

Caracterización fitoquímica de la especie amenazada *Fraxinus caroliniana* Mill subsp. *cubensis* (Griseb.) Borhidi

Mabelkis Terry Rosabal, Beatriz del Valle Suárez, Yunel Pérez Hernández, Ileana Mestre Naite, Yohanka Lezcano Mas, Lenia Robledo Ortega

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas sede Camilo Cienfuegos. Autopista a Varadero km 3 ½. Matanzas. Matanzas. CP 40100.

e-mail: mabelkys.terry@umcc.cu

RESUMEN

Fraxinus caroliniana Mill subsp. *cubensis* (Griseb.) Borhidi es conocida comúnmente como búfano, representa una subespecie endémica y categorizada en Peligro Crítico de extinción en Cuba. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar la composición fitoquímica de plantas de *F. caroliniana* en dos localidades de la provincia de Matanzas. Se analizó cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en extractos foliares y se cuantificaron azúcares reductores y totales. Los resultados indicaron la presencia de flavonoides, terpenos, esteroides, saponinas, taninos y antraquinonas en hojas que pudieran ser consideradas para posteriores estudios sistemáticos y de aplicación en la agricultura. Las plantas provenientes de la Ciénaga de Zapata mostraron contenidos de azúcares reductores y totales superiores a los obtenidos en las plantas de la localidad de Martí. Estos resultados aportan información para la identificación de caracteres de posible valor taxonómico y conservacionista en esta especie.

Palabras clave: antroquininas, búfano, esteroides, extracto, taninos, terpenos

Phytochemical characterization of the threatened specie *Fraxinus caroliniana* Mill subsp. *cubensis* (Griseb.) Borhidi

ABSTRACT

Fraxinus caroliniana Mill subsp. *cubensis* (Griseb.) Borhidi is commonly known as buffalo, represents an endemic subspecies and categorized as critical danger of extinction in Cuba. This work aimed to characterize the phytochemical composition of plants of *F. caroliniana* in two localities of the Matanzas province. The presence of secondary metabolites in leaf extracts was qualitatively analyzed and reductive and total sugars were quantified. The results indicated the presence of flavonoids, terpenes, steroids, saponins, tannins and anthraquinones in leaves that could be considered for further systematic studies and application in agriculture. The plants from the Ciénaga de Zapata showed contents of reducing sugars and totals higher than those obtained in the plants of Martí. These results provide information for the identification of characters of possible taxonomic and conservation value in this species.

Keywords: anthraquinones, extracts, swamp ash, steroids, tannins, terpenes

INTRODUCCIÓN

El archipiélago cubano ha sufrido una fuerte transformación de su cobertura boscosa desde de la llegada de los europeos (Jordán, 2006). Las áreas que aún conservan los principales recursos bióticos naturales, con ecosistemas y paisajes de alta naturalidad y representatividad, constituyen el 10% del territorio nacional (CNAP, 2009). Estos sitios se caracterizan por poseer un menor grado de transformación dado lo poco accesible de estos territorios. Las principales áreas boscosas se localizan fundamentalmente en

las ciénagas y los humedales, en los macizos montañosos, zonas costeras y grupos insulares que conforman el territorio cubano (Capote *et al.*, 2005).

La explotación histórica de los bosques del país ha producido una fuerte disminución de estas áreas naturales y se ha obtenido un patrón de fragmentación de los mismos. La fragmentación se define como la transformación de un bosque continuo en muchas unidades más pequeñas y aisladas entre sí, cuya extensión agregada de superficie resulta ser mucho menor que la

del bosque original. Los efectos biológicos de la fragmentación se enfatizan sobre las condiciones microclimáticas de los fragmentos, sobre la abundancia de algunas especies y las interacciones biológicas, los que afectan la biodiversidad existente en los mismos (Capote *et al.*, 2007).

En los bosques de ciénaga existentes en Cuba se presentan una gran diversidad de especies y endemismos. Actualmente, a causa de la deforestación y la fragmentación se estima la pérdida de un porcentaje notable de especies propias de esta formación vegetal (CITMA, 2009).

