

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE QUITO**

**CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**ESTUDIO FITOQUIMICO Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923,  
*Streptococcus mutans* ATCC: 25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619,  
*Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615 DE EXTRACTOS APOLARES  
(CLOROFORMO –HEXANO) DE *Croton elegans* KUNTH (mosquera)**

**AUTORA:**

**MARÍA ANTONIA LOZADA FIALLOS**

**TUTORA:**

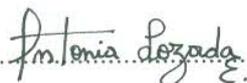
**TATIANA DE LOS ANGELES MOSQUERA TAYUPANTA**

**Quito, diciembre 2016**

### Cesión de derechos de autor

Yo María Antonia Lozada Fiallos, con documento de identificación N°1722735279, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación intitulado: “ESTUDIO FITOQUIMICO Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus mutans* ATCC: 25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615 DE EXTRACTOS APOLARES (CLOROFORMO –HEXANO) DE *Croton elegans* KUNTH (mosquera)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera 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 autora 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.

(f) .......

María Antonia Lozada Fiallos  
1722735279  
Quito, diciembre 2016

### **Declaratoria de coautoría del docente tutor/a**

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación ESTUDIO FITOQUIMICO Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus mutans* ATCC: 25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615DE EXTRACTOS APOLARES (CLOROFORMO – HEXANO) DE *Croton elegans* KUNTH (mosquera) realizado por María Antonia Lozada Fiallos , obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, diciembre 2016



Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta

CI: 1711668010

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo está dedicado a mi papi Marcelo, mi mami Maura que con amor me enseñaron a seguir adelante.*

*A mis hermanos Marcelo, Darío, Diana, Jessica, Maura, Felipe, Mauro, Victoria, que me apoyaron día a día con sus consejos y enseñanzas de seguir adelante con mis sueños y aspiraciones.*

*A mis hermosas sobrinas Julia y Saya, que con su ternura y amor hacen que la vida sea mejor.*

*A Paul por ser mi amigo que me apoyo en todo momento y por su confianza en mí.*

*A mi oscuro por ser más que una mascota.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A la Ingeniera Tatiana Mosquera por ser un apoyo profesional en esta etapa de  
formación académica*

*A la Universidad Politécnica Salesiana*

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO CONCEPTUAL.....	3
3.1 Droga Vegetal.....	3
3.2 Euphorbiaceae .....	3
3.3 <i>Croton elegans</i> Kunth (mosquera) .....	3
3.3.1 Taxonomía.....	3
3.3.2 Descripción Botánica .....	4
3.3.3 Distribución geográfica.....	4
3.3.4 Propiedades farmacéuticas .....	4
3.4 Extractos con solventes .....	5
3.5 Método de extracción .....	7
3.5.1 Extracción con equipo Soxhlet.....	7
3.6 Tamizaje fitoquímico.....	8
3.6.1 Resinas .....	8
3.6.2 Saponinas .....	9
3.6.3 Aminoácidos .....	9
3.6.4 Quinonas .....	10
3.6.5 Cardiotónicos .....	10
3.6.6 Antocianidina .....	11
3.6.7 Alcaloides.....	11
3.6.8 Flavonoides .....	12
3.6.9 Azúcar reductora .....	12
3.7 Método de evaluación antimicrobiano .....	12
3.7.1 Método en Agar Sólido .....	13
3.7.2 Método en Cultivo Líquido .....	14
CAPÍTULO II .....	15
MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	15
4.1 Material Vegetal .....	15
4.2 Desinfección y secado del material vegetal.....	15
4.3 Método de extracción .....	15
4.3.1 Tamizaje Fitoquímico .....	16
4.4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	19
4.4.1 Actividad de la cepa bacteriana.....	19
4.4.2 Preparación del inóculo.....	20

4.4.3	Elaboración del Control Positivo de Antibiosis.....	20
4.5	Método de difusión en agar según Kirby Bauer.....	21
4.5.1	Lectura de los resultados.....	21
4.6	Método en medio líquido.....	22
4.6.1	Preparación del caldo de cultivo.....	22
4.6.2	Preparación del inóculo bacteriano.....	22
4.6.3	Inoculación de microorganismo.....	22
4.6.4	Incubación.....	23
4.6.5	Siembra.....	23
4.6.6	Lectura de los resultados.....	24
CAPITULO III.....		25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		25
3.1	Análisis cualitativo.....	25
3.1.1	Actividad antimicrobiana del extracto de <i>Croton elegans</i> Kunth (mosquera).....	26
CONCLUSIONES.....		30
RECOMENDACIONES.....		32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		33

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de extracto de las hojas de <i>Croton elegans</i> Kunth (mosquera) en cloroformo y en hexano .....	25
Tabla 2. Promedio de halo de inhibición de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos clorofórmico y hexánico en diluciones al 25% y 50% de <i>Croton elegans</i> Kunth (mosquera) por el método de difusión en agar según Kirby Bauer ..	26
Tabla 3. Concentración mínima bactericida de concentrado clorofórmico y hexánico de las hojas de <i>Croton elegans</i> Kunth (mosquera) frente a <i>S. aureus</i> ATCC25923, <i>S. mutans</i> ATCC25175, <i>S. Pyogenes</i> ATCC19615, <i>S. pneumoniae</i> ATCC49619 por el método en medio líquido.....	28

## RESUMEN

Las plantas medicinales se emplean cada vez más en nuestro país por sus propiedades terapéuticas, la mayoría de estas no se han evaluado científicamente, ha sido su uso etnobotánica el que ha definido el potencial terapéutico de cada especie. *Croton elegans* Kunth (mosquera) es una de las especies, sobre la cual no hay evaluaciones ni de actividad biológica ni de identificación química, representando la oportunidad de investigación en esta especie, el presente trabajo identifica de forma cualitativa los grupos fitoquímicos presentes en la planta y evalúa la actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus mutans* ATCC:25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC:19615 .Se utilizó extractos clorofórmicos y hexánicos de las hojas de *Croton elegans* Kunth (mosquera), obtenidos por método Soxhlet en concentraciones de 25% y 50 % .La identificación fitoquímica del material vegetal muestra la presencia de metabolitos secundarios: resinas, aminoácidos, quinonas, alcaloides, flavonoides, catequinas. La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar (Kirby –Bauer) y el método en dilución en medio líquido, sin evidenciar resultados de inhibición en ninguna de las concentraciones sobre los patógenos probados, por lo cual la investigación concluye aceptando la hipótesis nula, no se evidencia actividad antibacteriana de los extractos sobre los microorganismos de estudio.

**Palabras claves:** Actividad antibacterial, Fitoquímica, *Croton elegans* Kunth (mosquera), Actividad Biológica, Extractos apolares.

## ABSTRACT

Medicinal plants are used more and more in our country for its therapeutic properties, most of these not been evaluated scientifically, has been its use ethnobotanical which has defined the therapeutic potential of each species. *Croton elegans* Kunth (mosquera) is one of the species, on which there are no evaluations biological activity or chemical identification, representing an opportunity to research on this species, this work identifies qualitatively the phytochemicals present in the plant groups and evaluated the antibacterial activity of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Polar used extracts of chloroform and hexane from the leaves of *Croton elegans* Kunth (mosquera), obtained by Soxhlet method in concentrations of 25% and 50%. The phytochemistry of plant material identification shows the presence of secondary metabolites: resins, amino acid, Quinones, alkaloids, flavonoids, catechins. The antibacterial activity was evaluated by diffusion on agar (Kirby-Bauer) method and the method in dilution in liquid, without evidence of results of inhibition in none of the concentrations of the tested pathogens, both by which research concludes by accepting the null hypothesis in terms of antibacterial activity on the micro-organisms of study.

