (catequinas) y polímeros de flavonoles (proantocianidinas).

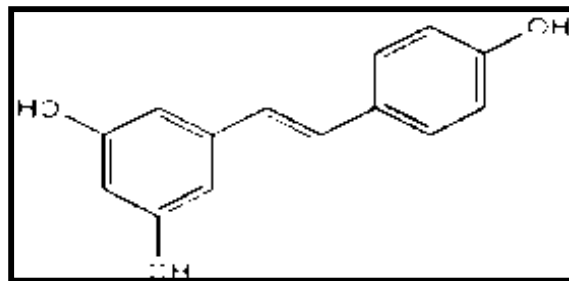


Figura N° 10. Estructura del polifenol <sup>31</sup>

**Flavonoides:** Eduardo<sup>28</sup> (2011), menciona que los flavonoides tienen actividades biológicas, entre ellas: antiinflamatorias, antibacterianas, antialérgicas, antivirales, antitrombóticas y vasodilatadoras.

**Proantocianidina:** conocidas como "taninos condensados" con propiedades antioxidantes, antibacterianas que inhiben la adhesión de la bacteria.

Estudios revelan que las antocianinas y las proantocianidinas son 50 veces más potentes que la vitamina E y 20 veces más

que la vitamina C como antioxidantes. Del mismo modo; previenen enfermedades cardiovasculares otorgando la permeabilidad vascular, evitando daño de los radicales libres en las arterias.

Díaz<sup>30</sup> (2012), sostiene que estos metabolitos tienen propiedades antioxidantes, antialérgicas, anticancerígena, antiinflamatoria y antimicrobiana. Se considera que el efecto antimicrobiano de los polifenoles radica en inhibir el desarrollo de microorganismos que afectan la salud humana, entre ellos: ***H. pylori* y *E. coli* y *S. aureus*.**

**Taninos:** Hugo<sup>28</sup> (2011), los taninos en el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** tienen propiedades astringentes, las cuales son útiles para tratar úlceras gástricas y quemaduras.

**Saponinas:** Altamirano<sup>15</sup> (2015), menciona que constituyen de grupo de glucósidos amorfos coloidales, muy hidrosolubles, que producen espuma cuando se los agita en una solución acuosa, los cuales son excelentes agentes emulsionantes. Modifican la permeabilidad de la membrana celular, por lo que en ocasiones se le suministra con otros fármacos para mejorar el paso de éstos al interior de la célula.

**Quinonas:** Hugo<sup>28</sup> (2011), describe que son compuestos cuya coloración va desde el amarillo tenue a negruzco. Se ubican generalmente en la corteza.

**b. Corteza:** “Diterpenos (tipo clerodano): ácido hardwickiico, bincatriol. Crolechinol, ácido crolechínico, korberin-A, korberin-B”.<sup>20</sup>

**c. Hojas:** contienen en su mayoría alcaloides

**d. Corteza de raíz y semillas:** Alcaloides (Taspina).

### 2.2.1.8 Actividad farmacológica

Diversas investigaciones demuestran que el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** presenta propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, cicatrizantes, entre otras; por poseer metabolitos como catequinas, proantocianidinas oligoméricas (lignanós) y alcaloides (taspina), los cuales le otorgan actividad antimicrobiana, cicatrizante, antiviral, antiinflamatoria, antiulcerosa, antidiarreica e inmunomoduladora; las cuales han sido estudiadas clínicamente, Risco<sup>32</sup> (2005).

#### a. Actividad antimicrobiana

Numerosas investigaciones sustentan la acción antiviral y antibacteriana de la sangre de grado, Corrales *et al*<sup>17</sup> (2013), en la investigación de corte experimental *in vitro* sostiene que el látex de ***Croton lechleri*** posee actividad antimicrobiana por la presencia de polifenoles, poliacetilenos, flavonoles, terpenoides, esteroides, alcaloides, propóleos ácido clorequínico, las coberinas A y B y el 1,3,5-trimetoxibenceno potentes frente a ***Bacillus subtilis***. Asimismo; Altamirano<sup>15</sup> (2015), ratifica la actividad antibacteriana es debido a los compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas.

Carrión<sup>11</sup> (2010), sustenta que la sangre de grado presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, como ***S. aureus*** ATCC 6538. Lock y Rojas<sup>55</sup> (2004), consideran que el látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** tiene actividad biológica, destacando su acción antimicrobiana, antiinflamatoria, cicatrizante, antioxidante y citotóxica; donde

los compuestos químicos responsables de la acción antimicrobiana serían los compuestos fenólicos frente a las bacterias Gram positivas.

Chen destaca que en 3 ensayos *in vivo* de sangre de grado se evaluó la citotoxicidad y actividad antibacteriana. Cuyos resultados demuestran que el látex carece de actividad citotóxica y ratifica que los compuestos fenólicos y terpénicos son los responsables del efecto antibacteriano.

En este entender; Díaz<sup>30</sup> (2012), que la presencia de polifenoles (ácido gálico) y catequinas atribuyen propiedades antioxidantes, antialérgicas, anticancerígenas, antiinflamatorias y antimicrobianas. Asimismo, Blanco<sup>54</sup> (2015), describe que la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos se relaciona en función a su concentración y el mecanismo de acción consiste en destruir la pared y membrana celular inactivando los sistemas enzimáticos.

Por tanto, los fenoles tienen actividad bacteriostática o bactericida, fungicida y viricida. Siendo potentes sobre las bacterias Gram positivas.

#### **b. Actividad cicatrizante y antiulcerosa**

Risco<sup>32</sup> (2005), la sangre de grado ayuda a regenerar la piel estimulando la contracción de la herida, permitiendo la cicatrización de la herida. Los principios activos que participan en este proceso son la taspina y los polifenoles (catequina y proantocianina). El mecanismo de acción de la taspina se relaciona con la estimulación de la quimiotaxis de fibroblastos, actuando al inicio del proceso de cicatrización, demostrado en estudios *in vivo* con ratones de experimentación, durante las primeras 60 horas. Este alcaloide muestra un efecto

cicatrizante con dosis de 0.375 mg/Kg. Del mismo modo, el lignano (3'-4-O-dimetilcedrusina), también interviene en la cicatrización y los polifenoles por la acción secuestradora de radicales libres que estimulan la contracción de la herida.

Carrión<sup>11</sup> (2010), la acción antibacteriana de los polifenoles contribuye al proceso de cicatrización, por permitir la precipitación de las proteínas de las células, formando la costra. Respecto a su acción antiulcerosa, Risco<sup>32</sup> (2001) sostiene que el látex ***Croton lechleri Müll. Arg.*** facilita la curación de ulcera gástrica, al reducir el tamaño de la ulcera. Esta acción se le atribuye también al alcaloide taspina, puesto que demostró reducir ulcera gástrica aguda aumentando el espesor y consistencia de la mucosa gástrica en estudios en ratas inducidas con Indometacina.

Por los estudios clínicos se recomienda el tratamiento con el látex ***Croton lechleri Müll. Arg.*** por vía tópica como agente de cicatrización aliviando irritaciones dérmicas y por vía oral para el tratamiento de ulcera gástrica.

### c. Actividad antiinflamatoria

Risco<sup>32</sup> (2005), el alcaloide taspina también posee actividad antiinflamatoria, demostrado en tres estudios experimentales *in vivo* con ratas, presentado en 3 modelos farmacológicos:

El primer modelo fue el edema inducido por carragenina en la zona suplantaria de la rata, el alcaloide presentó efecto antibacteriano con dosis de 58 mg/Kg dándose los primeros efectos potentes a tres horas de administración de carragenina (vía oral); comparado con el control fenilbutazona.

El segundo modelo de granuloma aplicada por torundas de algodón, el alcaloide inhibió el proceso inflamatorio durante siete días con dosis de 20 mg/Kg.

El tercer modelo de artritis inducida por un coadyuvante la tarpina inhibió con dosis 20 mg/Kg/día por siete días de tratamiento y con dosis única de 518 mg/Kg.

Por otro lado, estas propiedades no solo se le atribuyen a la tarpina, sino también a látex crudo en su conjunto que siendo administrado en dosis superiores a 25 mg/Kg inhiben el proceso de inflamación al 100%.

Tabla N<sup>o</sup>.03. Resumen de los compuestos presentes en ***Croton lechleri*** Müll. Arg., Díaz (2014)

CONSTITUYENTE QUÍMICO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
<b>Taspina</b>	<i>Actividad antiinflamatoria , curación de herida y citotóxica</i>
<b>3,4-O-Dimetilcedruin</b>	<i>Curación de heridas e inhibición de la proliferación celular</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procianidina B1 y B4</li> <li>• Catequinas; epigallocatequina; epicatequina; galocatequina</li> <li>• Catequina (4-8)-galocatequina (4-6)</li> <li>• Galocatequina; galocatequina (4-6)- epigallocatequina; galocatequina (4-8)- galocatequina (4-8)-epigallocatequina</li> <li>• Benzofurano-5-y1,2,3-dihidro:2-(3-dimetoxifenil)7-metoxi-carbonil-propan-1-oic ácido metilester, benzofurano-5-y1,2,3-dihidro:2-(4-hidroxí-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metoxi-carbonil-propen-1-oic ácido metilester</li> <li>• B-sitosterol; bincartriol; crolechinol; crolechinic ácido crolechínico (11); daucosterol</li> </ul>	
<b>1,3,5-trimetoxibenzeno</b>	<i>Actividad citotóxica, actividad antibacteriana</i>
<b>2,4,6- trimetoxifenol</b>	<i>Actividad antibacteriana</i>
Alcohol3,4-Dimetoxibenzil;3,4-dimetoxifenol;alcohol 4-hidroxifenil y su acetato; β-sitosterona; sitosterol- β-D-glucopiranososa	
<b>Korberina A y Korberina B</b>	<i>Actividad antibacteriana</i>
4-O-Metilcedrusina	
<b>SP-303(PM=2200 Da)</b>	<i>Actividad antiviral, tratamiento de la diarrea</i>
Catequina-(4-8)-epigallocatequina	
<b>Isoboldina; noriboldina; magnoflorine; SB-300(PM=3000 Da)</b>	<i>Actividad antidiarreica</i>



### 2.2.1.9 Aplicación y mecanismo de acción

Tabla N°04. Aplicaciones del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.

MECANISMOS DE ACCIÓN	APLICACIÓN
Cicatrizante de las heridas	Aplicar el látex sobre las heridas varias veces según sea necesaria.
Fracturas	Aplicar el látex externamente sobre la parte afectada.
Ulceras	Tomar cuatro gotas de la savia con agua en ayunas acompañado de abundante agua.
Diarrea	Tomar el látex diluido en agua.
Afecciones dérmicas	Aplicar lavados con las hojas trituradas en agua.
Ulceras estomacales e intestinales	Tomar el látex diluido en agua.

### 2.2.2 *Staphylococcus aureus*

“El género **estafilococos** son cocos Gram positivos, catalasa positivos, tiene aproximadamente 30 especies, siendo las de importancia clínica **S. aureus**, **S. saprophyticus** y **S. epidermidis**”.<sup>33</sup>

La especie **S. aureus** es un microorganismo del reino protista, distribuido en el ambiente, coloniza al hombre y animales. Constituye un mortal patógeno humano, originando un alto índice de infecciones a nivel de la población y hospitalario.

Chans<sup>33</sup> (2008), en la comunidad es un agente de infecciones agudas colonizando superficies cutáneas y mucosas. A nivel hospitalario es uno de los principales agentes causales de infección de heridas operatorias y de prótesis por producir toxinas. Presenta capacidad de adaptación y supervivencia, lo que conlleva al incremento paulatino de resistencia a los antimicrobianos. También es causante de síndromes de piel escaldada, shock tóxico e intoxicaciones alimentarias.

### 2.2.2.1 Taxonomía

- Reino: BACTERIA
- Filo: FIRMICUTES
- Clase: BACILLI
- Orden: BACILLALES
- Familia: STAPHYLOCOCCACEAE
- Género: *Staphylococcus*
- Especie: *S. aureus*

### 2.2.2.2 Hábitat

*S. aureus* se aloja habitualmente en la piel, fosas nasales y en zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas. El lugar de portación más frecuente es el vestíbulo nasal, el cual está mediado por ácidos teicoicos. Se estima que un 20-30% de la población tiene portación nasal, colonizándose mayormente en empleados de salud, pacientes con diabetes, hemodiálisis.<sup>34</sup>

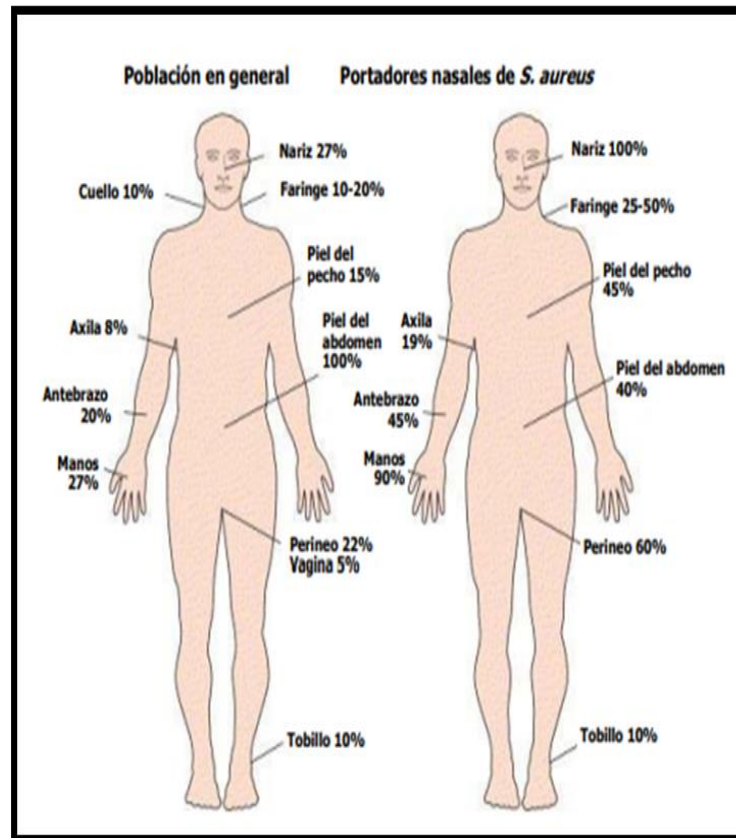


Figura N°11. Índices de portación *S aureus* en diferentes sitios corporales <sup>36</sup>

### 2.2.2.3 Morfología

Tienen forma de cocos Gram positivos de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, con preferencia a unirse en racimos. Es aerobio y anaerobio facultativo, es decir, puede desarrollarse con o sin oxígeno, es coagulasa positivo, manitol positivo. Carece de movimiento, no se encapsula.

Cervantes *et al*<sup>35</sup> (2014), manifiesta que el termino ***Staphylococcus***, proviene del griego ***staphyle*** que simboliza a un racimo de uvas, causante de procesos inflamatorios e infecciosos. Producen catalasa, característica que la diferencia de los géneros ***Streptococcus*** y ***Enterococcus*** que son catalasa negativos.

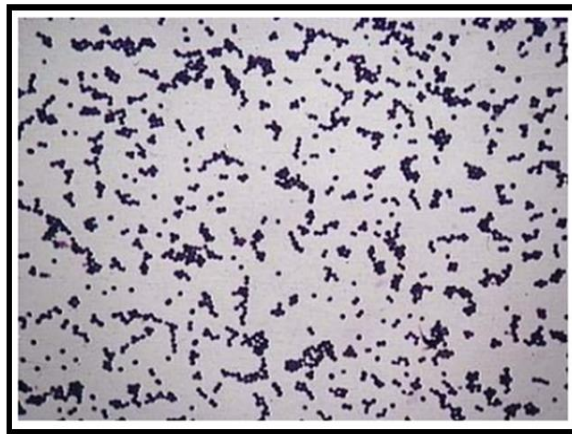


Figura N° 12. Tinción de Gram,100X. ***Staphylococcus aureus***<sup>36</sup>

### 2.2.2.4 Estructura

#### a. Pared celular

Contiene una capa de peptidoglicano. Se encargan de mantener rígida de la pared bacteriana. A nivel patogénico contribuiría a la manifestación del proceso inflamatorio por activación del complemento. Asimismo, incentiva la producción de anticuerpos opsonizantes.<sup>34</sup>

**Ácidos Teicoicos:** Chans<sup>33</sup> (2008), En la infección activan el proceso de inflamación, llegando a desencadenar shock séptico.

**Proteína A:** presente especialmente en **S. aureus**, unida al peptidoglicano y a moléculas de inmunoglobulina G, actuando como factor de virulencia, siendo empleada como una prueba para la identificación **S. aureus**<sup>34</sup>

**Clumping factor:** determina la formación de fibrina en la superficie bacteriana.<sup>33</sup>

**b. Capsula:** “posee propiedades antifagocíticas y su presencia en **S. aureus** le da el carácter virulento”<sup>34</sup>

**c. Determinantes de patogenicidad (Factores de virulencia)**

**S. aureus** puede producir diversidad de sustancias, la que en su mayoría participan en el origen de la enfermedad.

**Enzimas:**

- **Coagulasa:** Cervantes *et al*<sup>35</sup> (2014), se presenta en dos formas: coagulasa ligada y libre. Es un marcador biológico de virulencia, que permite diferenciar los diferentes tipos de **Staphylococcus spp.** Una coagulasa positiva indica que el análisis contiene **S. aureus**
- **Catalasa:** “otorgan protección a la bacteria evitando fagocitosis.”<sup>35</sup>
- **Desoxirribonucleasa:** Chans (2008)<sup>33</sup>, sostiene que su función en el proceso infeccioso radica en destruir el ADN de las células con necrosis, facilitando la fluidez del pus.

- **Lipasas:** “hidroliza los lípidos y facilita la diseminación de nuevas áreas de la piel.”<sup>34</sup>
- **Estafiloquinasas:** “desdoblan la fibrina contribuyendo la invasión de tejidos vecinos.”<sup>34</sup>

**Toxinas:**

Son las que causan las infecciones de **S. aureus** y son de tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y la leucocidina.

### 2.2.2.5 Patogenia

**S. aureus** actúa como comensal y agente principal de procesos infecciosos. El vestíbulo nasal es el sitio colonizador en el hombre. Castañón-Sánchez<sup>37</sup> (2014), la colonización aumenta el riesgo de contraer la infección, puesto que constituye un reservorio donde los microorganismos empiezan a proliferarse a raíz de las defensas baja del huésped, es decir, la colonización antecede el proceso infeccioso y los abscesos se originan cuando el germen es inoculado en la piel.

**S. aureus** es un patógeno con capacidad de formar abscesos en los focos de infección tanto locales como metastásicos. Esta respuesta patológica clásica a **S. aureus** define el marco dentro del que evolucionará la infección. La infección estafilocócica propicia una reacción inflamatoria caracterizada al inicio por una respuesta intensa de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y una infiltración ulterior de macrófagos y fibroblastos. Si la respuesta inmunológica del hospedador (incluido el depósito de fibrina y colágena) no detiene la infección, ésta se propaga a los tejidos vecinos o al torrente circulatorio.

La transmisión infecciosa puede ser exógena o endógena. La transmisión exógena puede ser mediante la contaminación de

tejido traumatizado (heridas o quemaduras); material médico contaminado y la ingestión de alimentos o leche contaminados.

La transmisión endógena consiste en el ingreso del germen desde la piel, a través de fracturas, heridas o cuerpos extraños desde un lugar en donde el microorganismo es comensal. La infección se ve favorecida, en cualquier caso, si el paciente es inmunodeprimido, tiene diabetes, malnutrición o cursa una terapia antibiótica de amplio espectro.

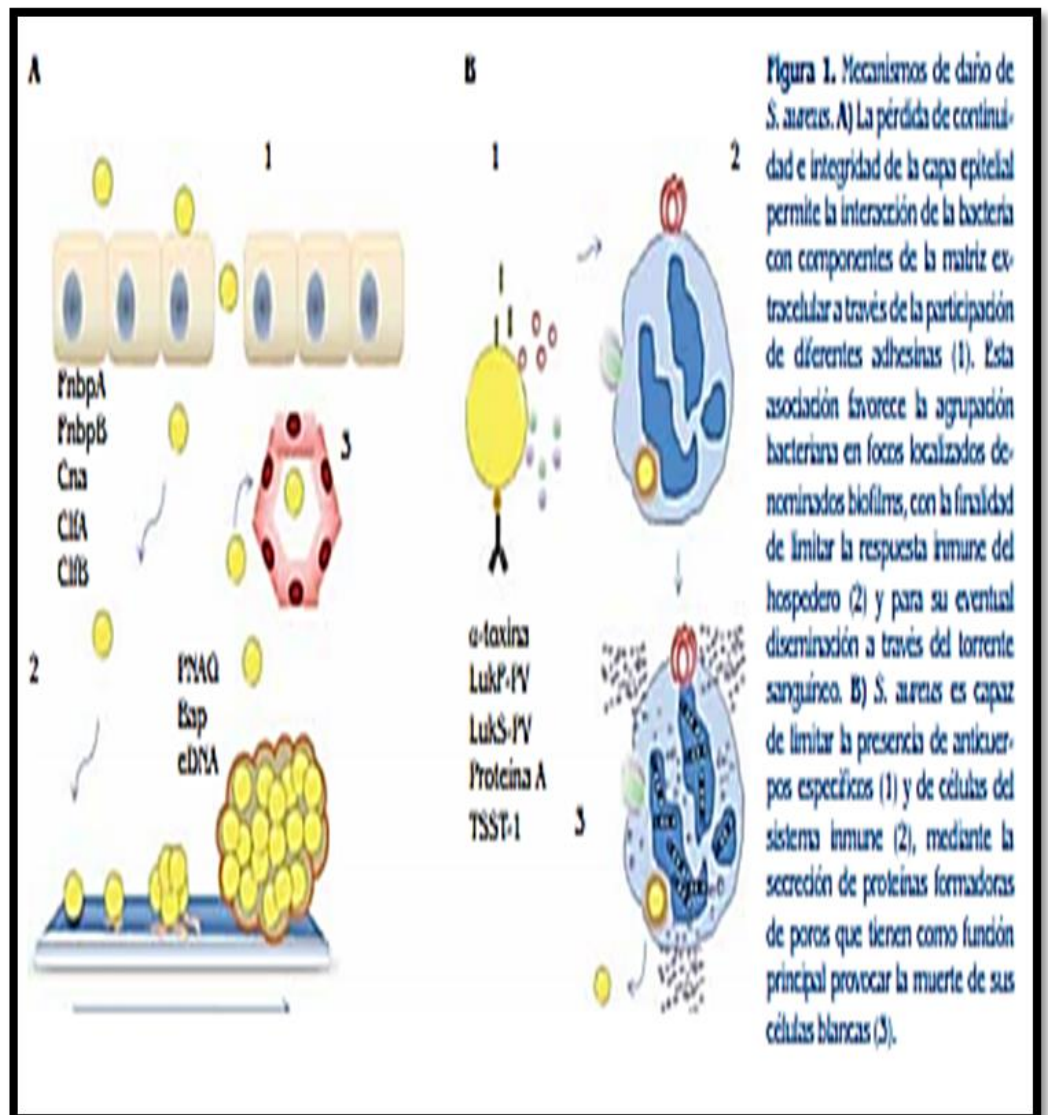


Figura N°13. Mecanismos de daño de *S. aureus* <sup>37</sup>

### 2.2.2.6 Manifestaciones clínicas

***Staphylococcus aureus*** es un patógeno que origina infecciones a nivel hospitalario y en la población, que pueden desencadenar graves consecuencias.

