

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA**



**EFEECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO PURO
DE *Croton lechleri* Mull Arg. (SANGRE DE DRAGÓN)
SOBRE LA CEPA BACTERIANA DE *Staphylococcus
aureus* ATCC 43300**

**Tesis para obtener el Título Profesional de Médica
Veterinaria**

ERNESTINA PRICE MONTALVA

Asesor: MPVM. MV. Hugo Samamé Beltrán

**Lima, Perú
2019**

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen María por su amor, por guiarme durante todo mi camino en la vida y por elegirme para esta profesión.

A mi padre Enrique Carlos Price por hacerme la persona que soy, por forjar mi carácter y personalidad, por enseñarme el amor y respeto hacia los animales, por apoyarme en mis decisiones, sueños y anhelos, y por último por acompañarme, cuidarme y amarme siempre.

A mi madre Mariela Montalva por aconsejarme, por la paciencia y por el apoyo incondicional que me dio desde mi infancia.

A mi abuela Acela Ganoza por el cariño, apoyo, fe y oraciones que siempre me concediste.

A mi familia, por el cariño y apoyo que me brindaron desde que era niña.

A mi enamorado Mario Pauta por su amor, apoyo, paciencia y tiempo brindado desde que estamos juntos, gracias por tu ayuda y tolerancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Mg. Hugo Samamé Beltrán, por sus enseñanzas, guía y ayuda para la realización de esta tesis.

A mis profesores Mg. Juan Carlos Ramos, MVZ. Alberto Delgado, MV. Mauricio Jara y Dra. Patricia Tabacci, Evelyn Pala por sus enseñanzas, consejos y ayuda para la realización de esta tesis.

A mis mejores amigas Olenka Cobos y María Pía Vives, a mis amigos de la promoción 2009, a mi compañero Enrique Vásquez, a mis amigos y futuros colegas por la paciencia, cariño y apoyo brindado.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la URP, en especial a la Escuela Profesional de Medicina Veterinarias, por brindarme sus instalaciones para la realización de esta tesis.

Índice

	Pág.
Resumen	
Abstract	
1. Introducción.....	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Justificación de la investigación	2
1.3. Objetivos	
1.3.1 Objetivo General	3
1.3.2 Objetivos Específicos	3
2. Marco Teórico	4
3. Antecedentes	20
4. Hipótesis.....	26
5. Materiales y Métodos	
5.1. Lugar de ejecución	27
5.2. Tipo y diseño de investigación	27
5.3. Variables	27
5.4. Operacionalización de las variables	28
5.5. Muestreo	28
5.6. Procedimientos y análisis de datos	29
5.7. Aspecto ético	32
6. Resultados	33
7. Discusión	34
8. Conclusiones	38
9. Recomendaciones	39
10. Referencias bibliográficas	40
11. Anexos	46

RESUMEN

Las infecciones bacterianas son causantes de morbilidad y mortalidad. En la actualidad las bacterias han creado resistencia a los antibacterianos, es por este motivo que es necesario buscar nuevas alternativas de tratamiento en las plantas. **Objetivos.** Determinar el efecto antibacteriano del extracto puro de *Croton lechleri* Müll. Arg frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. **Materiales y métodos.** Por el método de la macrodilución se determinó el efecto antibacteriano de la planta a diferentes concentraciones del extracto (30%, 32%, 34%, 37%, 40%, 43%, 47%, 52%, 58%, 66%, 77%, 91% y 100%), frente al *Staphylococcus aureus*, realizándose seis repeticiones y sembrándose cada una en placas Petri para determinar el efecto bacterioestático o bactericida, y el porcentaje de efecto de inhibición bacteriana. **Tratamiento estadístico.** Las diferencias entre los tratamientos fueron fijados mediante ANOVA y Test de Fisher. **Resultados.** El extracto puro de *Croton lechleri* Müll. Arg mostró efectos antibacterianos frente al *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 a concentraciones mayores del 77%. **Conclusión.** El extracto puro de *Croton lechleri* Müll. Arg posee efecto bactericida frente al *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 que se pueden evidenciar con concentraciones mayores a 77% y presenta un porcentaje de inhibición total entre el 91% hasta el 100%.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Croton lechleri*, sangre de dragón, efecto antibacteriano.

ABSTRACT

The bacterial infections are causing morbidity and mortality, now a days the bacteria have created resistance against antibacterials, this is the reason it is necessary to search new alternatives of treatments in plants. **Objectives.** Determine the antibacterial effect of the pure extract of *Croton lechleri* Müll. Arg against *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. **Materials and methods.** By the macrodilution method has determined the antibacterial effect of the plant with different extract's concentrations (30%, 32%, 34%, 37%, 40%, 43%, 47%, 52%, 58%, 66%, 77%, 91% and 100%), against *Staphylococcus aureus*, making six repetitions and brespent each one on petri plates to determinate the bactericide or bacteriostatic effect, and the percentage of inhibition. **Statistical treatment.** The differences between the treatments using ANOVA, Fisher's Test, Duncan and Tukey. **Results.** The pure extract of *Croton lechleri* Müll. Arg showed antibacterials effects against *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 at concentrations higher than 77%. **Conclusions.** The pure extract of *Croton lechleri* Müll. Arg possess bactericide effects against *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 witch concentrations higher than 77% and has an total inhibition percentage between 91% to 100%.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Croton lechleri*, dragon's blood, antibacterial effect.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Las infecciones bacterianas pueden causar morbilidad y mortalidad a los animales de compañía y los de abasto, además, de representar un riesgo zoonótico al poder contagiar a las personas que están a su alrededor que suelen ser los propietarios incluso los mismos médicos veterinarios y médicos humanos tratantes (Ríos et al., 2015).

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria coagulasa positiva con cápsula (mecanismo por el cual evita la fagocitosis), pared celular y no esporulada. Esta bacteria forma parte de la microbiota de la piel y mucosas nasales tanto de los humanos como de los animales mamíferos y aves, causando infecciones oportunistas cuando hay algún proceso viral o inmunodeficiente. Posee dos mecanismos de patogenicidad celular: por enzimas y por toxinas. Pueden llegar a causar infecciones supurativas en la piel, infectar tejidos blandos, tejido óseo, septicemias e intoxicaciones alimentarias (Gentilini, 2007; Ríos et al., 2015; Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014; Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2014; Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2014).

A lo largo de los años por un mal uso de antimicrobianos ante infecciones producidas por el *Staphylococcus aureus*, éste ha generado mecanismos de resistencia contra diferentes grupos de antimicrobianos (aminoglucósidos, macrólidos, betalactámicos, tetraciclinas y quinolonas), de los cuales los más conocidos son la inactivación enzimática, modificaciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad, con los cuales pueden inhibir la acción de los antimicrobianos (Seija, 2006).

El uso de plantas medicinales se remonta desde las antiguas civilizaciones, en donde se hacían preparaciones con diferentes partes de la planta para la cura de diversas enfermedades, entre ellas frente a infecciones bacterianas. Se ha descubierto que ciertas plantas medicinales poseen propiedades antisépticas y antimicrobianas, y es así como en la actualidad se están usando como alternativas terapéuticas en infecciones con bacterias de cepas multiresistentes (Ferreira, 2010).

En Latinoamérica una de las plantas medicinales que actualmente se está empezando a usar para el tratamiento terapéutico de infecciones bacterianas con cepas multiresistentes es la sangre de dragón (*Croton lechleri Mull Arg*), que ha demostrado poseer propiedades antimicrobianas por la actividad en conjunto que tienen sus metabolitos secundarios tales como los terpenoides, flavonoides, leptinas, entre otros; los cuales pueden llegar a concentraciones adecuadas al sitio de acción y obtener así buenos resultados (Ramirez, 2003).

1.2. Justificación del problema

Actualmente la existencia de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* es un problema de importancia mundial, pues afecta a animales de abasto, el cual tiene un gran impacto económico sobre todo para el control de mastitis bovina, en donde cada vez es más difícil instaurar una terapia antimicrobiana para poder eliminar la infección (Pellegrino, et al., 2011).

La salud humana puede estar también comprometida al haber *Staphylococcus* (microorganismo resistente) en la carne de animales que se consumen y que están envenenadas con toxinas y enzimas extracelulares al haber estado enfermos con infecciones supurativas como mastitis, artritis, infecciones urinarias, neumonía, bacteremia nosocomial y heridas post operatorias; en estos casos los humanos pueden llegar a contraer microorganismos resistentes a ciertos antimicrobianos (Lee, 2003).

En Sudamérica se están haciendo estudios sobre el uso de las plantas medicinales como tratamiento a enfermedades infecciosas, una de las plantas es la sangre de dragón (*Croton lechleri Mull Arg*), la cual ha demostrado tener efectos antimicrobianos ante cepas multiresistentes, por las propiedades que posee su látex: antibacteriano, antiviral y de regeneración tisular; esto se da mediante sus metabolitos secundarios pertenecientes a diferentes grupos fenoles, terpenoides, alcaloides, leptinas, polipéptidos (5 -6), entre otros (Corrales, Castillo, & Melo, 2013).

Se ha demostrado "in vitro" que el *Croton lechleri Mull Arg* tiene efectos antimicrobianos frente a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, pero tiene excelentes

resultados frente al *Staphylococcus aureus*, a concentración mínima inhibitoria con un rango de 0.008 a 256 mg/mL (Bussmann et al., 2010).

Para el procedimiento experimental se usó la planta *Croton lechleri* (Sangre de Dragón), cual crece en nuestra Amazonía peruana y sólo se necesita cortar un trozo de la corteza para extraer la resina que se usará como extracto puro para comprobar sus efectos como antibacteriano.

Mediante este procedimiento experimental se determinó el efecto bactericida del *Croton lechleri* frente al *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, permitiendo así que haya más alternativas en la terapéutica antimicrobiana.

1.3.Objetivo General

Evaluar el efecto antimicrobiano "in vitro" del extracto puro de *Croton lechleri* Mull Arg (Sangre de dragón) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

1.4.Objetivos Específicos

Determinar el porcentaje de inhibición del extracto puro de *Croton lechleri* Mull Arg (Sangre de dragón) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Determinar el efecto bactericida y bacteriostático del extracto puro de *Croton lechleri* Mull Arg (Sangre de dragón) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Microbiología

2.1.1. Reseña histórica de los cocos: *Staphylococcus aureus*

Fue en 1880 en Escocia, donde el médico cirujano Sir Alexander Ogston observó que los cocos en forma de racimo se encuentran en material purulento en los abscesos, dos años después los nombró como *Staphylococcus* para diferenciarlo de los *Streptococcus* por su morfología. Además, demostró que, si se exponían al calor el material purulento producido por la infección para luego ser inoculado en ratones y ser tratado con fenol, podía prevenir la enfermedad. En 1940 se descubrió que tiene una gran capacidad de adaptación y para desarrollar resistencia convirtiéndose en una bacteria preocupante hasta la actualidad (Gentilini, 2007; Seija, 2006; Cervantes-García et al., 2014).

2.1.2. Taxonomía

Pertenece a la familia de Micrococcaceae, son bacterias Gram positivas, es aerobio o anaerobio facultativo, puede fermentar la glucosa en anaerobiosis, posee en su pared celular ácidos teitoicos y es sensible a la enzima lisostafina. Sus células son de forma de esfera y poseen un diámetro de 0.5 – 1.5 micras, no forman esporas, no presentan flagelos y no tienen movimiento, se forman como racimo de uvas (Chans, 2015; Gentilini, 2007; Granados & Villaverde, 2003; I. Rojas, 2014; Arias, 2014; Cervantes-García et al., 2014; Murray et al., 2014; Brooks et al., 2014).

En el género *Staphylococcus* se conocen cerca de 45 especies y 24 subespecies, dentro de las cuales el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* son las más reconocidas que actúan como patógenos bajo ciertas circunstancias en la actualidad. Las especies de estafilococo coagulasa positiva son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* y *Staphylococcus hyicus* el cual es variable. El resto está dentro del grupo de estafilococo coagulasa negativo, los cuales son los de más importancia en medicina veterinaria por su resistencia a los antimicrobianos (Gentilini, 2007; Quinn, Markey, Carter, Donnelly, & Leonard, 2008; Murray et al., 2014).

