

Determinación de metales, fenoles totales y flavonoides totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú)

Sandra Sariego-Frómeta, Jorge Erick Marin-Morán*, Ania Ochoa-Pacheco, Damari Rivero-Breff ***, Orlando Ramón Sariego-Tamayo******

Profesora Asistente del dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma, Km 17½ carretera a Manzanillo. Peralejo, Bayamo. Granma. Cuba. CP 85100. *Profesor Asistente. Escuela de Ingeniería de San Carlos. Universidad de San Pablo. Avenida Trabajador San-Carlense, 400, Centro-San Carlos, San Pablo, Brasil. CP 13566-770. E-mail: **Profesora Auxiliar del dpto. de Farmacia. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Avenida Patricio Lumumba S/N. Santiago de Cuba. Cuba. CP 90500. ***Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Avenida Patricio Lumumba S/N. Santiago de Cuba. Cuba. CP 90500. ****Profesor Auxiliar del dpto. de Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma, Km 17½ carretera a Manzanillo. Peralejo, Bayamo. Granma. Cuba. CP 85100. jmarin74@yahoo.es

Recibido: 25 de agosto de 2015.

Aceptado: 27 de noviembre del 2015.

Palabras clave: *Petiveria alliacea*, extractos vegetales, metales, fenoles totales, flavonoides totales.

Key words: *Petiveria alliacea*, vegetal extracts, metals, total phenols, total flavonoids.

RESUMEN. *Petiveria alliacea* L. (anamú) es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional, que posee una composición química peculiar determinada por la abundancia de compuestos sulfurados. La presencia de estos compuestos en la planta además de conferirle propiedades antimicrobianas implican la posibilidad de su utilización en la fitorremediación. Lo anterior, indica que la prescripción médica de esta especie requiere de la realización inminente de previos análisis del contenido de metales en sus tejidos, los cuales pudieran ser superiores a los niveles permisibles, afectando la salud humana. En la presente investigación se determinaron por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Inductivamente Acoplado las concentraciones de 12 metales en una muestra de las hojas de *Petiveria alliacea* L. utilizadas en la elaboración de extractos totales con actividad antimicrobiana in vitro frente a patógenos para la especie humana. La cuantificación de los fenoles totales en los extractos se efectuó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. La cuantificación de flavonoides totales en los extractos se realizó por un método colorimétrico basado en la reacción con cloruro de aluminio al 2,5 % en metanol. Los valores de las concentraciones de metales fueron inferiores a los niveles máximos permisibles en hierbas medicinales sugeridos por la Organización Mundial de la Salud. Las concentraciones de fenoles totales en los extractos oscilaron de 0,06 a 41,50 mg/mL y los flavonoides totales se encontraron en concentraciones entre 0,460 y 21,80 mg/mL.

ABSTRACT. *Petiveria alliacea* L. (anamu) is a plant largely used in traditional medicine. It has a peculiar chemical composition determined by the abundance of sulphur compounds. The presence of these compounds in the plant, besides conferring it antimicrobial properties, implies the possibility of its use in the phytoremediation. The previous statement indicates that the medical prescription of this species requires the imminent fulfillment of previous tests of the metals content in its tissues, which might conduct, in levels higher to the ones permissible, to the deterioration of the human health. In the present research it was determined by Atomic Emission Spectrometry with Inductively Coupled Plasma the concentrations of 12 metals in a sample of *Petiveria alliacea* L. leaves, used in the elaboration of total extracts with *in vitro* antimicrobial activity against pathogens for human species. The quantification of total phenols in the extracts were performed by colorimetric method of Folin-Ciocalteu. The quantification of total flavonoids in the extracts were carried out by the colorimetric method based on the reaction with 2,5 % aluminum chloride in methanol. The values of metal concentrations were lower than maximum levels permissible in medicine

herbs suggested by the World Health Organization. The concentrations of total phenols in the extracts ranged from 0,06 to 41,50 mg/mL and the total flavonoids were found in concentrations between 0,460 and 21,80 mg/mL.

INTRODUCCIÓN

La medicina natural es un campo terapéutico que parte de la integración del hombre a la naturaleza y constituye una vía para contrarrestar los efectos adversos de los productos farmacéuticos obtenidos mediante la síntesis química. En Cuba, cuyos planes de salud abarcan sus más recónditas zonas, están registradas 759 especies de plantas medicinales, que representan el 9,56 % del número total de especies presentes en la flora del país.¹

Petiveria alliacea L. (anamú) es una planta medicinal de la familia Phytolaccaceae que fue introducida en Cuba en 1848 y que procede de América Tropical.