Tabla N° 05. Cuadros Clínicos más importantes causados por ***S. aureus***<sup>39</sup>

LUGAR DE INFECCIÓN	CUADRO CLÍNICO	LOCALIZACIÓN DE LESIONES
En piel y mucosas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Forunculosis</li><li>• Impétigo</li><li>• Paroniquia</li><li>• Celulitis</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Epidermis (superficial)</li><li>• Epidermis (superficial)</li><li>• Epidermis y dermis</li><li>• Tejido blando junto a las uñas</li></ul>
Generalizadas y en vísceras	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bacteriemia</li><li>• Osteomielitis</li><li>• Artritis</li><li>• Endocarditis</li><li>• Neumonía</li><li>• Meningitis</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Torrente circulatorio</li><li>• Hueso (extremidades inferiores)</li><li>• Articulaciones</li><li>• Endocardio</li><li>• Pulmón</li><li>• Meninges</li></ul>
Por acción tóxica	<ul style="list-style-type: none"><li>• Síndrome de la piel escaldada</li><li>• Síndrome de shock tóxico</li><li>• Intoxicaciones alimentarias</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Base de epidermis</li><li>• Difuso (piel, riñones, músculo)</li><li>• Aparato digestivo</li></ul>

### 2.2.2.7 Pruebas diagnósticas de laboratorio

#### a. Pruebas directas:

- Por tinción de Gram y el examen microscópico del contenido del absceso o del tejido infectado. Permitirá observar los cocos Gram positivos conjuntamente con leucocitos polimorfonucleares.
- Prueba de catalasa y fermentación de glucosa que permite la diferenciación del genero **Staphylococcus** del **Micrococos**.



- Prueba de coagulasa, es la más empleada por que permite diferenciar **S. aureus** coagulasa positivo de **S. aureus** coagulasa negativo.
- Otras técnicas modernas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que utilizan genes específicos de **S. aureus**.

**b. Cultivo y aislamiento:** para observarla se incuban a 34-37°C, después de 24 horas de incubación se observan colonias medianas, blancas, cremosas, brillantes y a las 48-72 horas se pueden apreciar colonias de color amarillo.



Figura N° 14. Cultivo de **S. aureus** en Agar sangre<sup>40</sup>

El agar manitol salado, permite aislar la especie **Staphylococcus aureus**, Además, facilita un diagnostico presuntivo basándose en la coloración amarilla que presentan las colonias

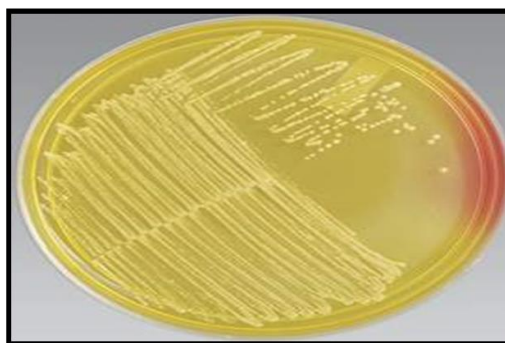


Figura N°15. Colonias de **S. aureus** en agar manitol salado. <sup>41</sup>



### 2.2.2.8 Tratamiento

El tratamiento que combate las infecciones por ***Staphylococcus aureus*** son los antibióticos betalactámicos: Oxacilina, Cloxacilina y Dicloxacilina.

#### a. Oxacilina (Inyectable 1g)

**Indicaciones:** es un betalactámico (subgrupo isoxazolil penicilina), fármaco de elección para casi todas las enfermedades estafilocócicas

Es un medicamento antibiótico bactericida de amplio espectro, principalmente con acción contra gérmenes Gram positivos, incluyendo cepas de estafilococo productoras de penicilinasas; es activo contra la mayoría de las cepas de ***Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *Streptococo Viridans***. Está indicada en el tratamiento de infecciones respiratorias, genitourinarias, óseas, articulares, piel y tejidos blandos, ocasionadas por gérmenes susceptibles.

**Mecanismo de acción:** inhibe la síntesis de peptidoglicano de la pared celular bacteriana; evitando así el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano indispensable para la rigidez y estabilidad. Tiene acción bactericida, determinada por la capacidad de llegar a unirse a proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que son enzimas que se encuentran en la membrana interna de la pared bacteriana y participan en la síntesis de la pared celular, Calvo <sup>45</sup> (2018).

#### **Farmacocinética:**

- Su absorción (Tmax 30 minutos IM / 60 minutos V.O.).
- Distribución: tejidos y líquidos corporales. Tiene un tiempo de vida media de 24 a 42 minutos. Se prolonga hasta 2 horas en pacientes con insuficiencia renal severa.

- Metabolismo: en el hígado en un 49%.
- Excreción: orina y bilis.

**Efectos adversos:** cefaleas, náuseas o vómitos, diarreas, candidiasis oral o vaginal, prurito, rash cutáneo, urticaria, tromboflebitis, anafilaxia, fiebre.<sup>44</sup>

**Contraindicaciones:** hipersensibilidad a Oxacilina, penicilinas o algún otro componente en su formulación.<sup>44</sup>

**Interacciones:** con tetraciclinas hay descenso de la acción farmacológica. Aminoglucósidos, inactivación mutua al administrarse juntos. Anticonceptivos orales, disminución de eficacia.<sup>44</sup>

### 2.2.3 Método de difusión en agar

Sánchez-García *et al*<sup>46</sup> (2016), es un método cualitativo caracterizado por ser de fácil estandarización. Se desarrolla en base a los fundamentos de Kirby & Bauer, Sherris & Turck, 1966, se puede realizar ya sea en disco, pozo y cilindros.

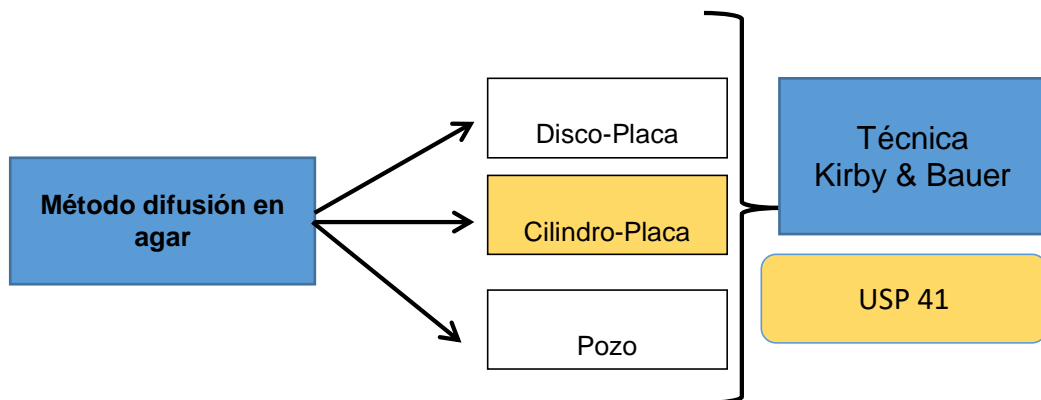


Figura N° 16. Clasificación del método de difusión en agar

Actualmente, se encuentran estandarizados y son recomendados por el subcomité de ensayo de susceptibilidad (NCCLS) de los Estados Unidos. Asimismo, la USP 41 en su apartado 81 de pruebas biológicas para

antibióticos y valoraciones microbiológicas, establece que el método cilindro-placa es recomendable para demostrar el efecto inhibitorio de los antibacterianos sobre diversos microorganismos de importancia clínica y que necesitan especial atención por la generación de cepas resistentes.<sup>47</sup> Los resultados de este método son interpretados en tres categorías: sensibles, intermedios y resistentes.

### 2.2.3.1 Método difusión en agar Cilindro – Placa

**Fundamento:** método cualitativo cuya metodología sustenta la difusión del antibacteriano a partir de un cilindro hacia una capa de agar en una placa Petri, cuya difusión produce un área circular denominada zona de inhibición.<sup>48</sup>

Sánchez-García *et al*<sup>46</sup> (2016), indica que el método se desarrolla en base a la concentración del antibiótico que determina la inhibición del crecimiento bacteriano visible de forma circular en la superficie de un agar sembrado homogéneamente con la cepa de estudio. Se emplean cilindro de acero inoxidable o de porcelana estériles, en los cuales se distribuyen una cantidad determinada del antibiótico.

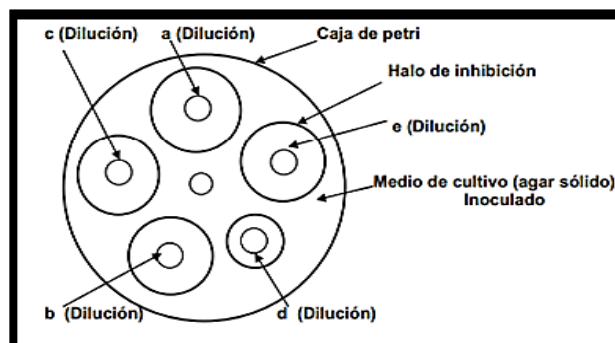


Figura N° 17. Método de difusión en agar Cilindro- placa<sup>49</sup>

**Indicaciones:** “la aplicación de este método es recomendable para microorganismos con crecimiento rápido como *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus spp.* *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus spp.*”.<sup>50</sup>

## Materiales:

Tabla N°06. Materiales para el método cilindro - placa

MATERIALES	DESCRIPCIÓN
Suero fisiológico	0.85 g de cloruro de sodio en 100 mL
Medio de cultivo	Agar Mueller-Hinton, recomendado para ensayos cualitativos. Permite el crecimiento adecuado de bacterias patógenas; además carece en su composición de timina o timidina que son inhibidores de sulfamida y de trimetoprin. <sup>51</sup>
	pH debe ajustarse a 7.2-7.4
	Temperatura de almacenamiento: 2-8°C, debe dejarse a temperatura ambiente antes de su utilización.
Cilindros	Deben de tener un diámetro externo de 8 mm, interno de 6 mm y 10 mm de largo. <sup>47</sup>
Hisopos	Esterilizarlo para la inoculación de la cepa bacteriana.

Elaboración: propia

## Método:

Tabla N° 07. Procedimientos del método de difusión en agar cilindro - placa

PROCEDIMIENTOS DEL MÉTODO		
Preparación del inóculo	Método del medio de cultivo líquido	Coger de 3 a 5 colonias de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y sembrarlas en suero fisiológico. Incubar a 37°C de 2 a 6 horas hasta superar una turbidez de 0.5 de la escala de MacFarland. <sup>51</sup>
	Método de suspensión directa de colonias	A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas coger varias colonias con un asa y ajustar el inóculo a una turbidez de 0.5 de la escala de MacFarland en suero fisiológico. Agitar "vortex" durante 15-20 segundos". <sup>51</sup>
Inoculación de las placas	Picazo, <sup>51</sup> Inocular las placas, sin dejar ninguna zona libre, rotando la placa unos 60°. Dejar secar de 3 a 5 minutos.	
Dispensación de los cilindros en la placa	Muñoz <sup>52</sup> (2006), con pinzas estériles colocar cilindros a una distancia de 5 mm para evitar superposición de los halos de inhibición. Para placas de 150 mm no se emplearán más de 12 cilindros y para las de 100 mm no más de 6. Distribuir las diluciones del antibiótico en cada cilindro (no menos de cuatro replicas por concentración) para asegurar la precisión estadística.	
Incubación	Se recomienda incubar las placas sin invertirlas a 37°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los cilindros, <sup>53</sup> <i>Staphylococcus spp/ y Enterococcus spp</i> el tiempo de incubación debe prolongarse por 24 horas para una mejor detección de la resistencia a Oxacilina y Vancomicina, respectivamente.	
Lectura de resultados	Picazo, <sup>51</sup> medir el diámetro de los halos con vernier o regla, incluyendo el diámetro del cilindro.	

Elaboración: propia

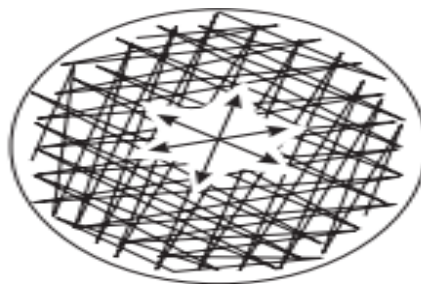


Figura N° 18. Modo de siembra de inóculo en superficie del agar<sup>50</sup>

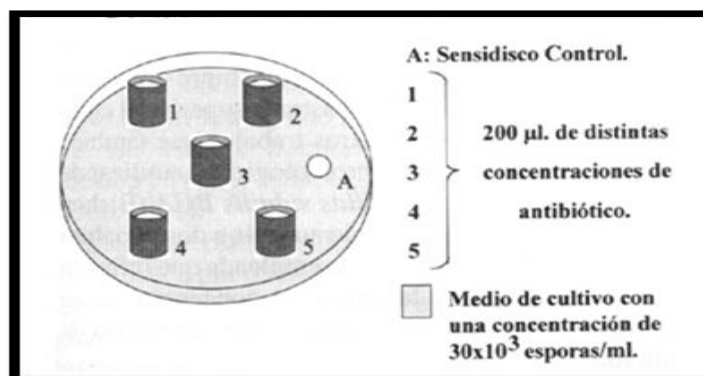


Figura N° 19. Esquema de metodología

#### 2.2.4 Categorías interpretativas para antibiograma en estudios *in Vitro*

Para la interpretación de resultados del diámetro de los halos de inhibición el INS establece valores críticos del antibiograma, expresados en categorías que permiten determinar si la cepa bacteriana de importancia clínica es sensible o resistente a determinados antibióticos.<sup>53</sup>

Se tiene 3 categorías:

**Sensible:** describe que la infección producida por el microorganismo puede responder al tratamiento con la dosis del antibiótico prescrito, es decir, hay inhibición del antibiótico frente al microorganismo patógeno.<sup>50</sup>

**Intermedio:** describe que la infección producida por el microorganismo tiene una velocidad de repuesta lenta al tratamiento con la dosis administrada, es decir, hay eficacia clínica solamente en lugares donde el antibiótico se encuentra fisiológicamente concentrado. Por tanto, la infección solo responde con tratamiento a dosis altas del antibiótico de prueba.<sup>50</sup>

**Resistente:** la cepa bacteriana es resistente, no hay respuesta terapéutica a la dosis de tratamiento del antibiótico empleado, por no existir inhibición.<sup>50</sup>

En este sentido el subcomité de ensayo de susceptibilidad - NCCLS establecen parámetros validados de zona de diámetro críticos para categorizar los niveles de susceptibilidad de los antibióticos empleados en un estudio *in vitro*.

### a. Estándares de interpretación de zonas de diámetro según el INS

Tabla N° 08. Antibióticos y diámetros críticos para *Staphylococcus spp*- INS <sup>31</sup>

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		R	I	S
<b>PENICILINAS</b>				
Penicilina	10 unidades	£28	-	29
<b>Oxacilina (S.Aureus)</b> (Estafilococo coagulasa negativos)	<b>1 µg</b>	<b>£ 10</b>	<b>11-12</b>	<b>&gt;14</b>
	1 µg	£ 17	-	>18
<b>GLICOPEPTIDOS</b>				
Vancomicina	30 µg	-	-	>15
teicoplanina	30 µg	£ 10	11-13	>14
<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13-14	>14
<b>FLUOROQUINOLONAS</b>				
Norfloxacin	10 µg	£ 12	13-16	>17
ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	≥21
<b>TETRACICLINA</b>				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15-18	>19
<b>MACROLIDOS</b>				
Eritromicina	15 µg	£ 13	14-22	>23
<b>LINCOSAMIDAS</b>				
Clindamicina	2 µg	£ 12	15-20	>21
<b>OTROS</b>				
Cloranfenicol	30 µg	£ 12	13-17	>18
Rifampicina	5 µg	£ 16	17-19	>20
Nitrofurantoina	300 µg	£ 14	15-16	>17
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	£ 10	11-15	>16

Elaboración: INS

**Disco de Penicilina:** el resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Penicilina es válido también para Ampicilina y Amoxicilina.

**Disco de Oxacilina:** el resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Oxacilina es válido también para Dicloxacilina y Cloxacilina.

La resistencia a Oxacilina señala una resistencia cruzada a todas las penicilinas (asociadas o no a inhibidores de betalactamasas), cefalosporinas de todas las generaciones y carbapenems, sin excepción.

Las cepas resistentes a Penicilina y sensibles a Oxacilina son sensibles a las penicilinas asociadas a los inhibidores de betalactamasas, a las cefalosporinas y a los carbapenems.

**b. Estándar de interpretación de zonas de diámetro según Duraffourd Lapraz (1983)**

Nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm

sensible (+): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm

muy sensible (++) : para un diámetro entre 14 y 20 mm

Sumamente sensible (+++) : para un diámetro superior a 20 m

## **2.3. Formulación de hipótesis**

### **2.3.1 Hipótesis general**

El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a ***Staphylococcus aureus***.

### **2.3.2 Hipótesis específicas**

1. El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) posee algunos constituyentes químicos relacionados con el efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus***.
2. ***Staphylococcus aureus*** es sensible a concentraciones de 25%,50%,75% y 100% del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado).
3. El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) presenta efecto antibacteriano *in vitro* comparado con Oxacilina frente a ***Staphylococcus aureus***.

### 2.3.3 Variables

- **Variable independiente X:** Látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. (Sangre de grado).
- **Variable dependiente Y:** Efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*.

### 2.3.4 Cuadro de operacionalización de variables

Tabla Nª 09: Cuadro de operacionalización de variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>  <b>X:</b> látex de <i>Croton lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado)	Análisis organoléptico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Color</li> <li>• Olor</li> <li>• Sabor</li> <li>• Textura</li> </ul>
	Prueba de solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insoluble</li> <li>• Poco Soluble</li> <li>• Moderadamente Soluble</li> <li>• Totalmente Soluble</li> </ul>
	Marcha fitoquímica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcaloides</li> <li>• Flavonoides</li> <li>• Polifenoles</li> <li>• Saponinas</li> <li>• Compuestos fenólicos</li> <li>• Antocianinas</li> </ul>
	Concentraciones del látex <i>Croton lechleri</i> Müll. Arg. (Sangre de grado)	<b>Concentraciones al:</b> 25%,50%,75%,100%
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>  <b>Y:</b> efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	Método de difusión en agar cilindro- placa	Diámetros de los halos de inhibición en mm según la escala duraffourd: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Nula (-)</b> : para un diámetro inferior a 8 mm</li> <li>• <b>sensible (+)</b>: para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm</li> <li>• <b>muy sensible (++)</b> : para un diámetro entre 14 y 20 mm</li> <li>• <b>Sumamente sensible (+++)</b>: para un diámetro superior a 20 mm</li> </ul>



## 2.4 Marco Conceptual

**Agar Müller-Hinton:** medio de cultivo microbiológico utilizado para realizar ensayos de susceptibilidad a antibióticos.

**Antibiótico:** fármaco con actividad biológica que inactiva y destruye el desarrollo proliferativo patógeno de un microorganismo.

**ATCC:** “American Type Culture Collection”<sup>53</sup>

**Cepa:** “cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.”<sup>53</sup>

**Cultivos:** “método microbiológico para la multiplicación de especies bacterianas. Permiten el estudio profundo de la bacteria que causan enfermedades infecciosas de interés clínico”.

**Disco de sensibilidad:** “discos empapados con un determinado antibiótico. E empleado para estudios de sensibilidad antibacteriana por método de difusión en agar”.<sup>53</sup>

**Efecto antibacteriano:** capacidad de destrucción hacia un determinado microorganismo, con la finalidad de inactivar su crecimiento y desarrollo patógeno.

**Escala de Mc. Farland:** “es un estándar de turbidez de sulfato de bario. Empleada en el proceso de inoculación para en prueba cualitativa de susceptibilidad 0.5.”<sup>53</sup>

**Espectrofotometría UV-VIS:** método analítico que determina la concentración cuantitativa de un compuesto en solución. basada en la medición de absorción

de radiación UV por determinadas moléculas, la radiación correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético causa transiciones electrónicas a longitudes de onda característica de la estructura molecular de un compuesto.

**Incubación:** proceso de que facilita condicione adecuada para el crecimiento y desarrollo de cultivos bacterianos.

**Inóculo:** alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.<sup>51</sup>

**Halo de inhibición:** área circular inhibida por el agente antimicrobiano.

**Látex:** savia procedente de la sangre de grado. Es viscoso de color rojizo, se obtiene rasgando la corteza.

**Medio de cultivo:** medio con componente nutritivo, que constituyen fuente de enriquecimiento para el cultivo de cepa bacteriana.

**Pruebas de sensibilidad:** se efectúan a través de antibiogramas, sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para determinar la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. reflejan un comportamiento *in vitro*

**Sensible:** categoría clínica de interpretación para pruebas determinan la susceptibilidad de una bacteria, lo que paralelamente permite inferir que el antibiótico empleado en el tratamiento es eficaz.

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1 Tipo del estudio

**Transversal:** Debido a que la investigación fue realizada en un periodo determinado, donde variables fueron observadas a las 24 horas luego de realizar el estudio microbiológico.

**Aplicada:** la investigación se realizó en forma práctica, a través de procedimientos experimentales. Lo resultados tendrán utilidad en la solución de problemas concerniente a la salud.

### 3.2. Diseño a utilizar

**Experimental in vitro:** debido a la manipulación de la variable independiente que permitió observar su efecto en la variable dependiente. Esto se llevó a cabo en condiciones rigurosamente controladas, con la finalidad de establecer las causas y consecuencias de una situación o acontecimiento particular.

### 3.3. Población

- **Población vegetal:** el látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. (sangre de grado) fue recolectado en la provincia de Tingo María-Huánuco ubicado a 647 msnm.
- **Población microbiológica:** cepas estandarizadas del microorganismo bacteriano *Staphylococcus aureus*.

### 3.4. Muestra

- **Muestra vegetal:** 500 ml de látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. (Sangre de grado), fue recolectado mediante una incisión en forma de “v” en la corteza. de *Croton lechleri* Müll. Arg “Sangre de grado” en la provincia de Tingo María- Huánuco.

- **Muestra microbiológica:** Placas Petri de agar Mueller-Hinton cultivadas con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

### 3.5 Técnica e instrumentos de la recolección de datos

#### 3.5.1 Técnica de recolección de datos

Técnica de observación estructurada, en vista que el estudio es de tipo concluyente, de objetividad, de precisión y de laboratorio.

#### 3.5.2 Instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos de recolección de datos empleados en la investigación son fichas de observación, diseñadas por los investigadores, donde se consideró como premisas los indicadores derivados de las variables de estudio, concluyendo con la construcción de reactivos o ítems en cada instrumento.

Cada instrumento fue sometido a 3 validaciones de juicios de expertos, con el fin de garantizar los criterios de validez, precisión y confiabilidad. En este entender, las fichas de observación para la recolección de datos son:

- Análisis organoléptico
- Prueba de solubilidad
- Marcha fitoquímica
- Efecto antibacteriano

Para la interpretación de los resultados del diámetro de los halos de inhibición obtenidos se consideró como parámetro interpretativo la escala de **Duraffourd y Lapraz** (1983), útil para establecer la sensibilidad de un microorganismo patógeno frente a la acción de antibacterianos en ensayo in vitro.

