

Estudio tecnológico del extracto blando de las hojas de la *Petiveria alliacea* L.

Jorge Erick Marín Morán, Ania Ochoa Pacheco,* Rosandra Silva Pérez, Bertha Nelsa Delgado Farín y Zelene Salgueiro Blanco.

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Patricio Lumunba s/n, Altos de Quintero, Santiago de Cuba, Cuba.

Recibido: 18 de marzo de 2008. Aceptado: 17 de septiembre de 2008.

Palabras clave: estudio tecnológico, anamú, *Petiveria alliacea* L., optimización, extracto blando.
Key words: technological study, anamú, *Petiveria alliacea* L., optimization study, soft extract.

RESUMEN. Se realizó un estudio tecnológico del extracto blando de las hojas de la *Petiveria alliacea* L., a través de la optimización del método de elaboración y la determinación de los parámetros de calidad en la zona del óptimo experimental. Para la optimización, se tuvieron en cuenta, los resultados de un trabajo investigativo previo; sobre esta base, se realizó un diseño univariado, en el que se fijaron a un cierto nivel los factores: volumen de menstro para humectar (X_2): 1,5 vol./g de peso; tiempo de maceración (X_3): 48 h y temperatura de concentración del extracto (X_4): 40 °C; en el caso del tiempo de humectación (X_1): fue variado (6 y 8 h), hasta encontrar la mejor respuesta. Se realizaron dos experimentos con sus réplicas. Se tomó como variable respuesta los sólidos totales, según establece la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 312. Los resultados se procesaron, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS (PLUS) versión 5.1 (2001). Para la determinación de los parámetros de calidad del extracto blando, se tuvieron en cuenta las características organolépticas, pH, densidad relativa y sólidos totales; según NRSP 312; además del tamizaje fitoquímico. Los resultados de la optimización, confirmaron, que siguiendo la dirección X_1 , X_2 y X_3 positivas y la X_4 negativa, se encuentra el óptimo experimental en el experimento No. 1 (X_1 : 6 h; X_2 : 1,5 vol./g de peso; X_3 : 48 h y X_4 : 40 °C). Se informan los valores de los parámetros de calidad para el extracto blando optimizado.

ABSTRACT. A technological study of the soft extract of the leaves of the *Petiveria alliacea* L. was carried out; through the optimization of the method of elaboration of the same and the determination of the parameters of quality in the area of the experimental optimum. For the optimization, were taken into account, the results of a previous research work; being carried out on the basis of the same ones, an unvaried design, where they fixed at a certain the factors: volume of menses to moisten (X_2): 1,5 vol./g of weight; time of maceration (X_3): 48 h and temperature of concentration of the extract (X_4): 40 °C; in the case of the time of humectación (X_1): it was varied (6 and 8 h), until finding the best answer. Two experiments with their replicas were carried out. It took as variable answer the total solids, as the Norma Ramal Salud Pública of Cuba (NRSP) 312. The results were processed, using the statistical program STATGRAPHICS (PLUS) version 5.1 (2001). For the determination of the parameters of quality of the soft extract, were taken into account the organoleptic characteristics, pH, relative density and total solids; according to NRSP 312; besides the phytochemical screening. The results of the optimization, confirm that following the address X_1 , X_2 and X_3 positive and the negative X_4 , it was the experimental optimum in the experiment No. 1 (X_1 : 6 h; X_2 : 1,5 vol./g of weight; X_3 : 48 h and X_4 : 40 °C). They are informed the values of the parameters of quality for the optimized soft extract are informed.

