

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES, FLAVONOIDES Y EVALUACIÓN
ANTIMICROBIANA EN TRES ECOTIPOS DE *MORINGA OLEIFERA* CULTIVADAS EN CUBA.
DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOLS, FLAVONOIDS AND ANTIMICROBIAL
EVALUATION OF THREE ECOTYPE OF *MORINGA OLEIFERA* GROWN IN CUBA.

Vivian Lago Abascal^{1*}, Olga Echemendia Arana¹, Kethia L. Gonzales García², Yasnay Hernández Rivero², Ernesto Almora Hernández¹, Raisa Monteagudo Borges¹

1. Entidad de Ciencia Tecnología e Innovación Sierra Maestra. (ECTI).

2. Departamento de Química, Instituto de Ciencias Marinas (ICIMAR).

Email de correspondencia: vlago@bionaturasm.cu

RESUMEN

Introducción: *Moringa oleifera* Lam se considera uno de los árboles más útiles y con múltiples beneficios. Sus hojas acumulan altos contenidos de compuestos a los que se le atribuyen propiedades biológicas.

Objetivo: Determinar y cuantificar el contenido de polifenoles totales, flavonoides y la actividad antimicrobiana de extractos acuosos e hidroalcohólicos de diferentes ecotipos de *Moringa oleifera* Lam cultivada en Cuba.

Métodos: El contenido de polifenoles se determinó según el método descrito en la Farmacopea Británica (2009) y los flavonoides por el método modificado de Woisky (1998). Los extractos se enfrentaron a cepas de referencias (*Escherichia coli* (ATCC10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), *Salmonella thyphi* (ATCC9992) y cepas provenientes de aislamientos clínicos.

Resultados: Los extractos hidroalcohólicos mostraron una mayor concentración de polifenoles y flavonoides con respecto a los extractos acuosos. Tanto los extractos acuosos como los hidroalcohólicos de los tres ecotipos manifestaron mejor concentración mínima letal (CML) con las bacterias Gram positivas que, con las Gram negativas, siendo mayor la actividad de los extractos hidroalcohólicos, destacándose el ecotipo Criolla con una CML de 3,13mg/mL y 12,55mg/mL respectivamente.

Conclusión: Se demostró que *Moringa oleifera* Lam tiene actividad biológica y pudiera ser un potencial como antimicrobiano.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, *Moringa oleifera*, polifenoles, flavonoides.

ABSTRACT

Introduction: *Moringa oleifera* Lam is considered one of the most useful trees with multiple benefits. Its leaves accumulate high content of compounds to which biological properties are attributed.

Objective: To determine and quantify the content of total polyphenols, flavonoids and the antimicrobial activity of aqueous and hydroalcoholic extracts of different ecotypes of *Moringa oleifera* Lam cultivated in Cuba.

Methods: The polyphenol content was determined according to the method described in the British Pharmacopoeia (2009) and the flavonoids by the modified method of Woisky (1998). The antibacterial activity of the extracts was examined against reference strains (*Escherichia coli* (ATCC10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), *Salmonella thyphi* (ATCC9992)) and strains from clinical isolation.

Results: The hydroalcoholic extracts showed a higher content of flavonoids and polyphenols respect to the aqueous extract. The aqueous and hydroalcoholic extracts of the 3 ecotypes showed better CML with Gram positive bacteria than Gram negative, the activity of hydroalcoholic extracts was greatest, standing out the Creole ecotype with a CML of 3.13mg / mL and 12, 55mg / mL respectively.

Conclusions: *Moringa oleifera* Lam has biological activity and could be used as an potential antimicrobial.

Keywords: Antibacterial activity, *Moringa oleifera*, polyphenol, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales poseen la ventaja de que sus principios activos se encuentran en proporciones biológicamente equilibrados debido a la presencia de sustancias complementarias que se potencian entre ellas y proporcionan como resultado efectos biológicos balanceados y menos efectos indeseables. Por lo tanto, se hace necesario se llevan a cabo cuantiosos experimentos científicos para evaluar la eficacia terapéutica de la planta y su posible toxicidad.⁽¹⁾ Que reúna los requisitos de calidad, seguridad y eficacia, para conocer la composición química y los principios activos que le atribuyen las propiedades a las plantas, que permitan sustentar su uso, asegure su aplicación libre de riesgos y cumpla con todo lo establecido en los lineamientos internacionales para la evaluación y control de los medicamentos herbarios.⁽²⁾

Moringa oleifera pertenece a la familia *Moringaceae*, género *Moringa* que cuenta con 13 especie, siendo esta especie la más estudiada.⁽³⁾ Compuestas por diferentes ecotipo como: *Supergenius*, *Plain* y *Criolla*, esta última es cultivada bajo las condiciones climatológicas de cada país.