2.1.3. Hábitat

Se encuentra en la nasofaringe y en las zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas y también en mucosa nasofaríngea. Algunos estafilococos forman parte de la microbiota de la piel y mucosas, en humanos y animales mamíferos y aves. Así como otras especies que causan infecciones óseas, genitourinarias, procesos supurativos en la piel y en tejidos blandos, pueden llegar a producir infecciones oportunistas, septicemias e intoxicaciones alimentarias (Gentilini, 2007; Seija, 2006; Pottumarthy et al., 2004; I. Rojas, 2014; Quinn et al., 2008; Granados & Villaverde, 2003; Arias, 2014; Murray et al., 2014; Ríos et al., 2015).

2.1.4. Características Estructurales

La cápsula formada por polisacáridos unidos a la pared celular, se encarga de la protección ante la fagocitosis de los leucocitos y esto también facilita la adherencia a los catéteres, sondas prótesis u otros materiales sintéticos; en los estafilococos coagulasa negativo, ésta es la que indica la patogenicidad. La composición de la pared celular es una gruesa capa de peptidoglicano, un polímero polisacárido y está compuesto por cadenas de uniones de tipo beta sin ramificaciones y contienen subunidades de ácido n acetil murámico y n acetil glucosamina los cuales se encuentran alternándose (Gentilini, 2007; Seija, 2006; Murray et al., 2014).

Posee cadenas laterales de pentapéptidos que están conectadas con el residuo de ácido n – acetil murámico y poseen una unión cruzada por un puente de pentaglicina adherido a la L-lisina de una cadena y a otra cadena esta adherido la D-alanina, la cual es específica para este tipo de estafilococo. Su función es la de mantener rígida a la pared bacteriana y dar resistencia osmótica. En la patogenia esto ayuda a provocar la inflamación activando el complemento, atrae leucocitos y estimula a la producción de inmunoglobulinas opsonizantes. Este mecanismo se debe a que la pared está cubierta con la proteína A, la cual se une con el fragmento Fc de la inmunoglobulina G, evadiendo a las células polimorfo nucleares, monocitos y activando el complemento y promoviendo a respuestas de hipersensibilidad inmediata y tardía de tipo I y IV (Gentilini, 2007; Seija, 2006; Cervantes-García et al., 2014; Murray et al., 2014; Espinoza & Serna, 2018).

En la superficie externa posee una proteína de factor de agregación, la cual se une al fibrinógeno por una reacción no enzimática y se convierte en una fibrina insoluble lo cual se encarga de agrupar a los estafilococos, esto es lo se denomina como "cumpling" factor. El método por el cual invaden al hospedero se debe a factores de virulencia que está compuesto por un sistema de célula – célula comunicadas y se denomina como *quorum sensing* (QS), el cual está constituido por proteínas de bajo peso molecular producidas por la misma bacteria, éstas son llamadas autoinductoras y de acuerdo a factores del ambiente pueden llegar a activar muchos genes que producen los factores de virulencia. El QS más conocido es el regulador de genes accesorios (*agr*), otros son *sae RS*, *srrAB*, *arlSR* y *lytRS* (Gentilini, 2007; Seija, 2006; (Cervantes-García et al., 2014; Murray et al., 2014; Brooks et al., 2014; Espinoza & Serna, 2018).

2.1.5. Productos celulares determinantes de la patogenicidad

2.1.5.1. Enzimas (Gentilini, 2007; Quinn et al., 2008; Murray et al., 2014; Brooks et al., 2014; Espinoza & Serna, 2018)

Catalasa: evade la fagocitosis por los polimorfos nucleares y además convierte el peróxido de hidrógeno tóxico en agua y oxígeno, lo cual se acumula durante el metabolismo de la bacteria.

Coagulasas: la coagulasa libre cubre a la célula con fibrina lo cual altera la capacidad fagocítica de los macrófagos.

Estafiloquinasas o Fibrinolisinina: causan la degradación de la fibrina y ayuda a la colonización de tejidos adyacentes.

Hialurodinasa: se encarga de hidrolizar al ácido hialurónico, lo cual provoca que la diseminación de la infección sea más rápida.

Lipasas: se encarga de la hidrolización de lípidos, lo cual hace que la diseminación sea en tejidos sebáceos.

Fosfolipasa C: afecta a los tejidos durante la sepsis causando que sean más susceptibles al daño y destrucción que provoca el complemento.

Nucleasa: la termonucleasa o DNAsa ayuda a la invasión del estafilococo.

Beta lactamasa: las cuales son producidas para la resistencia frente a los antimicrobianos betalactámicos como la penicilina, ampicilina y otros, siendo

codificadas por plásmidos transmisibles por mecanismos de traducción y de conjugación.

2.1.5.2. Las toxinas (Gentilini, 2007; Quinn et al., 2008); Granados & Villaverde, 2003; Cervantes-García et al., 2014; Murray et al., 2014; Brooks et al., 2014).

Las exotoxinas se dividen en dos: Una actúa sobre las membranas (Hemolisinas) y otra sobre la actividad de superantígenos como: leucocidina, exfoliatinas, toxinas causantes de shock tóxico y enterotoxinas.

Hemolisinas: son toxinas que dañan la membrana celular causando la lisis y muerte de las células; pueden presentarse solas, en combinación o en algunas ocasiones no se presentan.

Toxina – alfa: Actúa sobre: eritrocitos, leucocitos, monocitos, plaquetas, fibroblastos y células HeLa y endoteliales, es citotóxica y forma poros. Es dermonecrótica y neurotóxica.

Toxina – beta: Es una esfingomielinasa C la cual se encarga de la lisis caliente – fría en la membrana de los eritrocitos. Tiene especificidad para la esfingomielina y lisofosfatidilcolina, aunque no se sabe con exactitud su función, se piensa que le proporciona selectividad a la bacteria.

Toxina – delta: Es una toxina tensoactiva y termoestable. Causa lisis en eritrocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos, plaquetas y membranas celulares de esferoplastos y protoplastos.

Toxina – gamma y leucocidina de Pantón Valentine: Son toxinas polipéptidas conformadas por 2 componentes el S (proteínas de elución lenta) y F (proteínas de elución rápida) las cuales hacen sinergismo y afectan la membrana celular formando poros, siendo regulada por el gen *agr*. (regulador de genes accesorios) Posee un fago móvil (fi – SLT) transfiriendo así esta toxina a otras cepas. La toxina – gamma actúa mayormente en los eritrocitos y la leucocidina actúan sobre los neutrófilos y macrófagos, lo cual promovería la inflamación.

Toxinas con actividad de superantígenos: están formadas por: las enterotoxinas, toxinas exfoliativas y toxinas de choque tóxico, las cuales se unen como moléculas enteras al complejo mayor de histocompatibilidad del tipo II e inducen a la

activación de los macrófagos y linfocitos T₃, liberando citoquinas y aumentando la susceptibilidad de los lipopolisacáridos de las bacterias.

Enterotoxinas: son raras en cepas de origen animal, existen 15 tipos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O). Causan las intoxicaciones alimentarias, son termoestables y resistentes a la hidrólisis de las enzimas gástricas y duodenales.

Toxinas exfoliativas o epidermolítica A y B: (ETA y ETB) causan la formación de ampollas y exfoliación mediante la actividad que posee en la proteasa serina. Se han encontrado en lesiones de estrato granuloso de la epidermis, por medio de la destrucción de los desmosomas sin causar citólisis ni inflamación, es por este motivo que en la epidermis no se hallan leucocitos ni estafilococos. El serotipo A es termoestable y es codificada mediante un fago y el serotipo B es termolábil y codificada mediante plásmidos.

Toxina – 1 del síndrome del choque tóxico: es termoestable y se sintetiza por genes cromosómicos. Causa la liberación de citosinas por macrófagos y linfocitos T, puede producir la extravasación de células endoteliales en bajas concentraciones, mientras que en altas concentraciones produce citotoxicidad, es resistente a la lisis proteica y determinadas cepas de la bacteria producen bacteriocinas las cuales son de origen peptídico, inhibiendo así que otras bacterias proliferen.

2.1.6. Patogenia

Se puede dar de dos formas:

1. De forma directa, la cual es por invasión y destrucción tisular local posteriormente (supuración), que puede ser superficial (piodermas, forúnculos, celulitis, linfadenitis) o profunda (artritis séptica, osteomielitis, piomiositis) y después de diseminarse por vía sanguínea (bacteremia asociadas a contaminación de catéter, infecciones en válvulas derivativas ventrículo – atriales o ventrículo – peritoneales, endocarditis de válvulas protésicas y nativas, infecciones oftalmológicas post quirúrgicas, bacteriamias con o sin shock o falla multiorgánica, formación de abscesos metastásicos que pueden ser en cerebro, pulmón, hígado, bazo, retro peritoneo, riñón, tracto genital) (Gentilini, 2007; Seija, 2006;

Pottumarthy et al., 2004; Arias, 2014; I. Rojas, 2014; Cervantes-García et al., 2014; Murray et al., 2014; Brooks et al., 2014).

2. Por efectos de las toxinas: síndrome de piel escaldada, intoxicación alimentaria y síndrome de shock tóxico (Seija, 2006; Cervantes-García et al., 2014; Murray et al., 2014; Brooks et al., 2014).

Tabla 1. Infecciones producidas por *S. aureus*

Invasión directa
Superficial
• Piodermas, incluyendo impétigo y paroniquia
• Infecciones de piel y tejidos blandos, forúnculos, celulitis, linfangitis, linfadenitis, etc.
Profunda
• Artritis séptica
• Osteomielitis
• Piomiositis
Diseminación por vía sanguínea
• Bacteriemia con o sin shock o falla multiorgánica
• Formación de abscesos metastásicos (cerebro, pulmón, hígado, bazo, retroperitoneo, riñón, tracto genital, etc.)
Enfermedades mediadas por toxinas
• Síndrome de piel escaldada
• Intoxicación alimentaria
• Síndrome del shock tóxico

Fuentes: (Seija, 2006)

Tabla 2. Secuencia de eventos patogénicos e infecciones serias causadas por *S. aureus*

Colonización, portador, producción de toxina
Rotura de barrera cutaneomucosa
Invasión
• Celulitis, linfangitis
• Formación de absceso
• Eventual invasión de la sangre
Bacteriemia
Síndrome de sepsis
• Componentes de la pared
• Toxina del shock tóxico
• Rol de los mediadores disparados
Complicaciones
• Abscesos supurados metastásicos, endocarditis, etc.
• Shock séptico o falla multiorgánica
Muerte

Fuentes: (Seija, 2006)

2.1.7. Epidemiología

Es una bacteria oportunista que se encuentra a nivel mundial, pues forma parte de la microbiota, la cual se desarrolla poco después del nacimiento y la bacteria crea colonias en el neonato en ciertas zonas como: el muñón del cordón umbilical, la piel y el tracto gastrointestinal. En donde mayormente coloniza es en la mucosa nasal y el ser enfermo se convierte en el principal reservorio. Las infecciones pueden ser endógenas o exógenas. Se puede transmitir por inhalación, por contacto o ingestión (Gentilini, 2007; Fariña et al., 2013; Cervantes-García et al., 2014; Arias, 2014; Murray et al., 2014).

A través de los años las infecciones por *Staphylococcus aureus* han sido de gran importancia en la salud pública, pues esta bacteria ha ido tomando resistencia a frente a los antimicrobianos con los que los enfermos eran medicados y en los últimos años la cantidad de brotes epidémicos han ido en aumento a nivel mundial (Cervantes-García, et al., 2014; Ríos et al., 2015).

Tiene como importancia epidemiológica el estudio de la clasificación serológica, que sirve para la tipificación de los antígenos presentes en su pared celular y capsular, además puede presentar bacteriófagos para tipificar de acuerdo a su sensibilidad a ser lisado. Con esta tipificación se puede determinar si el origen de la cepa de *Staphylococcus aureus* es de humano, bovino o aviar (Gentilini, 2007; Quinn et al., 2008).

