

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE EXTRACTO DE MOSQUERA (*Croton
elegans*.) FRENTE A: (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus
pyogenes* ATCC: 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619 y *Streptococcus
mutans* ATCC: 25175), PATÓGENOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**AUTOR:
OMAR LEONARDO ORDÓÑEZ REA**

**TUTORA:
TATIANA DE LOS ÁNGELES MOSQUERA TAYUPANTA**

Quito, abril del 2016

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo Omar Leonardo Ordóñez Rea, con documento de identidad N° 1720214400, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud que soy el autor del trabajo de grado **“EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE EXTRACTO DE MOSQUERA (*Croton elegans*.) FRENTE A: (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619 y *Streptococcus mutans* ATCC: 25175), PATÓGENOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS”** mismo que ha sido para optar el título de: **INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Omar Leonardo Ordóñez Rea

Cédula: 1720214400

Fecha: Marzo 15 del 2016

DECLARATORIA DE COAUTORIA TUTOR

Yo declaro bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el Proyecto de investigación, “EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE EXTRACTO DE MOSQUERA (*Croton elegans*.) FRENTE A: (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619 y *Streptococcus mutans* ATCC: 25175), PATÓGENOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS” realizado por Omar Leonardo Ordóñez Rea, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Marzo del 2016



Ing. Tatiana De Los Ángeles Mosquera Tayupanta

C.I: 1711668010



Omar Leonardo Ordóñez Rea

C.I: 1720214400

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
Marco Teórico	4
1.1 Droga	4
1.2 Familia Euphorbiaceae	4
1.2.1 <i>Croton elegans</i> Kunth	5
1.2.1.1 Taxonomía	5
1.2.1.2 Descripción botánica	6
1.2.1.3 Distribución geográfica	6
1.2.1.4 Propiedades farmacológicas	7
1.3 Extracción	7
1.3.1 Técnica de extracción por disolvente	8
1.3.1.1 Maceración	8
1.3.1.1.1 <i>Producto extractivo</i>	9
1.4 Tamizaje fitoquímico	10
1.5 Agentes patógenos de las vías respiratorias	15
1.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15
1.5.2 <i>Sreptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	16
1.5.3 <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	17

1.5.4 <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	17
1.6 Método de evaluación antimicrobiana	18
Capítulo 2	20
Marco metodológico	20
2.1 Lugar de recolección	20
2.2 Recolección de la planta medicinal	20
2.3 Desinfección y secado del material vegetal	21
2.4 Proceso de obtención del extracto	21
2.5 Control de calidad del extracto de <i>Croton elegans</i>	22
2.5.1 Análisis organoléptico	23
2.5.1.1 Olor	23
2.5.1.2 Color.....	23
2.5.1.3 Sabor	23
2.5.2 Parámetros físicos	24
2.5.2.1 Densidad.....	24
2.5.2.2 Índice de refracción.....	25
2.5.2.3 Sólidos totales	25
2.5.3 Parámetros Químicos	26
2.5.3.1 Acidez (pH).....	26
2.5.4 Ensayo cualitativo.....	27

2.5.4.1 Tamizaje fitoquímico	27
2.5.4.1.1 <i>Ensayo de dragendorff</i>	27
2.5.4.1.2 <i>Ensayo de mayer</i>	27
2.5.4.1.3 <i>Ensayo de wagner</i>	28
2.5.4.1.4 <i>Ensayo de borntrager</i>	28
2.5.4.1.5 <i>Ensayo de catequinas</i>	28
2.5.4.1.6 <i>Ensayo de resinas</i>	28
2.5.4.1.7 <i>Ensayo de fehling</i>	29
2.5.4.1.8 <i>Ensayo de espuma</i>	29
2.5.4.1.9 <i>Ensayo de Ninhidrina</i>	29
2.5.4.1.10 <i>Ensayo de kedde</i>	29
2.5.4.1.11 <i>Ensayo de antocianidinas</i>	30
2.5.4.1.12 <i>Ensayo de shinoda</i>	30
2.6 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	30
2.6.1 Activación de las cepas bacterianas.....	31
2.6.2 Preparación del inóculo	31
2.6.3 Elaboración del patrón referencia	32
2.6.4 Método de siembra por difusión en pozo modificado	32
2.6.5 Lectura e Interpretación de resultados	33
2.6.6 Método estadístico	34

2.6.6.1 Modelo Anova de una vía	34
Capítulo 3	37
Resultado y discusión.....	37
3.1 Control de calidad del extracto <i>Croton elegans</i>	37
3.1.1 Análisis organoléptico	37
3.1.2 Análisis físicos.....	38
3.1.2.1 Densidad.....	38
3.1.2.2 Índice de refracción.....	39
3.1.2.3 Sólidos totales	40
3.1.3 Análisis químicos.....	41
3.1.4 Análisis cualitativo	42
3.1.5 Patrón de referencia	44
3.1.6 Actividad antimicrobiana del extracto de <i>Croton elegans</i>	44
3.1.7 Análisis estadístico	48
3.1.7.1 Análisis de varianza de una vía de la actividad inhibitoria del extracto Croton elegans a concentración 25% frente a: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Streptococcus pneumoniae ATCC 25175, Streptococcus mutans ATCC 49619 y Streptococcus pyogenes ATCC 19615.....	48
3.1.7.2 Análisis de varianza de una vía del extracto Croton elegans a concentración 50% frente a: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Streptococcus	

pneumoniae ATCC 25175, Streptococcus mutans ATCC 49619 y Streptococcus pyogenes ATCC 19615	52
3.1.7.3 Análisis de varianza de una vía del extracto Croton elegans en concentración 25% y 50% frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923	55
3.1.7.4 Análisis de varianza de una vía del extracto Croton elegans en concentración 25% y 50% frente a Streptococcus pneumoniae ATCC 25175	56
3.1.7.5 Análisis de varianza de una vía del extracto Croton elegans en concentración 25% y 50%. Frente a Streptococcus mutans ATCC 49619	58
3.1.7.6 Análisis de varianza de una vía del extracto Croton elegans en concentración 25% y 50% frente a Streptococcus pyogenes ATCC 19615	59
Conclusiones	62
Recomendaciones.....	64
Referencias.....	66

Índice de tablas

Tabla 1: Métodos de extracción	8
Tabla 2: Relación droga/extracto según el producto extractivo.....	10
Tabla 3: Análisis de calidad	22
Tabla 4: Contenido del análisis de varianza.....	35
Tabla 5: Análisis organolépticos	37
Tabla 6: Densidad de las concentraciones al 25% y 50%	38
Tabla 7: Índice de refracción del extracto al 25% y 50%	39
Tabla 8: Sólidos totales para extracto al 25%	40
Tabla 9 Sólidos totales para extracto al 50%	40
Tabla 10: Valor de pH del extracto al 25% y 50%	41
Tabla 11: Cuadro de compuestos químicos del análisis cualitativo.....	42
Tabla 12: Valores del patrón referencia de Penicilina Clemizol.....	44
Tabla 13: Promedio en milímetros (mm) de halos de inhibición de los extractos 25% y 50% en las bacterias <i>Streptococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Staphylococcus pneumoniae</i> ATCC 25175, <i>Staphylococcus mutans</i> ATCC 49619, <i>Staphylococcus pyogenes</i> ATCC 19615.....	45
Tabla 14: Anova de una vía del extracto <i>Croton elegans</i> a concentración 25% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 49619 y <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	48

Tabla 15: Test Tukey del extracto <i>Croton elegans</i> a concentración 25% frente a: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 49619 y <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	50
Tabla 16: Anova de una vía del extracto <i>Croton elegans</i> a concentración 50% <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 49619 y <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	52
Tabla 17: Test Tukey del extracto <i>Croton elegans</i> a concentración 50% frente a: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 49619 y <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	53
Tabla 18: Anova de una vía del extracto <i>Croton elegans</i> en concentración 25% y 50% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	55
Tabla 19: Anova de una vía del extracto <i>Croton elegans</i> en concentración 25% y 50% frente a <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 25175	56
Tabla 20: Test Tukey del del extracto <i>Croton elegans</i> en concentración 25% y 50% frente a <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 25175	57
Tabla 21: Anova de una vía del extracto <i>Croton elegans</i> en concentración 25% y 50% para <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 49619	58
Tabla 22: Anova de una vía del extracto <i>Croton elegans</i> en concentración 25% y 50% frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.....	59
Tabla 23: Test Tukey del extracto <i>Croton elegans</i> en concentración 25% y 50% frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.....	60

Índice de figuras

Figura 1: Promedio en mm de los halos de inhibición de las concentraciones de 25% y 50% del extracto de <i>Croton elegans</i>	46
---	----

Índice de ecuaciones

Ecuación 1: Densidad relativa a 25 °C:	24
Ecuación 2: Cálculo del índice de refracción.....	25
Ecuación 3: Cantidad de sólidos totales.....	26
Ecuación 4: Dilución de patrón referencia.....	32

Resumen

En nuestro país existe una variedad de plantas medicinales algunas de ellas sin estudios científicos y poco investigadas como es el caso de la especie *Croton elegans*, el uso etnobotánico de la misma permite deducir cierta actividad antimicrobiana, siendo este el fundamento que determinó el ensayo sobre algunas bacterias causantes de afecciones respiratorias como: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus pneumoniae* ATCC (49619), *Streptococcus mutans* ATCC (25175) y *Streptococcus pyogenes* ATCC (19615). Se realizó una maceración con las hojas secas trituradas en alcohol al 90% por dos días y se obtuvo un extracto fluido en dos concentraciones al 25% y 50%. Con los extractos fluidos se realizaron pruebas fitoquímicas cualitativas y pruebas de actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en pozo modificado. Los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas evidencian la presencia de resinas, aminoácidos, flavonoides, catequinas, alcaloides y quinonas. En las pruebas de actividad antibacteriana ninguna de las dos concentraciones de extractos presento actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en el caso de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, ambas concentraciones presentaron actividad inhibitoria, el análisis estadístico determina que la concentración al 50% es más efectiva con un halo de inhibición de 11,74 mm, con el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, ambas concentraciones presentaron actividad inhibitoria, pero estadísticamente ninguna de las dos concentraciones es más efectiva, el *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, ambas concentraciones presentaron actividad inhibitoria, siendo en este caso estadísticamente efectiva la concentración al 25% con un halo de 15,16 mm.