En Cuba *Moringa oleifera* es conocida como tilo blanco o palo blanco. Se encuentra distribuida a lo largo del territorio nacional y es reconocida por los habitantes por las propiedades nutritivas y medicinales que ofrecen las hojas. Una de las características distintivas de la planta es que en sus hojas, se acumulan altos contenidos de compuestos fenólicos estudiados por sus aplicaciones biológicas⁽⁴⁾ que ejercen su acción como, antimicrobiano⁽⁵⁾ esta acción antimicrobiana puede ser utilizada como estrategia o alternativa terapéutica para controlar infecciones bacterianas que afectan al humano, que en el contexto actual, es uno de los grandes retos que afronta el desarrollo de fármacos, debido a la aparición de cepas multirresistentes y la escasez de tratamientos alternativos.⁽⁶⁾ Por lo que se impone el estudio de plantas con estas propiedades. El objetivo del trabajo es determinar el contenido de polifenoles y flavonoides de las hojas secas de *Moringa oleifera* cultivadas en Cuba, y evaluar la actividad antimicrobiana que le confieren estos metabolitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

El material vegetal que se utilizó corresponde a las hojas de *Moringa oleifera* Lam de las variedades Supergenius, Plain y Criolla, cosechadas en la Finca el Lechero del municipio La Lisa, en terrenos destinados a el cultivo con fines farmacéuticos de la ECTI “Sierra Maestra.” Las hojas se recolectaron después de los 90 días de establecido el cultivo, la recolecta se realizó en el mes de junio del año 2019 en La Habana, por períodos de 45 días, que comenzó con el desprendimiento de las ramas de abajo hacia arriba, sin llegar a la yema terminal (3 últimas ramas) de la planta. Posteriormente se eliminan de forma manual las ramas y las hojas maduras (despalille), seguidamente las hojas se someten a un lavado mecánico e inmediatamente, son centrifugadas. El secado se realiza en hornos solares CONA a una temperatura menor de 45 °C. Las hojas secas se conservan en bolsas de polietileno hasta su análisis.

Obtención de los extractos hidroalcohólicos y acuosos.

Con cada muestra vegetal de las tres variedades de hojas secas de *Moringa oleifera* (Plain, Supergenios y Criolla) se prepararon extractos acuosos e hidroalcohólicos al 70% (1/10) según la metodología descrita por Miranda.⁽⁷⁾ La extracción hidroalcohólica (etanol/agua) se realizó por el método de maceración durante 6 días con cambio del disolvente al tercer día a temperatura entre 25-28 °C, mientras que la extracción acuosa fue preparada por maceración a una temperatura menor de 50 °C.

Se determinó la Concentración Mínima Letal (CML) como la concentración más baja del extracto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y levaduriforme.

Análisis estadístico.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para el análisis estadístico se emplearon las medias y la desviación estándar como medidas descriptivas de la tendencia central y dispersión de datos respectivamente. Previo al procesamiento se evaluó la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Kolmogorov–Smirnov y el test de Bartlett respectivamente. La comparación entre grupos se realizó mediante un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA). Las medias se compararon a través de la prueba de Duncan. Por otro lado, las correlaciones entre los componentes mayoritarios y la CML se analizaron mediante cálculo del Coeficiente de correlación de Pearson. Todos los análisis estadísticos se efectuaron mediante el paquete estadístico SPSS 10.0.1.

RESULTADOS.

Cuantificación de polifenoles totales:

La tabla 1 muestra los resultados del contenido de polifenoles de los extractos acuosos e hidroalcohólicos que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El extracto hidroalcohólico del ecotipo Supergenius mostró la mayor concentración de polifenoles (94,54 mg/mL) y la menor el ecotipo Criolla. Mientras que, en la acuosa, esta variedad expresó la mayor concentración de este metabolito (23,97 mg/mL) y la Supergenius la menor.

De manera general se logró una mayor concentración con los extractos hidroalcohólicos en los ecotipos estudiados.

Cuantificación de flavonoides:

El extracto hidroalcohólico del ecotipo Plain mostró la mayor concentración de flavonoides (110,12 mg/mL) y la menor el ecotipo Criolla (80,91 mg/mL). De igual forma se comportó para la extracción acuosa, donde la Plain fue la de mayor concentración (27,36 mg/mL) y la Criolla la de menor concentración (18,44 mg/mL) (Tabla 1)

De igual forma la extracción hidroalcohólica extrajo la mayor concentración de flavonoides con respecto al acuoso. Esto pudiera estar relacionado con la polaridad de estos compuestos, y la gran versatilidad en su estructura química debido a la presencia de agliconas altamente metiladas hasta glicósidos.

