

Trabajo científico

Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana

Physical, physical-chemical and chemical characterization of total extracts of fresh leaves from *Petiveria alliacea* L. with antimicrobial action

Ania Ochoa Pacheco,¹ Jorge Marin Moran,¹ Damari Rivero Breff,² Eva María Aguilera Saborit.²

¹ Universidad de Oriente

² Universidad Médica de Holguín “Mariana Grajales Coello”

Resumen

Se realizó la caracterización física, físico-química y química de extractos totales: 2 blandos: proporciones 1:8 (B₃); 1:12 (B₄) y 3 batidos: proporciones 1:4 (E₁), 1:6 (E₂), 1:8 (E₃); a partir de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. y utilizando como menstruo solución hidroalcohólica al 80 %. Los parámetros de control de la calidad determinados fueron: características organolépticas; sólidos totales; densidad relativa; pH; cenizas totales; tamizaje fitoquímico (Norma Ramal de Salud Pública de Cuba); concentración de fenoles y flavonoides totales. Los resultados muestran los valores de los parámetros en cada uno de los extractos. El extracto blando B₃ mostró mayores valores en los sólidos totales, densidad relativa, cenizas totales, fenoles totales, por cientos de fenoles totales en base a la hoja fresca y flavonoides totales que el extracto batido E₃.

Abstract

It was made the physics, chemical-physics and chemical characterization of total extracts: 2 soft: proportions 1:8 (B₃); 1:12 (B₄) and 3 blended: proportions 1:4 (E₁), 1:6 (E₂), and 1:8 (E₃); from fresh leaves of *Petiveria alliacea* L. and using as menstruous: hydroalcoholic solution at 80%. The parameters of the quality control determined were: organoleptics characteristics, total solids, relative density, pH, total ashes, phytochemical screening (Brunch Norm of Public Salud of Cuba), concentration of total fenols and flavonoids. The results showed the valors of the parameters in the extracts. The soft extract B₃ showed bigger valors in the total solids, relative density, total ashes, total fenol and percent of the totals fenois according the fresh leaves and total flavonoid that blended extract E₃.

Palabras clave: Extractos totales, Parámetros de control de la calidad, Anamú, Estudio tecnológico.

Key words: Total extracts, Parameters of quality control, Anamú, Technological study.

Correspondencia:

MSc. Ania Ochoa Pacheco
Pizarro #24 %Trocha y 1ra, Rpto Flores, Santiago de Cuba, Cuba, CP90300. Telef: 05322-656729
e-mail: aochoa@cnt.uo.edu.cu

Fecha de recepción: 11 de octubre de 2012

Fecha de recepción de modificaciones: 10 de abril de 2013

Fecha de aceptación: 23 de abril de 2013

Introducción

La Medicina Verde, que no es más que el empleo de las plantas medicinales para el tratamiento de numerosas enfermedades, a pesar de ser muy antigua y de transmitirse de generación en generación, constituye no solo el rescate de un rico acervo cultural, sino también una alternativa de solución a los problemas en el campo de la salud pública y es objeto de investigación científica en la actualidad, garantizando la calidad tecnológica, eficacia terapéutica e inocuidad de las mismas.^{1,2}

Cuba posee una rica flora y una valiosa tradición en el uso de las plantas medicinales. En tal sentido, se realizan investigaciones que permiten evaluar científicamente el uso de los productos naturales, garantizando las mismas la eficacia, seguridad, calidad y estabilidad tecnológica, biodisponibilidad y costo; contribuyendo de esta forma a la búsqueda de soluciones a los problemas de salud existentes en cada territorio, brindando alternativas terapéuticas asequibles a la población.

El anamú (*Petiveria alliacea* L.), es una planta de la familia *Phytolaccaceae*, conocida con distintos nombres en diferentes países de Centro y Sur América, el Caribe y África. Se describe como una hierba perenne de tallo recto, poco ramificado de 0.5 a 1 m de alto, con hojas alternas en forma elíptica, de 6 a 19 cm de largo y de 5 a 6 cm de ancho. Sus flores son pequeñas de color blanco, el fruto es una baya cuneiforme que presenta cuatro ganchos doblados hacia abajo y se usa como planta medicinal. Entre los usos etnomédicos actuales, se encuentran: antiinflamatorio, antimicrobiano, antiherpético, analgésico, inmunomodulador, anticancerígeno, hipoglicemiante, para las infecciones cutáneas micóticas e psoriásicas.^{3,4,5}