Palabras clave: *Croton elegans*, actividad inhibitoria, patógenos respiratorios

Abstract

In our country there is a variety of medicinal plants some of them without scientific studies and little investigation that is the case of the species *Croton elegans*, the ethnobotanical use of it allows us to deduce some antimicrobial activity, this being the fundament that determined the essay on some respiratory disease causing bacteria such as: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus pneumoniae* ATCC (49619), *Streptococcus mutans* ATCC (25175) y *Streptococcus pyogenes* ATCC (19615). Maceration with dry crushed leaves in 90% alcohol was performed for two days and a fluid extract was obtained in two concentrations 25% and 50%. With the extracts, phytochemical qualitative and antimicrobial activity tests were performed by the modified well diffusion method. The obtained results in the phytochemical tests show presence of resins, amino acids, flavonoids, catechins, alkaloids, quinones. The antibacterial activity tests on either extract concentrations showed no activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, in the case of *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, both concentrations presented with inhibitory activity, the statistical analysis determines that a 50% concentration is more effective with a halo of 11.74 mm, with *Streptococcus mutans* ATCC 25175, both concentrations had inhibitory activity, but statistically neither concentration showed more effectiveness above the other, in *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, both concentrations had inhibitory activity, statistically concentration 25% was more effective with a halo of 15.16 mm.

Key words: *Croton elegans*, inhibitory activity, respiratory pathogens

Introducción

El estudio de Balslev (2008, pág. 2) de las 5172 especies útiles en el Ecuador, el 60% son medicinales, el 55% son fuente de materiales como los usados para construcción, el 30% son comestibles y el 20% son utilizadas para ritos religiosos y cosas similares. Siendo en la actualidad la “mosquera” (*Croton elegans*) una planta medicinal, de esta especie la referencia bibliográfica es escasa, y se encuentra registrado un estudio publicado por (Barrionuevo, 2011, pág. 1) cuyo tema de investigación fue (Evaluación del extracto etanólico de mosquera “*croton elegans*”, en concentraciones de 10, 20 y 30% a dosis de 2ml; en cicatrización post- quirúrgica en ovario histerectomía en caninas mestizas, en el Centro de Gestión Zonal Animal de Carapungo en el Distrito Metropolitano), la falta de estudios en esta especie representa una necesidad de investigación que permita confirmar científicamente su uso etnobotánico.

Según Cerón (2006, pág. 288) en su investigación de Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos, registra 255 especies de plantas medicinales silvestres utilizadas dentro la medicina natural, listado en el que consta la mosquera (*Croton elegans*), especie endémica del país, utilizada contra inflamaciones, dolor molar, cicatrizante, amigdalitis, verrugas, baño vaginal.

Considerando el uso etnobotánico contra inflamaciones, dolor molar, cicatrizante, amigdalitis y otros y ante la falta estudios de la especie se ve, la oportunidad de cubrir

este espacio, el uso etnobotánico permite deducir la posible actividad antibacteriana de la especie vegetal hacia agentes biológicos patógenos, actividad que podría ser aprovechada en el uso de afecciones respiratorias, afecciones que en el Ecuador según los datos del Ministerio de Salud Pública (2014), en los 4 últimos años ha ido decayendo gracias a las campañas de salud, pero aún existe prevalencia, se registran en el 2011 (3'142295 casos), 2012 (3'163923 casos), 2013 (2'771659 casos), 2014 (2'267912 casos).

Entre las bacterias que se aíslan de afecciones respiratorias como en la bronquitis crónica y en las sobreinfecciones de las bronquiectasias y la fibrosis quística se menciona el *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* entre otras bacterias (Pratz, 2008, pág. 37).

El trabajo de investigación enfocó como principal objetivo evaluar la acción antibacteriana de extracto de mosquera (*Croton elegans*) frente a: (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619 y *Streptococcus mutans* ATCC: 25175), patógenos de enfermedades respiratorias.

Para la realización del trabajo experimental se identificó la taxonomía de la especie *Croton elegans* recolectada, se obtuvo el extracto de la especie *Croton elegans* mediante métodos que determinen mayor concentración activo, y se determinó la actividad

antibacteriana del extracto de *Croton elegans* sobre las bacterias responsables de afecciones respiratorias.

Las conclusiones de la investigación se fundamentan en la hipótesis que el extracto de *Croton elegans* en dos concentraciones diferentes presenta acción antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619 y *Streptococcus mutans* ATCC: 25175 causantes de afecciones respiratorias y si una de las concentraciones del extracto *Croton elegans* presenta actividad antimicrobiana diferente a la otra.

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1 Droga

Se le denomina a cualquier sustancia de origen mineral, vegetal o animal que tiene uso en la medicina e industrias. Principalmente proviene de origen vegetal el que contiene principios activos (Muñoz, 2012, pág. 15).

1.2 Familia Euphorbiaceae

Es una familia con cerca de 322 géneros y 8910 especies que van desde grandes árboles leñosos a malas hierbas simples e incluyen importantes especies económicas (Poltronieri, 2015, pág. 87).

Es una de las familias con mayor variedad genética y con mucha abundancia en los trópicos. Muchas de ellas producen latex y gran variedad de ellas son de importancia por la producción de recursos como caucho, aceite de tung, ricino y tapioca (Loughmiller, 2006, pág. 40).

También son conocidas por producir aporfina, piridina, indol, y alcaloides tipo tropano, lignanos, derivados de floroglucinol, diferentes tipos de terpenos, elagitaninos, proantocianinas, glucósidos cianogénicos, antroquinonas, epóxidos de ácidos grasos (Wiar, 2006, pág. 163).

Alrededor de 150 especies de plantas dentro de esta familia son usadas para fines medicinales en la costa del Pacífico, sobre todo en aliviar el estreñimiento, promover la micción, para calmar la inflamación y promover la expectoración. Los taninos hidrolizables y diterpenos son predominantes y responsables de las propiedades médicas de *Euphorbiaceae* (Wiar, 2006, pág. 163).

En el Ecuador alrededor de 258 plantas registradas están dentro de la familia *Euphorbiaceae*, 118 especies se consideran útiles, es decir que pueden ser medicinales o fuente de madera u otros recursos (Balslev, 2008, pág. 8).

***1.2.1 Croton elegans* Kunth**

Se realiza una división para su mejor entendimiento.

1.2.1.1 Taxonomía

Según tropicos, (2016, pág. 1).

“Clase: Equisetopsida

Subclase: Magniliidae Novák ex Takht

Superorden: Rosanae Takht

Orden: Malpighiales Juss ex Bercht & J. Presl

Familia: Euphorbiaceae Juss

Género: *Croton* L.

Especie: *elegans* Kunth

Nombre común: mosquera, purga”

1.2.1.2 Descripción botánica

Según la descripción por Barrionuevo (2011, pág. 1).

Raíz. - Fasciculada

Tallo. - Arbustivo

Hoja. - Lanceolada con nervadura. Haz verde y envés anaranjado.

Flor. - Racimos terminales

Fruto. - No posee

Semilla. – Grano

1.2.1.3 Distribución geográfica

El *Croton elegans* es un arbusto endémico de los Andes del Ecuador, distribuida desde la provincia del Carchi hasta el sur del país en la provincia del Azuay. Se la encuentra a una altitud de 1000 a 2,500 msnm, a lo largo de las carreteras de los valles del Chota, Vilcabamba y Guayllabamba, también en las zonas secas del valle interandino. Su

principal amenaza son los incendios, la tala de bosques por las plantaciones de pino y cipreses, y el pastoreo. Se desconoce que exista dentro de las áreas de protección del Ecuador y la especie vegetal no se encuentra amenazada según la (IUCN, 2015).

1.2.1.4 Propiedades farmacológicas

El aceite de las semillas es irritante, rubefaciente y catártico. La resina o gomorresina de esta especie se aplica en gotas directamente en las muelas con presencia de caries y en las encías sangrantes. Se utilizan de 3 a 5 gotas de resina para curar la amigdalitis y la angina. La infusión de la planta se usa como gargarismo para curar la amigdalitis. Se le usa también como desinfectante de llagas. La infusión se utiliza como baño para inflamaciones vaginales. La infusión de las hojas se usa para el tratamiento de úlceras gástricas y cancerosas (Barrionuevo, 2011, pág. 25).

1.3 Extracción

Se utiliza este término farmacéuticamente cuando implica la separación en fracciones de partes activas de tejidos vegetales o animales de elementos inertes utilizando solventes selectivos para el proceso de extracción (Remington, 2003, pág. 874).

Los extractos constituyen la fracción no volátil de los principios activos que contiene una planta y se obtiene por método mecánico o mediante disolventes como lo muestra a continuación.

Tabla 1:

Métodos de extracción

Extracción	Temperatura Grado Celsius
Maceración	20-25
Percolación	20-25
Digestión	55
Infusión	90-100
Decocción	90-100

Nota: Tomado de *Remington farmacia*, A. Gennaro., 2000.

1.3.1 Técnica de extracción por disolvente

Consiste en la difusión de los principios activos presentes en la droga. Para que los principios activos pasen al solvente, este solvente tiene que penetrar en la droga y los principios activos polares a él, se mezclan con el disolvente y son transportados en este. Los disolventes pueden ser: agua, alcohol o mezclas de ambos y disolventes orgánicos como benceno y cloroformo (Eva, 2012, pág. 166).

1.3.1.1 Maceración

Se basa en poner la droga triturada junto con el solvente, durante algunos días. El hinchamiento de la droga es importante ya que aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente. La velocidad con la que se obtiene el equilibrio está en función del tamaño de la partícula de la droga molida, grado de hinchamiento de la

célula y de las propiedades del solvente como su viscosidad y polaridad (Sharapin, 2000, pág. 41).

1.3.1.1.1 Producto extractivo

Cuando se obtienen los componentes activos de la droga mediante maceración o percolación, la preparación puede estar lista para su uso como agente medicinal en forma de tinturas o extractos fluidos con los que se puede seguir procesando para realizar un extracto sólido o semisólido (Remington, 2003, pág. 873).

En la tabla 2, se indica la relación droga/extracto según el producto a obtener, en nuestro caso al requerir un extracto fluido la relación 1:1, esto significa que el primer dígito es correspondiente a la droga y el segundo al extracto.

Tabla 2:

Relación droga/extracto según el producto extractivo

Productos extractivos	Relación Droga/extracto
A) Productos obtenidos por destilación:	
Aceites esenciales o esencias	*
Aguas destiladas aromáticas	1:5
Alcoholatos	*
B) Extractos obtenidos por acción de uno o más disolventes sobre la droga:	
Tinturas	1:5 (algunas 1:10)
Tinturas madres homeopáticas	*
Extractos fluidos	1:1
Extractos blandos	*
Extractos secos/nebulizados	Aprox. 5:1
Extractos glicólicos	1:5
Extractos hidroglicólicos	1:5
Extractos oleosos	*

Nota: * Específica para cada caso, tomado de *Vanaclocha*, B. Cañigüeral, 2003.

1.4 Tamizaje fitoquímico

Consiste en la extracción cualitativa de los grupos químicos activos en una planta y con ello guiar el aislamiento de los grupos de interés. Los diferentes extractos obtenidos son

sometidos a reacciones cualitativas generalmente de coloración, confirmando o no la presencia de compuestos químicos (Sharapin, 2000, pág. 198).

