



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

Trabajo de Titulación (modalidad proyecto de Investigación) previo a la obtención del Título de Química Farmacéutica.

AUTOR: Arias Jarrín Nelly Mishel

TUTOR: Dr. Fernando Augusto Novillo Logroño PhD.

Quito, 2019

## DERECHOS DE AUTOR

Yo, Arias Jarrín Nelly Mishel en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba), modalidad presencial, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, concedo a favor de la Universidad Central del Ecuador una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservamos a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Central del Ecuador para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de titulación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando la Universidad de toda responsabilidad.

Firma: \_\_\_\_\_

Nelly Mishel Arias Jarrín  
1725961344  
mishel\_arias@hotmail.es

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación, presentado por **NELLY MISHEL ARIAS JARRÍN**, para optar por el grado de Química Farmacéutica; cuyo título es: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, SEGÚN LA FARMACOGEOGRAFÍA, EN EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS OBTENIDOS DE LAS HOJAS DE *Psidium guajava* L. (GUAYABA)**, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes, incluido las páginas preliminares, para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del tribunal examinador que se designe.

En la ciudad de Quito a los 30 días del mes de agosto de 2019.

Dr. Fernando Augusto Novillo Logroño PhD.  
DOCENTE TUTOR  
1707216527

## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL TRABAJO FINAL POR EL TRIBUNAL

El Tribunal constituido por: Químico Trosky Yánez y Doctora Carmita Reyes y Doctor Fernando Novillo, luego de revisar el Trabajo de Investigación titulado: “Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).” Previo a la obtención del Título (o grado académico) de Química Farmacéutica presentado por la señorita Nelly Mishel Arias Jarrín APRUEBA el trabajo presentado

Para constancia de lo actuado firman:

-----

Químico Trosky Yánez

CC: 1802537728

-----

Doctora Carmita Reyes

CC: 1712862034

-----

Doctor Fernando Novillo

1707216527

## DEDICATORIA

A mis padres Fernando y Nelly, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más.

A mi hermana y mejor amiga María Fernanda por su cariño y apoyo incondicional, durante este proceso.

A toda mi familia, que con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona.

A Alejandro, por apoyarme cuando más lo necesité.

*« Voy a recoger plantas y fósiles y a realizar observaciones astronómicas con el mejor de los instrumentos. Sin embargo, este no es el propósito principal de mi viaje. Trataré de averiguar cómo las fuerzas de la naturaleza actúan unas sobre otras y de qué manera el entorno geográfico ejerce su influencia sobre los animales y las plantas. En resumen, debo aprender acerca de la armonía en la naturaleza »*

***Alexander von Humboldt.***

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Central del Ecuador, por acogerme estos años y enseñarme que hay un mundo a la espera de ser descubierto, una vez más, Todopoderosa es la Sabiduría.

A la Facultad de Ciencias Químicas, donde aprendí que la verdadera magia es la ciencia. Donde aprendí y sufrí casi por igual desde el primero hasta el último día. Pero en especial por poner a personas muy importantes en mi vida desde el primer momento.

A mi tutor, Doctor Fernando Novillo, quien con sus conocimientos se embarcó en este viaje de descubrimiento, y a quien agradezco cada uno sus consejos que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A mis maestros que me brindaron sus conocimientos a lo largo de la Carrera y avivaron mi deseo de conocer y aprender más acerca del mundo de la química y de los medicamentos, de manera especial a la Doctora Carmita Reyes y al Doctor Trosky Yáñez que dedicaron su tiempo en la revisión de este proyecto de investigación y cuyas recomendaciones ayudaron a mejorar los resultados de este trabajo.

A mi papá Fernando mi “alma gemela” por ser mi ejemplo de esfuerzo y valentía. A mi mamá Nelly que ha sido durante toda mi vida la figura del amor incondicional. A ustedes que han sido la mayor motivación de mi vida y mi ejemplo para no temer a las adversidades. Porque son ustedes el pilar donde sembraré mis logros.

A mi hermana María Fernanda, siempre mi modelo a seguir, a quien jamás podré pagar todo lo que ha hecho por mí. Este logro es tanto tuyo como mío porque siempre me diste ánimos para seguir y donde siempre tuve un abrazo esperando.

