

Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón)

Secondary metabolites and *in vitro* antibacterial activity of extracts from *Anacardium occidentale* L. (Cashew tree) leaves

Dr. C. Yordan Martínez Aguilar,^I MSc. Fernando Soto Rodríguez,^{II} Dr. C. Manuel Almeida Saavedra,^I MSc. Robinson Hermosilla Espinosa,^I Dr. C. Orlando Martínez Yero^I

^I Universidad de Granma. Bayamo, Granma, Cuba.

^{II} Laboratorio Provincial de Criminalista. Ministerio del Interior. Bayamo, Granma, Cuba.

RESUMEN

Introducción: las hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón) tienen contenidos óptimos de nutrientes; se ha utilizado como antidiarreico y nutracéutico en animales, sin embargo, la caracterización fitoquímica y antimicrobiana de sus extractos son insuficientes.

Objetivo: determinar los metabolitos secundarios y la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L.

Métodos: del polvo de las hojas de *Anacardium occidentale* L. se obtuvo inicialmente el extracto fluido y la tintura al 20 %. Se realizó tamizaje fitoquímico y pruebas de calidad de las preparaciones farmacéuticas. Se determinó la actividad antibacteriana (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella entérica*, *Shigella* sp.) de tres diluciones del extracto seco (50, 100 y 200 mg/mL) de la tintura al 20 % y de los extractos n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo (*Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes*), con posterior caracterización fitoquímica.

Resultados: en el extracto fluido y en la tintura al 20 % se detectaron cumarinas y otros metabolitos como saponinas, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos libres, triterpenos/esteroides, fenoles/taninos. El índice de refracción, la densidad, el pH y los sólidos totales mostraron resultados similares para el extracto fluido y la tintura al 20 %. Además, para estos indicadores no se encontraron diferencias

significativas 6 meses después. El extracto seco mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, con los mayores halos de inhibición para la dilución de 200 mg/mL. Asimismo, el extracto de acetato de etilo indicó el menor crecimiento de esta bacteria patógena, según los halos de inhibición. En los extractos, clorofórmico y acetato de etilo, se determinaron cumarinas y azúcares reductores.

Conclusiones: en el extracto fluido y la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale* se detectaron mayormente cumarinas y su calidad no se afectó durante 6 meses. Los extractos n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo mostraron actividad estafilocócica *in vitro*, también se detectaron azúcares reductores y cumarinas en los dos últimos extractos.

Palabras clave: marañón, antibacteriano, extractos de planta, tamizaje fitoquímico.

ABSTRACT

Introduction: the leaves of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree) have optimal contents of nutrients and have been used as antidiarrheal and nutraceutical in animals; however, the phytochemical characterization and antimicrobial of the extracts are insufficient.

Objective: to determine secondary metabolites and *in vitro* antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* L. leaf extracts.

Methods: fluid extract and 20% tincture were initially obtained from powdered leaves of *Anacardium occidentale* L. Phytochemical screening and quality testing of pharmaceuticals were performed. The antibacterial activity was determined (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteric* and *Shigella* sp.) in three dilutions of the dry extract (50, 100, and 200 mg/mL) from the 20 %, tincture and from the n-hexane, chloroform and ethyl acetate extracts (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* sp., *Salmonella enteric*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes*), with subsequent phytochemical characterization.

Results: high content of coumarins and other metabolites such as saponins, flavonoids, reducing sugars, free aminoacids, triterpenes and/or steroids, phenols and/or tannins were detected in the fluid extract and the 20 % tincture. The refractive index, the density, the pH and the total solids showed similar results for the fluid extract and for the 20 % tincture. Besides, no significant differences were found in these parameters six months after the study. The dry extract showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, with the largest inhibition zones for dilution of 200 mg/mL. Furthermore, the ethyl acetate extract indicated the slowest growth of this bacterial pathogen, according to inhibition hales. In the chloroform and ethyl acetate extracts, abundant coumarins and reducing sugars were found.