2.1.8. Resistencia bacteriana

En la década del 40 se reportaron altas tasas de mortalidad causadas por infecciones por estafilococos, para mediados de la década de los 50 se hicieron hemocultivos de esta bacteria resistente a la penicilina, este mecanismo es a través de la obtención de un plásmido que es capaz de degradar el antibacteriano antes de que pueda llegar a la célula diana. Estos plásmidos pueden ser mutados al azar al igual que los genes en los cromosomas, los cuales son microevoluciones; mientras que las macroevoluciones se dan con procesos como inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones y transposiciones.

Esto quiere decir que pueden haber mutaciones en los genes ya existentes como en genes que se obtienen (Sanabria, 2014).

Esta bacteria soporta la desecación en los exudados por semanas, se mantienen vivas a – 30°C en medios líquidos y a 60°C durante 30 minutos, pueden tolerar los cambios de pH entre 4 y 9 y concentraciones de sal del 7.5%, el cual es el medio de aislamiento. Los estafilococos pueden ser inhibidos por las sales biliares, colorantes bacteriostáticos (cristal violeta) y desinfectantes (clorhexidina) (Gentilini, 2007; Brooks et al., 2014).

Son los recientes cambios en la taxonomía los cuales está causando que se desarrollen cepas resistentes del estafilococo, las cuales llegan a ser un riesgo zoonótico, esto quiere decir que además de haber contagio entre animales también afecta a las personas en relación con sus animales de compañía, al igual con los animales de abasto, y por ende llegar a ser un riesgo sanitario para los médicos veterinarios y médicos humanos (Ríos et al., 2015).

Esta resistencia se ha generado por el uso indiscriminado de antimicrobianos y además por el lazo estrecho entre las personas y las mascotas, es por eso que se están efectuando medidas de bioseguridad ambiental y la utilización consciente de los antimicrobianos. (Ríos et al., 2015).

Existen dos tipos de resistencia: natural, la cual es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano y la adquirida, la cual se da cuando hay un fracaso en la terapéutica, es decir cuando se utiliza un determinado antimicrobiano que funciona frente a una bacteria (Ríos et al., 2015; I. Rojas, 2014).

El *Staphylococcus aureus* empezó a mostrar resistencia a la metilina en el año 1951, dos años después de que este antibacteriano fuera introducido como tratamiento frente a este tipo de infecciones y en 1972 se reportó el primer caso en animales en Inglaterra, dado en vacas con mastitis (Guzmán & Lozada, 2007).

El género *Staphylococcus* ha desarrollado mecanismos para la evasión de los efectos de los antimicrobianos como: producción de betalactamasas, inactivación enzimática,

modificaciones en el sitio blanco, alteraciones de las membranas bacterianas, aumento de la salida del antimicrobiano (Seija, 2006; Rojas, 2014).

La hiperproducción de betalactamasas: hiperproducción de penicilinas estafilocócica normal, la cual es mediada por plásmidos. La alta producción de enzimas hace que las meticilinas y oxacilinas sean degradadas de manera lenta. Causan resistencia a los betalactámicos y cefalosporinas de cuarta y quinta generación, incluyendo a la combinación con ácido clavulánico y los carbapenémicos, mediante la destrucción del anillo betalactámico lo cual los hace inútiles (Ríos et al., 2015; I. Rojas, 2014).

Modificación de PBP's: fueron descritas en 1981, las bacterias Gram positivas poseen una barrera de peptidoglicanos en la estructura de la pared celular. Esta barrera está formada por transpeptidasas conocidas como penicillin binding protein (PBP proteínas de anclaje de penicilina), las cuales facilitan la transpeptidación como último paso en la síntesis de peptidoglicanos. Las bacterias producen mínimas modificaciones en las PBP's 1, 2 y 4, que son las que presentan bajo peso molecular y una baja afinidad a los betalactámicos (Arias, 2014; Casellas, 2011; Guzmán & Lozada, 2007; Krupa et al., 2014; Ortega & Simón, 2010; Ríos et al., 2015; Sanabria, 2014).

Las cepas poseen 4 clases de PBP's en la membrana citoplasmática, las que participan en la reticulación de los peptidoglicanos de la pared celular, las PBP's normales tienen alta afinidad a los betalactámicos, cuando se produce la unión a los PBP's no pueden realizar la función de ensamblarse a la pared celular y la bacteria muere (Arias, 2014; Casellas, 2011; Guzmán & Lozada, 2007; Krupa et al., 2014; Ortega & Simón, 2010; Ríos et al., 2015; Sanabria, 2014).

El PBP2a no forma parte del set de los PBP's normales, es una proteína única e inducible, que es producida por los estafilococos resistentes a la meticilina, teniendo baja afinidad por los betalactámicos, y es por esto que puede sustituir funciones biosintéticas de las PBP's normales frente a los betalactámicos y así previene la lisis celular (Arias, 2014; Casellas, 2011; Guzmán & Lozada, 2007; Krupa et al., 2014; Ortega & Simón, 2010; Ríos et al., 2015; Sanabria, 2014; Brooks et al., 2014).

Se ha descubierto que el estafilococo posee el gen *mecA* (gen ausente en las cepas

susceptibles a la meticilina), el cual es un segmento del ADN bacteriano de aproximadamente, 2kb, que posee dos elementos reguladores (*mecR1* y *mec I*) que controlan la transcripción del gen. Este gen que se encarga de codificar una proteína fijadora de penicilinas alterada (PBP2a), este gen se ubica en un elemento genético móvil conocido como casete cromosómico estafilocócico (SSC*mec*). El SSC*mec* está compuesto por: el gen *mec*, elemento de recombinasas de casete cromosómico. CCR responsable de la movilidad del elemento y otros elementos genéticos como: plásmidos, transposones y secuencia de inserción. Según la presencia o ausencia de estos elementos se han caracterizado 8 distintos tipos de casete (I, IA, II, III, IIIA, IIIB, IV, IVA) de mediante este el gen puede ser transferido a estafilococos de la misma o diferente especie. Esto quiere decir que una cepa sensible a los betalactámicos al obtener este gen por transferencia horizontal de una cepa resistente, puede crearse una nueva cepa resistente a los betalactámicos e incluye también la resistencia a los carbapenemas y cefepime (Arias, 2014; Casellas, 2011; Guzmán & Lozada, 2007; Krupa et al., 2014; Ortega & Simón, 2010; Ríos et al., 2015; Sanabria, 2014; Murray et al., 2014; Brooks et al., 2014).

Se ha relacionado también que la sensibilidad a antimicrobianos está vinculado a la distribución geográfica, pues hay diferentes clones predominantes dependiendo el continente. En América del norte la mayoría de estafilococos son sensibles a cloranfenicol, rifampicina y amikacina, sin embargo, en Europa son resistentes al cloranfenicol y sensibles a la minocilina (Ríos et al., 2015).

Inactivación enzimática: inactivan la hidrólisis y pueden modificarse para inactivar la acetilación, adenilaciones o fosforilación, las cuales hacen inútiles los efectos de los aminoglucósidos (Seija, 2006).

Modificaciones en el sitio blanco: modificación del gen PBP, adquisición de genes para codificar la sustitución de blancos originales PBP 2 o la dihidrofolato reductasa alternativa en cepas con resistencia al trimetropim (Seija, 2006).

Alteraciones de las membranas bacterianas: se da más en gram negativas, en donde la membrana formada por lípidos que son impermeables a las sustancias hidrofílicas. Es así como las sustancias hidrofílicas quedan confinadas a través de las proteínas transmembranas con función de porinas. Hay ciertos antimicrobianos que poseen

moléculas de gran tamaño (penicilina y vancomicina) y por ende no pueden pasar por las porinas. Aunque la existencia de las porinas sólo disminuye el flujo de llegada del antimicrobiano al espacio periplasmático sin causar una resistencia significativa, sin embargo cuando ocurre este tipo de resistencia unido a otro puede generar altos niveles de resistencia (Seija, 2006).

Aumento de la salida del antimicrobiano: la resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico, el cual llega a afectar a diferentes grupos de antimicrobianos como betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. En bacterias gram negativas tiene tres proteínas de alto peso molecular y está relacionada con la membrana citoplasmática, que funciona como fusión de ambas membranas y porinas en la membrana externa. En las gram positivas existe una proteína de membrana con función ATPasa la cual funciona como bomba de eflujo (Seija, 2006).

Resistencia a macrólidos: se ha demostrado que hay resistencia a la eritromicina y es por dos fenotipos. El primero se da por una modificación en el rRNA blanco por enzimas que metilan un residuo específico en el rRNA, como resultado se obtiene una disminución en la unión a la eritromicina y a las lincomisinas. En esta resistencia los genes que codifican se encuentran en los plásmidos y en los cromosomas. El segundo comprende una resistencia más amplia a macrólidos, se da por medio de un gen que se encuentra en el plásmido el cual codifica la bomba de eflujo de ATP – dependiente. (Seija, 2006).

Resistencia a aminoglucósidos: se dan por 3 eventos (Seija, 2006).

- 1.- Una codificación por mutación cromosómica, la cual altera el sitio de acción en el ribosoma.
- 2.- Un transporte ineficiente, el cual causa una baja resistencia.
- 3.- Enzimas modificadoras, es un mecanismo común, el cual modifica a nivel de los transposones que se localizan en plásmidos o cromosomas.

Resistencia a quinolonas: se debe a una disminución en la actividad de la girasa, la cual se da por mutaciones en el gen *gyrA* y *gyrB*, que forma parte de la estructura de la subunidad A del ADN girasa, mutaciones en la topoisomerasa IV. Una mutación en el gen *norA* o *MepA* provoca el superenrollado negativo de los cromosomas bacterianos y causa la disminución de la acumulación del fármaco en el interior de la célula, otro

método por el cual genera resistencia es por el mecanismo de la bomba de eflujo. Las mutaciones en el gen *glA* cromosómico también otorga una baja resistencia a las fluoroquinolonas. (Seija, 2006; (Sanfilippo, Hesje, Haas, & Morris, 2012); (Redgrave, Sutton, Webber, & Piddock, 2014).

2.2. Antibacterianos

2.2.1. Reseña histórica

La terapéutica antibacteriana es muy antigua, hace más de 2500 años los chinos ya empleaban este tipo de terapias para el tratamiento de diferentes infecciones, los cuales eran extraídos de compuestos naturales como cáscaras de soja o diversos vegetales (Gentilini, 2007; Seija, 2006).

Es en 1877 Pasteur y Joubert concluyen en que hay organismos que destruyen otros organismos, establecieron entonces que “la vida destruye la vida”. En 1929 Fleming descubre el metabolito fúngico para la penicilina, durante la segunda guerra mundial Chain y Florey continuaron con el desarrollo de las penicilinas. En 1936 Dogmagk descubre las sulfonamidas, en el cual observa el poder antibacteriano y se empieza a usar en la clínica. Para luego desarrollarse los antimicrobianos sintéticos y semisintéticos (fluoroquinolonas), los cuales tienen efectos más potentes y más efectivos para las enfermedades infecciosas (Doti, 2009; Gentilini, 2007; Seija, 2006).

Los antibacterianos son sustancias de origen natural, semisintética o sintética, que causan la destrucción o inhibe la multiplicación de las bacterias causando poco a ningún daño al hospedador. Estos se pueden diferenciar por sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, espectro de acción y mecanismo de acción (Doti, 2009; Giguère, 2013).

Hay dos tipos de antimicrobianos:

Los antimicrobianos bactericidas son: los betalactámicos, cefalosporinas, los péptidos, aminoglucósidos, furanos, fluoroquinolonas, nitromidazoles, rifamicinas y sulfonamidas potenciadas (Doti, 2009).

Los antimicrobianos bacteriostáticos: lincosamidas, macrólidos, anfenícolos, tetraciclinas y sulfonamidas (Doti, 2009).