Fraxinus caroliniana Mill subsp. *cubensis* (Griseb.) Borhidi es conocida comúnmente como búfano, es una subespecie endémica y categorizada en Peligro Crítico de extinción en el Primer Taller de Categorización de Árboles Cubanos realizado en 2005. Fue incluida en la Instrucción Técnica N° 01/90 del Ministerio de la Agricultura (MINAGRI, 1990); así como en la Lista Roja de la Flora Vasculare Cubana (Berazaín *et al.*, 2005). La misma se caracteriza por ser una especie espacial y numéricamente restringida. Sus poblaciones se distribuyen de forma discontinua y fragmentada en la Ciénaga de Majagüillar, Martí y Ciénaga de Zapata, donde se encuentran aisladas y reducidas como consecuencia de las actividades antropogénicas.

Los estudios fitoquímicos pueden contribuir con datos importantes al estudio taxonómico de especies vegetales, ya que reflejan la composición estructural o arquitectura de la planta y han apoyado a esta rama de la botánica en numerosas ocasiones (Ferreira *et al.*, 2005). Por otra parte, permiten estimar las potencialidades que presentan las plantas con fines industriales y para el desarrollo de la agricultura.

Varios autores han investigado la composición fitoquímica de especies de *Fraxinus* como *F. formosana* (Hayata). Ohwy. (Sutargadi *et al.*, 1978), *F. malacophylla* Hemsl. (He *et al.*, 1994) y *F. americana* L. (Takenaka *et al.*, 2000); sin embargo no existen referencias sobre trabajos de tamizaje fitoquímico en plantas de *Fraxinus caroliniana* Mill subsp. *cubensis* (Griseb.)

Borhidi. El objetivo del presente trabajo es caracterizar la composición fitoquímica de esta subespecie presente en la provincia de Matanzas, que permita aportar información para la identificación de caracteres de posible valor taxonómico y conservacionista; así como otros usos potenciales en el campo de la medicina y de la agricultura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material

El material vegetal (*F. caroliniana* Mill subsp. *cubensis* (Griseb.) Borhidi) se recolectó en la localidad 'Las Maravillas' en el municipio de Martí y 'La Peojota' en la Ciénaga de Zapata. Se seleccionaron dos árboles vigorosos y sanos por cada área y se colectaron hojas en el mismo día. El estudio se realizó en el laboratorio perteneciente al Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas, Cuba.

Preparación de los extractos

Las hojas colectadas de esta especie de ambas localidades fueron lavadas con agua destilada para eliminar el polvo y posteriormente se procedió al secado en una estufa (Boxun) a 45°C (Jalal *et al.*, 2009). Las hojas secas fueron trituradas en un molino eléctrico hasta pulverizar (Niranjan *et al.*, 2013).

Se mezclaron 3 g de polvo de las hojas secas de plantas de ambas localidades (por separado) con 30 ml de etanol 96% en Erlenmeyers de 250 ml con tapones de algodón. Se colocaron en agitación sobre una zaranda orbital (HDL® APPARATUS) a 160 rpm por 24 h, a 30°C. Posteriormente las muestras fueron filtradas con cinco capas de papel de filtro. Se colectaron los filtrados (extractos) y se conservaron a 4°C para los ensayos posteriores.

Análisis fitoquímico

Para la determinación de la presencia de metabolitos secundarios se utilizó la metodología descrita por Chigodi *et al.* (2013) e incluyó pruebas para flavonoides, terpenoides, antocianinas, taninos,

antraquinonas, glucósidos cardiotónicos, saponinas, flobataninos, esteroides, cumarinas y emodinas.

- **Flavonoides:** se adicionó un mililitro de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N a 1 ml de extracto y posteriormente se agregó igual volumen de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N. La presencia de un color amarillo en la solución indicó la presencia de flavonoides.

- **Terpenoides:** se mezcló un mililitro de extracto con 1 ml de cloroformo (CHCl_3) y a continuación se adicionaron 2 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. La coloración rojo-parda en la interfase indicó la presencia de terpenoides.