Un rasgo distintivo en la identificación de esta especie es su intenso olor aliáceo atribuido a compuestos sulfurados únicos de la planta entre los que se encuentran: el ácido fenilmetanosulfónico, el S-(2-hidroxietil) fenilmetano tiosulfonato, el S-bencil-2-(hidroxietano) tiosulfonato, el S-(2-hidroxietil)-2-hidroxietano tiosulfonato y el S-bencil-fenilmetano tiosulfonato.^{2,3}

La abundancia de compuestos sulfurados le confiere a esta especie una composición química peculiar que implica la posibilidad de su utilización en la fitorremediación. Lo anterior indica que su prescripción médica requiere de la realización inminente de previos análisis del contenido de metales en sus tejidos, los cuales pudieran ser superiores a los niveles permisibles, afectando la salud humana y además el efecto de polifenoles y flavonoides en el sinergismo de los compuestos antimicrobianos de esta planta.

En las hojas de *P. alliacea* se han aislado además flavonoides como la miricitrina, la astilbina, la engeletina, el leridal y el leridol. La leridalchalcona identificada en el anamú es considerada la primera chalcona halogenada obtenida de un producto natural.⁴

Aún cuando se conoce que en el reino vegetal los flavonoides y polifenoles funcionan como fitoalexinas en respuesta al ataque microbiano, no se ha estudiado la efectividad *in vitro* de estos compuestos aislados y purificados del anamú, ni su posible efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana atribuida a la planta.

La presente investigación tiene como objetivo determinar el contenido de metales en una muestra de las hojas empleadas en la elaboración de extractos totales de anamú (con actividad antimicrobiana *in vitro* frente a patógenos para la especie humana) así como las concentraciones de fenoles y flavonoides totales en los extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron muestras foliares extraídas de plantas de *Petiveria alliacea* L. de una población ubicada en la Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) “Niña Bonita” de la localidad “El Caney” en el municipio de Santiago de Cuba, (GPS 20° 2’38,9’’N y 075° 45’25,8’’W). La especie fue identificada taxonómicamente con el registro SC. 4297 en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) de la ciudad de Santiago de Cuba.

Análisis de metales

Para la determinación de metales el material vegetal (hojas) fue secado en estufa (WSU 400, Alemania) a 60 °C durante 48 h hasta peso constante (humedad residual de un 8 %). Se efectuó la digestión de 2 g de hojas secas en una mezcla de ácidos nítrico/clorhídricos concentrados y el material resultante fue filtrado y trasvasado a un volumétrico de 25 mL para su posterior análisis por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-AES) en un equipo SPECRO ARCOS (Alemania) de vista axial. Los valores promedios de las concentraciones foliares de metales se reportaron en partes por millón (ppm).

Características de los extractos

Se determinó el contenido de fenoles totales y flavonoides totales en extractos totales (con actividad antimicrobiana *in vitro* frente a patógenos para la especie humana) elaborados a partir de hojas frescas y de hojas secas de *Petiveria alliacea* L. empleando como menstruos alcohol isopropílico y soluciones hidroetanólicas al 30 % y al 80 % (v/v).

Extractos blandos

Se elaboraron extractos fluidos por el método de percolación según la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 311.⁵ Los extractos blandos se obtuvieron por concentración de los extractos fluidos en las siguientes condiciones:

- B₁:** Extracto en la proporción 1:4 con hojas secas y solución hidroetanólica al 30 %;
- B₂:** Extracto en la proporción 1:6 con hojas secas y solución hidroetanólica al 30 %;
- B₃:** Extracto en la proporción 1:4 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 30 %;
- B₄:** Extracto en la proporción 1:6 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 30 %;
- B₅:** Extracto en la proporción 1:4 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 80 %;
- B₆:** Extracto en la proporción 1:6 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 80 %;
- B₇:** Extracto en la proporción 1:8 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 80 %;

B₈: Extracto en la proporción 1:12 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 80 %;

B₉: Extracto en la proporción 1:4 con hojas frescas y alcohol isopropílico;

B₁₀: Extracto en la proporción 1:6 con hojas frescas y alcohol isopropílico.