Se han llevado a cabo investigaciones farmacognósticas, fitoquímicas, preclínicas farmacológicas en el Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente con esta especie vegetal; entre estas últimas se encuentra la evaluación de la actividad antimicrobiana^{6,7} de extractos totales de la hoja fresca; a través del método de Kirby-Bauer,⁸ teniendo en cuenta, entre varios aspectos, la observación de que extractos vegetales de esta droga estudiados como principios activos antiinflamatorios, no sufren contaminación microbiana cuando se han expuesto a condiciones no controladas de almacenamiento; mostrando 9 de ellos actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, incluso, en dos de ellos (E₂ y E₃),⁷ comparable a la Ciprofloxacina en el rango intermedio (14-17 mm) para *P. aeruginosa*, según el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico Estándar (NCCLS).⁸

A partir de estos resultados farmacológicos alentadores, se requiere realizar la caracterización de estos extractos totales a

través de la determinación de sus parámetros de control de la calidad y así garantizar la calidad física, físico-química y química que los mismos deben tener para su futuro uso en el ser humano en formas farmacéuticas, con acción antimicrobiana.

Estos antecedentes fundamentan la investigación que se propone, respondiendo al siguiente problema científico: "Necesidad de caracterizar desde el punto de vista físico, físico-químico y químico extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con actividad antimicrobiana".

Lo anterior permite formular el siguiente objetivo: Caracterizar desde el punto de vista físico, físico-químico y químico extractos totales de las hojas frescas de la *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana.

Material y método

Esta investigación es un estudio Tecnológico, que tiene como propósito determinar parámetros físicos, físico-químicos y químicos que serían herramientas de control de la calidad de esos extractos vegetales, si se decidieran utilizar para elaborar formas farmacéuticas antimicrobianas.

Recolección y procesamiento del material vegetal.

Para la recolección del material vegetal, se tuvieron en cuenta una serie de criterios de inclusión y exclusión: que las plantas estuvieran alejadas de caminos y carreteras para evitar trabajar con material contaminado con plomo proveniente de la combustión de gasolina, pues el mismo puede precipitar determinados metabolitos, como por ejemplo los flavonoides, en el proceso de extracción. Esto evita además el estrés metabólico de las plantas; que la población estuviera integrada por no menos de 6 individuos para aumentar la confiabilidad estadística de los resultados; que la mayor parte de los individuos de la población seleccionada se encontraran en estado desarrollado para evitar diferencias metabólicas debidas al grado de desarrollo de la planta; que los individuos de la misma, no se encontraran agrupados en forma de cortina, evitando así que cambios en el tipo de suelo alteren los resultados.

Preparación de los extractos.

Los extractos que se prepararon fueron:

1. Extracto blando con solución hidroalcohólica al 80%.
2. Extracto batido con solución hidroalcohólica al 80%.

La metodología de preparación de los extractos, es la que se describe a continuación:

Para el extracto blando: Se partió de la droga fresca fraccionada; luego se preparó el extracto fluido por el método de percolación,

utilizando como menstruo etanol-agua al 80% teniendo en cuenta resultados previos ^{6,7} y según Norma Ramal de Salud Pública de Cuba 311 (NRSP).⁹ A partir de éste, se obtuvieron 2 extractos blandos (**B**) por evaporación, en un rotoevaporador marca KIKA-Werke de procedencia Alemana, según NRSP 311.⁹ Estos extractos blandos; se obtuvieron en dos proporciones: **B3** – Proporción 1:8 **B4** – Proporción 1:12

Para el extracto batido: Se partió de las hojas frescas y se batieron en una batidora marca Waring de procedencia americana; se añadieron en pequeños intervalos, determinados volúmenes de alcohol para facilitar el batido de las hojas; hasta completar la cantidad determinada de menstruo. Luego se maceró por 48 horas este extracto, al cabo de los cuales se filtró al vacío; obteniéndose un extracto denominado (**E**). A partir del mismo se tomaron determinados volúmenes para obtener 3 proporciones de este extracto, por rotoevaporación en un rotoevaporador marca KIKA-Werke de procedencia Alemana, a una temperatura de 35°C; a los cuales se denominaron: **E1** -Proporción 1:4 **E2** - Proporción 1:6 **E3** -Proporción 1:8

Determinación de parámetros de control de la calidad Físicos, Físico-químicos y Químicos de los extractos.

Determinación de parámetros Físicos y Físico-químicos.

Se determinaron, según la NRSP 312,¹⁰ los parámetros que se describen a continuación:

a) Características organolépticas:

Determinación del olor: Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm. de anchura por 10 cm. de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se olió y se determinó si correspondía con las características del producto.

