
Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado” frente a *Staphylococcus aureus* atcc 25923

Evaluation of the *in vitro* antibacterial effect of *Croton lechleri* Latex "Grade Blood" versus *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Avaliação do efeito antibacteriano *in vitro* do látex *Croton lechleri* "Grau Sangue" versus *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Jherlits Juniors Chininin Vílchez¹ , Cisneros Hilario César Braulio²

Resumen

La presente investigación, tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacteriano *In vitro* del látex de *Croton lechleri* “Sangre de Grado” frente a *Staphylococcus aureus*. El tipo de estudio es analítico, experimental, pre-clínico, *In vitro*. La población estuvo constituida por las bacterias *Staphylococcus aureus* y la muestra por la subsp. *aureus* *Rosenbach* (ATCC 25923). La presente investigación se desarrolló en los laboratorios de microbiología, de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, y para la evaluación de la actividad antibacteriana se siguió el modelo de Contreras, 2002, para lo cual se preparó 06 placas conteniendo el cultivo bacteriano, en las cuales se sembró discos embebidos con los tratamientos: 15 μ L etanol de 96°, eritromicina 15 μ y 15 μ látex al 50, 70 y 100%, se incubaron y a las 48 horas se midieron los halos de inhibición, los datos encontrados fueron sometidos al análisis estadístico utilizando el programa SPSS versión 24, comparándose los diámetros promedio de los halos de inhibición de los 5 tratamientos y 3 repeticiones, mediante el análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado, encontrándose un valor de $F=61,671$ y significación igual a $0,000 < 0,01$, que indica que existe diferencia altamente significativa entre los promedio de los halos de inhibición, siendo el tratamiento con látex de *Croton lechleri* al 100% el que reporta el mayor promedio de inhibición como se puede ver posee efecto antibacteriano *In vitro* del 54.75 %, frente a *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, látex, *Croton lechleri*, *Staphylococcus aureus*, sangre de grado.

Abstract

The objective of the present investigation was to evaluate the *in vitro* antibacterial effect of *Croton lechleri* Latex "Grade Blood" against *Staphylococcus aureus*. The type of study is analytical, experimental, preclinical, *in vitro*. *Staphylococcus aureus* bacteria and the sample constituted the population by subsp. *aureus* *Rosenbach* (ATCC 25923). The present investigation was developed in the microbiology laboratories of the Faculty of Human Medicine of the San Pedro University, and for the evaluation of the antibacterial activity, the model of Contreras, 2002 was followed, for which 06 plaques containing the culture were prepared. bacterial, in which disks embedded with the treatments were seeded: 15 μ L ethanol of 96 °, erythromycin 15 μ g and 15 μ L latex at 50, 70 and 100%, were incubated and at 48 hours the inhibition halos were measured, the data found were subjected to the statistical analysis using the SPSS program version 24, comparing the average diameters of the halos of inhibition of the 5 treatments and 3 repetitions, by means of the analysis of variance of a completely randomized design, finding a value of $F = 61,671$ and equal significance to $0.000 < 0.01$, which indicates that there is a highly significant difference between the average of the inhibition zones, being the With 100% *Croton lechleri* latex, the one that reports the highest average inhibition, as can be seen, has an antibacterial effect *in vitro* of 54.75%, against *Staphylococcus aureus*.

Key words: Antibacterial activity, latex, *Croton lechleri*, *Staphylococcus aureus*, grade blood.

¹ Facultad de Medicina Humana. Universidad San Pedro. Chimbote – Perú. jchininivilchez@gmail.com

² Instituto Peruano de Investigación en Ciencias de la Salud - IPICS, Chimbote – Perú.