**Key Words:** Antibacterial activity, Phytochemistry, *Croton elegans* Kunth (mosquera), biological activity, polar extracts.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales y sus productos derivados, han sido milenariamente utilizados en la medicina tradicional y ahora son cada vez más valiosos como materia prima en la preparación de medicamentos modernos para la industria farmacéutica y herbal, cuyo mercado, igualmente importante, sigue una tendencia hacia un aumento significativo. Se estima que el mercado mundial de fármacos de origen vegetal es de aproximadamente 35 mil millones de dólares anuales (Cerón, 2006), según (Lopatirisky , Gándara , & González, 2003), espera que este porcentaje aumente al 30% en la próxima década ascendiendo a más de 50 billones de dólares, consolidados sobre Europa y en los Estados Unidos, con una tasa de crecimiento del 6% anual. Ecuador es un país rico en recursos naturales y tiene aproximadamente 500 especies de plantas medicinales, de las cuales 125 son mundialmente comercializadas.

Los etnobotánicos están conscientes de que existe una gran riqueza de especies, escondidas en los bosques tropicales, conocida sólo por los habitantes locales quienes las usan como alimentos, medicinas y muchos otros propósitos; es también que el conocimiento tradicional asociado a estas plantas puede llevar a los investigadores a descubrir nuevos productos comerciales que podrían beneficiar a la humanidad (Buitrón, 1999).

La presente investigación tiene como propósito identificar cualitativamente los grupos fitoquímicos y evaluar la actividad antimicrobiana sobre: *S.aureus* ATCC: 25923, *S.mutans* ATCC: 25175, *S.pneumoniae* ATCC: 49619, *S.pyogenes* ATCC:

19615, de los extractos apolares, cloroformo y hexano de las hojas de *Croton elegans* Kunth (mosquera).

El estudio plantea dos hipótesis, como hipótesis alternativa: los extractos apolares (Cloroformo–Hexano) de *Croton elegans* Kunth (mosquera) en diferentes concentraciones tienen propiedad antimicrobiana sobre: *S.aureus* ATCC: 25923, *S.mutans* ATCC:25175, *S.pneumoniae* ATCC: 49619, *S.pyogenes* ATCC: 19615 y como hipótesis nula :los extractos apolares (Cloroformo–Hexano) de *Croton elegans* Kunth (mosquera) en diferentes concentraciones no tienen propiedad antimicrobiana sobre: *S.aureus* ATCC: 25923, *S.mutans* ATCC: 25175, *S.pneumoniae* ATCC: 49619, *S.pyogenes* ATCC: 19615.

# CAPÍTULO I

## MARCO CONCEPTUAL

### 2.1 Droga Vegetal

Planta medicinal o partes de ella ( hojas , tallo , raíz , fruto , semilla ) frescas o secas, así como gomas y resinas no tratadas, que se emplean puras o mezcladas que contengan el principio activo en la elaboración de medicamentos con fines terapéuticos , que estén definidos por la parte vegetal usada, el nombre científico de la especie botánica (Ayala & Vásquez, 2014).

### 2.2 Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae ha sido identificada como una de las más numerosas, extensas y controvertidas de las Angiospermas, con más de 300 géneros y 5000 especies, se encuentran distribuidas la mayoría de ellas en América y África tropical. La morfología de la familia es enormemente variable y por lo tanto difícil de caracterizar, hecho que ha sugerido que las especies tengan un origen polifilético (Miranda, 2015).

Esta familia vegetal está presente en todo el mundo y es más diversa en los Trópicos. Existe una gran variedad genérica de Euphorbiaceae Neotropicales en las tierras bajas de la selva Amazónica, por la existencia de varios géneros endémicos. Presentan una extensa cantidad de hábitats, está presente en los bosques lluviosos, en bosques estacionales y en desiertos (Miranda, 2015).

### 2.3 *Croton elegans* Kunth (mosquera)

#### 2.3.1 Taxonomía

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Rosanae

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Croton* L.

Especie: *elegans* Kunth

Nombre común: cucharilla, mosquero, mosquera, purga

### **2.3.2 Descripción Botánica**

Se desarrolla como una mata o pequeño arbusto perenne, de tallo erecto, glandulosos, pegajosos muy ramificados y de rápido crecimiento (hasta más de 1 metro de altura). Sus hojas son oblongo lanceoladas y ligeramente dentadas, de color verde claro, manchitas y quebradizas, de color pardo oscuro durante la floración. Además, presentan inflorescencias capituliforme, con flores tubulares y liguladas amarillas; anteras muy exsertas y lígulas mayores que las brácteas. Su fruto es de tipo aquenio, con vilano de más de 5 milímetros de longitud (Jaramillo, 2010).

### **2.3.3 Distribución geográfica**

Diferentes investigaciones se han realizado para esta especie, donde se han obtenido muestras de las provincias Carchi, Imbabura, Ibarra, Pichincha y Tungurahua, para el desarrollo de los estudios.

### **2.3.4 Propiedades farmacéuticas**

Es un purgante muy fuerte, también se lo ha empleado en el tratamiento del reumatismo, la gota, la neuralgia, la bronquitis (Allauca, 2014)

Se utiliza la resina para curar la amigdalitis y la angina en diferentes dosis (Barrionuevo, 2011).

La planta *Croton elegans* Kunth (mosquera) trata afecciones como inflamaciones, dolores molares, cicatrizante, amigdalitis, verrugas (Cerón, 2006).

La especie de género *Croton* han presentado propiedades antiinflamatorias, antitumorales, leishmanicidas y antialérgica (Neira, Stashenko, & Escobar, 2014).

#### **2.4 Extractos con solventes**

Para la investigación fitoquímica y farmacológica es necesario realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar. Para ello se realiza una extracción con disolventes de diferentes polaridades, diclorometano o hexano, éter o etanol y agua. Debido a la toxicidad de estos disolventes es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (rota vapor) hasta alcanzar un extracto blando o seco (Bastidas & Fernández, 2015).

El contacto de la droga con un solvente es capaz de solubilizar los principios activos de la materia prima vegetal, para ello los principios activos deben de pasar por un disolvente, este se va a encargar de obtener un extracto líquido o sólido, posteriormente se elimina la mayor cantidad de disolvente teniendo un extracto puro, esta es el método más utilizado para la obtención de principios activos de una planta medicinal con uso terapéutico (Osorio, 2009).

Los solventes apolares son sustancias de tipo orgánico que carecen de polo positivo y negativo en sus moléculas, son volátiles debido a su estructura en las cadenas y las fuerzas intra e intermoleculares. Algunos solventes de este tipo son: cloroformo, benceno, tolueno, xileno, cetonas, hexano, ciclohexano, tetracloruro de carbono son los que disuelve o van a disolver. Un caso especial lo constituyen los líquidos fluorosos que son derivados de algunos compuestos orgánicos en el que se han

sustituido los enlaces carbono – hidrogeno por carbono- flúor y que se encuentran estado líquido en condiciones normales, por esta estructura se consideran como disolventes más apolares que los disolventes orgánicos convencionales (Alea, 2008).

Para seleccionar un solvente debe de cumplir con las siguientes características:

- La relación del soluto con el solvente sea alta y selectiva con el soluto a utilizar
- El disolvente no altere el material extraído
- Estabilidad química en todo el proceso
- Baja presión de vapor
- Baja toxicidad e inflamabilidad
- Baja densidad
- Volatilidad moderada
- Facilidad de recuperación del extracto y
- Bajo costo

Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos (Caldas, 2012).

En este estudio se seleccionó como disolventes el cloroformo y hexano, debido a que investigaciones bibliográficas previas determinan la eficacia terapéutica de extractos apolares de plantas de la familia Euphorbiacea, (Ramírez , Castillo , & Melo, 2013) en su estudio se “Evaluó el potencial antibacterial *in vitro* de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos aeróbicos de pacientes con úlceras cutáneas, se utilizaron extractos polares y apolares ”, en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana *in vitro*, se evidencio que los extractos de *Croton lechleri* fueron efectivos frente a la mayoría de bacterias ATCC utilizadas en el estudio, siendo el extracto etanólico el de mayor potencial antibacterial y la técnica de

difusión en pozo la que presento mejor sensibilidad y reproducibilidad. De igual forma (Barrionuevo, 2011) en su estudio de “Evaluación del extracto etanólico de mosquera *Croton elegans*, utilizó concentraciones de 10, 20 y 30%, para la cicatrización post-quirúrgica en ovario en caninas mestizas en el centro de gestión zonal animal de Carapungo en el distrito metropolitano ”, determinando que la concentración con mayor eficiencia fue la de 30% de extracto etanólico de *Croton elegans* (mosquera), concentración que además no generó ninguna patologías de tipo inflamatorio o infecciosa, y que el proceso de cicatrización fue normal.

