

Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos etanólico y acuoso de hojas de *Calotropis procera* (Aiton) Dryand.

Mijail Mijares Bullaín Galardis¹, Raúl Carlos López Sánchez¹, Roberto Carlos Muñoz Leyva², José Ángel Morales León³, Róbinson Hermosilla Espinoza³

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal y ²Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. ³Centro de estudios de Química Aplicada. Facultad de Ciencias Técnicas. Universidad de Granma. Peralejo. Provincia Granma. Cuba.

mbullaing@udg.co.cu

Recibido: 12/03/2019 - Aceptado: 14/03/2019

[Versión para imprimir](#) 

Resumen

En Cuba *Calotropis procera* (Aiton) Dryand. se emplea como planta medicinal. De las hojas se obtuvieron los extractos etanólico y acuoso mediante la extracción asistida por ultrasonido y se llevaron a sequedad por rotoevaporación. La actividad antibacteriana y antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby con modificaciones. Los extractos no mostraron actividad frente a las bacterias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*; y tampoco inhibieron el crecimiento de las levaduras *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. El tamizaje fitoquímico preliminar mostró la presencia de grupos de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana pero en pequeñas cantidades lo que pudo influir en los resultados obtenidos.

Palabras clave: *Calotropis procera*, actividad antibacteriana, actividad antifúngica, tamizaje fitoquímico

Summary

In Cuba *Calotropis procera* (Aiton) Dryand is used as a medicinal plant. From the leaves, the ethanolic and aqueous extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction and brought to dryness by rotoevaporation. The antibacterial and antifungal activity of the extracts was evaluated by means the diffusion method in agar by superficial disc dissemination of Bauer-Kirby with modifications. The extracts showed no activity against the bacteria *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*; and they also did not inhibit the growth of the yeasts *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The preliminary phytochemical screening showed the presence of groups of secondary metabolites with antimicrobial activity but in small quantities which could influence the results obtained.

Keywords: *Calotropis procera*, antibacterial activity, antifungal activity, phytochemical screening

Introducción

Desde tiempos inmemoriales, en las diferentes culturas, el hombre ha utilizado las plantas medicinales para tratar y curar diversas enfermedades causadas por microorganismos patógenos. En la actualidad se observa un fenómeno de multirresistencia a los agentes antimicrobianos convencionales debido, entre otras causas, a su uso indiscriminado.

Esta situación, así como la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, ha llevado a los científicos a investigar nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales [1].

Debido a esta problemática, una de las más serias que enfrenta la ciencia médica en la actualidad, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) han promovido el desarrollo de programas para la identificación, investigación, cultivo y conservación de plantas medicinales como fuente natural de principios activos para la obtención de nuevos agentes antimicrobianos.

Para realizar este trabajo resulta importante tener en cuenta el conocimiento empírico acumulado por la población en cuanto al manejo y uso de estas especies de plantas e incorporar los conocimientos técnicos especializados para optimizar estos procesos y favorecer de forma efectiva la conservación de estos importantes recursos filogenéticos [2].

La flora cubana es muy rica y variada, presenta más de un 50% de endemismo y, en algunas zonas entre el 70% y 80% de las especies tienen propiedades medicinales, sin embargo, ha sido poco estudiada, lo que ha limitado su explotación y aprovechamiento [3-5].

Calotropis procera (Aiton) Dryand., de la familia Apocynaceae, es conocida por los nombres comunes algodón de ceda, bomba, tula [6], algodón de la India [7], en Cuba se le nombra algodón americano, algodón de Judea, algodón de seda, algodón de playa, árbol de Judea, árbol de seda, cazuela, estrella de Holanda y estrella del norte [8].

Las raíces, el látex y la corteza de las raíces de la planta se emplean en la medicina tradicional para inducir el vómito y como laxante natural. Es también utilizada para combatir los síntomas provocados por diferentes enfermedades cutáneas (lepra, infecciones cutáneas bacterianas) y otras enfermedades como la sífilis [9]. Se le atribuyen también propiedades antiinflamatorias y antisépticas [10].

