

Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni)

Evaluation of the antimicrobial activity of extracts from leaves and seeds of *Morinda citrifolia* L. (noni)

MSc. Aliuska Castillo Mompí,^I MSc. Yoandris M. Pascual Sanchez,^{II} Dr. C. Livio Cesar CunhaNune,^{III} MSc. Caridad de la Paz Lorente,^I MSc. Francisco Cañete Aguila^{IV}

^I Filial de Ciencias Médicas "Haydée Santamaría Cuadrado". Manzanillo, Cuba.

^{II} Centro de Estudios Producción Animal. Universidad de Granma. CEPA-UDG. Bayamo, Cuba.

^{III} Grupo de estudios sobre el uso de medicamentos. Universidad Federal de Piauí. GEUM-UFPI. Teresina, Brasil.

^{IV} Laboratorio de Microbiología. Hospital Clínico Quirúrgico "Celia Sánchez Manduley". Manzanillo, Cuba.

RESUMEN

Introducción: reportes científicos han demostrado que la *Morinda citrifolia* L (noni) presenta actividad antimicrobiana frente a un gran número de bacterias y hongos patógenos, sin embargo estos estudios reportan estas propiedades para el fruto, existiendo poca información sobre las hojas, raíces y semillas de esta planta.

Objetivos: evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos de hojas secas y semillas de *M. citrifolia* L (noni), así como identificar mediante cromatografía de capa fina los principales metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana.

Métodos: se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos alcohólicos, hexánicos, clorofórmicos y de acetato de etilo de las hojas y semillas de la *M. citrifolia* L. (noni) frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *Candida sp* por el método de Bauer-Kirby. Se identificaron mediante cromatografía de capa fina los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana en placas semi-preparativas de sílica gel, y se observaron los perfiles cromatográficos bajo la luz ultravioleta (λ = 365 nm).

Resultados: todos los extractos evaluados de las hojas y semillas de *M. citrifolia* L (noni) tuvieron actividad antimicrobiana frente a las cepas estudiadas. Los

principales metabolitos secundarios detectados fueron, en los extractos de hojas, quinonas, coumarinas y flavonoides; en las semillas, coumarinas y flavonoides respectivamente.

Conclusiones: se demostró la actividad antimicrobiana de hojas y semillas del árbol de *M. citrifolia* L (noni), siendo los metabolitos secundarios quinonas y coumarinas los responsables de ésta.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, extractos, hojas, semillas de noni.

ABSTRACT

Introduction: scientific studies have shown that *Morinda citrifolia* L. (noni) has antimicrobial activity against a large number of pathogenic bacteria and fungi. However, those studies report such activity in reference to the fruit, and there is little information about the leaves, roots and seeds of the plant.

Objectives: evaluate the antimicrobial activity *in vitro* of various extracts from dry leaves and seeds of *M. citrifolia* L. (noni) and identify by thin layer chromatography the main secondary metabolites responsible for such antimicrobial activity.

Methods: an evaluation was conducted of the antimicrobial activity *in vitro* of alcoholic, hexanic, chloroformic and ethyl acetate extracts from leaves and seeds of *M. citrifolia* L. (noni) against *E. coli*, *S. aureus* and *Candida sp.* strains using the Bauer-Kirby method. Thin layer chromatography was used to identify the metabolites responsible for antimicrobial activity on semi-preparative silica gel plates. Chromatographic profiles were observed under ultraviolet light ($\lambda=365$ nm).

Results: all the extracts evaluated of leaves and seeds of *M. citrifolia* L. (noni) had antimicrobial activity against the strains studied. The main secondary metabolites found were quinones, coumarins and flavonoids in the leaf extracts, and coumarins and flavonoids in the seed extracts.

Conclusions: it was demonstrated that leaves and seeds of the *M. citrifolia* L. tree (noni) have antimicrobial activity, and that quinones and coumarins are the secondary metabolites responsible for such activity.

Key words: antimicrobial activity, extracts, noni leaves, noni seeds.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han sido utilizados durante siglos en cada cultura del ámbito mundial. Los científicos y profesionales de la medicina han mostrado creciente interés en el campo de la medicina natural, a medida que reconocen los verdaderos beneficios que para la salud tributan estos productos.¹

Las plantas tienen una habilidad casi sin límites de sintetizar compuestos químicos, que en muchos casos le sirven como mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros. Atendiendo a ello el hombre, ha dirigido sus investigaciones a la identificación y aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado probar que un gran número de especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos y hongos patógenos para el hombre.²⁻⁵