La polaridad de los solventes permite que se pueda extraer diferentes extractos de una planta con diferentes actividades y eficacia frente a las bacterias dando la propiedad farmacológica de la misma, los extractos apolares tienen más potencial antibacteriano, estos agentes tienen dos grupos polar (carga positiva) es el que se une a los grupos fosfatos de la membrana de la bacteria y el grupo apolar (carga negativa) penetra al interior de la membrana por su característica hidrofóbica desnaturalizando las proteínas de la membrana y perdiendo su semipermeabilidad (Ramírez, Castillo, & Melo, 2013).

## **2.5 Método de extracción**

### **2.5.1 Extracción con equipo Soxhlet**

La extracción Soxhlet es un proceso por el cual se realiza extracciones consecutivas entre el solvente que se calienta hasta llegar a su punto de ebullición y se enfría llegando al cartucho con el material vegetal de manera pura, el proceso se realiza preparando la muestra la cual debe de estar pulverizada o molida, colocada en un cartucho el cual puede ser de celulosa o de papel filtro, un tapón de cartucho o de algodón si es necesario, en un balón se colocara la cantidad adecuada de solvente

para que se realice el reflujo y a temperatura que requiera el mismo hasta llegar a su punto de ebullición , obtención del extracto con el solvente (Núñez, 2008).

## **2.6 Tamizaje fitoquímico**

Consiste en un conjunto de pruebas “cualitativas” sencillas para identificación de los principales grupos funcionales en un extracto vegetal. Lo que hace que en muchas investigaciones fitoquímicas se utilicen técnicas cromatográficas y espectroscópicas más precisas y exactas. Estas pruebas detectan la presencia de un grupo de compuestos como: alcaloides, lactonas, cumarinas, triterpenteros, etc., por la presencia de precipitados, coloraciones, espumas, etc. Las reacciones que se utilizan es según a la investigación que se está realizando, con muestras pequeñas y la utilización de material de laboratorio básico (Caldas, 2012).

Los grupos fitoquímicos identificados considerados importantes en esta especie son:

### **2.6.1 Resinas**

Son exudados sólidos o semisólidos derivados de los polímeros ,en algunos casos son los terpenos oxidados de aceites volátiles de plantas, no tienen uniformidad en su composición química , son insolubles en agua teniendo poco sabor , no volátiles , solubles en aceites esenciales , alcohol o éter, a temperatura ambiente son sólidas pero se convierten en líquidas con el calor (Bótanico, 2011).Para determinar las resinas se realiza un ensayo de resinas, al ser una mezcla compleja de terpenos, ácidos resínicos, ácidos grasos y demás compuestos, se van a separar del agua, debido a que se forma una reacción sobresaturada, formando un sólido el cual correspondería a la resina dando positivo al ensayo (Delporte, 2010).

### **2.6.2 Saponinas**

Son compuestos naturales, glucósidos de esteroides o triterpenoides caracterizados desde un punto de vista estructural por presentar enlaces glucósidos y /o ester entre una genina poco polar y restos glucósidos , desde el punto de vista de su actividad se caracterizan por formar espumas en soluciones acuosas y por hemolizar los glóbulos rojos .Las saponinas tiene amplio rango de actividades biológicas tales como su acción antimicótica , antiviral , hipolesterolema , diurética , antiinflamatoria (Pérez & Quitián, 2009). Las saponinas esteroides poseen un núcleo espirostano que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos, formando una espuma abundante al agitar sus soluciones acuosas. Las saponinas triterpénica presentan una estructura policíclica, normalmente tetra o pentacíclica, La mayoría de las saponinas triterpenospentacíclicos es de tipo - amirina, que se basa en un oleanano esqueleto de carbono. De los grupos funcionales distintos de hidroxilo también puede ser carboxilo, aldehído, lactona, éter y grupos carbonilo. El doble enlace es más común en 12,13. Las saponinas se identifican por análisis fitoquímicos como el ensayo de la espuma, ensayo de Liebermann-Burchard y ensayos para carbohidratos. Al agitar una solución acuosa de una muestra se debe de forma una espuma estable y que dure más de 2 min. (Martínez A. , 2001).Las saponinas tienen propiedades tenso activas, lo que hace disminuir la tensión superficial del agua esto hace que se produzca la espuma si se agita y permite reconocer si el extracto utilizado posee saponinas (Delporte, 2010).

### **2.6.3 Aminoácidos**

Son monómeros que en su estructura química tiene un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) y un grupo carboxilo ( $\text{COOH}$ ) , de la cual se forma una proteína , para determinar los

aminoácidos se realiza el ensayo de Ninhidrina , es positivo el ensayo si tiene una coloración violeta (Rodríguez, 2011).La ninhidrina reacciona con el aminoácido que tenga el grupo amino libre , dando lugar a la formación de un amino y anhídrido carbónico con la reacción del reactivo hidrindantina que a su vez reacciona con el amonio y la molécula de ninhidrina dando la coloración característica del ensayo de azul a purpura (Jorin, Abril, & Barcena, 2006).

#### **2.6.4 Quinonas**

Son compuestos oxidados, producto de una oxidación de un fenol doble, pigmentos orgánicos, solubles en sustancias acuosas, abundantes en la naturaleza (hongos, bacterias). Se caracterizan por tener dos átomos de oxígeno unidos al carbono del núcleo en posición orto o para resultando dos clases de quinonas del benceno, que tiene doble enlace conjugado por esta estructura las quinonas son sustancias fuertemente coloreadas. Se realiza un ensayo de quinonas para determinar si la fase acuosa alcalina se colorea rosado se reporta (++) o rojo se reporta (+++) dando positivo el ensayo (Bucay, 2009). El ensayo de Borntranger reconocer antraquinonas, se toma una porción de la muestra vegetal con una solución de KOH hasta punto de ebullición durante varios minutos, esto va hacer que se hidrolice y se oxiden los glicósidos antracénicos, se deja enfriar, luego se acidifica y se extrae con benceno, cuando se separa esta base se forman dos fases la acuosa y la fase bencénica cambiando su color amarilla y la fase acuosa toma el color rojo si contiene antraquinonas dando positivo el ensayo. La solución alcalina se deja enfriar, se acidifica y se extrae con benceno (Martínez A. , 2012).

#### **2.6.5 Cardiotónicos**

Son sustancias esteroídicas que poseen una genina y azúcar, presenta un esqueleto tetracíclico de los esteroides. Los ensayos dan una reacción positiva cuando existe

una coloración azulada, rosa hasta violáceo (Martínez A. , 2002).El reactivo de Kedde, se va a producir una reacción que determina las geninas dando una coloración violácea en medio (Castañeda, Manrique , & Ibañez, 2016).

### **2.6.6 Antocianidina**

Son pigmentos naturales, que están constituidos por una aglicona y una azúcar unidos por un enlace glucosídico .La coloración depende de factores propios y la posición del grupo del flavonoides (Astrid Garzón, 2008). Son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Ortiz, Reza, Chew, & Meza, 2011). El ensayo es positivo cuando la fase amílica da un coloración de rojo a marrón, este permite determinar grupo de flavonoides dependiendo del anillo, si es pirano central, se determina flavonas y anillo pirano se determina chalconas y anillo furano auronas (Bonilla, Varón , & Garzón, 2014).