La actividad de los antibacterianos se evalúa mediante la concentración mínima inhibitoria, esta determina cual es la concentración más baja del antimicrobiano para prevenir el crecimiento de la bacteria, en cambio la concentración mínima bactericida, determina la concentración más baja del antimicrobiano para matar a la bacteria. Esto es una aproximación pues depende de la concentración del fármaco que llega al lugar de la infección y de la bacteria involucrada. Los bactericidas a altas concentraciones terapéuticas se convierten en bacteriostáticos, y los bacteriostáticos a altas concentraciones terapéuticas se convierten en bactericidas (Giguère, 2013).

2.3. *Croton lechleri* Mull Arg (Sangre de dragón)

2.3.1. Descripción

El nombre científico de la sangre de dragón es *Croton lechleri* Mull. Arg. (sin *C. draconoides* Mull. Arg). Especies sudamericanas estrechamente relacionadas conocidas como sangre de dragón incluyen *Croton palanostigma* Klotzsch (sin. *C. benthamianus* Mull. - Arg) y *C. erythrocillus* Mull. - Arg., ambas se encuentran en el Perú. Algunos botánicos peruanos clasifican *C. draconoides* (Mull. Arg) como sinónimo de *C. palanostigma* (Klotzschs). En el centro de Perú (Oxapampa, Pasco), otras dos especies conocidas localmente como sangre de dragón son *C. perspicuous* Croizat y la *C. rimbachii* Croizat. En Brasil, también es conocida como sangre de dragón o Sangra d'Água; *Croton Urucurana baillon* se produce tanto en el sureste de Brasil y en Paraguay (Jones, 2003).

2.3.2. Taxonomía (USDA, 2018)

Nombre científico	:	<i>Croton lechleri</i>
Reino	:	Plantae
Phylum	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Euphorbiales

Familia	:	Euphorbiaceae
Género	:	Croton
Epíteto específico	:	Lechleri

2.3.3. Descripción botánica

El árbol alcanza los 10 a 20 metros de altura, la raíz es cilíndrica cónica, la peridermis está constituido por corcho o súber. La corteza del tallo posee gran cantidad de lenticelas y látex de color rojo oscuro con varias tonalidades. Las hojas son de 12 a 20 centímetros de largo y de 5 a 14 centímetros de ancho, las hojas más tiernas son de color blanco rojizo. Los frutos son de forma capsular globoso de 3 mm de ancho y semillas lisas con carúncula y endosperma oleaginoso (Ramirez, 2003).

2.3.4. Hábitat y Distribución

Su origen es en las zonas tropicales y subtropicales de Sudamérica, mayormente se encuentra en Perú en estado silvestre en las montañas sobre todo en bosques húmedos. En el Perú este árbol crece en los departamentos de Amazonas, Cusco, Huánuco, Junín, San Martín, Madre de Dios y Loreto a unos 705 – 1660 m.s.n.m (Ramirez, 2003).

Para crecer requiere de suelos arcilloso y areno – arcillosos que sean profundos y ricos en nutrientes, con buena exposición de luz. La semilla germina entre los 10 – 14 días. La cosecha del látex se hace de los árboles ya grandes, aproximadamente a partir del octavo año, la cual se realiza haciéndole cortes a la corteza del tronco, la madera también es destinada para la obtención de papel y leña y la resina se utiliza para el colorante de los barnices y mármoles y en la preparación de laca para oro (Ramirez, 2003).

2.3.5. Usos en la historia

El nombre se le dio en la India por la mitología con los dioses Brahma y Shiva, es así como se describe un lazo entre el dragón y el elefante y que de ambos resulta la sangre de dragón con propiedades medicinales como hemostático y antidiarreico. Es de color rojizo y puede presentarse en gránulos, polvo y extracto. Se han descrito sus usos en

literatura registrada en países como España, México, Venezuela, Ecuador, Colombia y otros países de África y sudeste de Asia (Gupta, Bleakley, & Gupta, 2007).

Se ha usado en medicina en las civilizaciones griegas, romanas y árabes, para curar todo tipo de enfermedades como coagulante en hemorragias, antidiarreico, para reducir la fiebre, disentería, úlceras en la boca, en la garganta, intestinos y estómago, como antiviral en el sistema respiratorio y digestivo, para problemas de piel como el eczema, funciona como astringente, relajante muscular, para la gonorrea, obstrucción del conducto nasolacrimal y quemaduras leves. En China se usó para la leucorrea, fracturas, heridas y úlceras estomacales e intestinales y diarrea. Se descubrió que poseía propiedades para la regeneración tisular en las fracturas, esguinces, úlceras, estimulante de la circulación, y para controlar el dolor, también posee propiedades antisépticas (Gupta et al., 2007).

En Latinoamérica y específicamente en Perú fue usado por los indígenas por vía oral para el tratamiento de diferentes tipos de diarreas, cólera, hemorroides, para baños vaginales antes del parto, para sanar el tejido interno después de un aborto. Dentro de las propiedades descritas, ésta posee efectos antivirales, antineoplásicos, antiinflamatorios, antirreumáticos y antibacterianos (Gupta et al., 2007).

Actualmente se usa la savia para tratamientos de diarrea crónica, leucorrea, gastritis, úlceras gastrointestinales, cicatrizante, estimula al sistema inmunológico, bactericida, bacteriostático, fungicida, antiviral, antioxidante, anticancerígeno (hígado, estómago, útero), antirreumático, antiinflamatorio, antiofidico; y tratamientos para: influenza, tonsilitis, herpes, uta, anemias, tuberculosis, quemaduras, acné, resfriados, afectaciones en las amígdalas, gingivitis, cervicitis, para mejorar la fertilidad, reducción del peso y control de hemorragias (Corrales et al., 2013).

En la actualidad se ha demostrado que la savia pura o diluida tiene una efectividad del 90% en la disminución del número de bacterias y, que además en el caso de las úlceras hay una disminución en el número de los granulocitos, lo cual ayuda a disminuir los niveles de mieloperoxidasa, efecto que no posee ningún otro antibacteriano o probiótico (Jones, 2003).

2.3.6. Composición Química

Se han identificado en el látex esteroides, cumarinas, alcaloides (tipo isoquinoleico y fenantrenico, la taspina), flavonoides, taninos (54%), saponinas (baja concentración), antocianinas, proantocianinas – 1,4 y SP 303, antracenos, compuestos reductores (4%) como galactosa, lactosa, ramnosa, triterpenoides, compuestos fenólicos (ácido gálico), vitamina A, E y C, contiene ácidos orgánicos, almidón, celulosa, grasas, lignanos (dihidrobenzofurano 3, 4 – 0 – dimetilcedrusina y dihidrobenzofurano 4 – 0 – metilcedrusina), mucilagos, proteínas y catequinas (epicatequina, galocatequina, epigallocatequina). Las hojas poseen alcaloides aporfina (taliporfina y glaucina), fenoles, ácido clorequínico, leptinas, coberinas A y B, 1, 3, 5 – trimetoxibenceno, 2, 4, 6 – trimetoxifenol, proantociadina, entre otros (Ramirez, 2003; Corrales et al., 2013).

3. ANTECEDENTES

Nascimento, Locatelli, Freitas, & Silva, 2000 en su investigación de “Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemical on Antibiotic Resistant Bacteria”, prueban cepas susceptibles y cepas resistentes a antimicrobianos de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* frente a diferentes extractos de plantas como *Achillea millifolium*, *Caryophyllus aromaticus*, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Psidium guajava*, *Punica granatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Syzygyum joabolanum* y *Thymus vulgaris*, comprobando su actividad antimicrobiana. Como resultado se obtiene que la *Caryophyllus aromaticus* y la *Syzygyum joabolanum* tienen la mayor actividad como antimicrobiano, y a su vez que estos extractos muestran sinergismo con otros antimicrobianos.

Srinivasan, Nathan, Suresh, & Lakshmana Perumalsamy, 2001 en su investigación “Antimicrobial Activity of Certain Indian Medicinal Plants used in Folkloric Medicine”, demostró la actividad antibacteriana midiendo el diámetro de los halos en diferentes tipos de agar, 22 extractos funcionan como antibacterianos frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Algunas plantas que se utilizaron fueron *Albizia lebbbeck*, *allium cepa*, *Allium sativum*, *Curcuma longa*, entre otras frente a bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, entre otras. Se obtuvo como resultado un potencial significativo de la actividad antibacteriana que poseen los extractos puros de las plantas ya mencionadas frente a las bacterias tanto Gram positivas y Gram negativas.

Mahady, 2005 en su publicación medicinal “Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections”, manifiesta que las infecciones son causas de muerte y morbilidad en el mundo a pesar del desarrollo de la microbiología para el control de microorganismos siguen apareciendo brotes de bacterias multidrogo resistente y además de nuevos patógenos emergentes. Cientos de especies de plantas han sido probadas de manera *in vitro* que funcionan como antibacteriano de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las plantas medicinales han sido probadas de manera *in vitro*, *in vivo* y en la clínica diaria en animales y humanos, las cuales pueden ser significativamente efectivas en terapias antimicrobiales.

J. Rojas, Ochoa, Ocampo, & Muñoz, 2006 en su investigación “Screening for Antimicrobial Activity of Ten Medicinal Plants used in Colombian Folkloric Medicine: A Possible Alternative in the Treatment of Non – nosocomial Infections”, se evalúa la actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de los extractos de las plantas *Bidens pilosa*, *Bixa orellana*, *Cecropia peltata*, *Cinchona officinalis*, *Gliricidia sepium*, *Jacaranda mimosifolia*, *Justicia secunda*, *Piper pulchrum* y *Spilanthes americana* frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolytic*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Se obtuvo como resultado que los extractos muestran actividad antibacteriana y una baja concentración mínima inhibitoria, excepto frente al *Streptococcus β hemolytic* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Mahesh & Satish, 2018 en su publicación “Antimicrobial Activity of some important Medicinal Plant against Plant and Human Pathogens”, manifiesta la comparación del extracto etanólico que se extrae de las hojas, raíces y corteza de las plantas *Acacia nilotica*, *Sida cordifolia*, *Tinospora cordifolia*, *Withania somnifer* y *Ziziphus Mauritania*, las que muestran alta actividad antibacteriana frente a bacterias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* y *Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum*. Estas mismas plantas a su vez presentan altas propiedades anti fúngicas frente a *Aspergillus flavus*, *Dreschlera turcica* y *Fusarium verticillioides*.

Alviano & Alviano, 2009 en su publicación “Plant Extracts: Search for new Alternatives to treat Microbial Diseases”, establece que el uso de plantas es una nueva estrategia para descubrir nuevos tratamientos medicinales. Es así como se ha estudiado que las plantas poseen propiedades antibacterianas y antioxidantes, los cuales pueden encontrarse tanto en extractos como en aceites esenciales, pudiéndose usar en diferentes tipos de infecciones (bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias). Sin embargo, los mecanismos de acción de las plantas pueden llegar a causar toxicidad en mamíferos por la interacción de macromoléculas, es por esto que se deben de investigar a aquellas especies de plantas que no hayan sido usadas en estudios farmacológicos.

Abdallah, 2011 en su publicación “Plants: An Alternative source for Antimicrobials”, manifiesta que a pesar de que los antibióticos han curado infecciones a lo largo de los años, en la actualidad las bacterias están desarrollando resistencia y por ende se tienen

que desarrollar nuevas estrategias para combatir a las infecciones bacterianas, como el utilizar fuentes naturales, es decir la medicina tradicional a base de plantas, las cuales tienen diferentes mecanismos de acción y funcionan como antimicrobiales.

Rosas-Piñón et al., 2012 en su estudio “Ethnobotanical Survey and Antibacterial Activity of Plants used in the Altiplane of México for the Treatment of Oral Cavity Infections”, establece que en las encuestas realizadas en el altiplano mexicano se han demostrado que hay 47 especies de plantas usadas como tratamiento de enfermedades bucales. Los extractos etanólicos y de agua fueron extraídos de diferentes partes de plantas (tronco, hojas, raíz, fruto) de *Haematoxylon brasiletto*, *Punica granatum*, *Lostephane heterophylla*, *Bursera simaruba*, *Cedrela odorata*, *Rhus standleyi*, *Persea americana*, *Eysenhardtia polistachya*, *Syzygium aromaticum*, *Amphiterrygium adstringens*, *Argemone mexicana*, *Cinnamomun zeylanicum*, *Cnidioscolus multilobus* comparando la concentración mínima inhibitoria de efecto bactericida frente a las bacterias *Streptococcus mutans* y *Phrophylromonas gingivalis* de manera *in vitro*. Teniendo como resultado que los extractos de agua tienen mayor concentración mínima inhibitoria frente a dichas bacterias.