Recibido el 30 de mayo del 2018
Aceptado el 16 de julio del 2018

Resumo

Esta pesquisa foi avaliar os efeitos antibacterianos de *Croton lechleri* latex "Sangre de Dragão" contra *Staphylococcus aureus*. O tipo de estudo é analítico, experimental, pré-clínico, in vitro. A população foi constituída pela bactéria *Staphylococcus aureus* e a amostra por subespécie. *aureus* Rosenbach (ATCC 25923). Esta investigação foi desenvolvida nos laboratórios de microbiologia, Faculdade de Medicina Humana da Universidade de San Pedro, e a avaliação do modelo de actividade antibacteriana Contreras, 2002 foi seguido para as quais foram preparadas 06 placas de cultura contendo bacteriana, em que os discos embebidos semeada com tratamentos: 15 uL de etanol a 96 °, 15 ug de eritromicina e 15 uL de látex 50, 70 e 100%, e incubadas 48 horas, as zonas de inibição foram medidos, os dados encontrados foram submetidos a análise estatística utilizando o programa SPSS versão 24, comparando os diâmetros médios dos halos de inibição de 5 tratamentos e três repetições, utilizando a análise de variância de um desenho completamente aleatório, encontrar um valor de $F = 61,671$ e igual significado para $0,000 < 0,01$, o que indica que existe uma diferença altamente significativa entre a média das zonas de inibição, sendo a amento látex de *Croton lechleri* 100%, o que apresentou o maior inibição média como pode ser visto tem in vitro efeito antibacteriano de 54,75%, contra *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, látex, *Croton lechleri*, *Staphylococcus aureus*, sangue grau.

Introducción

El presente trabajo de investigación, se realizará con la finalidad de demostrar un producto natural antibacteriano como alternativa en infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas producidas por microorganismo como *Staphylococcus aureus* ya que no existen muchas investigaciones realizadas en el Perú y el Extranjero reportados. (Zapata, 1987)

El *Staphylococcus aureus* está considerado uno de los microorganismos más importantes en la práctica médica diaria. Es capaz de provocar una amplia gama de enfermedades, ya sea por acción directa o mediante la acción de sus toxinas. *Staphylococcus aureus* tiene gran capacidad para colonizar la piel y las mucosas de los seres humanos y de diferentes animales. Varios estudios evidencian el papel de dicha colonización en la patogénesis y la epidemiología de las infecciones causadas por *S. aureus*. Se ha demostrado que los portadores nasales constituyen una fuente importante de propagación de la bacteria (Rodríguez, 2015).

El tratamiento de estas infecciones se ha convertido en algo extraordinariamente complejo en la época actual como consecuencia de la aparición en la comunidad de cepas de *S. aureus*, resistentes a la meticilina, que provocan infecciones en pacientes sin factores de riesgo, fundamentalmente niños y adolescentes (Álvarez, 2012)

La necesidad diaria y creciente de uso de productos naturales en el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades y además de elaborar productos extemporáneos que puedan satisfacer las necesidades de salud de la población, por ende se busca impulsar el uso de tratamientos naturales como el látex de *Croton lechleri* "Sangre de Grado" y así usar nuevas alternativas terapéuticas efectivas y sin efectos colaterales en la salud, ya que en nuestro país no existe un plan estratégico que orienta la investigación y utilización en forma sistemática de los recursos vegetales que tengan como meta su incorporación definitiva al Programa de Salud. (Zapata, 1987).

El Perú, considerado el tercer país más mega diverso del planeta, ha efectuado importantes aportes de especies y variedades para el mundo gracias a los diversos pisos ecológicos y microclimas que presenta, contando con 84 zonas de vida de las 103 conocidas donde habría 50 mil especies vegetales (20% de las existentes en la Tierra) de las que 2,000 han sido utilizadas con fines curativos. Actualmente, esta riqueza de promisorios agentes terapéuticos vegetales aunada al conocimiento ancestral de su uso etnofarmacológico, constituye un valioso recurso por explotar adecuadamente mediante el desarrollo sostenible en beneficio de la humanidad y, especialmente, de las comunidades nativas que han preservado estos recursos hasta nuestros días (Li, 2010).

La OMS considera esencial separar el mito de la realidad, que están estrechamente relacionados en medicina tradicional, ser capaces de distinguir las prácticas y los remedios válidos de los ineficaces o peligrosos, promoviendo esta actividad mediante métodos adecuados que garanticen los principios de seguridad, eficacia y calidad. Si bien es cierto que la extracción, el aislamiento e identificación de los constituyentes químicos de origen vegetal, se ha efectuado en años relativamente recientes, el propósito para el cual estas sustancias medicinales se emplean hoy es el mismo que le dieron nuestros antecesores en su momento histórico; salvo que ya se está en condiciones de aprovechar el acelerado desarrollo de la fitoquímica para sustentar científicamente las investigaciones en plantas, para velar por la seguridad de los preparados medicinales se establecen regulaciones internacionales, que exigen amplias investigaciones farmacotoxicológicas en animales de experimentación antes de iniciar su aplicación en seres humanos (Pérez, 2007).