Conclusions: the fluid extract and the 20% tincture from *Anacardium occidentale* leaves contained mostly coumarins and their quality remained the same six months afterwards. N-hexane, chloroform and ethyl acetate extracts disclosed *staphylococcal* activity *in vitro* whereas reducing sugars and coumarins were detected in the last two extracts.

Key words: cashew tree, antibacterial, plant extracts, phytochemical screening.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son aquellas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos. En la actualidad se calcula unas 260 000 especies de plantas, de las que el 10 % se puede considerar medicinal. Según la clasificación de tratados médicos de fitoterapia, en épocas modernas y pasadas, las regiones tropicales son favorecidas por la proporción de especies medicinales, teniendo en cuenta que todavía no se conoce la totalidad de la flora vegetal.¹

Las plantas son laboratorios naturales donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas, de hecho se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Un gran porcentaje de los principios activos está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución restringida. Entre estos metabolitos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, bacterias, hongos, como son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides. Se ha demostrado que existe gran variación en cuanto a la concentración de estos en la planta, no hay un patrón de máxima producción ni órganos especiales de almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo, lo común es que las mayores concentraciones de estos tipos de compuestos se encuentren en hojas, flores y semillas.²

Las hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón) presentan contenidos óptimos de minerales, principalmente electrolitos, material saponificable, ácidos grasos monoinsaturados, fitoesteroles y proteínas solubles, por lo que se le atribuyen propiedades medicinales como hipoglucemiante, antihipertensiva, astringentes, antihelmíntica y antiinflamatoria.³⁻⁵ El polvo AO (*Anacardium occidentale*) obtenido de las hojas de *A. occidentale* L. se utilizó con efectividad para contrarrestar el síndrome diarreico en animales de granja, además su empleo como nutracéutico en las dietas de las aves incrementó los indicadores productivos.^{6,7} La literatura refiere información sobre la caracterización fitoquímica y antimicrobiana de la fruta de *A. occidentale*, sin embargo, estas determinaciones en las hojas son insuficientes. El objetivo de este trabajo consistió en determinar los metabolitos secundarios y la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de hojas de *A. occidentale*.

MÉTODOS

Toma y preparación de la muestra

Se tomaron hojas y retoños de 3 árboles de *Anacardium occidentale* L. (AO) de aproximadamente 10 años de edad, en la zona de Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba, caracterizada por una topografía llana y suelo ferralítico, autenticado por especialistas de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma. Se tuvo en cuenta para la recolección la diversidad del tamaño y la estructura de las hojas. Las muestras se deshidrataron de 60 a 65 °C durante 16 h, luego se sometió a molinaje de 1 mm, con el empleo de un molino eléctrico de cuchillas paralelas; las muestras se conservaron a temperatura ambiente en frascos ámbar para evitar la descomposición de las sustancias activas por acción de la luz.

Preparaciones farmacéuticas

Tintura

Para obtener 250 mL de tintura al 20 % de *A. occidentale* L., se utilizaron 50 g de la droga cruda en un menstruo de etanol al 70 %. Se maceró la droga pulverizada por 7 d mediante un agitador mecánico (ILM tipo THYS 2, Alemania), a continuación se realizó la extracción de la tintura.

Después de lograr la homogeneidad y transparencia total de la tintura, se envasó en frascos ámbar para evitar la descomposición de las sustancias activas por acción de la luz. Las muestras se mantuvieron en reposo 3 d en refrigeración a 8 °C.⁸

Extracto fluido

El extracto fluido de hojas de *A. occidentale* se obtuvo según la técnica descrita en la norma ramal de salud pública (NRSP) 311⁸ que consta de 6 etapas: humectación del material vegetal, carga del percolador, maceración, extracción del percolado, reposo y filtración. Se dejaron en reposo y refrigeración 250 mL del extracto fluido a 8 °C por 3 d.