Los grupos investigados en la especie de estudio son:

1.4.1 Saponinas

Son un grupo de glucósidos amorfos coloidales muy hidrosolubles que producen espuma y son excelentes agentes emulsionantes (Remington, 2003, pág. 477).

Para identificar la presencia de saponinas (glicósidos esteroides), se aprovecha la presencia de un núcleo espirostano que tiene la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y formar espuma abundante y estable al agitar en soluciones acuosas (Martínez A. , 2001, pág. 2).

1.4.2 Resinas

Son exudados vegetales propios de algunas familias de plantas originados por polimerización y oxidación de derivados terpénicos. Son insolubles en agua y no volátiles, a temperatura ambiente son sólidas, pero se convierten en líquidas con el calor (Jardín Botánico, 2011).

Para obtener presencia de constituyentes resinosos, se trata con exceso de agua para precipitar sus componentes y dar una tener una respuesta (farmacognosia, 2015).

1.4.3 Antocianidinas

Constan de un anillo aromático unido a un anillo heterocíclico que contiene oxígeno, el cual está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático. El esqueleto básico de las antocianinas es el 2- fenilbenzopirilio de la sal de flavilio con diferentes sustituciones. Son más estables en un medio ácido que en un medio neutro o alcalino. En medio ácido la forma predominante es la del ión flavilio, el cual da el color rojo; a medida que el pH se eleva, las antocianinas se transforman en una base quinónica de color azulado (SantaCruz, 2011, pág. 10).

1.4.4 Aminoácidos

Son compuestos orgánicos que poseen un grupo amino, primario o secundario y una función ácida, un grupo carboxilo, en algunos casos un sulfito o fosfato (Fuentes, 1998, pág. 703).

Para la identificación de aminoácidos se utiliza el reactivo de ninhidrina (agente oxidante), que reacciona con todos los aminoácidos a un pH 4-8 para dar un compuesto de color púrpura. Esta reacción se da con aminas primarias y amoniaco, pero sin desprendimiento de CO₂ (UNAD, 2000).

1.4.5 Quinonas

Los 1,2- y 1,4- dihidroxi compuestos aromáticos se oxidan rápidamente, dando las correspondientes quinonas (Geissman, 1973, pág. 755).

Las antraquinonas dan coloración rojiza en medio acuoso alcalino frente a la reacción de Borntrager, esto debido al estado de resonancia de los OH fenólicos (FCN, 2011, pág. 82).

1.4.6 Azúcares reductores

Son monosacáridos o disacáridos que pueden o no ceder electrones a otras moléculas y puede actuar como agente reductor (Oxford, 2003, pág. 66).

La reacción de Fehling permite distinguir entre azúcares los que contienen un grupo carbonilo y reducen la solución a azúcares reductores y aquellos otros que no contienen un grupo carbonilo libre y son no reductores (sacarosa) (Fieser, 1985, pág. 270).

Los azúcares reductores, en medio alcalino, son capaces de reducir el ión Cu^{2+} de color azul a Cu^{+} de color rojo. Para ello el grupo carbonilo del azúcar se oxida a grupo carboxilo (Bioquímica, 2011).

1.4.7 Alcaloides

Son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno básico, se caracterizan por ser insolubles en el agua y reaccionan con los ácidos para formar sales (Anaya, 2003, pág. 53).

Para su identificación el alcaloide en estado de sal (extracto ácido), combinado con el yodo de los reactivos de Wagner (yodo-yoduro de potasio), Mayer (mercurio tetrayoduro de potasio) y Dragendorff (tetrayodo bismuto de potasio), y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, estos forman precipitados dando resultados positivos de aparición (Arango, 2008, pág. 7).

1.4.8 Cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de gama-lactona, alfa,β-insaturada o delta-lactona-alfa,β-insaturada, que actúan sobre el músculo cardiaco (FCN, 2011, pág. 83).

En presencia de ácido 3,5 dinitrobenzoico y medio alcalino da la aparición de color azulado, rosa hasta violáceo, indica reacción positiva, debido a la presencia de lactona butenólida (α -insaturada) (FCN, 2011, pág. 83).

1.4.9 Catequinas

Son unidades monoméricas de los flavonoides condensados. Se ha encontrado que ejerce efectos protectores sobre el tejido conectivo (Marcano, 2002, pág. 176).

Estos actúan como agentes anti-oxidantes, anticancerígeno, anti-inflamatorio, anti-envejecimiento entre otros (Sreekumari, 2011, pág. 239).

Las catequinas no son sustancias curtientes. Se transforma en estas mediante reacciones de condensación (Klages, 1968, pág. 470).

1.4.10 Flavonoides

Son metabolitos secundarios de tipo fenilpropano que se encuentran como *O*-glicósidos en sus fuentes naturales, aunque también se encuentran de forma natural como agliconas o como *C*-glicosidos (Vivar, 2006, pág. 63).

Las propiedades y efectos en el ser humano son como antioxidantes, antivirales, antiinflamatorios y anticancerígenas (Causse, 2010, pág. 45), también se les atribuye

como protectores capilares y venosos, diuréticas, espasmolíticas, antiinflamatorias y antibacterianas (Vanaclocha, 2003, pág. 30).

Para su identificación con el reactivo de Shinoda los flavonoides con el núcleo benzopirona, producen coloraciones rojizas cuando a las disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido por HCl concentrado (Martínez A. , 2005, pág. 20).

1.5 Agentes patógenos de las vías respiratorias

Los microorganismos que mayoritariamente se aíslan de infecciones humanas respiratorias que causan problemas graves son: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, todas estas bacterias asociadas con enfermedades de las vías respiratorias altas y bajas (Forbes, 2009, pág. 265).

1.5.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Las bacterias del género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos, de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, que se congregan de forma irregular. Los estafilococos son bacterias inmóviles, no forman esporas y no poseen cápsula y raras ocasiones son anaerobias facultativas. La característica principal de esta bacteria es la producción de la enzima coagulasa, que permite coagular el plasma (Pahissa, 2009, pág. 17).

Las infecciones más importantes dadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) son la endocarditis y neumonía que están asociadas a infecciones adquiridas en los hospitales (Pahissa, 2009, pág. 17)

Entre otras de las enfermedades más destacadas se mencionan: Sinusitis, Meningitis, Bronquitis, Neumonía entre otras más (Lozoya, 2013).

1.5.2 *Sreptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Son células Gram positivas. Son vistos como pares de cocos (diplococos), aunque también pueden producirse por separado y en cadenas cortas. Las células oscilan entre 0,5 y 1,25 μm de diámetro. No forman esporas, y son inmóviles. Al igual que otros estreptococos, carecen de catalasa y fermentan glucosa en ácido láctico (Todar, 2012).

Una de estas bacterias es *Sreptococcus pneumoniae* causante de la neumonía. Esta bacteria es la causa frecuente de esta enfermedad debido a su variación genética lo que impide que los individuos desarrollen una memoria inmunológica eficaz contra todas las cepas. *Sreptococcus pneumoniae* ha evolucionado como resultado de la respuesta inmunitaria de los huéspedes humanos (Pharman, 2006, pág. 306).

Sreptococcus pneumoniae se adhiere e invade las células epiteliales respiratorias. Hay un alto grado de presencia en personas saludables y en especial de niños. *Sreptococcus pneumoniae* es transmitida de persona a persona vía respiratoria. También es un caso común de sinusitis y otitis media (Lydyard, 2010, pág. 8).

1.5.3 *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativa, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2, en aproximadamente 24 horas (Ojeda, 2013, pág. 5).

En la familia de los estreptococos del grupo viridans (SGV) son residentes habituales de la mucosa oral, respiratoria, gastrointestinal de los mamíferos y del aparato genital en la mujer, el cual es de importancia en la prevención de la colonización de patógenos potenciales. Este grupo de SVG se encuentran *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans* que son bacterias importantes implicadas en las caries dentales que son seres que no comprometen la vida, constituyendo una de las patologías más frecuentes en la sociedad (Fernández, 2009, pág. 1).

1.5.4 *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Los estreptococos son organismos anaerobios facultativos y Gram Positivos que a menudo aparecen formando cadenas o por pares y son catalasa-negativa. Las agrupaciones de estreptococos más importantes son A, B, y D. Entre los grupos de estreptococos, la enfermedad contagiosa (específicamente faringitis) es causada por el grupo A (Fox, 2015).

Streptococcus pyogenes (conocido como GAS) es el agente causal en las infecciones estreptocócicas del Grupo A. En el caso de la amigdalitis que no sea tratada, puede desarrollarse fiebre reumática, una afección que afecta las articulaciones y las válvulas cardiacas (Ecured, 2015).

Son la causa más habitual de faringitis bacteriana, el *Streptococcus pyogenes*, dentro de lo que son las enfermedades supurativas, también puede ser la causa de otras enfermedades graves. Entre ellas destacan la escarlatina, que es una complicación de la faringitis estreptocócica. La vía de contagio del *Streptococcus pyogenes* es la respiratoria o con el contacto directo con la piel, caso de la varicela, entre otras (Lozoya, 2013).

1.6 Método de evaluación antimicrobiana

“No existe una reglamentación ni estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas, como sí existe para los antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en los utilizados para evaluar resistencia y/o susceptibilidad a los antibióticos. Los métodos usados para evaluar la actividad de extractos de plantas sobre bacterias y hongos son similares; varía la forma de preparación del inóculo, el tipo de medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación (Alzate, 2009).”

Los métodos más utilizados en los laboratorios por su sencillez y rapidez listados por Alzate (2009, pág. 377) son:

- Técnica por difusión en agar con discos impregnados

Llamado técnica de Kirby-Bauer, la cual determina la susceptibilidad a las drogas utilizando discos de papel de filtro impregnados con cantidades conocidas de los agentes antimicrobianos a utilizar (Ingraham, 1998, pág. 494).

El antimicrobiano difunde radialmente hacia afuera y crea un gradiente de concentración por disco; así el antimicrobiano está en alta concentración cerca del disco y va disminuyendo a medida que se aleja del disco (Rodríguez, 2005, pág. 339).

- Técnica por difusión en pozos

Este método consiste en realizar una serie de pozos o hendiduras en un agar nutritivo de cinco milímetros de espesor contenido en una caja de Petri, empleando un sacabocados estéril. En cada pozo se deposita el extracto a ensayar la que se presume posee actividad biológica sobre los microorganismos indicadores (Alzate, 2009, pág. 379).

- Método de dilución en medio líquido o en medio sólido

Se realiza con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para ello se preparan una serie de placas (dilución en agar) o tubos (dilución en caldo), inoculados con un determinado volumen medio de cultivo que contiene concentraciones progresivas y crecientes del antimicrobiano a ensayar; sobre este se le adiciona el inóculo bacteriano (García, 1997, pág. 122).