Tabla 1. Cuantificación de flavonoides y polifenoles de las tres ecotipos de *Moringa*.

Ecotipo	Concentración de flavonoides (mg eq. quercetina /g .s)		Concentración de polifenoles totales (mg eq. pirogalol /g .s)	
	Ext. acuoso	Ext. 70%	Ext. Acuoso	Ext. 70%
Criolla	18,44/1,13b	80,91/1,64a	23,97/0,23b	71,23/0,38a
Supergenius	25,11/0,78b	97,67/0,97a	3,89/0,12b	94,54/1,67a
Plain	27,36/0,87b	110,12/0,75a	7,58/0,11b	93,77/0,65a

Leyenda: Los valores expresan el valor medio de las determinaciones/desviación estándar. Las letras a, b, indican las diferencias significativas $p < 0.05$ entre solventes para cada ecotipo por el Test de Bartlett

Correlación entre el contenido de polifenoles totales y el contenido de flavonoides.

Se realizó un análisis estadístico de correlación entre el contenido de estos compuestos presentes en los extractos acuosos e hidroalcohólicos para los tres ecotipos y la actividad antimicrobiana. Este análisis demostró que existe una correlación negativa y altamente significativa entre las concentraciones de flavonoides y la concentración inhibitoria media (CI_{50}) para las cepas *S. aureus* y *A. iwoffi* en los ecotipos *Criolla* (*S. aureus*; $r = -0,917$ y *A. iwoffi*; $r = -0,879$) y *Supergenius* (*S. aureus*; $r = -0,892$ y *A. iwoffi*; $r = -0,747$). Por otro lado, el ecotipo *Plain* mostró diferente comportamiento estadístico, siendo la correlación negativa y significativa entre las concentraciones de flavonoides y la CI_{50} de las cepas *Salmonella* ($r = -0,933$) y *C.albicans* ($r = -0,933$). La actividad antimicrobiana de los extractos frente a las cepas estudiadas pudiera deberse a la presencia de este metabolito.

Actividad Antimicrobiana:

Los valores de la actividad antimicrobiana se muestran en la Tabla 2.

Los extractos acuosos del ecotipo *Criolla* inhibieron el 46,66 % de las cepas estudiadas: (*Salmonella Typhi* ATCC9992), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) y *Staphylococcus aureus* (a.c 3cepas), *Candida albicans* (ATCC 10231), mientras que los extractos hidroalcohólicos inhibieron el 100 % de las cepas evaluadas. Alcanzando valores de CML (3,13 mg/g). Encontrándose diferencias significativas entre los extractos acuosos e hidroalcohólicos para $p < 0,05$.

Tabla 2: Actividad antimicrobiana de los tres ecotipos de *Moringa oleifera*.

Microorganismos	Criolla		Plain		Supergenius	
	Acuoso	70%	Acuoso	70%	Acuoso	70%
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	N	12,55	N	22,67	N	17,62
<i>Salmonella Typhi</i> (ATCC9992)	11,1b	3,13a	18,42b	5,66a	N	17,62
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	11,1b	3,13a	18,42b	5,66a	19,72	N
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	11,1b	3,13a	18,42b	5,66a	N	17,62
<i>Staphylococcus aureus</i> (a.c)	11,1b	3,13a	18,42b	5,66a	19,72b	5,31a
<i>Staphylococcus aureus</i> (a.c)	11,1b	3,13a	N	5,66a	19,72b	5,31a
<i>Staphylococcus aureus</i> (a.c)	11,1b	3,13a	N	5,66a	19,72b	2,65a
<i>Acinetobacter iwoffii</i> (a.c)	11,1b	3,13a	N	5,66a	9,86b	1,32a
<i>Acinetobacter iwoffii</i> (a.c)	N	12,55	N	22,67	9,86b	1,32a
<i>Enterobacter agglomerons</i> (a.c)	N	12,55	N	22,67	N	17,62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (a.c)	N	12,55	N	N	N	10,62
<i>Escherichia coli</i> (a.c)	N	12,55	N	22,67	N	17,62
<i>Escherichia coli</i> (a.c)	N	12,55	N	22,67	N	17,62

Leyenda: N negativo a, b, indican las diferencias significativas $p < 0.05$ entre los tipos de solventes y las concentraciones de cada variedad por el Test de Bartlett.