Tamizaje fitoquímico

Se hizo un tamizaje fitoquímico de la tintura al 20 % y del extracto fluido, se repitió este análisis 6 meses después, según los ensayos *Liebermann-Burchard* (triterpenos/esteroides), espuma (saponinas), ninhidrina (aminoácidos libres), *Mayer y Wagner* (alcaloides), *Baljet* (cumarinas), *Fehling* (azúcares reductores), cloruro férrico (fenoles/taninos), *Borntrager* (quinonas), *Shinoda* (flavonoides), resinas y antocianidinas. Se utilizó el sistema de cruces como criterio de medida para especificar la cualificación de los metabolitos secundarios.⁹

Especificaciones de la calidad de la tintura al 20 % y del extracto fluido

En el extracto fluido y la tintura al 20 % se determinaron el pH, el índice de refracción, la densidad y los sólidos totales; estos análisis se repitieron 6 meses después. El pH se analizó en un pH-metro (HANNA 211, Portugal),¹⁰ el índice de refracción mediante un refractómetro (ABBE WYA-2S, China).¹¹ La densidad relativa se midió en un densímetro a 20 °C (TGL 0-12792, Alemania)¹² y los sólidos totales, según la NC 92-02.¹³ Todos los análisis se desarrollaron por triplicado.

Extracto seco

El extracto seco de las hojas de *A. occidentale* se obtuvo a partir de la tintura al 20 %. Se tomó una muestra de 100 mL, que se depositó en un balón de 500 mL y en un rotoevaporador; se logró una masa consistente por eliminación del solvente a 50 °C a una velocidad de rotación de 60 rpm.

Para el estudio de la composición fitoquímica de las formulaciones,⁹ se desarrolló un fraccionamiento sucesivo con solventes de polaridad creciente. Se concentró hasta sequedad 100 mL de tintura al 20 % de las hojas de *A. occidentale* y se redisolvió en etanol al 70 % (20 mL). Luego, en un embudo separador de 100 mL, se extrajeron 6 mL de n-hexánico. Este paso se repitió con cloroformo y acetato de etilo.¹⁴

Evaluación de la actividad antibacteriana

Para evaluar la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en agar por difusión superficial en disco (*Bauer-Kirby*). Se utilizaron discos con antibióticos comerciales (gentamicina y cloranfenicol) como controles positivos y discos de 7 mm de diámetro de papel de filtro, a los cuales se les aplicó 10 µL, obtenido de 3 concentraciones (50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL) en dimetilsulfóxido (DMSO) del extracto seco y se determinó la actividad frente *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008), *Bacillus subtilis*, *Salmonella entérica*, *Shigella* sp. De la misma forma se aplicó un disco impregnado con 10 µL, procedente de los extractos n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo para determinar la actividad frente *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14207), *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008), *Salmonella entérica*, *Shigella* sp. y *Enterobacter aerogenes*. Los resultados se evaluaron mediante la lectura en milímetros de diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos (Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S17 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, *CLSI*, Wayne Pa. 2007).

Los datos se analizaron mediante el módulo de estadística descriptiva y se determinaron la media y la desviación estándar. Se empleó el software estadístico SPSS versión 12.1.

RESULTADOS

En la tabla 1 se observa el tamizaje fitoquímico del extracto fluido y de la tintura al 20 % de la planta en estudio. Se detectó gran variedad de metabolitos secundarios, en especial, cumarinas; los demás metabolitos se identificaron en menores proporciones, como saponinas, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos libres, triterpenos/esteroides, fenoles/taninos. No se identificaron quinonas, alcaloides ni resinas. Hay que señalar que el tamizaje fitoquímico desarrollado 6 meses después (datos no mostrados), indicó resultados similares a la tabla 1.

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del extracto fluido y de la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale* L.

Ensayos de identificación	Extracto fluido	Tintura al 20%
Fenoles/taninos	+	+
Flavonoides	+	+
Aminoácidos libres	+	+
Quinonas	-	-
Triterpenos/esteroides	+	+
Cumarinas	++	++
Resinas	-	-
Antocianidinas	+	+
Azúcares reductores	+	+
Alcaloides (M)	-	-
Alcaloides (W)	-	-
Saponinas	+	+
Principios amargos	-	-

-: negativo, +: positivo.