INTRODUCCIÓN

La especie vegetal *Petiveria alliacea* L. (anamú), considerada medicinal e incluida en el Programa Nacional de Plantas Medicinales para su estudio integral, ha sido estudiada por investigadores del Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente; a través de una sus líneas de investigación: "Bioenergética y Productos Farmacéuticos a partir de fuentes naturales"; cumpliendo con la Ruta crítica de investigación¹ en plantas medicinales

establecida por el Centro para el Control de la Calidad de los Medicamentos de Cuba (CECMED); se llegó hasta la elaboración de un medicamento herbolario para el tratamiento de la *Psoriasis* como antiinflamatorio, de esta forma, se ha estado contribuyendo a darle respuesta a un problema de salud del territorio, en cuanto al déficit de medicamentos antipsoriásicos, a su poca eficacia, a su elevado costo y la ocurrencia de reacciones adversas.

*Correspondencia:

M.C. Ania Ochoa Pacheco

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Patricio Lumunba s/n,

Altos de Quintero, Santiago de Cuba, Cuba. Teléfono: 633011, ext. 271. Correo electrónico: aochoa@cnt.uo.edu.cu.

Las investigaciones realizadas, han consistido en: estudios farmacognósticos en los que se han establecido los parámetros de calidad físicos y químicos para la droga cruda (hojas);^{2,4} estudios fitoquímicos⁵ que han mostrado la composición química cualitativa de las hojas y las raíces, específicamente la presencia de flavonoides como uno de los metabolitos responsables de la acción antiinflamatoria; estudios preclínicos farmacológicos⁶ de extractos totales, flavonólicos y medicamento, confirmando la acción antiinflamatoria a las dosis probadas; estudios tecnológicos tanto para los extractos totales como para el medicamento herbolario,⁷⁻⁹ han permitido el desarrollo de una forma farmacéutica: ungüento, a partir de las hojas; la estabilidad física y química cualitativa del fitofármaco y su principio activo; así como la optimización del método de obtención de extractos totales. Recientemente, se está estudiando la actividad antimicrobiana de extractos totales, y se han obtenido resultados alentadores con algunos elaborados a partir de la droga fresca frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.¹⁰

En cuanto a la optimización⁷ del método de elaboración del extracto blando de las hojas; se realizó un diseño factorial completo 2^4 con punto central. Se elaboraron 23 extractos blandos, según el procedimiento descrito en la NRSP 311, con la modificación de cuatro factores: tiempo de humectación (X_1), volumen del menstruo para humectar (X_2), tiempo de maceración (X_3) y temperatura de concentración (X_4). Se evaluó como variable de respuesta, los sólidos totales, según NRSP 312. Los resultados se procesaron utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS y se demostró que el volumen del menstruo para humectar no tiene influencia estadísticamente significativa en el experimento y sí X_1 , X_3 y X_4 , siendo mayor la influencia de X_4 . La interacción entre los factores tiempo de humectación y temperatura a la cual se concentra el extracto es la de mayor influencia estadística en el experimento. La significación estadística de interacciones de tercer y cuarto orden demuestran que el diseño realizado se encuentra en una zona de óptimo experimental, correspondiente a la dirección X_1 , X_2 y X_3 positivas y X_4 negativa.

Teniendo en cuenta este antecedente⁷ y que la cuarta Etapa de la Ruta Crítica de Investigación en Plantas Medicinales:¹ Investigación Fitoquímica, define en una de sus tareas el establecimiento de las especificaciones de calidad del material vegetal y sus extractos para ser utilizados con fines farmacéuticos; se propone esta investigación en la que se completó la optimización del método de obtención del extracto blando de las hojas, que es el principio activo del medicamento herbolario para el tratamiento de la *Psoriasis*; contribuyendo de esta forma a garantizar su calidad físico química y tecnológica como materia prima; aportando los elementos necesarios que permitirán el futuro registro de este fitofármaco en el CECMED; por lo que se trazaron los objetivos siguientes: optimizar el método de elaboración del extracto blando de las hojas; aplicando el diseño univariado para la determinación del óptimo experimental y determinar los parámetros de calidad físicos, químicos físicos y químico cualitativo del extracto blando en la zona del óptimo experimental.

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Recolección y procesamiento del material vegetal

Las hojas de la especie se identificaron taxonómicamente en el museo Tomás Romay de la ciudad de Santiago de Cuba, por especialistas del grupo de Biodi-

versidad y Ecosistemas de la región Oriental (BIOECO), Cuba.