Capítulo 2

Marco metodológico

2.1 Lugar de recolección

La recolección del material vegetal se la realizó en la provincia de Pichincha en la ciudad de Quito a una altitud de 2800 msnm, en el barrio de Carcelén en el sector de los Mastodontes. Posee un clima templado. El periodo de recolección se realizó en los meses de Abril-Mayo del 2015, por medio del equipo TA318 se tomó la temperatura de $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ y una humedad relativa del $37\% \pm 5$.

2.2 Recolección de la planta medicinal

La planta fue identificada por el Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, luego se procedió a su recolección silvestre en el sector los Mastodontes.

Para su recolección se tomó como materiales tijeras podadoras y sacos de yute. La parte que se tomó de la planta fue la hoja y considerando el estado óptimo de la planta para un mejor rendimiento, evitando hojas enfermas, daño de insectos, plantas no muy jóvenes ni viejas y daños mecánicos (López, 2005, págs. 76,77).

2.3 Desinfección y secado del material vegetal

Luego de recolectadas las hojas, se procedió a su desinfección para ello se utilizó hipoclorito de Sodio diluido al 1% en un recipiente amplio para un completo remojo de las hojas con un tiempo alrededor de 10 minutos en agua (Gilchrist, 2005, pág. 6).

Luego de la desinfección se procedió a secar la droga mediante el método de Secado al aire libre y al sol por dos días, con una temperatura entre 25 °C a 34 °C \pm 1 y una humedad relativa entre 20% a 25% \pm 5, referenciado con el equipo TA318, (Muñoz, 2012, pág. 312).

2.4 Proceso de obtención del extracto

Para obtener una tintura al 25% y 50% de concentración se realizó basada en la metodología referida por Miranda (2001, pág. 56).

Se trituró la droga vegetal seca, en un molino de discos metálico modelo corona y se pesó 700 g y 100 g de droga triturada para la concentración 25% y 50% respectivamente, luego se transfirió la droga molida a un recipiente y se colocó alcohol al 90% en una relación de por cada gramo de droga triturada 4 ml de alcohol es decir 2,8 L para el extracto de 25% y por cada gramo de droga triturada 2 ml es decir 200 ml para el extracto de 50%, todo esto para el proceso de humectación el que duró 30 minutos en el recipiente. Posterior al tiempo se tomó la droga humectada y se la introdujo en un percolador metálico con capacidad de 5L y se maceró por un periodo de 72 horas para ambas concentraciones. Ya concluido el tiempo se recogió 2800 ml (extracto al 25%) y 200 ml (extracto al 50%) y se la guardo en recipientes de vidrio ámbar para su posterior utilización y análisis cualitativos.

2.5 Control de calidad del extracto de *Croton elegans*

Los métodos físico-químicos, sirven para determinar las características del producto (Rodríguez, 1998, pág. 35).

Tabla 3:

Análisis de calidad

Análisis organoléptico	Parámetros Físicos	Parámetros Químicos	Ensayo Cualitativo
Color	Densidad	Acidez (pH)	Saponinas
			Catequinas
Olor	Índice de refracción		Sudan
			Shinoda
			Resinas
Sabor	Solidos totales		Felhing
			Antocianidinas
			Ninhidrina
			Borntrajer
			Wagner
			Dragendorf
			Mayer

Nota: Elaborado por Omar Ordóñez, 2015.

2.5.1 Análisis organoléptico

Se cogió una alícuota de 1 ml, y se la colocó sobre un vidrio reloj para poder realizar los respectivos análisis organolépticos.

2.5.1.1 Olor

Su identificación se realiza mediante análisis organoléptico, característica que puede ser descrita con atributos como como: Aromático, aliáceo, alcanforado, nauseabundo, desagradable y otros. (Paz, 2011, pág. 113).

También por otro autor este reconoce que existen siete olores que lo llamaría olores primarios como: alcanfor, almizcle, floral, menta, etéreo, picante y pútrido (Becker, 1977, pág. 725).

2.5.1.2 Color

Su resultado se interpreta como: Si es verde que proviene de partes aéreas de la planta; marrón de cortezas, tallos y raíces; blanco de féculas y gomas (Paz, 2011, pág. 113).

2.5.1.3 Sabor

Se la interpreta de sabor: Dulce, amargo, astringente, ácido, salino, punzante, nauseabundo, aromático (Paz, 2011, pág. 113).

2.5.2 Parámetros físicos

Para su desarrollo se realizaron a cabo los índices de: densidad, refracción y sólidos totales.

2.5.2.1 Densidad

Se pesó el picnómetro vacío y seco, luego se colocó el extracto a la temperatura de 25 °C (± 1 °C) durante 15 min., el exceso de líquido sobrenadante en el picnómetro se secó con toallas absorbentes y se procedió a pesar. Se limpió se secó nuevamente y se pesó el picnómetro con el agua destilada a 25 °C (Miranda, 2001, pág. 62).

Expresión de los resultados:

Ecuación 1:

Densidad relativa a 25 °C:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

El cual:

M1: Peso del picnómetro con la muestra (g)

M2: Peso del picnómetro con el agua (g)

M: Peso el picnómetro vacío (g).

2.5.2.2 Índice de refracción

Se colocó sobre el prisma una gota de agua destilada, se ajusta el equipo seleccionando el espectro visible que muestra una línea límite del campo visual, girando el compensador y colocando la intersección sobre el punto límite de los campos visible y oscuro para su calibración.

Luego se limpió el prisma y se colocó una gota del extracto para su medición, se cerró y se enfocó de modo que la línea horizontal quede en el centro del círculo de medición y se toma los datos (Durst, 2007, pág. 31).

Ecuación 2:

Cálculo del índice de refracción

$$N_d^{25} = N_d^t + 0.00044 (t-25)$$

Donde:

N_d^{25} = Índice de refracción a 25 °C

N_d^t = Valor leído en la escala el aparato a la temperatura

t = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044 factor de corrección por grado Celsius

2.5.2.3 Sólidos totales

Se tomó una cápsula previamente tarada y se le añadieron 5 ml con una pipeta volumétrica y se la llevó a baño maría hasta evaporar y el residuo se la llevo a la estufa a

105 °C por 3 horas hasta alcanzar peso constante. Se separó la cápsula de la estufa y se ubicó en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente (Soto, 1999, pág. 27).

Expresión de los resultados.

Ecuación 3:

Cantidad de sólidos totales

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Donde:

St= Cantidad de solidos totales (%)

Pr= Cápsula más el residuo (g)

P= Cápsula vacía (g)

V= Volumen de la porción de ensayo.

100= factor matemático para el cálculo.

2.5.3 Parámetros Químicos

Para su desarrollo se realiza un solo ensayo, el de acidez.

2.5.3.1 Acidez (pH)

Ajustamos el equipo con las soluciones amortiguadora de pH 4, 7, 10, para asegurar el correcto valor y luego introducimos el electrodo en la solución de extracto para su medición (Chacón, 2004, pág. 94).

2.5.4 Ensayo cualitativo

Las pruebas preliminares sencillas y rápidas que permitan detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos. Esto se logra mediante las técnicas de "screening" (tamizaje) (Miranda, 2001, pág. 63).

2.5.4.1 Tamizaje fitoquímico

Para su análisis se hizo los siguientes ensayos:

2.5.4.1.1 Ensayo de dragendorff

Da a reconocer en un extracto la aparición de alcaloides, se procede a evaporar el solvente en baño maría y el residuo se combina con 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua destilada. La nueva solución (acuosa ácida) se realiza el ensayo, colocando 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++) (Arango, 2008, pág. 7).

2.5.4.1.2 Ensayo de mayer

Se procede del mismo modo hasta obtener la solución ácida del ensayo de Dragendorff, Se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, agitamos y filtramos. Luego colocar de 2 a 3 gotas de la solución Mayer en la solución preparada. Luego si observar opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado coposo (+++) (Arango, 2008, pág. 7).

2.5.4.1.3 Ensayo de wagner

Preparar la solución ácida al igual que el ensayo de Dragendorff y añadir de 2 a 3 gotas del reactivo de Wagner, clasificando del mismo modo que el ensayo de Mayer (Arango, 2008, pág. 7).

2.5.4.1.4 Ensayo de borntrager

Evaporar el solvente en baño maría y el residuo se re disolver en 1 ml de cloroformo. Adicionar 1 ml de hidróxido de sodio al 5 % en agua destilada. Agitar y dejar en reposo por unos minutos. Se considera positiva si da coloración rosada, roja o violeta lo que indica la presencia de antraquinonas (Fitopolis, 2012).

2.5.4.1.5 Ensayo de catequinas

Tomar una gota del extracto con la pipeta Pasteur, y la aplicar sobre el papel filtro. Sobre la mancha se coloca la solución de carbonato de sodio. El espectro de una sombra verde carmelita en la luz UV, indica un ensayo positivo (Miranda, 2001, pág. 45).

2.5.4.1.6 Ensayo de resinas

Adicionar 2 ml de la solución alcohólica y 10 ml de agua destilada en un tubo de ensayo. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo (Jardín Botánico, 2011).

2.5.4.1.7 Ensayo de fehling

Evaporar el solvente en baño maría y el restante re disolver en 1-2 ml de agua. Adicionar 2 ml del reactivo y calentar en baño maría durante 5-10 minutos. La prueba se considera positiva si la solución da color rojo o aparece un precipitado rojo (Durst, 2007, pág. 485).

2.5.4.1.8 Ensayo de espuma

Colocar 5 veces su volumen en agua destilada en el extracto alcohólico y agitar la mezcla durante 5-10 minutos. La prueba se considera positiva si muestra espuma en la superficie del líquido por más de 2 mm de altura y permanece por más de 2 minutos, dando la identificación de saponinas (FCN, 2011, pág. 83).

2.5.4.1.9 Ensayo de Ninhidrina

Tomar una alícuota del extracto alcohólico y mezclar con 2 ml de solución al 2 % de ninhidrina en agua. Calentar por 5 a 10 minutos en baño maría. La prueba da positivo cuando muestra un color azul violáceo, permitiendo la identificación de aminoácidos (Fuentes, 1998).

2.5.4.1.10 Ensayo de kedde

Una alícuota del extracto incorporar 1 ml del reactivo de Kedde y esperar unos 5 a 10 minutos. La prueba es positiva cuando desarrolla una coloración violácea, que permanece durante 1 a 2 horas, permitiendo la identificación de glicósidos cardiotónicos (FCN, 2011, pág. 83).

2.5.4.1.11 Ensayo de antocianidinas

Calentar 2 ml del extracto alcohólico con 1 ml de HCL concentrado por 10 minutos. Enfriar y colocar 1 ml de agua destilada y 2 ml de alcohol amílico. Agitar y esperar que las dos fases se separen. La manifestación de un color rojo a marrón en la fase amílica, se considera positivo (Miranda, 2001, pág. 48).