Radulovi, Blagojevi, Stojanovi-Radi, & Stojanovi, 2013 en su estudio “Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action”, establece que las bacterias a lo largo de los años han desarrollado resistencia a antibacterianos, hay emergencia de patógenos nuevos y resurgencia de antiguas bacterias. es por este motivo que se están descubriendo y desarrollando agentes antibacterianos a través de las plantas como fuente de diferentes componentes que son metabolitos secundarios como alcaloides, fenoles, terpenoides; los cuales poseen una potente actividad antibacteriana, con diferentes mecanismos de acción como la inhibición de la pared celular, síntesis de proteínas, induce a la fuga de las células por medio de la manipulación de las membranas interfiriendo con el metabolismo, síntesis y función del ADN y ARN. Se estudió a su vez la capacidad de las plantas tanto en extractos como en aceites esenciales, pueden mostrar efectos antagonistas o sinergistas junto con otros antibacterianos y la ventana terapéutica que se puede llegar a tener.

Marasini et al., 2015 en su investigación” Evaluation of Antibacterial Activity of some Traditionally Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria”, prueba la

concentración mínima inhibitoria de extractos etanólicos de 16 tipos de plantas entre ellas *Cinnamomum camphora*, *Curculigo orchioides*, *Curcuma longa*, *Cynodon dactylon* frente a diferentes cepas de bacterias como: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, *Pseudomonas aeruginosa* imipenem resistente, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella tiphy* multidrogo resistente y *Salmonella typhimurium*. El resultado fue que los extractos de planta empleados tienen una capacidad de actividad antibacteriana con una concentración mínima inhibitoria de <100 µg/ mL.

Lopez-Romero, González-Ríos, Borges, & Simões, 2015 en su investigación “Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*”, el objetivo de este estudio fue determinar los efectos antibacterianos que poseen los componentes como *Carveol*, *carvone* y *Citronellal* frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida. El resultado obtenido fue que el *Citronellal* tiene una significativa actividad antibacteriana frente a ambas bacterias, mediante la destrucción de la membrana bacteriana.

Mabhiza, Chitemerere, & Mukanganyama, 2016 realizan en su investigación “Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callitemon citrinus* and *Veronia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*”, los alcaloides pertenecientes a las plantas *Callitemon citrinus* y *Veronia adoensis* demostraron tener actividad antibacteriana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en el estudio se determinó la concentración mínima inhibitoria. En ambas bacterias los alcaloides funcionan como bacterioestáticos e inhibe la proteína de transporte dependiente de ATP.

Huapaya, J ; Flórez, M; Larrea, H 2003 en su investigación “Control Microbiológico y Evaluación de la Actividad Antimicrobiana *In vitro* de *Croton lechleri* “Sangre de Grado”, con el objetivo de comprobar el efecto antimicrobiano del gen crotón sobre las bacterias Gram positivas, usando diferentes muestras de mercados de cercado de Lima, San Martín, Huánuco y Ucayali. El método utilizado fue el de excavación en placa cultivo con las siguientes cepas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas*

aeruginosa. Como resultado se obtuvo que la mejor actividad antimicrobiana fue frente al *Staphylococcus aureus*.

Ferreira, E., 2010, en su investigación “Evaluación de Actividad Antibacteriana y Moduladora de Resistencia Bacteriana a los Aminoglucósidos a los Extractos Polares y Apolares de *Croton campestris* (dosel), *Ocimum gratissimum* (albahaca) y *Cordia verbanacea* (cordia)”, con el objetivo de evaluar de manera comparativa las actividades microbiológicas de los extractos metanólicos y hexenales obtenidos de las hojas de las plantas para probar el potencial antibacteriano y la interacción de los extractos con otras técnicas de control bacteriano mediante la concentración mínima inhibitoria utilizando bacterias resistentes y multiresistentes de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se encontraron metabolitos secundarios en los extractos que poseen actividad antimicrobiana y que los extractos apolares tiene mayor eficiencia en bacterias multiresistentes de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Corrales et al., 2013, en su investigación “Evaluación del Potencial Antibacterial de *Croton lechleri* frente a Aislamientos Antimicrobianos de Pacientes con Úlceras Cutáneas”, tuvo como objetivo la evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos aeróbicos de pacientes con úlceras cutáneas del Sanatorio de Agua de Dios, Cundinamarca, Colombia, causadas por bacterias multiresistentes utilizando el sistema automatizado BBL-Crystal™ para el aislamiento bacteriano y los ensayos de difusión en pozo, dilución en agar y de difusión en disco para sensibilidad bacteriana contra bacterias Gram positivo y Gram negativo. Como resultado se obtuvo que de los extractos empleados de *Croton lechleri*, el extracto etanólico evidenció un mayor potencial antibacterial obteniendo halos de inhibición de gran significancia comparables a los antibacterianos de rutina.

Lavor et al., 2014 en su investigación “Association between Drugs and Herbal Products: *In vitro* Enhancement of the Antibiotic Activity by Fractions from Leaves of *Croton campestris* A. (euphorbiaceae)”, con el objetivo de evaluar la actividad antibacterial de los extractos de metanol y fracciones de acetato etílico obtenidos de las hojas de *Croton campestris*, recurrieron al método microdilución para obtener la concentración mínima inhibitoria, la actividad antibacterial y moduladora frente a bacterias resistentes. Como resultado se evidenció que la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de *Croton*

campestris y sus fracciones interfieren y modifican la resistencia bacteriana frente a aminoglucósidos.

4. HIPÓTESIS

4.2. Hipótesis general

Hipótesis nula

El extracto puro de *Croton lechleri Mull Arg.* no posee efectos antimicrobianos sobre la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Hipótesis alterna

El extracto puro de *Croton lechleri Mull Arg.* posee efectos antimicrobianos sobre la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

4.3. Hipótesis específicas

4.3.3. Hipótesis específica 1

Hipótesis nula

El extracto puro de *Croton lechleri Mull Arg.* no posee un alto porcentaje de efecto de inhibición frente a la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Hipótesis alterna

El extracto puro de *Croton lechleri Mull Arg.* posee un alto porcentaje de efecto de inhibición frente a la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

4.3.4. Hipótesis específica 2

Hipótesis nula

El extracto puro de *Croton lechleri Mull Arg* no posee un efecto bactericida o bacteriostático frente a la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Hipótesis alterna

El extracto puro de *Croton lechleri Mull Arg* posee un efecto bactericida o bacteriostático frente a la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

5 METODOLOGÍA

5.1 Lugar de ejecución

Laboratorio de Parasitología LA – 79 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5.2 Tipo y Diseño de Investigación

El diseño del experimento es cuantitativo y cualitativo experimental, porque se utilizó su diseño para analizar la certeza de las hipótesis formuladas. El alcance de la investigación fue explicativo, ya que proporciona sentido al fenómeno al que se hizo referencia.

El presente trabajo de investigación fue de tipo experimental, porque se evaluó el efecto de una variable, donde se manipularon las condiciones de la investigación.

Fue prospectivo, porque es un estudio que comenzó a realizarse en el presente, pero los datos fueron analizados en un determinado tiempo a futuro.

Es *in vitro* porque la técnica de investigación para el estudio se realizó en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

5.3 Variables

Modelo de Variables

$Y = \bar{X} + T + E$: Donde Y es una variable aleatoria que representa la observación, \bar{X} el efecto constante, T el efecto del tratamiento y E son las variables aleatorias de otros factores

Variable Independiente

Extracto puro de *Croton lechleri Mull Arg.*

Variable Dependiente

Efecto Antibacteriano.

5.4 Operacionalización de las variables

VARIABLES	CATEGORIZACIÓN	INSTRUMENTO	ESCALA DE MEDIDA	INDICADORES
Extracto puro de <i>Croton lechleri</i>	Cualitativo	Observación directa de la turbidez de la solución en diferentes concentraciones	De Razón	100% 91% 77% 66% 58% 52% 47% 43% 40% 37% 34% 32% 30%
Efecto Antibacteriano	Cuantitativa	Contador de colonias Ficha de recolección de datos	De Razón	≥ 1 UFC/mL.

5.5 Muestreo

5.5.1 Población

La población estuvo constituida por una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 proporcionada por el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

Por parte del vegetal utilizado la población estuvo constituida por la resina líquida de *Croton lechleri Mull Arg* proporcionada por el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5.5.2 Muestra

La muestra del estudio se obtuvo en el laboratorio a partir de la cepa proporcionada. Estuvo constituida por 10 mL de una suspensión bacteriana a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL del cultivo puro de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

A partir del extracto vegetal total se prepararon las concentraciones de 100%, 91%, 77%, 66%, 58%, 52%, 47%, 43%, 40%, 37%, 34%, 32% y 30%.

5.6 Procedimientos y análisis de datos

5.6.1 Recolección de la muestra vegetal

Las muestras de la resina de *Croton lechleri Mull Arg* (Sangre de dragón) fueron recolectadas en Iquitos, capital del departamento de Loreto en el mes de Febrero del 2018. Siendo almacenadas en un frasco ámbar en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5.6.2 Preparación de la concentración madre del extracto puro de *Croton lechleri Mull Arg*

Para la obtención de la solución Stock o madre del extracto crudo de *Croton lechleri Mull Arg* se procedió a pesar 5.12 gramos del extracto puro y disolverlo con el caldo Muller Hinton. Seguidamente se prepararon las diluciones seriadas en base 2 de cada extracto a evaluar (1:1, 1:2, 1:4, 1:6 etc.) previo al inicio del ensayo (Corrales et al., 2013).

5.6.3 Preparación y estandarización del inóculo bacteriano

La estandarización del inóculo se realizó mediante la técnica turbidimétrica. A partir del cultivo reactivado se realizó una suspensión en caldo Mueller Hinton hasta alcanzar una concentración bacteriana aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente al tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland. La turbidez adecuada fue verificada visualmente mediante una adecuada luz y contraste. El inóculo preparado se utilizó inmediatamente después de su preparación (Weinstein et al., 2012).