- **Nula (-):** para un diámetro inferior a 8 mm
- **Sensible (+):** para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm

- **Muy sensible (++)**: para un diámetro entre 14 y 20 mm
- **Sumamente sensible (+++)**: para un diámetro superior a 20 mm

### 3.5.3 Materiales e instrumentos del laboratorio

Tabla N° 10. Materiales e instrumentos del laboratorio

MATERIALES	APLICACIÓN
Frasco ámbar	Almacenamiento del látex
Pipetas Pasteur	Empleado en la marcha fitoquímica
Baguetas	Empleado en el análisis organoléptico
Placas Petri	Para realizar la prueba antimicrobiana
Tubos de ensayo	Empleado en la marcha fitoquímica
Capilares	Siembra en placas sílice gel CCF
Papel kraft	Empaquetar los materiales a esterilizar
Mascarillas	Proceso de experimentación
Tips estériles	Para medir en microlitros
Guantes	Para evitar la contaminación
Gradilla	Para ubicar los tubos de ensayo.

Elaboración: Propia

### 3.5.4 Equipos

Tabla N° 11. Equipos

EQUIPOS	APLICACIÓN
Cocinilla eléctrica	Se usó para la marcha fitoquímica
Luz UV	cromatografía
Placas cromatografías	Placas de sílice gel para realizar la cromatografía
Campana de extracción	Para evitar los peligros de los solventes y reactivos de laboratorio
Micro pipeta	Para medir las diluciones en $\mu\text{L}$
Autoclave	Para esterilizar los materiales
Incubadora	Para incubar las placas de antibiograma.
Pinzas Mayer estériles	Para ubicar los cilindros en la placas
Cilindros de acero inoxidable estériles	Para depositar las disoluciones (concentraciones) del látex en las placas
Cuchillo	Para cortar la corteza del <i>Croton lechleri</i>

Elaboración: Propia

### 3.5.5 Reactivos

- Reactivo de Molish
- Reactivo de gelatina
- Reactivo de Rosenheim
- Reactivo de Benedict
- Reactivo de Sonneschein
- Reactivo Mayer
- Reactivo Wagner
- Reactivo de tricloruro Férrico
- Reactivo de Dragendorf
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo de Tollens
- Reactivo de Ninhidrina
- Reactivo de Lugol
- Reactivo de Lieberman - Burchard
- Reactivo de Fehling A
- Reacción de Bortranger Hidróxido de sodio al 5%)
- Reactivo de Generación de espuma
- Etanol de 70°
- Etanol de 96°

### 3.6 Procedimiento experimental

#### 3.6.1 Obtención del material vegetal

El látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. (sangre de grado) fue recolectado en la provincia de Tingo María-Huánuco, a 647 msnm con la ayuda de una persona de la misma zona, que tiene experiencia en el proceso de extracción del látex.

Se realizó incisiones en forma de "V" en la corteza, extrayéndose 500 mL del látex, fue almacenada en frascos de color ámbar, con la finalidad de evitar la contaminación, foto sensibilidad y asegurar la conservación de los metabolitos. La muestra de estudio se transportó desde la zona de adquisición, hacia el laboratorio de farmacognosia de la UIGV.

#### 3.6.2 Identificación botánica

La identificación de la muestra fue determinada en el herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM; para tal efecto se llevó los tallos, hojas y el látex de *Croton lechleri* Müll. Arg., para su identificación taxonómica.

### 3.6.3 Determinación fisicoquímica de la muestra

#### 3.6.3.1 Análisis organoléptico

Es un examen preliminar de tipo cualitativo de la droga y se basa en la valoración por medio de los órganos de los sentidos; como: color, olor, sabor, y tacto. Sirven de modo orientativo. Se realizó una observación sensorial de las siguientes características:

Tabla N° 12. Características del análisis organoléptico

CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
<b>Olor</b>	Aromático, oleoso, alcanforado, sin olor, herbal, nauseabundo, desagradable, a especia, etc.
<b>Color</b>	Uniforme o con presencia de fragmentos de distintos colores.
<b>Sabor</b>	Dulce, amargo, ácido, salino, astringente, punzante, aromático, etc.
<b>Textura</b>	(tacto) Viscosa, lisa, áspera, densa.

Elaboración: Propia

#### 3.6.3.2 Prueba de solubilidad

Permite evaluar la capacidad de disolución de una muestra vegetal con solventes de distinta polaridad. Para realizar la prueba de solubilidad del látex de ***Croton lechleri Müll. Arg.*** (Sangre de grado) se colocó una batería de tubos de ensayo con 1mL de muestra vegetal, la cual fue llevada a desecación; seguidamente se adiciono 1mL de cada uno de los solventes descritos en la tabla N°13. Los resultados obtenidos son expresados como: (-) Insoluble, (+) Poco soluble, (++) Moderadamente soluble, (+++) Totalmente Soluble.

Tabla N° 13. Solventes para prueba de solubilidad

Nº	SOLVENTES
1.	Agua destilada
2.	Etanol 70°
3.	Éter de Dietílico
4.	Cloroformo
5.	N-butanol
6.	Ciclohexano
7.	Acetato de etilo

**Leyenda:**

(-): Insoluble  
(+): Poco soluble  
(++): Moderadamente soluble  
(+++): Totalmente Soluble

Elaboración: Propia

### 3.6.3.3 Marcha Fitoquímica

Secesión de aislamientos y purificaciones de los metabolitos existentes en la muestra vegetal, permite observar reacciones como: cambio de color, fluorescencia, reacciones de precipitación, lo que indica qué tipos de metabolitos primarios y secundarios tiene la muestra. En la siguiente tabla, se especifica cada uno de los ensayos fitoquímicos del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. (sangre de grado).

Tabla N° 14. Marcha fitoquímica

Nº	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA
1	CARBOHIDRATOS	Molish	Anillo violeta en la interfase
2	COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl <sub>3</sub>	Coloración verde – azulado
3	TANINOS	Gelatina	Precipitado denso blanco
4	FLAVONOIDES	Shinoda	Coloración rojo magenta
5	ANTOCIANINAS Y CATEQUINAS	Rosenheim	Coloración rojo oscuro
6	AMINOÁCIDOS	Ninhidrina	Coloración violácea
7	ALCALOIDES	Dragendorff	Coloración rojo ladrillo
		Mayer	Precipitado blanco
8	QUINONAS	Borntrager	Coloración roja
9	TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	Lieberman - Burchard	Esteroides: verde – azul
10	SAPONINAS	Generación de espuma	Formación de 0.5 a 1cm de espuma estable por 15 min.
11	GLUCÓSIDOS	Baljet	Coloración anaranjada
12	POLIFENOLES	vainillina clorhídrica	Coloración azul
13	IRIDOIDES	Vainillina - HCl	Rojo grosella

**Leyenda:**

(-): La coloración o precipitado no se evidencia.      (++) : La coloración o precipitado es moderada.  
 (+): La coloración o precipitado es leve.                      (+++) : La coloración o precipitado es total.



### 3.6.3.4 Prueba de cromatografía en capa fina

Método de análisis donde se da una interacción entre dos fases: una fase móvil y una fase estacionaria, como resultado se separan los componentes de la muestra vegetal en estudio.

#### a. Procedimiento:

- Sembrar la muestra en la fase estacionaria a un centímetro arriba de la parte inferior (placa de sílice gel 2 cm x 10 cm F254).
- Introducir la placa en la cuba cromatográfica (fase móvil).
- Retirar la placa cuando la fase móvil haya recorrido hasta quedar  $\frac{3}{4}$  partes del extremo superior de la placa.
- Secar y revelar.
- Medir el recorrido, calcular el  $R_f = \frac{\text{distancia que recorre la muestra}}{\text{distancia que recorre el solvente}}$
- Observar en luz Uv

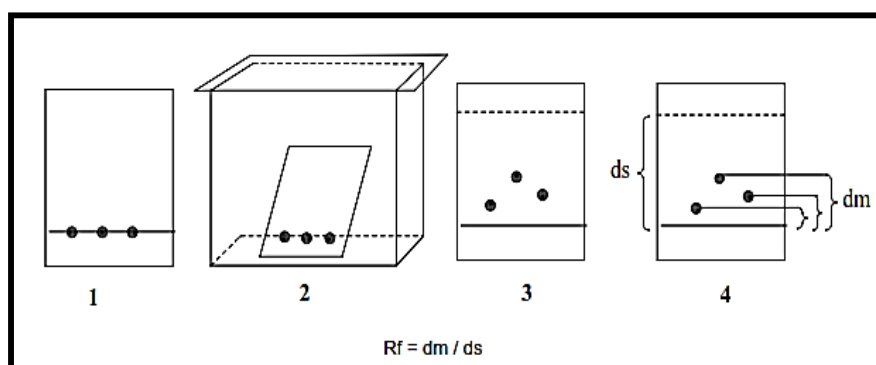


Figura N° 20. Etapas de la CCF

Tabla N° 15. Fase móvil y reveladores

METABOLITOS SECUNDARIOS	FASE MÓVIL	REVELADOR
Flavonoides	BAW 1- butanol: ácido acético: agua destilada (4:1:5)	AlCl <sub>3</sub> al 1% en etanol
Alcaloides	Metanol: agua (25:75)	Reactivo De Dragendorf

Elaboración: Propia

### 3.6.3.5 Prueba de espectrofotometría en el UV-VIS para la cuantificación de Polifenoles.

#### Método de Polifenoles:

El examen de Folin-Ciocalteu es utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos totales en muestras vegetales. Se basa en la reacción entre los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, resultado de la reacción se da coloración azul que es sensible a ser determinada por espectrofotometría a 765 nm.

#### Procedimiento Experimental

A partir de una disolución concentrada o madre de Ácido Gálico (100 mg/L) se preparan diluciones diluidas de 10 mL a concentraciones crecientes entre 0 y 16 ppm. Según se detalla en la tabla.

- **Preparación de la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 100 mg/L**

Tabla N°16. Estándar de ácido gálico a partir de una dilución concentrada de 100 mg/L.

Reactivos	Concentración (mg/mL) de la curva de patrón de ácido gálico								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Ácido Gálico (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6
Agua (mL)	10	9.8	9.6	9.4	9.2	9	8.8	8.6	8.4

Elaboración: Propia

- **Preparación del extracto de polifenoles de la muestra**

Para la extracción de los compuestos fenólicos de la muestra se seguirá la metodología propuesta por TÓMAS-BARBERÁN ET.2001.

Tomar una cantidad adecuada de muestra en un tubo, luego agregar, metanol en proporción de 1:2.

Añadir NaF 2 mM para inactivar la enzima polifenol oxidasa y evitar la degradación de los polifenoles durante la prueba.

Homogeneizar el contenido de los tubos en el vortex y llevar a centrifugar a 3500 rpm durante 10° a 25° C.

Recuperar el sobrenadante.

- **Determinación de polifenoles en la muestra y en los patrones de ácido gálico.**

De cada dilución patrón de ácido gálico extraer 250 µL con el sobrenadante de la extracción de los compuestos polifenólicos y colocarlos en matraces aforados de 25 mL.

Agregar 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu

Homogeneizar el contenido de los matraces, dejándolos reposar 8 minutos en oscuridad.

Agregar a cada matraz 3.75 mL de disolución de carbonato sódico al 7.5% y llevar a un volumen de 25 mL con agua destilada.

Homogeneizar los matraces alejados de la luz por 2 horas.

Medir la absorbancia a 765 nm.

### 3.6.3.6 Prueba de espectrofotometría en el UV-VIS para la cuantificación total de flavonoides totales

#### Método de Flavonoides totales:

Para la realización de la prueba se tiene una concentración de 1 mg/mL de estándar Quercetina, realizar diluciones para obtener concentraciones de 0.024, 0.1 y 0.2 mg/mL en fioles de 50 mL y se enrasan con etanol.

Después a cada concentración se le toma 2 mL de alícuota y se le agrega 6 mL de etanol más 0.4 mL del reactivo de tricloruro de aluminio al 2% más 0.4 mL del reactivo de acetato de sodio 1M y agua para 20 mL de volumen total. Se incuba por 30 minutos.

Para las muestras se toma una alícuota de 0.5 mL del látex de ***Croton lecheri* Müll. Arg.** y se agrega 6 mL de etanol + 0.4 mL del reactivo de tricloruro de aluminio al 2% + 0.4 mL del reactivo de acetato de sodio 1M y agua para 20 mL de volumen total. Se incuba por 30 minutos.

Para las lecturas en el espectrofotómetro UV-VIS se considera una longitud de onda de 415 nm

### 3.6.3.7 Método de difusión en agar cilindro - placa para determinar efecto antibacteriano

#### a. Obtención de la cepa bacteriana

La cepa ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** fue adquirida a través del Laboratorio GenLab.

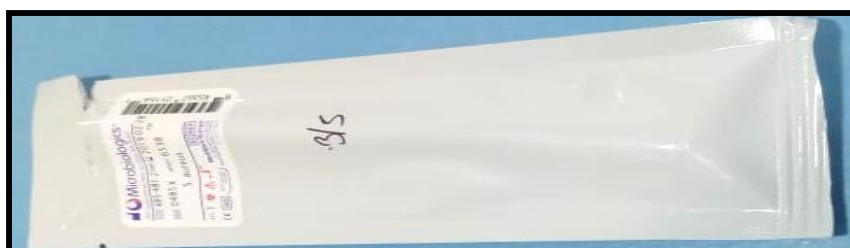


Figura N° 21. Cepa ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**

## b. Activación de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fue activada en Agar Tripticasa de Soya e incubado a 37 °C por 24 - 48 horas.

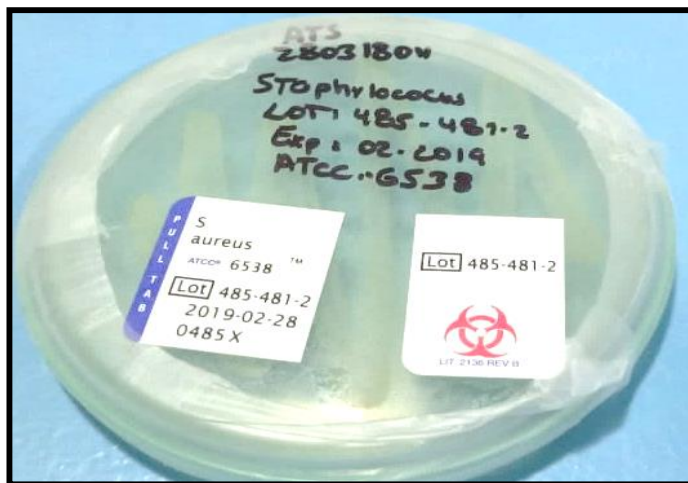


Figura N° 22. Activación de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

## c. Preparación del inóculo con el método de suspensión directa de colonias

Se aislaron colonias de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, con un asa de kolle ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) en suero fisiológico estéril al 0.9%. Agitando durante 15-20 seg. y rotar varias veces el inóculo contra la pared del tubo para eliminar el exceso de inóculo.



Figura N° 23. Preparación del inóculo

#### d. Preparación del Agar Müeller - Hinton

El Agar Mueller Hinton se preparó con agua destilada de acuerdo a las instrucciones de fábrica, ajustando el pH entre 7.2 - 7.4. Luego, se autoclavó a 121°C durante 15 minutos, se deja enfriar a 45 - 50°C. Una vez temperado se vertió el preparado en placas Petri estériles, dando un fondo uniforme de 4 mm de grosor aproximadamente, lo que equivale a 25 - 30 ml para placas de 100 mm de diámetro. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.



Figura N° 24. Preparación del Agar Müeller-Hinton

#### e. Preparación de las concentraciones del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. (sangre de grado)

La muestra del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. se lleva a diluciones con agua destilada en concentraciones de 25%, 50%, 75% y la concentración pura del látex que constituye al 100%. Dichas disoluciones son preparadas para depositar en los cilindros de cada placa Petri.

Tabla N°17. Formulación de las concentraciones del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg

Concentración %	Látex de <i>Croton lechleri</i> (mL)	Agua destilada (mL)
25%	1.25 mL	3.75 mL
50%	2.5 mL	2.5 mL
75%	3.75 mL	1.25 mL
100%	5 mL	0 mL

Elaboración: Propia

**f. Inoculación de las placas (sembrado):** se inoculó las placas de agar Müller - Hinton en su totalidad, sin dejar espacios libres, rotando la placa unos 60° con el fin de conseguir un sembrado uniforme, usando hisopos estériles a una distancia de 10cm de la llama del mechero. Dejar secar de 3- 5 min antes de introducir los discos o cilindros.



Figura N° 25. Inoculación de las placas (sembrado)

**g. Dispensación de los cilindros en las placas Petri**

- Se colocan 5 cilindros con pinzas estériles en el agar Müller-Hinton previamente inoculado con la cepa bacteriana. Debe asegurarse que contacten firmemente con el agar y tienen que estar distribuidos adecuadamente para evitar superposición de los halos de inhibición.
- Se distribuyó 100 ul de las diluciones de las concentraciones del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (sangre de grado) 25%, 50%, 75% y 100%. en cada cilindro.
- El control positivo empleado fue el antibiótico Oxacilina cuya presentación son discos de sensibilidad para antibiograma con polimixina B de 1µg de la marca L y D Insumed.
- El control negativo fue el agua destilada.

- Se repitió dicho procedimiento para un total de 10 placas, tal como se detalla en la siguiente figura N° 24
- Dejar que las diluciones difundan en el agar por 30 min.



Figura N° 26. Dispensación de los cilindros en las placas Petri

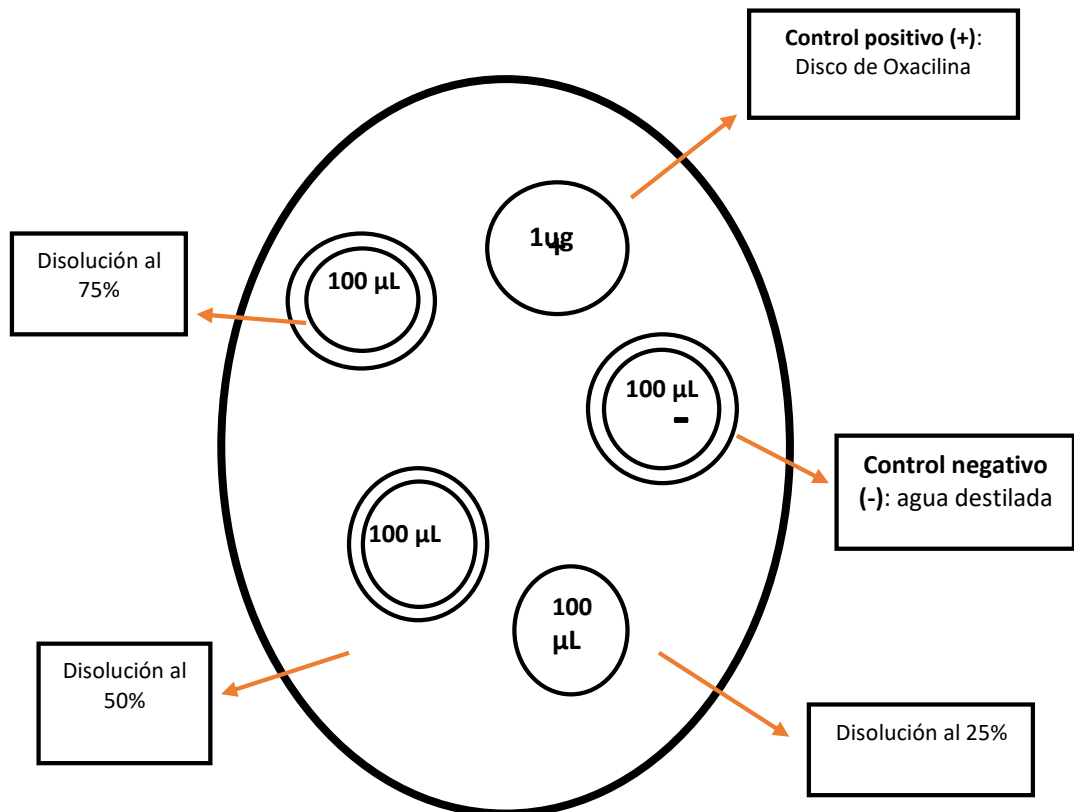


Figura N° 27. Esquema de distribución del método cilindro – placa (A)



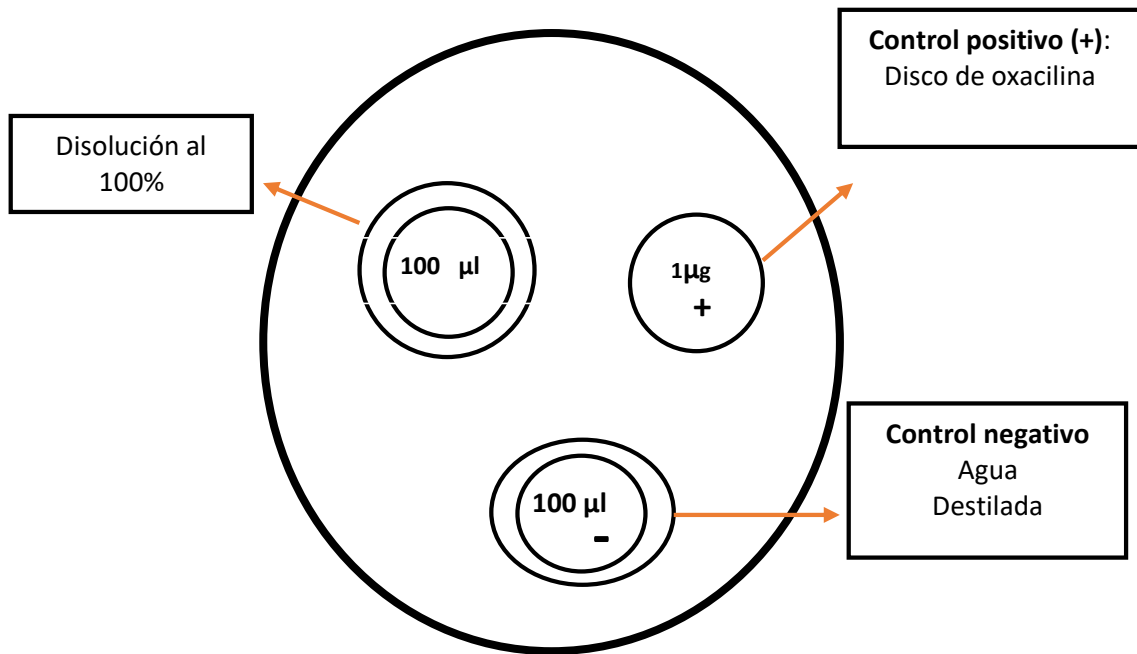


Figura N° 28. Esquema de distribución del método cilindro – placa con (B)

### h. Incubación

Se incubó las placas sin invertirlas a 37°C por 24 horas.



Figura N° 29. Incubación de placas Petri

**i. Lectura e interpretación de los resultados para determinar el efecto antibacteriano del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.**

Se midió el diámetro de los halos inhibición con vernier, incluyendo el diámetro del cilindro. La lectura se realiza al reverso de la placa y con luz transmitida para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; los cuales serán registrados en las fichas de observación (ver anexo N°12).

El tamaño de halo de inhibición indicó si el microorganismo en estudio es sensible, intermedio y resistente, categorías interpretativas para estudios in vitro validado y establecido por la NCCLS y empleado por el INS. En este sentido, para la interpretación de los resultados se tomó como modelo interpretativo la escala de Duraffourd y Lapraz (1983), tabulando cada diámetro de halo según la siguiente escala

**Nula (-):** para un diámetro inferior a 8 mm.

**Sensible (+):** para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.

**Muy sensible (++):** para un diámetro entre 14 y 20 mm.

**Sumamente sensible (+++):** para un diámetro superior a 20mm



Figura N° 30. Lectura de los diámetros de halos de inhibición.