Se colectaron en horas tempranas de la mañana, a la sombra y en zonas alejadas de la carretera. Se lavaron, se secaron al sol y se pesaron cada 24 h hasta que alcanzaron peso constante para posteriormente molerlas. Luego, se les determinó la humedad residual¹¹ y los restantes indicadores farmacognósticos,¹¹ incluyendo el tamizaje fitoquímico,^{1,12} para evaluar su calidad farmacéutica.

Diseño del proceso de optimización

Este diseño se realizó basado en los resultados de trabajo investigativo previo.⁷

Información preliminar

La variable respuesta que se evaluó fue un parámetro de calidad que establece la NRSP 312:¹³ sólidos totales.

Los factores controlables que se tuvieron en cuenta fueron: X_1 (tiempo de humectación), X_2 (cantidad de menstruo para humectar), X_3 (tiempo para la maceración), X_4 (temperatura a la cual se concentran los extractos); hay otros como grado de división de la droga y tipo de envase del percolador, que se mantuvieron constantes, pues aunque tienen influencias en la variable respuesta, se pudieron establecer condiciones en ellos que no los afectaron.

Se realizaron dos experimentos con dos réplicas cada uno a través de un método univariado de optimización.

Los factores que fueron estudiados, se fijaron a un cierto nivel, menos uno de ellos (X_1), el cual fue variado hasta encontrar la mejor respuesta, teniendo en cuenta un estudio previo.⁷

$$X_1: 6 \text{ h } (+1,5) \qquad X_3: 48 \text{ h } (+1)$$

$$8 \text{ h } (+2)$$

$$X_2: 1,5 \text{ vol./g de peso } (+1) \qquad X_4: 40 \text{ }^\circ\text{C } (-1)$$

Se consideró importante el efecto, mediante el criterio siguiente: sólidos totales: se seleccionó la combinación de experimentos que tuviera el mayor valor.

Método de elaboración del extracto blando

Se preparó por el método de percolación, según la NRSP 311¹⁴ y los resultados del trabajo de investigación realizado en 2004.⁷

Determinación de los parámetros de calidad físicos, químico físicos y químico cualitativo del extracto blando optimizado

Se determinaron los parámetros de calidad, según NRSP 312:¹³ características organolépticas, pH, densidad relativa, sólidos totales, tamizaje fitoquímico.¹

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Procesamiento del material vegetal

La identificación taxonómica de la especie vegetal corroboró que se estaba trabajando con la *Petiveria alliacea* L. El tiempo de secado para la droga fue de 5 d, el cual coincidió con los resultados de otros trabajos sobre la planta.³⁻¹⁰ Se encontró un 7,22 % de humedad residual, que se encuentra dentro del intervalo establecido para drogas no oficiales (< 14 %).¹

Los restantes parámetros farmacognósticos coincidieron con resultados de trabajos experimentales anteriores.²⁻⁵ El tamizaje fitoquímico de la droga mostró la presencia de alcaloides, fenoles y taninos, quinonas,

flavonoides, saponinas, azúcares reductores, triterpenos y esteroides; coincidiendo con trabajos experimentales anteriores.²⁻¹⁰

Optimización del método de obtención del extracto blando

Los valores medios de sólidos totales obtenidos son: 56,75 % (experimento 1) y 56,95 % (experimento 2) resultaron superiores a los obtenidos en trabajo investigativo previo;⁷ por lo que se puede plantear que estas condiciones experimentales aumentan la extracción de las sustancias solubles. Este resultado se logró a partir del análisis factorial en el trabajo que constituye antecedente de esta⁷, en el cual el ajuste del modelo fue muy significativo, lo que permitió predecir otros puntos experimentales. En uno (experimento 1) aumentó la respuesta y en el otro (experimento 2) permaneció constante. Que se haya mantenido constante la respuesta indica que no es necesario seguir aumentando el tiempo de humectación. Entre estos valores no hay diferencias estadísticas, por lo que ambas condiciones experimentales son similares; no obstante, aunque en el experimento 2 se obtuvieron valores semejantes a los obtenidos en el experimento 1, se escogió este último como óptimo experimental; porque, además de que estadísticamente no existían diferencias significativas entre ellos, desde el punto de vista económico es más factible, ya que el tiempo de humectación es menor; por lo que se acortaría el proceso de obtención del extracto blando.