Los reportes hallados en las fuentes consultadas sugieren que los extractos etanólico y acuoso de hojas de *C. procera* presentan actividad antibacteriana y antifúngica.

Materiales y métodos

Colecta, identificación y selección del material vegetal

La colecta del material vegetal se realizó el 20 de mayo de 2018 en Blanquital, municipio Manzanillo, provincia Granma, Cuba (coordenadas 20°20'43.476" N -77°5'4.416") a las 8:00 am., a una temperatura de 32°C y una humedad relativa de 78%.

La planta fue identificada en el Jardín Botánico Cupaynicú, por el Dr. C. Luis Catasús Guerra, (número de Voucher: 251)[11].

La clasificación del material vegetal se realizó según la NRSP 309 [12]. Se desecharon las hojas que no reunían las condiciones para ser utilizadas en la investigación. La desinfección se realizó según el procedimiento reportado por Carballo y col [13], con modificaciones: lavado con agua potable e inmersión en disolución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 15 minutos.

Las hojas se secaron a la sombra sobre planchas de cartón perforadas durante 10 días removiendo el material tres veces al día, y luego en una estufa universal (Memmert UNB 200, Alemania) con circulación de aire a 40°C durante 3 horas. Se obtuvo un polvo empleando un molino (IKA, modelo MF 10 Basic, Alemania).

Obtención de los extractos

50 g del polvo de las hojas se humectaron con etanol al 70 % y con posterioridad se adicionaron 250 mL de la misma solución. Se realizó una extracción asistida por ultrasonido (Ultrasonic Cleaner SB-120DT, China) a una temperatura de 40°C, frecuencia de 40 KHz durante dos horas [14,15]. Luego de la extracción se retiró el extracto etanólico del balón y se dejó reposar el material vegetal durante 24 horas a temperatura ambiente. El procedimiento fue repetido empleando agua como disolvente. Como resultado se obtuvieron los extractos etanólico y acuoso.

Los extractos se filtraron a presión reducida y se almacenaron en recipientes de color ámbar, se dejaron en reposo durante 48 horas a 8°C, transcurrido este tiempo se filtraron.

Obtención de los extractos secos

Los extractos secos fueron obtenidos mediante un procedimiento de evaporación rotatoria a 60rpm. Se utilizó un rotoevaporador (IKA, RV10 digital, Alemania) conectado a un baño con termostato (IKA, HB10, Alemania), un termostato de refrigeración y recirculación (LAUDA ALPHA RA 24, Alemania) y una bomba de vacío (PC 500 series, Alemania).

Evaluación de la actividad antibacteriana

El ensayo se realizó en una cabina de flujo laminar vertical (FASTER, TWO 30, Italia) por el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby [16,17], con modificaciones.

Los inóculos se elaboraron de colonias aisladas incubadas por 24 horas, se ajustaron al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC/mL).

La inoculación de las placas se realizó mediante la siembra en césped sobre agar Mueller-Hinton (BioCen, Cuba, lote: 4100001) (pH 7,3 \pm 0,2) con hisopos con punta de algodón estériles.

Fue utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente para obtener disoluciones stock de cada extracto a una concentración de 248 mg/mL.

Sobre una placa de Petri se colocaron discos de papel de filtro (MACHEREY-NAGEL, Alemania) de 6 mm de diámetro previamente esterilizados y se les adicionó 5 μ L de la disolución stock cargándolos con 1240 μ g/disco. Con la ayuda de una pinza se situaron los discos impregnados de cada extracto sobre las placas previamente inoculadas.

Las placas inoculadas y con los discos cargados de ambos extractos se incubaron a 37 \pm 0,1 °C durante 24 horas en una incubadora (Memmert INB 200, Alemania). Las zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de los discos fueron medidas en milímetros.