## CAPÍTULO IV: PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS

### 4.1 Presentación de resultados

Se trabajó con 6 grupos de análisis, con 4 concentraciones del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (25%,50%,75% y 100%), control positivo (Oxacilina 1ug) y control negativo (agua destilada), con 5 repeticiones por cada grupo. Se empleó la escala de Duraffourd y Lapraz en la interpretación.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas fueron organizados mediante tablas y figuras, con la finalidad de analizar e interpretar de acuerdo a los objetivos planteados.

#### 4.1.1 Resultados de prueba de análisis organoléptico

Tabla N° 18. Resultados del análisis organoléptico del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.**

CARACTERÍSTICAS	OBSERVACIONES
Olor	Alcanforado, herbal
Color	Rojo vino
Sabor	Amargo
Textura	Viscosa, homogénea y densa

Elaboración: Propia

**Interpretación:** Los resultados de la tabla N° 18 corresponden a la prueba de análisis organoléptico del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (sangre de grado), el cual constituyo un examen de tipo cualitativo basado en la valoración por medio de los sentidos (color, olor, sabor, y tacto). Se concluye que el olor de la muestra de estudio es alcanforado y herbal; el color es rojo vino; con sabor amargo y una textura viscosa, homogénea y

densa. Según Altamirano<sup>15</sup> (2015), el sabor amargo se debe a la presencia de alcaloides y el color rojo vinoso a la presencia de antocianinas.4.1.2 Resultados de prueba de solubilidad

Tabla N° 19. Resultados de la prueba de solubilidad del látex de ***Croton lechleri Müll. Arg.***

Nº	SOLVENTES	OBSERVACIÓN
1.	Agua destilada	+++
2.	Etanol 70°	+++
3.	Éter de Dietílico	++
4.	Cloroformo	++
5.	N-butanol	++
6.	Ciclohexano	++
7.	Acetato de etilo	++

Elaboración: Propia

**Leyenda:**

- (+++): totalmente Soluble
- (++): moderadamente soluble
- (+) : ligeramente soluble
- (-) : Insoluble

**Interpretación:** Los resultados de la tabla N° 19 corresponden a la prueba de solubilidad del látex de ***Croton lechleri Müll. Arg.*** (sangre de grado), donde se observa que se emplearon solventes de distintas polaridades; obteniendo como resultado que la muestra es totalmente soluble en agua destilada y etanol 70°, moderadamente soluble en éter de dietílico, cloroformo, N-butanol, Ciclohexano y acetato de etilo.

Al respecto, Altamirano<sup>15</sup> (2015), en su investigación “Evaluación de la Actividad antioxidante de cuatro especies del género ***Croton***. Sostiene que el látex de ***Croton lechleri Müll. Arg.*** es soluble en agua por la presencia de glucósidos, cadenas de ácidos carboxílicos (R-COOH) y compuestos fenólicos.

### 4.1.3 Resultados de marcha fotoquímica

Tabla N° 20. Resultados de la Marcha fitoquímica del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.

Nº	METABOLITO	ENSAYO	REACCIÓN POSITIVA	RESULTADO
1	<b>CARBOHIDRATOS</b>	Molish	Anillo violeta en la interfase	++
2	<b>COMPUESTOS FENÓLICOS</b>	FeCl <sub>3</sub>	Coloración verde – azulado	+++
3	<b>TANINOS</b>	Gelatina	Precipitado denso blanco	++
4	<b>FLAVONOIDES</b>	Shinoda	Coloración rojo magenta	+++
5	<b>ANTOCIANINAS Y CATEQUINAS</b>	Rosenheim	Coloración rojo oscuro	+++
6	<b>AMINOÁCIDOS</b>	Ninhidrina	Coloración violácea	++
7	<b>ALCALOIDES</b>	Dragendorff	Coloración rojo ladrillo	++
		Mayer	Precipitado blanco	++
8	<b>QUINONAS</b>	Borntrager	Coloración roja	-
9	<b>TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES</b>	Lieberman - Burchard	Esteroides: verde – azul	++
10	<b>SAPONINAS</b>	Generación de espuma	Formación de 0.5 a 1cm de espuma estable por 15 min.	+++
11	<b>GLUCÓSIDOS</b>	Baljet	Coloración anaranjada	++
12	<b>POLIFENOLES</b>	vainillina clorhídrica	Coloración azul	+++
13	<b>IRIDOIDES</b>	Vainillina - HCl	Rojo grosella	+++

**Legenda:**

(-): La coloración o precipitado no se evidencia.

(+): La coloración o precipitado es leve.

(++): La coloración o precipitado es moderada.

(+++): La coloración o precipitado es total.

#### 4.1.4 Resultados de la cromatografía en capa fina

Tabla N° 21. Resultados de la CCF del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.

METABOLITOS SECUNDARIOS	FASE MÓVIL	RESULTADO
Flavonoides	BAW 1- butanol: ácido acético: agua destilada (4:1:5)	Manchas amarillas.
Alcaloides	Metanol: agua (25:75)	Manchas de color rojo a anaranjado intenso

Elaboración: Propia

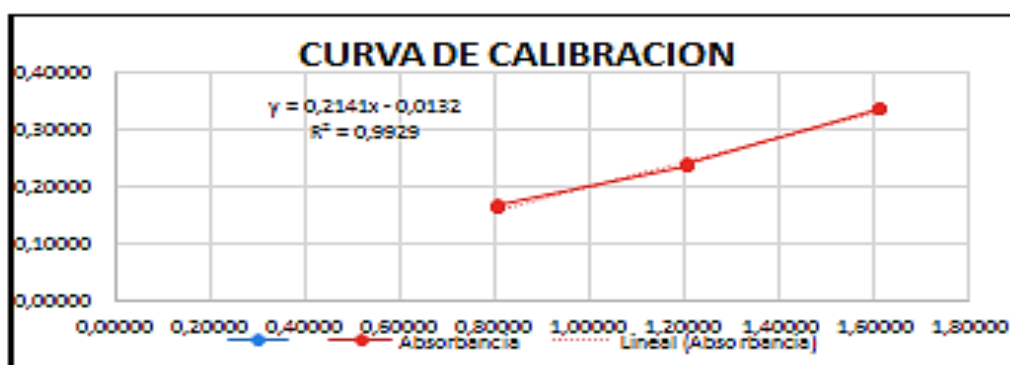


Figura N° 31. Cromatografía en capa fina del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.

**4.1.5 Resultado de la espectrofotometría en el UV-VIS para la cuantificación de polifenoles totales**

**Estándar** : **ÁCIDO GÁLICO**  
**Equipo** : Espectrofotómetro UV-VIS  
**Longitud de onda** : 765 nm  
**Potencia** : 100% T/C  
**Peso** : 50,3 mg  
**Volumen enrase** : 50 mL

mg/mL	Factor de corrección	(mg/mL) Corregido	Absorbancia
0,80480	1	0,80480	0,16087
0,80480	1	0,80480	0,16340
0,80480	1	0,80480	0,16517
1,20720	1	1,20720	0,23530
1,20720	1	1,20720	0,23727
1,20720	1	1,20720	0,23902
1,60960	1	1,60960	0,33320
1,60960	1	1,60960	0,33583
1,60960	1	1,60960	0,33722



MUESTRA	ABSORBANCIA		
MUESTRA A1	0,63033	0,63954	0,64703

MUESTRA	mg/ mL			RSD
MUESTRA	576,6589	585,2642	592,2625	1,3366

**REULTADOS:** 584.73 mg de Ácido galico/ mL de Latex

**ESPECIFICACIONES/ OBSERVACIONES:** Los Polifenoles se expresan en mg equivalentes de Ácido galico /mL de látex

Figura N° 32. Resultado de la espectrofotometría en Uv-Vis de la cuantificación de Polifenoles totales

#### 4.1.6 Resultados de la cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría en el UV-VIS

**Estándar** : **QUERCITINA**  
**Equipo** : Espectrofotómetro UV-VIS  
**Longitud de onda** : 415 nm  
**Potencia** : 100% T/C  
**Peso** : 50,1 mg  
**Volumen enrase** : 50 mL

mg/mL	Factor de corrección	(mg/mL) Corregido	Absorbancia
0,02405	1	0,02405	0,11029
0,02405	1	0,02405	0,11199
0,02405	1	0,02405	0,11181
0,10020	1	0,10020	0,55026
0,10020	1	0,10020	0,54999
0,10020	1	0,10020	0,55158
0,20040	1	0,20040	1,11700
0,20040	1	0,20040	1,11680
0,20040	1	0,20040	1,11680



MUESTRA	ABSORBANCIA		
MUESTRA A1	1,44660	1,44230	1,45300

MUESTRA	mg/ mL			RSD
MUESTRA	24,9656	24,8901	25,0779	0,3782

**RESULTADOS:** 24.98 mg de Quercitina/ mL de látex de *Croton lechleri* Müll.Arg

**ESPECIFICACIONES/ OBSERVACIONES:** Los Flavonoides Totales se expresan en mg equivalentes de Quercitina /mL de extracto

Figura N° 33. Resultados de la cuantificación en Uv-Vis de Flavonoides totales por espectrofotometría



#### 4.1.7 Determinación del efecto antibacteriano por el método difusión en agar cilindro – placa

Para determinar el efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg (sangre de grado) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; fue identificado a través de la medida del diámetro de los halos de inhibición en los 6 grupos de análisis: concentraciones al 25%, 50%, 75%, 100%, control (+) Oxacilina y control (-) agua destilada, con 5 ensayos (repeticiones) por cada grupo e interpretados según la escala Duraffourd y Lapraz.

Tabla N° 22. Escala interpretativa Duraffourd y Lapraz (1983)

Escala	Diámetros de halos de inhibición
Nula (-)	Inferior a 8 mm
Sensible (+)	Entre 8 a 14 mm
Muy sensible (++)	Entre 14 y 20 mm
Sumamente sensible (+++)	Superior a 20 mm

Fuente: Duraffourd y Lapraz (1983)

Tabla N° 23. Resultados de la lectura de los halos de inhibición en mm en 100 µL

Nº DE ENSAYOS	Concentración (%) látex de <i>Croton lechleri</i> 100 µl				Control (+) Oxacilina 1 µg	Control (-) Agua destilada
	LONGITUD DEL HALO DE INHIBICION (mm)					
	25%	50%	75%	100%	1 µg	100 µl
1	19	22	25	28	35	0
2	12	17	28	32	38	0
3	15	23	24	28	31	0
4	10	14	23	29	34	0
5	15	24	25	28	40	0
<b>Promedio</b>	<b>14</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>29</b>	<b>36</b>	<b>0</b>

Elaboración: Propia

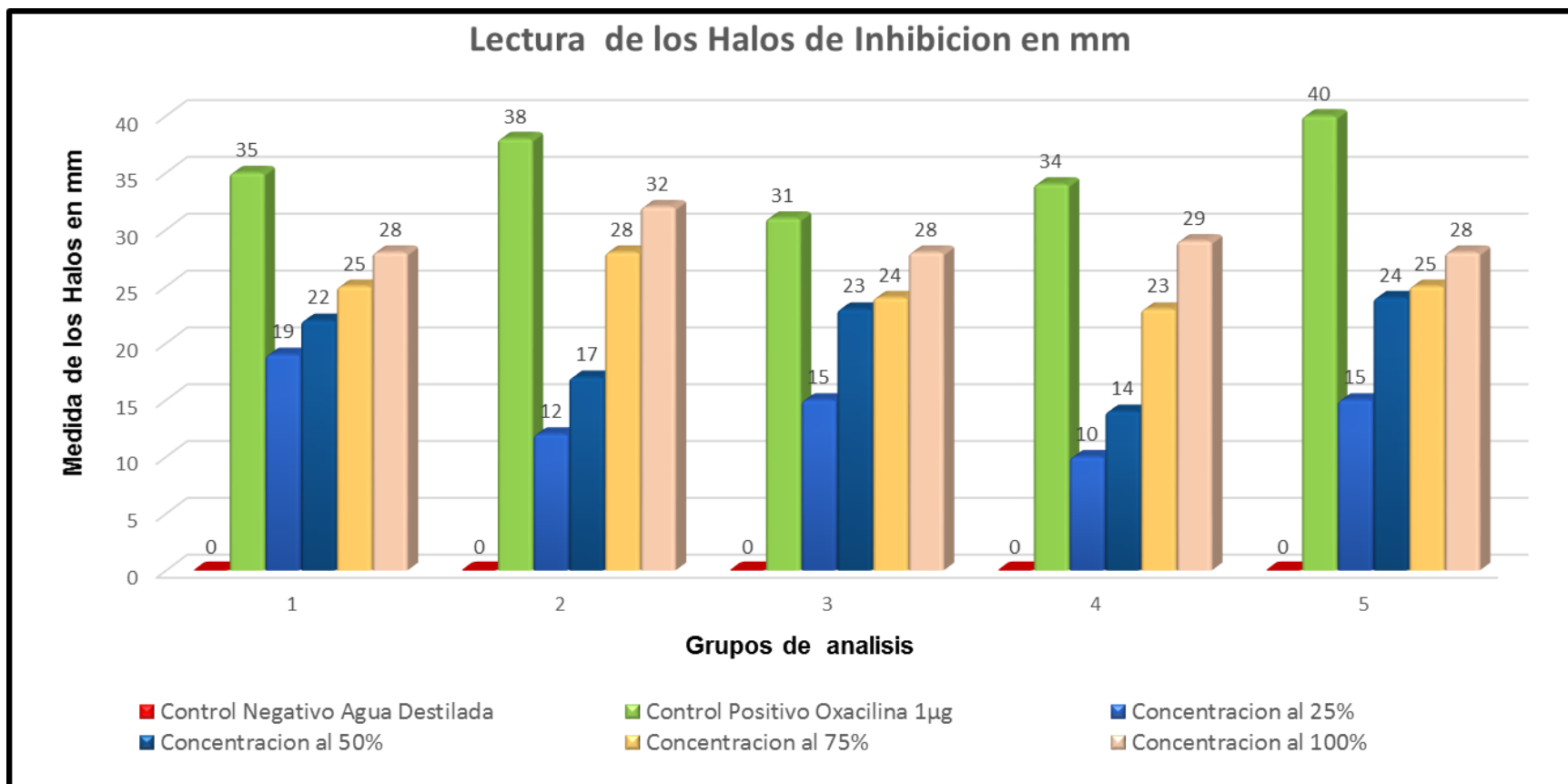


Figura Nª 34. Resultados de la lectura de lo halos de inhibición en mm por el método de difusión en agar cilindro-placa en 100 µL

**Interpretación:** En la tabla N°23 y la figura N° 34 se observan los resultados de la lectura de los halos de inhibición en mm por el método de difusión en agar cilindro - placa en 100 µl, de los 6 grupos de análisis; cada grupo con 5 ensayos (repeticiones). Dichos resultados se obtuvieron después de las 24 horas de incubación a 37°C; los cuales fueron promediados por cada grupo de análisis.

## 4.2 Contrastación de hipótesis

Para contrastar las hipótesis de investigación se sistematizaron y procesaron los resultados en función a pruebas estadísticas. Durante el proceso de experimentación se trabajó con 6 grupos de análisis: concentraciones del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg** al 25%,50%,75% y 100%; control positivo (oxacilina 1ug) y control negativo (agua destilada), con 5 ensayos (repeticiones) por cada grupo, interpretados según la escala de Duraffourd y Lapraz.

El diseño estadístico que se empleó es el análisis de variancia (ANOVA) que permitió determinar que si hay diferencias estadísticas significativas entre los promedios de los halos de inhibición del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg** en los todos los grupos de análisis, con un nivel de confianza ( $p < 0.05$ ).

La prueba HSD de TUKEY permitió comparar las diferencias entre los grupos de análisis en base a los promedios del diámetro de los halos de inhibición obtenidos en el experimento.

También se emplearon las pruebas estadísticas de normalidad: T de una muestra y Wilcoxon para comparar el efecto antibacteriano entre el grupo control y las concentraciones del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg** (sangre de grado)

### 4.2.1 Contrastación de hipótesis general

**H<sub>1</sub>**: El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg** (Sangre de grado) tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a ***Staphylococcus aureus***.

**H<sub>0</sub>**: El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg** (Sangre de grado) NO tiene efecto antibacteriano *in vitro* frente a ***Staphylococcus aureus***.

La comprobación de la hipótesis general gira en función de las contrastaciones de las hipótesis específicas planteadas en el estudio, por

tanto, debido a la complejidad de las variables de medición se procede a subdividir en hipótesis específicas.

#### 4.2.1.1 Contrastación de la hipótesis específica 1

**H<sub>1</sub>:** El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) posee algunos constituyentes químicos relacionados con el efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus***.

**H<sub>0</sub>:** El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado) no posee algunos constituyentes químicos relacionados con el efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus***.

Para la contratación de la hipótesis se realizó la marcha fitoquímica, cromatografía en capa fina y la espectrofotometría uv-vis, con el fin de identificar la presencia de los metabolitos del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (sangre de grado).

Los resultados expuestos en la tabla N° 20 corresponden a la marcha fitoquímica del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg** (sangre de grado) que indican que la muestra presenta una reacción positiva en su totalidad (+++) para compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas, catequinas, saponinas, polifenoles e iridoideas. Por otro lado, la muestra presenta una reacción positiva moderada (++) para: carbohidratos, alcaloides, taninos, aminoácidos, triterpenos, esteroides y glucósidos.

Del mismo modo, la cromatografía en capa fina permitió separar los componentes del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (Sangre de grado), dilucidándose varios constituyentes químicos; entre ellos, flavonoides y alcaloides, especificada en tabla N° 21.

A nivel cuantitativo, mediante la espectrofotometría uv-vis para polifenoles totales se empleó como patrón disoluciones de ácido gálico con la técnica de Folin-Ciocalteu, observada a 765 nm obteniéndose 584,73 mg de Acido gálico/mL en el látex ***Croton***

**lechleri Müll. Arg.** También, se determinó la presencia de flavonoides, se empleó como estándar quercetina, observada a 415 nm, obteniéndose 24.98 mg de Quercitina/ mL en el látex **Croton lechleri Müll. Arg.** (Ver anexo N° 09)

Los metabolitos identificados con mayor intensidad, entre ellos, compuestos fenólicos, antocianinas, catequinas, flavonoides, saponinas, polifenoles e iridoides, estarían relacionados con el efecto antibacteriano del látex de **Croton lechleri Müll. Arg.** (sangre de grado) tal como lo indica la literatura revisada. Por tanto, se acepta la H<sub>1</sub>.

#### 4.2.1.2 Contrastación de la hipótesis específica 2

H<sub>1</sub>: **Staphylococcus aureus** es sensible a concentraciones de 25%,50%,75% y 100% del látex de **Croton lechleri Müll. Arg** (Sangre de grado).

H<sub>0</sub>: **Staphylococcus aureus** no es sensible a concentraciones de 25%,50%,75% y 100% del látex de **Croton lechleri Müll. Arg** (Sangre de grado).

Para la contratación de la hipótesis planteada se utilizaron las pruebas estadísticas ANOVA y DHS de TUKEY con el fin de establecer diferencias entre los grupos de análisis, así mismo, realizar comparaciones múltiples, en función a los promedios de los diámetros de halos de inhibición, determinando la sensibilidad de **Staphylococcus aureus** ATCC 6538.

Tabla N° 24. Efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg frente a *S. aureus* ATCC 6538, en función a los diámetros de halos de inhibición (promedios)

<b>Análisis de varianza de un factor (ANOVA)</b>						
	<b>GRUPOS</b>	<b>N° Ensayos</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Variancia</b>
1	<b>25%</b>	5	71	14	3.4	11.6
2	<b>50%</b>	5	100	20	4.3	18.5
3	<b>75%</b>	5	125	25	1.87	3.5
4	<b>100%</b>	5	145	29	1.73	3
5	<b>Control (+) Oxacilina</b>	5	178	36	3.51	12.3
6	<b>Control (-) Agua destilada</b>	5	0	0	0	0

Elaboración: Propia

#### **Prueba de hipótesis estadística:**

**H<sub>0</sub>**= Todos los grupos de análisis presentan igual diámetro de los halos de inhibición ( $p > 0.05$ ).

**H<sub>1</sub>**= Todos o al menos uno de los grupos de análisis presentan diferentes diámetros de los halos de inhibición ( $p < 0.05$ ).

Tabla N° 25. Análisis de varianza

<b>Origen de variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de cuadrados</b>	<b>F experimental</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Valor crítico para F</b>
<b>Entre grupos</b>	3902.977	5	780.59	95.58	4.84E-15	2.62
<b>Dentro de los grupos</b>	196	24	8.17			
<b>Total</b>	4098.97	29				

Elaboración: Propia

**Criterio de aceptación:** como el nivel de significancia empleado es 0.05 y  $p$  (probabilidad) hallado es menor; asimismo y  $F_{\text{experimental}} > F_{\text{crítico}}$ , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna; por tanto, estadísticamente existe diferencias significativas en todos los grupos de análisis.