A mi familia, que de una u otra forma estuvieron conmigo a través de sus oraciones, especialmente a mis abuelitos Luz María y Luis Alfonso que se preocuparon por mi bienestar durante todos estos años, y a mis tíos y tías que tomaron el lugar de mis padres cuando estuvieron lejos y me apoyaron en los momentos más difíciles.

A mi incondicional Alejandro, por nunca perder la fe en mí y mis capacidades, por asumir funciones de ayudante, asesor, mejor amigo y novio. Por saber cómo ayudarme en cada dificultad, y por no dejarme sumir en la tristeza cada vez que fallaba.

A mis amigos, porque sin ustedes habría terminado antes, pero no habría vivido las más peculiares historias y en especial a Eduardo, mi primer amigo universitario quien a pesar del cansancio y las tristezas vividas siempre tuvo una palabra de apoyo.

A todos ustedes mi eterno agradecimiento, este es el resultado, un escalón más en que sus manos me ayudaron a subir.

## Índice de Contenidos

Introducción.....	1
Capítulo I.....	4
1. El problema .....	4
1.1. Planteamiento del problema .....	4
1.2. Formulación del problema.....	5
1.2.1. Preguntas de investigación.....	5
1.3. Objetivos de la investigación.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos .....	5
1.4. Importancia y justificación de la investigación .....	6
Capítulo II.....	9
2. Marco teórico.....	9
2.1. Antecedentes.....	9
2.2. Fundamento teórico .....	11
2.2.1. Farmacognosia .....	11
2.2.2. Productos Naturales .....	11
2.2.3. Planta medicinal.....	12
2.2.4. Farmacogeografía .....	12
2.2.5. Buenas Prácticas de Recolección Agrícola.....	12
2.2.6. Metabolitos primarios y secundarios. ....	12
2.2.6.1. Terpenos .....	13
2.2.6.2. Compuestos fenólicos .....	14
2.2.7. Extractos botánicos. ....	16
2.2.7.1. Tipos de extractos.....	16
2.2.8. Método de extracción.....	16
2.2.9. Control de calidad .....	17
2.2.9.1. Limpieza y desinfección.....	17
2.2.9.2. Identificación macroscópica.....	17
2.2.9.3. Dsecación, fragmentación y almacenamiento .....	18
2.2.9.4. Determinación de cenizas totales. ....	19
2.2.9.5. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico .....	19
2.2.9.6. Determinación de humedad.....	19
2.2.10. Cromatografía en capa fina.....	20
2.2.11. Tamizaje fitoquímico .....	21
2.2.11.1. Cuantificación de fenoles totales.....	21

2.2.11.2.	Cuantificación de flavonoides totales .....	22
2.2.12.	Producto Natural Procesado de Uso Medicinal (PNPUM).....	22
2.2.12.1.	Clasificación de los Productos Naturales Procesados de Uso Medicinal....	22
2.2.12.1.1.	Formas farmacéuticas .....	22
2.2.12.2.	Control de calidad de formas farmacéuticas sólidas .....	23
2.2.13.	Actividad antioxidante.....	23
2.2.14.	Butil hidroxitolueno, 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) .....	24
2.2.15.	Método del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) .....	25
2.2.16.	Descripción botánica de <i>Psidium guajava</i> L. (Guayaba).....	26
2.2.16.1.	Generalidades de la familia Myrtaceae. ....	26
2.2.16.2.	Jerarquía taxonómica.....	27
2.2.16.3.	Nombre científico.....	27
2.2.16.4.	Nombre común.....	27
2.2.16.5.	Distribución geográfica .....	27
2.2.16.6.	Descripción botánica .....	27
2.2.16.7.	Identificación microscópica .....	28
2.2.16.8.	Aspectos del cultivo .....	28
2.2.16.9.	Usos.....	28
2.2.16.10.	Actividad farmacológica de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	28
2.3.	Fundamento legal. ....	29
2.4.	Hipótesis .....	32
2.4.1.	Hipótesis alternativa. (Hi).....	32
2.4.2.	Hipótesis Nula. (Ho) .....	32
2.5.	Sistema de variables .....	32
Capítulo III	.....	33
3.	Marco metodológico.....	33
3.1.	Diseño de la investigación.....	33
3.2.	Población .....	33
3.3.	Muestra o materia prima.....	33
3.4.	Método.....	33
3.4.1.	Materiales.....	33
3.4.2.	Desarrollo Experimental .....	36
3.4.3.	Procedimientos.....	36
3.4.3.1.	Recolección de la muestra vegetal .....	36
3.4.3.2.	Identificación taxonómica .....	38