Extractos blandos batidos

Se denominaron extractos batidos (**E**) a extractos blandos elaborados a partir de material vegetal de menor tamaño de partícula. Inicialmente se batieron las hojas frescas añadiendo a intervalos (como menstru) una solución hidroetanólica al 80 %. Posteriormente, se preparó un extracto fluido por el método de percolación según la NRSP 311.⁵ Los extractos blandos batidos se obtuvieron por concentración del extracto fluido en las siguientes proporciones:

E₁: Extracto en la proporción 1:4 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 80 %

E₂: Extracto en la proporción 1:6 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 80 %

E₃: Extracto en la proporción 1:8 con hojas frescas y solución hidroetanólica al 80 %.

Extracto seco

El extracto seco (**E₄**) se obtuvo por concentración en un rotoevaporador (IKA-werke, Alemania) y recirculador de agua para condensación (MLW, Alemania) hasta sequedad del extracto fluido elaborado con hojas frescas batidas y solución hidroetanólica al 80 %.

Determinación cuantitativa de fenoles totales y flavonoides totales en los extractos de *Petiveria alliacea* L.

Para la cuantificación de los fenoles totales se empleó un método colorimétrico con el reactivo de Folin-Ciocalteu,⁶ registrando los valores de absorbancia a 700 nm. Los resultados se expresaron como ácido tánico a partir de una curva de calibración obtenida para dicho compuesto en el intervalo de 0,4 a 1,4 µg/mL. La cuantificación de flavonoides totales se realizó por un método colorimétrico basado en la reacción con cloruro de aluminio al 2,5 % en metanol,⁷ determinando las absorbancias a 430 nm. Los resultados se expresaron como quercetina a partir de una curva de calibración obtenida para dicho compuesto en el intervalo de 1 a 7 µg/mL. Se efectuaron 4 mediciones para cada determinación utilizando un espectrofotómetro UV-vis Ultrospec III (Pharmacia LKB-Suecia). Se reportó la variación estacional del contenido foliar de fenoles totales (mg/mL) de las plantas colectadas en la localidad de estudio.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se efectuó con el programa STATGRAPHICS Centurion XV.⁸ Se aplicó un análisis de regresión simple para la realización de las curvas de calibración y comprobar su comportamiento lineal. El análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) con una prueba de Fisher se empleó para determinar si las muestras eran significativamente diferentes para un valor de $p < 0,05$. La prueba de rangos múltiples de Tukey (HSD) permitió evaluar cuáles muestras eran significativamente diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del contenido de metales en las hojas secas de *Petiveria alliacea* L.

De manera general, las plantas colectadas se caracterizaron por presentar un contenido mayoritario de hierro y manganeso con valores de 145,330 y 94,530 ppm (**Tabla 1**).

Tabla 1 Concentración de metales (en ppm) en las hojas de *Petiveria alliacea* L.

Metales	Hierro	Manganeso	Zinc	Estroncio
$\bar{X} \pm DS$	145,330±0,011	94,530±0,010	73,070±0,011	67,500±0,010
LD (ug/L)	0,1	0,1	0,2	0,05
Metales	Plomo	Cobre	Molibdeno	Cromo
$\bar{X} \pm DS$	2,520±0,015	5,740±0,006	0,883±0,005	0,800±0,010
LD (ug/L)	1	0,4	0,5	0,2
Metales	Vanadio	Níquel	Cobalto	Cadmio
$\bar{X} \pm DS$	0,846±0,001	2,176±0,002	0,565±0,001	0,096±0,001
LD (ug/L)	0,5	0,5	0,2	0,1

$\bar{X}$ Media. DS Desviación estándar. LD Límite de detección/rango (0,05-1 ug/L).⁹

La concentración de hierro encontrada en la presente investigación en las hojas de anamú resultó superior a las citadas como normales en los tejidos vegetales. Coincidentemente con lo planteado por Schroeder y Burgos no se observaron en las plantas síntomas de toxicidad por acumulación de este elemento.¹⁰ Valores cercanos a 200 ppm fueron obtenidos por otros autores en estudios previos de la especie.¹¹ Se estima que en el organismo humano el requerimiento diario de hierro es de 13 mg, resultando los valores permisibles de la exposición oral y parenteral de 1300 y de 130 ppm respectivamente.¹²