Tabla N° 26. Prueba DHS de TUKEY

HSD : 5.33  
 Multiplicador : 4.17  
 Mse : 8.17  
 N° : 5

GRUPOS de Tto.	Subconjunto para alfa = 0.05					
	Control Negativo	Tto. 25%	Tto. 50%	Tto. 75%	Tto. 100%	Oxacilina 1 µg
Control Negativo		14	20	25	29	36
Tto. 25%			8	11	15	21
Tto. 50%				5	9	16
Tto. 75%					4	11
Tto. 100%						7
Oxacilina 1 µg						

Elaboración: Propia

**Criterio de aceptación:** valores mayores al HSD, son los que hacen la diferencia, los grupos de análisis comparados con el control negativo presentan efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

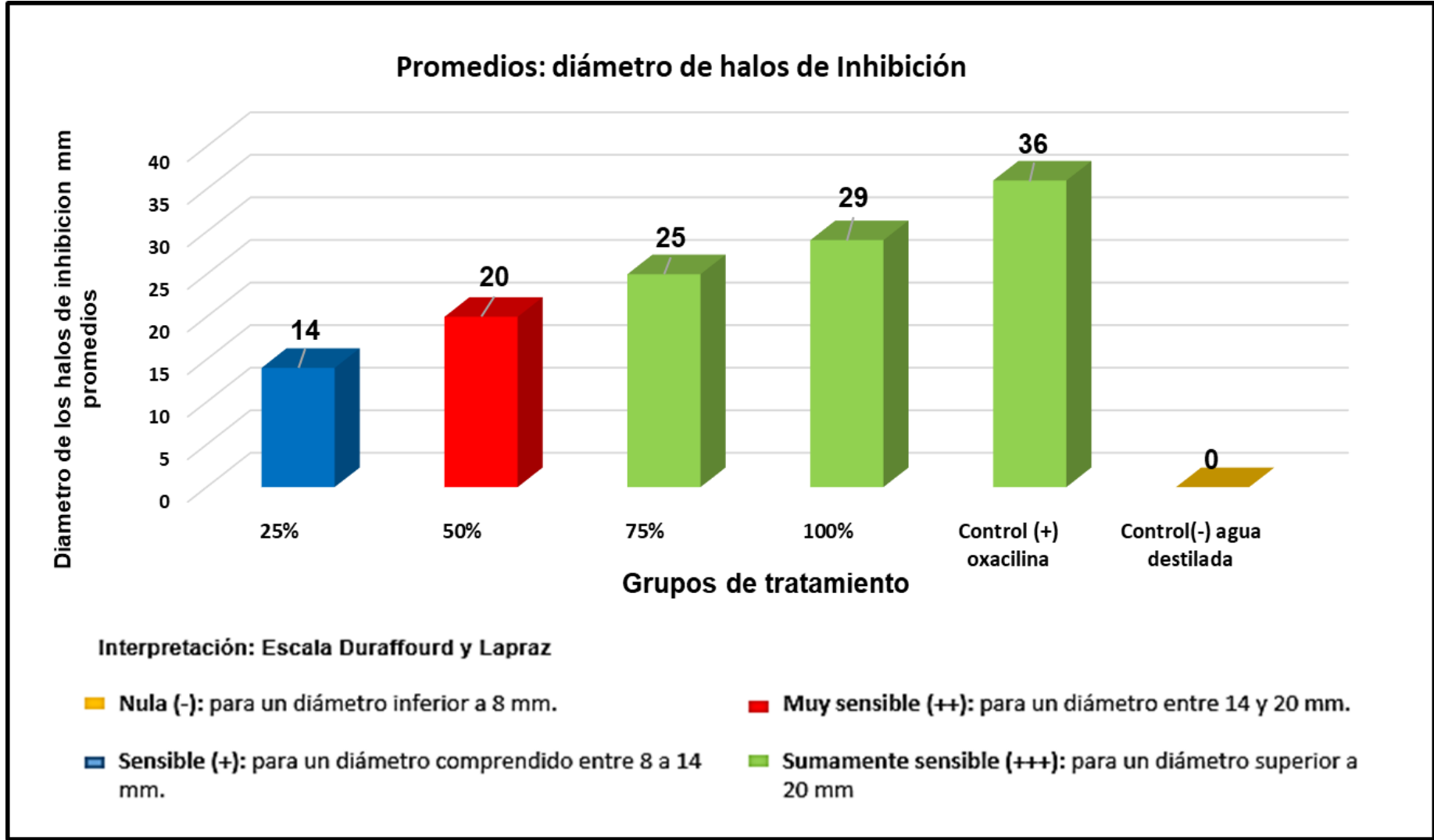


Figura N° 35. Efecto antibacteriano del látex *Croton lechleri* Müll. Arg. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, en función a los diámetros de halos de inhibición (promedios)



En la tabla N° 24 y figura N° 35 se detallan los resultados de la medida del diámetro de los halos de inhibición promediados de los 6 grupos de análisis, a partir de los 5 ensayos realizados; los cuales fueron interpretados según la escala Duraffourd y Lapraz. Los resultados expuestos a continuación permitieron determinar el efecto antibacteriano del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg** frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**.

En el grupo 1, concentración al 25% del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg.**, el diámetro de los halos de inhibición (promedio) fue de 14 mm; ubicándose en la escala como sensible (+), es decir, el ***Staphylococcus aureus*** presenta sensibilidad a dicha concentración como tratamiento.

En el grupo 2, concentración al 50% del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg.**, el diámetro de los halos de inhibición (promedio) es de 20 mm, identificándose en la escala como muy sensible (++), es decir, el ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** es muy sensible a dicha concentración como tratamiento.

En los grupos 3 y 4, concentraciones al 75 % y 100 % del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg.** y el grupo 5, Control positivo (+) Oxacilina presentan diámetros de halos de inhibición (promedios) de 25 mm, 29mm y 36 mm; ubicándose en la escala como sumamente sensible (+++); lo que significa que el ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** es sumamente sensible a dicha concentración como tratamiento. En cambio, en el grupo 6, control negativo (agua destilada), se ubica en la escala nula por no presentar halos de inhibición.

Para este análisis se empleó la prueba estadística análisis de varianza (ANOVA) que establece que hay diferencias estadísticas altamente significativas entre los grupos de estudio con un 95% de confianza; lo que dio lugar a aceptar la hipótesis alterna: todos o al menos uno de los grupos de análisis presentan diferentes diámetros de los halos de inhibición ( $p < 0.05$ ). Por lo tanto; estos resultados permiten corroborar la hipótesis específica y concluir que el ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538 es sensible frente a las concentraciones de 25%,50%,75%,100% látex de ***Croton lechleri*** Müll. Arg., según identificación en la escala Duraffourd y Lapraz.

Por otro lado, se empleó la prueba de DHS de Tukey para comparar las diferencias entre los promedios de los grupos de tratamiento; lo que paralelamente permitió inferir que, al aumentar las concentraciones de tratamiento, mayor es el efecto del látex ***Croton lechleri*** Müll. Arg. frente a ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538, evidenciado por el incremento de la medida de los halos de inhibición, según la escala de Duraffourd y Lapraz.

#### 4.2.1.3 Contrastación de la hipótesis específica 3

**H<sub>1</sub>**: el látex de ***Croton lechleri*** Müll. Arg. (Sangre de grado) presenta efecto antibacteriano comparado con Oxacilina frente a ***Staphylococcus aureus***.

**H<sub>0</sub>**: el látex de ***Croton lechleri*** Müll. Arg. (Sangre de grado) no presenta efecto antibacteriano comparado con Oxacilina frente a ***Staphylococcus aureus***

**Prueba de normalidad para la comparación entre el grupo control positivo (Oxacilina) y las concentraciones del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.**

**Prueba de hipótesis estadística:**

**H<sub>0</sub>:** los resultados de repetitividad si presentan distribución normal

**H<sub>1</sub>:** los resultados de repetitividad no presentan distribución normal

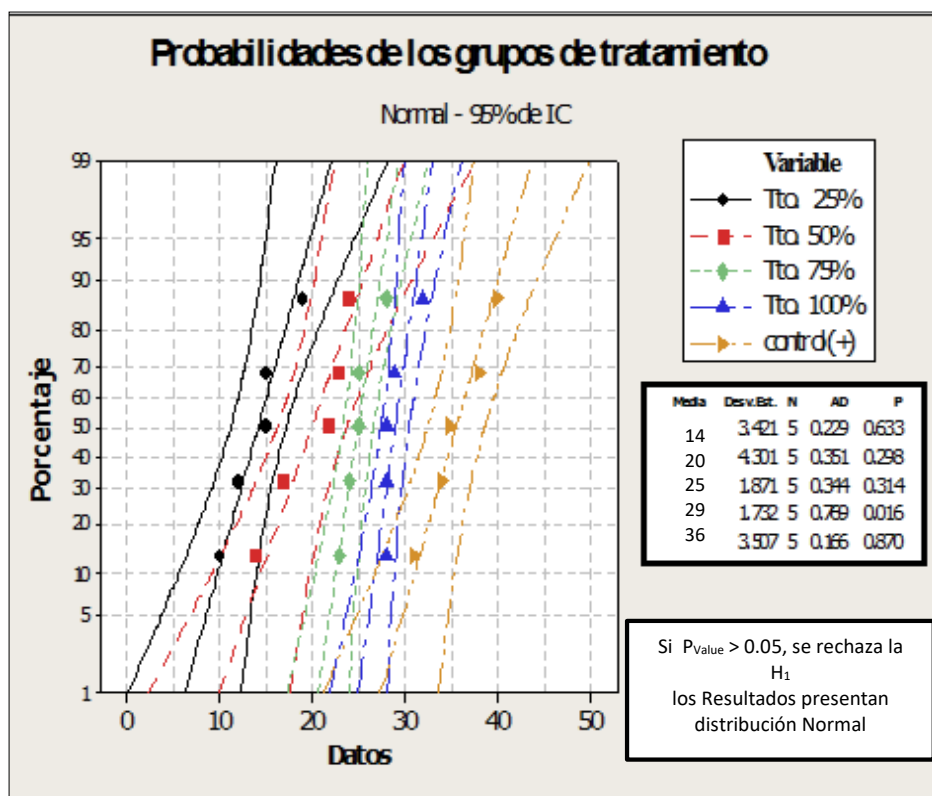


Figura N° 36. Resultados de la prueba de normalidad según estadístico Anderson Darling

**Criterio de aceptación:** Si  $P_{\text{Value}} > 0.05$ , se rechaza la  $H_1$

Demostrando que los resultados presentan distribución Normal.

Interpretación: Como  $P_{\text{Value}} > 0.05$ , se acepta la  $H_0$ .

- Los Resultados presentan distribución Normal para los tratamientos de 25%, 50% ,75% y oxacilina.
- Los Resultados presentan distribución NO Normal para el tratamiento de 100%

**a) Prueba estadística: T de una muestra Tto. 25%,50%,75% y control (+) para datos con distribución normal**

**Prueba de hipótesis estadística:**

**H<sub>0</sub>:** los resultados obtenidos son iguales a 14 mm de los halos de inhibición en la placa.

**H<sub>1</sub>:** los resultados obtenidos son mayores a 14 mm de halos de inhibición en la placa.

Tabla N° 27. T de una muestra: Tto. 25% 50% 75% y control (+) Oxacilina

<b>Prueba de <math>\mu = 14</math> vs. <math>&gt; 14</math></b>							
Variable	N	Media	Desviación Estándar	$\bar{x}$ error estándar	Límite superior 95 %	t	p
<b>Tto. 25%</b>	5	14	3.42	1.53	10.94	0.13	0.451
<b>Tto. 50%</b>	5	20	4.30	1.92	15.90	3.12	0.018
<b>Tto. 75%</b>	5	25	1.871	0.837	23.216	13.15	0.000
<b>Control (+)</b>	5	36	3.51	1.57	32.26	13.77	0.000

Elaboración: propia

**Criterio de Aceptación:**

Si  $P_{\text{value}} < 0.05$ , se acepta la  $H_1$ , demostrando que los resultados son mayores al 14 mm de halo de inhibición en la placa

Tomando como parámetro la escala Duraffourd y la tabla de antibióticos y parámetros críticos de *Staphylococcus aureus* del INS, estipulan que hay sensibilidad del microorganismo cuando los halos de inhibición son mayores a 14 mm

Como  $P_{\text{value}} < 0.05$ , se acepta la  $H_1$ , demostrando que los resultados son mayores a 14 mm de halo de Inhibición en la placa para los tratamientos de 50%, 75% y el control positivo (oxacilina 1  $\mu\text{g}$ ), lo que significa que estos grupos de tratamiento presentan efecto antibacteriano muy sensible y sumamente sensible según la escala Duraffourd y según la tabla N° 08 de antibióticos y diámetros críticos de *Staphylococcus aureus spp* del INS.

#### b) Prueba de Wilcoxon para datos con distribución no normal

##### Prueba de hipótesis estadística:

$H_0$ : los resultados obtenidos son iguales a 14 mm de los halos de inhibición en la placa.

$H_1$ : los resultados obtenidos son mayores a 14 mm de halos de inhibición en la placa.

Tabla N°28. Prueba de clasificación con signo de Wilcoxon: Tto. 100%

<b>Prueba de la mediana = 14.00 vs. La mediana &gt; 14.00</b>					
<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>N° de prueba</b>	<b>Estadística de Wilcoxon</b>	<b>p</b>	<b>Mediana estimada</b>
<b>Tto. 100%</b>	5	5	15.0	0.030	28.50

Elaboración: propia

##### Criterio de Aceptación:

Si  $P_{\text{value}} < 0.05$ , se acepta la  $H_1$ , demostrando que los resultados son mayores al 14 mm de halo de inhibición en la placa

Tomando como parámetro la escala Duraffourd (tabla N° 22) y la tabla N° 08 de antibióticos y parámetros críticos de ***Staphylococcus spp.*** del Instituto Nacional de Salud; establecen que hay sensibilidad del microorganismo cuando los halos de inhibición son mayores a 14 mm.

Si  $P \text{ value} < 0.05$ , se acepta la  $H_1$ , demostrando que los resultados son mayores al 14 mm de halo de inhibición en la placa para el grupo de tratamiento de 100% por presentar distribución no normal, que significa que este tratamiento presenta efecto antibacteriano sumamente sensible según la escala Duraffourd y según la tabla N° 08 de antibióticos y diámetros críticos de ***Staphylococcus aureus*** del INS. Estadísticamente estos resultados permiten concluir que en base a los  $P \text{ value}$ , el tratamiento al 100% es una concentración adecuada que presenta un efecto antibacteriano sumamente sensible, por presentar el mayor diámetro de inhibición comparado con las otras concentraciones empleadas en el estudio.

Tabla N° 29. Efecto antibacteriano del látex ***Croton lechleri*** Müll. Arg frente ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538, según porcentaje de inhibición

Concentraciones del látex <i>Croton lechleri</i>	$\bar{X}$ de los halos de inhibición	$\bar{X}$ de los halos de inhibición (c.+ )	Porcentaje %
25%	14	36	39
50%	20	36	56
75%	25	36	69
100%	29	36	81

Elaboración: propia

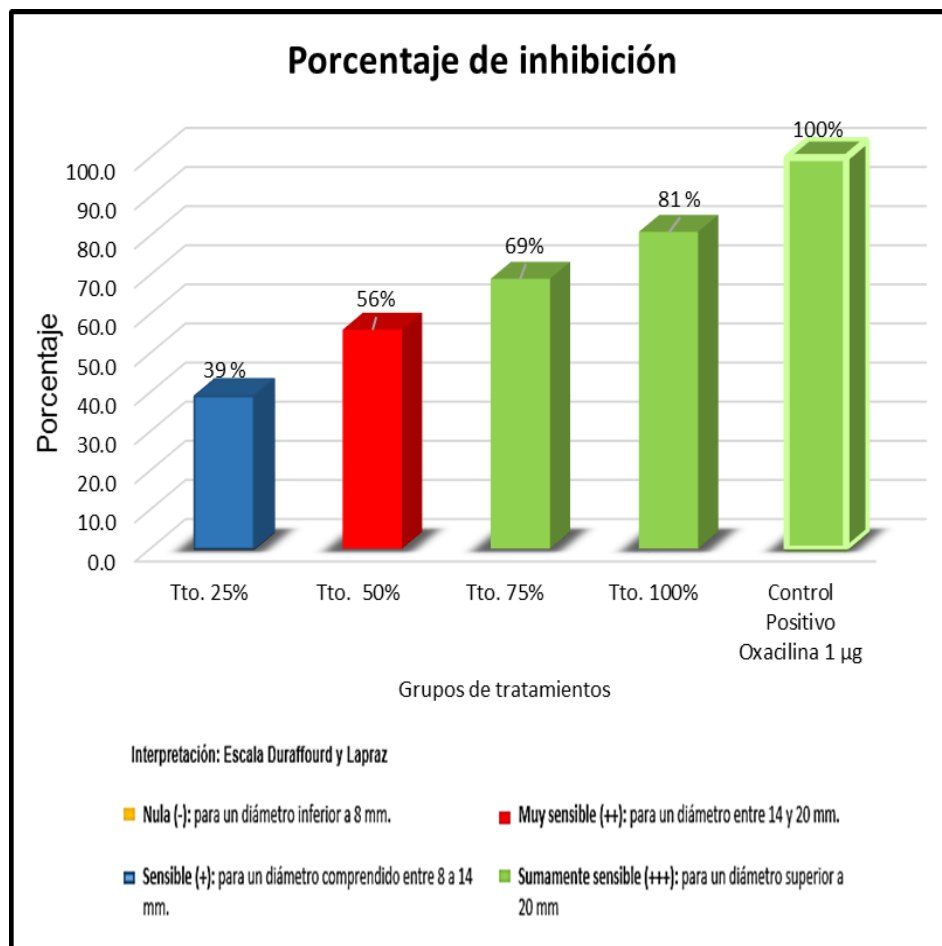


Figura N° 37. Efecto antibacteriano del látex *Croton lechleri* Müll. Arg. frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, según porcentaje de inhibición

Los resultados fueron interpretados según la escala de Duraffourd y Lapraz, escala utilizada para determinar el efecto antibacteriano in vitro según diámetros de inhibición de los halos en las placas.

- **Nula (-)**: para un diámetro inferior a 8 mm.
- **sensible (+)**: para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- **muy sensible (++)**: para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- **Sumamente sensible (+++)**: para un diámetro superior a 20 mm.

En este entender; en la tabla N° 29 y figura N° 37 se muestran los resultados del efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, según porcentajes de inhibición; los cuales fueron establecidos en base a los halos de inhibición promediados de las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% de la muestra de estudio, se determina:

El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (sangre de grado) a una concentración de 25% presenta efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** en un 39% por generar sensibilidad al microorganismo ubicándose en la escala Duraffourd y Lapraz como sensible.

El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (sangre de grado) a una concentración de 50% presenta efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** en un 56% por generar sensibilidad al microorganismo ubicándose en la escala Duraffourd y Lapraz como muy sensible.

El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (sangre de grado) a una concentración de 75% presenta efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** en un 69% por generar sensibilidad al microorganismo ubicándose en la escala Duraffourd y Lapraz como sumamente sensible.

El látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** (sangre de grado) a una concentración de 100% presenta efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** en un 81% por generar sensibilidad al microorganismo ubicándose en la escala Duraffourd y Lapraz como Sumamente sensible.

El grupo control positivo (Oxacilina 1 µg) presenta efecto antibacteriano frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** en un 100% por generar sensibilidad al microorganismo ubicándose en la escala Duraffourd y Lapraz como Sumamente sensible, tomando el parámetro comparativo para determinar el efecto de inhibición.



### 4.3 Discusión de resultados

La marcha fitoquímica permitió identificar algunos constituyentes químicos en el látex de ***Croton lechleri Müll. Arg.*** como: carbohidratos, compuestos fenólicos, antocianinas, catequinas, flavonoides, saponinas, polifenoles, iridoides, alcaloides, triterpenoides, esteroides, aminoácidos y taninos.

Al realizar la espectrofotometría uv-vis se determinó la presencia polifenoles totales, se empleó como patrón disoluciones de ácido gálico con la técnica de Folin-Ciocalteu, observada a 765 nm obteniéndose 584,73 mg de Acido gálico/mL en el látex ***Croton lechleri Müll. Arg.*** Asimismo, se determinó la presencia de flavonoides totales empleando como patrón Quercitina, observada a 415 nm, obteniéndose 24.98 mg de Quercitina/ mL en el látex ***Croton lechleri Müll. Arg***

Al respecto, Arbildo<sup>22</sup> (2014) en la investigación referente al rendimiento de taspina aislada de dos muestras de ***Croton lechleri Müll. Arg***, sustenta que el látex contiene proantocianinas y alcaloides mayoritariamente. Del mismo modo, Artemio<sup>24</sup> (2008), en la Fitofarmacopea peruana-2006, menciona que contiene constituyentes químicos como: alcaloides, polifenoles, lignanos, diterpenos esteroides. Altamirano<sup>15</sup> (2015), demuestra que al realizar la investigación fitoquímica y cromatográfica identifica la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y que la actividad antibacteriana se debe a la presencia de estos metabolitos.

En la determinación del efecto antibacteriano del látex de ***Croton lechleri Müll. Arg.*** (Sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus*** se aplicó el método de difusión en agar cilindro - placa, estandarizado por el Sub Comité de ensayos de susceptibilidad (NCCLS) de los Estados Unidos y basado en la técnica de difusión en disco de Kirby-Bahuer y reconocido como método para evaluar la potencia de antibióticos en la USP 41, en su apartado de pruebas biológicas (antibióticos valoraciones microbiológicas).<sup>47</sup>

Al respecto, Muñoz (2006)<sup>52</sup> en la investigación “Validación del método microbiológico cilindro-placa para la potencia del antibiótico Lincomicina clorhidrato”, indica que éste método es el más empleado, por su exactitud y sensibilidad, validado por la USP. Asimismo, Corrales *et al*<sup>17</sup> (2013), sostiene que es importante elegir la técnica y metodología al realizar investigaciones que tengan como propósito evaluar la actividad antibacteriana de extractos vegetales, porque dependiendo de la técnica elegida hay variaciones en los resultados, su sensibilidad y reproducibilidad; corroborado al realizar su investigación titulada “Evaluación del potencial antibacteriano *in vitro* de ***Croton lechleri*** frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas”, donde aplicó tres métodos: difusión en pozo, difusión en disco y dilución en agar. Cuyos resultados reafirman que la técnica de difusión en pozo permitió mejor sensibilidad y reproducibilidad, a diferencia del método de difusión en disco.

Ramírez y Marín<sup>56</sup> (2009), describen las metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal, recomiendan aplicar el método de cilindro – placa, por las ventajas en los resultados, puesto que permite la mejor difusión con amplitud de la muestra vegetal para la inhibición bacteriana y fundamenta que la técnica de difusión en disco tiene desventajas, la que está relacionada con la composición del papel filtro Whatman el cual contiene celulosa (uniones  $\beta$ -(1-4) de monómeros de glucosa), que al poseer muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, hacen que la superficie del disco sea hidrofílica, los cuales interaccionan directamente con compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de éstos en el agar; este es el fundamento que podría avalar la alta sensibilidad detectada del método del cilindro y/o pozo en el estudio realizado.

Respecto a la determinación del efecto antibacteriano, se trabajó con seis grupos de análisis: concentraciones del látex al 25%, 50%, 75%, 100%, control negativo (agua destilada) y control positivo (Oxacilina), con 5 ensayos (repeticiones) por grupo. El análisis estadístico permitió determinar que existen

diferencias altamente significativas entre los grupos de análisis con un 95 % de confianza ( $p < 0.05$ ) y permiten concluir que el ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538 es sensible frente a las concentraciones de 25%,50%,75%,100% del látex de ***Croton lechleri*** Müll. Arg.

Al emplear la prueba de DHS de Tukey permitió establecer comparaciones entre los grupos de análisis y concluir que, al incrementar las concentraciones de tratamiento, mayor es el efecto antibacteriano del látex de ***Croton lechleri*** Müll. Arg. (Sangre de grado) frente a ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538.

También se aplicó la prueba de normalidad con la finalidad de comparar el efecto antibacteriano entre el grupo control positivo (Oxacilina) y las cuatro concentraciones del látex de ***Croton lechleri*** Müll. Arg. frente a ***Staphylococcus aureus***, tomando como parámetros la tabla de antibióticos y parámetros críticos de ***Staphylococcus aureus spp*** del Instituto Nacional de Salud y la escala Duraffourd y Lapraz, que establecen que hay sensibilidad del microorganismo cuando los halos de inhibición son mayores a 14 mm. Los resultados del análisis estadístico demuestran que ***Staphylococcus aureus*** es muy y sumamente sensible a las cc. de 50%,75%,100% y el control positivo (Oxacilina) del látex de ***Croton lechleri*** Müll. Arg. Asimismo, se concluye que, comparando el efecto antibacteriano en función al diámetro de los halos de inhibición, la concentración con mayor efecto antibacteriano es la de 100%, por presentar el mayor diámetro de inhibición comparado con las otras concentraciones empleadas en el estudio y ser la más cercana a oxacilina (control +).

Finalmente, se determinó el porcentaje de inhibición de las concentraciones del látex de ***Croton lechleri*** Müll. Arg. frente a ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538, donde la concentración al 25% presenta efecto antibacteriano de tipo sensible en un 39%; la concentración al 50% presenta un efecto antibacteriano muy sensible en un 56%; la concentración al 75% presenta efecto antibacteriano sumamente sensible en un 69%; la concentración al 100% presenta efecto antibacteriano sumamente sensible en un 81% y el grupo

control positivo (Oxacilina) presenta efecto antibacteriano sumamente sensible en un 100%; interpretados según la escala Duraffourd y Lapraz.