Por lo tanto nos planteamos el siguiente problema: ¿El látex de *Croton lechleri* “Sangre de grado”, tendrá actividad antibacteriano *in vitro*, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?, siendo nuestra hipótesis que: El látex de *Croton lechleri* “Sangre de grado” tiene efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Planteándonos como objetivo principal: Determinar la actividad antibacteriano del latex de *Croton lechleri* “Sangre de Grado” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y como objetivos específicos Realizar el estudio fitoquímico del látex *Croton lechleri* Sangre de grado, determinar la solubilidad del látex *Croton lechleri* Sangre de grado y evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del látex *Croton lechleri* “Sangre de grado” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Material y Métodos

La presente investigación fue de tipo analítico-experimental, pre-clínico, *in vitro*. La población estuvo constituida por las bacterias *Staphylococcus aureus* y la muestra por la subsp. *aureus* *Rosenbach* (ATCC 25923).

Para la obtención del látex se siguió el método de Risco, 2005, donde el látex de la Planta de *Croton lechleri* “Sangre de Grado” fue obtenido del Distrito de Iquitos, Departamento de Loreto, ubicada entre los 106 a 220 msnm, realizándose incisiones oblicuas, en la corteza del árbol de edad 9 años con 1 mes, la incisión se realizó utilizando un machete de acero inoxidable, recogiendo el látex en un recipiente aséptico, el que se vertió en un frasco de vidrio, previa colocación con embudo, el cual fue transportado en una caja de poliuretano conteniendo paquetes fríos a una temperatura de $5\pm 8^{\circ}\text{C}$. (Meza, 1999).

El estudio fitoquímico del látex de sangre de grado siguió el método de Lock de Ugaz, 1994, el que se realizó en los ambientes de laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, al cual se le practicó, las reacciones de Cloruro Férrico, Gelatina, Dragendorff, Espuma, Liberman-Buchard, Shinoda y Ninhidrina, Para determinar cualitativamente la presencia y cantidad de metabolitos secundarios presentes en el látex, utilizando la siguiente codificación: Ausencia (-), Poca cantidad (+), Regular Cantidad (++), Abundante cantidad (+++).

Para el ensayo de solubilidad (Cuellar, 2000), se midió 1 mL de látex de *Croton lechleri* “Sangre de Grado” puro en seis tubos de ensayo, luego se agregaron en la misma proporción los solventes agua destilada, etanol 96°, metanol, cloroformo, éter, polisorbato de sodio 80, y se agitó vigorosamente los tubos durante 10 s, anotándose las características de solubilidad.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana, se utilizó pruebas de discos difusión en agar de kirby bauer siguiendo las recomendaciones del manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión del instituto nacional de salud (INS). El método se fundamenta en la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la difusión del principio activo en un medio de cultivo sólido, que se evidencia con la formación de zonas claras o halos de inhibición (Contreras, 2002).

Como medio de crecimiento bacteriano se preparó Agar Muller Hinton, que consistió en la disolución en caliente de 34 g de agar en 1 L de agua destilada, luego se autoclavó y se dejó enfriar en un baño maría a temperaturas entre los 45°-50°C, una vez esterilizado y solidificado, se midió el pH, siendo de 7,2 y 7,4. Luego se distribuyó el medio en seis placas petri, con un grosor del agar en la placa de 4 mm (Contreras, 2002).

Los discos que se utilizaron, previamente fueron embebidos con los 15 µL de los siguientes tratamientos: etanol 96°, eritromicina 15 µg, *Croton lechleri* al 50%, 70% y 100%, utilizándose como disolvente etanol. En tres placas petris se sembraron discos embebidos con etanol y eritromicina, y en otras tres placas se sembraron los discos conteniendo sangre de grado en concentraciones de 50%, 70% y 100%. Los discos con un diámetro de 6 mm y se ubicaron a una distancia mínima de 25 mm uno del otro.

Para la identificación del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se utilizó el método directo de inoculación, utilizándose una placa de cultivo con agar manitol salado, se incubó por 18 - 24 h, observándose el crecimiento de colonias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para la prueba de efectividad antibacteriana, se estandarizó la cepa aislada de *Staphylococcus aureus* según la escala de Mc Farland 0.5, con la ayuda de un asa bacteriológica se extrajo una muestra de la cepa reactivada y se inoculó en un tubo conteniendo 5 mL de suero fisiológico al 0.9 %, se agitó por 5 minutos, y se ajustó la turbidez utilizando la escala de Mc Farland al 0.5. Después de 15 minutos con la ayuda de un hisopo se realizó la inoculación de las placas, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbida. Las placas fueron incubadas en posición invertida a 37.2°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos por 48 horas, finalmente se midieron los diámetros de las zonas de inhibición utilizándose un vernier (Zendejas-Manzo, 2014).