Una de estas especies de plantas es la *Morinda citrifolia* L. (noni), árbol de la familia *Rubiaceae*. La cual es originaria de las islas de la Polinesia y que ha tenido múltiples usos desde hace más de 2 000 años hasta nuestros días. Investigaciones recientes han demostrado que el fruto del noni es el órgano de la planta más utilizado como antiinflamatorio, antiséptico, antibacteriano, antiviral; antifúngico, antitumoral, antihelmíntico, analgésico, hipotensor e inmunoestimulante.⁶ Estudios realizados en Cuba por el Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), han demostrado que el fruto presenta actividad antiinflamatoria y analgésica.⁷

Además en la bibliografía consultada se reporta que existe poca investigación científica sobre las hojas, raíces y semillas de esta planta con respecto al fruto. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos de hojas y semillas de *M. citrifolia*, así como identificar mediante cromatografía de capa fina los principales metabolitos secundarios responsables.

MÉTODOS

Para el estudio se tomaron muestras de las hojas y semillas de la *M. citrifolia* en áreas de la Empresa Agropecuaria de Manzanillo. Las cuales fueron colectadas entre las 9:00 y 10:00 am, con una temperatura promedio de 25-26 °C y una humedad relativa del 90 %. La identificación de la misma se realizó en el herbario del museo "Tomas Romay", del Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) de la provincia Santiago de Cuba, coincidiendo con el ejemplar No. 15217. Las muestras fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente por 7 días y terminado este secado previo se colocó el material en estufa (WSU 400, Alemania) con recirculación de aire a 60 °C durante una hora.

A partir de la droga cruda obtenida se prepararon las tinturas al 20 %, utilizando como menstruo una solución etanólica al 70 % (v/v) en agua destilada. La extracción se efectuó mediante maceración de la droga pulverizada en zaranda (MLW, Alemania) a 60 rpm durante 15 min a intervalos de 10 h, por un tiempo de 7 días, según la norma ramal de Salud Pública 312 y 313. Los extractos secos de las hojas y semillas de *M. citrifolia* fueron obtenidos a partir de las tinturas al 20 %, concentrando 200 mL de la muestra a 50 °C con ayuda de un roto-evaporador (IKA, RV05 basic, Alemania).

Extracción de compuestos orgánicos bioactivos

Con el objetivo de separar los compuestos orgánicos responsables de la actividad antibacteriana procedentes de las diferentes partes de las plantas evaluadas, se procedió a su extracción en solventes inmiscibles de polaridad creciente (n-hexano, cloroformo y acetato de etilo) mediante una extracción sucesiva sólido-líquido, posteriormente se efectuó la evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas y la selección de la fracción promisorias, así como la identificación de la familia química a la que pertenece mediante tamizaje fitoquímico. Además se comprobó la pureza de las fracciones promisorias por Cromatografía en Capa Fina (CCF) para lo que se emplearon placas semi-preparativas de sílica gel, observando los perfiles cromatográficos bajo la luz ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$).⁸⁻¹⁰

Se emplearon los siguientes sistemas de solventes como fase móvil:

- A. Éter de petróleo: acetato de etilo (5:1).
- B. Tolueno: acetato de etilo. (1:9).
- C. Cloroformo: hexano. (2:1).
- D. Xileno: metanol (1:1)
- E. Cloroformo: metanol (1: 1).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para los test microbiológicos se utilizaron cepas de referencia de *Escherichia coli* (ATCC 113-3) y *Staphylococcus aureus* (ATCC29737) y 3 cepas salvajes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida sp.*, aisladas en el laboratorio de microbiología del Hospital Clínico Quirúrgico "Celia Sánchez Manduley" de Manzanillo, provincia Granma.

Se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer - Kirby*). Evaluándose las dos tinturas al 20 %, los dos extractos secos obtenidos a partir de las tinturas y las seis fracciones de la extracción con solventes inmiscibles de polaridad creciente. Para ello se resuspendieron 100 mg de los extractos secos obtenidos a partir de las tinturas al 20 % y los extractos secos obtenidos de las extracciones sucesivas en 1 mL de dimetilformamida para una concentración final de 100 mg/mL. De las soluciones obtenidas se aplicaron 6 µl en discos de papel de filtro de 7 mm de diámetro para una concentración final de 6 mg/disco de extracto y para el caso de las tinturas se embebieron los discos de papel de filtro. La lectura de las placas se efectuó a las 24 y 48 h de incubación para las bacterias y el hongo respectivamente, se midió en milímetro la zona de crecimiento del microorganismo en 5 direcciones, tomando como resultado el valor promedio de estas mediciones.

