



Química Viva

E-ISSN: 1666-7948

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Argentina

Bullaín Galardis, Mijail Mijares; Santana Machado, Dania; Corría Sánchez, Willian
Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *Colubrina*
arborescens (Mill.) Sarg.

Química Viva, vol. 16, núm. 2, agosto, 2017, pp. 31-40

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86352507005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *Colubrina arborescens* (Mill.) Sarg.

Mijail Mijares Bullaín Galardis ¹, Dania Santana Machado ², Willian Corría Sánchez ³

¹ Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. ² Laboratorio Municipal de Medicina Verde del Ministerio de Educación. Manzanillo. ³ Departamento de Biología-Geografía. Facultad de Ciencias Informáticas, Naturales y Exactas. Universidad de Granma Granma Cuba.

mbullaing@udg.co.cu

Recibido 30/05/2017 - Aceptado 04/08/2017

Resumen

Colubrina arborescens (Mill.) Sarg. se emplea tradicionalmente para tratar varias enfermedades, como antiséptico, antipirético, antihipertensivo, antirreumático y diurético. Los extractos se obtuvieron de las hojas mediante la extracción asistida por ultrasonido. La actividad antimicrobiana de los extractos se evaluó frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, con el empleo del método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby. La concentración inhibitoria mínima del crecimiento microbiano se evaluó mediante el método de microdilución en caldo. El extracto acuoso mostró actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* a 1240 µg/disco y su concentración inhibitoria mínima fue de 1708,3 µg/mL. El extracto etanólico mostró actividad frente a *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* a 1240 µg/disco y la concentración inhibitoria mínima fue de 427,0 y 854,1

µg/mL respectivamente. El tamizaje fitoquímico realizado a los extractos con actividad antimicrobiana indicó la presencia de varias familias de metabolitos secundarios, alcaloides, aminoácidos libres, antocianidinas, azúcares reductores, coumarinas, esteroides, fenoles, saponinas y taninos.

Palabras clave: *Colubrina arborescens*, actividad antimicrobiana, concentración inhibitoria mínima, tamizaje fitoquímico.

Summary

Colubrina arborescens (Mill.) Sarg. is traditionally used to treat various diseases, such as antiseptic, antipyretic, antihypertensive, antirheumatic and diuretic. The extracts were obtained from the leaves by ultrasonic assisted extraction. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Basillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* using the Bauer-Kirby disc diffusion agar method. The minimal inhibitory concentration of bacterial growth was evaluated by the broth microdilution method. The aqueous extract showed activity against *Pseudomonas aeruginosa* at 1240 µg/disk and the minimum inhibitory concentration was 1708.3 µg/mL. The ethanolic extract showed activity against *Candida*

albicans and *Saccharomyces cerevisiae* at 1240 µg/disc and the minimum inhibitory concentration was

427.0 and 854.1 µg/mL, respectively. Phytochemical screening of extracts with antimicrobial activity indicated the presence of several families of secondary metabolites, alkaloids, free amino acids, anthocyanidins, reducing sugars, coumarins, sterols, phenols, saponins and tannins.

Key words: *Colubrina arborescens*, antimicrobial activity, minimal inhibitory concentration, phytochemical screening.

Introducción

Los antibióticos han salvado millones de vidas, y además han supuesto una revolución en la medicina. Sin embargo, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana a los antibióticos [1].

El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es motivo de gran preocupación ya que dificulta el enfoque terapéutico de los pacientes infectados [2].

La resistencia a los antibióticos en patógenos bacterianos humanos existía antes del uso de estos fármacos por el hombre y su prevalencia era baja. Los estudios realizados con bacterias obtenidas en los años previos al descubrimiento de los antibióticos o con bacterias de poblaciones humanas que no habían tenido acceso a ellos lo demuestran. Desde el uso masivo de los antibióticos se ha constatado a nivel mundial un aumento muy importante de la prevalencia de la resistencia.

Las plantas, gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico, del cual sólo se conoce con éxito un tercio, considerando la variedad de especies existentes a nivel mundial y aquellas inexploradas hasta hoy, sin considerar aquellas especies ya extintas [3].

El archipiélago cubano posee la flora más diversa de la región caribeña, comprende 195 familias, 1210 géneros. El rasgo más distintivo de la flora cubana es el endemismo, manifestado en el 53 % [4].