3.4.3.3.	Limpieza y desinfección.....	38
3.4.3.4.	Identificación macroscópica.....	38
3.4.3.5.	Desecación, fragmentación y almacenamiento .....	39
3.4.3.6.	Control de calidad. ....	40
3.4.3.6.1.	Determinación de cenizas totales .....	40
3.4.3.6.2.	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico .....	40
3.4.3.6.3.	Determinación de humedad de la muestra vegetal.....	40
3.4.3.7.	Control de calidad de formas farmacéuticas sólidas .....	41
3.4.3.7.1.	Uniformidad de unidades de dosificación .....	41
3.4.3.7.2.	Friabilidad .....	41
3.4.3.7.3.	Fuerza de ruptura.....	41
3.4.3.7.4.	Desintegración.....	41
3.4.3.8.	Extracción del material vegetal por maceración dinámica.....	41
3.4.3.8.1.	Preparación de micro- extractos .....	41
3.4.3.8.2.	Perfil cromatográfico.....	42
3.4.3.8.3.	Preparación de los extractos hidroalcohólicos .....	42
3.4.4.	Tamizaje fitoquímico, caracterización de los extractos.....	43
3.4.4.1.	Identificación de alcaloides.....	43
3.4.4.2.	Identificación de Terpenoides (test de Salkowski) .....	43
3.4.4.3.	Identificación de Esteroides (test de Liebermann- Burchard).....	43
3.4.4.4.	Taninos .....	43
3.4.4.5.	Saponinas .....	43
3.4.4.6.	Identificación de antraquinonas (test de Borntrager) .....	44
3.4.4.7.	Identificación de glicósidos cardiotónicos (test de Keller- Killiani).....	44
3.4.4.8.	Identificación de fenoles .....	44
3.4.5.	Cuantificación de fenoles totales .....	44
3.4.6.	Cuantificación de flavonoides totales.....	45
3.4.7.	Evaluación de la actividad antioxidante .....	47
3.5.	Diseño experimental.....	48
3.5.1.	Primera etapa .....	48
3.5.2.	Segunda etapa .....	48
Capítulo IV	.....	50
4.	Análisis y discusión de resultados .....	50
4.1.	Recolección de la muestra vegetal.....	50
4.2.	Identificación taxonómica .....	50

4.3.	Limpieza y desinfección.....	50
4.4.	Identificación macroscópica.....	51
4.5.	Desecación, fragmentación y almacenamiento .....	55
4.6.	Control de calidad.....	56
4.7.	Control de calidad de formas farmacéuticas sólidas. ....	60
4.7.1.	Uniformidad de unidades de dosificación de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	60
4.7.2.	Friabilidad de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	60
4.7.3.	Fuerza de ruptura de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	61
4.7.4.	Desintegración de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	61
4.8.	Extracción del material vegetal por maceración dinámica.....	62
4.8.1.	Preparación de micro- extractos y perfil cromatográfico .....	62
4.8.2.	Preparación de extractos hidroalcohólicos .....	64
4.9.	Tamizaje fitoquímico.....	66
4.10.	Cuantificación de fenoles totales en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	67
4.11.	Cuantificación de flavonoides totales en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	70
4.12.	Evaluación de actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de <i>Psidium guajava</i> L.....	72
4.12.1.	Curva de referencia con el estándar butil hidroxitolueno (BHT). ....	72
5.	Conclusiones y Recomendaciones .....	87
5.1.	Conclusiones.....	87
5.2.	Recomendaciones .....	88
	Referencias bibliográficas .....	89