### **2.6.7 Alcaloides**

La estructura de estos alcaloides está basada en dos anillos de 5 átomos unidos que comparten un átomo de nitrógeno. En la naturaleza por lo general los anillos tienen como sustituyentes grupos hidroximetileno en la posición C-1 y grupos hidroxilos en C-7 ( Brambilla, Epifane, Fumeo, & Potiggia, 2016).Son sustancias presentes en todos los órganos de la planta, en hojas en flores, en frutos, en semilla, en corteza, en la raíz. Se puede determinar alcaloides utilizando reactivos como: Reactivo de Wagner es positivo si existe un precipitado de color café, reactivo de Dragendorff indica la presencia de alcaloides por la formación de precipitados de color naranja rojizo cuando se adiciona una solución acida, el reactivo de Mayer se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol (Aragon, 2008).

### **2.6.8 Flavonoides**

Son compuestos polifenólicos que denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura venzo  $\gamma$ -pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos. Ellos son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas (Cartalla & Reynaldo, 2001). el ensayo de Shidona, se añade HCl concentrado y magnesio produciendo una disolución de color rojo a violeta, el alcohol amílico se colorea naranja, amarillo o rojo si es positivo el ensayo (Martínez A. , FLAVONOIDES, 2005).

### **2.6.9 Azúcar reductora**

Son mono y oligosacáridos que contienen un grupo aldehído o cetónico libre que presenta un efecto reductor sobre ciertos agentes oxidantes, para determinar su presencia se realiza el ensayo de Fehling se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo (Lorén, 2010). El poder reductor de los azúcares proviene de la oxidación del grupo carboxilo, la azúcar reductora reducen iones de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+}$  de azul a rojo por la oxidación del grupo carboxilo añadimos tartrato sódico potásico como estabilizante (Jaya & Ramirez, 2013).

## **2.7 Método de evaluación antimicrobiano**

No existe ningún mecanismo estandarizado ni métodos para determinar la actividad antimicrobiana para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas, como se establece para antibióticos, los métodos están basados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos, utilizando técnicas microbiológicas (Shiva, 2007).

Estas técnicas fueron desarrolladas al observar que los microorganismos eran capaces de inducir resistencia al antimicrobiano que se ha utilizado contra él durante

un período largo de tiempo, esta resistencia puede deberse a diversos mecanismos como:

- a. Producción de una sustancia que destruye el antibiótico.
- b. Adaptación del metabolismo bacteriano para inhibir el antibiótico.
- c. La pared celular del microorganismo se vuelve impermeable al antibiótico.
- d. Un fago comunica la resistencia por transducción
- e. Desaparición de cepas sensibles y supervivencia de cepas resistentes por un fenómeno de selección natural.
- f. Producción de cepas (Lizcano & Vergara, 2008).

### **2.7.1 Método en Agar Sólido**

#### ***2.7.1.1 Difusión en agar***

Este es un método que sirve para determinar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos, se parte de una muestra de cultivo puro para el estudio de sensibilidad antimicrobiana, aislando en placas con un medio de cultivo selectivo de las cepas que se van a estudiar. Para realizar el método de disco se debe utilizar placas previamente inoculadas con cepas ATCC, luego se colocará un disco de papel filtro con el antibiótico impregnado, este se difundirá en toda el agar de la placa formando un gradiente de concentración, después de 18 a 24 horas de incubación los discos van a presentar una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir

al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos. La ventaja del método es que se puede cambiar los componentes nutricionales del medio de cultivo para poder trabajar con microorganismos exigentes y llevar a cabo el antibiograma (Taroco, Seija, & Vignolia, 2015).

### **2.7.2 Método en Cultivo Líquido**

Determina la concentración más baja del antimicrobiano, para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), este valor no representa el valor absoluto, el MIC es el punto entre la concentración de la inhibición del crecimiento bacteriano y concentración más baja, lo que el MIC puede tener varias variaciones en cada una de las diluciones (Lanche, 2015).

#### ***2.7.2.1 Dilución en caldos de cultivo***

Es una técnica en la cual se prueba una suspensión de bacterias en concentraciones predeterminadas mediante diluciones dobles en un medio líquido, se realiza el método utilizando placas de microtitulación que contienen un antibiótico pre diluido, se observa el crecimiento mediante la turbidez en cada uno de los mismos, si es transparente no hay crecimiento y si existe turbidez hay crecimiento. Existen microdiluciones ya preparados comercialmente los cuales no se puede realizar algunas modificaciones, por local no son muy utilizadas (Lanche, 2015).

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y METODOLOGÍA

#### 3.1 Material Vegetal

La recolección del material vegetal *Crotón elegans* Kunth (mosquera) se realizó en la parroquia de San Isidro Picaihua del Cantón Ambato perteneciente a la provincia de Tungurahua a una altitud de 2600msnm coordenadas 768713.77 m E y 9858811.85 m S, con un clima templado y seco con una temperatura media de 15 °C.

#### 3.2 Desinfección y secado del material vegetal

El material recolectado se desinfectó con una solución de 0.075 % de Hipoclorito de sodio en 10 litros de agua durante 2 min, se secó al ambiente por 3 días, luego se utilizó la cámara climática termostática con humedad BRINDER KBF-270 por 24 h a 37°C .Se molió hasta obtener un polvo uniforme.

#### 3.3 Método de extracción

Separación de productos orgánicos por un disolvente o varios, obteniendo uno o más componentes, la obtención de un extracto se debe de tener la droga y un disolvente que cumpla con las característica predeterminadas, la calidad y pureza del extracto dependerá del material vegetal utilizado por lo que se recomienda que se debe de hacer una estandarización de la muestra vegetal (Corado, 2005).

Se preparó el extracto clorofórmico y de hexano según (Cabello & Belloso, 2009) por el método de reflujo Soxhlet, utilizando 30g de hoja de *Croton elegans* molida la cual se colocó en el cartucho de papel de filtro, se introdujo en el tubo Soxhlet, y se realizó el montaje del equipo con un tubos refrigerantes, para evitar la volatilidad del solvente . Se colocó 200 ml de cada uno de los solventes en un matraz .El reflujo se realizó por 6 horas manteniendo una temperatura constante entre 60 °C-70

° C (puntos de ebullición de los solventes).El proceso fue el mismo tanto para la obtención de extracto clorofórmico como para el extracto hexánico. Los extractos se concentraron en un rotavapor en el cual realiza destilaciones de una sola etapa de forma rápida sin dañar el producto .La base del método es la recuperación del disolvente mediante la rotación bajo vacío, esto protege al producto obtenido (Buchi, 2012) .Los extractos concentrados se utilizaron para preparar las disoluciones para las pruebas antibacterianas. Disoluciones al 25% y 50% p/v, 25 % de extracto concentrado en 10ml de alcohol al 96% y 50% de extracto concentrado en 10 ml de alcohol al 96%.

## **Ensayos cualitativos**

### **3.3.1 Tamizaje Fitoquímico**

Se realizaron los ensayos según (Arias & Rodríguez, 2014)

#### ***3.3.1.1 Ensayo de Resinas***

Se tomó 2ml de extracto en un tubo de ensayo, se adicionó 10 ml de agua destilada. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%).El ensayo es positivo cuando existe un precipitado.

#### ***3.3.1.2 Ensayo de Espuma***

Se tomó 2 ml de extracto en un tubo de ensayo, se adiciono 10 ml de agua, se agitó la mezcla fuertemente durante 10 minutos. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo da positivo si se observa en la superficie del líquido espuma por más de 2 min se mantiene estable.

#### ***3.3.1.3 Ensayo de Ninhidrina***

Se tomó 2ml del extracto en un tubo de ensayo, se mezcló con 2 ml de solución ninhidrina al 2%, seguido la mezcla se calentó durante 10 minutos en baño de agua

en el Equipo SHELLAB hasta una temperatura de 50 °C. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo es positivo si presenta una coloración azul violácea.

#### ***3.3.1.4 Ensayo de Borntrager***

Se tomó 2ml de extracto en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en el baño de agua en el equipo SHELLAB hasta una temperatura de 50 °C, el residuo se re disolvió en 1 ml de cloroformo, se adicionó 1ml de hidróxido de sodio al 5% en una Sorbona, se agita fuertemente. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo es positivo si presenta una coloración roja o violeta.