Los extractos acuosos del ecotipo Plain solo inhibieron el 26,66 % de las cepas: *Salmonella Typhi* (ATCC9992), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus aureus* (a. c) en el caso de los extractos hidroalcohólicos inhibieron el crecimiento en un 93,33 % de las cepas evaluadas, los extractos hidroalcohólicos presentan una mejor actividad antimicrobiana.

Los extractos acuosos del ecotipo *Supergenius* inhibieron el 40% de crecimiento de las cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Staphylococcus aureus* (a. c 3 cepas) *Acinetobacter iwoffii* (a. c 2 cepas), mientras que los extractos hidroalcohólicos mostraron un 93.33 % de inhibición de las cepas evaluadas con una CML de (1,32 mg/g b.s). Encontrándose diferencias significativas para ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN.

El contenido de polifenoles concuerda con lo planteado por Peschel,⁽¹¹⁾ quién afirmó que las mezclas hidroalcohólicas son frecuentemente empleadas para la extracción de este compuesto en *Moringa*. Por otra parte, la adición de agua en un 30 o 40% favorece también la extracción. Otros estudios

Las bacterias Gram positivas son más sensibles a los productos naturales que las bacterias Gram negativas debido a la estructura de la membrana y la pared celular tanto a nivel morfológico como fisiológico. Las bacterias Gram negativas poseen membrana externa resistente a los agentes antimicrobianos.⁽²⁵⁾ La pared celular de las bacterias Gram negativas contienen peptidoglucano, lipoproteína exterior y lipopolisacáridos que emergen hasta la superficie bacteriana, en general, esta es permeable sin selectividad específica.

Sin embargo, la membrana externa es semipermeable, lo cual delimita el paso de moléculas grandes, como es el caso de los metabolitos secundarios presentes en los extractos alcohólicos.⁽²⁶⁾

Con relación a la actividad antimicrobiana con la cepa *Candida albicans*, los extractos de los tres ecotipos evaluados inhibieron el crecimiento microbiano, exceptuando la extracción acuosa de Supergenius que no mostró actividad, lo cual tiene similitud a lo planteado por Moyo.⁽²⁷⁾ Según Martín,⁽²⁸⁾ encontró que los extractos acuosos presentan poca actividad antimicrobiana. Lo que puede estar dado a que el agua extrae otros metabolitos que pueden interactuar antagónicamente en esta actividad. Plantean además que los principios activos de las plantas no son fácilmente extraídos con agua.

Los resultados del estudio sugirieron que los extractos de hojas secas de *M. oleifera* de forma general presentan un potencial de compuestos antimicrobianos contra patógenos y su capacidad para eludir los mecanismos de resistencia, lo cual podría contribuir al tratamiento y la erradicación de enfermedades infecciosas. Estos resultados avalan la continuidad de otras investigaciones en la búsqueda de compuestos en las hojas secas de *M. oleifera* que presentan actividad antimicrobiana.

Moringa oleifera se presenta como una planta medicinal con benéficas implicaciones en el mejoramiento de la calidad de vida. En este estudio se evidenció que los extractos acuosos e hidroalcohólicos de las hojas de los tres ecotipos analizados de esta especie contienen polifenoles totales a una concentración que varían entre 3,89 y 110,12 mg/mL y una actividad antimicrobiana frente a los cultivos evaluados, siendo superior el efecto para los extractos hidroalcohólicos del ecotipo Criolla. Es de gran interés el enfoque sobre el estudio de las partes de esta planta a corto, mediano y largo plazo, así como sus repercusiones y bienestar en el ser humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González Minero José Francisco. Un estudio transversal de *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae). Departamento de Biología Vegetal y Ecología de Farmacia Universidad de Sevilla C/S. Fernando, 4 Dominguezia. 2018; vol. 34(1).