- **Antocianinas:** se mezcló un mililitro de extracto con 3 ml de agua destilada y posteriormente se adicionó 1 ml de HCl 2 N y solución amoniacal 0.5 N a 1 ml de la mezcla anterior. La presencia de un color rosado-rojo que se torna azul-violeta indicó la presencia de antocianinas.

- **Taninos:** se mezcló un mililitro de cada extracto con 2 ml de agua destilada y la mezcla se calentó en un Baño termostático. Posteriormente se filtró con papel de filtro y al sobrenadante se adicionaron dos gotas de solución de cloruro férrico al 1% en metanol. La presencia de taninos se identificó mediante la formación de un color verde oscuro en la solución.

- **Antraquinonas:** se mezclaron dos mililitros de cada extracto con 3 ml de HCl al 10% y la mezcla se calentó a 100°C durante 3 minutos en Baño termostático. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Seguidamente se adicionó igual volumen de CHCl_3 al filtrado y a continuación unas gotas de solución de amonio al 10% y se volvió a calentar la mezcla. La formación de una coloración rosada indicó la presencia de antraquinonas.

- **Glucósidos cardiotónicos:** se mezclaron dos mililitros de cada extracto con 2 ml de ácido glacial acético que contenía una gota de solución de cloruro férrico al 1%. A la mezcla se adicionó cuidadosamente 1 ml de H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo de ensayo. La presencia de desoxiazúcares característicos de los compuestos cardiotónicos, se observó por la formación de un anillo pardo en la interfase junto a un anillo púrpura por debajo.

- **Saponinas:** se mezcló un mililitro de cada extracto con 3 ml de agua destilada, se agitó

vigorosamente y posteriormente la mezcla se calentó a 100°C. La formación de espuma o una mezcla cremosa con pequeñas burbujas mostró la presencia de saponinas.

- **Flobataninos:** se mezcló un mililitro de cada extracto con una solución de HCl al 2% y se calentó a 100°C. La presencia de flobataninos se determinó por la formación de un precipitado rojo.

- **Esteroides:** se mezcló un mililitro de cada extracto con 3 ml de CHCl_3 y luego se agitó la mezcla. Posteriormente se adicionaron 2 ml de H_2SO_4 concentrado cuidadosamente por los lados del tubo de ensayo. La formación de un color rojo en la capa superior y una coloración verde fluorescente en la capa de H_2SO_4 indicó la presencia de esteroides en el extracto.

- **Cumarinas:** se mezcló un mililitro de cada extracto con 1 ml de NaOH al 10%. La formación de una coloración amarilla indicó la presencia de cumarinas en la muestra.

- **Emodinas:** se mezcló un mililitro de cada extracto con 1 ml de hidróxido de amonio (NH_4OH) y 2 ml de benceno. La formación de una coloración roja indicó la presencia de emodinas.

La presencia de los metabolitos se indicó de manera cualitativa a través del sistema no paramétrico de cruces. Presencia: (+++ = alto, ++ = moderado, + = bajo, - = ausencia).

Cuantificación de azúcares reductores y totales

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método del ácido dinitrosalisílico y se empleó la D-glucosa (SIGMA) como patrón (Miller, 1959). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 456 nm. El método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) se empleó para determinar colorimétricamente el contenido de azúcares totales con D-glucosa como patrón. Las muestras fueron leídas a 490 nm.

Análisis estadístico

Los datos de las concentraciones de azúcares reductores y totales fueron procesados según paquete Statgraphic plus 5.1 sobre WINDOW. Se determinó el ajuste a una Distribución Normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y

la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett. Al no cumplirse los supuestos se empleó la Prueba de Kruskal-Wallis y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Kwels (SNK) ($p < 0.01$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fitoquímico

Los resultados en la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios en hojas de *Fraxinus* de las localidades de Ciénaga de Zapata y Martí se muestran en la Tabla 1.