Colubrina arborescens (Mill.) Sarg. es un árbol perteneciente a las ramnáceas, estas constituyen una gran familia que comprende 58 géneros y casi 900 especies [5]. El género *Colubrina* cuenta con aproximadamente 30 especies, de hábito arbóreo o arbustivo, con distribución principalmente en América, aunque también en Asia y Australia [6].

Esta planta se conoce vulgarmente con varios nombres, los más empleados son: bijáguara, birijagua (Cuba); quitarán (Puerto Rico); corazón de paloma (República Dominicana); cascalata (México); costex (Guatemala); chaquirio, chaquira (El Salvador); coffee colubrina, nakedwood (Estados Unidos); bitters (Bahamas); green heart, mountain ebony (Jamaica); bois de fer, bois mabi (Haití) [7].

Esta planta se utiliza de forma tradicional y empírica como antiséptico, antipirético, antirreumático, diurético y en baños como antipsoriático [8-10].

En las fuentes consultadas no se han encontrado hasta el momento reportes del uso de los

extractos de esta especie como antibacteriano, por ello, es posible que algunas cepas no hayan desarrollado mecanismos de defensa contra estos, lo que les permitiría inhibir su crecimiento [11].

Materiales y métodos

Colecta, identificación y selección del material vegetal

El material vegetal se colectó el 18 de junio de 2016 en Peralejo, comunidad perteneciente al Consejo Popular Entronque de Bueycito del municipio Bayamo, provincia Granma, Cuba (coordenadas 20°17'9.132" N -76°43'39" E) a las 8:10 am., a una temperatura de 25,4 °C con una humedad relativa del 73 %. Muestras y fotografías de la planta se trasladaron al Jardín Botánico Cupaynicú, en el municipio Guisa, provincia Granma, Cuba, donde el Dr. C. Luis Catasús Guerra identificó la planta, la cual se encuentra registrada con el número 195 de la Serie Catasús en el herbario del Jardín Botánico Cupaynicú [12].

Las hojas se clasificaron y se desecharon las que no reunían las condiciones para realizar la investigación, según la NRSP 309 del MINSAP [13]. Luego se desinfectaron mediante el lavado con agua potable y la inmersión durante 10 min en una disolución de hipoclorito de sodio al 2 % [14].

Las hojas se secaron a la sombra, en bandejas de plástico a temperatura ambiente, se removieron tres veces al día durante una semana, su secado se completó en una estufa de calor y secado (Binder modelo ED 23, Alemania) a 40 °C durante 3 horas. Se pulverizó en un molino fino (IKA, modelo MF 10 Basic, Alemania) hasta obtener un tamaño de partícula de un diámetro inferior a 1 mm.

Obtención de los extractos

Los solventes empleados para la extracción fueron el diclorometano, cloroformo, solución hidroetanólica al 70 % (v/v) y agua.

Se utilizaron cuatro balones de destilación, a cada uno se le agregaron 50 g de los polvos (con un tamaño de partícula inferior a 1 mm de diámetro) de hojas, para un total de 200 g de la droga cruda. Los

50 g de material vegetal contenidos en cada balón se humectaron con un solvente diferente. Posteriormente se adicionaron a cada balón 250 mL del mismo solvente empleado para humectar el material vegetal.

Como resultado de la extracción se obtuvieron cuatro extractos, diclorometánico, clorofórmico, etanólico y acuoso.

El método de extracción aplicado fue la extracción asistida por ultrasonido (Ultrasonic Cleaner SB-3200 DTD, China) a una temperatura de 40 °C, frecuencia de 40 KHz durante dos horas [15,16].

Los cuatro extractos obtenidos se filtraron a presión reducida y se almacenaron en recipientes de color ámbar, se dejaron en reposo durante 72 horas a una temperatura entre 4 y 8 °C.

Transcurrido el tiempo de reposo se observó en cada uno de ellos la formación de un precipitado, por lo que se filtraron nuevamente.

Obtención de los extractos secos

Los cuatro extractos se llevaron a sequedad por rotoevaporación a 40 °C, a una velocidad de rotación de 60 rpm. Se utilizó un rotoevaporador (IKA, RV05 Basic, Alemania) conectado a un baño con termostato (IKA, HB4, Werke, Alemania), un recirculador de agua para condensación (MLW, Alemania) y una bomba de vacío (VEM KMR 53 K4 FTH, Alemania).