5.6.4 Pruebas de susceptibilidad, acción antibacteriana del extracto puro.

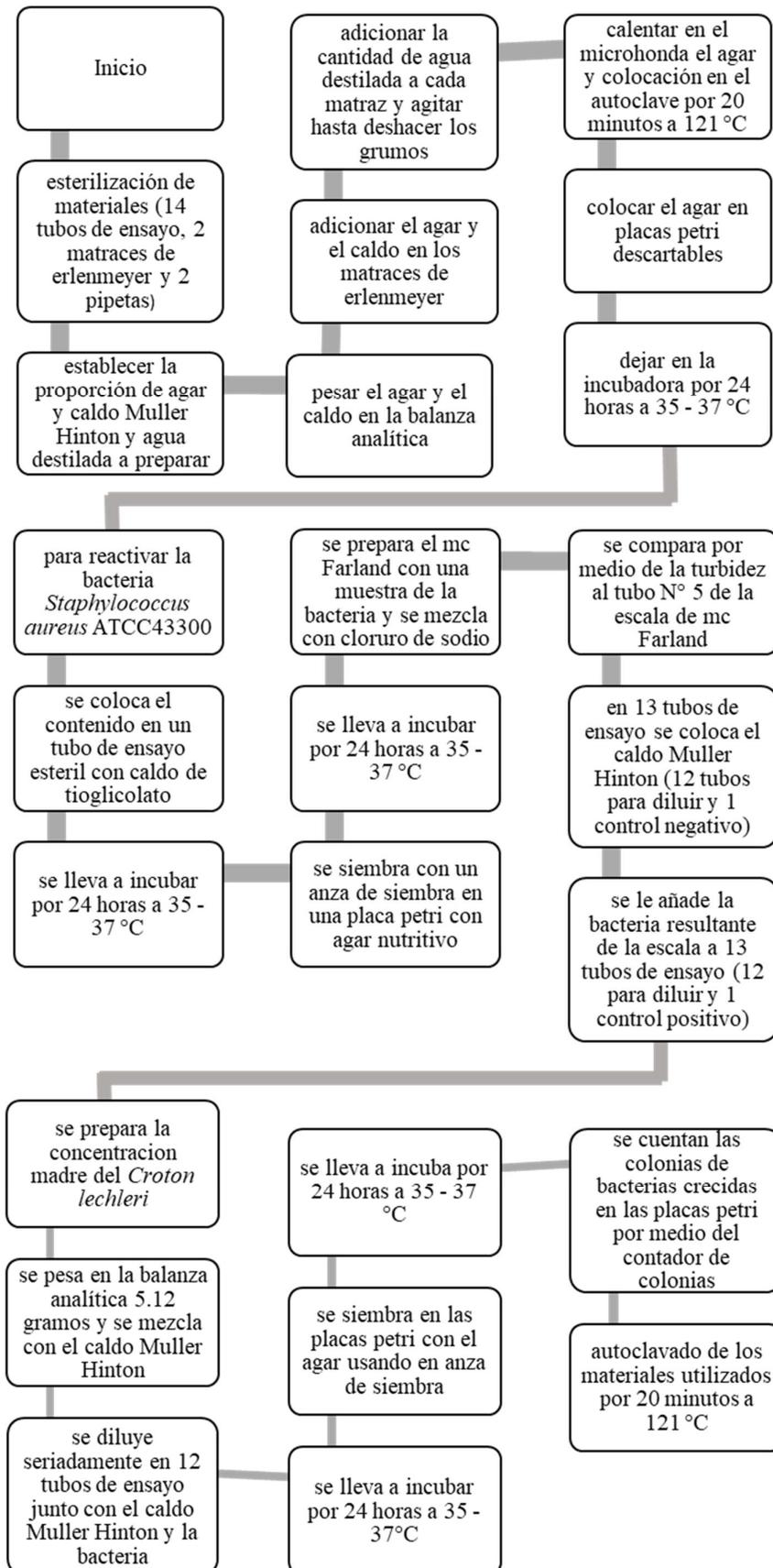
5.6.4.1 Método de macrodilución

Para este método se siguieron los procedimientos propuestos por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) para los test de susceptibilidad bacteriana de crecimiento aeróbico (Weinstein et al., 2012).

Este método fue utilizado para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de los extractos y para determinar el porcentaje de efecto de inhibición.

Se utilizaron tubos estériles de 13x100 mm que puedan ser cerrados con tapa rosca, con un volumen mínimo de 1mL de caldo de cultivo Mueller Hinton. Luego se colocó 1 mL de la dilución del extracto a subsecuentes diluciones a razón de 1:2 se usó una nueva pipeta para cada uno, y sobre todos los tubos 1 mL de la suspensión bacteriana, teniendo como volumen final 2 mL en cada tubo. El tubo número 13 sólo tuvo caldo de cultivo (control negativo) y el número 14 tuvo agar de cultivo y suspensión bacteriana (control positivo). Finalmente, los tubos pasaron a incubación a una temperatura de 35 – 37°C por al menos 20 horas. Posterior al tiempo señalado, se procedió a sembrar, tomando de cada tubo una muestra del caldo resultante mediante el anza de siembra para luego ser colocado en placas Petri con agar Muller Hinton. Se dejaron las placas cultivadas en la incubadora a una temperatura de 35 – 37 °C durante 24 horas, para luego las colonias bacterianas que han crecido ser contadas por el contador de colonias y determinar el efecto bactericida y

bacteriostático de acuerdo al número de crecimiento de colonias bacterianas. La secuencia se puede observar en el siguiente diagrama:



Para determinar el porcentaje de efecto de inhibición se dividió el promedio de número de colonias bacterianas que han crecido en las placas Petri junto con las diferentes concentraciones del extracto de *Croton lechleri Mull Arg* sobre las colonias crecidas en el control positivo y se multiplicó por 100.

5.6.5 Técnicas para el procesamiento de la información

Luego de aplicar el instrumento, los datos fueron procesados de manera automatizada, en una laptop Lenovo, utilizando los siguientes Software: Procesador de texto Microsoft Word 2016, Microsoft Excel 2016, Programa Estadístico Info Stat ®

Pruebas estadísticas utilizadas: Análisis de varianza y T de Fisher para evaluar la diferencia del efecto medio por dilución y para el porcentaje de efecto de inhibición.

El análisis de la información se realizó mediante el uso de gráficos de barra, circulares, diagrama de cajas y bigotes para comparar la efectividad del extracto puro a distintas diluciones, además de cuadros estadísticos.

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

La investigación se desarrolló en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. El proyecto de investigación *in vitro* a través de macrodiluciones, se solicitó la autorización del Jefe de Laboratorio Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeñas para la elaboración del trabajo práctico de los cultivos de la bacteria y la preparación del extracto puro del *Croton lechleri Mull Arg*.

Fue una investigación médica cuyo fin es puramente científico y carece de uso diagnóstico o terapéutico directo.

Se respetaron las normas del laboratorio como la bioseguridad de la institución para evitar riesgos biológicos de contaminación que puedan afectar al medio ambiente y al investigador.

6 RESULTADOS

Se trabajó con 6 repeticiones, con 12 concentraciones diferentes del extracto de *Croton lechleri* Müll. Arg. (100%, 91%, 77%, 66%, 58%, 52%, 47%, 43%, 40%, 37%, 35%, 32%), el control positivo (Bacteria) y control negativo (caldo de cultivo Muller Hinton).

Para los resultados se calcularon las medias del número de colonias de las repeticiones que crecieron después de los tratamientos aplicados a diferentes concentraciones de *Croton lechleri* Mull Arg. En concentraciones del 91% al 100%, el número de colonias fue cero, en concentraciones entre 66% y 77% las medias del número de colonia fueron 76.13 ± 8.98 . y 6.83 ± 5.91 respectivamente, las concentraciones inferiores a 47% no muestran inhibición en el crecimiento de colonias bacterianas, la media es, igual o más de 2000 ± 0 . número colonias por tratamiento. (Anexo 1)

El efecto bactericida se puede observar en concentraciones a partir del 91% al 100%, en donde el crecimiento de las colonias es nulo ($p < 0.05$) a diferencia de los tratamientos con concentraciones menores del 43%, en donde se observa que no hubo disminución en el crecimiento de las colonias. (Anexo 1 y 2)

El efecto bacteriostático se observa en concentraciones entre el 47% y 77%, si bien el número de colonias de bacterias se han reducido ($p < 0.05$), no logra inhibir completamente su multiplicación, sin embargo, cuando se aumenta la concentración al 77%, el número de colonias bacterianas se ve reducido considerablemente. (Anexo 2 y 3).

7 DISCUSIÓN

La bacteria *Staphylococcus aureus* es causa común de infecciones a nivel mundial, la cual actualmente ha generado resistencia a diversos antimicrobianos mediante diferentes mecanismos. Esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir a ambientes hostiles, puede interactuar con muchos receptores del huésped, es así como puede colonizar en diversos tejidos como piel y mucosa tanto de humanos como de animales. Existen diferentes tipos de cepas las cuales han sido determinadas por PCR, la mayoría presenta la característica de ser multidrogo resistente y por ende las instituciones de la salud tienen el deber de hacer vigilancias epidemiológicas y medidas de control para prever infecciones y descubrir nuevos tratamientos para combatir a éstas (Chans, 2015; Hernández, Toraño, González, & González, 2003; Ortega & Simón, 2010).

Se ha demostrado que el extracto puro de la planta *Croton lechleri Mull Arg* poseen metabolitos secundarios que tienen propiedades como antibacteriano, funcionando como bactericida entre ellos: 2, 4, 6 – trimetoxifenol, 1, 3, 5 – trimetoxibenceno, coberinas A y B, ácido clorenquínico, proantocianidinas (1 y 4), de las cuales están comprometidas uno o más monómeros, la leucoantocidina es un monómero flavonoide y también incluye catequinas, epicatequinas, galocatequinas, galoepicatequinas, flavonoles, flavanes -3 -4 dioles, leucoantocianidinas, antocianidinas, triterpenoides, taninos, alfa pineno, biciclogermacreno, cariofileno, ácido gálico (da Silva Brito, Silva, Malheiro, Baptista, & Pereira, 2018; Gupta et al., 2007; Hauser, 2016; Simionatto et al., 2007).

Los fenoles son metabolitos secundarios de las plantas, las cuales cumplen muchas funciones positivas en la salud de los seres vivos, es así como tiene acción antibacteriana, el presunto mecanismo de acción es que al atravesar la membrana fosfolipídica de la bacteria, desestabiliza la membrana citoplasmática con lo cual inhibe el crecimiento bacteriano; otros posible mecanismos son: la quelación de sustratos minerales tales como el hierro y el zinc causando un aumento en la permeabilidad de la membrana; la inhibición la producción de toxinas extracelulares de las bacterias, que tiene acción directa en el metabolismo de las bacterias, inhibe la bomba de eflujo y la inactivación de proteínas unidas a membranas. (Daglia, 2012; Farhadi, Khameneh, Iranshahi, & Iranshahi, 2019).

Para esta investigación se eligió el procedimiento de dilución en agar (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2013), que se realiza para determinar la susceptibilidad de un antimicrobiano. En el procedimiento realizado se obtuvo como resultado que en las placas con concentración del 73% de *Croton lechleri Mull Arg*, el crecimiento bacteriano es de 3% y en concentraciones a partir de 90% hay ausencia del crecimiento bacteriano.

Con la técnica descrita la inhibición del crecimiento bacteriano concuerdan con los expuesto con (Corrales et al., 2013), quien mediante una prueba de sensibilidad antimicrobiana con extracto etanólico de *Croton lechleri Mull Arg*, tuvo como resultado la inhibición del crecimiento del *Staphylococcus aureus*, a partir de concentraciones mayores a 66.66% ($p < 0.05$), evidenciando que el efecto antibacteriano del extracto de la planta se da en altas concentraciones, asemejándose a los resultados obtenidos en esta investigación, en donde la inhibición del crecimiento de las colonias se da a partir de concentraciones mayores del 77% ($p < 0.05$). es conocido que a mayores concentraciones la disponibilidad de los metabolitos activos es mayor, lo cual producirá el efecto inhibitorio.

Los resultados obtenidos por el método de excavación de placa para el control de calidad microbiológico (Huapaya et al., 2003), donde la difusión del látex de *Croton lechleri Mull Arg* en las placas petri, forma halos de inhibición y el efecto antibacteriano es medido por el diámetro de los mismos, frente al *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, las concentraciones a partir de 25% resultan ser significativas, pudiendo llegar a mostrar un efecto antibacteriano, dicho hallazgo difiere con la investigación realizada, debido a que se utilizó una cepa diferente (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300) la cual tiene características multidrogo resistente y se necesita una concentración mayor de 77% para que el extracto tenga un efecto antibacteriano, y mayor de 91% para que tenga efecto bactericida, la diferencia se debe a que la cepa de la bacteria ATCC 25923, es resistente solo a la metilicina y por ende necesita menos concentraciones del extracto para poder evidenciar efectos antibacterianos significativos; así mismo otra diferencia puede deberse a que cada muestra obtenida de la planta expresa diferentes metabolitos activos según su lugar de recolección y la época del año.

Los resultados obtenidos por el método de inhibición de crecimiento mediante la difusión en disco (Chininin & Cisneros, 2018), por medio de la medición de diámetro de los halos formados por sensidiscos que fueron embebidos en diferentes concentraciones de extracto etanólico de *Croton lechleri Mull Arg* y colocados en placas petri, siendo a su vez inoculados con *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Los resultados obtenidos muestran que se el posible punto de quiebre es a concentraciones a partir del 50% del extracto para evidenciar un efecto antibacteriano significativo, dicho hallazgo se asemeja a lo expuesto en la investigación realizada, donde en concentraciones menores al 43% el número de colonias es similar al control positivo, mientras que en concentraciones a partir del 52% se evidencian una disminución dosis dependiente en el número de colonias bacterianas; dicha semejanza puede deberse a que la cepa bacteriana ATCC 25923 y la cepa ATCC 43300 poseen un gen de resistencia a la meticilina, dificultando su eliminación.