Se pudo observar, que el análisis de varianza divide la variabilidad de los sólidos totales en distintos segmentos, separados para cada uno de los efectos; después prueba la significación estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado contra una estimación del error experimental (Tabla 1). En este caso, 15 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0.05; indicando que los factores estudiados muestran diferencias significativas para un 95 % de confiabilidad, siendo X_4 el de mayor significación estadística entre todos los efectos principales; esto indica que existen metabolitos que son termolábiles, disminuyendo los sólidos totales, cuando se aumenta la temperatura en los experimentos.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado, explica el 99,587 % de la variabilidad en sólidos totales.

En el gráfico de Pareto para los sólidos totales, se especifica la significación individual de cada efecto (Fig. 1).

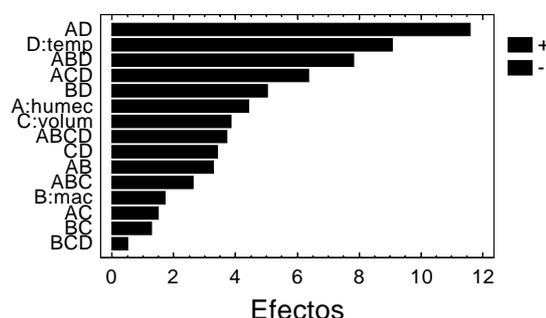


Fig. 1. Gráfico de Pareto para los sólidos totales.

La interacción de segundo orden del tiempo de humectación y la temperatura de concentración del extracto blando (AD), son los efectos que presentaron la mayor significación estadística entre todos, para un 95 % de confiabilidad, en las condiciones experimentales estudiadas. Esto puede explicarse desde el punto de vista práctico, teniendo en cuenta que la humectación facilita la penetración del menstruo y provoca el ensanchamiento de los capilares del material vegetal seco, que está compuesto por proteínas, polipéptidos, glúcidos, formadores de coloides hidrófilos, aumentando el proceso de imbibición celular, por lo que se favorece el proceso difusivo de los metabolitos de la planta hacia el menstruo, y permite que la difusión ocurra espontáneamente. La humectación se hace significativa a medida que transcurre el tiempo de contacto del material vegetal con el menstruo.

El tiempo de maceración se hace significativo a medida que este se incrementa, debido a que el disolvente pasa un mayor tiempo en contacto con los metabolitos, de modo que se van generando cavidades, se solvata la molécula, alcanza el equilibrio de disolución y se

Tabla 1. Análisis de la varianza para sólidos totales.

Fuente	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A: humectación	74,140 8	1	74,140 8	700,83	0,000 0
B: maceración	19,846 5	1	19,846 5	187,60	0,000 0
C: volumen	100,728	1	100,728	952,15	0,000 0
D: temperatura	562,067	1	562,067	5 313,07	0,000 0
AB	40,523 2	1	40,523 2	383,05	0,000 0
AC	8,453 63	1	8,453 63	79,91	0,000 0
AD	515,529	1	515,529	4 873,16	0,000 0
BC	10,882 6	1	10,882 6	102,87	0,000 0
BD	171,657	1	171,657	1 622,63	0,000 0
CD	78,720 2	1	78,720 2	744,12	0,000 0
ABC	25,792 6	1	25,792 6	243,81	0,000 0
ABD	234,356	1	234,356	2 215,31	0,000 0
ACD	154,714	1	154,714	1 462,47	0,000 0
BCD	1,561 93	1	1,561 93	14,76	0,001 1
ABCD	52,547 3	1	52,547 3	496,72	0,000 0
Error puro	10,01	19	0,105 789		
Total (corr.)	2 539,28	37			

A: X_1 , B: X_2 , C: X_3 , D: X_4 . R-cuadrado = 99,587 %. R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,305 3 %. Error estándar de est. = 0,325 253. Error absoluto de la media = 0,351 33.

estabiliza en el medio. En este proceso difusivo ocurren migraciones espontáneas de mayor a menor concentración, que dependen del tiempo.