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de C. arborescens.

Se utilizó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby [17], adoptado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antes NCCLS) [18], con algunas modificaciones.

Los inóculos se prepararon a partir de colonias crecidas durante 24 h y se ajustaron equivalentemente al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Se realizó la siembra sobre el agar Mueller-Hinton (BioCen, Cuba, lote: 2500005) (pH $7,3 \pm 0,2$) con hisopos estériles. De cada uno de los extractos se elaboró una disolución stock a 248 mg/mL, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente. Se adicionaron 5 µL de esta disolución a discos de papel de filtro (Whatman, Inglaterra) de 6 mm de diámetro previamente esterilizados, quedando aproximadamente 1240 µg/disco. Finalmente, las placas de Petri se incubaron a $37 \pm 0,1$ °C durante 24 horas en una incubadora (Boxun BG-80, China). Las zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de los discos se midieron en milímetros.

Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Se utilizaron como controles negativos, discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro cargados con 5 µL de DMSO; y como controles positivos, discos de los antibióticos comerciales Gentamicina, Ciprofloxacina y Amoxicilina de 30, 5 y 30 µg/disco, respectivamente (Sensi-Disc™, Francia). Los resultados se declararon como el promedio del diámetro de los halos de inhibición para cada tratamiento.

Bacterias evaluadas

Se utilizaron bacterias pertenecientes a cinco géneros bacterianos, dos de referencia internacional, depositadas en el *American Type Culture Collection* (ATCC) y tres salvajes aisladas en el Centro de Higiene y Epidemiología del municipio Manzanillo, provincia Granma.

- *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)
- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633)
- *Escherichia coli* (salvaje)
- *Pseudomonas aeruginosa* (salvaje)
- *Staphylococcus aureus* (salvaje)

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de C. arborescens.

Se realizó con el empleo de un método similar al de la determinación de la actividad antibacteriana [17- 19], frente a las levaduras *Candida albicans* (salvaje), aislada en el Centro de Higiene y Epidemiología del municipio Manzanillo, provincia Granma, Cuba y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763). La siembra e inoculación de *Candida albicans* se realizó en agar Mueller-Hinton (BioCen, Cuba, lote: 2500005) (pH 7,3 $\pm$ 0,2) suplementado con 2 % de glucosa y 0,5 μ g/mL de azul de metileno, mientras que la siembra e inoculación de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó en agar dextrosa Sabouraud (BioCen, Cuba, lote: 3500004) (pH 5,6 $\pm$ 0,2).

El período de incubación luego de la inoculación fue de 48 horas a 29 $\pm$ 1 °C. Se utilizaron como controles negativos, discos de papel de filtro (Whatman, Inglaterra) de 6 mm de diámetro cargados con 5 μ L de DMSO; y como control positivo, discos del antifúngico Fluconazol de 30 μ g/disco (Sensi-DiscTM, Francia).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

La determinación de la concentración inhibitoria mínima se realizó mediante el método de microdilución en caldo [20,21].

Se elaboraron cuatro soluciones *stock* disolviendo 82 mg de cada extracto seco en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para una concentración final de 41 mg/mL. Se obtuvieron cuatro soluciones de trabajo mediante una dilución 1/3 para una concentración final de 13,6 mg/mL.

Los inóculos se prepararon a partir de colonias crecidas durante 24 h y se ajustaron equivalentemente al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración de aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/mL.

En los pocillos de las placas de cultivo de 96 pocillos (Corning) se añadieron 100 μ L de Caldo Mueller- Hinton (BioCen, Cuba, lote: 350C001) (pH 7,3 $\pm$ 0,2). En el primer pocillo se mezclaron 100 μ L de la solución de trabajo y se realizaron diluciones seriadas dobles hasta la hilera 10. Se agregaron 100 μ L del inóculo a cada pocillo con la excepción del último pocillo que constituyó el control de esterilidad. De esta forma, se obtuvo un rango de concentración de los extractos entre 3416,7 – 6,6 (μ g/mL), un control de crecimiento y un control de esterilidad.