2.5.4.1.12 Ensayo de shinoda

Diluir el extracto alcohólico con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y añadir un trocito de cinta de magnesio metálico. Después esperar 5 minutos y colocar 1 ml de alcohol amílico, mezclar las fases y esperar. La prueba se considera positiva, si el alcohol amílico se colorea en amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos (Sing, 1997, pág. 77).

2.6 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Para este ensayo se utilizaron las siguientes bacterias certificadas ATCC (American Type Culture Collection), adquiridas en Medibac: *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Streptococcus mutans* ATCC (25175), *Streptococcus pneumoniae* ATCC (49619), *Streptococcus pyogenes* ATCC (19615), como control positivo Penicilina Clemizol de concentración de un millón U.I, marca *Life*, el control negativo alcohol 90% y con los extractos a ensayar al 25% y 50%.

2.6.1 Activación de las cepas bacterianas

Para su activación se siguió las instrucciones recomendadas por el fabricante por (Microbiologics Inc, 2012)

Se abrió el paquete y se tomó la ampolla, luego se oprimió la parte superior hasta romper internamente la misma y provocar que el líquido hidrate la cepa bacteriana liofilizada, se sembró en 4 placas de Tryptic Soy Agar (TSA) para cada bacteria a excepción de *Streptococcus pneumoniae* ATCC (49619) que se sembró en cajas de agar sangre, adquiridos por la empresa Cultiprep Cia. Ltda., una vez sembradas las placas fueron incubadas en condiciones aerobias el *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) y anaerobias para el resto de bacterias a una temperatura de 37 °C por 24 horas.

2.6.2 Preparación del inóculo

Se tomó un asa estéril y de un cultivo fresco de bacteria se coge de 3 a 5 colonias del mismo tipo de morfología y se transfiere a un tubo de caldo estéril Tryptic Soy Broth (TSB) con 4 a 5 ml. El tubo de TSB es incubado a 35 °C por un lapso de 18 a 24 horas hasta alcanzar una turbidez estándar de 0,5 Mcfarland, esto resultará con una suspensión bacteriana de 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml. Luego de cumplido el tiempo de incubación del inóculo bacteriano se llevó a la centrifuga por 20 minutos con 4000 rpm para que permanezca una biomasa firme, luego se eliminó el sobrenadante y se le añadió suero fisiológico de 4 ml a 5 ml, se colocó este nuevo inóculo en un vortex de 1 a 2 minutos para su homogenización. Se configuró el espectrofotómetro a 625 nm con una absorbancia de 0,08 a 0,1 para todas las bacterias (Pratt, s.f, pág. 12).

2.6.3 Elaboración del patrón referencia

Para la disminución de la concentración se utilizó la metodología de (Guadix, 2006, pág. 247).

La presentación comercial de la Penicilina Clemizol es de 1'000.000 U.I. es decir 600.000 µg/ml y se quiere llegar a una concentración de 80 µg/ml con un volumen de 10 ml, por lo tanto, utilizamos la fórmula respectiva para diluciones.

Ecuación 4:

Dilución de patrón referencia

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

Donde:

C_1 = Concentración inicial

V_1 = Volumen inicial

C_2 = Concentración final

V_2 = Volumen final

2.6.4 Método de siembra por difusión en pozo modificado

Utilizando la metodología de (Alzate, 2009, pág. 377) se procedió con su desarrollo. Se utilizó frascos boeco de 250 ml y medio de agar (TSA) para *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) y Brain Heart Infusion (BHI) para el resto de bacterias, previamente

esterilizados los frascos boeco con su respectivo medio de cultivo fueron colocados en baño maría a una temperatura de 45 °C – 50 °C por un lapso de 40 minutos, temperatura que fue controlada con un termómetro, luego dentro de la cámara de flujo se colocó 24 ml de medio de agar en una probeta de 25 ml y 1 ml de inóculo bacteriano con una micropipeta de 1 ml, ambos se mezclaron en un vaso de precipitación estéril de 50 ml y se agitó con una espátula metálica pequeña y fue puesto en cada caja Petri por quintuplicado para cada bacteria, se esperó un lapso de 30 minutos para la solidificación del medio y luego realizar 3 cortes en cada medio solidificado con una pipeta Pasteur estéril con un diámetro promedio de 6,2 mm y en cada uno de los pocillo se colocan 50 µl de las siguientes muestras: orificio 1: extracto al 25% y 50%, orificio 2: patrón referencia (antibiótico Penicilina Clemizol) y orificio 3: blanco negativo (alcohol 90%), y fueron llevadas a las incubadoras en condiciones aerobias para *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) y anaerobias para el resto de bacterias a una temperatura de 37 °C por 24 horas.

2.6.5 Lectura e Interpretación de resultados

Después de las 24 horas de incubación, las placas son examinadas. Las zonas de inhibición deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Si se observa colonias individuales en la placa, es porque el inóculo está muy diluido y la prueba debe ser repetida. Las placas en el momento de la lectura se mantienen en un fondo negro no reflectante para facilitar su lectura. Las zonas que deben ser tomadas en cuenta son las que no se observan crecimiento visible (Pratt, s.f, pág. 13).

La medida de los halos de inhibición se las puede realizar con algún instrumento de medición digital o manual, en nuestro caso fue tomada con un Pie de rey digital.

2.6.6 Método estadístico

Para su análisis estadístico se utiliza el siguiente método.

2.6.6.1 Modelo Anova de una vía

Según esta técnica de Barón (s.f, pág. 29) cuando la distribución de datos de cada muestra tiene una distribución regular decimos que es una prueba paramétrica. Este modelo ANOVA de una vía sirve para determinar si existen diferencias significativas entre varias poblaciones (bacterias) o grupos (concentraciones) en una variable cuantitativa (halos de inhibición). Si al realizar la prueba de ANOVA se obtiene un resultado de significancia bajo $P = (X > 0,05)$, rechazaremos la hipótesis nula donde todos los grupos de medias son iguales y aceptaremos la hipótesis alternativa, el extracto de *Croton elegans* presenta acción antimicrobiana ante las bacterias causantes de afecciones respiratorias y al menos una de las concentraciones presenta actividad antimicrobiana diferente a la otra.

Una vez que el grado de significancia es menor a 0,05 se procede a realizar test a posteriori Tukey (HSD de Tukey) una técnica de comparaciones múltiples, la cual se desea saber que grupo es el que difiere uno del otro a través de la comparación de las medias (Barón, s.f, pág. 29).

Tabla 4:

Contenido del análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Tratamiento (entre grupos)	K-1=	$SCE = \sum \frac{(\sum x_{ij})^2}{n} - \frac{(\sum \sum x_{ij})^2}{N}$	$S_{EG}^2 = CME$ $= \frac{SCE}{K - 1}$	F_c $= \frac{CME}{CMD}$	0,05
Error (dentro de grupos)	K(n-1)	SCD= SCT - SCE	$S_{DG}^2 = CMD$ $= \frac{SCD}{N - K}$		
Total	(Kn)-1=	$SCT = \sum \sum (x_{ij})^2 - \frac{(\sum \sum x_{ij})^2}{N}$			

Nota: Tomado de P. Yáñez, 2007, p. 60

Donde:

K= número de grupos o columnas

n= número de filas o réplicas

N= número total de casos en el experimento

SCE =Suma de cuadrados entre grupos

SCD= Suma de cuadrados dentro de grupos

SCT= Suma de cuadrados total

CME= Cuadrado medio entre los grupos

CMD= Cuadrado medio dentro de los grupos

F_C = estadístico calculado

0,05 = nivel de significancia o error más aceptable

Capítulo 3

Resultado y discusión

3.1 Control de calidad del extracto *Croton elegans*

Para su desarrollo se realizaron análisis organolépticos, físicos, químicos y cualitativos.

3.1.1 Análisis organoléptico

Para su interpretación de resultados de olor, color y sabor se toman del literal 2.5.1.1 al 2.5.1.3.

Tabla 5:

Análisis organolépticos

Parámetros	Resultado
Olor	Etéreo
Color	Verde
Sabor	Amargo

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

El sabor amargo del extracto es característico de distintas clases como sales inorgánicas como (KI o Mg Cl₂) o sustancias fenólicas. Estas últimas en forma flavonoide que también confieren el sabor amargo (González, 2013, pág. 65). “El olor etéreo podría deberse al solvente del extracto (Lieury, 2008, pág. 135)”.

3.1.2 Análisis físicos

Para su desarrollo se hizo análisis de: densidad, totales índice de refracción y sólidos.

3.1.2.1 Densidad

Para su resultado se tomó la ecuación 1, dando:

Tabla 6:

Densidad de las concentraciones al 25% y 50%

	Concentración 25%			Concentración 50%		
	Repeticiones			Repeticiones		
	1	2	3	1	2	3
Picnometro vacio(g)	12,2379	12,2427	12,2635	26,3201	26,3206	26,3470
Picnometro + agua (g)	23,1032	23,1098	23,1046	36,0140	36,0212	36,0116
Picnometro + extracto (g)	21,3440	21,3397	21,3531	34,5852	34,5692	34,5682
Resultado (g/ml)	0,83809	0,8371	0,8384	0,8526	0,8503	0,8506
Resultado □ (g/ml)	0,8354			0,8511		

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

La densidad de los extractos a 25°C tanto de 25% (0,8354 g/ml) y 50% (0,8511 g/ml) son menores a la densidad del agua a 25 °C de (0,9971 g/ml), debido a que no existen trabajos realizados con la planta *Croton elegans* no se puede realizar una comparación.

3.1.2.2 Índice de refracción

Para su interpretación se utilizó la ecuación 2, dando:

Tabla 7:

Índice de refracción del extracto al 25% y 50%

	Concentración 25%		Concentración 50%	
	IR	Grados Brix	IR	Grados Brix
1	1,3700	23.5	1,3700	24
2	1,3700	23.5	1,3700	24
3	1,3700	23.5	1,3700	24
Resultado	1,3700	23,5	1,3700	24

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

Ambas concentraciones 25% y 50% poseen un IR (1,3700) igual y similar al del IR del agua (1,3330), debido a que no existen trabajos realizados con la planta *Croton elegans* no se puede realizar alguna comparación.