En la tabla 2 se muestra la calidad de las preparaciones farmacéuticas del extracto fluido y la tintura al 20 %; el índice de refracción, la densidad, el pH y los sólidos totales mostraron resultados similares. Además, para estos indicadores no se encontraron diferencias notables 6 meses después (datos no mostrados).

Tabla 2. Indicadores de calidad del extracto fluido y de la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale* L.

Parámetros	Tintura al 20%	Extracto fluido
Índice de refracción	1,3478 (0,13)	1,3554 (0,12)
pH	5,05 (0,42)	5,02 (0,34)
Densidad g/mL	0,9114 (0,71)	0,9376 (0,62)
Sólidos totales %	2,806 (1,123)	2,958 (1,125)

Media ± Desviación estándar.

La actividad antibacteriana de tres concentraciones del extracto seco de la tintura al 20 % de las hojas de *A. occidentale* L. en DMSO, frente a 5 cepas bacterianas, se muestra en la tabla 3. Solo se encontró actividad frente *S. aureus* y los mayores halos de inhibición correspondieron a la concentración de 200 mg/mL.

Tabla 3. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto seco obtenido de la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale* L.

Extracto seco (diluciones en dimetilsulfóxido)	Halos de inhibición (mm)				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella entérica</i>	<i>Shigella</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>
Extracto seco (50 mg/mL)	8	-	-	-	-
Extracto seco (100 mg/mL)	10	-	-	-	-
Extracto seco (200 mg/mL)	12	-	-	-	-
Gentamicina	20	23	17	18	22
Cloranfenicol	21	16	19	15	23

En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos de la planta frente a 6 cepas de microorganismos, una grampositiva (*S. aureus*) y 5 gramnegativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *E. aerogenes*). El extracto de acetato de etilo mostró los mayores halos de inhibición, contrario al extracto n-hexánico que presentó los más bajos frente *S. aureus*.

Tabla 4. Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo obtenidos de la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale* L.

Extractos	Halos de inhibición (mm)					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella</i> sp.	<i>Salmonella entérica</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
n-hexánico	-	-	-	-	-	8
Clorofórmico	-	-	-	-	-	10
Acetato de etilo	-	-	-	-	-	13
Cloranfenicol	22	16	19	15	17	21

En el resultado del tamizaje fitoquímico (tabla 5) se observaron cumarinas y azúcares reductores (+ + +) en los extractos clorofórmico y acetato de etilo, se debe destacar que las cumarinas no se encontraron en el extracto n-hexánico.

Tabla 5. Tamizaje fitoquímico de los extractos n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo obtenidos de la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale* L.

Ensayos (metabolitos)	Extractos		
	n- hexánico	clorofórmico	Acetato de etilo
<i>Borntrager</i> (quinonas)	-	-	-
FeCl ₃ (fenoles/taninos)		-	-
<i>Shinoda</i> (flavonoides)		-	-
<i>Baljet</i> (cumarinas)	-	+	+
<i>Mayer</i> (alcaloides)	-	-	-
Ninhidrina (aminoácidos libres)		-	-
<i>Fehling</i> (azúcares reductores)		++	+++

-: negativo, +: positivo

DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos, las probabilidades de que los extractos de base alcohólica muestren actividad antibacteriana, antifúngica, cicatrizante y antioxidante, es significativa. Se ha demostrado que los metabolitos secundarios, en especial los flavonoides, antocianidinas y taninos en el *A. occidentale*, incrementan la digestibilidad de los nutrientes, el funcionamiento orgánico del cuerpo, activan la capacidad antioxidante (atrapadora de los radicales libre RH*) y modifican la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y antiinflamatoria).¹⁵ Nuestros resultados coinciden con *Martínez* y otros³ que no observaron quinonas, alcaloides y resinas en el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de las hojas de *A. occidentale*.

El tamizaje fitoquímico realizado a la tintura al 20 % y al extracto fluido de las hojas de *A. occidentale* 6 meses después de elaborado, indicó la estabilidad del producto como futuro fitoterapéutico o nutracéutico. Este resultado es corroborado por *Martínez* y otros,⁶ quienes demostraron que el polvo tiene una actividad biológica prolongada.