Para el análisis estadístico se empleó un Anova de clasificación simple en la comparación de varias muestras por el test de Fisher, en los casos en que hubo diferencias estadísticamente significativas para un valor de $p < 0,05$ se realizó un test de rangos múltiples para determinar las medias que diferían.

RESULTADOS

La evaluación de la actividad antimicrobiana de todas las tinturas al 20 % y los extractos secos correspondientes mostraron que para las hojas el mayor halo de inhibición fue de 9-10 mm registrado en el extracto seco frente las cepas de *E. coli* salvaje y ATCC. En el caso de las semillas el mejor resultado fue de 7 mm para el extracto seco con la cepa control, mientras que para *S. aureus* salvaje y control los mejores resultados se observaron en las hojas con el extracto seco. Frente a la *Candida sp* los halos de inhibición de las semillas fueron de 13 mm para la tintura y de 12 mm para el extracto seco ([tabla 1](#)). Además no se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las tinturas y los extractos secos de hojas y semillas de *M. citrifolia* evaluados frente a los microorganismos. Evidenciándose una mejor respuesta de los extractos secos frente a las bacterias y hongos.

La actividad antibacteriana y antifúngica de las fracciones hexánicas, clorofórmicas y de acetato de etilo se muestran en la [tabla 2](#). Los mejores resultados en las hojas se observaron con el solvente hexánico con la cepa de *E. coli* salvaje mostrando un halo de inhibición de 9 mm, mientras que con la cepa de referencia de esta misma

especie bacteriana los tres extractos crearon halos de inhibición entre 7 y 8 mm. Con la cepa de *S. aureus* salvaje los halos de inhibición se observaron con los extractos hexánicos y clorofórmicos oscilando entre 9 y 10 mm, sin embargo con la cepa de referencia los halos fueron con los tres extractos entre 7 y 8 mm. Para *Candida sp* la acción antifúngica solamente se observó con el extracto hexánico mostrándose un halo de 10 mm.

Tabla 1. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de la tintura (20 %) y el extracto seco de las hojas y semillas de la *M. citrifolia* L (noni)

Microorganismo	Partes	Halos de inhibición (mm)			ES± Sig.
		Control Positivo	Tintura	Extracto seco	
<i>E. coli</i> (ATCC)	Semilla	30,6 ^a	0 ^c	7 ^b	0,44 ^{**}
	Hoja	30,6 ^a	10 ^b	9 ^b	1,44 ^{**}
<i>E. coli</i> (Salvaje)	Semilla	15,7 ^a	3 ^b	2 ^b	1,11 ^{**}
	Hoja	19,3 ^a	9 ^b	10 ^b	1,44 ^{**}
<i>S. aureus</i> (ATCC)	Semilla	31,6 ^a	0 ^b	0 ^b	0,11 ^{**}
	Hoja	31,7 ^a	11 ^b	12 ^b	1,44 ^{**}
<i>S. aureus</i> (Salvaje)	Semilla	19 ^a	7 ^c	9 ^b	1,00 ^{**}
	Hoja	20 ^a	7 ^b	8 ^b	1,33 ^{**}
<i>Candida sp</i>	Semilla	30,6 ^a	13 ^b	12 ^b	1,44 ^{**}
	Hoja	29 ^a	2 ^b	3 ^b	1,33 ^{**}

^{a, b, c.} Medias con letras diferentes en la misma fila difieren para $p < 0,05$ (Fisher, 1955)
^{*} $p < 0,05$, ^{**} $p < 0,01$. Control positivo: Ciprofloxacina (CIP) para las bacterias y Fluconazol (FLU) para el hongo, Control negativo: etanol 70 % y Dimetilformamida.

Mientras que para la semilla con el extracto de acetato de etilo se obtuvo el mejor resultado con la cepa de *E. coli* salvaje que fue de 9 mm, mientras que con la cepa de referencia los extractos clorofórmico y de acetato de etilo mostraron actividad con halos entre 7 y 8 mm. Los mejores resultados de actividad antibacteriana frente a *S. aureus* salvaje se observaron con halos de inhibición entre 7 y 10 mm sin embargo con la cepa de referencia solamente mostró actividad con el extracto hexánico con un halo de 9 mm. En cuanto a la actividad antifúngica con *Candida sp* de las semillas se puede plantear que con los tres extractos se formaron halos de inhibición que oscilaron entre los 8 y 12 mm.