2. Escalona Cruz L J, Tase Aguilar A, Estrada Martínez A, Almaguer Mojena M L. Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. Rev Cub de Plant Med. 2015;20(4): 429-439.
3. Gaikwad M, Kale S, Bhandare S, Urunkar V, Rajmane A. Extraction, Characterization and Comparison of Fixed oil of *Moringa oleifera* L & *Moringa concanensis* Nimmo Fam. Moringaceae. Int. J. of PharmTech Research. 2011;3(3):1567-1575.
4. Kotb D, Shahein M, Abd M, Metwally M. Determination of polyphenolic compounds and antioxidant activity of olive leave, Moringa leave and marigold petals extracts. World Journal of Dairy & Food Sciences. 2017, 12(2): 102-107; doi: 10.5829/idosi.wjdfs.2017.102.107.
5. Khan R A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. Saudi Pharm. J. 2018;26(5): 739–753. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2018.02.015>.
6. Ministerio de Medio Ambiente. *Gobierno de España*. Obtenido de Vigilancia de zoonosis y resistencia antibacteriana: <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/zoonosis-resistencias>. antimicrobianas/resistencias_antimicrobianas.aspx. Junio de 2017.
7. Miranda M, Cúellar A. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Ed. Félix Varela, MES. 2001; Cap. XI.
8. Farmacopea Británica (Ph Eur monograph 1426 Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations. 2009; Vol III.
9. Woisky R, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J. of Apic Research. 1998;37(2): 99-105
10. Wayne Pa. National Commite for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. 2000; M7-A5. NCCLS.
11. Peschel W, Sánchez-Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzía I, Jiménez D, Lamuela-Raventós R, Buxaderas S, Codina C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. Food Chemistry. 2006;97(1): 137-150.
12. Tijjani, MI Bello, A Aluyu, T Olurishe, S Maidawa, J Habila, E Balogun Phytochemical and antibacterial Studies of Root Extract of *Cochlospermum tinctorium* A. Rich (Cochlospermaceae). Res. J. Med. Plants. 2009; 3: 16-22.
13. Oudot C, Gomes A, Nicolas V, Le Gall M, Chaffey P, Broussard C, Brenner C. CSRP3 mediates polyphenols-induced Cardioprotection in hypertension. J. Nut. Bioch. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2019;01.001>.

14. Farzaei M H, Tewari D, Momtaz S, Argüelles S, Nabavi SM. Targeting ERK signaling pathway by polyphenols as novel therapeutic strategy for neurodegeneration. *Food and Chem Toxicol*, 120, 183–195. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018;07.010>.
15. Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one- dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80: 1925–1941.
16. Brilhante RSN, Sales JA, Pereira VS, Castelo-Branco DSCM, Cordeiro RA, Sampaio CMS. Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pacific J. of Tropical Med*. 2017; 10(7): 621–630.
17. Moya Sarasti Pamela Dayana Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante la extracción de la fracción activa presente en las hojas de la especie vegetal moringa oleífera frente a microorganismos patógenos. Universidad central del Ecuador Facultad de Ciencias Químicas química farmacéutica. DMQ, MARZO. Proyecto de investigación presentado como requisito previo para la obtención del título de: Químico Farmacéutico, 2018.
18. Cabrera Carrión José L, Jaramillo Jaramillo Carmita, Dután Torres Fausto, Cun Carrión Jorge, García Pedro A, Rojas de Astudillo Luisa. Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* lam. en función de su edad y altura *Bioagro*. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado Barquisimeto, Venezuela. 2017; vol. 29, núm. 1pp. 53-60.
19. Patra AK. An overview of antimicrobial properties of different classes of phytochemicals. In: Patra AK (Ed.), *Dietary phytochemicals and microbes*. 2012; XII: 1-32.
20. Chevill L, Humeau C, Falcimaigne A, Engasser JM, Ghoul M. Enzymatic Acylation of Flavonoids. *Process. Biochem*. 2006;41:2237-2251.
21. Domingo D, López Brea M. Plantas con actividad antimicrobiana. *Rev. Esp Quimioterap. Esp*. 2003;16(4):385-393.
22. Sahin S, Samli R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound -assisted extraction with response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20: 595.
23. Akhtar M, Moosa Hasany S, Bhanger MI, Iqbal S. Sorption potential of *Moringa oleifera* pods for the removal of organic pollutants from aqueous solutions. *J. of Hazardous Materials*. 2007; 141(3):546-56.
24. Paikra BK, Dhongade HKJ, Gidwani B. Phytochemistry and Pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. *J. of Pharmacopuncture*. 2017; 20(3):194-200.

25. Zaidan MRS, Noor Rain A, Badrul AR. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Trop Biomed. 2005;22(2):165–170. Disponible en: http://www.msptm.orgfiles/165_-_170_In_vitro_screening.Pdf.
26. Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microb. Reviews 1999;12(4):64. Disponible en: <http://cmr.asm.org/content/12/4/564.long>.
27. Moyo B, Oyedemi S, Masika PJ, Muchunje V. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/ sunflower seed cake. Meat Sci. 2012;91(4):441-7
28. Martin N, Eloff JN. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum*- (Combretaceae). J. Ethnophar. 1998;62:255-263.