Investigaciones recientes han comprobado que algunas especies de la familia Phytolaccaceae resultan de gran interés en la fitorremediación por su facilidad de hiperacumular manganeso, tal es el caso de *Phytolacca acinosa*.¹³ No obstante, la concentración promedio de este metal en las hojas de anamú fue aproximadamente 2,64 veces inferior al valor de la exposición oral permisible en la especie humana reconocido por el Comité de Plantas Medicinales de uso Humano en el año 2007.¹²

La concentración de zinc obtenida en el presente estudio es semejante a otras reportadas en condiciones similares de crecimiento de la especie.¹¹ Las exposiciones orales y parenterales permisibles en la especie humana para este metal coinciden con los valores informados anteriormente para el hierro.¹²

La OMS estima que la dosis letal (DL₅₀) de estroncio en el organismo humano es de 2000 ppm y recomienda que el plomo no debe exceder en productos naturales niveles de 10 mg/kg de peso seco de hierba.¹⁴ Las concentraciones foliares de ambos metales fueron inferiores a los niveles de toxicidad declarados para la especie humana.

Las concentraciones foliares de cobre se encuentran por debajo de las referidas por otros autores (entre 12 y 68 ppm)¹⁰ y son muy inferiores a las citadas por Ferrer en la especie, quien reportó contenidos de este metal de 160 ppm.¹¹ Se estima que en el organismo humano el requerimiento diario de cobre es de 1,4 mg, resultando los valores permisibles de la exposición oral y parenteral de 250 y de 25 ppm respectivamente.¹²

La exploración fotoquímica de las hojas de *Petiveria alliacea* permitió la cuantificación en ppm de 7 metales (molibdeno, cromo, vanadio, níquel, cobalto, cadmio y estroncio) que constituyen una primera referencia para la especie en Cuba.

Según informes realizados en el año 2007 por el Comité de Plantas Medicinales de uso Humano las exposiciones orales y parenterales permisibles de molibdeno, cromo, vanadio y níquel son de 30 y 3 ppm respectivamente.¹²

El níquel puede resultar tóxico para el desarrollo de las plantas con dosis efectivas de 0,18 a 5 ppm que provocan una reducción del 50 % del crecimiento.¹⁵ Las plantas colectadas mostraron un fenotipo normal con relación a las variables macromorfológicas asociadas al crecimiento.

El contenido promedio de cobalto en las hojas de anamú fue de 0,565 ppm. Se ha demostrado que la dosis letal (DL₅₀) de este metal en la especie humana varía entre 630 y 1500 ppm en dependencia del compuesto que forme.¹⁴

De los 12 metales cuantificados en las hojas de *P. alliacea* el cadmio mostró la concentración más baja con un valor promedio de 0,096 ppm. La amplia distribución del cadmio en la naturaleza hace inevitable su seguimiento desde el punto de vista toxicológico por los efectos perjudiciales que provoca en la salud humana. Se considera, además, que su toxicidad es similar a la del mercurio y que su exposición crónica en la especie humana es de 0,2 ppm.¹⁴

De manera general, las concentraciones en ppm de los metales determinados en las hojas de *P. alliacea* son inferiores a los niveles máximos permisibles en hierbas medicinales sugeridos por la OMS y por el Comité de Plantas Medicinales de uso Humano.

Las concentraciones de los 12 metales determinados en las hojas de anamú deben ser superiores que las presentes en los extractos totales de esta planta debido a la baja extracción de los mismos en las condiciones de experimentación empleadas. Los resultados del análisis químico foliar sugieren que las plantas empleadas en la presente investigación están libres de contaminación por elementos metálicos, lo que pudiera avalar la utilización medicinal en la especie humana de los extractos totales obtenidos.

Concentraciones de fenoles totales y flavonoides totales en los extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L.

Tomando como precedentes las investigaciones realizadas en otras especies vegetales, se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos de *P. alliacea* así como la variación en las concentraciones foliares de estos metabolitos en dos meses con características climáticas opuestas en nuestro país. Estos compuestos polifenólicos de origen vegetal debido a la presencia de grupos carbonilo e hidroxilo pueden coordinar iones metálicos y formar compuestos de coordinación con acción antimicrobiana.¹⁶

Concentraciones de fenoles totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. colectadas en enero de 2012

La curva de calibración con ácido tánico desarrollada para la determinación cuantitativa de fenoles totales en las hojas de *P. alliacea* colectadas en el mes de enero presentó valores de absorbancia de $0,179 \pm 0,006$ a $0,624 \pm 0,022$ (Tabla 2).