En ambas muestras se identificó la presencia de flavonoides, terpenos, esteroides, saponinas, taninos y antraquinonas. No se detectaron cumarinas, flobatadinos y glucósidos cardiotónicos. Además, en las plantas provenientes de la localidad Martí no se detectaron emodinas.

La presencia o ausencia de los metabolitos secundarios, así como las diferencias en cuanto a las cantidades relativas de los mismos, puede estar relacionado con diversos factores como son el momento de la colecta, la edad de la plantas, la forma de cosecha, el secado, el genotipo, los factores ambientales y las técnicas de detección utilizadas (Omodamiro *et al.*, 2014). En este caso se consideró que los resultados pudieran estar

relacionados con los factores ambientales y genotípicos, teniendo en cuenta que el resto de los factores fueron homogéneos para ambos grupos de plantas.

La presencia de terpenoides y flavonoides en los extractos evaluados pueden indicar un uso potencial en trastornos asociados con el estrés oxidativo, como la aterosclerosis, las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, *Diabetes mellitus*, cáncer, las enfermedades coronarias, entre otras (Abubacker *et al.*, 2013; Zubair *et al.*, 2013). La actividad antioxidante de estos compuestos ha sido demostrada en numerosas especies vegetales de diferentes familias botánicas (Mohan *et al.*, 2011; Abubacker *et al.*, 2013).

Los mecanismos antioxidantes de los flavonoides se ha relacionado con la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ERO), así como a la acción quelatante de metales de transición como el cobre y el hierro; los cuales, en presencia de peróxido de hidrógeno, pueden generar otros radicales más potentes que afectan el funcionamiento de numerosas macromoléculas esenciales y estructuras celulares (Alam *et al.*, 2012).

Los flavonoides en particular han exhibido otras actividades biológicas como analgésica, antialérgica y citostáticas. Compuestos de esta naturaleza encontrados

Tabla 1. Contenidos relativos de metabolitos en extractos etanólicos de hojas de *Fraxinus caroliniana* Mill. subsp. *cubensis* colectados en dos localidades (Ciénaga de Zapata y Martí).

Metabolitos	Ciénaga de Zapata	Martí
Flavonoides	+	+
Terpenos	++	+
Antocianinas	-	-
Esteroides	+++	+++
Saponinas	+	+
Taninos	+++	+++
Cumarinas	-	-
Emodinas	+	-
Antraquinonas	++	+
Flobataninos	-	-
Glucósidos cardiotónicos	-	-

Presencia: +++ alto, ++ moderado, + bajo, - ausencia

en extractos metanólicos de hojas de *Argemone mexicana* Linn. fueron relacionados con un efecto anticancerígeno (Hodek *et al.*, 2002). Además, las sustancias de naturaleza flavonoide también han sido purificadas, caracterizadas y utilizadas como marcadores químico-taxonomicos para la identificación de especies del género *Primula* (Fico *et al.*, 2007; Colombo *et al.*, 2014). La identificación de la presencia de dichos compuestos en las plantas de fraxinus analizadas podría contribuir a otros estudios taxonomicos en esta especie endémica.

De igual forma, los compuestos terpenoides presentes en los extractos de *F. caroliniana* corroboraron los estudios realizados por Eyles *et al.* (2007) en otras especies del género, los cuales determinaron la presencia de monoterpenos ciclopentanoides que son considerados un mecanismo de defensa contra herbívoros.