En la [tabla 3](#) se muestra el tamizaje fitoquímico de los extractos hexánicos, clorofórmicos y de acetato de etilo de las hojas y semillas de *M. citrifolia*, encontrando que el metabolito mayoritario en las tres fracciones evaluadas fueron las cumarinas, la cual está presente tanto en las hojas como en las semillas. Además se detectó la presencia de flavonoides en la fracción hexánica y de acetato de etilo de las hojas y en las tres fracciones de las semillas. Y se pudo comprobar la existencia de quinonas en todas las fracciones evaluadas de las hojas y en la fracción clorofórmica de las semillas.

Tabla 2. Actividad antibacteriana y antifúngica de las fracciones de extracción sólido-líquido de las hojas y semillas de *M. citrifolia*

Microorganismo	Parte	Halos de inhibición (mm)				EE± Sig.
		Control	n-hexano	Cloroformo	Ac. Etilo	
<i>E. coli (Salvaje)</i>	Semilla	19 ^a	7 ^b	8 ^b	9 ^b	1,25**
	Hoja	18 ^a	9 ^b	0 ^c	0 ^c	0,33**
<i>E. coli (ATCC)</i>	Semilla	30,3 ^a	0 ^c	7 ^b	8,33 ^b	0,36**
	Hoja	30,3 ^a	8 ^b	7 ^b	8 ^b	1,00**
<i>S. auerus (Salvaje)</i>	Semilla	18 ^a	7 ^b	8 ^b	9 ^b	1,33**
	Hoja	18 ^a	10 ^b	9 ^b	0 ^c	0,33**
<i>S. auerus (ATCC)</i>	Semilla	31,6 ^a	9,33 ^b	0 ^c	0 ^c	0,14**
	Hoja	31,6 ^a	8 ^b	8 ^b	7 ^b	0,31**
<i>Candidasp</i>	Semilla	29,6 ^a	8 ^c	12 ^b	9 ^c	0,58**
	Hoja	30 ^a	10 ^b	0 ^c	0 ^c	0,66**

^{a, b, c.} Medias con letras diferentes en la misma fila difieren para $p < 0,05$ (Fisher, 1955)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Control positivo: Ciprofloxacina (CIP) para las bacterias y Fluconazol (FLU) para el hongo, Control negativo: etanol 70 % y Dimetilformamida.

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de los extractos hexánicos, clorofórmicos y de acetato de etilo de las hojas y semilla de la *M. citrifolia*

Ensayos (metabolitos)	Hojas			Semillas		
	n-Hexano	Cloroformo	Ac. Etilo	n-hexano	Cloroformo	Ac. Etilo
Mayer (alcaloides)	-	-	-	-	-	-
Wagner (alcaloides)	-	-	-	-	-	-
Baljet (coumarinas)	++	++	++	++	++	++
Shinoda (flavonoides)	+	-	+	+	+	+
FeCl ₃ (fenoles/taninos)	-	-	-	-	-	-
Borntrager (quinonas)	+	++	+	-	+	-

(-) ausencia, (+) presencia, (++) abundante.

Al efectuar el análisis cromatográfico (Fig.) para comprobar la pureza de las fracciones promisorias con actividad antibacteriana y antifúngica, mostró para la fracción n-hexano de las hojas la presencia de metabolitos al observar en la placa con luz UV a 365 nm sin revelador químico cuatro manchas en las hojas, dos de color rosado indicativo de la presencias de quinonas y dos amarilla (coumarinas y flavonoides). En el caso del extracto de la semilla se observó una mancha amarilla lo que indica la presencia de coumarinas y flavonoides. Para los extractos clorofórmicos se observan tres manchas para las hojas, dos de color rosado que indica la presencia de quinonas, una rojo (quinonas y coumarinas) y para la semilla una mancha amarilla que indica quinonas, coumarinas y flavonoides. En la fracción de acetato de etilo se muestran dos manchas en la hoja, una de color rosado, que indica la presencia de quinonas, una de color amarillo (coumarinas y flavonoides) y en la semilla una mancha de color amarillo (coumarinas y flavonoides).

n-Hexano Cloroformo A. Etilo



Fig. Cromatogramas de los fracciones n-hexano, cloroformo y acetato de etilo de las hojas y semillas de *M. citrifolia*.