Tabla 2 Absorbancias obtenidas para la curva de calibración con ácido tánico en la determinación de fenoles totales en enero de 2012.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia ($\bar{X} \pm DS$)
0,4	0,179 $\pm$ 0,006
0,6	0,267 $\pm$ 0,009
0,8	0,354 $\pm$ 0,013
1,0	0,457 $\pm$ 0,015
1,2	0,530 $\pm$ 0,018
1,4	0,624 $\pm$ 0,022

$\bar{X}$ Media. DS Desviación estándar

La ecuación de la recta y los parámetros que la describen son los siguientes:

Absorbancia = -0,007 + 0,045 x concentración (Ecuación 1)

r^2 ajustado= 99,8 % F= 1200,56 p=0,0000 p. intercepto=0,0741

Como reflejan los parámetros de la recta, la curva de calibración obtenida cumple con los principales requisitos de aceptación expresando un 99,8 % de ajuste de los datos con el modelo, con un intercepto que atraviesa el cero con un 99 % de confianza.

Bajo estas condiciones se puede afirmar que la **ecuación 1** puede ser empleada para la cuantificación de fenoles totales expresados como ácido tánico. A partir de esta ecuación, despejando la variable concentración se determinaron con los valores de absorbancia de cada uno de los extractos las concentraciones de fenoles totales equivalentes a ácido tánico para esas absorbancias.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia} + 0,007}{0,045}$$

Luego estos valores fueron multiplicados por el factor de dilución rindiendo las concentraciones de fenoles totales para cada uno de los extractos (**Tabla 3**).

Tabla 3 Concentraciones de fenoles totales (mg/mL) en los extractos obtenidos a partir de hojas de *Petiveria alliacea* L. colectadas en el mes de enero de 2012.

Extractos	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅
Fenoles totales ($\bar{X} \pm DS$)	0,26 ^a $\pm$ 0,02	0,38 ^b $\pm$ 0,02	0,07 ^c $\pm$ 0,01	0,11 ^d $\pm$ 0,02	0,12 ^d $\pm$ 0,01
Extractos	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀
Fenoles totales ($\bar{X} \pm DS$)	0,24 ^a $\pm$ 0,02	0,26 ^a $\pm$ 0,02	0,36 ^b $\pm$ 0,03	0,06 ^c $\pm$ 0,01	0,08 ^c $\pm$ 0,01
Extractos	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	LD
Fenoles totales ($\bar{X} \pm DS$)	0,17 ^e $\pm$ 0,01	0,25 ^a $\pm$ 0,01	0,36 ^b $\pm$ 0,02	1,42 ^f $\pm$ 0,04	1,00 ¹⁷
Estadísticos del ANOVA		F= 368,40	P-valor= 0,0000		

$\bar{X}$ Media. DS. Desviación estándar. LD: Límite de detección (ug/mL). Superíndices con letras distintas representan diferencias estadísticas significativas entre las medias (p<0,05).

Las concentraciones de fenoles totales en los 14 extractos elaborados con hojas de anamú colectadas en el mes de enero de 2012 oscilaron entre 0,06 y 1,42 mg/mL. El análisis de varianza demostró la existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las concentraciones de fenoles totales a un nivel de confianza del 95 %. La prueba de rangos múltiples de Tukey indicó que las concentraciones de polifenoles en los extractos **E₁** y **E₄** resultaron diferentes estadísticamente entre ellos y con los cuatro grupos homogéneos formados.

Concentraciones de fenoles totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. colectadas en julio de 2012

La curva de calibración con ácido tánico desarrollada para la determinación cuantitativa de fenoles totales en las hojas de *P. alliacea* colectadas en el mes de julio presentó valores de absorbancia de $0,021 \pm 0,001$ a $0,092 \pm 0,003$ (Tabla 4).

Tabla 4 Absorbancias obtenidas para la curva de calibración con ácido tánico en la determinación de fenoles totales en julio de 2012.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia ($\bar{X} \pm DS$)
0,4	$0,021 \pm 0,001$
0,6	$0,035 \pm 0,001$
0,8	$0,048 \pm 0,001$
1,0	$0,059 \pm 0,002$
1,2	$0,071 \pm 0,002$
1,4	$0,092 \pm 0,003$

$\bar{X}$. Media. DS. Desviación estándar.