Las placas se incubaron a 37 $\pm$ 0,1°C por un período de 24 horas en una incubadora (Boxun BG-80, China). La concentración inhibitoria mínima se determinó como la concentración mínima del extracto que inhibió completamente el crecimiento bacteriano a simple vista. El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las bacterias y extractos evaluados. Para las levaduras se procedió de forma similar utilizando el RPMI-1640 como medio de cultivo, incubando las placas a 29 $\pm$ 1 °C durante 48 horas.

Tamizaje fitoquímico

Para detectar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos con actividad antimicrobiana se realizó un tamizaje fitoquímico, el método utilizado fue el establecido por Rondina y Coussio, con modificaciones [22]. Los ensayos realizados fueron los específicos para detectar los grupos de metabolitos secundarios teniendo en cuenta el solvente empleado en su extracción.

Resultados

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de las hojas de

C. arborescens, a 1240 µg/disco (Tabla I), muestran que sólo el extracto acuoso mostró actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla I. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *C. arborescens*.

Sustancias a evaluar	Halos de inhibición (mm) frente a cepas bacterianas				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
	(Salvaje)	(ATCC 6633)	(Salvaje)	(Salvaje)	(ATCC 14028)
	Gram-positiva	Gram-positiva	Gram-negativa	Gram-negativa	Gram-negativa
	($\bar{x} \pm DS$)	($\bar{x} \pm DS$)	($\bar{x} \pm DS$)	($\bar{x} \pm DS$)	($\bar{x} \pm DS$)
diclorometánico	-	-	-	-	-
clorofórmico	-	-	-	-	-
etanólico	-	-	-	-	-
Acuoso	-	-	9,3±0,6	-	-
gentamicina	19,3±0,6	-	18,0±1,0	22,3±0,6	18,3±0,6
ciprofloxacina	21,3±0,6	16,3±0,6	29,0±0,0	32,7±0,6	19,0±1,0
amoxicilina	28,0±0,0	18,3±0,6	-	20,7±0,6	17,3±0,6
DMSO	-	-	-	-	-

(-): Resultado negativo en la inhibición del crecimiento bacteriano; DMSO: dimetilsulfóxido.

El dimetilsulfóxido, empleado como control negativo, no inhibió el crecimiento de las cepas empleadas, lo que demuestra que al emplearlo como solvente en la obtención de las disoluciones *stock* no alteró los resultados obtenidos.

El comportamiento de los antibióticos comerciales empleados como control positivo frente a cada una de las cepas bacterianas evaluadas fue el esperado, pues estas manifestaron la sensibilidad y resistencia previstas, lo que indica que las condiciones en las que se desarrolló el ensayo fueron adecuadas.

La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas (Tabla II) muestran que el extracto etanólico, a 1240 µg/disco, inhibió el crecimiento de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla II. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de las hojas de *C. arborescens*.

Sustancias a evaluar	Halos de inhibición (mm) frente a levaduras	
	<i>Candida albicans</i> (Salvaje)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)
	($\bar{x} \pm DS$)	($\bar{x} \pm DS$)
diclorometánico	-	-
clorofórmico	-	-
etanólico	10,7 $\pm$ 0,6	9,6 $\pm$ 0,5
acuoso	-	-
fluconazol	19,3 $\pm$ 0,5	21,6 $\pm$ 0,5
DMSO	-	-

(-): Resultado negativo en la inhibición del crecimiento; DMSO: dimetilsulfóxido.

El dimetilsulfóxido no inhibió el crecimiento de las cepas empleadas, por lo que se infiere que no alteró los resultados al emplearlo como solvente en la elaboración de las soluciones *stock*. El fluconazol, utilizado como control positivo, inhibió el crecimiento de ambos microorganismos. La concentración inhibitoria mínima del extracto acuoso de hojas de *C. arborescens* frente a *Pseudomonas aeruginosa* fue de 1708,3 μ g/mL, mientras que las del extracto etanólico frente a *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron de 427,0 y 854,1 μ g/mL respectivamente (Tabla III).

Tabla 3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los extractos de las hojas de *C. arborescens*.

Extractos a evaluar	Concentración inhibitoria mínima (μ g/mL)		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Salvaje)	<i>Candida albicans</i> (Salvaje)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)
etanólico	ND	427,0	854,1
acuoso	1708,3	ND	ND

ND: No determinado.