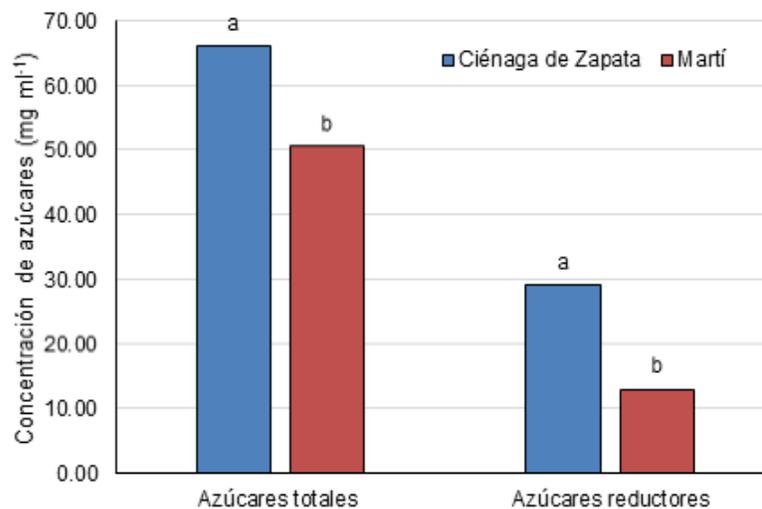
Los terpenos son de uso potencial como antifúngicos. Dicho efecto fue referido por Abubacker *et al.* (2013) con extractos acuosos de *Hamelia patens* Jacq. contra diferentes especies de hongos como *Aspergillus fumigatus* NCBT 112, *Candida albicans* NCBT 140, *Fusarium oxysporum* NCBT 156 y *Rhizoctonia solani* NCBT 194. En trabajos

similares con *Juniperus barbadense* L. var. *lucayana* (Britt.) se logró la identificación de nueve sesquiterpenos, cuatro de los cuales mostraron una fuerte actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* Pers. (Nuñez *et al.*, 2007).

La presencia abundante de taninos sugiere un uso potencial contra enfermedades infecciosas provocadas por bacterias, hongos y otros parásitos. Estos compuestos pueden reaccionar con proteínas ricas en prolina para formar complejos irreversibles que provocan la inhibición de la síntesis de proteínas (Jiménez *et al.*, 2012). Las plantas que presentan taninos como componente astringente principal han sido utilizadas para el tratamiento de desórdenes intestinales como diarrea y disentería (Chrinius *et al.*, 2011).

Cuantificación de azúcares totales y reductores

Se comprobó la presencia de concentraciones de azúcares totales en los extractos de hojas de fraxinus de las dos localidades superiores a 50 mg m⁻¹ (Figura 1). Las plantas provenientes de la Ciénaga de Zapata mostraron contenidos de azúcares totales y reductores superiores a los obtenidos en las plantas de la localidad de Martí.



Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas según la Prueba de Kruskal Wallis y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Kwels ($P < 0.01$).

Figura 1. Contenido de azúcares en extractos de hojas de plantas de *Fraxinus caroliniana* subsp. *cubensis* provenientes de dos localidades (Martí y Ciénaga de Zapata).

Además de la función energética de los azúcares y su participación en la biosíntesis de polímeros, estos compuestos presentan funciones hormonales importantes tales como mensajeros primarios en señales de transducción (Rolland *et al.*, 2002). Por otra parte, la producción de azúcares mediante la fotosíntesis es un proceso vital y el estatus de estos modula y coordina reguladores internos y señales ambientales que manejan el crecimiento y desarrollo. Aunque el efecto regulador de los azúcares sobre la actividad fotosintética y el metabolismo de las plantas ha sido reconocido hace mucho tiempo, el concepto de azúcares como moléculas centrales señaladoras es relativamente novedoso (Rolland *et al.*, 2006). Por otra parte, se han propuesto varias funciones a los azúcares reductores como son: papel antiestrés en condiciones de sequía, ya que pueden participar en el ajuste osmótico; constituir un reservorio de carbono y en la eliminación de radicales libres (Parvaiz y Satyawati, 2008); protección a macromoléculas y estabilización de estructuras membranosas, así como la reducción de procesos de fusión (Bartels y Sunkar, 2005). En correspondencia con lo anterior, los resultados de las plantas crecidas en las dos localidades pudieran estar relacionados con las condiciones ambientales diferentes.