La ecuación de la recta y los parámetros que la describen son los siguientes:

Absorbancia = -0,006 + 0,067 x concentración (Ecuación 2)

r^2 ajustado= 98,7 % F= 381,24 p=0,0000 p. intercepto=0,1188

Como reflejan los parámetros de la recta, la curva de calibración obtenida cumple con los principales requisitos de aceptación expresando un 98,7 % de ajuste de los datos con el modelo, con un intercepto que atraviesa el cero con un 99 % de confianza.

Bajo estas condiciones se puede afirmar que la **ecuación 2** puede ser empleada para la cuantificación de fenoles totales expresados como ácido tánico. A partir de esta ecuación, despejando la variable concentración se determinaron con los valores de absorbancia de cada uno de los extractos las concentraciones de fenoles totales equivalentes a ácido tánico para esas absorbancias.

$$\text{Concentración (µg/mL)} = \frac{\text{Absorbancia} + 0,006}{0,067}$$

Luego estos valores fueron multiplicados por el factor de dilución rindiendo las concentraciones de fenoles totales para cada uno de los extractos (Tabla 5).

Tabla 5 Concentraciones de fenoles totales (mg/mL) en los extractos obtenidos a partir de hojas de *Petiveria alliacea* L. colectadas en el mes de julio de 2012.

Extractos	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅
Fenoles totales ($\bar{X} \pm DS$)	$7,90^a \pm 0,03$	$11,60^b \pm 0,03$	$2,10^c \pm 0,01$	$3,00^d \pm 0,01$	$3,60^e \pm 0,02$
Extractos	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀
Fenoles totales ($\bar{X} \pm DS$)	$6,40^f \pm 0,03$	$7,50^g \pm 0,03$	$8,70^h \pm 0,03$	$1,80^c \pm 0,01$	$2,50^i \pm 0,01$
Extractos	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	LD
Fenoles totales ($\bar{X} \pm DS$)	$2,00^c \pm 0,01$	$2,60^i \pm 0,01$	$3,90^e \pm 0,02$	$41,50^k \pm 0,05$	$1,00^{17}$
Estadísticos del ANOVA		F= 601,48		P-valor= 0,0000	

$\bar{X}$ Media. DS. Desviación estándar; LD. Límite de detección (ug/mL). Superíndices con letras distintas representan diferencias estadísticas significativas entre las medias (p<0,05).

Las concentraciones de fenoles totales en los 14 extractos elaborados con hojas de anamú colectadas en el mes de julio de 2012 oscilaron entre 1,80 y 41,50 mg/mL. El análisis de varianza demostró la existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las concentraciones de fenoles totales a un nivel de confianza del 95 %. La prueba de rangos múltiples de Tukey indicó que las concentraciones de polifenoles en los extractos **B₁**, **B₂**, **B₄**, **B₆**, **B₇**, **B₈** y **E₄** resultaron diferentes estadísticamente entre ellos y con los tres grupos homogéneos formados.

El contenido de fenoles totales en los extractos de las hojas colectadas en el mes de julio fue de 10 a 30 veces superior al contenido de polifenoles determinados en el mes de enero de 2012.

Arámbula *et al.* plantearon que en los meses de verano las concentraciones de fenoles pueden triplicarse o cuatriplicarse con respecto a otras estaciones del año.¹⁸ Lo anterior pudiera atribuirse a que en los meses de verano las plantas sufren más estrés debido a las condiciones climáticas, entre las que se encuentran un mayor estrés hídrico y elevadas temperaturas.¹⁹

Concentraciones de flavonoides totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. colectadas en julio de 2012

Las elevadas concentraciones de fenoles totales en los extractos de las hojas de anamú colectadas en el mes de julio de 2012 sugirieron la determinación en los mismos del contenido de flavonoides totales debido a la posible implicación de estos metabolitos en la actividad antimicrobiana de la planta.

La curva de calibración con quercetina desarrollada para la determinación cuantitativa de flavonoides totales en las hojas colectadas en el mes de julio presentó valores de absorbancia de $0,091 \pm 0,003$ a $0,550 \pm 0,020$ (Tabla 6).

Tabla 6 Absorbancias obtenidas para la curva de calibración con quercetina en la determinación de flavonoides totales en julio de 2012.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia ($\bar{X} \pm DS$)
1	$0,091 \pm 0,003$
2	$0,162 \pm 0,005$
3	$0,240 \pm 0,008$
4	$0,314 \pm 0,010$
5	$0,380 \pm 0,013$
6	$0,486 \pm 0,017$
7	$0,550 \pm 0,020$

$\bar{X}$. Media. DS. Desviación estándar.