Huapaya *et al*<sup>0</sup> (2012), indica que 5 de 11 especies del Gen *Croton* poseen actividad antibacteriana, especialmente para bacterias Gram positivos, los cuales fueron sustentados en su investigación “Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** las muestras de estudio fueron diluida a diferentes concentraciones 10%, 25%, 50% y 100%, control negativo (suero fisiológico) y positivo (Ciprofloxacino, 5mg/mL). Utilizó el método de excavación en placa (pozo), distribuyendo en cada pocillo 100 µL de las concentraciones del látex, con dos repeticiones por tratamiento. Los resultados expresan que las concentraciones del 50% y 100% del látex tuvieron alta actividad antibacteriana, ya que se observaron halos de inhibición similares a los del control positivo en cepas de ***S. aureus*** y en menor grado de ***P. aeruginosa*** y en ***E. coli*** no se observó inhibición.

Corrales *et al*<sup>7</sup> (2013) en el estudio “Evaluación del potencial antibacterial *in vitro* de ***Croton lechleri*** frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas”, sustenta que ***Croton lechleri*** presenta actividad antibacterial frente a aislamientos bacterianos de úlceras cutáneas en los pacientes del estudio y la actividad antimicrobiana es debida a metabolitos como el: ácido clorequínico, las coberinas A y B y el 1,3,5-trimetoxibenceno y el 2,4,6-trimetoxifenol potentes frente a *Bacillus subtilis*, entre otros. Asimismo, la que permitió presentar mejor sensibilidad y reproducibilidad fue la técnica de difusión en pozo.

Altamirano<sup>15</sup> (2015) al investigar la especie ***Croton lechleri*** sostiene que actividad antibacteriana se debe a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas. Carrión<sup>11</sup> (2010), La sangre de grado presenta actividad antimicrobiana frente a Gram-positivos, como: ***S. aureus*** ATCC 6538, del mismo modo, Lock y Rojas<sup>55</sup> (2004), sostiene que el látex de ***Croton lechleri*** **Muell. Arg.** tiene una variedad de acciones biológicas, destacando su acción antibacteriana, antiinflamatoria, citotóxica, antioxidante y cicatrizante y

los metabolitos con actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas se debe a compuestos fenólicos. Chen al estudiar la sangre de grado destaca sus propiedades antitumorales, antimicrobianas y cicatrizantes, asimismo indica que en 3 ensayos *in vivo* se evaluó la citotoxicidad y actividad antibacteriana. Cuyas evidencias demuestran que el látex no es tóxico. Asimismo, manifiesta que los compuestos fenólicos y terpénicos son los responsables del efecto antibacteriano.

Finalmente, Risco<sup>32</sup> (2005) que el látex de sangre de drago, oriundo de la Amazonia del Perú es de sabor astringente y constituido por ácido benzoico, heterósidos, taninos, celulosa y alcaloides, destacando la taspina. Los metabolitos encontrados tienen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, cicatrizantes y antiulcerosas. Dichas propiedades hacen que sea considerado en el campo de la industria como una materia transformable.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

1. Los constituyentes químicos identificados en el látex de ***Croton lechleri Müll. Arg.*** Son: carbohidratos, compuestos fenólicos, antocianinas, catequinas, flavonoides, saponinas, polifenoles, iridoides, alcaloides, triterpenoides, esteroides, aminoácidos, taninos y los que podrían estar relacionados con el efecto antibacteriano son los compuestos fenólicos, polifenoles, flavonoides, antocianinas y saponinas.
2. Se determinó que ***Staphylococcus aureus*** es sensible a las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% del látex ***Croton lechleri Müll. Arg.*** y siendo sumamente sensible a las concentraciones de 75% y 100%.
3. Se comparó el efecto antibacteriano entre el control positivo (Oxacilina) y las concentraciones del látex ***Croton lechleri Müll. Arg.***, de acuerdo a la tabla de antibióticos y diámetros críticos del INS y la escala de Duraffourd y Lapraz; demostrando que las concentraciones de 50%, 75% y 100% tiene efecto antibacteriano sumamente sensible.

## 5.2 Recomendaciones

1. Profundizar el aislamiento y la identificación y cuantitativo de los metabolitos del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg.**, para la determinación de la actividad biológica que sustenten las múltiples propiedades terapéuticas en el tratamiento de infecciones de interés clínico.
2. Realizar investigaciones *in vitro* del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.** para determinar el efecto ante otros microorganismos causantes de múltiples infecciones de interés clínico.
3. Se recomienda realizar investigaciones comparativas con diferentes muestras de procedencia del látex de ***Croton lechleri* Müll. Arg.**, para de determinar sus propiedades antibacterianas frente a diversos microorganismos resistentes a fármacos sintéticos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Resistencia a los antimicrobianos [en línea]. Ginebra: OMS; 2018. [fecha de acceso 23 de febrero del 2018]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
2. MINSA. Estrategias Y Metodologías de Intervención Para Mejorar El Uso De Los Antimicrobianos En El Ámbito Hospitalario. [en línea] Lima – Perú; 2007. [fecha de acceso 23 de febrero del 2018]. [http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/documento\\_tecnico\\_ESTRATEGIAS\\_Y\\_METODOLOGIAS\\_DE\\_INTERVENCION\\_ATM.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/documento_tecnico_ESTRATEGIAS_Y_METODOLOGIAS_DE_INTERVENCION_ATM.pdf)
3. Maguiña, C. Uso Racional de antibióticos. [en línea] Lima - Segunda Edición: Marzo 2013. [fecha de acceso 23 de febrero del 2018]. <http://cmp.org.pe/wpcontent/uploads/2017/03/UsorRacionalAntibioticos.pdf>
4. Instituto Nacional de Salud. Informe de la Resistencia Antimicrobiana en Hospitales en Perú. [en línea] Lima; 2007. [fecha de acceso 23 de febrero del 2018]. [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer//Informe\\_Resistencia\\_2007pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer//Informe_Resistencia_2007pdf)
5. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión [en línea] Lima: INS; 2002. [fecha de acceso 25 de febrero del 2018]. <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
6. Sangre de grado. Biopat Perú [en línea] Lima: INDECOPI. Rev. Año 1, N° 7 Julio 2015. [fecha de acceso 25 de febrero del 2018]. [https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/202940/07.Boletin\\_N7\\_SangreGrado.pdf/8265b1eb-f494-4db3-8dc4-ba72fe830155](https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/202940/07.Boletin_N7_SangreGrado.pdf/8265b1eb-f494-4db3-8dc4-ba72fe830155)
7. Yi *et al.* Characterization and determination of six flavonoids in the ethnomedicine "Dragon's Blood" by UPLC-PAD-MS. Chemistry Central Journal.2012; 6:116
8. Jones K. Review of Sangre de Drago (*Croton lechleri*)-A South American Tree Sap in the Treatment of Diarrhea, Inflammation, Insect Bites, Viral Infections, and Wounds: Traditional Uses to Clinical Research. The Journal Of Alternative And Complementary Medicine. 2003; 9: 877-89
9. Cayo C. y Barrera R. "Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del *Croton lechleri* sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)" [Tesis] Huacho; 2014. [Fecha de acceso 27 de febrero de 2018]. <http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/article/view/1097/1075>



10. Huapaya J, Flórez M y Larrea H. "Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de ***Croton lechleri*** (Sangre de grado)" [en línea] Lima; 2012. [fecha de acceso 27 de febrero del 2018]. [http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2003/Art2\\_Vol3\\_N1-2.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2003/Art2_Vol3_N1-2.pdf)
  
11. Carrión J. *et al.* Evaluación de la actividad antioxidante, contenido de polifenoles totales y actividad antimicrobiana de fracciones de sangre de grado, ***Croton lechleri***. [En línea] Lima: IPEN Informe Científico Tecnológico; 9:25-28.; 2010. [fecha de acceso 27 de febrero del 2018]. <http://dspace.ipen.gob.pe/handle/ipen/658>
  
12. León K, Santiago J. "Preparación y caracterización de películas de alcohol poli vinílico embebidas con extracto de sangre de grado" [En línea] Lima; 2007. [Fecha de acceso 27 de febrero de 2018]. [dspace.ipen.gob.pe/bitstream/ipen/520/1/Pag%20229-234.pdf](http://dspace.ipen.gob.pe/bitstream/ipen/520/1/Pag%20229-234.pdf)
  
13. Tamariz J, Capcha R. y *et al.*, "Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (***Croton lechleri***) frente al ***Helicobacter pylori***" [En línea] Lima; 2003. [Fecha de acceso 27 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/RMH/article/viewFile/760/726>
  
14. Avilés I. "Efecto inhibitorio de sangre de drago (***Croton lechleri***) sobre cepas de ***Streptococcus mutans***, estudio *in-vitro*" [Tesis] Quito; 2017. Fecha de acceso 28 de febrero de 2018. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9164/1/T-UCE-0015-527.pdf>
  
15. Altamirano I. Evaluación de la Actividad antioxidante de cuatro especies del género ***Croton***. Quito, julio 2015. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6320/1/T-UCE-0008-056.pdf>
  
16. Allaica, N. "Comparación del efecto cicatrizante de tinturas elaboradas a base de guarango (*caesalpinia spinosa*) y sangre de drago (***Croton lechleri***) aplicados en ratones (*mus musculus*)" [Tesis] Ecuador; 2015 [Fecha de acceso 06 de marzo de 2018]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4009>
  
17. Corrales L y *et al.* "Evaluación del potencial antibacterial *in vitro* de ***Croton lechleri*** frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas" [En línea] Bogotá; Nova vol.11 N° 19; 2013. [Fecha de acceso 28 de febrero de 2018]. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S179424702013000100006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S179424702013000100006)

18. García, C. “Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de ***Staphylococcus aureus*** con resistencia múltiple”)” [Tesis] México; 2006 [Fecha de acceso 06 de marzo de 2018]. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/13743.pdf>
  
19. Panduro G. Impacto de la extracción de ***Croton lechleri***. *Muell. Arg.* “Sangre de grado” en poblaciones naturales y en la economía de la comunidad del caserío Tarapoto, cuenca del río Nanay [En línea] Iquitos -Perú: Universidad nacional de la Amazonia Peruana 2006 [Fecha de acceso 21 de marzo del 2018]. <https://core.ac.uk/download/pdf/54238970.pdf>
  
20. Obando L. Estudio de los alcaloides de ***Croton draconoides*** “sangre de grado”, su actividad cicatrizante y el diseño de una forma farmacéutica. [En línea] Perú: Universidad nacional mayor de San Marcos. 2015 [Fecha de acceso 21 de marzo del 2018]. [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4262/Obando\\_bl.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4262/Obando_bl.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  
21. Risco, E. Interés terapéutico del látex de ***Croton lechleri***. Unitat de Farmacología y Farmacognòsia. Facultat de Farmàcia. [En línea] España: Universitat de Barcelona. España 2001 [Fecha de acceso 21 de marzo del 2018]. <https://www.fitoterapia.net/archivos/200812/roda-sangre-de-drago.pdf?1>
  
22. Arbildo L. Rendimiento de taspina aislada de 2 muestras de ***Croton lechlerii*** (sangre de grado) de las cuencas del bajo Nanay y alto Napo respectivamente. [En línea] Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica UNAP 2014 [Fecha de acceso 21 de marzo del 2018] [http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3577/Lindbergh\\_Tesis\\_Titulo\\_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3577/Lindbergh_Tesis_Titulo_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
  
23. Iván, C. Sangre de Drago, Resina parece que los árboles "sangran" cuando los cortan. [En línea] Perú: Naturaleza Insólita. (Fauna & Flora) 2013 [Fecha de acceso 21 de marzo del 2018] <http://historiasinsolitas.com/p793084/Sangre-Draco-Resina-parece-que-los-arboles-sangran-cuando-los-cortan>
  
24. Artemio C. La fitofarmacopea peruana. [En línea] Perú; Revista Científica del Laboratorio de Productos Naturales 2008; [Fecha de acceso 21 de marzo del 2018] <http://bibliotecafarmacologica.com/Fitoica/2008/articulo%203.pdf>
  
25. Torres G. Manual de buenas prácticas de recolección del látex [En línea] Perú: Fundación Chankuap, 2013 [Fecha de acceso 23 de marzo del 2018] <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Sangre-de-Draco.pdf>
  
26. Hermida M. Sangre de grado. [En línea] Perú: block Verdechaco 2015 [Fecha de acceso 24 de marzo del 2018] <http://arbolesdelchaco.blogspot.com/2008/08/sangre-de-drago.html>

27. ONG. Perú ecológico. [En línea]. Perú: 2012 [Fecha de acceso 24 de marzo del 2018] [http://www.peruecologico.com.pe/flo\\_sangregrado\\_1.htm](http://www.peruecologico.com.pe/flo_sangregrado_1.htm)
28. Eduardo, H. Caracterización Físico-Química para la determinación de la calidad y rendimiento del látex de Sangre de Grado (*Croton perpeciosus Croizat*) en la provincia de San Ignacio Cajamarca. [En línea] UNALM. 2011[Fecha de acceso 25 de marzo del 2018] <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/611/K50.F1-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. INDECOPI. Comisión nacional contra la biopiratería (Sangre de grado). [En línea] Perú: 2015 [Fecha de acceso 25 de marzo del 2018] [https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/202940/07.-Boletin\\_N7\\_SangreGrado.pdf/8265b1eb-f494-4db3-8dc4-ba72fe83015](https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/202940/07.-Boletin_N7_SangreGrado.pdf/8265b1eb-f494-4db3-8dc4-ba72fe83015)
30. Díaz. R. Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* Y *Escherichia coli* [En línea] 2012 [Fecha de acceso 25 de marzo del 2018] [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112192/diaz\\_r.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112192/diaz_r.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
31. Cofré. A. Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de Jugo de Murtilla ( *Ugni molinae* Turcz ) Obtenido por Condensación de Vapor [En línea] :2012 [Fecha de acceso 25 de marzo del 2018]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2015/fac675d/doc/fac675d.pdf>
32. Risco, E. Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de drago. [En línea] :2005 [Fecha de acceso 25 de marzo del 2018]. <http://catalogo.procolombia.co/sites/default/files/companies/900829477/sheet/croton.pdf>
33. Chans G. **Estafilococos** [en línea]. Uruguay: microbiología; 2008. [Fecha de acceso 26 de mayo del 2018] <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2017.pdf>
34. Universidad de la República. Dpto. de Bacteriología y Virología Médica. Temas de Bacteriología y Virología “Médica [en línea] Uruguay: Dpto. de Bacteriología y Virología Médica; 2008. [Fecha de acceso 26 de mayo del 2018]: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
35. Cervantes E, et al. Características generales del ***Staphylococcus aureus***. [En línea] México: Rev Latinoamericana Patología Clínica Medde Lab 2014; 61 (1): 28-40. [Fecha de acceso 26 de mayo del 2018]. <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
36. Barbagelata M. Mutante auxótrofa de ***Staphylococcus aureus*** como potencial herramienta inmunoproláctica en la portación nasal [En línea] Argentina: Universidad Nacional del Litoral; 2014 [Fecha de acceso 26 de mayo del 2018]

[https://www.researchgate.net/publication/314151338\\_Mutante\\_auxotrofa\\_de\\_Staphylococcus\\_aureus\\_como\\_potencial\\_herramienta\\_inmunoprofilactica\\_en\\_la\\_portacion\\_nasal](https://www.researchgate.net/publication/314151338_Mutante_auxotrofa_de_Staphylococcus_aureus_como_potencial_herramienta_inmunoprofilactica_en_la_portacion_nasal)

37. Castañón-Sánchez CA. Patogenia molecular de ***Staphylococcus aureus***. [en línea]. Mexico: Art. en revision. Evid Med Invest Salud; 2012; 5 (3): 79-84 2007 [Fecha de acceso 26 de mayo del 2018] <http://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2012/eo123b.pdf>
38. Silva M. ***Staphylococcus aureus*** [en línea]. Chile: Curso de Microbiología Y Parasitología; 2007 [Fecha de acceso 26 de mayo del 2018]. <http://7staphylococcus-aureus.blogspot.pe/>
39. García J. et al. Microbiología Médica General; Editorial Harcourt; 1ra. Impresión; España 1998.
40. Fundación io. ***Staphylococcus aureus***. [En línea] Atlas bacteriología [Fecha de acceso 26 de mayo del 2018] [http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus\\_aureus.html](http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html)
41. Hernández X. Medios de Cultivo. [En línea] blog; 2016 [Fecha de acceso 26 de mayo del 2018]. <http://blogagares.blogspot.com/2016/12/medios-de-cultivo.html>
42. Jorgensen J. y Sahm D. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana: Consideraciones generales. En: Manual de Microbiología Clínica. Sexta edición. Eds: Murray P., Baron E., Pfaller M y col: Sociedad Americana de Microbiología. Washington DC, 1995.
43. Araujo J y Salas R. Actividad antimicrobiana de plantas. [En línea] Lima: Revista científica. [Fecha de acceso 08 de mayo del 2018] <file:///C:/Users/user/Desktop/clari%20tesis/antibiogramas/cientifica.pdf>
44. Centro de Atención Farmacéutica (CAF DIGEMID). Oxacilina Inyectable 1g. [En línea] Lima: CAF DIGEMID [Fecha de acceso 10 de mayo del 2018] <http://www.digemid.minsa.gob.pe/Upload/Uploaded/PDF/Oxacilina.pdf>
45. Calvo D. Oxacilina. [En línea] Cuba: Infomed del Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 2018. [Fecha de acceso 10 de mayo del 2018]. <http://fnmedicamentos.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=126>
46. Sánchez-García E. y et al. Actividad Antimicrobiana. [En línea] Barcelona, España: Investigación en plantas de importancia médica; 2016. [Fecha de acceso 08 de mayo del 2018] <http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/viewFile/334/247>
47. USP 40, en su apartado de pruebas biológicas (antibióticos valoraciones microbiológicas)

48. Cárdenas D. M. y Asencios Diana G. Evaluación de un método de ensayo microbiológico para determinar la potencia antibiótica de tirosina [Tesis en línea] Lima; 2008. [Fecha de acceso 11 abril de 2018] [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/1217/Cardenas\\_sd.pdf;jsessionid=1790DFA2FD19AF56D7EA54972C564B78?sequence](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/1217/Cardenas_sd.pdf;jsessionid=1790DFA2FD19AF56D7EA54972C564B78?sequence)
49. Pedraza P. Castellanos. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos *in vitro*. Parte X cefoperazona- sulbactam. [En línea] Bogotá: pontificia universidad javeriana. Microbiología industrial;2009[Fecha de acceso 08 de mayo del 2018] <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis326.pdf>
50. Prat S. Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana por Difusión en Agar. [En línea] Chile: Instituto de Salud Pública de Chile. [Fecha de acceso 08 de mayo del 2018] [http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/manual\\_susceptibilidad.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf)
51. Picazo J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. [En línea] España: Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. [Fecha de acceso 08 de mayo del 2018] <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
52. Muñoz S. Validación del método microbiológico cilindro-placa para la potencia del antibiótico lincomicina clorhidrato. [Tesis en línea] El Salvador; 2006. [Fecha de acceso 08 de mayo del 2018]. <http://ri.ues.edu.sv/5110/1/10131772.pdf>
53. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. [En línea] Lima: Serie de Normas Técnicas N° 30; 2002. [Fecha de acceso 08 de mayo del 2018] <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
54. Blanco K. Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos sulfonados en el sistema de conductos radiculares. revisión sistemática. [en línea] <file:///C:/Users/user/Downloads/519-2360-1-PB.pdf>
55. Lock O y Rojas R. Química y farmacología del ***Croton lechleri* Muell. Arg.**, ("Sangre de grado") [En línea] Lima: Revista de QUÍMICA del Departamento de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú; 2004. [Fecha de acceso 19 de mayo del 2018] [revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/download/18661/18912](http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/download/18661/18912)
56. Ramírez L. y Marín D. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. [En línea] Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira. Scientia et Technica Año XV, No 42, 2009. [Fecha de acceso 0 de junio de 018] <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>

## **ANEXOS**

Anexo N°01. Matriz de consistencia

TITULO: EFECTO ANTIBACTERIANO <i>IN VITRO</i> DEL LÁTEX DE <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (SANGRE DE GRADO) FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> .						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGIA
¿Tendrá efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ?	Determinar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	El látex de látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado) tiene efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	X: Látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado)	Análisis organoléptico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Color</li> <li>• Olor</li> <li>• Sabor</li> <li>• Textura</li> </ul>	<b>TIPO:</b> Transversal <i>In vitro</i> Prospectivo  <b>DISEÑO:</b> Experimental <i>in vitro</i>  <b>NIVEL:</b> Aplicativo  <b>POBLACIÓN:</b> Población Vegetal: Látex <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado)  Población microbiológica: Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>
				Prueba de solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insoluble</li> <li>• Poco soluble</li> <li>• Moderadamente soluble</li> <li>• Totalmente soluble</li> </ul>	
				Marcha fitoquímica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcaloides</li> <li>• Flavonoides</li> <li>• Polifenoles</li> <li>• Saponinas</li> <li>• Compuestos fenólicos</li> <li>• Antocianinas</li> </ul>	
				Concentraciones del látex de <i>crotón lechleri</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25%,50%,75%, 100%</li> </ul>	
PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECIFICOS	HIPOTESIS ESPECIFICA	VARIABLE DEPENDIENTE			
1. ¿Cuáles serán los constituyentes químicos presentes en el látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (Sangre de grado)?	1. Identificar algunos constituyentes químicos en el látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (Sangre de grado).	1. El látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (Sangre de grado) posee algunos constituyentes químicos relacionados con el efecto antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .			Diámetros de los halos de inhibición en mm según la escala Durafford y Lapraz  <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Nula (-):</b> para un diámetro inferior a 8 mm</li> <li>• <b>Sensible (+):</b> para un diámetro comprometido entre 8 a 14 mm</li> <li>• <b>Muy sensible (++):</b> para un diámetro entre 14 y 20 mm</li> <li>• <b>Sumamente sensible (+++):</b> para un diámetro superior a 20 mm</li> </ul>	<b>MUESTRA</b> Muestra Vegetal: 500 mL del látex <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado)- Tingo María, Huánuco.  Muestra microbiológica: placas Petri con Agar Mueller Hinton cultivadas con cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538  <b>TECNICAS:</b> Observación de tipo estructurada  <b>INSTRUMENTOS:</b> Ficha de recolección de datos: a. análisis organoléptico b.- prueba de solubilidad c.- marcha fotoquímica d.- efecto antibacteriano
2. ¿Será sensible <i>Staphylococcus aureus</i> frente al látex <i>Crotón lechleri</i> Müll Arg (sangre de grado)?	2. Identificar la sensibilidad del <i>Staphylococcus aureus</i> frente a concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% del látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado).	2. <i>Staphylococcus aureus</i> es sensible a concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% del látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (sangre de grado).	Y: Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	Método de difusión en agar cilindro - placa		
3. ¿Cómo será el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> entre Oxacilina y el látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg. (Sangre de grado) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ?	3. Comparar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> entre Oxacilina y el látex de <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg (sangre de grado) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	3. El látex <i>Crotón lechleri</i> Müll. Arg (sangre de grado) presenta efecto antibacteriano <i>in vitro</i> comparado con Oxacilina frente a <i>Staphylococcus aureus</i>				

Anexo N°02. Certificación botánica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



**"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"**

**CONSTANCIA N° 140-USM-2018**

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de Clarivel Margot ESPINOZA RIVERA Y Zulma Danitza SERNA QUISPE, estudiantes de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica; sido estudiada y clasificada como: ***Croton lechleri*** Müll. Arg. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: EUPHORBIALES**

**FAMILIA: EUPHORBIACEAE**

**GENERO: *Croton***

**ESPECIE: *Croton lechleri* Müll. Arg.**

Nombre vulgar: "sangre de grado"

Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 23 de Abril de 2018

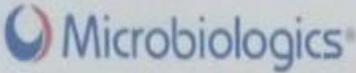
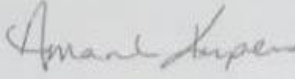
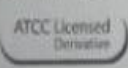

ACE/ddb



Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

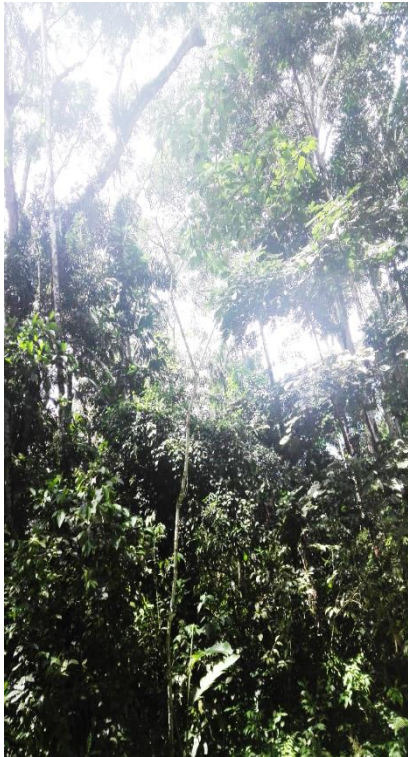


Anexo N° 03. Certificado de la cepa **Staphylococcus aureus** ATCC 6538

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
<b>Specifications</b> Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-481 Reference Number: ATCC® 6538™** Purity: Pure Passage from Reference: 2	<b>Expiration Date:</b> 2019/2/28 <b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Kieshia L. Negen Release Date: 2017/3/31
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative
	
Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitak®: Although the Vitak® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p>	
	<p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiology, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p>
	
TESTING CERT #2655.01	
<p>© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303      Page 1 of 1      DOC 286</p>	

Anexo N° 04. Obtención y recolección de la muestra vegetal

Árbol de *Croton lechleri* Müll. Arg. ubicado en Tingo María – Huánuco





Anexo N° 05. Análisis organoléptico del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.