#### ***3.3.1.5 Ensayo de Shinoda***

Se tomó 2 ml de extracto en un tubo de ensayo, se adicionó 1ml de ácido clorhídrico concentrado y una cinta de magnesio metálico, después se esperó 5 minutos y se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se espera hasta que se separen, este proceso se realiza por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo es positivo si presenta una coloración amarillo, naranja o rojo.

#### ***3.3.1.6 Ensayo de Antocianidina***

Se tomó 2 ml de extracto en un tubo de ensayo, se adicionó 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y se calentó durante 10 minutos en el baño de agua en el equipo SHELLAB hasta una temperatura de 50 °C, se dejó enfriar y luego se adicionó 1 ml de agua y 2ml de alcohol amílico, se agitó y se dejó en reposo. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo es positivo si presenta una coloración de roja a marrón.

### ***3.3.1.7 Ensayo de Draggendorff***

Se tomó 2ml de extracto en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en el baño de agua en el equipo SHELLAB hasta una temperatura de 50 °C, el residuo se re disolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en el agua, con la solución acida se realizó el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Draggendorff. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo es positivo si se observa opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

### ***3.3.1.8 Ensayo de Mayer***

Se tomó 5 ml de extracto en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en el baño de agua en el equipo SHELLAB hasta una temperatura de 50 °C, el residuo se re disolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua, se adicionó una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtró, se añadió de 2 a 3 gotas de la solución reactiva de Mayer .Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo presenta tres posibilidades para que sea positivo si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado coposo (+++).

### ***3.3.1.9 Ensayo de Wagner***

Se tomó 5 ml de extracto en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en el baño de agua hasta una temperatura de 50 °C, el residuo se redisolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua, con la solución ácida se realizó el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Wagner. .Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo es positivo si se observa opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

#### **3.3.1.10 Ensayo de Catequina**

Se tomó una gota de extracto con la ayuda de un capilar, se aplicó sobre papel de filtro, sobre la mancha se adicionó una solución de carbonato de sodio, se observó bajo luz UV. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). Es positivo si existe la aparición de una mancha verde a la luz UV.

#### **3.3.1.11 Ensayo de Fehling**

Se tomó 2 ml de extracto en un tubo de ensayo, se evaporó el solvente en el baño de agua en el equipo SHELLAB hasta una temperatura de 50 °C, el residuo se disolvió en 2ml de agua y se adicionó 2 ml de reactivo de Fehling, la mezcla se calentó en un baño de agua durante 10 minutos. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo es positivo si existe una coloración roja o un precipitado rojo.

#### **3.3.1.12 Ensayo de Kedde**

Se tomó 2 ml de extracto en un tubo de ensayo, luego se mezcló con 1 ml del reactivo de Kedde y se dejó reposar durante 10 minutos. Este proceso se realizó por triplicado con los dos extractos de cloroformo y hexano (25% y 50%). El ensayo es positivo si existe una coloración violácea.

### **3.4 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

#### **3.4.1 Actividad de la cepa bacteriana**

Para el presente trabajo se utilizaron cuatro cepas ATCC: *S.aureus* ATCC: 25923, *S.mutans* ATCC: 2517, *S.pyogenes* ATCC: 19615 y *S.pneumoniae* ATCC: 49619 para evaluar la actividad antibacteriana de extracto clorofórmico y hexánico de las hojas de *Croton elegans* Kunth (mosquera), la activación bacteriana se realizó con

los medios y en las condiciones específicas para cada microorganismo, mediante la técnica identificada por Microbiologics (fabricante)

### **3.4.2 Preparación del inóculo**

A partir de una placa de cultivo en crecimiento con la ayuda de una asa estéril se tomaron de 3 a 5 colonias de la misma morfología y se inocularon en un tubo de ensayo con 3 a 4 ml de caldo estéril de TSB (Tryptic Soy Broth) .Se encubaron a 35°C por un lapso de 18 a 24 horas hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 escala MacFarland, teniendo una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC/ml , después del tiempo de incubación se llevó a la centrifugadora por 20 minutos con 4000rpm el tubo de ensayo , se eliminó el sobre nadante y se añadió de 4 a 5 ml de suero fisiológico estéril , se colocó en el vórtex por 1 a 2 minutos para homogenizar , Se realizó la lectura de la absorbancia del inóculo a 625 nm con una absorbancia de 0.08 a 0.1 en el Espectrofotómetro UV/Visible marca Shimatzu modelo MINI1240 , para todos las bacterias (*S.aureus* ATCC : 25923 ,*S.mutans* ATCC: 25175, *S.pyogenes* ATCC: 19615 , *S.pneumoniae* ATCC: 49619) (Prat, 2009).

### **3.4.3 Elaboración del Control Positivo de Antibiosis**

Se utilizó Benzatina Bencilpenicilina para suspensión inyectable de 1.200.000U.I. (Unidades internacionales) es decir 720.000 ug/ml y se quiere llegar a una concentración de 80 ug /ml con un volumen de 10 ml, por lo tanto se tomó la concentración y el volumen.

Se determinó la concentración de Benzatina Bencilpenicilina, la cual fue diluida en 10 ml agua destilada estéril (Guadix, 2006).

### **3.5 Método de difusión en agar según Kirby Bauer**

Con el fin de evaluar la actividad antibacteriana del extracto, se utilizó medio de cultivo TSA (Tryptic Soy Agar) para *S. aureus* ATCC25923, BHI (Brain and Heart Infusion Agar) para *S. mutans* ATCC: 25175 y *S. pyogenes* ATCC: 19615, Agar sangre para *S. pneumoniae* ATCC: 49619, previamente esterilizados, los medios se mantuvieron a temperaturas de 45° C en un baño maría, hasta el momento de dispensación, mientras se trabajó dentro de cámara de flujo, se colocó 24 ml del agar en una probeta de 25ml y 1ml de inóculo bacteriano con una micropipeta de 1000 ul, ambos se mezclaron en un vaso de precipitación de 50 ml, se agitó con una espátula pequeña, fue puesto en una caja Petri, esto se realizó por quintuplicado con cada una de las cepas, se dejó solidificar por 30 minutos, luego se hicieron tres pozos con una pipeta Pasteur estéril de un diámetro es de 6,2 mm y en cada pocillo se colocó 50 ul de extracto cloroformo y de extracto hexánico al 25% y 50%, control positivo (Benzatina Bencilpenicilina) y blanco negativo. Se incubaron en condiciones aerobias a *S. aureus* ATCC: 25923, temperatura de 37°C por 24 horas, y anaerobias a *S. mutans* ATCC: 25175, *S. pyogenes* ATCC: 19615, *S. pneumoniae* ATCC: 49619 a una temperatura de 37°C por 24 horas, CO<sub>2</sub> al 5 (Alzate, Arteaga, & Jaramillo, 2009).

#### **3.5.1 Lectura de los resultados**

Se efectuaron las lecturas correspondientes de las placas después de 24 h de incubación, midiendo los halos de inhibición de cada uno de los pozos, para verificar la eficiencia del extracto clorofórmico y hexánico, como se observó crecimiento bacteriano se utilizó el método en medio líquido para comprobar los resultados obtenidos por el método de difusión en agar según Kirby Bauer.

### **3.6 Método en medio líquido**

#### **3.6.1 Preparación del caldo de cultivo**

Método en medio líquido por dilución es la exposición de las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, con diluciones a la mitad y el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CIM (Toraco, Seija, & Vignoli, 2015). Por cada microorganismo se realiza una serie de diez tubos considerando tubo N° 1 a la concentración de 70% de extracto, las diluciones se realizan a mitades en forma secuencial (70, 35, 17.5, 8.75, 4.375, 2.187, 1.093, 0.546, 0.273, 0.136) el proceso se realiza por duplicado. El proceso se realiza tanto con los dos tipos de extractos clorofórmicos y hexánicos.

De esta manera, el extracto se incorpora al caldo de cultivo y se conoce la concentración del mismo, tanto para los dos extractos (Cloroformo –Hexano).