Los glucósidos también han sido utilizados como marcadores sistemáticos en *Fraxinus* (Hosny, 1988) y en especies de la familia *Lamiaceae* (Marin *et al.*, 2004) y *Araceae* (Clark *et al.*, 2014). En este sentido, los resultados contribuyen al conocimiento de esta especie endémica, sientan las bases para nuevos estudios sistemáticos y permitirán profundizar en la influencia de las condiciones ambientales y edafoclimáticas en el contenido de compuestos químicos.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de flavonoides, terpenos, esteroides, saponinas, taninos y antraquinonas en *Fraxinus caroliniana* Mill. subsp. *cubensis* (Griseb.) Borhidi, los cuales pudieran ser considerados para posteriores estudios sistemáticos. No obstante, se precisa continuar con otros trabajos de purificación e identificación de tales metabolitos, que permitan el análisis posterior de fenómenos

de convergencia y divergencia dentro de este grupo taxonómico y profundizar en la influencia de las condiciones ambientales en el contenido de los metabolitos posibles marcadores.

REFERENCIAS

Abubacker M, Sirag N, Osman I, Abakar S, Aboul-Enien AM (2013) Anticancer and antioxidant activities of *Guiera senegalensis*. Sudan Journal of Medical Sciences 8(3): 135-140

Alam N, Hossain M, Mottalib MA, Suliman SA, Gan SH, Khalil I (2012) Methanolic extracts of *Withania somnifera* leaves, fruits and roots possess antioxidant properties and antibacterial activities. Complementary and Alternative Medicine 12: 175; doi: 10.1186/1472-6882-12-175

Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. Critical reviews in plant Sciences 24(1): 23-58; doi: 10.1080/07352680590910410

Berazaín R, Areces F, Lazcano JC, González LR (2005) Lista roja de la flora vascular cubana. Documentos del Jardín Botánico, La Habana

Capote RP, Cruz RO, Vantourt A (2007) Fragmentación de vegetación en el Archipiélago Cubano: Conservación de Diversidad Biológica y Mitigación de desertificación. En: Riveros M, Sánchez LE (eds) Memoria 1er Taller Binacional y Regional sobre Desertificación. Caracas, 7-9/08/2006, pp. 33-36. Editorial IVIC, Caracas, ISBN: 9802610895

Capote RP, Guzmán JM, Llamacho J (2005) Fragmentación de vegetación en el archipiélago cubano: conservación de diversidad biológica y mitigación de cambios globales en áreas protegidas. En: CITMA (ed) V Convención Internacional sobre Medio Ambiente y Desarrollo, Palacio de las Convenciones, 4-8/07/2005, pp. x-x CITMA, La Habana; ISBN: 959-7164-93-0

Chrinius H, Gary GY, Gideon AS, Asabe MM, Abel SA (2011) Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research 68 (4):535-539

CITMA (2009) IV Informe Nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica República de Cuba. CITMA-PNU-GEF, La Habana

Clark BR, Bliss BJ, Suzuki JY and Borris RP (2014) Chemotaxonomy of Hawaiian *Anthurium* cultivars based on multivariate analysis of phenolic