Los datos fueron procesados utilizándose el análisis de varianza ANOVA para un diseño completamente aleatorizado con 5 tratamientos y 6 repeticiones y posterior prueba de comparación múltiple de DUNCAN para determinar el mejor tratamiento, adicionalmente se calcularon medidas de resumen como promedios, con apoyo del software estadístico SPSS V-24 versión libre.

Resultados

Tabla N° 1. Marcha fitoquímica del látex de *Croton lechleri* (Sangre de Grado)

Reacción de identificación	Metabolito secundario	Cantidad
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
Shinoda	flavonoides	+++
dragendorff	alcaloides	++
Espuma	saponinas	+++
Liberman-buchard	Triterpenos y esteroides	-
Ninhidrina	Aminoácidos	-
Gelatina	Taninos	++

Leyenda: (+++) = abundante; (++) = regular; (+) = trazas; (-) = ausencia

Tabla N° 2. Ensayo de solubilidad del látex de *Croton lechleri* (Sangre de Grado)

Muestra	Solvente	Resultado	Observación
Sangre de grado	Agua destilada	-	Insoluble
Sangre de grado	Etanol 96%	+++	Muy soluble
Sangre de grado	metanol	++	Soluble
Sangre de grado	cloroformo	-	Insoluble
Sangre de grado	éter	-	Insoluble
Sangre de grado	Tween 80	+	Poco soluble

Leyenda: (+++) = muy soluble; (++) = soluble; (+) = poco soluble; (-) = insoluble

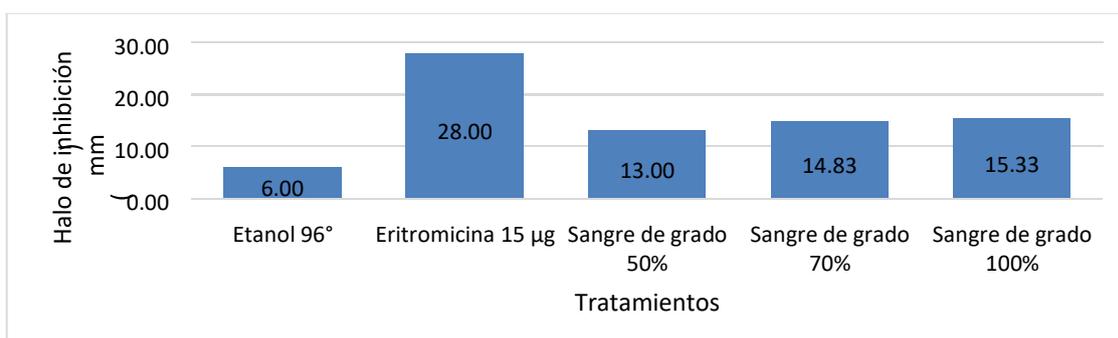


Figura N° 1. Promedio de los halos de Inhibición al evaluar el látex *Croton lechleri* sangre de grado, al evaluar la actividad antibacteriana, frente a *Staphylococcus aureus*.

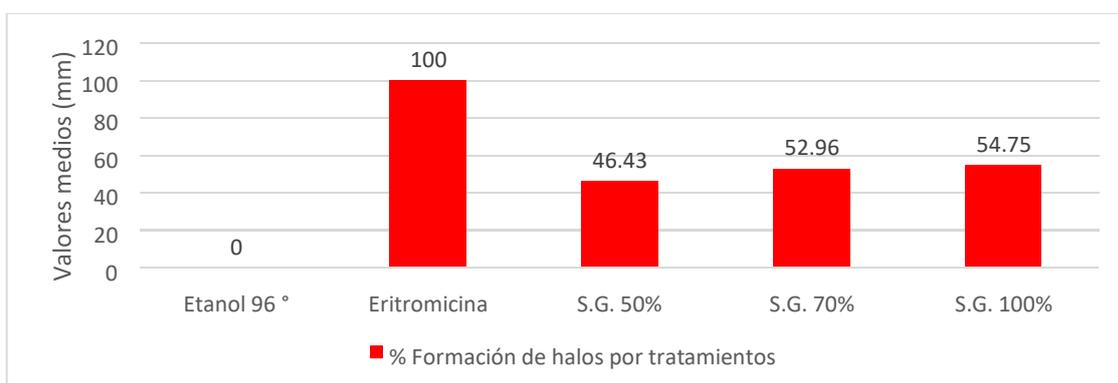


Figura N° 2. Porcentaje de formación de los halos al evaluar el efecto antibacteriano del látex *Croton lechleri*, frente a *Staphylococcus aureus*. Dónde: S.G. = Sangre de grado.