Determinación del color: Se tomó un tubo para ensayos bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas. Se informó el resultado.

b) Sólidos totales: De la muestra de ensayo previamente homogenizada se transfirieron 5 mL. a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en un baño de agua y se evaporó hasta que el residuo estuvo aparentemente seco, posteriormente se pasó a una estufa a una temperatura de 105 +/- 2 °C durante 3 horas. Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el proceso anterior, pero empleando solo 60 minutos de secado, las veces necesarias, hasta obtener una masa constante.

Los sólidos totales (St)(g/100 mL) se calcularon mediante la fórmula siguiente:

$$S_t = (Pr-P)/V \times 100$$

Donde:

Pr..... masa de la cápsula más el residuo (g)
P..... masa de la cápsula vacía (g)
V..... volumen de la porción de ensayo (mL)
100..... factor matemático

El ensayo se realizó por triplicado. Los valores se aproximaron hasta la décima.

c) Densidad relativa: De la muestra de ensayo se tomó la cantidad necesaria de acuerdo con la capacidad del picnómetro y se enfrió a 25°C. Se pesó el picnómetro limpio, vacío y seco con un error máximo permisible de +/- 0.5 mg, y se llenó con la muestra de ensayo de modo que no quedaran burbujas de aire, si es preciso se emplea una tira de papel de filtro para extraer el exceso de muestra. Se sumergió en un baño de agua a (25 +/- 1°C) durante 30 minutos, al cabo de las cuales se tapó, se secó exteriormente cuidando de no frotar excesivamente o de transmitir el calor de la mano y se pesó. Se vació el picnómetro, se lavó con alcohol etílico y posteriormente con agua, repitiéndose el ensayo con agua enfriada a 25°C.

La densidad relativa (Dr.) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Dr = (m_1 - m) / (m_2 - m)$$

Donde:

m: masa del picnómetro vacío (g).
m1: masa del picnómetro con la muestra de ensayo (g).
m2: masa del picnómetro con agua (g).

Si la determinación se hizo a la temperatura t se emplea la fórmula siguiente:

$$d_{25}^{25} = d_{25}^t + 0.00080 (t - 25)$$

Donde:

d_{25}^t : densidad relativa a la temperatura de medición.
T: temperatura de la medición (°C).
0.00080: factor de corrección.

El ensayo se realizó por triplicado. Se aceptó una diferencia entre las determinaciones de 0.0002 como máximo. Los resultados se aproximaron hasta la milésima.

d) pH: Se determinó según se establece en la Norma Cubana: NC 90-13-13.¹⁰ Se utilizó un pHmetro marca HANNA pH 211 de procedencia alemana.

Según NRSP 309 de Cuba:¹¹

e) Cenizas totales: En un crisol de porcelana o platino, se añadieron 2 mL de la muestra de ensayo (5 muestras, una por cada una de los extractos). Se calentó suavemente la muestra de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar (550°C) y

posteriormente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750°C, durante 2 horas. Se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó. Se repitió el proceso a partir de la incineración, hasta obtener una masa constante, es decir, hasta que no difirieran en más de 0.5 mg/g, 2 pesadas consecutivas. Para obtener la masa constante el tiempo de calentamiento y pesada se hicieron en intervalos de 30 minutos. Si el residuo presentaba trazas de carbón, se le añadieron unas gotas de solución de peróxido de hidrogeno concentrado, ácido nítrico concentrado o solución de nitrato de amonio 10g/100mL y se calentó hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol, el residuo es de color blanco o casi blanco. El ensayo se realizó por triplicado.

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS.

f) Determinación cualitativa de principios activos (Tamizaje Fitoquímico).^{12,13}

g) Determinación de Fenoles totales: Se empleó el método de Folin Ciocalteu.¹⁴ Los resultados se expresaron como ácido tánico a partir de una curva de calibración obtenida para este compuesto, en el rango 0.4 a 1.4 $\mu\text{g/mL}$.

Para todos los extractos se tomaron 0.5 mL de cada uno y se diluyeron en un volumétrico de 50 mL respectivamente. Los 5 volumétricos se enrasaron y rotularon, conservándose a resguardo de la luz.

Para la preparación del blanco, se tomaron 5 mL de agua destilada, y se llevaron a un volumétrico de 25 mL, luego se añadieron 2 mL de la solución reactivo para taninos (Folin Ciocalteu), se agitó moderadamente y se adicionó 1 mL de la solución de carbonato de sodio para enrasar con agua destilada y homogenizar.