Olor



Color



Sabor



Textura

Anexo N° 06. Prueba de solubilidad del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.

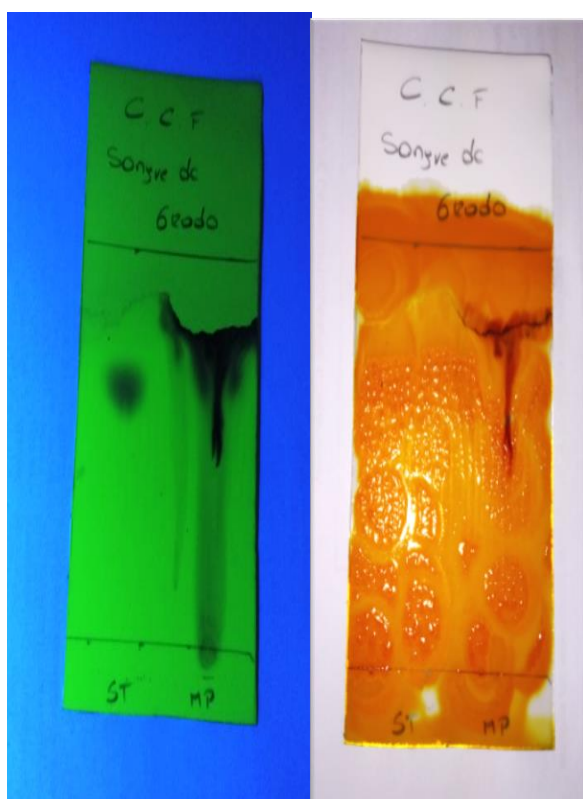




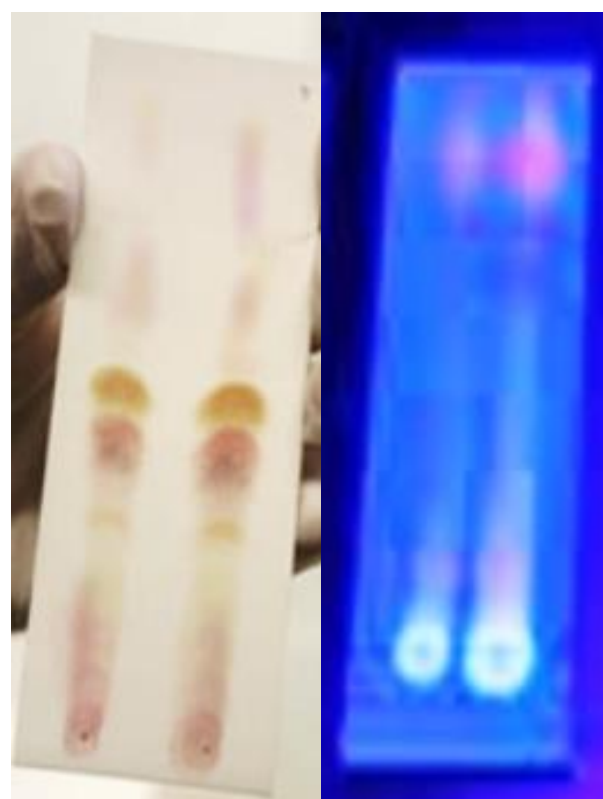
Anexo N° 07. Marcha fitoquímica del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.



Anexo N° 08. Cromatografía en capa fina del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.



CCF de Alcaloides



CCF de Flavonoides



Anexo N° 09: Espectrofotometría en el UV-VIS del látex *Croton lechleri* Müll. Arg.



Cuantificación de Polifenoles del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.



Cuantificación de Flavonoides del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.

Reporte de contenido por espectrofotometría Uv-Vis de Polifenoles totales

**COPIA CONTROLADA**

	<b>SERVICIO DE CONTROL DE CALIDAD</b>	Código y Versión: PQ-FR-035.00
<b>ÁREA DE ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS</b>		Fecha de Emisión: 2016-01-11
REPORTE DE CONTENIDO POR ESPECTROFOTOMETRÍA Uv-Vis		
Página 1 de 1		

**DATOS DEL PRODUCTO:**

Nombre: LATEX DE Croton lechleri Fabricante: \*\*\*\*\*  
 Presentación: Frasco de 25 ml. aproximadamente Fecha de Vencimiento: S/F  
 Lote: \*\*\*\*\* Norma Técnica: Técnica Interna SCC-UPCH  
 Código SCC-UPCH: \*\*\*\*\* Fecha de análisis: 2018-07-04

**SISTEMA ESPECTROFOTOMETRICO:**

Equipo: ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS Código: EQ-FQ-32  
 Longitud de onda: 765 nm

**DATOS DEL ESTÁNDAR:**

Nombre: Ácido Galico Primario: ✓ Secundario: --- Working Std: ---  
 LOTE: ----- Fecha de Vencimiento: -----  
 Potencia: 100,0 % T/C Código: ---  
 Peso molecular en forma de Sal: --- Humedad: --- %  
 Peso molecular en forma de Base: ---  
 Peso: 50,3 mg Volumen enrase: 500 ml.

Diluciones de la curva:  
 8 ppm Vol. dilución 1: 0,8 mL Vol. enrase 1: 10 mL  
 12 ppm Vol. dilución 1: 1,2 mL Vol. enrase 1: 10 mL  
 16 ppm Vol. dilución 1: 1,6 mL Vol. enrase 1: 10 mL

mg/mL	Factor de corrección	(mg/mL) Corregido	Absorbancia
0,80480	1	0,80480	0,16087
0,80480	1	0,80480	0,16340
0,80480	1	0,80480	0,16517
1,20720	1	1,20720	0,23530
1,20720	1	1,20720	0,23727
1,20720	1	1,20720	0,23902
1,60960	1	1,60960	0,33320
1,60960	1	1,60960	0,33583
1,60960	1	1,60960	0,33722

**ECUACIÓN DE LA RECTA:**  $y = 5,6991x - 0,0238$   
 a: -0,0132  
 b: 0,214

**DATOS DE LA MUESTRA** LATEX DE Croton lechleri

Peso o volumen de muestra: 0,50 (ml) Volumen de enrase: 1 (ml)  
 Vol. dilución 1: 0,25 (ml) Volumen de enrase: 25 (ml)

**CÁLCULOS:**

MUESTRA	ABSORBANCIA
MUESTRA A1	0,63033
MUESTRA A2	0,63954
MUESTRA A3	0,64703

MUESTRA	mg/ ml	RSD	PROMEDIO
MUESTRA	576,6589	585,2642	592,2625
MUESTRA			1,356
MUESTRA			584,73

**RESULTADOS:** 584.73 mg de Ácido galico/ mL de Latex  
**ESPECIFICACIONES/ OBSERVACIONES:** Los Polifenoles se expresan en mg equivalentes de Ácido galico/ mL de latex  
**CONCLUSIÓN:** -----

E.Olivar  
ANALISTA

2018-07-05  
FECHA DE REPORTE



Reporte de contenido por espectrofotometría Uv-Vis de Flavonoides totales

**COPIA CONTROLADA**

	<b>SERVICIO DE CONTROL DE CALIDAD</b>	Código y Versión: PQ-FR-035.00
<b>ÁREA DE ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS</b>		Fecha de Emisión: 2016-01-11
REPORTE DE CONTENIDO POR ESPECTROFOTOMETRÍA Uv-Vis		
Página 1 de 1		

**DATOS DEL PRODUCTO:**

Nombre: LATEX DE Croton lechleri Fabricante: \*\*\*\*\*  
 Presentación: Frasco de 25 ml. aproximadamente Fecha de Vencimiento: S/F  
 Lote: \*\*\*\*\* Norma Técnica: Técnica Interna SCC-UPCH  
 Código SCC-UPCH: \*\*\*\*\* Fecha de análisis: 2018-07-04

**SISTEMA ESPECTROFOTOMETRICO:**

Equipo: ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS Código: EQ-FQ-32  
 Longitud de onda: 415 nm

**DATOS DEL ESTÁNDAR:**

Nombre: QUERCITINA Primario: ✓ Secundario: --- Working Std: ---  
 LOTE: A101792 012 Fecha de Vencimiento: -----  
 Potencia: 100,0 % T/C Código: ---  
 Peso molecular en forma de Sal: --- Humedad: --- %  
 Peso molecular en forma de Base: ---  
 Peso: 50,1 mg Volumen enrase: 50 ml.

Diluciones de la curva:  
 24 ug/mL Vol. dilución 1: 1,2 mL Vol. enrase 1: 50 mL  
 100 ug/mL Vol. dilución 1: 5 mL Vol. enrase 1: 50 mL  
 200 ug/mL Vol. dilución 1: 10 mL Vol. enrase 1: 50 mL

mg/mL	Factor de corrección	(mg/mL) Corregido	Absorbancia
0,02405	1	0,02405	0,11029
0,02405	1	0,02405	0,11199
0,02405	1	0,02405	0,11181
0,10020	1	0,10020	0,55026
0,10020	1	0,10020	0,54999
0,10020	1	0,10020	0,55158
0,20040	1	0,20040	1,11700
0,20040	1	0,20040	1,11680
0,20040	1	0,20040	1,11680

**ECUACIÓN DE LA RECTA:**  $y = 5,6991x - 0,0238$   
 a: -0,0238  
 b: 5,6991

**DATOS DE LA MUESTRA** LATEX DE Croton lechleri

Peso o volumen de muestra: 0,20 (ml) Volumen de enrase: 20 (ml)

**CÁLCULOS:**

MUESTRA	ABSORBANCIA
MUESTRA A1	1,44660
MUESTRA A2	1,44230
MUESTRA A3	1,45300

MUESTRA	mg/ ml	RSD	PROMEDIO
MUESTRA	24,9656	24,8901	25,0779
MUESTRA			0,3782
MUESTRA			24,98

**RESULTADOS:** 24.98 mg de Quercitina/ mL de extracto  
**ESPECIFICACIONES/ OBSERVACIONES:** Los Flavonoides Totales se expresan en mg equivalentes de Quercitina/ mL de extracto  
**CONCLUSIÓN:** -----

E.Olivar  
ANALISTA

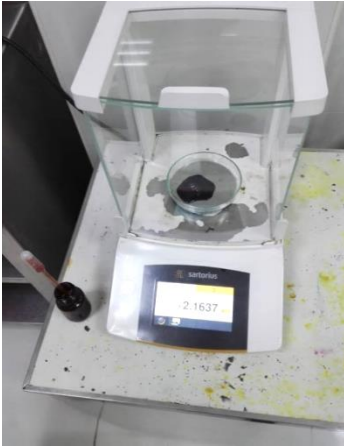
2018-07-05  
FECHA DE REPORTE



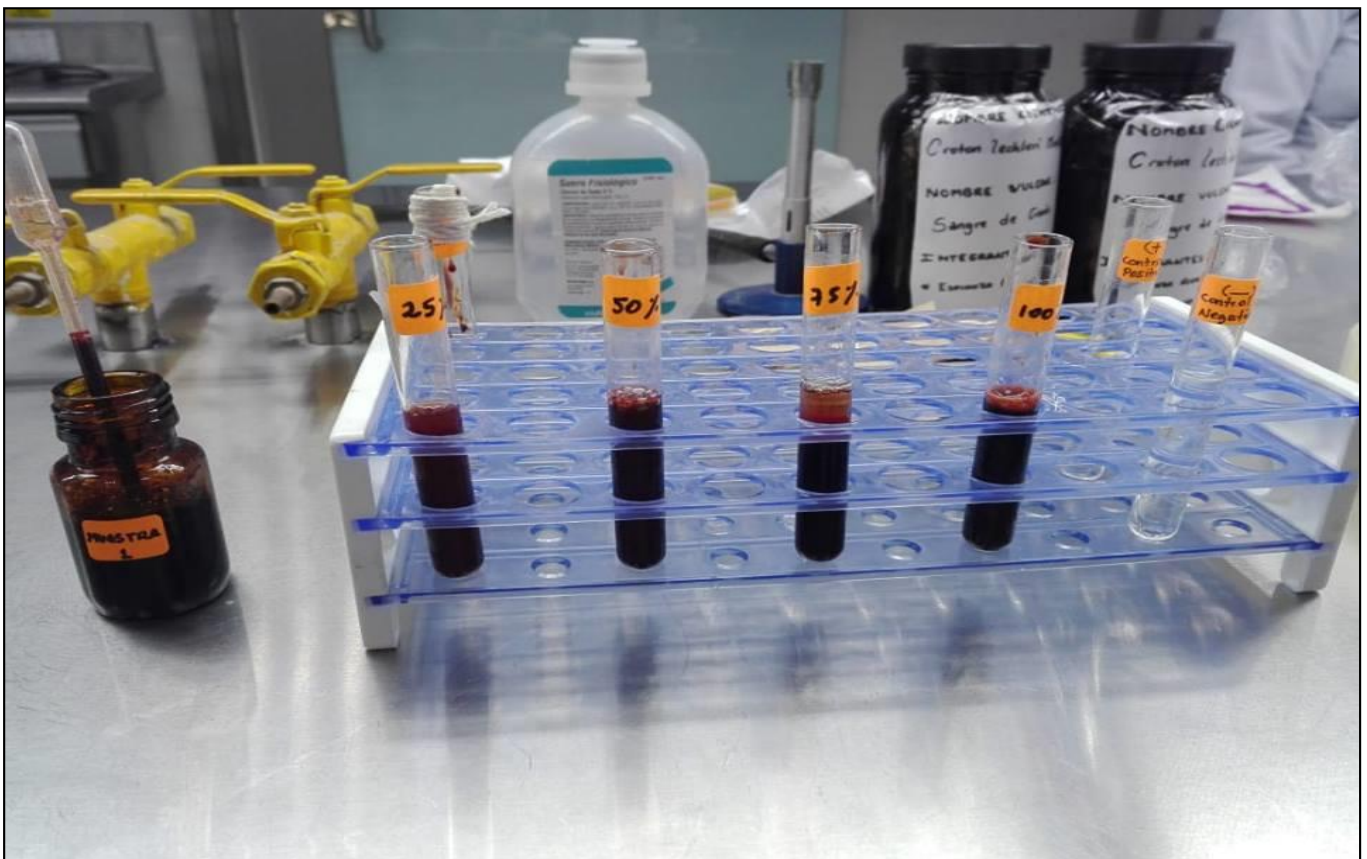


Anexo N° 10. Formulación de las concentraciones del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.

Volumen	Peo	Peo en mg
5 mL	2.6137 g	2 6137 mg



Concentración %	Látex de <i>Croton lechleri</i> mg	Látex de <i>Croton lechleri</i> (mL)	Agua destilada (mL)
25%	653.425 mg	1.25 mL	3.75 mL
50%	1 306. 85 mg	2.5 mL	2.5 mL
75%	1 960.75 mg	3.75 mL	1.25 mL
100%	2 6137 mg	5.00 mL	0 mL



Concentraciones del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg.

Anexo N° 11. Efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* Müll. Arg. por el método de difusión en agar cilindro – placa



Activación de cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



Plaqueo del Agar Mueller - Hinton



Preparación inoculo con el método de suspensión directa de colonias del *Staphylococcus aureus* ATCC 6538





Sembrado de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en la superficie del agar



Dispensación de los cilindros en las placas Petri



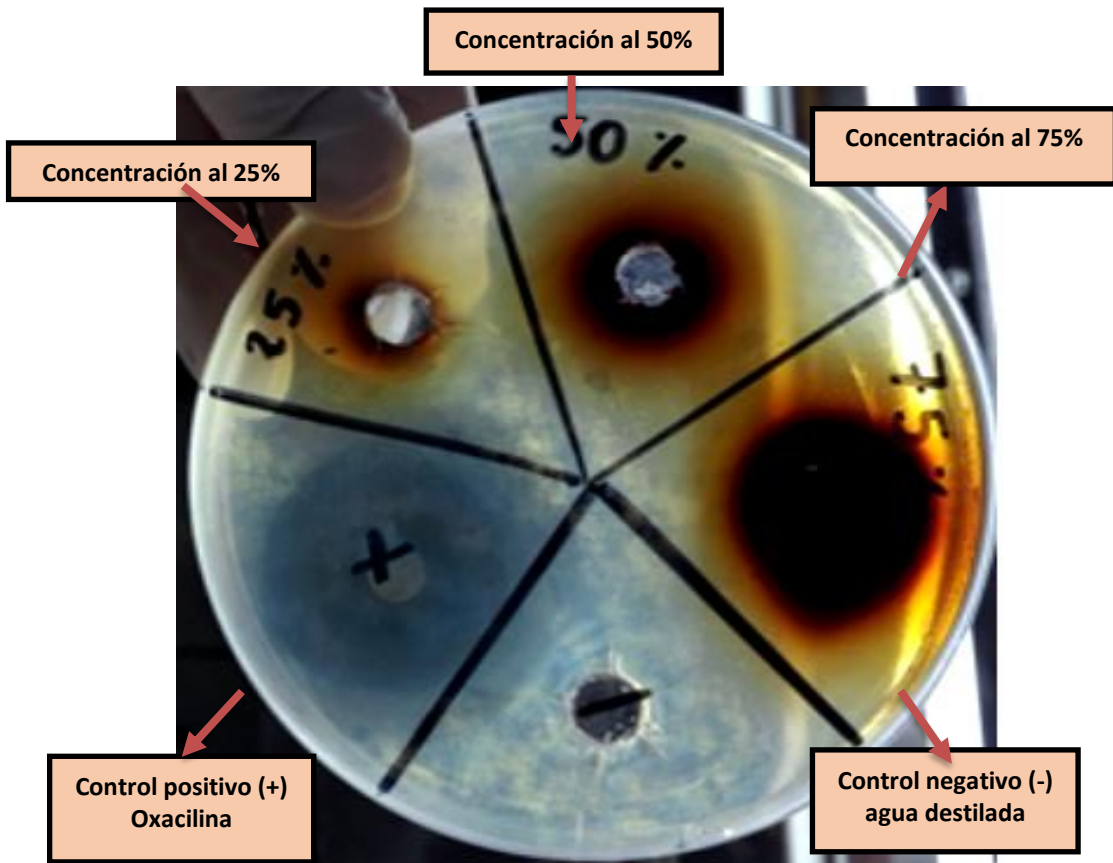
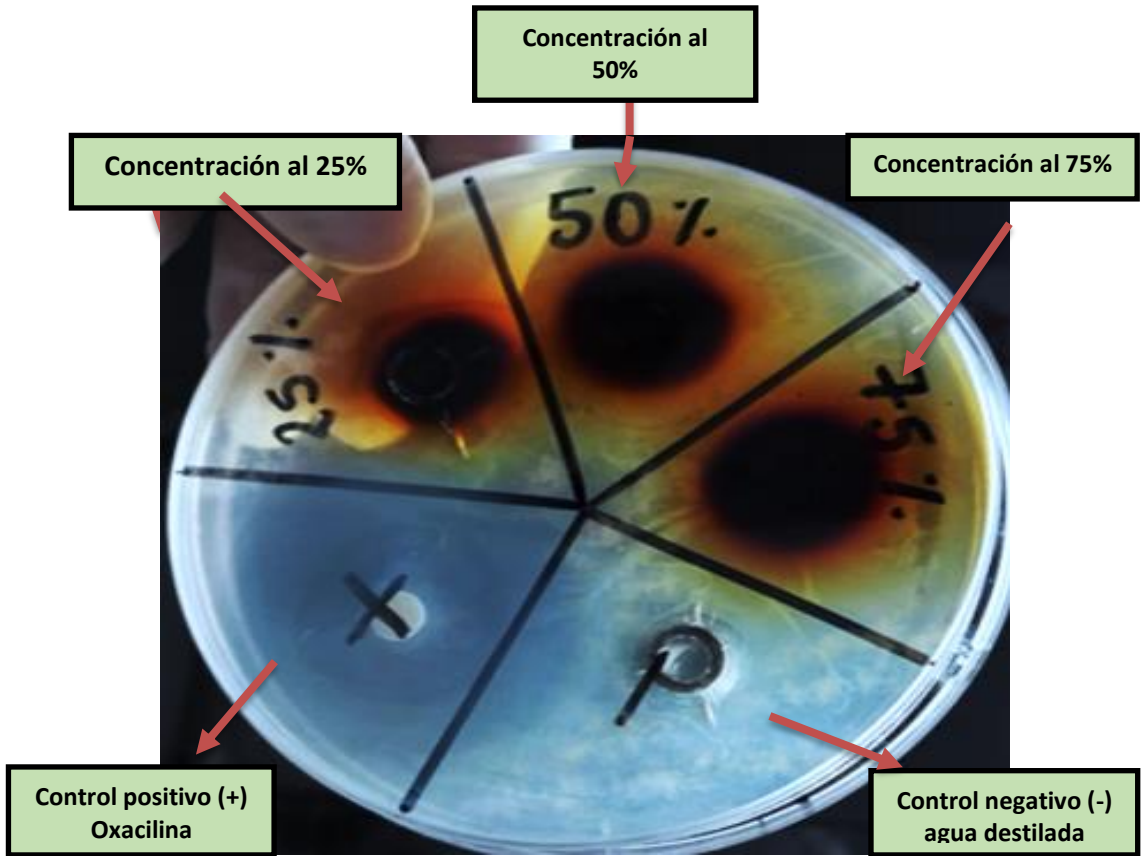
Incubación de las placas Petri a 37°C por 24 horas