Los resultados obtenidos por (Espinoza & Serna, 2018), para evidenciar el efecto antibacteriano de *Croton lechleri Mull Arg* a través del método de la medición de halos de inhibición a diferentes concentraciones frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), muestran efecto antibacteriano significativo a concentraciones del 75% y 100%, asemejándose a los resultados obtenidos en la investigación realizada, donde se observa que hay efecto antibacteriano significativo a partir de concentraciones mayores a 77%, demostrando que la inhibición del crecimiento es dosis dependiente. Esto se debe a que la cepa de la bacteria ATCC 6538 es resistente a la meticilina y es formadora de biofilm, por lo cual necesita mayores concentraciones del extracto para poderse evidenciar los efectos antibacterianos, al igual que la cepa de la bacteria utilizada en la investigación ATCC 43300 que es resistente a la meticilina y oxacilina, requiriendo al igual que la cepa ya mencionada altas concentraciones del extracto para que se pueda evidenciar el efecto antibacteriano.

El porcentaje inhibitorio se emplea para determinar la efectividad del extracto de las plantas contras las diferentes bacterias. En los resultados obtenidos por (Huapaya et al., 2003) los extractos de *Croton lechleri Mull Arg* fueron recolectados de diferentes departamentos de la amazonía peruana y diferentes mercados de Lima, fueron diluidos con etanol a concentraciones del 50% y 100%, y se realizaron dos repeticiones para cada dilución, y la bacteria de *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923, obteniéndose como

resultado el porcentaje de inhibición del 23.7% y del 81.2% para la concentración del 50%, y del 24.9% y 85.3% para la concentración del 100%, estos hallazgos difieren con la investigación realizada en donde se evidencia que el porcentaje de inhibición fue del 100% y 51% a concentraciones de 100% y 52% respectivamente, esta diferencia se puede deber a que cada muestra obtenida de la planta posee diferentes metabolitos activos según su lugar de recolección, otra diferencia puede deberse a la extracción empleada con etanol influye en la expresión de los diferentes metabolitos activos, y finalmente la cepa bacteriana ATCC 25923 es resistente a la meticilina, mientras la cepa ATCC 43300 que fue empleada en esta investigación es resistente a la meticilina y oxacilina.

8 CONCLUSIONES

- El extracto puro de *Croton lechleri* Mull Arg presentó efecto inhibitorio/antibacteriano sobre el *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.
- El extracto puro de *Croton lechleri* Mull Arg presentó un porcentaje de efecto de inhibición del 100% a concentraciones del 91% hasta el 100%.
- El extracto puro de *Croton lechleri* Mull Arg presentó efecto bacteriostático sobre el *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 entre las concentraciones de 47% y 77%.
- El extracto puro de *Croton lechleri* Mull Arg presentó efecto bactericida sobre el *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 a concentraciones mayores de 77%.

9 RECOMENDACIONES

- Investigar el efecto antibacteriano del extracto del *Croton lechleri Mull Arg* frente a otras cepas multidrogo resistentes
- Evaluar el sinergismo del extracto del *Croton lechleri Mull Arg* con otros antimicrobianos frente a cepas bacterianas multidrogo resistentes.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Abdallah, E. M. (2011). Plants: An alternative source for antimicrobials. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 16–20. <https://doi.org/10.1520/D7262-10>
- 2 Alviano, D., & Alviano, C. (2009). Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 106–121. <https://doi.org/10.2174/138920109787048607>
- 3 Arias, F. (2014). *Caracterización fenotípica y genotípica de Staphylococcus aureus resistente a meticilina aislado a partir de secreción nasal de bovinos y cerdos*. Universidad Austral de Chile. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0775>
- 4 Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2014). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26* (2 edición). AMGH Editora.
- 5 Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., ... Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>
- 6 Casellas, J. M. (2011). *Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología*. *Revista Panamericana de Salud Publica* (Vol. 30). <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200004>
- 7 Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del Staphylococcus aureus. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40. Retrieved from www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx
- 8 Chans, G. R. (2015). Staphylococcus. *Temas de Bacteriología y Virología Para CEFA*, 1–12. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 17.pdf>
- 9 Chininin, J., & Cisneros, C. (2018). Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del látex de Croton lechleri “sangre de grado” frente a Staphylococcus aureus atcc 25923. *Conocimiento Para El Desarrollo*, 9(1), 129–136.
- 10 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 33). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11055835>

- 11 Corrales, L., Castillo, A., & Melo, A. (2013). Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *Ciencias Biomédicas*, *11*(19), 51–63.
- 12 da Silva Brito, S. S., Silva, F., Malheiro, R., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2018). *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, *113*(December 2017), 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.044>
- 13 Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, *23*(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- 14 Doti, F. (2009). *Uso práctico de los antibióticos en la clínica de pequeños animales*. (F. Doti, Ed.) (1ra ed.). Buenos Aires - Republica Argentina: Inter-medica.
- 15 Espinoza, C., & Serna, Z. (2018). EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL LÁTEX DE *Croton lechleri* Müll. Arg. (SANGRE DE GRADO) FRENTE A *Staphylococcus aureus*. Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
- 16 Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., & Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, *33*(1), 13–40. <https://doi.org/10.1002/ptr.6208>
- 17 Fariña, N., Carpinelli, L., Samudio, M., Guillén, R., Laspina, F., Sanabria, R., ... de Kaspar, H. M. (2013). *Staphylococcus coagulasa*-negativa clínicamente significativos: Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista Chilena de Infectología*, *30*(5), 480–488. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000500003>
- 18 Ferreira, E. (2010). Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A . (velame), *Ocimum gratissimum* L . (alfavaca) e *Cordia verbanacea* Avaliação da atividade antibacteriana. *Universidade Regional Do Cariri - URCA*.
- 19 Gentilini, E. (2007). Estafilococos. In N. Stanchi, P. Martino, E. Gentilini, E. Reinoso, M. Echevarría, N. Leardini, & J. Copes (Eds.), *Microbiología Veterinaria* (1ra ed., pp. 190–194). Buenos Aires - Republica Argentina: Inter-medica.
- 20 Giguère, S. (2013). Antimicrobial Drug Action and Interaction. In S. Giguère, J. Prescott, & P. Dowling (Eds.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (5th ed., pp. 1–2). John Wiley & Sons.
- 21 Granados, R., & Villaverde, M. C. (2003). *microbiologa. Tomo I. Editorial Paraninfo. Madrid, España* (Vol. 330).
- 22 Gupta, D., Bleakley, B., & Gupta, R. K. (2007). Dragon’s blood: Botany, chemistry

- and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3), 361–380.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.018>
- 23 Guzmán, M., & Lozada, R. (2007). Detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes aislados de pacientes con infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(1), 349–363. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-255http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199416677009
- 24 Hauser, M. (2016). Use of croton- or calophyllum-derived proanthocyanidin polymers or botanical extracts in combination with rifaximin for the treatment of diarrhea in non-human animals. *PCT Int. Appl.* Jaguar Animal Health, Inc., USA .
- 25 Hernández, T., Toraño, G., González, M., & González, I. (2003). *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina : detección de portadores entre niños hospitalizados y niños sanos de la comunidad. *Rev Cubana Med Trop*, 55(3), 153–161.
- 26 Huapaya, J., Flórez, M., & Larrea, H. (2003). Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana en vitro de croton lechleri Sangre de grado. *Horizonte Médico*, 3, 1–2. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=677686&indexSearch=ID>
- 27 Jones, K. (2003). Review of *Sangre de Drago* (*Croton lechleri*) - A South American Tree Sap in the Treatment of Diarrhea, Inflammation, Insect Bites, Viral Infections, and Wounds: Traditional Uses to Clinical Research. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9(6), 877–896.
<https://doi.org/10.1089/107555303771952235>
- 28 Krupa, P., Bystron, J., Bania, J., Podkowik, M., Empel, J., & Mroczkowska, A. (2014). Genotypes and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* from chicken and chicken meat in Poland. *Poultry Science*, 93(12), 3179–3186.
<https://doi.org/10.3382/ps.2014-04321>
- 29 Lavor, A., Matias, E., Alves, E., Santos, B., Figueredo, F., Lima, L., ... Coutinho, H. (2014). Association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae). *European Journal of Integrative Medicine*, 6(3), 301–306.
<https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.03.002>
- 30 Lee, J. H. (2003). Methicillin (Oxacillin) - Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans.

- Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6489–6494.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6489>
- 31 Lopez-Romero, J. C., González-Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2015). Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2015/795435>
- 32 Mabhiza, D., Chitemerere, T., & Mukanganyama, S. (2016). Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medicinal Chemistry*.
- 33 Mahady, G. (2005). Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. *Current Pharmaceutical Design*, 11(19), 2405–2427.
<https://doi.org/10.2174/1381612054367481>
- 34 Mahesh, B., & Satish, S. (2018). Antimicrobial Activity of Some Important Medicinal Plant oils against Human Pathogens. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, (4), 839–843. <https://doi.org/10.1080/22311866.2012.10719105>
- 35 Marasini, B. P., Baral, P., Aryal, P., Ghimire, K. R., Neupane, S., Dahal, N., ... Shrestha, K. (2015). Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/265425>
- 36 Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2014). *Microbiología médica* (7 edición). Elsevier Health Sciences.
- 37 Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 247–256.
<https://doi.org/10.1002/mame.201700219>
- 38 Ortega, C., & Simón, M. del C. (2010). *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) y a otros β -lactámicos en animales de compañía (perro y gato); aproximación a la situación actual y al riesgo para la salud pública. *Revista Veterinaria Argentina*, 27, 1–23.
- 39 Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., & Bogni, C. I. (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12(7), 1–14.
- 40 Pottumarthy, S., Schapiro, J. M., Prentice, J. L., Houze, Y. B., Swanzy, S. R., Fang,

- F. C., & Cookson, B. T. (2004). Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(12), 5881–5884.
- 41 Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C., & Leonard, F. C. (2008). *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. (1 edición). Acribia.
- 42 Radulovi, N. ., Blagojevi, P. ., Stojanovi-Radi, Z. ., & Stojanovi, N. . (2013). Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Current Medicinal Chemistry*, *20*, 932–952. <https://doi.org/10.2174/0929867311320070008>
- 43 Ramirez, G. (2003). Sangre de drago (*Croton lechleri*). *Natura Medicatrix*, *21*(4), 214–217.
- 44 Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, *22*(8), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- 45 Ríos, A. M., Barquero, M. R., Ortiz, G., Ayllón, T., Smit, L., Rodríguez-Dominguez, M., & Sánchez-Días, A. (2015). *Staphylococcus* multirresistentes a los antibióticos y su importancia en medicina veterinaria. *Clinica Veterinaria de Pequeños Animales AVEPA*, *35*(3), 149–161.
- 46 Rojas, I. (2014). *Prevalencia y caracterización fenotípica y molecular de Staphylococcus aureus resistente a la meticilina en superficies de contacto humano y animal en el Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nac.* Universidad Nacional de Costa Rica.
- 47 Rojas, J., Ochoa, V., Ocampo, S., & Muñoz, J. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *6*(2), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-2>
- 48 Rosas-Piñón, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M. I., Sánchez-Nieto, S., & Rivero-Cruz, J. F. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*, *141*(3), 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.020>
- 49 Sanabria, G. (2014). Evolución de la resistencia en el *Staphylococcus aureus*. Evolution of resistance in *Staphylococcus aureus*. *Revista Del Instituto de Medicina*