#### **3.6.2 Preparación del inóculo bacteriano**

Se prepararon inóculos bacterianos de las cepas ATCC, seleccionadas, en TSB. Se incubaron a temperatura de 37°C en condiciones aerobias a *S.aureus* ATCC: 25923 por 24 horas y anaerobias *S.mutans* ATCC: 25175, *S.pyogenes* ATCC: 19615, *S.pneumoniae* ATCC: 49619 a una temperatura de 37 °C por 24 horas, CO<sub>2</sub> al 5%. Trascurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos de ensayo por 20 minutos con 4000rpm, se eliminó el sobre nadante y se añadió de 4 a 5 ml de suero fisiológico estéril, se colocó en el vórtex por 1 a 2 minutos para homogenizar, Se realizó la lectura del inóculo a 625 nm con una absorbancia de 0.08 a 0.1 en el Espectrofotómetro UV/Visible marca Shimatzu modelo MINI 1240.

#### **3.6.3 Inoculación de microorganismo**

Se realizó según (Ordoñez, 2016)

Una vez obtenidos los tubos seriados con caldo de cultivo y diferentes concentraciones de extracto se procede a inocular los microorganismos, para *S.aureus* ATCC: 25923, *S.pyogenes* ATCC: 19615, *S.pneumoniae* ATCC:49619, de manera que se inocula  $1 \times 10^6$  y para *S.mutans* ATCC: 25175: 1000ul de la suspensión bacteriana en cada tubo de ensayo, se inocula  $1 \times 10^8$ , para cada cepa se debe de realizar el seriado de los tubos de ensayo del 1 al 10.

La diferencia de volumen entre cepas radica en el crecimiento *in vitro* que tiene cada una de los microorganismos, las cuales exigen más cantidad de Unidades formadoras de colonia (ufc) a inocular.

#### **3.6.4 Incubación**

Se incubaron en condiciones aeróbicas a *S.aureus* ATCC: 25923, temperatura de 37 °C por 24 horas, y anaerobias a *S.mutans* ATCC: 25175, *S.pyogenes* ATCC: 19615, *S.pneumoniae* ATCC: 49619 a una temperatura de 37 °C por 24 horas, CO<sub>2</sub> al 5%.

#### **3.6.5 Siembra**

Después de las 24 horas de incubación adecuado, con la ayuda de un hisopo estéril, se tomó una muestra de cada uno de los tubos y se sembró en una caja Petri con TSA (*S.aureus* ATCC: 25923), BHI (*S.mutans* ATCC: 25175, *S.pyogenes* ATCC: 19615) y Agar sangre (*S.pneumoniae* ATCC:49619), preparados previamente según las indicaciones del fabricante. Las cajas que contenían las muestras Se incubaron en condiciones aerobias a *S.aureus* ATCC: 25923, temperatura de 37 °C por 24 horas, y anaerobias a *S.mutans* ATCC: 25175, *S.pyogenes* ATCC: 19615, *S.pneumoniae* ATCC: 49619 a una temperatura de 37 °C por 24 horas, CO<sub>2</sub> al 5

### **3.6.6 Lectura de los resultados**

Culminado el tiempo de incubación se observó las cajas, para verificar si existió o no crecimiento bacteriano, que permita determinar cuál es la concentración que generó inhibición completa, definiéndola a esta, como concentración mínima bactericida (CMB) de cada extracto frente a cada microorganismo.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis cualitativo

**Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de extracto de las hojas de *Croton elegans* Kunth (mosquera) en cloroformo y en hexano**

<b>Compuesto</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Extracto Clorofórmico</b>	<b>Extracto Hexánico</b>
<b>Resinas</b>	Resina	Positivo	Positivo
<b>Saponinas</b>	Espuma	Negativo	Negativo
<b>Aminoácidos</b>	Ninhidrina	Positivo	Positivo
<b>Quinonas</b>	Borntrager	+++	+++
<b>Catequinas</b>	Catequinas	Positivo	Positivo
<b>Antocianidina</b>	Antocianidina	Negativo	Negativo
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	+++	+++
<b>Alcaloides</b>	Mayer	++	++
<b>Alcaloides</b>	Wagner	+++	+++
<b>Cardiotónico</b>	Kedde	Negativo	Negativo
<b>Flavonoides</b>	Shidona	Positivo	Positivo
<b>Azúcar Reductoras</b>	Fehling	Negativo	Negativo

++ Presencia moderada

+++presencia abundante

Fuente: Realizado por el autor

Los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de cloroformo y hexano en las diferentes concentraciones no presentaron diferencias en sus componentes, de forma cualitativa las hojas de la planta *Croton elegans* Kunth (mosquera), presentan metabolitos secundarios como: aminoácidos, quinonas, alcaloides están presentes moderadamente, en abundancia están presentes los flavonoides, catequinas, resinas, lo que hace proveer posibles propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y anticancerígeno. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los reportes de (Barrionuevo, 2011) que identificaron metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, taninos y esteroides, no se encontraron compuestos como: saponinas, antocianidinas, cardiotónicos, azúcares reductoras en los extractos crudos.

### 3.1.1 Actividad antimicrobiana del extracto de *Croton elegans* Kunth (mosquera)

**Tabla 2. Promedio de halo de inhibición de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos cloroformo y hexánico en diluciones al 25% y 50% de *Croton elegans* Kunth (mosquera) por el método de difusión en agar según Kirby Bauer**

<i>Extracto</i>	Promedio en milímetros (mm) de halos de inhibición					
	<i>S. aureus</i> ATCC:25923	<i>S. mutans</i> ATCC :25175	<i>S. Pyogenes</i> ATCC:19615	<i>S.pneumoniae</i> ATCC:49619	DMSO	Benzatina Bencilpenicilina
<b>Cloroformo 25%</b>	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	30
<b>Hexano 25%</b>	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	31
<b>Cloroformo 50%</b>	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	30
<b>Hexano 50%</b>	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	30

Promedio de pruebas por quintuplicado

Fuente: Realizado por el autor

En la tabla 2 se muestra los resultados del efecto inhibitorio de los extractos clorofórmico y hexánico obtenidos por el método de difusión en agar según Kirby Bauer, medido con el halo de inhibición sobre el crecimiento de *S.aureus* ATCC:25923, *S.mutans* ATCC:25175, *S.pyogenes* ATCC:19615, *S.pneumoniae* ATCC: 49619. Los extractos y el control DMSO no presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias estudiadas, el diámetro de 6.2 mm corresponde al tamaño del pozo, mientras que el control positivo Benzatina Bencilpenicilina presentó un halo de inhibición de 30 mm para el extracto de cloroformo al 25 % , 50% , hexánico al 50% y para el extracto hexánico al 25% fue de 31 mm , ninguna de las diluciones de prueba ejercieron efecto inhibitorio, la inhibición del control positivo, confirma que el método empleado fue manejado de forma correcta y la no existencia de halos en el caso de los extractos de estudio es por la falta de potencial antibacteriana de los mismos, *Croton elegans* es una especie poco estudiada en cuanto a actividad biológica y resultados como estos direccionan a estudiarlas frente a otros agentes patógenos o considerar otros solventes para la realización de extractos, pues es muy probable que los solventes cloroformo y hexano utilizados, no hayan podido extraer los activos que tienen actividad antibacteriana .

Para confirmar los resultados presentados se realizó cinco repeticiones sin tener ningún resultados en ninguna de las diluciones de estudio, frente a la posibilidad que sea el medio sólido del agar el que no permitió la difusión del extracto, se procedió a realizar una segunda prueba utilizando el método líquido que sería confirmatorio.