En la preparación de la muestra a medir se filtró con papel de filtro la solución muestra de ensayo. Para los **extractos blandos** se tomó 1 mL de la muestra de ensayo y se añadió a un volumétrico de 100 mL. Luego se añadieron 2 mL de la solución reactivo, se agitó circularmente y se dejó reposar 5 minutos. Posteriormente se añadió 1 mL de carbonato de sodio al 20 por ciento, se enrasó, homogenizó y se dejó reposar por 5 minutos para medir la absorbancia en el espectrofotómetro (ULTROSPEC 1000 de procedencia inglesa) a 700 nm de las disoluciones preparadas anteriormente. Para los **extractos batidos** se procedió también de la forma anterior pero se tomaron 0.5 mL de la muestra de ensayo y se añadieron en un volumétrico de 25 mL. Las mediciones se realizaron por triplicado para cada extracto.

La ecuación matemática empleada para el cálculo de la concentración de la muestra expresada como ácido tánico fue:

Conc. del Extracto = Conc. Equivalente de ácido tánico x Factor mat. de dilución.

La concentración equivalente de ácido tánico para los extractos, es la que se obtiene al despejar en la ecuación del modelo

ajustado que se obtiene para la curva de calibración del ácido tánico, la variable concentración de ácido tánico y se calcula a través del STATGRAPHICS Plus para Windows Versión 5.1 del año 2001.

h) Determinación de Flavonoides totales: Estos metabolitos se determinaron por un método colorimétrico por reacción con cloruro de aluminio en metanol a 430 nm. Los resultados se expresan como quercetina a partir de una curva de calibración obtenida para dicho compuesto en el rango de 1 a 7 $\mu\text{g/mL}$.¹⁵ Para las mediciones se empleó un espectrofotómetro ULTROSPEC 1000 de procedencia inglesa.

La ecuación matemática empleada para el cálculo de la concentración de la muestra expresada como quercetina fue:

Conc. del Extracto = Conc. Equivalente de Quercetina x Factor mat. de dilución.

La concentración equivalente de quercetina para los extractos, es la que se obtiene al despejar en la ecuación del modelo ajustado que se obtiene para la curva de calibración de la quercetina, la variable Concentración de Quercetina y se calcula, a través del STATGRAPHICS Plus para Windows Versión 5.1 del año 2001.

Marcha operatoria: En un volumen de 10 mL se añadieron:

- 1 mL de la muestra
- 1 mL del cloruro de aluminio al 2,5% en metanol, se agitó y se dejó reposar por 10 min.
- Se enrasó con etanol absoluto y se realizó la medición contra blanco de reactivos a 430 nm.

Para la determinación del contenido de flavonoides en los extractos totales (**B₃**, **B₄**, **E₁**, **E₂** y **E₃**) en estudio se realizaron diluciones en agua en proporción 0,5:50 para preparar la muestra de ensayo y luego 1:10 para la muestra a medir.

Procesamiento y análisis de los resultados. Análisis Estadísticos.

Se realizó un análisis estadístico, utilizando el programa STATGRAPHICS Plus para Windows Versión 5.1 del año 2001, realizando un Análisis de Varianza de Clasificación simple, con una prueba de rangos múltiples (Prueba de diferencia francamente significativa HSD de Tukey) para evaluar si los extractos **B₃** y **B₄**; así como **E₁**, **E₂** y **E₃**; también **B₃** y **E₃** presentaron semejanzas o diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de control de la calidad cuantitativos determinados.

Resultados y discusión

Determinación de parámetros de control de la calidad Físicos, Físico-químicos y Químicos a los extractos.

Determinación de parámetros físicos y físico-químicos.

La Tabla 1 muestra los resultados del control de la calidad físicos y físico-químicos a los extractos evaluados.

En la medida en que se concentran ambos extractos (de **B₃** a **B₄** y de **E₁** a **E₃**) el por ciento de **sólidos totales** aumenta en cada uno de ellos (Tabla 1). Estos valores demuestran la presencia de sustancias en estos extractos con solución hidroalcohólica al 80%.

Tabla 1. Resultados promedios de los controles de la calidad físicos y físico-químicos a los extractos.

En los valores de Densidad relativa se muestran la media \pm desviación estándar. Letras diferentes representan una diferencia significativa entre muestras ($p \leq 0.05$), en cada uno de los extractos.