La calidad de la tintura al 20 % y del extracto fluido (tabla 3) es similar a los extractos de plantas medicinales autorizadas y explotadas con fines terapéuticos en Cuba, lo que permite proponer esta materia prima para la confección de formulaciones farmacológicas. Los sólidos totales en el *A. occidentale* muestran una concentración adecuada de principios activos, favorables a las hojas de jubaban (2,68 %), cortezas del fuste (1,18 %) y la raíz del nogal del país (1,71 %).^{16,17} La ligera acidificación en los extractos (tabla 2) permitió la estabilidad y conservación del producto, porque 6 meses después, los indicadores de calidad se mantuvieron inalterables (datos no mostrados). Por la calidad farmacéutica de la tintura al 20 % y por el bajo costo de su obtención en comparación al extracto fluido, se recomiendan investigaciones con este extracto.

Por otro lado, se evidenció que el extracto seco de la tintura al 20 % de hojas de *A. occidentale* L. tiene actividad antibacteriana frente a la cepa de *S. aureus* (ATCC),

con halos de inhibición entre 8 y 12 mm de diámetro. Estos resultados sugieren que las hojas de *A. occidentale* presentan metabolitos secundarios solubles en etanol al 70 %, con actividad antimicrobiana frente a bacterias grampositivas. Al respecto, *Bhandari* y otros¹⁸ indicaron resultados similares en la actividad antiestafilocócica del extracto seco de *Berberis asiatica* con una concentración 2,5 veces mayor a nuestra investigación. Por otro lado, *Martínez* y otros⁶ encontraron actividad bactericida frente a *E. coli* con una concentración de 0,40 mg/mL de la fracción "Y" del producto liofilizado de *A. occidentale*, lo cual demuestra que los extractos acuoso y etanólico de *A. occidentale* poseen actividad antibacteriana.

A pesar de que la utilización de *A. occidentale* solo mostró actividad antimicrobiana frente *S. aureus*, los halos de inhibición observados fueron superiores a muchos reportes de plantas medicinales cultivadas en Cuba y al polvo ultra fino chino distribuido en países asiáticos.¹⁹ Quizás la compleja estructura de la pared celular de las bacterias grampositivas, constituida por 5 a 10 % de muranilpéptidos que actúa como barrera, influyó en una menor sensibilidad del producto para estas concentraciones. Asimismo, la obtención y purificación de los principios pudiera incrementar su potencial antibacteriano.²⁰

El extracto de acetato de etilo tiene mayor actividad antiestafilocócica que las diluciones del extracto seco. *Mothana* y otros,²¹ con una concentración 8 veces mayor que nuestro estudio, reportaron actividad antiestafilocócica con halos de inhibición entre 8 y 31 mm de diámetro para diversas plantas medicinales. A su vez, *Duraipandiyar*,²² con 18 especies de plantas medicinales frente a 9 cepas bacterianas, refirió resultados similares con una concentración de 2,5 mg/disco. Por lo antes expuesto, se corrobora la efectividad medicinal (frente *S. aureus*) de los extractos de las hojas de *A. occidentale* L., utilizados en pequeñas concentraciones.

En el análisis fitoquímico del extracto clorofórmico y acetato de etilo, se destacan las cumarinas y azúcares reductores (+++). Al parecer, la actividad antiestafilocócica está relacionada con la presencia de estos metabolitos con muchas propiedades benéficas, entre ellas, antibacterianas. Las diferencias parecen estar marcadas en la mayor polaridad del acetato de etilo, lo cual permite mejor extracción y por tanto, mayor concentración de metabolitos.