Figura N° 3. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano por tratamientos al evaluar el efecto antibacteriano del látex *Croton lechleri*, frente a *Staphylococcus aureus*.

Tabla N° 3. Análisis de varianza ANOVA de los datos obtenidos al evaluar el efecto del látex *Croton lechleri* sangre de grado, sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1503,133	4	375,783	61,671	,000
Dentro de grupos	152,333	25	6,093		
Total	1655,467	29			

Tabla N° 4. Prueba de Duncan de los datos obtenidos al evaluar el efecto del látex *Croton lechleri* sangre de grado, sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

<u>Subconjunto para alfa = 0.05</u>					
Porcentaje	N	1	2	3	4
2,00	6	6,0000			
3,00	6		10,8333		
4,00	6			14,8333	
5,00	6			15,3333	
1,00	6				27,3333
Sig.		1,000	1,000	,729	1,000

Discusión

El uso de productos naturales se ha constituido en una alternativa para el tratamiento de enfermedades ya que está alcanzando niveles mayores de aceptación, ello debido a su accesibilidad económica, baja tasa de efectos colaterales y la difusión de sus efectos benéficos, ejemplo de ello es la Sangre de grado, motivo de esta investigación.

El estudio fitoquímico realizado al látex de sangre de grado ha evidenciado abundantes flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas, y en regular cantidad los taninos y alcaloides, y en ausencia los aminoácidos, triterpenos y esteroides (tabla N° 01).

La prueba de solubilidad evidencia que existe mayor dilución con etanol al 96% y metanol, sin embargo en este último se observó una leve turbidez, menor solubilidad con cloroformo, éter, agua destilada, teniendo en cuenta la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas estos siendo apolares tienden a disolverse con mayor facilidad en metanol y etanol (tabla N° 02).

En la figura 1, muestra el promedio de los diámetros de los halos de inhibición bacteriana de 13; 14.83 y de 15.33 mm para sangre de grado a 50%, 70% y 100% de concentración, así mismo la figura 2 evidencia el porcentaje de inhibición de 46.43; 52.96; y 54.75% frente a *Staphylococcus aureus*, este efecto puede ser de bactericida y bacteriostático, debido a diversos componentes: proantocianinas (antioxidantes), taninos, un lignan de nombre dimetil cedrusina, y un alcaloide llamado taspina, entre otros. Uno o más de los cuales presentarían un efecto antibacteriano, pero que su actividad se encuentra disminuida por su dilución entre los demás componentes de la sangre de grado (Tamariz, 2003).

Así también, los resultados indican que la mayor actividad antibacteriana se observa en el tratamiento con eritromicina 15 µg, siendo el promedio de sus diámetros de inhibición de 28 mm (Figura 1, Figura 3), este efecto se le puede atribuir a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas (Tabla 1), de tal manera que ejercen un efecto bacteriostático, como la eritromicina, (Tamariz, 2003), que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas (Willett, 1994).

Los macrólidos se unen en forma reversible al sitio P, que se encuentra cerca del dominio V del componente 23S de la subunidad 50S y del centro que contiene a la enzima peptidiltransferasa. Actúan inhibiendo la translocación durante la síntesis proteica bacteriana, acción que es específica sobre células procariotas gracias a la ausencia de subunidad 50S en eucariotas (Mulazimoglu, 2005).

Se han podido determinar las proteínas que participan en la interacción macrólidoribosoma, comprobando que la proteína L22 es el lugar de fijación para eritromicina, mientras que L27 permite la fijación de espiramicina. Estos hallazgos sugieren que diferencias estructurales de los macrólidos se reflejan en dianas ribosomales específicas (Giner, 1995).