Extractos	Características organolépticas	Sólidos Totales (g/100mL)	Densidad Relativa (g/ml)	pH
B₃	Color: Marrón oscuro Olor: Aliáceo	18.62	$1.0826 \pm 0.0008a$	5.96
B₄	Homogeneidad Color: Marrón oscuro Olor: Aliáceo	25.22	$1.1451 \pm 0.0002b$	5.886
E₁	Homogeneidad Color: Marrón oscuro Olor: Aliáceo	8.12	$1.0073 \pm 0.01c$	5.786
E₂	Homogeneidad Color: Marrón oscuro Olor: Aliáceo	10.54	$1.0299 \pm 0.008c$	5.86
E₃	Homogeneidad Color: Marrón oscuro Olor: Aliáceo Homogeneidad	14.54	$1.0451 \pm 0.01ac$	5.913

Como se observa, se obtiene mayor por ciento de sólidos totales en el extracto blando **B₃** que en el batido **E₃**, con diferencias estadísticas para un 95 % de confianza; lo que difiere de resultados obtenidos en estudio anterior;⁷ donde se obtuvo mayor por ciento de sólidos totales en los extractos batidos que en los blandos en las tres proporciones que se probaron y donde se planteó que la técnica de extracción usando batidora permite obtener mayor cantidad de sustancias con respecto a la percolación. También los valores de sólidos totales en este estudio, para los tres extractos batidos (**E₁**, **E₂**, **E₃**), son más bajos que los obtenidos en estudio anterior⁷ (**13.17**, **18.97**, **22.21 g/100 mL**,⁷ respectivamente).

Estas diferencias, pudieran deberse, a que las condiciones climáticas invernales en el inicio de este año fueron totalmente

diferentes a la investigación anterior, específicamente cuando se recolectó el segundo lote de droga para preparar los extractos batidos hubo un régimen de precipitaciones abundantes debido a la entrada de un frente frío en la región oriental y como se ha descrito en la literatura:¹³ en la composición química de una especie vegetal influyen varios factores, tanto externos, como internos, entre los cuales se encuentran: el clima, el cual siempre incluye la temperatura, régimen de lluvias, luz, humedad, latitud, altitud, el suelo, entre otros; además la humedad, que depende de la altitud y del régimen de precipitaciones, puede producir pérdidas de sustancias solubles de hojas y raíces,¹³ en particular glicósidos y aceites esenciales, metabolitos que forman parte de la composición química de las hojas del anamú y que son solubles en la solución hidroalcohólica al 80 %.

Se puede resumir, que los menores valores en sólidos totales en el extracto **E₃** con respecto a **B₃**; así como los tres extractos batidos obtenidos en este estudio con respecto a estudio anterior,⁷ pudieran deberse a una posible dilución de los compuestos químicos presentes en las hojas por las abundantes precipitaciones que ocurrieron durante el período de recolección del segundo lote de la droga que hicieron que aumentara el contenido de agua en la hoja.

Estos resultados también se obtuvieron en el 2006, cuando al realizar la estandarización de los parámetros de control de la calidad del extracto blando de las hojas secas con solución hidroalcohólica al 30 %, se obtuvieron valores bajos de sólidos totales en el mes de Noviembre (27.4 g/100mL), debido a las abundantes precipitaciones que ocurrieron; sin embargo, al terminar estas, a partir del mes de diciembre, se empezaron a obtener valores mayores en este parámetro hasta llegar a 40.1 y 40.3 g/100mL en los meses de Abril y Mayo.¹⁶

El análisis estadístico reveló que entre los dos extractos blandos, así como entre los 3 batidos; existen diferencias estadísticamente significativas para un 95 % de confianza. La prueba de Cochran, indica que hay homogeneidad de varianza, pues el p-valor es mayor que 0.05.

Los valores obtenidos en la **densidad relativa** (Tabla 1), corroboran que el valor de densidad para el extracto batido **E₃** es menor que para el blando **B₃**, que aumentan en la medida en que ambos tipos de extractos están más concentrados y también son diferentes a los obtenidos en estudio anterior: (**B₃: 1.03 g/mL**, **B₄: 1.05 g/mL**, **E₁: 1.04**, **E₂: 1.05**, **E₃: 1.07 g/mL**).⁷ La densidad de la solución hidroalcohólica al 80 % es de 0.8434 g/mL, por lo que los valores obtenidos para cada uno de los extractos, demuestran la presencia de sustancias. El análisis estadístico demuestra que entre los dos extractos blandos existen diferencias estadísticas, no así entre los 3 batidos para un 95% de confianza. La prueba de Cochran, indica que hay homogeneidad de varianza, pues el p-valor es mayor que 0.05 (P-valor = 0.203786).