Los efectos de primer orden solamente aportan un 36,4 % de la explicación del modelo planteado, los efectos de segundo orden explican un 42 % del modelo y los efectos de tercer orden un 19 % del modelo. Todo esto indica que las interacciones de segundo y tercer orden son las más significativas en la investigación, aportando un 60 % del ajuste del modelo, por lo que se está en presencia de curvatura en la zona de experimentación, y en la zona del óptimo experimental.

En la figura 2, se infiere el aporte que realizan las interacciones de segundo orden en la respuesta; en ellas se observa cómo la temperatura influye negativamente en todos los casos. Los otros factores influyen positivamente en función del aumento de los sólidos totales. Esto se traduce, en que siempre que disminuya la temperatura y aumente cualquier otra variable, aumentará el rendimiento en la extracción y obtención de metabolitos presentes en la hoja.

Determinación de los parámetros de calidad del extracto blando en la zona del óptimo experimental

Los resultados del tamizaje fitoquímico, revelaron la existencia en el extracto de fenoles y taninos, flavonoides, azúcares reductores, alcaloides, triterpenos y esteroides, saponinas y quinonas, coincidiendo con otros trabajos.²⁻¹⁰

El pH de la disolución obtenida para realizar la extracción (alcohol 30 %) fue de 7,3, por lo que al compararlo con el pH de los extractos blandos, que osciló entre 6,06 y 6,08 en el experimento y su réplica, evidenció la presencia en ellos de compuestos químicos con ca-

racterísticas ácidas débiles, como son: los flavonoides, taninos, fenoles, ácido benzoico, ácidos grasos; entre otros (Tabla 2).

CONCLUSIONES

Las condiciones que definen el óptimo experimental en el método de elaboración del extracto blando de las hojas de de la *Petiveria alliacea* L. son: tiempo de humectación: 6 h; volumen de mensturo para humectar: 1,5 vol./g de peso; tiempo de maceración: 48 h y temperatura de concentración: 40 °C .

Los parámetros de calidad del extracto blando optimizado son: color: marrón oscuro; olor: a ajos; homogeneidad; no transparencia; pH: 6,07; densidad relativa: 1,22 g/mL; sólidos totales: 56,75 %; tamizaje fitoquímico: fenoles y taninos, flavonoides, azúcares reductores, alcaloides, triterpenos y esteroides, saponinas y quinonas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. Guías Metodológicas para la Investigación con Plantas Medicinales. Dirección de Ciencia y Técnica, Área de Docencia e Investigación, La Habana, 8-24, abril, 1997.
2. Pérez M.S., Guilarte M.L. Estudio Farmacognóstico de *Petiveria alliacea* L. (droga cruda y extracto fluido). Tesis de Diploma, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 1-30, 1994.
3. Ochoa A.P., Pupo M.P., Duany K. Caracterización y estudio de estabilidad físico química preliminar de las hojas de la especie *Petiveria alliacea* L. (anamú). **Rev. Cub. Quim.**, XII, 68-76, 2000.
4. Medinas D.V., Osorio Y.M. Estudio de estabilidad física y química cualitativa de las hojas (droga cruda) de la *Petiveria alliacea* L. Tesis de Diploma, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 28-49, 2007.