3.1.2.3 Sólidos totales

Para su interpretación se tomó la ecuación 3, dando:

Tabla 8:

Sólidos totales para extracto al 25%

	Cápsula 1	Cápsula 2	Cápsula 3
Vacío (g)	37,9271	33,1644	42,5455
Volumen (ml)	5	5	5
Seco (g)	38,1174	33,3526	42,7385
Resultado %	3,806	3,764	3,86
Resultado \bar{X} (%)	3,81		

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

Tabla 9:

Sólidos totales para extracto al 50%

	Cápsula 1	Cápsula 2	Cápsula 3
Vacío (g)	34,3454	39,2234	48,2233
Volumen (ml)	5	5	5
Seco (g)	34,5491	39,4268	48,4284
Resultado %	4,074	4,068	4,102
Resultado \bar{X} (%)	4,081		

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

La cantidad de solido total presente en el extracto de 25% (3,81 %, 3,81 g por cada 100g de planta) y 50% (4,081%, 4,081 g por cada 100g de planta), debido a que no existen trabajos realizados con la planta *Croton elegans* no se puede realizar alguna comparación.

3.1.3 Análisis químicos

Para su desarrollo se utilizó el valor marcado por el medidor de pH.

Tabla 10:

Valor de pH del extracto al 25% y 50%

Repetición	pH	
	Concentración 25%	Concentración 50%
1	6,3	5,76
2	6,28	5,76
3	6,27	5,74
Resultado	6,28	5,75

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

El punto neutro (pH 7), y zonas cercanas a 7 (6,5 a 7,5) representa la concentración de iones H^+ del agua pura, mientras que el pH de los extractos 25% (6,28) y 50% (5,75), está debajo del punto neutro (Finck, 1988, pág. 183), los dos extractos aún con las diferentes concentraciones presentan valores inferiores del punto neutro ligeramente ácidos.

3.1.4 Análisis cualitativo

Para su interpretación de cada ensayo se utilizó los literales 2.5.4.1.1 al 2.5.4.1.15

Tabla 11:

Cuadro de compuestos químicos del análisis cualitativo

Ensayo	Compuesto químico	Concentración	
		25%	50%
Espuma	Saponinas	No	No
Resinas	Resinas	Si	Si
Fehling	Az. reductores	No	No
Antocianidina	Antocianidina	No	No
Ninhidrina	Aminoácidos	Si	Si
Borntrager	Quinonas	+++	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++	+++
Mayer	Alcaloides	++	++
Wagner	Alcaloides	+++	+++
Shinoda	Flavonoides	Si	Si
Kedde	Cardiotónicos	No	No
Catequinas	Catequinas	Si	Si

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

Ante los resultados de tamizaje fitoquímico, se puede apreciar que los extractos obtenidos de las hojas de *Croton elegans* poseen algunos grupos de metabolitos

secundarios tales como: Resinas, Aminoácidos, Quinonas, Alcaloides, Flavonoides y Catequinas.

En investigaciones realizadas de tamizajes fitoquímicos del mismo género de *Croton* en Colombia, muestra que entre los compuestos hallados por (Pardo, 2014, pág. 360) en la planta *Croton leptostachyus* fueron: Saponinas, Polifenoles, Taninos, Flavonoides, Fenil-propanos, Terpenos e Iridoides y de la planta *Croton leptostachyus* por (Pérez, 2014, pág. 58) fueron: Saponinas, Polifenoles, Taninos, Flavonoides, Fenilpropanoides, Terpenos y esteroides, Iridoides, Cumarinas, Lactonas y Cardiotónicos, lo cual muestra que nuestra especie *Croton elegans* posee un mismo grupo en común los flavonoides, aunque carece de taninos, saponinas y otros compuestos, pero posee alcaloides que tienen un interés en la industria farmacéutica por su efecto en el sistema nervioso central (SNC).

En el país se menciona por Barrionuevo (2011, pág. 11) la especie *Croton elegans*, algunos metabolitos secundarios como: Alcaloides, Flavonoides, Taninos y Esteroles, que da a ver que nuestro tamizaje tiene en común los compuestos de Alcaloides y Flavonoides, aunque el resto de compuestos no se halla evidenciado por este tamizaje.

3.1.5 Patrón de referencia

Para su desarrollo se utilizó la ecuación 4.

Tabla 12:

Valores del patrón referencia de Penicilina Clemizol

Parámetro	Valor
Concentración inicial ($\mu\text{g/ml}$)	600.000
Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	80
Volumen inicial (ml)*	0,001
Volumen final (ml)	10

Nota: * Valor del resultado calculado, realizado por Omar Ordóñez, 2015.

Con el valor calculado de concentración final 80 $\mu\text{g/ml}$ para el patrón de referencia, se pudo realizar de mejor manera los ensayos, ya que usando la concentración del antibiótico de 600.000 $\mu\text{g/ml}$ los halos de inhibición son grandes e interfiere con los resultados del resto de los pocillos.

3.1.6 Actividad antimicrobiana del extracto de *Croton elegans*

Los resultados que se presentan a continuación son el promedio de las cinco determinaciones realizadas.

Tabla 13:

Promedio en milímetros (mm) de halos de inhibición de los extractos 25% y 50% en las bacterias *Streptococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus pneumoniae* ATCC 25175, *Staphylococcus mutans* ATCC 49619, *Staphylococcus pyogenes* ATCC 19615

	<i>Streptococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus pneumoniae</i> ATCC 25175	<i>Staphylococcus mutans</i> ATCC 49619	<i>Staphylococcus pyogenes</i> ATCC 19615
Extracto 25 % (mm)	6,2	7,94	10,7	15,16
Extracto 50 % (mm)	6,2	11,74	9,66	13,64
Control positivo en el extracto 25% (mm)	50,06	42,66	56,22	34,18
Control positivo en el extracto 50% (mm)	34,18	26,88	41,36	34,2
Control negativo (mm)	6,2	6,2	6,2	6,2

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

Como se observa el promedio del control negativo de todas placas de las bacterias es 6.2 mm, este diámetro es del pocillo y más no una actividad biológica.

La bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ningún extracto presentó actividad biológica, el diámetro expuesto se debe al diámetro del pocillo 6,2 mm. La bacteria *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175, muestra que ambas concentraciones tienen

efecto inhibitorio, presentando la concentración 50% el halo mayor inhibición. La bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 49619, muestra que ambas concentraciones tienen efecto inhibitorio, presentando que ambas concentraciones tienen semejante efecto inhibitorio. La *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, muestra que ambas concentraciones tienen efecto inhibitorio, presentando la concentración 25% el halo de mayor inhibición.

Figura 1:

Promedio en mm de los halos de inhibición de las concentraciones de 25% y 50% del extracto de *Croton elegans*

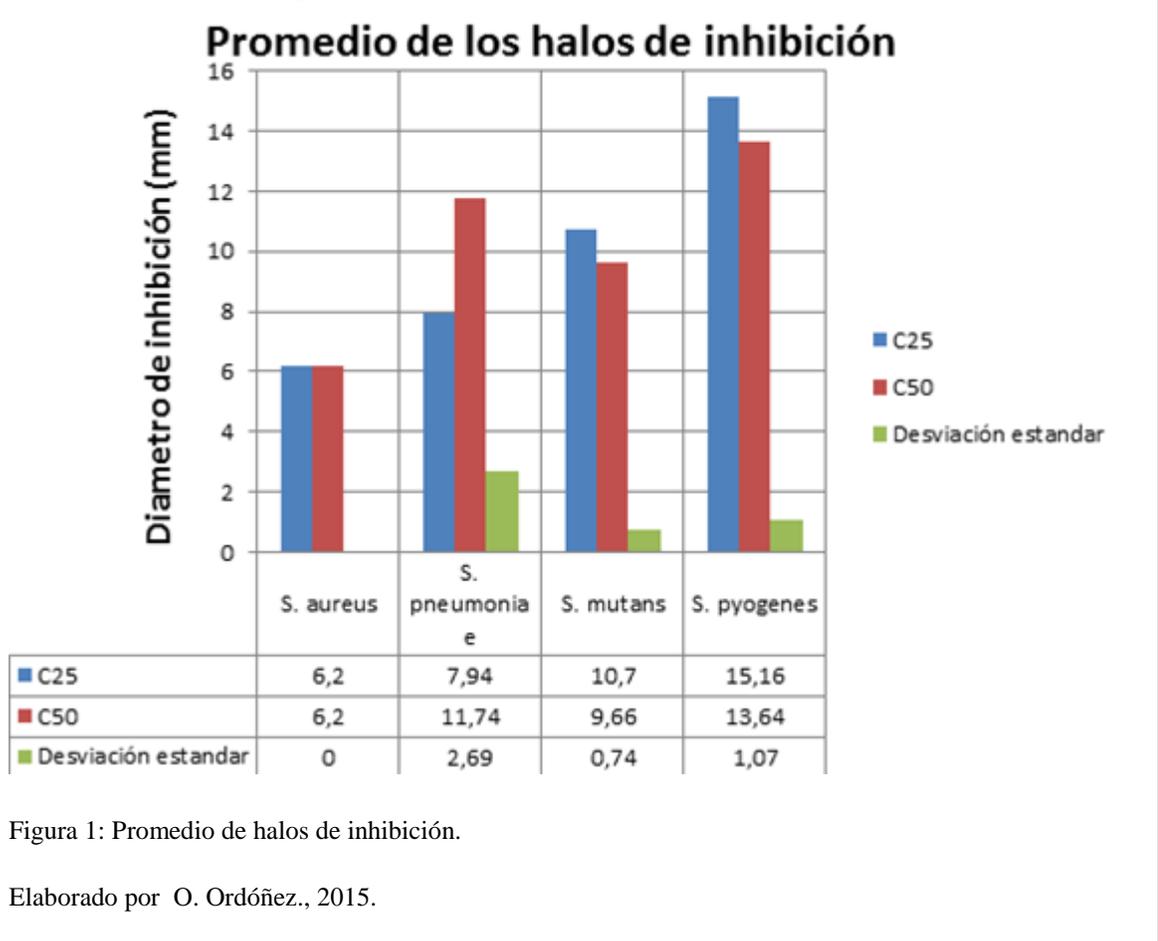


Figura 1: Promedio de halos de inhibición.

Elaborado por O. Ordóñez., 2015.

Donde C25= Concentración del extracto al 25%; C50= Concentración del extracto al 25%

En la figura anterior, se evidencia claramente la actividad antibacteriana de los extractos, la mayor actividad inhibitoria de las dos concentraciones de los extractos se observó frente a la bacteria *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Para el *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no se observa ningún efecto inhibitorio en ambas concentraciones. Para el *Streptococcus mutans* ATCC 49619 se observo efecto inhibitorio en ambas concentraciones y para el *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175 el extracto de 50% se observa que tiene mayor efecto inhibitorio que el de 25%.

En un estudio realizado en Colombia por Pardo (2014, pág. 361), sobre una especie de *Croton*, se determinó que los extractos de *Croton leptostachyus* frente a el *Staphylococcus aureus*, no presentó ningun halo de inhibición; lo que podría relacionarse con el resultado del presente estudio en el que, tampoco se observo actividad antibacteriana sobre esta bacteria.