El tamizaje fitoquímico realizado a los extractos acuoso y etanólico, permitió detectar varios grupos de metabolitos secundarios, alcaloides, aminoácidos libres, antocianidinas, azúcares reductores, coumarinas, esteroides, fenoles, saponinas y taninos (Tabla IV).

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico realizado a los extractos acuoso y etanólico de hojas de *C. arborescens*.

Metabolitos	Hojas	
	Ac	Et
Alcaloides	+	++
Aminoácidos libres	nd	+
Antocianinas	nd	+
Azúcares reductores	+	+
Coumarinas	nd	+
Esteroles	nd	+
Fenoles	++	-
Flavonoides	-	-
Mucílagos	-	nd
Principios amargos	-	nd
Quinonas	nd	-
Resinas	nd	-
Saponinas	++	++
Taninos	-	+
Triterpenos	nd	-

Ac: Extracto acuoso; Et: Extracto etanólico; (-): Ausente; (+): Presente; (++) : Abundante; (en blanco): No se realizó el ensayo.

Discusión

Según los resultados del tamizaje fitoquímico, la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acuoso las hojas de *C. arborescens* pudo estar determinada por la presencia de alcaloides, azúcares reductores, antocianinas, coumarinas, esteroides, fenoles, saponinas y taninos, a los cuales se les atribuye actividad antimicrobiana [23-27].

La presencia de alcaloides y saponinas en los extractos acuoso y etanólico de *C. arborescens* también fue reportada por Dominici y col (1995) [28], por lo que se infiere que la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* podría estar determinada por la presencia en ambos extractos de estos dos grupos de metabolitos secundarios con acción antimicrobiana [23-25].

Rodríguez y col (2010) [29] constataron la presencia de azúcares reductores, flavonoides y quinonas en el extracto acuoso. Constataron también en el extracto etanólico alcaloides, antocianinas, azúcares reductores, coumarinas, esteroides, saponinas, flavonoides y quinonas, grupos químicos con acción antimicrobiana [23-27].

En las fuentes consultadas, no se ha encontrado información sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de *C. arborescens*, no obstante, otras investigaciones han aportado información sobre la actividad antimicrobiana de otras especies representantes del género *Colubrina* y de la familia Rhamnaceae.

Tal es el caso de Nivas y col (2015) quienes reportaron la actividad antibacteriana del extracto acuoso de hojas de *Colubrina asiatica* (L.) Brong. frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a 250 µg/disco; esto pudo estar determinado por la presencia de compuestos fenólicos en este extracto [30], a los cuales se les atribuye actividad antimicrobiana [23,24].

Según Ekuadzi y col (2012) el extracto etanólico del tallo de *Gouania longipetala* Hemsl. inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 5 mg/ml, lo cual pudo estar relacionado con la presencia en este extracto de compuestos fenólicos, saponinas, esteroides y azúcares reductores [31], grupos de metabolitos secundarios a los que se le atribuye actividad antimicrobiana [23-25]. Las diferencias entre los resultados de esta investigación y los obtenidos por otros autores podrían estar determinadas por varios factores, por ejemplo, el hecho de pertenecer a diferentes especies y géneros dentro de una misma familia, el lugar, el momento de recolección del material vegetal, el órgano de la planta utilizado, el empleo del material vegetal fresco o seco, el método de extracción, el método, el medio de cultivo, la concentración de los extractos y la cepa microbiana utilizados para realizar las pruebas de sensibilidad [11,32]. Todos estos resultados remarcan el potencial de *C. arborescens* en este campo de la investigación, el cual debe ser profundizado.