En el caso del **pH**, los valores obtenidos corroboran las características ácidas débiles de las sustancias que se extraen en estos extractos; tales como flavonoides, fenoles y taninos, ácido benzoico, oleico, esteárico, lignocérico, entre otros. Parece ser que compuestos que se extraen por ambos métodos de extracción, mantienen las características ácidas débiles.

Los resultados promedios de la determinación de cenizas totales a cada uno de los extractos, se muestran en la Tabla 2. Como se observa en la misma, en cada uno de los extractos se obtienen cenizas, por lo que puede existir la presencia de restos inorgánicos, que además están reportados para el Anamú en hojas y raíces.^{3,17} La cantidad de cenizas totales aumentan en la medida en que se concentran los extractos; siendo superior en el extracto **B₄**, que es el más concentrado de todos con una proporción de 1:12.

Tabla 2. Resultados promedios de la determinación de cenizas totales (g).

B ₃	B ₄	E ₁	E ₂	E ₃
0.0473	0.1114	0.03355	0.04555	0.05395

Determinación de parámetros químicos.

a) Determinación cualitativa de principios activos (Tamizaje Fitoquímico).

Los resultados del tamizaje fitoquímico se muestran en la Tabla 3.

Entre los dos tipos de extractos (**blandos y batidos**), no existen diferencias en la composición química desde el punto de vista cualitativo.

Tabla 3. Resultados del Tamizaje Fitoquímico a los extractos.

Metabolitos	Ensayos	Evidencia	B ₃	B ₄	E ₁	E ₂	E ₃
Flavonoides	H ₂ SO ₄ conc.	Amarillo intenso	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Shinoda	Rojo	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Fenoles y Taninos	FeCl ₃	Verde oscuro	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Saponinas	Espuma	Espuma persistente	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Quinonas	Borntrager	Rosado	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
Triterpenos y Esteroides	Lieberman-Burchard	Verde oscura	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado rojo ladrillo	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)

a) Determinación de Fenoles totales.

La ecuación de la recta y los estadígrafos obtenidos para la curva de calibración con ácido tánico, son los siguientes:

$$\text{Absorbancia} = -0,00660952 + 0,0677143 \times \text{concentración}$$

Ecuación 1

$$r^2 \text{ ajustado} = 98,7021 \% \quad F = 381,24 \quad p = 0,0000 \quad p. \text{intercepto} = 0,1188$$

Como reflejan los estadígrafos de la recta, la curva de calibración obtenida cumple con los principales requisitos de aceptación, expresando un 98.7021 % de ajuste de los datos con el modelo, con un intercepto que atraviesa el cero con un 99 % de confianza (desde -0,00660952 hasta 0,00333845).

Bajo estas condiciones se puede afirmar que la ecuación obtenida puede ser empleada para la determinación cuantitativa de fenoles totales expresados como ácido tánico.

A partir de la **ecuación 1**, despejando la variable **concentración**, como se muestra a continuación; se determinan, con los valores de absorbancia de cada uno de los extractos, la concentración de polifenoles equivalente a ácido tánico para esa absorbancia. Luego este valor es multiplicado por el factor de dilución (1000 para los blandos y 5000 para los batidos), rindiendo los valores de fenoles totales para cada uno de los extractos que se recogen en la Tabla 4.

$$\text{Absorbancia} = -0.00660952 + 0.0677143 \times \text{Concentración.}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia} + 0.00660952}{0.0677143}$$

Se observa (Tabla 4) que la concentración de fenoles totales aumenta en la medida en que se incrementa la concentración de ambos extractos, siendo superiores estos valores en el extracto **B₃** con respecto a **E₃**, con diferencias estadísticas para un 95 % de confianza; estando en correspondencia con los resultados obtenidos en los **sólidos totales** en este trabajo.

Tabla 4. Valores de concentración de fenoles totales, expresados como ácido tánico para cada uno de los extractos.

Extractos	B ₃	B ₄	E ₁	E ₂	E ₃
Concentración media de Fenoles totales (mg/mL)	7.573	8.706	2.013	2.605	3.86
Estadígrafos del ANOVA	F = 601,48 P-Valor = 0,0000				

El análisis de varianza mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los 5 extractos, a un nivel de confianza del 95 %. El test de rangos múltiples, específicamente la prueba diferencia francamente significativa de Tukey, mostró que la concentración de fenoles

totales entre los dos extractos blandos, así como entre los tres batidos son diferentes. El contraste de Cochran (0,336932) indica que hay homogeneidad de varianza, por lo que el error que se comete en esta determinación es el mismo.