3.1.7 Análisis estadístico

3.1.7.1 Análisis de varianza de una vía de la actividad inhibitoria del extracto *Croton elegans* a concentración 25% frente a: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 49619 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Tabla 14:

Anova de una vía del extracto *Croton elegans* a concentración 25% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 49619 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Statistix 10,0		25/11/2015		10:21:33	
One-Way AOV for: Sa25 Sp25 Sm25 Spy25					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	228,996	76,3320	302,01	0,0000
Within	16	4,044	0,2527		
Total	19	233,040			
Grand Mean 10,000					
CV 5,03					

Nota: Elaborado por Omar Ordóñez, 2015.

El análisis presentó que el valor calculado $P=0,000$ es menor al nivel de significancia ($p=0,05$), con lo cual se tomó la hipótesis alternativa, el extracto de *Croton elegans* presenta acción antimicrobiana ante las bacterias causantes de afecciones respiratorias.

Una vez aceptada la hipótesis alternativa, se procedió a realizar el test *a posteriori* mediante Tukey HSD, para efectuar una discriminación del grupo.

Tabla 15:

Test Tukey del extracto *Croton elegans* a concentración 25% frente a: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 49619 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Statistix 10,0		25/11/2015		10:24:33	
Tukey HSD All-Pairwise Comparison Test					
Variable	Mean	Homogeneous Groups			
Spy25	15,160	A			
Sm25	10,700		B		
Sp25	7,940			C	
Sa25	6,200				D
Alpha	0,05	Estándar Error for Comparison			0,3180
Critical Q value	4,047	Crytical Value For Comparison			0,9098
All 4 means are significantly different from one another					

Nota: Elaborado por Omar Ordóñez, 2015.

Donde: Sa25= *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; Sp25= *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175; Sm25= *Streptococcus mutans* ATCC 49619; Spy25= *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

El test de Tukey HSD nos permite conocer las medias calculadas para diferenciar que grupos son diferentes significativamente, dando como resultado que existen cuatro grupos A, B, C y D, el grupo A (*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) posee mayor halo de inhibición con respecto a los otros grupos B y C. El grupo D (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) el extracto de concentración 25% no posee actividad antibacteriana. Dando como resultado que el extracto de 25% posee actividad antibacteriana en los grupos A, B, C y el D ninguna actividad.

3.1.7.2 Análisis de varianza de una vía del extracto *Croton elegans* a concentración 50% frente a: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 49619 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Tabla 16:

Anova de una vía del extracto *Croton elegans* a concentración 50% *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 49619 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Statistix 10,0		25/11/2015		10:27:33	
One-Way AOV for: Sa50 Sp50 Sm50 Spy50					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	152,242	50,7473	96,02	0,0000
Within	16	8,456	0,5285		
Total	19	160,698			
Grand Mean 10,310		CV 7,05			

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

El análisis presentó que el valor calculado $P=0,000$ es menor al nivel de significancia ($p=0,05$), por lo tanto, se toma la hipótesis alternativa, el extracto de *Croton elegans* presenta acción antimicrobiana ante las bacterias causantes de afecciones respiratorias.

Una vez aceptada la hipótesis alternativa, se procede a realizar el siguiente test *a posteriori* mediante Tukey HSD, para efectuar una discriminación del grupo.

Tabla 17:

Test Tukey del extracto *Croton elegans* a concentración 50% frente a: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175, *Streptococcus mutans* ATCC 49619 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Statistix 10,0		25/11/2015		10:28:33	
Tukey HSD All-Pairwise Comparison Test					
Variable	Mean	Homogeneous Groups			
Spy50	13,640	A			
Sp50	11,740		B		
Sm50	9,6600			C	
Sa50	6,2000				D
Alpha	0,05	Estándar Error for Comparison			0,4598
Critical Q value	4,047	Crytical Value For Comparison			1,3157
All 4 means are significantly different from one another					

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

Donde: Sa50= *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; Sp50= *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175; Sm50= *Streptococcus mutans* ATCC 49619; Spy50= *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

El test de Tukey HSD nos permite conocer las medias calculadas para diferenciar que grupos son diferentes significativamente, dando como resultado que existen cuatro grupos A, B, C y D, el grupo A (*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) posee mayor halo de inhibición con respecto a los otros grupos. El grupo D (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) el extracto de concentración 50% no posee actividad antibacteriana.

3.1.7.3 Análisis de varianza de una vía del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Tabla 18:

Anova de una vía del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Statistix 10,0		25/11/2015		10:30:33	
One-Way AOV for: Sa25 Sa50					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,0000	0,0000	M	M
Within	8	0,0000	0,0000		
Total	9	0,0000			
Grand Mean 6,2000					
CV 0,00					
WARNING:	The total sum of squares is too small to continue.				
	The dependent variable maybe nearly constant				

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

El análisis presentó que el valor P no puede ser calculado, debido a que los datos ingresados no presentan una variabilidad y más bien muestran una constante al ser cero,

por lo consiguiente no se toma la hipótesis alternativa, una de las concentraciones presenta actividad antimicrobiana diferente a la otra.

3.1.7.4 Análisis de varianza de una vía del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175

Tabla 19:

Anova de una vía del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175

Statistix 10,0		25/11/2015		10:31:33	
One-Way AOV for: Sp25 Sp50					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	36,1000	36,1000	66,79	0,0000
Within	8	4,3240	0,5405		
Total	9	40,4240			
Grand Mean 9,8400		CV 7,47			

Nota: Realizado por Omar Ordóñez, 2015.

El análisis presentó que el valor calculado $P=0,000$ es menor al nivel de significancia ($p=0,05$), por lo tanto, se escoge la hipótesis alternativa, una de las concentraciones del extracto *Croton elegans* presenta actividad antimicrobiana diferente a la otra.

Una vez aceptada la hipótesis alternativa, se procede a realizar el siguiente test *a posteriori* mediante Tukey HSD, para efectuar una discriminación del grupo.

Tabla 20:

Test Tukey del del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25175

Statistix 10,0		25/11/2015		10:35:33
Tukey HSD All-Pairwise Comparison Test				
Variable	Mean	Homogeneous Groups		
Sp50	11,740	A		
Sp25	7,9400	B		
Alpha	0,05	Estándar Error for Comparison		0,4650
Critical Q value	3,263	Crytical Value For Comparison		1,0727
All 4 means are significantly different from one another				

Nota: Elaborado por Omar Ordóñez, 2015.

Donde: P50= Concentración del extracto a 50%; P25= Concentración del extracto a 25%

El test de Tukey HSD nos permite conocer las medias calculadas para diferenciar que grupos son diferentes significativamente, dando como resultado que existen dos grupos A y B, el grupo A poseen mayor halo de inhibición frente al grupo B.

3.1.7.5 Análisis de varianza de una vía del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50%. Frente a *Streptococcus mutans* ATCC 49619

Tabla 21:

Anova de una vía del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% para *Streptococcus mutans* ATCC 49619

Statistix 10,0		25/11/2015		10:33:33	
One-Way AOV for: Sm25 Sm50					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	2,70400	2,70400	3,95	0,0820
Within	8	5,47200	0,6840		
Total	9	8,17600			
Grand Mean 10,180		CV 8,12			

Nota: Elaborado por Omar Ordóñez, 2015.

El análisis presentó que el valor calculado $P= 0,0820$ es mayor al nivel de significancia ($p=0,05$), por lo tanto, no se toma la hipótesis, una de las concentraciones presenta actividad antimicrobiana diferente a la otra.

.Por consiguiente, no se puede realizar el test *a posteriori* debido a que el calculado $P= 0,0820$ es mayor al nivel de significancia ($p=0,05$).

3.1.7.6 Análisis de varianza de una vía del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Tabla 22:

Anova de una vía del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Statistix 10,0		25/11/2015		10:36:33	
One-Way AOV for: Spy25 Spy50					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	5,77600	5,77600	17,09	0,0033
Within	8	2,70400	0,33800		
Total	9	8,48000			
Grand Mean 14,400					
CV 4,04					

Nota: Elaborado por Omar Ordóñez, 2015.

El análisis presentó que el valor calculado $P=0,0033$ es menor al nivel de significancia ($p=0,05$), por lo tanto, se escoge la hipótesis, una de las concentraciones del extracto *Croton elegans* presenta actividad antimicrobiana diferente a la otra.

Una vez aceptada la hipótesis alternativa, se procede a realizar el siguiente test a posteriori mediante Tukey HSD, para efectuar una discriminación del grupo.

Tabla 23:

Test Tukey del extracto *Croton elegans* en concentración 25% y 50% frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Statistix 10,0		25/11/2015		10:37:33
Tukey HSD All-Pairwise Comparison Test				
Variable	Mean	Homogeneous Groups		
Spy25	15,160	A		
Spy50	13,640	B		
Alpha	0,05	Estándar Error for Comparison		0,3677
Critical Q value	3,263	Crytical Value For Comparison		0,8483
All 4 means are significantly different from one another				

Nota: Elaborado por Omar Ordóñez, 2015.

Donde: P50= Concentración del extracto a 50%; P25= Concentración del extracto a 25%

El test de Tukey HSD nos permite conocer las medias calculadas para diferenciar que grupos son diferentes significativamente, dando como resultado que existen dos grupos A y B, el grupo A poseen mayor halo de inhibición frente al grupo B.

Conclusiones

Mediante el tamizaje fitoquímico cualitativo se evidenció que el extracto de las hojas de la planta *Croton elegans* posee compuestos químicos como: resinas, aminoácidos, flavonoides, catequinas, alcaloides y quinonas, y serían alguno o algunos de estos grupos presentes los responsables de la actividad antimicrobiana de la planta.

Los extractos al 25% y 50% de *Croton elegans* no presentaron ningún efecto de inhibición frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), resultado que permite concluir que los extractos no presentan efecto antibacteriano frente a esta bacteria.

Los extractos al 25% y 50% de *Croton elegans* presentaron efecto antibacteriano frente a las bacterias *Streptococcus pneumoniae* ATCC (49619), *Streptococcus mutans* ATCC (25175) y *Streptococcus pyogenes* ATCC (19615), encontrándose en con algunas bacterias diferencia significativa del efecto relacionada a la concentración del extracto.

La hipótesis del estudio que el extracto de *Croton elegans* presenta acción antimicrobiana ante las bacterias causantes de afecciones respiratorias, fue probada mediante el análisis estadístico ANOVA, realizado con los datos de inhibición sobre las *Streptococcus pneumoniae* ATCC (49619), *Streptococcus mutans* ATCC (25175) y *Streptococcus pyogenes* ATCC (19615).