Se utilizaron como controles negativos, discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro cargados con 5 μ L de DMSO; y como controles positivos, discos de los antibióticos comerciales Azitromicina, Ciprofloxacina y Gentamicina (Sensi-Disc, Francia) de 15, 5 y 10 μ g/disco, respectivamente. Los resultados se declararon como el promedio del diámetro de los halos de inhibición para cada tratamiento. A cada tratamiento se le realizaron tres repeticiones.

Bacterias evaluadas

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

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

Evaluación de la actividad antifúngica

El método empleado fue difusión en agar por diseminación superficial en disco de Bauer-Kirby [18].

Fueron utilizadas 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 las placas con *Candida albicans* se realizó en agar Mueller-Hinton (BioCen, Cuba, lote: 4100001) (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 las placas con *Saccharomyces cerevisiae* se realizó en agar dextrosa Sabouraud (BioCen, Cuba, lote: 3500004) (pH 5,6 \pm 0,2). Los inóculos se elaboraron de colonias aisladas incubadas por 24 horas, se ajustaron al patrón de turbidez 0,5 de McFarland para una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Las placas inoculadas y con los discos cargados con los extractos a evaluar se incubaron durante 48 horas a 29 \pm 1°C. Se utilizó como control negativo el mismo que se empleó en la evaluación de la actividad antibacteriana y como

control positivo, discos del antifúngico Fluconazol de 30 µg/disco (Sensi-Disc, Francia). El ensayo se realizó por triplicado bajo estrictas condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar vertical (FASTER, TWO 30, Italia).

Tamizaje fitoquímico

Se realizó para identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólico y acuoso de hojas de *C. procera*, los ensayos realizados fueron los establecidos para cada extracto teniendo en cuenta el solvente empleado en su extracción según la metodología empleada por Rondina y Coussio [19] y Sandoval y Suárez [20].

Resultados

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad bacteriana de los extractos de las hojas de *C. procera* son reportados en la Tabla 1. Como se observa, estos productos son inactivos frente a las cepas ensayadas.

Tabla 1: Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *C. procera*.

Sustancias a evaluar	Halos de inhibición (mm) frente a cepas bacterianas			
	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) Gram-positiva X ± S	<i>Staphylococcus aureus</i> (Salvaje) Gram-positiva X ± S	<i>Escherichia coli</i> (Salvaje) Gram-negativa X ± S	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028) Gram-negativa X ± S
etanólico	-	-	-	-
acuoso	-	-	-	-
gentamicina	26,3±0,6	18,7±0,6	19,3±0,6	18,3±0,6
ciprofloxacina	16,3±0,6	21,3±0,6	-	19,0±1,0
azitromicina	18,3±0,6	27,7±0,6	-	17,3±0,6
DMSO	-	-	-	-

(-): Resultado negativo en la inhibición del crecimiento bacteriano; DMSO:dimetilsulfóxido;X: media; s: desviación estándar.

El dimetilsulfóxido, solvente empleado para resuspender los extractos y utilizado como control negativo en el ensayo no inhibió el crecimiento bacteriano, lo que sugiere que su empleo en la obtención de las disoluciones stock no alteró los resultados obtenidos.

Los antibióticos comerciales empleados como controles positivos se comportaron según lo esperado ya que las cepas bacterianas empleadas en este ensayo mostraron la resistencia y sensibilidad previstas. Esto indica que las condiciones en que se realizó el ensayo y los procedimientos realizados cumplieron las normas establecidas.

De igual modo, los extractos tampoco inhibieron el crecimiento de las levaduras empleadas en el estudio (Tabla 2).

Tabla 2: Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de las hojas de *C. procera*.

Sustancias a evaluar	Halos de inhibición (mm) frente a levaduras	
	<i>Candida albicans</i> (Salvaje) X ± S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763) X ± S
etanólico	-	-
acuoso	-	-
fluconazol	18,3±0,6	22,3±0,6
DMSO	-	-

(-): Resultado negativo en la inhibición del crecimiento bacteriano; DMSO:dimetilsulfóxido; X: media; s: desviación estándar.