Los por cientos que representan la cantidad de fenoles totales, en cada uno de los extractos, en base a la hoja fresca, se muestran en la Tabla 5. En el caso del extracto blando **B₃**, el por ciento de fenoles totales es mayor que el extracto batido **E₃**, manteniéndose la influencia de las precipitaciones en los fenoles totales. Como se observa, la concentración de fenoles totales es baja en la hoja fresca; no obstante, indican la posible presencia de compuestos químicos con agrupamientos fenólicos, como flavonoides, taninos, fenoles propiamente dichos (con resultados positivos en el tamizaje); a los cuales se les han reportado acción antimicrobiana.¹⁸⁻²¹

Tabla 5. Valores de los por cientos de fenoles totales, en base a la hoja fresca.

Extractos	B ₃	B ₄	E ₁	E ₂	E ₃	B ₃
Por cientos que representan los fenoles totales, en base a la hoja fresca. (%)	0.088	0.076	0.05	0.044	0.048	0.088

c) Determinación de flavonoides totales.

La ecuación de la recta y los estadígrafos obtenidos para la curva de calibración con quercetina, son los siguientes:

Absorbancia= 0.00842857 + 0.07725 x Conc. Quer.
Ecuación 2

r^2 ajustado= 99,6934 % F= 1952,17 p= 0,0000 p. intercepto=0,3303

Conc. Quer: Concentración de Quercetina.

Como reflejan los estadígrafos de la recta, la curva de calibración obtenida cumple con los principales requisitos de aceptación, expresando un 99,6934 % de ajuste de los datos con el modelo, con un intercepto que atraviesa el cero con un 99 % de confianza (desde 0,00842857 hasta 0,00781906).

Bajo estas condiciones se puede afirmar que la ecuación obtenida puede ser empleada para la determinación cuantitativa de flavonoides totales expresados como quercetina.

A partir de la ecuación 2, despejando la variable **concentración Quer.**, como se muestra a continuación, se determinan, con los valores de absorbancia de cada uno de los extractos, la concentración de Flavonoides equivalente a quercetina para esa absorbancia. Luego este valor es multiplicado por el factor de dilución (1000 para todos los extractos), rindiendo los valores de flavonoides totales para cada uno de los extractos que se recogen en la Tabla 6.

$$\text{Absorbancia} = 0.00842857 + 0.07725 \times \text{Conc. Quer.}$$

$$\text{Conc. Quer} = \frac{\text{Absorbancia} - 0.00842857}{0.07725}$$

Se observa que la concentración de flavonoides totales aumenta en la medida en que se incrementa la concentración de ambos extractos, siendo superiores estos valores en el extracto **B₃** con respecto a **E₃**, manteniéndose la influencia de las precipitaciones en los flavonoides totales.

Tabla 6. Valores de concentración de flavonoides totales, expresados como quercetina para cada uno de los extractos.

Extractos	B ₃	B ₄	E ₁	E ₂	E ₃	B ₃
Concentración de Flavonoides totales (mg/mL)	2.130	2.532	1.026	1.305	1.922	2.130

Los por cientos que representan la cantidad de flavonoides totales, en cada uno de los extractos, en base a los fenoles totales, se muestran en la Tabla 7.

Los por cientos que representan la cantidad de flavonoides totales, en base a los fenoles totales, mostraron un 28 y 29 % para **B₃** y **B₄**, respectivamente; para los extractos batidos **E₁**, **E₂** y **E₃** un 51, 50.1 y 50.6 %, respectivamente. Como se observa, los por cientos son similares en cada proporción de los extractos dentro de cada método de extracción. **En los batidos**, hay una mayor pérdida de los fenoles no flavonoides (por ejemplo, taninos) por solubilización debido a las precipitaciones.

Tabla 7. Valores de los por cientos de flavonoides totales, en base a los fenoles totales.

Extractos	B ₃	B ₄	E ₁	E ₂	E ₃	B ₃
Por cientos que representan los flavonoides en base a fenoles totales. (%)	28	29.06	51	50.1	50.6	28

Conclusiones

1. La caracterización física, físico- química y química a los 5 extractos estudiados, arrojó: Las características organolépticas para todos los extractos son: color marrón oscuro, olor aliáceo y homogeneidad; los valores de pH para todos los extractos, mostraron que se extraen sustancias en la solución hidroalcohólica al 80 %, por ambos métodos de extracción, con características ácidas débiles; las concentraciones de fenoles y flavonoides

totales, aunque bajas, indican la presencia de tales compuestos en todos los extractos; las cenizas obtenidas, aunque bajas, indican la presencia de restos inorgánicos, en cada uno de los extractos; la composición química cualitativa para los 5 extractos mostró la presencia de Flavonoides, Fenoles y Taninos, Saponinas, Quinonas, Triterpenos y Esteroides Alcaloides.