La ecuación de la recta y los parámetros que la describen son los siguientes:

Absorbancia = $0,008 + 0,077 \times$ Concentración (Ecuación 3)

r^2 ajustado = 99,7 % $F=1952,17$ $p=0,0000$ p. intercepto = 0,3303

Como reflejan los parámetros de la recta, la curva de calibración obtenida cumple con los principales requisitos de aceptación expresando un 99,7 % de ajuste de los datos con el modelo, con un intercepto que atraviesa el cero con un 99 % de confianza.

Bajo estas condiciones se puede afirmar que la **ecuación 3** puede ser empleada para la cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina. A partir de esta ecuación, despejando la variable concentración de quercetina se determinaron con los valores de absorbancia de cada uno de los extractos las concentraciones de flavonoides totales equivalentes a quercetina para esas absorbancias.

$\text{Concentración de Quercetina (µg/mL)} = \frac{\text{Absorbancia} - 0,008}{0,077}$

Luego estos valores fueron multiplicados por el factor de dilución rindiendo las concentraciones de flavonoides totales para cada uno de los extractos (Tabla 7).

Tabla 7 Concentraciones de flavonoides totales (mg/mL) en los extractos obtenidos a partir de hojas de *Petiveria alliacea* L. colectadas en el mes de julio de 2012.

Extractos	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅
Flavonoides totales ($\bar{X} \pm DS$)	1,900 ^a ±0,002	2,800 ^b ±0,004	0,460 ^c ±0,001	0,740 ^d ±0,001	0,910 ^e ±0,002
Extractos	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀
Flavonoides totales ($\bar{X} \pm DS$)	1,620 ^f ±0,001	2,130 ^a ±0,003	2,530 ^g ±0,004	1,070 ^e ±0,002	1,610 ^f ±0,002
Extractos	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	LD
Flavonoides totales ($\bar{X} \pm DS$)	0,960 ^e ±0,002	1,320 ^b ±0,002	1,990 ^a ±0,002	21,80 ⁱ ±0,04	0,50 ²⁰
Estadígrafos del ANOVA F= 123,4 P-valor= 0,0015					

$\bar{X}$ Media. DS Desviación estándar. LD Límite de detección. (ug/mL). Superíndices con letras distintas representan diferencias estadísticas significativas entre las medias (p<0,05).

Las concentraciones de flavonoides totales en los 14 extractos oscilaron entre 0,460 y 21,80 mg/mL. El análisis de varianza demostró la existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las concentraciones de flavonoides totales a un nivel de confianza del 95 %.

La prueba de rangos múltiples de Tukey indicó que las concentraciones de polifenoles en los extractos **B₂**, **B₃**, **B₄**, **B₈**, **E₂** y **E₄** resultaron diferentes estadísticamente entre ellos y con los tres grupos homogéneos formados.

Los extractos elaborados con alcohol isopropílico (**B₉** y **B₁₀**) presentaron los mayores valores porcentuales de flavonoides totales con el 59,44 % y el 64,40 % respectivamente. De igual modo en los extractos blandos batidos y en el extracto seco se obtuvieron elevados valores porcentuales con cifras en el rango entre el 48 % y el 52,53 % (**Tabla 8**).

Tabla 8 Porcientos de las concentraciones foliares de flavonoides totales con respecto a las concentraciones de fenoles totales en julio de 2012.

Extractos	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇
PFT (%)	24,05	24,14	21,90	24,67	25,28	25,31	28,40
Extractos	B ₈	B ₉	B ₁₀	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
PFT (%)	29,08	59,44	64,40	48,00	50,78	51,03	52,53

PFT. Porcentaje de flavonoides totales en los extractos.

De manera general los valores de fenoles y flavonoides totales aumentaron en la medida en que se incrementó la concentración de los extractos y variaron en dependencia del secado o no del material vegetal y del solvente empleado.