Los macrólidos se ubican a la salida del túnel por donde el péptido nascente escapa del ribosoma. Al interactuar grupos reactivos de la desosamina y el anillo lactona, se forman puentes de hidrógeno y el diámetro del túnel se ve reducido de 15 Å a 10 Å. Dicha interacción es determinante de la acción antimicrobiana y se sabe que el impedimento de la misma, sea por dimetilación de la adenina o reemplazo de la adenina por otra base, genera completa resistencia. Como consecuencia de la ubicación de la molécula, se bloquea el pasaje de la cadena peptídica que está atravesando la fase de elongación. Sin embargo, como el sitio está bastante alejado del centro donde se halla la enzima peptidiltransferasa, algunos polipéptidos cortos logran ser sintetizados (Mulazimoglu, 2005).

Efectos indirectos de la unión de los macrólidos al ribosoma son: fomento de la disociación del peptidil-ARNt del ribosoma, interferencia en el ensamblaje de la subunidad 50S e impedimento en la formación de la unión peptídica. Este último punto es muy importante en el caso de los derivados semisintéticos 16-membrados que poseen una mayor extensión de la desosamina. Dicha extensión puede protruir sobre el sitio donde se ubica la enzima peptidil-transferasa e inhibir la ubicación del sustrato en el sitio P. La interacción de la clindamicina con el ribosoma no ha sido estudiada en detalle. Sin embargo se cree que actúa como reforzador de la unión del antibiótico con el sitio target, ya que al ser removida se observa una disminución en la actividad antibacteriana (Mulazimoglu, 2005).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permitirán mejorar el tratamiento, estandarizarlo con el soporte de evidencia científica y difundirlo; posibilitando con ello ampliar la cantidad de beneficiados, con un producto de bajo costo, sin efectos adversos, elevada efectividad y ampliamente difundido en nuestro territorio, inclusive fuera de la amazonia.

Conclusiones

El estudio fitoquímico cualitativo del látex de *Croton lechleri* Sangre de grado, ha revelado la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, y saponinas en mayor cantidad.

El ensayo de solubilidad del látex *Croton lechleri* sangre de grado, evidenció mayor solubilidad con el solvente etanol, seguido del metanol.

Existe diferencia altamente significativa entre los porcentajes de inhibición promedio de los diferentes tratamientos, siendo el tratamiento óptimo el látex *Croton lechleri* sangre de grado puro con un 54.75 de porcentaje de inhibición de cultivos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Referencias bibliográficas

- Álvarez, I. (2012). The evolution of an old pathogen called *Staphylococcus aureus*. *Rev Cubana Pediatr* vol.84 no.4, 53-54.
- Contreras, R. (2002). Instituto nacional de salud. en d. j. pomar, *manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el metodo de disco difusion - Serie de Normas tecnicas n° 30* (págs. 13-22). Lima-Peru: Centro de Documentación del INS.
- Cuellar, D. (2000). Universidad de la Habana - instituto de farmacia y alimentos. En D. M. Martinez, *Manual de Practicas de Laboratorio- Farmacognosia y productos naturales* (págs. 90-91). Habana: Universidad de la Habana.
- Giner, S., Canós, M., Rodilla, F., Ferrer, C. (1995) Nuevos macrólidos ¿Superan a la Eritromicina?. *Farm Hosp* 19 (5): 59-265.
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 2ª Edición*. Lima: Fondo Editorial PUCP.
- Meza, A. J. (1999). *Desarrollando Nuestra Diversidad Biocultural: "sangre de grado" y el Reto de su Produccion Sustentable en el Peru*. Lima-Peru: Fondo Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Mulazimoglu, L., Tulken, P. M., Van Bambeke, F. (2005) Macrolides. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon PS, Peloquin C and Morse GD (eds), *Antimicrobial Therapy and Vaccines, Volume II: Antimicrobial Agents (2nd Ed)* Pittsburg, ESun Technologies, p. 243-280.
- Roca, D. A. (Ene. 2013). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. *An. Fac. med. v.74 n.1*.
- Risco, E. (2005). bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de grado. *revista de fitoterapia*, 1-3.
- Rodríguez, E.(2015). Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *Iatreia vol.28 no.1*, 3-4.
- Tamariz, O., Capcha, R., Palomino, E., Aguilar, J. (2003). Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Revista Médica Herediana*, 1-8.
- Willett, H. P. (1994) Agentes antimicrobianos. En: Wolfgang KJ, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM (eds): *Zinsser Microbiología (2ª Ed)* Buenos Aires, Ed. Panamericana, p. 221-283.
- Zendejas-Manzo, G. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, Patogenicidad y Métodos de Identificación. *Rev Biomed*, 129143.