Tanto en la evaluación de la actividad antibacteriana como en la antifúngica, el dimetilsulfóxido no inhibió el crecimiento de las cepas empleadas, por consiguiente, es un disolvente adecuado para la elaboración de las disoluciones stock. El fluconazol, utilizado como control positivo se comportó según lo previsto al inhibir el crecimiento de ambos microorganismos.

El tamizaje fitoquímico practicado demostró que los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta son alcaloides, aminoácidos libres, azúcares reductores, fenoles, flavonoides, quinonas, resinas, saponinas, taninos y triterpenos (Tabla 3).

Tabla 3: Tamizaje fitoquímico realizado a los extractos acuoso y etanólico de hojas de *C. procera*.

Metabolitos	Hojas	
	Ac	Et
Alcaloides	+	+
Aminoácidos libres		+

Antocianinas		-
Azúcares reductores	-	+
Coumarinas		-
Esteroles		-
Fenoles	+	+
Flavonoides	+	+
Mucílagos	-	
Quinonas		+
Resinas		+
Saponinas	+	-
Taninos	+	+
Triterpenos		++

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

Discusión

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana de *C. procera* confirman los estudios anteriores de Mossa y col (1991) que plantearon que los extractos de *C. procera* están desprovistos de cualquier actividad antibacteriana y antifúngica [21]. Una observación similar fue realizada por Mainasara y col (2012) que demostraron la inactividad el extracto etanólico de las raíces frente a *S. aureus*, *E. coli* y *S. typhimurium* [22]. Sin embargo, entran en contradicción con los obtenidos por Shobowale y col (2013) quienes reportaron la inhibición del crecimiento de *E. coli*, *S. typhimurium* y *C. albicans* bajo la acción de los extractos etanólico y acuoso de hojas de *C. procera* [23], no obstante, ambos extractos no mostraron actividad frente a *B. subtilis*, lo cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

En el caso de las levaduras, los resultados corroboran el reporte de Farouky col (2016) quienes observaron que el extracto acuoso de hojas y los extractos etanólicos y acuosos de flores, frutos y látex de *C. procerano* inhibieron el crecimiento de *C. albicans*; tampoco mostraron actividad frente a *C. albicans* los extractos de hojas, flores, frutos y látex obtenidos con el empleo de acetona y alcohol isoamílico [24]. Nenaah (2013) constató que el extracto de hojas obtenido con el éter de petróleo como solvente no fue activo frente a *S. cerevisiae* [25].

La mayor parte de los grupos de metabolitos secundarios detectados en el tamizaje fitoquímico coinciden con los identificados por otros autores, con la excepción de los triterpenos, en ningún caso su presencia fue abundante.

Mainasara y col (2012) observaron la presencia de taninos, flavonoides y alcaloides en el extracto acuoso y etanólico de hojas de *C. procera*. También observaron la presencia de saponinas en el extracto acuoso y la ausencia de estas y de esteroles en el extracto etanólico [22].

Un resultado similar obtuvieron Zaman y col (2017) quienes determinaron la presencia de alcaloides, taninos, aminoácidos libres y flavonoides en el extracto etanólico de hojas, sin embargo, como elemento contradictorio también observaron la presencia de saponinas en este extracto [26]. Akindele y col (2017), también determinaron la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos y saponinas en el extracto acuoso y etanólico de hojas, aunque en esta investigación no se observó la presencia de saponinas en el extracto etanólico [27].

Morsy y col (2016) reportaron la presencia de flavonoides y saponinas, pero no observaron taninos, alcaloides, coumarinas y antocianinas en el extracto metanólico de hojas [28]. La ausencia de antocianinas, coumarinas y la presencia de flavonoides en esta investigación corrobora los resultados obtenidos por estos autores.

La actividad biológica de los extractos de origen vegetal está determinada por la presencia y concentración de determinados metabolitos secundarios, por ejemplo, la actividad antimicrobiana está relacionada con la presencia de alcaloides, azúcares reductores, fenoles, quinonas, saponinas y taninos [29-33].