DISCUSIÓN

En estudios efectuados a diferentes extractos del fruto y raíz de *M. citrifolia* se aislaron numerosos compuestos químicos como las quinonas y los fenoles los cuales han demostrado su actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgaii*, *Staphylococcus aureus*, *Baciillis subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigela*. Estos elementos antibacterianos pueden ser los responsables de los beneficios observados en el tratamiento de infecciones dermatológicas, gripes y otras.¹¹ Además se ha reportado que la *M. citrifolia* es utilizada tradicionalmente para tratar, heridas profundas, contusiones y ampollas. Los extractos del fruto maduro han mostrado en numerosas investigaciones actividad antibacteriana moderada frente a *P. aeruginosa*, *E. Coli*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella schottmuelleri* y *Shigella paradys*.¹²

Los resultados obtenidos para las hojas y semillas de *M. citrifolia* coinciden con lo expuesto por Ponce y col.,¹³ que plantea que los microorganismos son sensibles frente a un extracto natural cuando las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano se encuentran entre 9 y 14 mm. Estudios efectuados por Abdul y col.¹⁴ en extractos metanolitos de tallos, hojas y frutos de *M. citrifolia*, muestran halos similares a los registrados en esta investigación frente a las cepas de *E. coli*, *S.*

aureus y *Cándida*, además este mismo autor reportó inhibición para unas 12 bacterias gran positivas, 12 bacterias gran negativas y 13 hongos.

Al comparar los resultados por el método de separación cromatográfico y el tamizaje fitoquímico, se pudo comprobar que los metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana en los extractos de las hojas son: quinonas, coumarinas y flavonoides y en las semillas las coumarinas y flavonoides. Sus actividades se deben a su capacidad de actuar como inhibidores potentes de la cadena de transporte electrónico, como desacopladores de la fosforilación oxidativa, como agentes intercaladores en la hélice doble del ADN, como agentes de alquilación reductiva de biomoléculas, y como productores de radicales libres de oxígeno (por ciclo redox) bajo condiciones aeróbicas.^{15,16} Por lo que podemos concluir que la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas y semillas de *M. citrifolia* se debe a la presencia de quinonas y coumarinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang MY, Brett W, Jensen J, Diane N, Palu CH, *et al.* *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23(12):1127-1141.
2. Wallace RJ. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc Nutr Soc.* 2004;63(4):621-9.
3. Thuille N, Fille M, Nagl M. Bactericidal activity of herbal extracts. *Journal Hyg Environ Health.* 2003;206(3):217-21.
4. Singh G, Kapoor IP, Pandey SK, Singh UK, Singh RK. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytother Res.* 2002;16(7):680-2.
5. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000;97(4):1433-7.
6. García CM, Kim BN, Bich TN, Tillan CJ, Romero DJA, Darío LO, *et al.* Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnate* L., *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2009;14(2):14-20.
7. Morón FJ, Morón D. Mito y realidad de *Morinda citrifolia* L. (noni). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2004;9(3). [citado 20 de julio 2013]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962004000300002
8. Lenis LA, Benítez R, Peña E, Chito DM. Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. *Scientia et technia.* 2007;13(33):97-102.
9. Tené MD. Tamizaje fitoquímico, extracción fraccionada y evaluación biocida del extracto dicloro metano y metanólico de *Brosimum ali castrum swartz* (Ramón), fruto, semilla y hojas. [Tesis en opción al título de farmacéutico]. Facultad de ciencias químicas. 2008.

10. Córdor E, De Oliveira BH, Loaysa K, Reyna V. Estudio químico de los tallos de *Chinchona cubensens* Vahl. Rev Soc Química Perú. 2009;75(1):54-63.
11. Selvam P, Raj K, Harikrishnan R, Sarijan KS, Umalekshmi R. Antimicrobial activity of *Morinda citrifolia*. J Chem Sci. 2009;7(2):1133-1135.
12. Ramesh S, Harikrishnan R, Anburaj R, Mathavan E, Patharajam S. Physicochemical, phytochemical and antimicrobial studies on *Morinda citrifolia* L. fruits at different maturity stages. Int J Pharm Sci. 2012;4(Sup 5):473-476.
13. Ponce A, Roura S, Del valle C, Moreira M. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies. Postharvest Biology and Technology. 2008;49(2):294-300.
14. Abdul F. Studies on the chemical constituents of various parts of *Morinda citrifolia* L (noni). [Thesis submitted for the fulfillment of degree of doctor of philosophy in chemistry]. University of Karachi. Karachi, Pakistan. 2006. 187p.
15. Duran M, Gaitán R, Olivero JT. Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides. Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud. 2013;24(4).416-430.
16. Rodríguez EGR, Méndez D, Martelo J, Zambrano R. Análogos de quinonas naturales con actividad antibacteriana. Scien Techn. 2007;13(33):281-3.

Recibido: 13 de septiembre de 2013.

Aprobado: 14 de agosto de 2014.

MSc. *Aliuska Castillo Mompíe*. Filial de Ciencias Médicas "Haydee Santamaría Cuadrado". Manzanillo, Cuba. Correo Electrónico. alicastillo@ftec.grm.sld.cu