- metabolites. J Agric Food Chem 62 (46): 11323–11334; doi: 10.1021/jf502187c
- CNAP (2009) Plan del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) 2008-2013. Centro Nacional de Áreas Protegidas, La Habana; ISBN: 978-959-287-019-2
- Colombo PS, Flamini G, Fico G (2014) *Primula latifolia* Lapeyr and *Primula vulgaris* Hudson flavonoids. Natural Product Research 28 (19): 1641-1644; doi: 10.1080/14786419.2014.924003
- Dubois MK, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substance. Anal Chem 28 (3): 350-356; doi: 10.1021/ac60111a017
- Eyles, A, Jones, W, Riedl, K, Cipollini, D, Schwartz, S, Kenneth, C, Herms, DA, Bonello, P (2007) Comparative phloem chemistry of manchurian (*Fraxinus mandshurica*) and two North American Ash Species (*Fraxinus americana* and *Fraxinus pennsylvanica*). J Chem Ecol 33 (7):1430–1448; doi: 10.1007/s10886-007-9312-3
- Ferreira MJP, Brant AJC, Alvarenga SAV, Emerenciano VP (2005) Neural networks in chemosystematic studies of Asteraceae: a classification based on a dichotomic approach. Chemistry & Biodiversity 2 (5): 633–644; doi: 10.1002/cbdv.200590040
- Fico G, Rodondi G, Flamini G, Tonie F (2007) Comparative phytochemical and morphological analysis of three italian *Primula* species. Phytochemistry 68 (12): 1683-1691; doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.019
- He ZD, Ueda S, Inoue K, Akaji M, Fujita T, Yang CR (1994) Secoiridoid glucosides from *Fraxinus malacophylla*. Phytochemistry 35 (1): 177–181; doi: 10.1016/S0031-9422(00)90529-6
- Hodek P, Trefil P, Stiborova M (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compound interacting with cytochromes P450. Chem Biol Interact 139 (1):1-21
- Hosny M (1998) Secoiridoid glucosides from *Fraxinus oxycarpa*. Phytochemistry 47 (8): 1569–1576; doi: 10.1016/S0031-9422(97)00790-5
- Jalal K, Rahmat M, Fakhr TM and Nourbakhsh H (2009) Influence of Drying Methods, Extraction Time, and Organ Type on Essential Oil Content of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Nature and Science 7(11): 42-44
- Jiménez V, Reyes A, Pérez C, Alvarado B (2012) Separación cromatográfica del extracto de *Hamelia patens*. Revista Académica de Investigación 11: 1-10
- Jordán A (2006) La deforestación de la Isla de Cuba durante la dominación española (1492-1898). Fundaciones Dialnet. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=2755>. Consultado 12/12/2015
- Marin PD, Grayer RJ, Grujic S, Kite GC, Veitch NC (2004) Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. Phytochemistry 65 (9): 1247–1253; doi: 10.1016/j.phytochem.2004.04.014
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31 (3): 426-428; doi: 10.1021/ac60147a030
- MINAGRI (1990) Instrucción Técnica N° 01/90. Ministerio de la Agricultura, La Habana
- Mohan N, Jassal PS, Kumar V, Singh RP (2011) Comparative *in vitro* and *in vivo* study of antioxidants and phytochemical content in *Bacopa monnieri*. Recent Research in Science and Technology 3(9): 78-83
- Niranjan K, Sathiyaseelan V, Jeyaseelan EC (2013) Screening for anti-microbial and phyto chemical properties of different solvents extracts of leaf of *Pongamia pinnata*. International Journal of Scientific and Research Publications 3 (1): 1-3
- Núñez YO, Salabarría IS, Collado IG, Hernández-Galán R (2007) Sesquiterpenes from the wood *Juniperus lucayana*. Phytochemistry 68 (19): 2409-2414; doi: 10.1016/j.phytochem.2007.05.030
- Omodamiro OD, Unekwe PC, Nweke IN, Jimoh, MA (2014) Evaluation of diuretic activity of ethanol extract and its fractions of *Agave sisalana*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2 (1): 1-6
- Parvaiz A, Satyawati S (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants - a review. Plant Soil Environ 54 (3): 89–99
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar Sensing and Signaling in Plants. Plant Cell 14: 185–205; doi:10.1105/tpc.010455
- Rolland F, Baena E, Sheen J (2006) Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. Annu Rev Plant Biol (57):675–709; doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441
- Sutarjadi TH, Malingre M, Van FHL (1978) Iridoid and phenolic glycosides of *Fraxinus griffithii*. Phytochemistry 17 (3): 564-569; doi: 10.1016/S0031-9422(00)89371-1
- Takenaka Y, Tanahashi T, Shintaku M, Sakai T, Nagakura N, Parida R (2000) Secoiridoid

glucosides from *Fraxinus americana*.
Phytochemistry 55 (3): 275–284

Zubair SM, Rasool N, Mansha A, Anjum F,
Munawar I, Muhammad M, Muhammad S (2013)
Antioxidant, antibacterial, antifungal activities and

phytochemical analysis of dagger (*Yucca aloifolia*)
leaves extracts. Journal of Medicinal Plants
Research 7(6): 243-249; doi: 10.5897/JMPR11.943

Recibido: 17-11-2015
Aceptado: 09-02-2016