Además, la presencia y concentración de los metabolitos secundarios en las plantas están sujetas a un control genético, y su expresión puede sufrir modificaciones resultantes de la integración de procesos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos y evolutivos. Por consiguiente, la síntesis de metabolitos secundarios puede considerarse como una adaptación química de las plantas los cambios del ambiente [34].

En muchos casos los cambios en las concentraciones de metabolitos secundarios pueden ser resultado del desarrollo foliar y del surgimiento de nuevos órganos, lo que puede provocar una disminución de su concentración y al mismo tiempo, aumentar debido al crecimiento de la biomasa [35, 36].

La edad y el desarrollo de la planta y de los órganos vegetales también son de gran importancia y pueden influir en la cantidad y variedad de metabolitos producidos, pues en muchas especies los tejidos nuevos generalmente poseen mayor tasa biosintética de metabolitos [37].

Otro factor que influye en el desarrollo de las plantas, y por tanto en la producción de metabolitos secundarios, es la frecuencia con la que ocurren las variaciones anuales, mensuales y diarias en la temperatura del lugar donde crece la planta [38].

Por otro lado, varios procesos fisiológicos, tales como fotosíntesis, movilización de reservas, comportamiento estomático, expansión foliar y crecimiento pueden ser alterados por el potencial hídrico de la planta y por consiguiente provocar cambios en el metabolismo secundario y la producción de metabolitos [39-41].

La disponibilidad de nutrientes es otro factor que puede ser responsable de diferencias en la producción de metabolitos secundarios, su déficit no sólo afecta el metabolismo primario, sino que también afecta la producción de diferentes metabolitos secundarios [42]. El pH del suelo también es determinante en el desarrollo de las plantas y en el metabolismo primario y secundario [38].

Tienen una gran influencia en la producción de metabolitos secundarios y en sus concentraciones los estímulos mecánicos como los causados por la lluvia, el viento, la invasión por patógenos, ataques de herbívoros [38,43-45].

La época de recolección es uno de los factores de mayor importancia ya que la cantidad y la naturaleza de los metabolitos secundarios no es constante durante algunos períodos. Puede inferirse entonces que la ausencia de saponinas en el extracto etanólico y la presencia de estas en el extracto etanólico en la investigación realizada por Zaman y col (2017) pudo estar determinada por diferencias en la época de recolección pues la colecta del material vegetal se realizó en el mes de enero [26].

La extracción de metabolitos secundarios depende, entre otros factores, de la naturaleza del grupo al que pertenece, estructura, grado de polimerización y su relación con la polaridad del solvente utilizado en la extracción [46]. Esto puede ser la causa de que Morsy y col (2016) observaron la presencia de saponinas y la ausencia de alcaloides y taninos en el extracto metanólico de hojas [28], mientras que en esta investigación al emplear el etanol como solvente los resultados para estos grupos de metabolitos fueron totalmente opuestos.

Un ejemplo de esto lo constituye lo observado por Do y col (2014) en un estudio relacionado con la extracción de fenoles con distintos solventes y métodos de extracción, quienes reportan que la extracción fue más efectiva aumentando el contenido de agua, lo que puede estar relacionado con la solubilidad de los compuestos en este solvente [47].

El método de extracción empleado también pudo influir en los resultados de la actividad antimicrobiana y del tamizaje fitoquímico, pues en este proceso influyen varios parámetros en el rendimiento de la extracción de metabolitos como por ejemplo, el tiempo de extracción, la temperatura, la relación solvente/sólido y el número de etapas de extracción [48,49]. Es por ello que las diferencias entre los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana y los obtenidos por Shobowale y col (2013) podrían estar dadas en que estos autores emplearon la maceración como método de extracción [23].