En conclusión, en el extracto fluido y la tintura al 20 % de *Anacardium occidentale* se detectaron mayormente cumarinas y su calidad no se afectó durante 6 meses. Los extractos n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo mostraron actividad estafilocócica *in vitro* y se detectaron azúcares reductores y cumarinas en los dos últimos extractos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Font P. Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. Barcelona, España: Editorial Península; 1999. p. 821.
2. Soto F. Caracterización química, fitoquímica y antibacteriana *in vitro* de las hojas del *Anacardium occidentale* L. (Marañón) [Tesis en opción a Máster en Química-Biológica]. Bayamo, Granma, Cuba; 2011.
3. Martínez Y, Martínez O, Escalona A, Soto F, Valdivié M. Composición química y tamizaje fitoquímico del polvo de hojas y retoños del *Anacardium occidentale* L. (marañón). Rev Cubana Plant Med [serie en Internet]. 2012 [citado 15 Ene 2012]; 17(1): 1-9. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol17_1_12/pla01112.htm

4. Akinpelu DA. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. *Fitoterapia*. 2001;72:286-7.
5. Sokeng DS, Kamtchouing P, Watcho P, Jatsa BH, Moundipa FP, Lontsi D. Hypoglycemic activity of *Anacardium occidentale* L. Aqueous extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res*. 2001;36(2):1-9.
6. Martínez O, Montejo CE, Duverger RJ, Berlanga AJ. Tratamiento de la diarrea de los terneros con Polvo AO. *Rev Inf Vet*. 2001;6:7-16.
7. Siza S, Olmos E. Efecto del polvo de retoños y hojas de *Anacardium occidentale* L. (AO) como aditivo nutracéutico en las dietas de pollitas reemplazos ponedoras White Leghorn L-33 [Tesis presentada en opción al título de Doctor en Medicina Veterinaria Zootecnista]. Bayamo, Granma, Cuba; 2010.
8. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Medicamentos de origen vegetal: extractos y tinturas: proceso tecnológico. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP); 311. La Habana: MINSAP; 1991.
9. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Guía metodológica para la investigación en plantas medicinales. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1997.
10. NC 90-13-13. Aseguramiento Metrológico, Medidores de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH.
11. NC 90-13-11. Aseguramiento Metrológico, Refractómetros, Reglas generales para efectuar determinaciones refractométricas.
12. NC 26-63. Medicamentos, Determinación de la densidad relativa. Método de control.
13. NC 92-02. Control de la calidad. Muestreo de líquidos.
14. René MD. Tamizaje Fitoquímico, extracción fraccionada y evaluación biocida del extracto dicloro metano y metabólico de *Brosimum alicastrum* (Ramón), fruto, semilla y hojas [Tesis presentada en opción al título de Licenciado Farmacéutico]. Ciudad de Guatemala, Guatemala; 2008.
15. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y. Chemo prevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*. 2000;21:1655-60.
16. Pereira S. Estudio fitoquímico y antibacteriano de los extractos de la *Trichilia hirta* L. (Jubaban) y la *Cedrela odorata* L (Cedro) [Tesis presentada en opción al título Académico de Máster en Química Biológica]. Bayamo, Granma, Cuba; 2010.
17. Sánchez Y. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Juglans jamaicensis ssp Jamaicensis* (Nogal del País) [Tesis presentada en opción al título de Máster en Química-Biológica]. Bayamo, Granma, Cuba; 2011.
18. Bhandari DK, Nath G, Ray AB, Tewari PV. Antimicrobial activity of crude extracts from *Berberis asiatica* stem bark. *Pharmaceutical Biology*. 2000;38(4):254-7.
19. Qinghua H, Xiangfeng K, Yongqing H, Yulong Y, Fugui Y, Hejun L, et al. Effects of Chinese herbal ultra-fine powder as a dietary additive on gut microbiota in early-weaned piglets. *Standardization of Herbal/Ayurvedic Formulations*. 2008;24(3):453-65.
20. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: An Introduction*. San Francisco, USA: Editorial Benjamín Cummings; 2001. p. 88.

21. Mothana RAA, Mentel R, Reiss C, Lindequist U. Phytochemical screening and antiviral activity of some medicinal plants of the island soqotra. *Phytother Res.* 2006,20:298-302

22. Duraipandiyar V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2006; 6: 35-42.

Recibido: 21 de enero de 2012.

Aprobado: 19 de junio de 2012.

Yordan Martínez Aguilar. Universidad de Granma, AP 21. Bayamo, Granma. Cuba CP 85100. Correo electrónico: ymartineza@udg.co.cu