- Tropical*, 3(2), 27–39.
- 50 Sanfilippo, C. M., Hesje, C. K., Haas, W., & Morris, T. W. (2012). Topoisomerase mutations that are associated with high-level resistance to earlier fluoroquinolones in staphylococcus aureus have less effect on the antibacterial activity of besifloxacin. *Chemotherapy*, 57(5), 363–371. <https://doi.org/10.1159/000330858>
- 51 Seija, V. (2006). Seccion III etiopatogenia microbiologica. Genero estaphylococcus. In *Temas de bacteriologia y virologia medica* (2da ed., pp. 257–261). Uruguay: Oficina del Libro FEFMUR.
- 52 Simionatto, E., Bonani, V., Farias, A., Ré Poppi, N., Raposo, J., Stuker, C. Z., ... Hess, S. (2007). Essential oil of Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. *J. Braz. Chem. Soc*, 18(5), 879–885.
- 53 Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., & Lakshmana Perumalsamy, P. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(3), 217–220. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00345-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00345-7)
- 54 USDA. (2018). National Plant Germplasm System. Retrieved November 28, 2018, from <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=411368>
- 55 Weinstein, M., Zimmer, B., Cockerill, F., Wiker, M., Alder, J., Dudley, M., ... Turnidge, J. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standar- Ninth Edition* (Vol. 32). <https://doi.org/10.4103/0976-237X.91790>

11 ANEXOS

Anexo 1

Medidas de Resumen del efecto antibacteriano del extracto a diferentes concentraciones del *Croton lechleri* frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Medidas de resumen

Variable	N	Medias de número de colonias	D.E	E.E	CV	Min	Max
100%	1	0.00	0.00	0.00	sd	0.00	0.00
91%	1	0.00	0.00	0.00	sd	0.00	0.00
77%	1	6.83	5.91	2.41	86.54	0.00	15.00
66%	1	76.17	8.98	3.66	11.78	65.00	88.00
58%	1	479.33	121.68	49.68	25.39	310.00	616.00
52%	1	976.33	92.74	37.86	9.50	850.00	1120.00
47%	1	1813.33	71.46	29.17	3.94	1700.00	1910.00
43%	1	2000.00	0.00	0.00	0.00	2000.00	2000.00
40%	1	2000.00	0.00	0.00	0.00	2000.00	2000.00
37%	1	2000.00	0.00	0.00	0.00	2000.00	2000.00
35%	1	2000.00	0.00	0.00	0.00	2000.00	2000.00
32%	1	2000.00	0.00	0.00	0.00	2000.00	2000.00

Anexo 2

Efecto Antibacteriano del extracto puro de *Croton lechleri* frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Determinación de diferencias de las medias entre las concentraciones experimentales mediante el Test de ANOVA

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	74425316.7	14	5316094.05	2785.25	<0.0001
Tratamiento	74425316.7	14	5316094.05	2785.25	<0.0001
Error	143149.67	75	1908.66		
Total	74568466.4	89			

Hay una diferencia estadística entre los tratamiento administrados ($p < 0.05$)

Anexo 3

Efecto Antibacteriano del extracto puro de *Croton lechleri* frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Determinación de diferencias entre las concentraciones experimentales mediante el Test de Fisher.

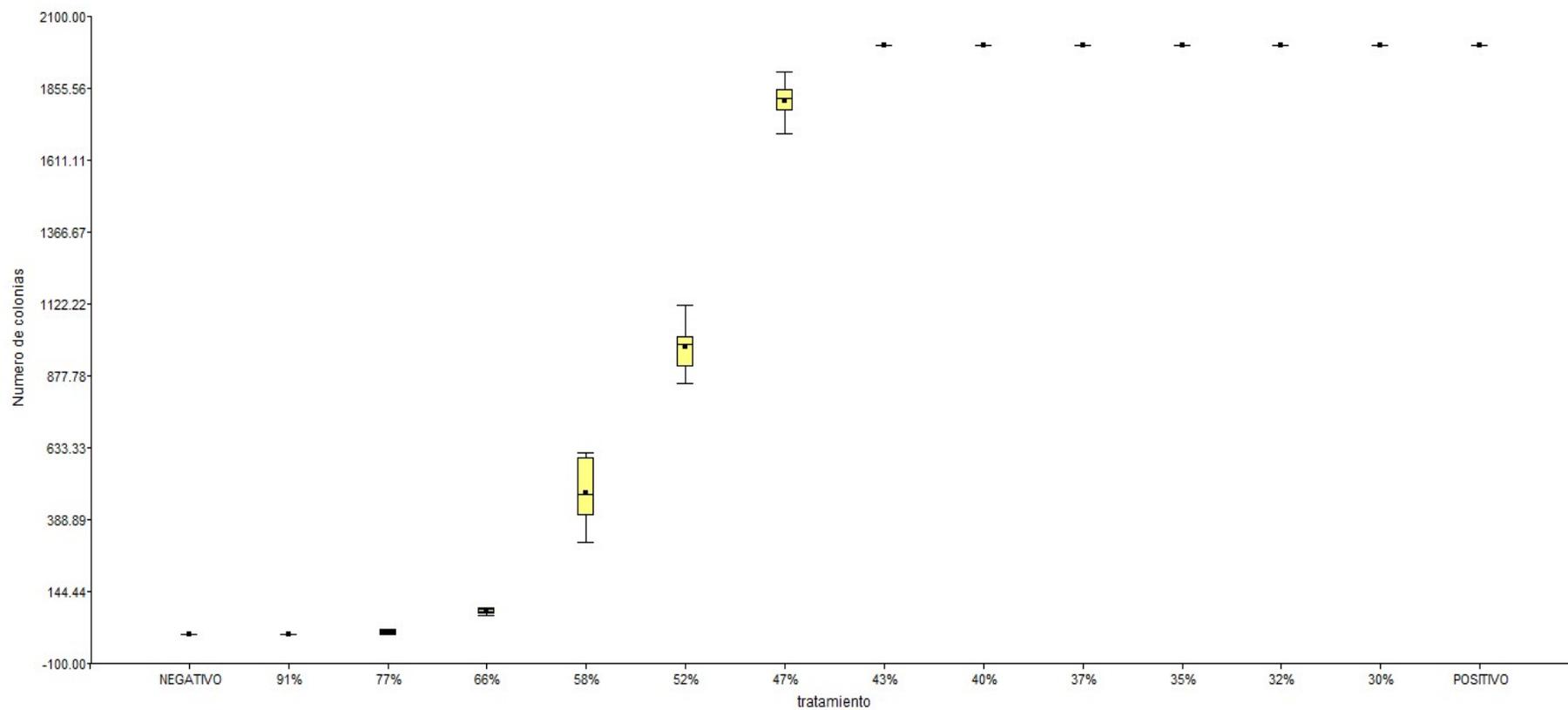
TEST: LSD Fisher Alfa = 0.05. DMS=50.24761

Error:		1908.6622	gl:	75		
Tratamiento	Medias	n	E.E			
CP	2000	6	17.84	A		
32%	2000	6	17.84	A		
35%	2000	6	17.84	A		
37%	2000	6	17.84	A		
40%	2000	6	17.84	A		
43%	2000	6	17.84	A		
Test de Fisher	47%	1813.33	6	17.84	B	
	52%	976.33	6	17.84		C
	58%	479.33	6	17.84		D
	66%	76.17	6	17.84		E
	77%	6.83	6	17.84		F
	91%	0	6	17.84		F
	100%	0	6	17.84		F
	CN	0	6	17.84		F

CN: Control Negativo; CP: Control Positivo; E.E: Error estandar. Medias con letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Anexo 4

Efecto Antibacteriano del extracto puro de *Croton lechleri* frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Esquema de caja y bigotes evidenciando el crecimiento bacteriano



Anexo 5

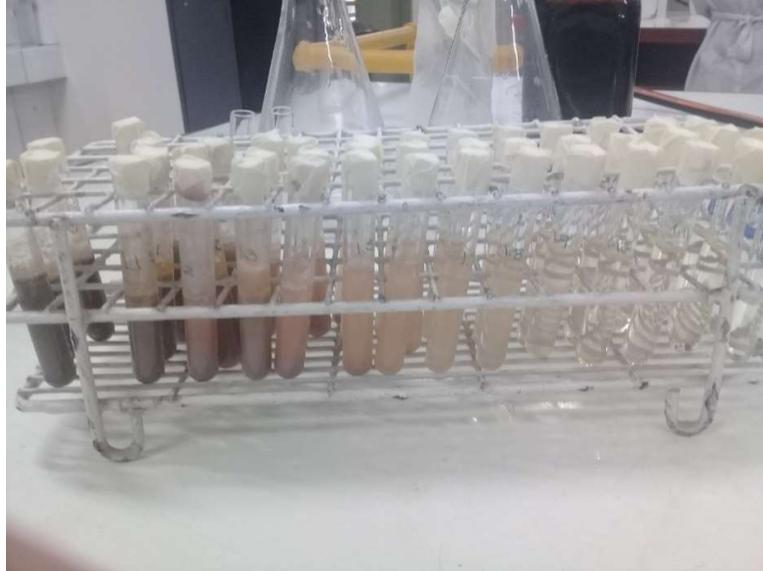
Porcentaje de inhibición del extracto puro de *Croton lechleri* comparado frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

N° de ensayo	Concentraciones de <i>Croton lechleri</i> Mull Arg.													Control Positivo	Control Negativo
	100%	91%	77%	66%	58%	52%	47%	43%	40%	37%	34%	32%	30%		
1	0	0	15	88	616	1010	1700	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	0
2	0	0	0	69	529	908	1850	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	0
3	0	0	0	79	401	1120	1840	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	0
4	0	0	10	65	310	850	1780	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	0
5	0	0	9	84	420	970	1800	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	0
6	0	0	7	72	600	1000	1910	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	0
Promedio N° de colonias	0	0	7	76	479	976	1813	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	0
% de crecimiento de las colonias	0%	0%	0.3%	4%	24%	49%	91%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
% de inhibición	100%	100%	99.7%	96%	76%	51%	9%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%

Se puede observar que a concentraciones mayores al 50% el extracto puro de *Croton lechleri* presenta un porcentaje de inhibición considerable, sin embargo sólo las concentraciones superiores al 77% evidencian un porcentaje de inhibición muy significativo.

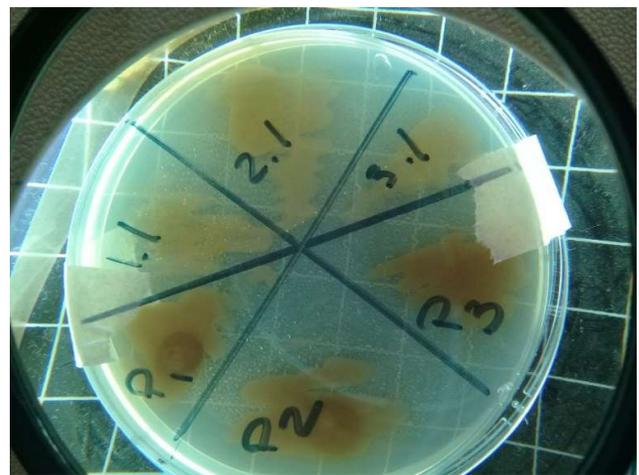
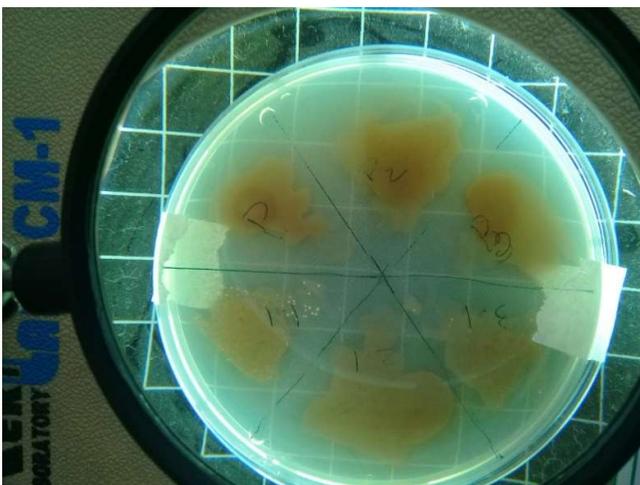
Anexo 6

Tubos de ensayo con diferentes concentraciones de *Croton lechleri* Mull Arg



Anexo 7

Efecto antibacteriano de las concentraciones al 100% y 91 %; no hay evidencia de crecimiento bacteriano



Anexo 8

Efecto antibacteriano de las concentraciones al 58% y 52 %; hay evidencia de crecimiento bacteriano