Estudios previos han indicado que extractos etanólicos al 70 % de hojas de *P. alliacea* cuyas concentraciones de fenoles y flavonoides totales fueron de 3,42 y 1,68 µg/mL respectivamente, notablemente inferiores a las reportadas en la presente investigación, presentaron actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC (patógenas para la especie humana) de 2 bacterias gramnegativas, 5 bacterias grampositivas y 3 hongos levaduriformes.²¹

El anamú pertenece a los niveles evolutivos bajos (Subclase Caryophyllidae) y basa su sistema defensivo contra patógenos en la síntesis y acumulación de sustancias antimicrobianas. Lo anterior sugiere que aun cuando se conoce que los derivados sulfurados del metabolismo secundario de *Petiveria alliacea* confieren esencialmente las propiedades antisépticas a esta planta, su sinergismo con fenoles y flavonoides podría incrementar su efecto antimicrobiano.

CONCLUSIONES

Las concentraciones en ppm de los 12 metales determinados en las hojas de *Petiveria alliacea* L. son inferiores a los niveles máximos permisibles en hierbas medicinales sugeridos por la Organización Mundial de la Salud, lo que pudiera avalar la utilización terapéutica de los extractos totales obtenidos. La exploración fitoquímica de las hojas de *Petiveria alliacea* L. permitió la cuantificación en ppm de 7 metales (molibdeno, cromo, vanadio, níquel, cobalto, cadmio y estroncio) que constituyen una primera referencia para la especie en Cuba. Los elevados valores de las concentraciones de fenoles y flavonoides totales en los extractos sugieren la posibilidad de su implicación en la actividad antimicrobiana de *Petiveria alliacea* L.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig, JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. 2da edic. Ed. Científico Técnica, La Habana, Cuba. 2012. p. 141-144.

2. Marrero D, Ortiz TT, Cuéllar A, Scull R, Salas E. Estudio por CG-EM de los componentes volátiles de las hojas de *Petiveria alliacea* L. Revista CENIC de Ciencias Químicas. 2014; 45: 48-51.
3. Kim S, Kubec R, Musah RA. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. J Ethnopharmacol. 2006; 104(1-2): 188-192.
4. Andersen Ø, Markham K. Flavonoids-Chemistry, Biochemistry and Applications. London-New York: Taylor & Francis Group Boca Raton; 2006. p. 1011-1013.
5. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 311. Medicamentos de origen vegetal: extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. La Habana, Cuba: MINSAP; 1998.
6. Sánchez JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros L, Jacobo DA. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. Anal Methods. 2013;(5): 5990-5999.
7. Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyck M. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. J Ethnopharmacol. 2000; 72: 34-42.
8. SOFTWARE: Statgraphics Centurion XV. Versión 16.2. StatPoint Technologies. 1982-2013.
9. Atomic Spectroscopy. A guide to selecting the appropriate technique and system. Perkin Elmer, USA: 2011.
10. Schroeder M, Burgos A. Concentraciones foliares y dinámica estacional de nutrientes en *Petiveria alliacea* L. Rev Cuba Plantas Med. 2011; 16 (4): 374-389.
11. Ferrer JI. Principales referencias etnomédicas sobre el anamú (*Petiveria alliacea*) y principios activos encontrados en la planta. Un acercamiento al tema. Rev CENIC (Cienc Biol). 2007; 38 (1): 27-30.
12. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Draft Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts. EMEA, London: European Medicines Agency Pre-authorisation Evaluation of Medicines for Human Use; 2007.
13. Xue S, Chen Y, Reeves R, Baker A, Lin Q, Fernando D. Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* (Phytolaccaceae). Environ Pollut. 2004; 131: 393-399.
14. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Working document QAS/05.131/Rev.1. September, 2005.
15. Azcón J, Talón M. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana, 2ª ed, España: SL: 2008.
16. Kasprzak MM, Erxleben A, Ochocki J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. RSC Advances. 2015; 5(57): 45853-45877.
17. Blainski A, López GC, Palazzo de Mello JC. Application and analysis of the Folin Ciocalteu. Method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. Molecules. 2013; (18): 6852-6865.
18. Arámbula J, Ibarra B, González R, Muñoz O, Hernández H. Variación estacional de compuestos fenólicos foliares en *Quercus sideroxyla* en diferentes tipos de suelo. Madera y Bosques. 2010; 16 (3): 49-59.
19. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. Plant Physiol Biochem. 2013; 72: 10-14.
20. Alves J, Mendonça LA, Reis SJ, Flach A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. Food Sci Technol. 2014.
21. Guedes R, Nogueira N, Almeida A, Souza C, Oliveira W. Actividad antimicrobiana de extractos brutos de *Petiveria alliacea* L. Latin Am J Pharm. 2009; 28(4): 520-524.