**Tabla 3. Concentración mínima bactericida de concentrado clorofórmico y hexánico de las hojas de *Croton elegans* Kunth (mosquera) frente a *S. aureus* ATCC25923, *S.mutans* ATCC25175, *S.Pyogenes* ATCC19615, *S.pneumoniae* ATCC49619 por el método en medio líquido.**

<b>Dilución</b>	<b>% de Extracto Cloroformo y Hexano</b>	<b><i>S.aureus</i> ATCC: 25923</b>	<b><i>S.mutans</i> ATCC: 25175</b>	<b><i>S.pyogenes</i> ATCC: 19615</b>	<b><i>S.pneumoniae</i> ATCC:49619</b>
<b>1</b>	70	+	+	+	+
<b>2</b>	35	+	+	+	+
<b>3</b>	17,5	+	+	+	+
<b>4</b>	8,75	+	+	+	+
<b>5</b>	4,375	+	+	+	+
<b>6</b>	2,187	+	+	+	+
<b>7</b>	1,093	+	+	+	+
<b>8</b>	0,546	+	+	+	+
<b>9</b>	0,273	+	+	+	+
<b>10</b>	0,136	+	+	+	+

+crecimiento

-ausencia de crecimiento

Fuente: Realizado por el autor

La tabla 3, se utilizaron 10 diluciones empezando con una concentración del 70% diluyendo siempre a la mitad logrando un amplio rango de análisis desde 0.136 a 70%, en cada tubo se coloca 2ml de extracto con 10 ul de la suspensión bacteriana de manera que se inoculó  $1 \times 10^6$  UFC/ml para *S.aureus* ATCC:25923 , *S.pyogenes* ATCC:19615 y 1000 ul de la suspensión bacteriana equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml para *S.mutans* ATCC:25175 y *S.pneumoniae* ATCC:49619 a cada una de estas se le somete a una concentración específica de extracto, esperando lograr que

alguna concentración de extracto inhiba el crecimiento bacteriano, pero los resultados indicaron crecimiento en todos los tubos, lo que determina la nula efectividad de los extractos sobre los agentes patógenos de estudio. En la revisión bibliográfica realizada, se encuentra un estudio de actividad antimicrobiana del extracto hexánico del látex de *Euphorbia laurifolia*, frente a la cepa *S.aureus* ATCC:25923 (Miranda, 2015), utilizando la misma metodología del presente trabajo, la investigación de Miranda concluye que la ausencia de actividad antimicrobiana se debe a que la familia *Euphorbiaceae* presenta una sabia lechosa, con gran cantidad de resinas, sustancias gomosas y terpenos con estructuras grandes y variables, compuestos no son muy absorbidos por las células de los microorganismos, dado su elevado peso molecular y su liposolubilidad; pudiendo ser esta también la causa de la falta de actividad microbiana observada en la presente investigación ya que *Croton elegans* es también una Euphorbiacear. Según el estudio de (Cruz, Rodriguez, & Rodriguez, 2010) explican la posibilidad que el compuesto activo no alcance el sitio blanco de acción o bien, la estructura del extracto impide el paso del principio activo al interior de la célula bacteriana, existe muy poca información sobre la composición química de Euphorbiaceae, no se encuentra identificados los metabolitos que serían los responsables de la actividad antibacteriana, siendo importante la caracterización fitoquímica para poder complementar próximos estudios sobre su actividad biológica.

## CONCLUSIONES

El extracto obtenido con solventes apolares (cloroformo y hexano) de las hojas de hojas de *Croton elegans* Kunth (mosquera) en diferentes concentraciones no tienen propiedad antimicrobiana sobre: *S.aureus* ATCC: 25923, *S.mutans* ATCC: 25175, *S.pneumoniae* ATCC: 49619, *S.pyogenes* ATCC: 19615, aceptando la hipótesis nula.

Los constituyentes fitoquímicos extraídos de las hojas de *Croton elegans* Kunth (mosquera), con solventes apolares de Cloroformo y Hexano, no tienen la actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas.

Los extractos de cloroformo y hexano en sus concentraciones del 25% y 50 % no presentaron ninguna diferencia en el tamizaje fitoquímico, identificándose grupos como: aminoácidos, quinonas, alcaloides, flavonoides, catequinas, resina,

La acción inhibitoria de Benzatina Bencilpenicilina (blanco positivo) valida que el método fue ejecutado de forma correcta y que los resultados negativos obtenidos con los extractos realizados por quintuplicado se debe a la ausencia de activos con actividad antibacteriana frente a *S.aureus* ATCC: 25923, *S.mutans* ATCC: 25175, *S.pneumoniae* ATCC: 49619, *S.pyogenes* ATCC: 19615.

El análisis de actividad antibacteriana en método líquido, verificado en diez concentraciones desde una mínima de 0.136% y una máxima de 70% , dando como resultado crecimiento bacteriano en todas estas concentraciones, evidencian que no hay efectividad de los extractos cloroformico y hexánico, descartando que la falta de actividad se deba a la dificultad del activo de difundirse un medio sólido para llegar a ejercer el efecto sobre bacterias, los resultados en este medio corroboran la hipótesis nula de la investigación: los extractos cloroformicos y hexánicos de *Croton*

*elegans* no presentan propiedades antibacterianas frente a *S.aureus* ATCC: 25923,  
*S.mutans* ATCC: 25175, *S.pneumoniae* ATCC: 49619, *S.pyogenes* ATCC: 19615.

## RECOMENDACIONES

Se sugiere seguir con la investigación de la planta *Croton elegans* Kunth (mosquera), considerando su uso etnobotánico en el campo de infecciones respiratorias, deben existir activos con acción antibacterial en patógenos respiratorios, la recomendación sería seguir trabajando con diferentes solventes apolares y polares, además probar frente a otros patógenos.

Evaluar además otros tipos de extracción como la de Goldfish, realizados bajo diferentes condiciones que podría generar una extracción más efectiva.

Evaluar técnicas de cuantificación químicas de los extractos, como también probar extractos de otras partes del material vegetal, tallo o raíces.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alea, J. (2008). *CROMATOGRAFÍA SOBRE PAPEL PARA DETERMINAR COLORANTES*. Obtenido de <http://colabora.inacap.cl/sitios/merlot/Materiales%20MerlotChile/mlcastro/Ciencias%20y%20Tecnolog%C3%ADa/Qu%C3%ADmica/Gu%C3%ADas%20Laboratorios%20Qu%C3%ADmica%20Org%C3%A1nica/Guia%20N%C2%BA3%20Cromatograf%C3%ADa%20en%20papel%20para%20determinar%20colorant>
- Allauca, J. (25 de julio de 2014). Obtenido de CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y CONSERVACIÓN DE PLANTAS : <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3456/1/13T0794%20ALLAUCA%20JOANNA.pdf>
- Alzate , L., Arteaga, D., & Jaramillo, Y. (8 de noviembre de 2009). *Determinación de las propiedades conservantes del fruto del algarrobo (hymenaea courbaril linneaus) para la industria de alimentos*. Obtenido de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/77/1/367-394.pdf>
- Aragon, G. (junio de 2008). *ALCALOIDES Y COMPUESTOS NITROGENADOS* . Obtenido de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf>
- Arias , C., & Rodríguez, M. L. (octubre de 2014). *CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE LA CORTEZA DE YUMBINGA (Terminalia amazonia)(J.F. Gmel.) Exell*. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7257/1/QT06117.pdf>
- Astrid Garzón, G. (2008). LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS: REVISIÓN. *Acta Biológica Colombiana*, 27-36.
- Ayala , S., & Vásquez, T. (noviembre de 2014). Obtenido de EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DEL MARCO (Ambrosia arborescens) Y MATICO (Aristeguietia glutina Lam.) SOBRE HONGOS PATOGENOS CAUSANTES DE LA DERMATOMICOSIS: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7303/1/UPS-QT06177.pdf>
- Barrionuevo, A. (2011). Obtenido de 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 : <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/802/1/T-UTC-1161.pdf>
- Bastidas , T., & Fernández, G. (octubre de 2015). Obtenido de ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO PRELIMINAR DEL TALLO Y RAÍZ DE LA PLANTA Moringa oleífera Lam.:

<http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3692/1/CD0000-32-ANEXO.pdf>