La hipótesis que una de las concentraciones del extracto *Croton elegans* presenta actividad antimicrobiana diferente a la otra, también fue demostrada después del análisis estadístico ANOVA de una vía, realizado con los datos de inhibición de las dos concentraciones del extracto frente a la bacteria *Streptococcus pyogenes* ATCC (19615), análisis que determina que el extracto al 25% de *Croton elegans* tiene mayor halo de inhibición que el extracto de 50% convirtiéndose en más efectivo sobre esta bacteria el extracto del 25%; mientras que los resultados de inhibición frente a la bacteria *Streptococcus pneumoniae* ATCC (49619) demostraron mayor efecto con el extracto de 50%.

Recomendaciones

Ensayar con otro tipo de extracto como el blando y el seco que no fueron tratadas en la presente investigación.

Se recomienda cuantificar los principios activos detectados en el screening fitoquímico y realizar pruebas antibacterianas en los compuestos aislados.

Se puede considerar otra parte vegetativa de la planta *Croton elegans* para su estudio, y confirmar si la actividad biológica está determinada en una parte específica de la planta.

Realizar un estudio cuantitativo de los compuestos químicos de la planta *Croton elegans* para obtener una información mejor detallada y así realizar futuros estudios, ya que el tamizaje fitoquímico puede haber malas interpretaciones por parte del investigador al no tener la experiencia apropiada para su deducción.

Disminuir la concentración del patrón de referencia cuando se trabaje con antibióticos comerciales al momento de realizar pruebas de antibiograma por medio de diluciones, ya que el halo de inhibición del antibiótico puede interferir en la interpretación de datos de las otras muestras a ensayar.

Al momento de la recolección de la planta, asegurarse de tomar la parte vegetativa sana y en la hora adecuada para que se obtenga un mejor rendimiento de los principios activos.

Referencias

- Alzate, L. A. (8 de Noviembre de 2009). *Determinación de las propiedades conservantes del fruto de algarrobo (hymenea courbaril linneaus) para la industria de alimentos*. Obtenido de lasalista: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/77/1/367-394.pdf>
- Anaya, A. (2003). *Ecología química*. México: plazayvaldes.
- Arango, G. (6 de Noviembre de 2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Obtenido de farmacia: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf>
- Balslev, H. N. (27 de Noviembre de 2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Obtenido de PUCE: <http://www.puce.edu.ec/portal/wr-resource/blobs/1/PUB-QCA-PUCE-2008-Enciclopedia.pdf>
- Barón, F. &. (23 de Septiembre de s.f). *Diferencias que presenta una variable numérica ante varios grupos*. Obtenido de bioestadística: <http://www.bioestadistica.uma.es/baron/apuntes/ficheros/cap05.pdf>
- Barrionuevo. (2011). *Evaluación del extracto etanólico de mosquera "croton elegans", en concentracion de 10, 20 y 30% a dosis de 2ml; en cicatrizacion post-quirurgica en ovario histerectomia en caninas mestizas en el centro de gestion zonal animal de carapungo en el distrito*. Latacunga.
- Becker, R. &. (1977). *Química general*. España: reverté.
- Beyer, .. (1987). *Manual de química orgánica*. España: reverté.

- Bioquímica. (5 de Noviembre de 2011). *PRUEBA DE FEHLING*. Obtenido de bioquimicamarzo-julio: <http://bioquimicamarzo-julio.blogspot.com/2014/06/prueba-de-fehling.html>
- Causse, C. (2010). *Los secretos de salud de los antioxidantes*. España: Hispano Europea.
- Cerón, E. (24 de Mayo de 2006). *Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos*. Obtenido de beisa: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>
- Chacón, J. (2004). *Prácticas recomendadas para determinar y reportar la incertidumbre de las mediciones en química analítica*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Durst, H. &. (2007). *Química orgánica experimental*. España: Reverte.
- Ecured. (11 de Noviembre de 2015). *Estreptococo*. Obtenido de ecured: <http://www.ecured.cu/index.php/Estreptococo>
- Eva, C. (2012). *Operaciones básicas de laboratorio*. España: Paraninfo.
- farmacognosia, p. m. (16 de Noviembre de 2015). *Temas de farmacognosia*. Obtenido de Plantas medicinal farmacognosia: <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/exudados-de-las-plantas/>
- FCN. (5 de Noviembre de 2011). *Glicósidos*. Obtenido de fcn: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2009/04/TP5-GLICOSIDOS-INTROD-y-I-2011-F.pdf>
- Fernández. (10 de Noviembre de 2009). *Aspectos microbiológicos de los estreptococos del grupo viridans*. Obtenido de seimc:

<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/SGVirid.pdf>

Fieser, L. F. (1985). *Química orgánica fundamental*. España: Reverté.

Finck, A. (1988). *Fertilizantes y fertilización*. España: reverté.

Fitopolis. (19 de Noviembre de 2012). *Ensayos Fitoquímicos*. Obtenido de Fitópolis:

<https://fitopolis.wordpress.com/category/ensayos-fitoquimicos/>

Forbes, B. S. (2009). *Bailey & Scott Diagnostic Microbiology* . Argentina: Panamericana .

Fox, A. (11 de Noviembre de 2015). *Streptococcus pyogenes*. Obtenido de microbiologybook: <http://www.microbiologybook.org/Spanish/chapter12.htm8>

Fuentes, X. C. (1998). *Bioquímica clínica y patología molecular*. España: Reverté.

García, P. F. (1997). *Microbiología clínica aplicada* . España: Diaz de Santos .

Geissman, T. (1973). *Principios de química orgánica*. España: Reverté.

Gilchrist, L. F. (2005). *Guía practica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. México: CIMMYT.

González, C. R. (2013). *la química en la vida cotidiana*. España: UNED.

Guadix, .. A. (2006). *Centros hospitalarios de alta resolución de andalucia*. España: MAD.

Ingraham, J. &. (1998). *Introducción a la microbiología* . España: Reverté.

IUCN. (31 de Mayo de 2015). *Croton elegans*. Obtenido de IUCN: <http://www.iucnredlist.org/details/45185/0>

- Jardín Botánico. (5 de Noviembre de 2011). *Las plantas medicinales y sus principios activos*. Obtenido de Jardín Botánico: http://www.jardinbotanico-clm.com/wp-content/uploads/2011/04/Ficha_Ciclos_Bloque2.pdf
- Klages, F. (1968). *Tratado de química orgánica*. México: Reverté.
- Lieury, A. (2008). *A que juega mi cerebro*. España: Robinbook.
- López, A. N. (2005). *Plantas Medicinales*. España: Altaban.
- Loughmiller, C. &. (2006). *Texas Wildflowers*. China: University of Texas Press.
- Lozoya, J. (10 de Noviembre de 2013). *Bacteria Staphylococcus aureus: síntomas, contagio y tratamiento*. Obtenido de Suite101: <http://suite101.net/article/bacteria-staphylococcus-aureus-sintomas-contagio-y-tratamiento-a43652#.VkJHh7cvfIV>
- Lydyard, P. C. (2010). *Case studies in infectious disease*. USA: Garland Science.
- Marcano, D. &. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Venezuela: Torino.
- Martínez, A. (5 de Noviembre de 2001). *Saponinas esteroideas*. Obtenido de farmacia: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinas2001.pdf>
- Martínez, A. (19 de Noviembre de 2005). *Flavonoides*. Obtenido de farmacia: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>
- Microbiologics Inc, .. (2012). *Saint cloud: Microbiologics Retail Catalog*. U.S.A.
- Miranda, M. &. (2001). *Farmacognosia y productos naturales*. Habana: Félix Varela.
- Muñoz. (2012). *Plantas medicinales y aromáticas*. México: Mundi-Prensa.
- Ojeda, J. O. (10 de Noviembre de 2013). *Streptococcus mutans and dental caries*. Obtenido de Scielo: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
- Oxford. (2003). *Diccionarios Oxford-complutence*. España: Complutence.

- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphilococcus aureus*. España: Novoprint.
- Pardo, D. O. (20 de Noviembre de 2014). *Estudio químico y etnobotánico de Croton leptostachyus*. Obtenido de scielo: <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v38n149/v38n149a02.pdf>
- Paz, M. (11 de Septiembre de 2011). *Tema 12. ANÁLISIS QUÍMICO DE PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES*. Obtenido de Universidad Politécnica de Madrid: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>
- Pérez, C. (20 de Noviembre de 2014). *EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE MEZCLAS DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE Mollinedia racemosa, Siparuna sessiliflora y Croton leptostachyus*. Obtenido de Universidad de Tolima: <http://repository.ut.edu.co/bitstream/001/1254/1/RIUT-AAA-spa-2014-Evaluaci%C3%B3n%20del%20potencial%20antioxidante%20de%20mezclas%20de%20extractos%20etan%C3%B3licos%20de%20Mollinedia%20racemosa,%20Siparuna%20sessiliflora%20y%20Croton%20leptostachys.pdf>
- Pharman, P. (10 de Noviembre de 2006). *Inmunología*. Argentina: Panamericana.
- Poltronieri, P. &. (2015). *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Reino Unido: Elseiver.
- Pratt. (12 de Septiembre de s.f). *Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusion en agar*. Obtenido de ispch: http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf

- Pratz, G. (2008). *Microbiología Clínica*. Barcelona: Panamericana.
- Remington. (2003). *Farmacología*. Argentina: Panamericana.
- Rodríguez, D. &. (1998). *Tercer encuentro de la agroindustria rural*. Perú: Punto y Coma.
- Rodriguez, E. G. (2005). *Bacteriología general*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- SantaCruz, L. (5 de Noviembre de 2011). *ANÁLISIS QUÍMICO DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS SILVESTRES*. Obtenido de bdigita: <http://www.bdigital.unal.edu.co/5351/1/197518.2011.pdf>
- Sharapin. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Quebecor-Impreandes.
- Sing, O. (1997). *Colorantes naturales*. Perú: Pontificia Universidad Católica de Perú.
- Soto, A. d. (1999). *Ingeniería sanitaria II*. República Dominicana: BÚHO.
- Sreekumari, S. &. (2011). *Texto de bioquímica*. México: Cuellar Ayala.
- Todar, K. (10 de Noviembre de 2012). *Streptococcus pneumoniae*. Obtenido de [textbookofbacteriology: textbookofbacteriology](http://textbookofbacteriology.com)
- Tropicos. (4 de Abril de 2016). *croton elegans kunth*. Obtenido de trópicos: <http://www.tropicos.org/Name/12806668>
- UNAD. (4 de Noviembre de 2000). *Pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar aminoácidos y proteínas en laboratorio*. Obtenido de datateca: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201103/201103/leccin_5_pruebas_cualitativas_y_cuantitativas_para_determinar__aminocidos__y_protenas_en_laboratorio.html
- Vanaclocha, B. &. (2003). *Fitoterapia*. Elsevier Masson.

Vivar, A. (2006). *Química de la flora mexicana*. México: UNAM.

Wiat, C. (2006). *Medicinal plant of asia and the pacific*. United States: Taylor & Francis.