Referencias

- [1] **Alós, JI** (2015) Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33: 692–699. DOI: 10.1016/j.eimc.2014.10.004
- [2] **Organización Mundial de la Salud** (2001) Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud: 99.
- [3] **Avello M, Cisternas I** (2010) Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile* 138: 1288-1293. DOI: 10.4067/S0034-98872010001100014
- [4] **Berazaín R, Gutiérrez J** (2016) Tesoros verdes: diversidad y endemismo de plantas en Cuba. *Islas del Tesoro verde. Descubrimientos botánicos en el Caribe*. Berlín: Botanic Garden & Botanical Museum.
- [5] **Ahmad W, Muhammad N, Khan H, Rauf S** (2014) Pharmacological and Phytochemical Studies of Genus *Zizyphus*. *Middle-East Journal of Scientific Research* 21: 1243-1263. DOI: 10.5829/idosi.mejsr.2014.21.08.21099
- [6] **Johnston M** (1971). Revision of *Colubrina* (Rhamnaceae). *Brittonia* 23: 2-53. DOI: 10.2307/2805841
- [7] **Little EL, Wadsworth F, Marrero J** (1977) Árboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes
- [8] <http://www.naturalmedicinefacts.info/plant/colubrina-arborescens.html/>, accesado 19/10/2016
- [9] <http://www.prota4u.org/protav8.asp?en=1&p=Colubrina+arborescens/>, accesado 19/10/2016
- [10] **Beyra A, León M C, Iglesias E, Ferrándiz D, Herrera R, Volpato G, Godínez D, Guimaraes M, Álvarez R** (2004) Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 185-204. doi:10.3989/ajbm.2004.v61.i2.44
- [11] **Bullaín MM, Tamayo Y, Avilés Y, Guardia Yans** (2015) Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones hexánica, diclorometánica, clorofórmica y etanólica de las hojas de *Faramea occidentalis* (L.) A. Rich. *QuímicaViva* 14: 71-80.
- [12] **Regalado L, Ventosa I, Morejón R** (2008) Revisión histórica de los herbarios cubanos con énfasis en las series de especímenes. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 29: 101-138.
- [13] Norma Ramal de Salud Pública 309 (1992) Medicamentos de origen vegetal: droga cruda. Métodos de ensayos. La Habana Cuba.
- [14] **Carballo C** (2005) Desinfección química de *Pedilanthustithy maloides* (L.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2: 45-49.
- [15] <http://www.buenastareas.com/ensayos/Extracci%C3%B3n-De-Sustancias-Asistida-Por->

Ultrasonido/1950573.html, accesado 10/9/2014

- [16] **Torres E, Guillén Z, Hermosilla R, Arias Q, Vogel C, Almeida M** (2014) Empleo del ultrasonido en la extracción de curcumina a partir de su fuente natural. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 19: 14-20.
- [17] **Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M** (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-496.
- [18] **CLSI document M02- A10**. (2009) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. *Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- [19] **CLSI document M44-A2** (2009) Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast. *Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- [20] **NCCLS document M7-A6** (2003) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. *Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards*.
- [21] **CLSI document M27-A3**. (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. *Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- [22] **Payo A, Dominicis ME, Mayor J, Oquendo M, Sarduy R** (2001) Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. *Revista Cubana de Farmacia* 35: 203-206.
- [23] **Domingo D, López-Brea M** (2003) Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* 16: 385-393.
- [24] **Márquez DM, Galeano E, Martínez A** (2003) Productos naturales con actividad antimicrobiana. Parte I. *Vitae* 10: 61-71.
- [25] **Márquez DM, Galeano E, Martínez A** (2004) Productos naturales con actividad antimicrobiana. Parte II. *Vitae* 11: 35-41.
- [26] **Aguilera M, Reza MC, Chew RG, Meza J A** (2011) Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotechnia* 13: 16-22.
- [27] **Astrid G** (2008) Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds. *Acta Biológica Colombiana* 13: 27-36.
- [28] **Elena Dominicis E, Oquendo M, Batista M, Herrera P** (1995) Tamizaje de alcaloides y saponinas de plantas que crecen en Cuba. II. Península de Guanahacabibes. *Revista Cubana de Enfermería* 11: 21-22.
- [29] **Rodríguez Y, Pereira S, Vega D, Almeida M, Benítez D** (2010) Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas y tallo de *Colubrina arborescens* M. *Revista QuímicaViva* 9: 30-34.
- [30] **Nivas D, Dethle UL, Gaikwad DK** (2015) *In vitro* Antioxidant Activities and antimicrobial Efficacy of Asian Snakewood; *Colubrina asiatica* (L.) Brong. *Research Journal of Medicinal Plant* 9: 307-320. DOI: 10.3923/rjmp.2015.307.320
- [31] **Ekuadzi E, Dickson RA, Fleischer TC** (2012) Antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Gouania longipetala* Hemsl. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 3: 1300-1305.
- [32] **Bullaín GM, Viera TY, Avilés TY** (2014) Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto seco de las hojas de *Farama occidentalis*. *QuímicaViva* 13: 164-173.