- Bonilla, N., Varón, F., & Garzón, L. (2014). EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS COLORANTES TIPO FLAVONOIDES, FLOR DEL POMO (*Syzygium jambos*). ZONA VERDE DEL IEAR. FLORENCIA CAQUETÁ. *Amazonia Investiga*, 34-42.
- Bótanico, J. (06 de abril de 2011). *Las plantas medicinales y sus principios activos*. Obtenido de [http://www.jardinbotanico-clm.com/wp-content/uploads/2011/04/Ficha\\_Ciclos\\_Bloque2.pdf](http://www.jardinbotanico-clm.com/wp-content/uploads/2011/04/Ficha_Ciclos_Bloque2.pdf)
- Bucay, L. (2009). *ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA VIOLETILLA (*Hybanthus parviflorus*)*. Obtenido de <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/207/1/56T00179.pdf>
- Buchi. (2012). *Manual de instrucción Rotavapor R-210/215*. Obtenido de [http://www.equipar.com.mx/web2012/wp-content/uploads/2012/info\\_man/buchi/Manual\\_Operacion\\_R210\\_215.pdf](http://www.equipar.com.mx/web2012/wp-content/uploads/2012/info_man/buchi/Manual_Operacion_R210_215.pdf)
- Buitrón, X. (1999). ECUADOR:USOS Y COMERCIO DE PLANTAS MEDICINALES SITUACION ACTUAL Y ASPECTOS IMPORTANTES PARA SU CONSERVACION . En X. Buitrón, *ECUADOR:USOS Y COMERCIO DE PLANTAS MEDICINALES SITUACION ACTUAL Y ASPECTOS IMPORTANTES PARA SU CONSERVACION* (págs. 20 -39). TRAFFIC International.
- Brambilla, G., Epifane, M. E., Fumeo, L., & Potiggia, R. (2016). Tecnología de Alimentos , Alcaloides. *Revista Digital Ciencia*, 1-5.
- Cabello, M., & Belloso, G. (2009). Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. *Revista UDO Agrícola* 9 (3), 705-710.
- Caldas, A. (2012). Obtenido de OPTIMIZACIÓN, ESCALAMIENTO Y DISEÑO DE UNA PLANTA PILOTO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO LÍQUIDO: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/tq1111.pdf>
- Cartalla, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 5-14.
- Castañeda, C., Manrique, M., & Ibañez, V. (5 de abril de 2016). *Estudio Fitoquímico y farmacológico de plantas con efecto Hipoglicemiante*. Obtenido de [http://www.revistacultura.com.pe/revistas/RCU\\_18\\_1\\_estudio-fitoquimico-y-farmacologico-de-plantas-con-efecto-hipoglicemiante.pdf](http://www.revistacultura.com.pe/revistas/RCU_18_1_estudio-fitoquimico-y-farmacologico-de-plantas-con-efecto-hipoglicemiante.pdf)
- Cerón, C. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 285-293.
- Corado, A. E. (Julio de 2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como*

*de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio* . Obtenido de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_0951\\_Q.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf)

- Cruz, A., Rodriguez, N., & Rodriguez, C. (2010). EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*. *Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient.* 13 (2), 117-124.
- Delporte, C. (2010). *Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica*. Obtenido de Universidad de Chile: [https://www.ucursos.cl/faciqyf/2010/1/FBQI4109/3/material\\_docente/bajar?id...](https://www.ucursos.cl/faciqyf/2010/1/FBQI4109/3/material_docente/bajar?id...)
- Guadix, A. (2006). *Centros hospitalarios de alta resolución de andalucia. España: MAD.*
- Jaramillo, L. (2010). RESCATE DE LA FLORA NATIVA DE SAN JOSE DE MORAN Y SUS ALREDEDORES . *Vinculacion colectiva -UTE*, 36.
- Jaya, S., & Ramirez, Y. (5 de enero de 2013). *Identificación de Azúcares*. Obtenido de <http://almez.pntic.mec.es/~mbam0000/paginas/LABORATORIOS/azucares.htm>
- Jorin, J., Abril, N., & Barcena, J. (17 de septiembre de 2006). *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular , Campus Universidad de Rabanales*. Obtenido de Separacion de aminoacidos por cromatografía en capa fina y deteccion mediante reaccion con ninhidrina: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/11%20CROMATOGRAF%C3%8DA%20DE%20CAPA%20FINA%20DE%20AAs.pdf>
- Lanche, X. (enero de 2015). *CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE GENTAMICINA FRENTE A Escherichia coli EN MUESTRAS DE UROCULTIVO DE PACIENTES DE CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR DE LA CIUDAD DE LOJA*. Obtenido de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10132/1/XIMENA%20LIZBETH%20LANCHE%20SILVA.pdf>
- Lizcano, A., & Vergara, J. (18 de julio de 2008). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y/O ACEITES ESENCIALES DE LAS ESPECIES VEGETALES Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata FRENTE A MICRORGANISMOS PATÓGENOS Y FITOPATÓ* . Obtenido de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>
- Lopatirisky , A., Gándara , A., & González, D. (febrero de 2003). *PLANTAS MEDICINALES POTENCIALES PARA SU PRODUCCION Y EXPORTACION EN EL ECUADOR* . Obtenido de [http://www.cib.espol.edu.ec/digipath/d\\_tesis\\_pdf/d-32037.pdf](http://www.cib.espol.edu.ec/digipath/d_tesis_pdf/d-32037.pdf)

- Lorén, J. M. (julio de 2010). *REACTIVO DE FEHLING*. Obtenido de <https://blog.uchceu.es/eponimos-cientificos/reactivo-de-fehling/>
- Martínez, A. (junio de 2001). Obtenido de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinas2001.pdf>
- Martínez, A. (2002). Obtenido de *CARDIOTONICOS*: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/cardiotonicos.pdf>
- Martínez, A. (Septiembre de 2005). *FLAVONOIDES*. Obtenido de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>
- Martínez, A. (noviembre de 2012). *Quininas y Compuestos Relacionados*. Obtenido de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/quinonas.pdf>
- Miranda, A. (7 de agosto de 2015). *ESTUDIO FITOQUÍMICO, Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIMICROBIANA in vitro Euphorbia laurifolia EN PATÓGENOS DÉRMICOS*. Obtenido de [http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4011/1/56T00534%20UDC TFC.pdf](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4011/1/56T00534%20UDC%20TFC.pdf)
- Neira, L., Stashenko, E., & Escobar, P. (2014). Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 15-22.
- Núñez, C. (2008). Obtenido de *EXTRACCIONES CON EQUIPO SOXHLET*: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>
- Ordoñez, O. (abril de 2016). *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 RESPIRA*. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12533/1/UPS-QT09830.pdf>
- Ortíz, M. A., Reza, M. C., Chew, R., & Meza, A. (2011). *PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS ANTOCIANINAS*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud XIII(2)*, 16-22.
- Osorio, E. (Septiembre de 2009). *ASPECTOS BÁSICOS DE FARMACOGNOSIA*. Obtenido de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Farmacognosia.pdf>
- Peréz, J., & Quitián, L. (18 de mayo de 2009). *Evaluación de método de extación de saponinas de los residuos del beneficio del Fique*. Obtenido de <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6493/2/130407.pdf>
- Prat, S. (9 de julio de 2009). *Prueba de suceptibilidad antimicrobiana por difusion en agar*. Obtenido de [http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/manual\\_susceptibilidad.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf)
- Ramírez, L., Castillo, A., & Melo, A. (2013). Evaluación del potencial antibacterial in vitro de Croton lechleri frente a aislamientos bacterianos de pacientes con

úlceras cutáneas. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 49-61.

- Rodríguez, F. (julio de 2011). *ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS*. Obtenido de [evuprimero.weebly.com/uploads/9/8/6/3/9863937/estructura\\_y\\_propiedades\\_de\\_pptidos\\_y\\_aminocidos\\_fabin\\_rodriguez.pdf](http://evuprimero.weebly.com/uploads/9/8/6/3/9863937/estructura_y_propiedades_de_pptidos_y_aminocidos_fabin_rodriguez.pdf)
- Shiva, C. (11 de julio de 2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento*. Obtenido de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5606/cmsr1de1.pdf?sequence=1>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignolia, A. (2015). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MEDICA* 63, 663-671. Obtenido de Métodos de estudio de la sensibilidad.
- Toraco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2 de junio de 2015). *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>