El método utilizado para realizar el ensayo de evaluación de la actividad antimicrobiana también pudo influir en las diferencias observadas entre estas investigaciones, variables como la concentración del inóculo, el medio de cultivo empleado, el tipo de difusión, el tiempo y la temperatura de incubación de las placas tienen gran efecto en los resultados. Tal es el caso de los resultados obtenidos por Shobowale y col (2013) en la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólico y acuoso de hojas que mostraron actividad frente a *C. albicans* donde emplearon el método de difusión en pozos de agar, como medio de cultivo el agar papa dextrosa y una concentración del inóculo de aproximadamente 10^5 UFC/mL [23].

Referencias:

1. Kelmanson JE, Jäger AK, Van Staden J (2000) Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 69: 241-246. DOI: 10.1016/S0378-8741(99)00147-6
2. <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-001.html/>, accesado 4/11/2017
3. https://www.ecured.cu/Flora_cubana/, accesado 6/11/2017
4. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000200006/, accesado 7/11/2017
5. <http://www.medulardigital.com/?act=dnews&s=24&n=6178/>, accesado 10/11/2017
6. Mari J (2016) Flores comunes de Puerto Rico. San Juan: Edicionesdigitales.info.3a edición.
7. Rueda EE (2013) Citotoxicidad in vitro de extractos laticíferos de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus thymaloides* (L.) Poit. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12: 476 – 492. DOI: 10.13140/2.1.3567.6802
8. Roig JT (1988) Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. Tomo 2, M-Z. La Habana: *Editorial Científico-Técnica*. 3ª edición.
9. <https://naturalezatropical.com/calotropis-procera/>, accesado 13/11/2017
10. Taciana M (2017) Propiedades antiinflamatorias de proteasas cisteínicas del látex de la planta medicinal *Calotropis procera* (Ait) R. Br. Aplicadas al control de infecciones por *Salmonella*. *Biblioteca Central*. Recife-PE, Brasil.
11. 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.
12. Norma Ramal de Salud Pública 310. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. *Especificaciones generales*. Vig.1992,1992.5 pp
13. Carballo C (2005) Desinfección química de *Pedilanthus thymaloides* (L.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2: 45-49.
14. <http://www.buenastareas.com/ensayos/Extracci%C3%B3n-De-Sustancias-Asistida-Por-Ultrasonido/1950573.html/>, accesado 10/9/2014
15. Torres E, Guillén Z, Herosilla 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.
16. 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.
17. CLSI (2009) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. CLSI document M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
18. CLSI (2009) Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
19. Rondina RVD, Coussio JD (1969) Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas (I). *Revista de Investigaciones Agropecuarias* (Serie 2. Biología y Producción Vegetal) 6: 352-66.
20. Sandoval D, Suárez O (1990) Estudio fitoquímico preliminar de detección de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia* 24:288–296.
21. Mossa JS, Tariq M, Moshin A, Angeel AM, Al-Yahya MA, Al-Said MS, Rafatullah S (1991) Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. *American Journal of Chinese Medicine* 19: 223–231. DOI: 10.1142/S0192415X91000302
22. Mainasara MM, Aliero BL, Aliero AA, Yakubu M (2012) Phytochemical and Antibacterial Properties of Root and Leaf Extracts of *Calotropis procera*. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science* 20: 1-6.
23. Shobowale OO, Ogbulie NJ, Itoandon EE, Oresegun MO, Olatope SOA (2013) Phytochemical and Antimicrobial Evaluation of Aqueous and Organic Extracts of *Calotropis procera* Ait Leaf and Latex. *Nigerian Food Journal* 31: 77 – 82. DOI: 10.1016/S0189-7241(15)30059-X
24. Farouk AA, Ahamed N T, AlZahrani O, AlamerKH, Bahobail AA (2016) Antimicrobial Activities Evaluation from the Extracts of Leaves, Flowers, Fruits and Latex of *Calotropis procera* from Taif. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 5:240-256. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.511.026
25. Nenaah G (2013) Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29:1255–1262. DOI 10.1007/s11274-013-1288-2
26. Zaman HU, Ahmad S (2017) Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Leaf Extracts of *Calotropis procera*. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences* 1: 19-21.
27. Akindele PO, Fatunla OA, Ibrahim KA, Afolayan CO (2017) Antibacterial and Phytochemical Screening of *Calotropis procera* Leaf Extracts against Vancomycin and Methicillin Resistant Bacteria Isolated from Wound Samples in Hospital Patients. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research* 2(1): 16-30. DOI: 10.9734/JOCAMR/2017/30975