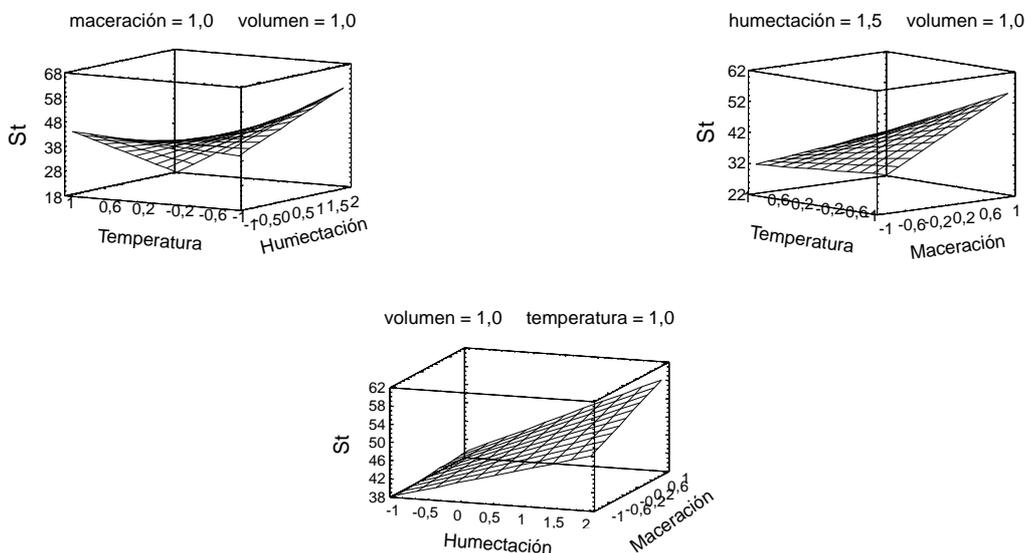


Fig. 2. Gráficos de superficie de respuesta estimada para efecto de segundo orden.

Tabla 2. Resultados de los parámetros de calidad del extracto blando en la zona del óptimo experimental.

Experimento	Características organolépticas				Densidad relativa (g/mL)	pH		Sólidos totales (%)	
	Olor	Color	Homogeneidad	Transparencia		X	\bar{X}	X	\bar{X}
1	A ajos	Marrón oscuro	Sí	No	1,22	6,06		56,7	
1'	A ajos	Marrón oscuro	Sí	No	1,22	6,08	6,07	56,8	56,75

5. Rojas E., Pubillones A. Estudio fitoquímico preliminar de flavonoides de hojas y raíz de la *Petiveria alliacea* L. Tesis de Diploma, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 10-20, 1998.
6. Ochoa A.P., Gross C.F., Armas A.C., Gutiérrez Y.F. Anti-inflammatory activity of the soft extract and ointments of *Petiveria alliacea* L. in rats. **Pharmacologyonline**, 683-689, 2006.
7. Boucicaut F., Castellano Y. Optimización del método de elaboración del extracto blando de las hojas de *Petiveria Alliacea* L. Tesis de Diploma, Santiago de Cuba, Universidad de Oriente, 22, 2004.
8. 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.**, **XVIII**, 78-83, 2006.
9. Ochoa A.P., Marín J.M., Delgado B.N.F., Silva R.P., Salgueiro Z.B. Estudio de estabilidad física y química del extracto blando optimizado de las hojas de la *Petiveria alliacea* L. **Rev. Cub. Quím.**, **XX**, 3-8, 2008.
10. Mujawimana R.J., Tamayo K.R.G. Evaluación antimicrobiana de extractos totales de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú). Tesis de Diploma, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 18-24, 2008.
11. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP 309). Métodos de ensayo de droga cruda, 3-6, 1991.
12. López T.G., Ochoa A.P., Colombat M. Folleto Metodológico Investigativo para las actividades prácticas de la asignatura Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Departamento de Farmacia, Universidad de Oriente, 15-29, 1999.
13. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. NRSP 312. Extractos, fluidos y tinturas. Métodos de ensayos, 1-5, 1991.
14. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. NRSP 311. Extractos, fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos, 3, 1991.