2. El extracto blando **B₃** mostró mayores valores en los sólidos totales, densidad relativa, cenizas totales, fenoles totales, por cientos de fenoles totales en base a la hoja fresca y flavonoides totales que el extracto batido **E₃**; estos aumentan en la medida en que se concentran los extractos para cada tipo.

Referencias

1. García N.M.N. Saber hacer sobre plantas medicinales. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, 1995:13.
2. Rojas E., Pubillones A. Estudio fitoquímico preliminar de flavonoides de hojas y raíz de *Petiveria alliacea* L. [Tesis de Diploma]. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 1998: 10-20.
3. Illnait J.F. Principales Referencias Etnomédicas Sobre el Anamú. Revista CENIC. Ciencias biológicas 2007; Vol. 38, No. 1: 27-30. Artículo disponible en:
URL:<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/rev.cen-c- ciencias-biológicas-art.-sobre-anamú.pdf>. Actualización: Diciembre del 2009.
4. Flora de la República de Cuba-Serie B, Plantas Avasculares-Fascículo 6-2002:2-3.
5. Anamú (*Petiveria alliacea* Lin.). Artículo Disponible en: URL: www.hipermercadonatural.com/index.php?main. Actualización: Marzo del 2010.
6. Mujawimana R. J., Tamayo K. G. Evaluación antimicrobiana de extractos totales de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú). [Tesis de Diploma]. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 2008:1-45.
7. Hidalgo A.R. Preclínica Antimicrobiana de Extractos totales de las Hojas de *Petiveria alliacea* L. (II). Tesis de Diploma. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba 2009:1-46.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. XII Informational Supplement. M100-S12. Wayne. Pennsylvania, NCCLS, 2002: 9-14.
9. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 311. Extractos fluidos y Tinturas. Procesos Tecnológicos, MINSAP; 1991: 51.
10. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 312. Extractos fluidos y Tinturas. Métodos de ensayos, MINSAP; 1991: 1-5.
11. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 309. Métodos de Ensayo de Droga cruda, MINSAP: 1991: 30-40.
12. A.P., López T.G., Colombat M.R. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Monografía. Editado en CD-ROM ISBN 959- 207-012- ISBN959-207-049-0, 2002: 15-30.
13. Martínez M.M, Cuéllar C.A. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. La Habana. Editorial Félix Varela. 2001: 170-171.
14. Khanbabae K., Ree T. Tannins: classification and definition. Nat Prod Rep Soc Chem. 2001; 18:641-649.
15. Lorente M.D. Estudio Farmacognóstico de *Euphorbia Hirta* L. (Tesis Doctoral) Editorial de la Universidad de Granada. D.L.:GR. 2006: 1519.
16. Ochoa A.P., Marín J.M., Fernández D.F. et al. Estandarización preliminar de parámetros de calidad del extracto blando de las hojas de *Petiveria alliacea* L. Rev Cub Quím. 2006, Vol. XVIII, # 3: 78-83.
17. Saiki M., Vasconcelos M.B., Sertie J.A. Determinación de componentes inorgánicos en plantas medicinales de Brasil por análisis de activación de neutrones. Biol. Trace. Elem. Res. Instituto de Pesquisas y Nucleares, división radioquímica, Sau Paulo-SP, Brasil. Julio-Dic.1990, 26-27;(79)43-50.
18. Gonzáles J, Lechuga AM., Serrano C.A. Estudio fitoquímico comparativo de *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis* (Yawar Chonq'a). Rev. Situa sept 2000 – feb. 2001; 9(17):66-66.
19. Escalona JC. Estudio químico farmacéutico de las Hojas de *Tamarindus indica* L. Valoración teórica de la actividad de los flavonoides. (Tesis en opción al título de Maestro en Ciencias de Medicina Tradicional y Bioenergética). ISCM, Santiago de Cuba, 2005: 40-50.
20. Artículo Disponible en:
URL:<http://www.anci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/chemical.htm>. Actualización 7 de Abril del 2010.
21. Ogunleye DS and Ibiotey SF. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia Americana*. Trop J Pharm Res. 2003 Dec; 2(2): 239-241.