28. **Morsy N, Al Sherif EA, Abdel-rassol MA** (2016) Phytochemical analysis of *Calotropis procera* with antimicrobial activity investigation. *Main Group Chemistry* 15: 267–273. DOI 10.3233/MGC-160206
29. **Domingo D, López-Brea M** (2003) Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* 16: 385-393.
30. **Márquez DM, Galeano E, Martínez A** (2003) Productos naturales con actividad antimicrobiana. Parte I. *Vitae* 10: 61-71.
31. **Márquez DM, Galeano E, Martínez A** (2004) Productos naturales con actividad antimicrobiana. Parte II. *Vitae* 11: 35-41.
32. **Aguilera M, Reza MC, Chew RG, Meza JA** (2011) Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnica* 13: 16-22.
33. **Astrid G** (2008) Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds. *Acta Biológica Colombiana* 13: 27-36.
34. **Kutchan TM** (2001) Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. *Journal of Plant Physiology* 125: 58–60. DOI: 10.1104/pp.125.1.58
35. **Spring O, Bienert U** (1987) Capitule Glandular Hairs from Sunflower Leaves: Development, Distribution and Sesquiterpene Lactone Content. *Journal of Plant Physiology* 130: 441-448. DOI: 10.1016/S0176-1617(87)80209-2
36. **Hendriks H, Anderson-Wildeboer Y, Engels G, Bos R, Woerdenbag HJ** (1997). The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. *Planta Medica* 63: 356-359 DOI: 10.1055/s-2006-957700
37. **Hartmann T** (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80: 177-188. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1996.tb00914.x
38. **Evans WC** (1996) Trease and Evans' Pharmacognosy. London: *WB Saunders Company*. 14a edición.
39. **Salisbury FB, Ross CW** (1992) Plant Physiology. Belmont: *Wadsworth Publishing Co*. 4a edición.
40. **Hsiao TC** (1973) Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24:519-570. DOI: 10.1146/annurev.pp.24.060173.002511
41. **Bazaaz F, Chiariello N, Coley P, Pitelka L** (1987) Allocating Resources to Reproduction and Defense. *Bioscience* 37: 58-67. DOI: 10.2307/1310178
42. **Gershenson J** (1984) Changes in the Levels of Plant Secondary Metabolites Under Water and Nutrient Stress. *Recent Advances in Phytochemistry* 18: 273-320. DOI: 10.1007/978-1-4684-1206-2_10
43. **Zheng Z, Wu M** (2004) Cadmium Treatment Enhances the Production of Alkaloid Secondary Metabolites of *Catharanthus roseus*. *Plant Science* 166: 507-514. DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.10.022
44. **Vázquez F, Carrillo M, Minero Y, Miranda ML** (2004) Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 623-628. DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.06.010
45. **Cipollini DF** (1997) Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. *Oecologia* 111: 84-90. DOI: 10.1007/s004420050211
46. **Bochi VC, Barcia MT, Rodrigues D, Speroni CS, Giusti MM, Godoy HT** (2014) Polyphenol extraction optimisation from ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry* 164:347-354. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.031
47. **Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH** (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22: 296-302. DOI: 10.1016/j.jfda.2013.11.001
48. **Guntero VA, Longo MB, Ciparicci SA, Martini RE, Andreatta AE** (2015) Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. Congreso Argentino de Ingeniería Química. Asociación Argentina de Ingenieros Químicos.
49. **Dueñas A, Alcívar U, Sacon E, Bravo L, Villanueva G** (2016) Determinación de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de *Chuquiraga Jussieuif* Gmel usando la lixiviación de muestras sólidas. *Tecnología Química* 36: 166-175.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista Química Viva

Número 1, año 18, Abril 2019

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar