
Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana in Vitro de *croton lechleri* “Sangre de grado”.

José Huapaya Yaya*; Martha Flórez Flores*; Hernani Larrea Castro*

RESUMEN

Se realizó el control microbiológico de extractos de *croton lechleri* expedido en el comercio bajo el nombre de "Sangre de grado". Además se evaluó la actividad antibacteriana del mismo. Se analizaron 50 muestras provenientes de los departamentos de Lima, San Martín, Huánuco y Ucayali. De 47 muestras provenientes de Lima, 18% fueron positivas a coliformes totales y un 9% a coliformes fecales. Se determinó una marcada actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* en extractos provenientes de Ucayali en diluciones del 50% y 100%..

Palabras claves: Control microbiológico, *Croton lechleri*, Sangre de grado, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

The microbiological control of extracts of *Croton lechleri* expended in the comercialization below the name of "Sangre de Grado" .was realized. Also was evaluated the antibacterial activity of the same. 50 samples proceeding from the departrnents of Lima, San Martin, Huanuco and Ucayali were analyzed. From 47 samples proceeding from Lima, 18% were positives to totals coliforms and 9% to fecals coliforms. A marked antibacterial activity agains *Staphylococcus aureus* in extracts proceeding from Ucayali in dilution of 50 % and 100 % was determinated.

Key Words: Microbiological control, *Croton lechleri*, Sangre de grado, antibacterial activity.

INTRODUCCION

En los últimos años, numerosas investigaciones se han venido realizado encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. Dentro de ellas, un considerable número de estudios han sido llevados hacia la evaluación de la actividad antiinflamatoria, antioxidante o antimicrobiana de extractos y otros productos de plantas medicinales y aromáticas.

Croton lechleri es una planta cultivada en el Perú. Existen cerca de 52 especies de este género, especialmente en los departamentos de Loreto, San Martín, Huánuco, Junín y Ucayali, siendo ampliamente utilizada en la medicina tradicional. La resina de este árbol es conocida comúnmente como "Sangre de grado o drago", por su gran parecido a la sangre humana ⁽¹⁾. ⁽²⁾. Contiene el alcaloide Taspina (acción cicatrizante) y Proanticianidina oligomérica (SP-303) de acción antiviral. Especies de esta familia contienen antraquinonas, triterpenoides, epoxiácidos grasos, ácidos grasos insaturados y agentes antitumorales ⁽³⁾.

El látex de este árbol amazónico es usado en forma tradicional desde épocas ancestrales y en los tiempos modernos ha sido estudiado y se ha demostrado sus propiedades medicinales como cicatrizante y como antiviral. Experimentos in vitro muestran que inhibe diferentes virus, incluyendo el virus herpes (HSV tipos 1 y 2), el virus de la hepatitis (A y B), el virus de la influenza A (FLU-A) y el virus de la parainfluenza (PIV).^(4,5)

Se ha demostrado que 5 de 11 especies del Gen Groton presentan actividad antimicrobiana, especialmente para los gram positivos ⁽⁶⁾.

(*) Instituto de Investigación, Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres.

La "Sangre de grado" tiene un uso muy extendido en nuestra población tanto rural como urbana. En la medicina herbaria peruana se utiliza y se recomienda extensamente para el uso externo como agente curativo de heridas y como antiséptico en ducha vaginal, para los desórdenes de la piel y relieves de mordeduras del insecto. Se toma internamente para hemorragias, úlceras en la boca, infecciones de la garganta, tuberculosis, úlceras pépticas, desórdenes intestinales, reumatismo y realzar la fertilidad ^{(1), (7)}.

Si bien es cierto, la sangre de grado ha sido estudiada detalladamente en sus aspectos fitoquímicos, son muy pocos los trabajos de control microbiológico de esta resina, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar microbiológicamente el extracto crudo de *croton lechleri* expendido en la vía pública así como determinar *in vitro* su actividad antibacteriana.

MATERIAL Y METODOS

Recolección y preparación de la muestra.

Las muestras de sangre de grado se obtuvieron por la modalidad de compra en diferentes distritos de Lima Cercado (Av. Tacna, Av. Grau, Av. Caqueta y Av. Abancay), Surquillo (Mercado 1 y 2), Lince (Mercado), Magdalena (Mercado), Comas (Av. Túpac Amaru), Puente Piedra (Mercado), anotando la procedencia de cada una de ellas. En total se obtuvieron 47 muestras, en su gran mayoría provenientes del comercio ambulatorio. Además se analizaron tres muestras del extracto crudo (látex) procedentes de los departamentos de San Martín (Moyobamba), Huánuco (Tingo María) y Ucayali (Pucallpa).

Para realizar el control de calidad, se diluyeron las muestras con solución buffer fosfato a pH 7, preparando diluciones a 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴. Para evaluar la actividad antibacteriana, las muestras se llevaron a diferentes concentraciones con solución buffer fosfato a pH 7, preparando diluciones al 10%, 25%, 50% y 100%.

Medios de cultivo y cepas bacterianas.

Los medios de cultivo empleados para el control de calidad microbiológico fueron: caldo lauril triptosa (CLT), caldo lactosado verde brillante al 2% (CVB), agar tripticosa soya (ATS) y agar sabouraud (AS). Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizó el agar Müeller-Hinton (AMH).

Las cepas utilizadas para la evaluación de la actividad antibacteriana fueron *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Con cada una de ellas se prepararon suspensiones con suero fisiológico estéril llevándose a la concentración del patrón 0,5 de la escala de McFarland.

Control de calidad microbiológico.

Se analizó el recuento total de mesófilos aerobios (RMA), recuento de coliformes totales (RCT), recuento de coliformes fecales (RCF) y recuento de levaduras (RL).

Para el RMA se utilizó el método de recuento estándar en placa. Para ello, las muestras de Sangre de grado se procesaron directamente como si se tratara de una muestra de agua, diluyéndose con buffer fosfato a pH 7. Se realizaron diluciones sucesivas de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴, agregando en una placa Petri estéril 1 ml de cada una de las diluciones, agregando luego agar ATS, homogenizándose con movimientos rotatorios e incubándose a 35°C por 24 h. Para realizar los cálculos se eligieron dos placas, correspondientes a una dilución que presente entre 30 y 300 colonias. Se hallaron la media aritmética de los dos valores, multiplicándose por el factor de dilución.

Para el RCT y el RCF se utilizó el método norteamericano de la técnica de Colimetría por el número más probable (NMP). El primero de ellos emplea el caldo CLT, seguido de la confirmación de los tubos positivos de gas en caldo CVB, incubándose a 35°C por 24 a 48 h. Los tubos que mostraron producción de gas en las primeras 24 h y en las 48 h adicionales, fueron considerados para la determinación de coliformes fecales y para la determinación del NMP de coliformes totales. Para los cálculos se compararon los resultados con la tabla de NMP (8).

Para el RL se utilizó el método de recuento estándar en placa. Para ello, las muestras de sangre de grado se procesaron directamente como si se tratara de una muestra de agua, diluyéndose con buffer fosfato a pH 7. Se realizaron diluciones sucesivas de 10¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴, agregando en una placa Petri estéril 1 ml de cada una de las diluciones, agregando luego agar AS, homogenizándose con movimientos rotatorios e incubándose a 35°C por 24 h. Para realizar los cálculos se eligieron dos placas, correspondientes a una dilución que presente entre 30 y 300 colonias. Se determinó la media aritmética de los dos valores, multiplicándose por el factor de dilución.

Determinación de la actividad antimicrobiana.

Se utilizó el método de excavación en placa cultivo. Previamente se repicaron los microorganismos de ensayo (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*) sobre el agar ATS a 37°C. Después del período de incubación, se prepararon suspensiones de cultivo en suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo hasta una concentración de microorganismos equivalente a 0,5 en la escala de McFarland (9).

Al preparar las placas del agar AMH, se añadió 1 ml de la suspensión de inóculo por cada 100 ml de medio de cultivo, homogenizándose con movimientos de rotación y solidificándose a temperatura ambiente, rotulándose con el nombre del microorganismo testigo. Luego se hicieron los pocillos mediante un excavador de 5 mm de diámetro procurando que su distribución en cada placa sea equivalente. En cada pocillo se colocó 100 µL de las diferentes concentraciones del látex a evaluar (10%, 25%, 50% y 100%), así como los controles negativos (suero fisiológico) y positivos (ciprofloxacina, 5mg/mL) con un total de dos repeticiones por tratamiento para cada bacteria. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, al cabo del cual se evaluaron los resultados mediante la lectura en milímetros del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos.

Para calcular el porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, se dividió la media del diámetro del halo inhibitorio del látex entre la media del diámetro del halo inhibitorio del control positivo multiplicado por 100.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los resultados del control de calidad microbiológico de la "Sangre de grado". Se debe señalar que 24 muestras presentaron recuentos de mesófilos entre 10 y 100 UFC/ ml, mientras que 38 presentaron recuentos superiores a 100 UFC/MI

Tabla 1. Frecuencia relativa de mesófilos aerobios en muestras de "Sangre de grado". Lima. 2002.

| Frecuencia | RECuento DE MESÓFILOS AEROBIOS (1 x 10 ³) | | | | | | TOTAL |
|------------|---|-----------|-------------|-------------|-------------|--------|-------|
| | < 0,09 | 0,10-0,99 | 1,00 – 1,99 | 2,00 – 2,99 | 3,00 – 3,99 | > 4,00 | |
| | 7 | 24 | 8 | 0 | 3 | 8 | 50 |

La Tabla 2 muestra que el 18% de las muestras fueron positivas a coliformes totales y el 9% a coliformes fecales. Sólo una muestra presentó recuentos de coliformes de 14 UFC/100 mL.

Tabla 2. Recuento de coliformes totales y fecales en muestras de "Sangre de grado". Lima. 2002.

| Muestras | RCT | | | | RCF | | | | TOTAL | |
|----------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-------|-----|
| | (+) | % | (-) | % | (+) | % | (-) | % | # | % |
| | 18 | 36 | 32 | 64 | 9 | 18 | 41 | 82 | 50 | 100 |

En la Tabla 3 se observa que 36 muestras presentaron recuentos de levaduras menores a 20 UFC/mL, mientras que sólo cuatro de ellas presentaron recuentos superiores a 66 UFC/mL.

Tabla 3. Frecuencia relativa del recuento de levaduras en muestras de "Sangre de grado". Lima. 2002.

| Frecuencia | RECuento DE LEVADURAS (1 x 10 ³) | | | | | | TOTAL |
|------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------|
| | <0,05 | 0,06 – 0,20 | 0,21 – 0,35 | 0,36 – 0,50 | 0,51 – 0,65 | >0,66 | |
| | 17 | 19 | 6 | 3 | 1 | 4 | 50 |

Las muestras procedentes de Moyobamba, Tingo María y Pucallpa presentaron recuentos de mesófilos aerobios menores a 50 UFC/mL, negativos para coliformes totales y fecales y con menos de 10 UFC/mL para las levaduras. Los detalles se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuento de microorganismos en las muestras procedentes de provincia. 2002.

| Procedencia | RECuento DE MICROORGANISMOS | | | |
|-------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Mesófilos (UFC/mL) | Levaduras (UFC/mL) | Coliformes Totales (UFC/100 mL) | Coliformes Fecales (UFC/100 mL) |
| Moyobamba | 34 | 9 | 0 | 0 |
| Tingo María | 23 | 5 | 0 | 0 |
| Pucallpa | 5 | 1 | 0 | 0 |

La mayor actividad antimicrobiana se observó a concentraciones del 50% y 100% del látex de "Sangre de grado". Se observaron halos de inhibición semejantes a los del control positivo en las cepas de *S.aureus* y en menor grado de *P.aeruginosa*, en tanto que frente a las cepas de *E.coli* no se observó halos de inhibición. Los detalles se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Actividad antibacteriana del látex de *croton lechleri* "Sangre de grado" frente a diferentes microorganismos. 2002.

| MUESTRA | DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm) | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|--------------------------------------|-----|-----|------|----|---------------|-----|-----|------|----|---------------------|-----|-----|------|----|
| | <i>S.aureus</i> | | | | | <i>E.coli</i> | | | | | <i>P.aeruginosa</i> | | | | |
| | 10% | 25% | 50% | 100% | C+ | 10% | 25% | 50% | 100% | C+ | 10% | 25% | 50% | 100% | C+ |
| Moyobamba | 12 | 14 | 24 | 26 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 10 | 12 | 16 | 16 | 40 |
| | 13 | 14 | 25 | 26 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 8 | 12 | 18 | 18 | 40 |
| Tingo María | 12 | 17 | 24 | 26 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 10 | 16 | 25 | 26 | 39 |
| | 14 | 16 | 24 | 25 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 14 | 22 | 28 | 24 | 40 |
| Pucallpa | 18 | 23 | 28 | 26 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 16 | 22 | 25 | 26 | 42 |
| | 19 | 23 | 26 | 28 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 14 | 20 | 23 | 24 | 40 |
| Lima | 5 | 12 | 20 | 21 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 0 | 10 | 14 | 15 | 40 |
| | 10 | 13 | 19 | 21 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 0 | 8 | 15 | 17 | 40 |

Sólo se incluyen datos de las concentraciones de látex al 50 y 100% para los cáculos del porcentaje del efecto inhibitorio; como puede observarse en la Tabla 6, se evidencia una respuesta de inhibición en el caso de las bacterias en un rango de 50% y 90% con respecto a la ciprofloxacina, siendo *staphylococcus aureus* la bacteria que más se inhibe.

| MICROORGANISMO | | CONCENTRACIÓN | | |
|----------------------|---|---------------|------|---------|
| | | 50% | 100% | CONTROL |
| <i>S. aureus</i> | A | 23,7 | 24,9 | 29,2 |
| | B | 81,2 | 85,3 | 100 |
| <i>E.coli</i> | A | 0 | 0 | 40,5 |
| | B | 0 | 0 | 100 |
| <i>P. aeruginosa</i> | A | 20,5 | 20,7 | 40,1 |
| | B | 51,1 | 51,6 | 100 |

DISCUSION

Nuestro país cuenta con un inmenso recurso en plantas medicinales y su estudio se hace cada día más importante y necesario, son pocas las investigaciones científicas que demuestran las propiedades terapéuticas las que podrían abrir nuevas posibilidades en el campo de la salud.

Son pocas las investigaciones que reportan el control microbiológico de plantas medicinales o derivados de ellas. La contaminación de las plantas o hierbas medicinales proviene, al igual que en otras hierbas y especies, a partir de la forma y sitio desde donde se cultivan, se extraen o se procesan (10). La presencia de microorganismos contaminantes en extractos o derivados de plantas medicinales representa un riesgo potencial. para la salud del consumidor, más si en su preparación se utilizan condiciones que permitan la sobrevivencia de estos.

Los resultados obtenidos demuestran que el 36% de las muestras de sangre de grado presentan recuentos totales que sobrepasan la norma internacional de la OMS, la cual estipula que el recuento

total aerobio debe ser inferior a 105 UFC/ml, de lo contrario son inaceptables para el consumo humano (10). Mientras que solo una de las muestras supera las 10 /100 ml coliformes totales y fecales permitidas por la norma internacional de la OMS. En cuanto a la presencia de levaduras en la sangre de grado se observa recuentos de colonias muy bajos, sólo 8% de las muestras presentaron valores superiores a 60 UFC/mL, siendo el límite permitido 100 UFC/ml (10).

Sin embargo, no se puede descartar que los bajos recuentos de mesófilos y levaduras sean efectos del 1, 3, 5-trimetoxibenceno y el 2, 4, 6-trimetoxifenol componentes de la sangre de grado que influyan sobre el crecimiento bacteriano ^{(6), (11)}.

Los resultados de este estudio muestran deficiencias en la calidad microbiológica de la Sangre de grado por lo cual es importante desarrollar reglamentos con respecto a los controles que deben realizarse, ya que muchos de los extractos o derivados de plantas medicinales son vendidos libremente en la vía pública e incluso en farmacias sin ningún control sanitario, lo cual puede ser muy perjudicial para la salud del consumidor.

De las 700 especies del género *Croton*, sólo han sido estudiadas 80 especies, de las cuales en 11 de ellas se ha evaluado su actividad antimicrobiana ⁽¹⁾. Para el efecto se hace necesario el estudio de cada una de las plantas medicinales y comprobar en ellas los posibles principios activos en búsqueda de nuevas propiedades farmacológicas.

Los ensayos realizados demuestran que la sangre de grado tiene actividad inhibitoria frente a bacterias como *Staphylococcus aureus* y en menor grado a *Pseudomonas aeruginosa*, no observándose ninguna acción frente a *Escherichia coli*, los cuales coinciden con lo reportado por Zapata, 1987 ⁽¹²⁾ y Chen 1994 ⁽⁶⁾.

Los mayores estudios del género *Croton* han sido en la evaluación de la actividad cicatrizante por su contenido en taspina, la 3'-4-O-dimetilcedrusina y los polifenoles (catequinas y proantocianidinas) ^{(3), (7), (13), (14)}; acción antiinflamatoria ^{(3), (15)}; acción antiviral la cual Ubillas, 1994 ^{(3), (5)} demostró actividad contra una variedad de virus DNA y RNA entre otras muchas propiedades demostradas experimentalmente in vitro como in vivo.

CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos en las condiciones de recogida de la sangre de grado, se concluye que:

Las muestras de sangre de grado expuestas en la vía pública presentaron mayores recuentos de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales, mientras que las traídas del lugar donde se producen y extraídas presentaron muy baja contaminación de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales así como de levaduras, pudiendo deberse a que no estuvieron expuestas al comercio ambulante y por tanto a una posible adulteración y contaminación.

De las 18 muestras positivas a coliformes totales, sólo una de ellas sobrepasa los límites permitidos por la OMS.

Frente a *Staphylococcus aureus* se observó una gran actividad microbiana y una baja pero significativa actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Las muestras de Sangre de grado procedentes de Moyobamba, Tingo María y Pucallpa produjeron mayores halos de inhibición frente a las cepas control de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. No se observó actividad antimicrobiana frente a las cepas control de *Escherichia coli* para ninguna de las muestras.

Pruebas de actividad antibacteriana de látex de croton lechleeri.

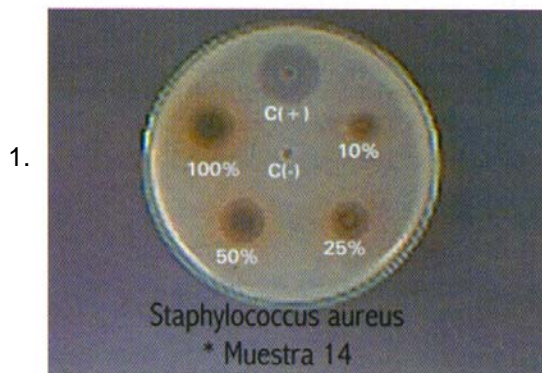


Foto N° 1. Método de excavación en placa para observar la actividad antibacteriana de la sangre de grado de Moyobamba (*Muestra 14) con una cepa control de S. aureus.

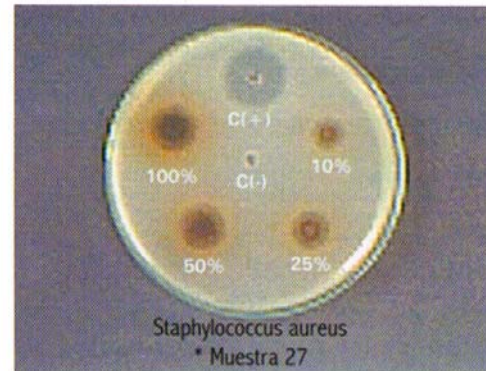


Foto N° 2. Método de excavación en placa para observar la actividad antibacteriana de la sangre de grado de Tingo María (*Muestra 27) con una cepa control de S. aureus.

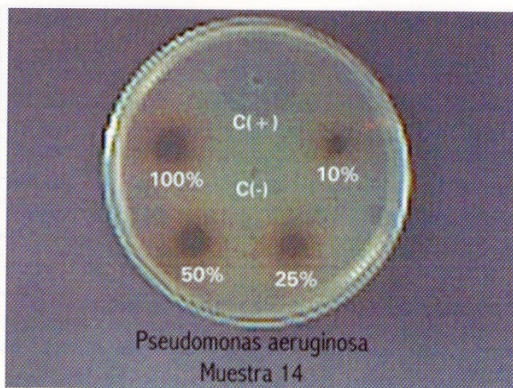


Foto N° 3. Método de excavación en placa para observar la actividad antibacteriana de la sangre de grado de Moyobamba (*Muestra 14) con una cepa control de P. aeruginosa.

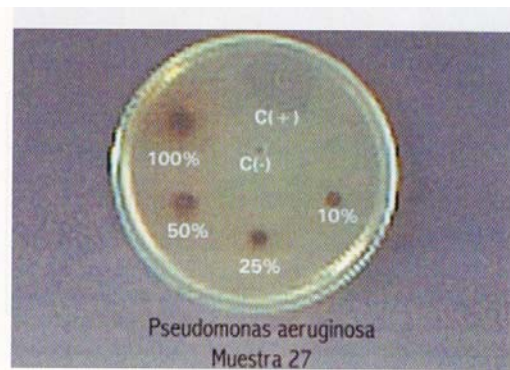


Foto N° 4. Método de excavación en placa para observar la actividad antibacteriana de la sangre de grado de Tingo María (*Muestra 27) con una cepa control de P. aeruginosa.

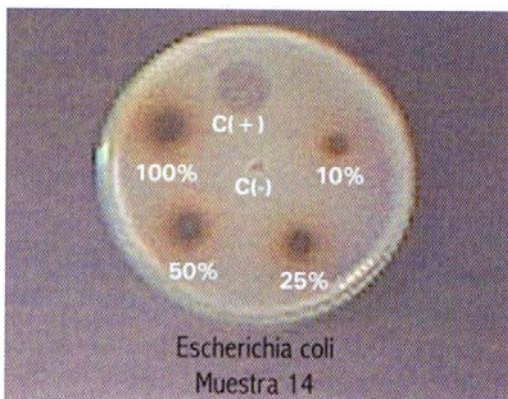


Foto N° 5. Método de excavación en placa para observar la actividad antibacteriana de la sangre de grado de Moyabamba (Muestra 14) con una cepa control de E coli

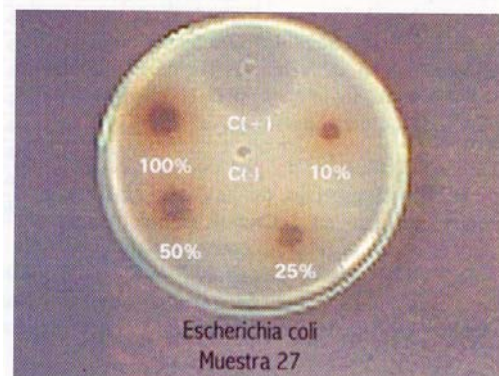


Foto N° 6. Método de excavación en placa para observar la actividad antibacteriana de la sangre de grado de Tingo María (*Muestra 27) con una cepa control de E.coli.

Los mayores halos de inhibición se observaron a concentraciones de 50% y 100% de látex de *croton lechleri*.

Se puede concluir que ya que se observó una buena actividad a bacterias gram positivas como *staphylococcus aureus*, puede ser que la acción antimicrobiana de este látex evite o inhiba el crecimiento de bacterias mesófilas que muchas de ellas son gram positivas

RECOMENDACIONES

En este tipo de productos se considera importante seguir los procedimientos de buena manufactura sanitaria a fin de evitar la contaminación con microorganismos ambientales.

Por la ausencia de control de calidad poco se puede confiar en que el látex proceda de especies de croton productoras de taspina y otros principios activos.

Se deben seguir con los estudios de actividad antimicrobiana para otras bacterias especialmente gram positivas así como para levaduras y hongos, ya que no hay muchos trabajos realizados en este tema.

Jose Huapaya Y.
Instituto de Investigación.
Laboratorio de Microbiología
Facultad de Medicina Humana
Universidad San Martín de Porres.

BIBLIOGRAFIA

1. FORERO L. E.; CHÁVEZ J F., YESID H. Croton lechleri. Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. CYTED. Martínez, Yesid & Cáceres; 2000. Santa Fe de Bogotá, DC (Colombia).
2. BERDONCES, I.; SERRA, J. Gran Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Edit. Tikal España; 1998. Pago 126-139.
3. MORALES GUIRLAN, M. Estudio de los efectos de la Sangre de Grado UPCH. 1984 Lima, Perú.
4. SIDWELL, R.; HUFFMAN, J H.; MOSCON, B. J; WARREN, R. P. Influenza virus - inhibitory effects of intraperitoneally and aerosol-administered SP-303, a plant flavonoid. Chemotherapy; 1994. Vol. 40: 42-50.
5. UBILLAS, R.; JOLAD, R. c.; KERMNAN, M. R., et al. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin form de latex of croton lechleri (Sangre de drago). Phytomedicine, 1994; Vol. 1: 77-106.
6. CHEN, Z.; CAI, Y; PHILLIPSON, J. Studies on the anti-tumour, anti-bacterial and wound-healing properties of dragon's blood. Planta Medica. 1994; Vol. 60: 541-545.
7. PÉREZ TUESTA, E.; IPARRAGUIRRE, D. Estudio Botánico Químico Farmacológico de cuatro especies con actividad Cicatrizante. 1995. Proyecto ICBAR. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Lima, Perú.
8. ANDREWS, W. Manual of food quality control 4. Rev. 1. Microbiological analysis. Food and drug administration. Food and agriculture organization of the United Nations. 1992.
9. Towards a set of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria. <http://www.nuigalway.ie/mic/eusus/index.html>.

10. SPECK, M. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2d ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, Inc. 1984; p. 62-76.
11. Organización Mundial de la Salud. Manual de Resoluciones de la Asamblea Mundial de Salud y del Consejo Ejecutivo. 1992. 3a ed. Ginebra OMS; pago 147.
12. MARCELO, A. J.; MEZA, E. N. Propiedades biológicas de metabolitos secundarios de Sangre de grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Fondo Editorial. 1999. Págs. 165-196.
13. ZAPATA, R. E. Actividad antimicrobiana in vitro de la droga comercializada como Sangre de Grado. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 1987. Tesis para optar el título de Licenciado en Farmacia y Bioquímica.
14. VAISBERG, A.; MILLA, M., PLANAS, M.; CÓRDOVA, J.; et al. Taspine is the cicatrizant in Sangre de drago extracted from *Croton lechleri*. *Planta Medica* 1989.; Vol. 55:140-143.
15. *PERDUE*, G. P., et al. South American plants 11: taspine isolation and anti-inflammatory activity. *J Pharm. Sci.*, January, 1979. Vol. 68 (1): 124-26.