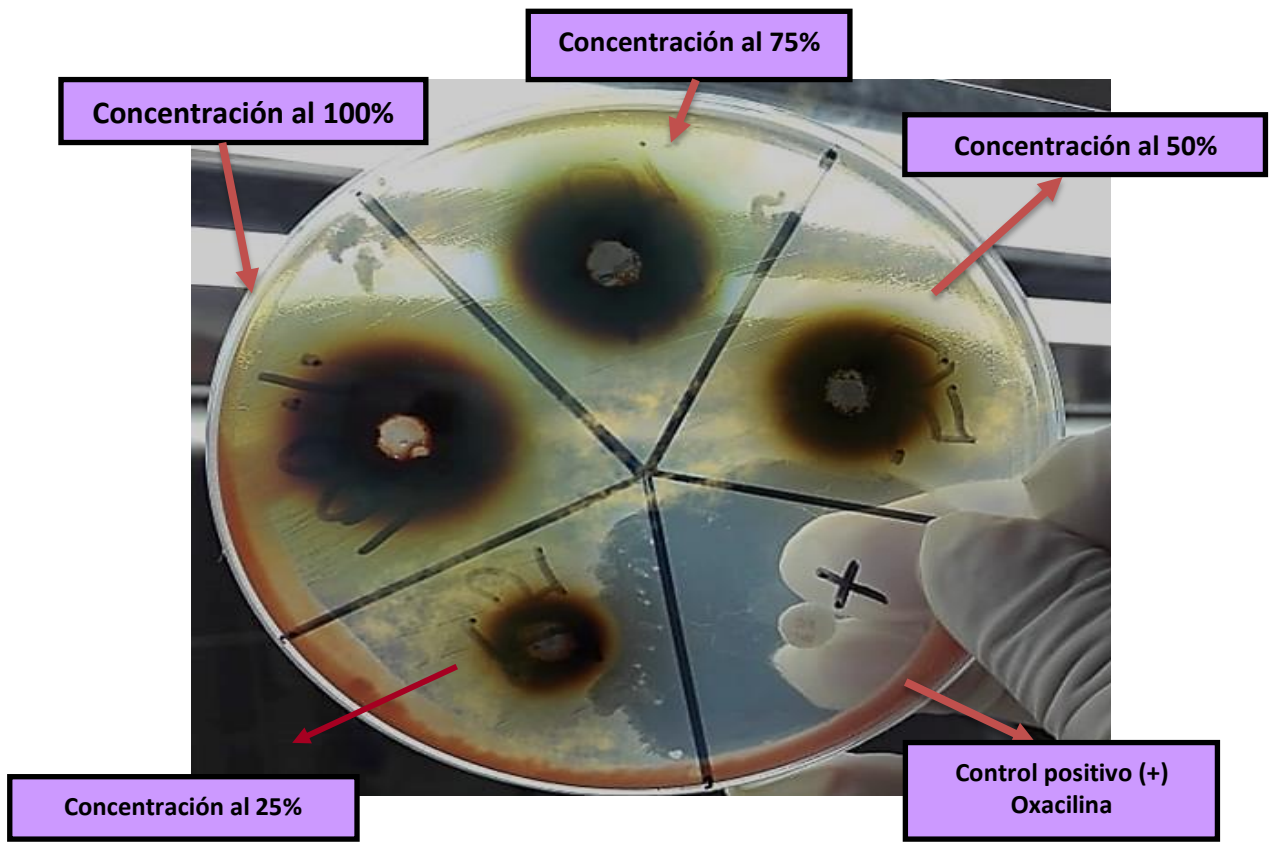
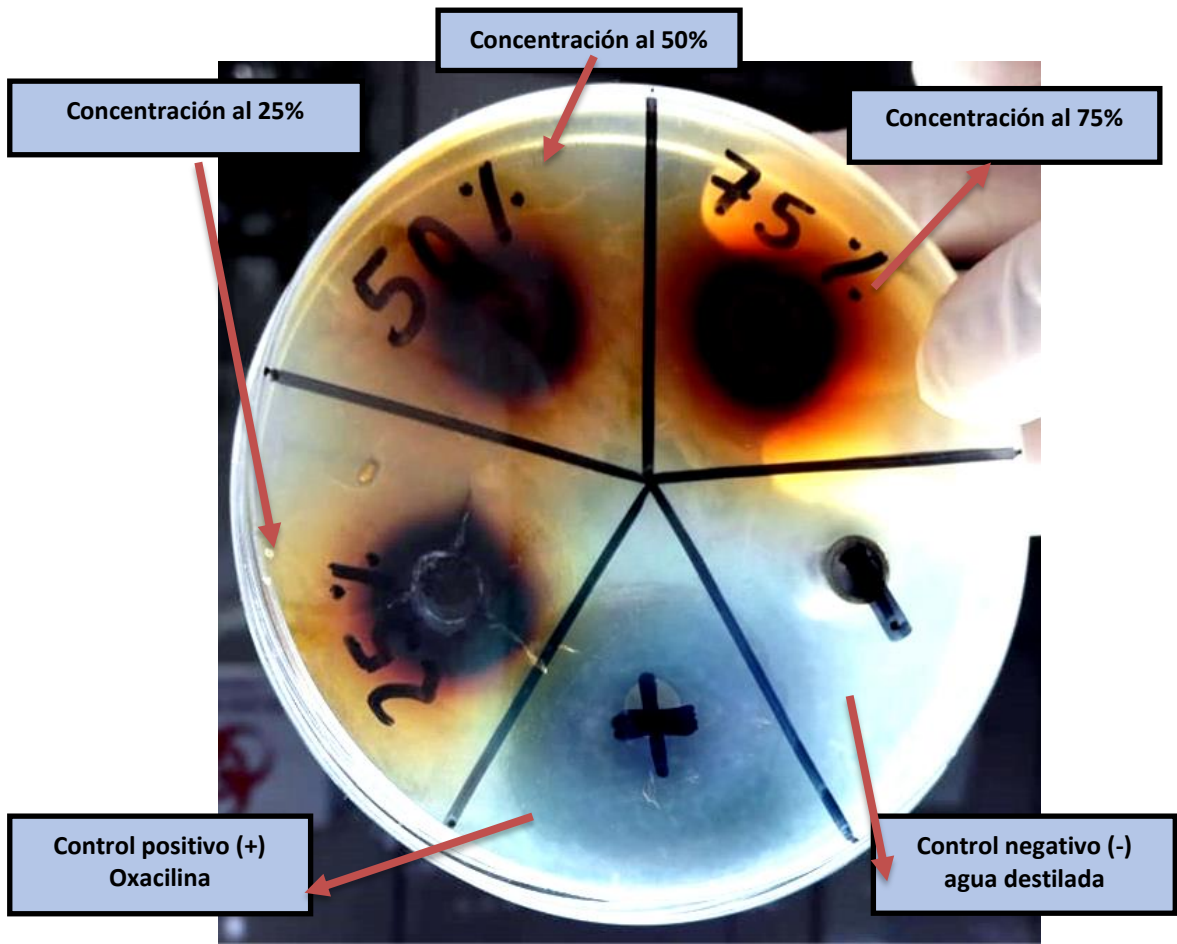


Anexo N° 12. Lectura de los resultados de los halos de inhibición

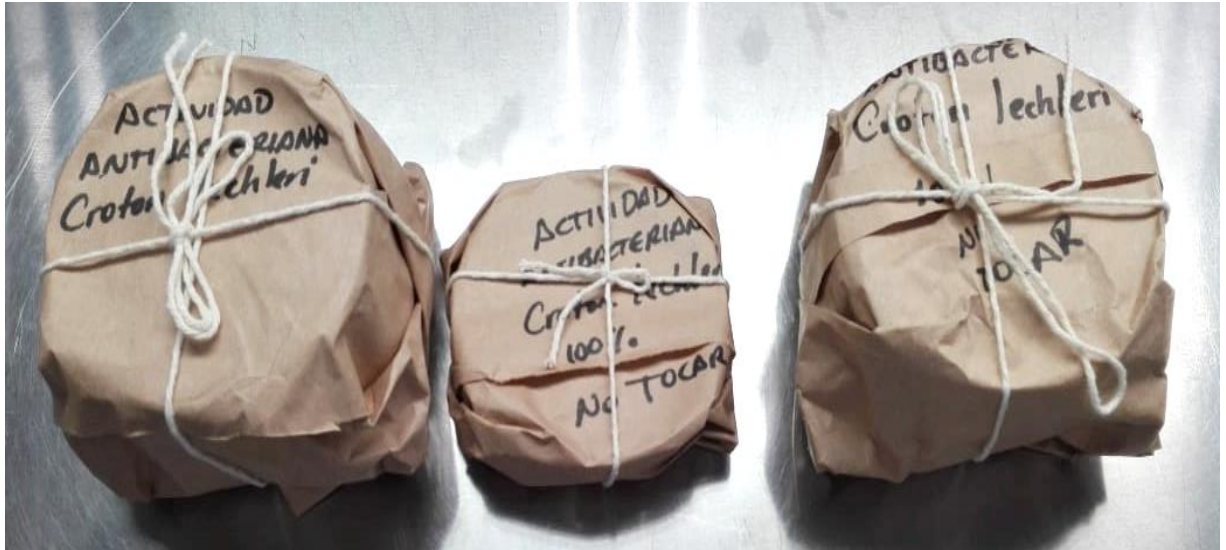












Anexo N° 13: Instrumentos de recolección de datos del análisis organoléptico

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**ANEXO**  
**INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA EL ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DE LÁTEX DE *Croton lechleri* (SANGRE DE GRADO)**

**FICHA DE OBSERVACIÓN**

**Fundamento:** La identificación a través de las características organolépticas es un examen preliminar de la droga y se basa en la valoración por medio de los órganos de los sentidos; incluye olor, el sabor, y tacto. Sirven de modo orientativo.

**Instrucciones:** En la muestra de látex de *Croton lechleri* (sangre de grado), describa sus características organolépticas, según la leyenda descrita:

**ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DEL LÁTEX DE *CROTON LECHLERI***

CARACTERÍSTICAS	OBSERVACIONES
1. Color	
2. Olor	
3. Sabor	
4. Textura	

• **Elaboración:** los ejecutores

• **Leyenda:**

1. **Olor:** Aromático, alíáceo, alcanforado, sin olor, herbal, nauseabundo, desagradable, a especia, etc.

2. **Color:** Uniforme o si presenta fragmentos distintos color.

3. **Sabor:** Puede ser dulce, amargo, ácido, salino, astringente, punzante, aromático, etc.

4. **Textura (tacto):** viscosa, lisa, áspera.

Anexo N° 14. Ficha de validación del instrumento de análisis organoléptico

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO**

**1. DATOS GENERALES:**

1.1. Apellido y nombres del experto: Mg. Q.F. Carlos Caro P.

1.2. Cargo e Institución donde labora: Docente - U.I.G.V.

1.3. Registro colegio profesional: 09767

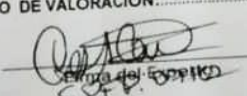
1.4. Nombre de instrumento: Recolección de datos para el análisis organoléptico de látex de *Croton lechleri*

**Instrucciones:** Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia, le solicitamos que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación. Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poca	2.-Poca	3.-Regular	4.-Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1. Claridad	El instrumento está formulado con un lenguaje apropiado.					X
2. Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables.					X
3. Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos.					X
4. Organización	El instrumento tiene una organización lógica.					X
5. Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.					X
6.- Intencionalidad	Es adecuado para relacionar las variables en mención.					X
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la farmacéutica como de la bioquímica.					X
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables.					X
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					X
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico.					X
Total						50

**III. PROMEDIO DE VALORACIÓN:** 50

  
 Experto del Instrumento

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar



Anexo N° 15: Instrumentos de recolección de datos para la prueba de solubilidad



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**ANEXO**  
**INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD DEL LÁTEX DE *Croton lechleri* (SANGRE DE GRADO)**

**FICHA DE OBSERVACIÓN**

**Fundamento:** La solubilidad es una medida de la capacidad de disolverse una determinada sustancia (sólido) en un determinado medio (solvente); implícitamente se corresponde con la máxima cantidad de sólido disuelto en una dada cantidad de solvente a una temperatura fija.

**Instrucciones:** A partir de la batería de tubos de ensayo para la prueba de solubilidad (con 1mL de muestra vegetal y 1mL de cada uno de los solventes descritos en la tabla), observar los resultados expresados como: (-) Insoluble (+), Ligeramente soluble, (++) Soluble, (+++) Muy Soluble

**PRUEBA DE SOLUBILIDAD DEL LÁTEX DE *CROTON LECHLERI***

N°	SOLVENTES	OBSERVACIÓN
1.	Aqua destilada	
2.	Etanol	
3.	Éter de Petróleo	
4.	Cloroformo	
5.	N-butanol	
6.	Ciclohexano	
7.	Acetato de etilo	

Elaboración: los ejecutores

**Leyenda:**

- (-) **Insoluble** : La solubilidad no se visualiza.
- (++) **Ligeramente soluble**: La solubilidad es leve.
- (++) **Soluble** : La solubilidad es moderada.
- (+++) **Muy Soluble** : La solubilidad es total.

Anexo N° 16. Ficha de validación del instrumento de la prueba de solubilidad del látex ***Croton lechleri* Müll. Arg.**



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO**

**1. DATOS GENERALES:**

- 1.1. Apellido y nombres del experto: Mg. Q.F. Pedro Jacinto Herivas  
 1.2. Cargo e Institución donde labora: Docente - U.I.E.V  
 1.3. Registro colegio profesional: 17.197  
 1.4. -Nombre de instrumento : Recolección de datos para la prueba de solubilidad del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado)

**Instrucciones:** Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia, le solicitamos que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación. Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poca    2.-Poca    3.-Regular    4.-Aceptable    5.-Muy aceptable

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
6. Claridad	El instrumento está formulado con un lenguaje apropiado.					X
7. Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables.					X
8. Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos.					X
9. Organización	El instrumento tiene una organización lógica.					X
10. Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.					X
6.- Intencionalidad	Es adecuado para relacionar las variables en mención.					X
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la farmacéutica como de la bioquímica.					X
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables.					X
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					X
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico.					X
Total						50

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 50

Firma del Experto

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar

Anexo N° 17: Instrumentos de recolección de datos de la marcha fitoquímica

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA**  
**MARCHA FITOQUÍMICA DEL LÁTEX DE *Croton lechleri* (SANGRE DE GRADO)**  
**FICHA DE OBSERVACION**

**Objetivo:** identificar los metabolitos presentes en el látex de *Croton lechleri* (sangre de grado).

**Instrucciones:** Emplear los reactivos y/o solventes descritos en la tabla para identificar los metabolitos secundarios y primarios del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado)

**MARCHA FITOQUÍMICA DEL LÁTEX DE *CROTON LECHLERI***

METABOLITO	REACCION	REACCION POSITIVA	RESULTADO
CARBONHIDRATOS	Fehling	Coloración rojo ladrillo	
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl <sub>3</sub>	Coloración verde o azul	
TANINOS	Geatina	Precipitado denso blanco	
FLAVONOIDES	Shinoda	Chalconas: no hay coloración	
		isoflavanonas: Amarillo rojizo	
		Flavonoles: rojo a magenta	
		Flavonas y flavonoles: amarillo a rojo	
ANTOCIANINAS Y FLAVONOIDES CATEQUICOS	Rosenheim	Coloración rojo oscuro	
AMINOÁCIDOS LIBRES Y GRUPOS AMINOS	Ninhidrina	Coloración violácea	
	Dragendorff	Precipitado naranja	
ALCALOIDES	Mayer	Precipitado blanco	
	Wittmann	Precipitado blanco	
	Sonnenschein	Coloración amarillo - verdoso	
	Bomtrager (NaOH 5%)	Coloración roja	
TRITERPENOIDES Y ESTEROIDES	Lieberman - burchard	Esteroides: verde - azul Triterpenoides: Rojo - naranja	
SAPONINAS	Generación de espuma	Formación de 0.5 a 1cm de espuma estable por 15 min.	
GLUCÓSIDOS	Bajet	Coloración anaranjada	
CUMARINAS	NH <sub>4</sub> OH o: 0 NaOH 10%	Fluorescencia celeste.	
INDOLINOL	vanilina clorhídrica	Coloración azul	
INDOLINOL	Vanilina - HCl	Rojo grosella	

**Elaboración:** los ejecutores

**Leyenda:**

- (-) : la coloración o precipitado no se evidencia.
- (+) : la coloración o precipitado es leve.
- (++) : la coloración o precipitado es moderada.
- (+++) : la coloración o precipitado es notable.

Anexo N° 18. Ficha de validación del instrumento de la marcha fitoquímica

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO**

**1. DATOS GENERALES:**

1.1. Apellido y nombres del experto : Dra. Q.F. Teresa Morales G.

1.2. Cargo e Institución donde labora : Docente - UNIV

1.3. Registro colegio profesional : 03342

1.4.-Nombre de instrumento : Instrumento de recolección de datos para la marcha fitoquímica del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado)

**Instrucciones:** Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia, le solicitamos que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación. Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poca	2.-Poca	3.-Regular	4.-Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTAJACIÓN				
		1	2	3	4	5
11. Claridad	El instrumento está formulado con un lenguaje apropiado.				✓	
12. Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables.				✓	
13. Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos.					✓
14. Organización	El instrumento tiene una organización lógica.					✓
15. Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.					✓
6.- Intencionalidad	Es adecuado para relacionar las variables en mención.					✓
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la farmacéutica como de la bioquímica.					✓
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables.					✓
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					✓
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico.					✓
<b>Total</b>						36.5

**III. PROMEDIO DE VALORACIÓN:** 4.1

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar

Firma del Experto  
Dra. Q.F. Teresa Morales G.

Anexo N° 19. Instrumentos de recolección de datos para la determinación del efecto antibacteriano del látex *Croton lechleri* Müll. Arg. frente a *S. aureus* ATCC 6538

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL LÁTEX DE *Croton lechleri* (SANGRE DE GRADO) FRENTE A *Staphylococcus aureus***

**FICHA DE OBSERVACIÓN**

**OBJETIVO:** Identificar la sensibilidad del *Staphylococcus aureus* frente a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% del látex de *Croton lechleri* (Sangre de grado).

**FUNDAMENTO:** El método de difusión en agar Cilindro-placa, basado en el trabajo de Kirby Bahuer, validado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) es utilizado para la determinación el efecto antibacteriano de los antibióticos, como lo estipula la USP 40, en su apartado de pruebas biológicas (antibióticos valoraciones microbiológicas).

**INSTRUCCIONES:** Medir con una regla o vernier en mm, los halos de inhibición en cada placa, según cada concentración y registrar los datos en la tabla.

**FECHA:**

Lectura de los halos de inhibición en mm por el método de difusión en agar cilindro placa en 100 µl

N° DE ENSAYOS	Concentración (%) látex de <i>Croton lechleri</i> 100 µl				Control (+) Oxacilina 1 µg	Control (-) Agua destilada
	LONGITUD DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)				1 µg	100 µl
	25%	50%	75%	100%		
1						
2						
3						
4						
5						
Promedio						

**Elaboración:** Los ejecutores

**Escala de Interpretación Duraffourd y Lapaz:**

Nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm.  
Sensible (+): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.  
Muy sensible (++) : para un diámetro entre 14 y 20 mm.  
Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm

Anexo N° 20. Ficha de validación para la determinación del efecto antibacteriano del látex *Croton lechleri* frente a *S. aureus* ATCC 6538

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO**

**1. DATOS GENERALES:**

1.1. Apellido y nombres del experto: Dr. F.F. Pedro Jacinto Heredia  
1.2. Institución donde labora : Desp. V.I.G.  
1.3. Registro colegio profesional : 17.192  
1.4.-Nombre de instrumento : Instrumento de recolección de datos para determinar el efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) frente a *Staphylococcus aureus*

**Instrucciones:** Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia, le solicitamos que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación. Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTAJACIÓN				
		1	2	3	4	5
16. Claridad	El instrumento está formulado con un lenguaje apropiado.					X
17. Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables.					X
18. Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos.				X	
19. Organización	El instrumento tiene una organización lógica.				X	
20. Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.				X	
6.- Intencionalidad	Es adecuado para relacionar las variables en mención.				X	
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la farmacéutica como de la bioquímica.				X	
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables.				X	
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación				X	
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico.				X	
Total						50

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 50


Firma del Experto

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar



Anexo N° 21. Equipo de medida para los halos de inhibición





**Metrolab**  
METROLOGÍA Y LABORATORIO S.A.C.

**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**      **MLL-002-2018**

Página : 1 de 3  
Fecha de emisión : 2018-02-21

- 1. SOLICITANTE** : YOBEL SUPPLY CHAIN MANAGEMENT S. A.  
DIRECCIÓN : Av. San genaro N° 150, Urb. Mollitalia - Los Olivos
- 2. INSTRUMENTO DE MEDICIÓN** : PIE DE REY

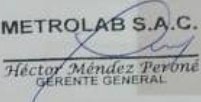
MARCA : MITUTOYO  
 MODELO : CD-6" ASX-B  
 N° DE SERIE : 14906882  
 ALCANCE DE INDICACIÓN : 0 mm - 150 mm  
 RESOLUCIÓN : 0,01 mm  
 CÓDIGO N° : CDC002 (\*)  
 PROCEDENCIA : Japón  
 TIPO DE INDICACIÓN : Digital  
 LUGAR Y FECHA DE CALIBRACIÓN : Laboratorio de Metrolab, 19 de febrero de 2018
- 3. MÉTODO Y PATRÓN DE MEDICIÓN**

La calibración se realizó por comparación directa según PC-012 Edición 5ta - Agosto 2012. Procedimiento de calibración de pie de rey.  
 Anillo patrón, serie N° 120470, con certificado de calibración N° LLA-465-2017.  
 Cilindro patrón, serie N° 1005812, con certificado de calibración N° LLA-467-2017.  
 Bloque patrón grado 0, serie N° 9910063, con certificado de calibración N° LLA-262-2017.  
 Bloque patrón grado 1, serie N° 9909270, con certificado de calibración N° LLA-C-043-2017.  
 Calibrados por el INACAL-DM, con trazabilidad a los patrones nacionales y en concordancia con el sistema internacional de unidades de medida (SI).
- 4. CONDICIONES AMBIENTALES**


La calibración se realizó bajo las siguientes condiciones ambientales:  
 Temperatura: 20 °C ± 2 °C
- 5. OBSERVACIONES**

(\*) Código indicado en una etiqueta adherida a la caja que contiene al instrumento.  
 Con fines de identificación se colocó una etiqueta autoadhesiva de con la indicación "CALIBRADO".  
 La periodicidad de las calibraciones está en función del uso, conservación y mantenimiento del medio de medición.

**METROLAB S.A.C.**




Héctor Méndez Ferón  
GERENTE GENERAL



**METROLAB S.A.C.**



Jorge Luis Pacheco Cristóbal  
Gerente técnico



Av. Guardia Peruana N° 381 Urb. Matellini - Chorrillos . Lima - Perú  
**Teléfonos:** 637 3138 / 637 3139    **Entel:** 994 221 268    **RPC:** 987 940 137  
**email:** atencion\_al\_cliente@metrolabsac.com / metrologia@metrolabsac.com / soporte\_tecnico@metrolabsac.com