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de <i>Psidium guajava</i> L. (guayaba).....	27
<b>Tabla 2.</b> Reactivos. ....	33
<b>Tabla 3.</b> Materiales. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Equipos. ....	35
<b>Tabla 5.</b> Parámetros de control de calidad de la materia prima, hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	39
<b>Tabla 6.</b> Parámetros de control de calidad de la materia prima, hojas secas y fragmentadas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	41
<b>Tabla 7.</b> Curva de calibración de ácido gálico.....	45
<b>Tabla 8.</b> Curva de calibración de quercetina. ....	46
<b>Tabla 9.</b> Curva de referencia con el estándar BHT.....	47
<b>Tabla 10.</b> Determinación de dimensiones de la lámina foliar. ....	51
<b>Tabla 11.</b> Resumen de dimensiones de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	51
<b>Tabla 12.</b> Características organolépticas de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	52
<b>Tabla 13.</b> Datos de medición de área foliar. ....	53
<b>Tabla 14.</b> Porcentaje de defoliación. ....	54
<b>Tabla 15.</b> Resumen de resultados obtenidos de área foliar y porcentaje de defoliación de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	55
<b>Tabla 16.</b> Resultados de los ensayos de control de calidad. Cenizas totales de <i>Psidium guajava</i> L.....	56
<b>Tabla 17.</b> Resultados de los ensayos de control de calidad. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico 3M de <i>Psidium guajava</i> L.....	58
<b>Tabla 18.</b> Resultado de los ensayos de control de calidad. Porcentaje de humedad por el método termogravimétrico (LOD) para las hojas fragmentadas de <i>Psidium guajava</i> L.....	59
<b>Tabla 19.</b> Determinación de Uniformidad de unidades de dosificación de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	60
<b>Tabla 20.</b> Determinación de la fuerza de ruptura de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	61
<b>Tabla 21.</b> Determinación del tiempo de desintegración de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	61
<b>Tabla 22.</b> Resultados de los ensayos físicos de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	61

<b>Tabla 23.</b> Factores de retención de los extractos de <i>Psidium guajava</i> L. obtenidos con diferentes solventes de extracción. Ensayo de identidad de compuestos fenólicos por CCF.....	62
<b>Tabla 24.</b> Factores de retención de los extractos de <i>Psidium guajava</i> L. obtenidos con diferentes solventes de extracción. Ensayo de identidad de flavonoides por CCF. ....	63
<b>Tabla 25.</b> Pesos y porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos de hojas de <i>Psidium guajava</i> L., de diferentes localidades de Ecuador. ....	64
<b>Tabla 26.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.....	66
<b>Tabla 27.</b> Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales. ....	67
<b>Tabla 28.</b> Datos experimentales de absorbancia y concentración de compuestos fenólicos en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	68
<b>Tabla 29.</b> Concentración de compuestos fenólicos expresados como mg de ácido gálico/ g de EHA .....	68
<b>Tabla 30.</b> Análisis de varianza de un factor. Cuantificación de fenoles totales. ....	69
<b>Tabla 31.</b> Curva de calibración de Quercetina para la cuantificación de flavonoides totales.....	70
<b>Tabla 32.</b> Datos experimentales de absorbancia y concentración de flavonoides en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. ....	71
<b>Tabla 33.</b> Concentración de flavonoides expresados como mg de quercetina/ g de EHA .....	71
<b>Tabla 34.</b> Análisis de varianza de un factor. Cuantificación de flavonoides totales. ....	72
<b>Tabla 35.</b> Datos obtenidos de la absorbancia para la curva de referencia con el estándar butil hidroxitolueno (BHT).....	73
<b>Tabla 36.</b> Porcentaje de inhibición y CI <sub>50</sub> del estándar butil hidroxitolueno (BHT).....	73
<b>Tabla 37.</b> Resultados de la absorbancia del EHA de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. de la ciudad de Quinindé (provincia de Esmeraldas) para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH.....	74
<b>Tabla 38.</b> Porcentaje de inhibición y CI <sub>50</sub> del EHA de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. de la ciudad de Quinindé (provincia de Esmeraldas). ....	74
<b>Tabla 39.</b> Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. EHA ciudad de Quinindé.....	75

<b>Tabla 40.</b> Resultados de la absorbancia del EHA de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. de la ciudad de Ibarra (provincia de Imbabura) para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH. ....	77
<b>Tabla 41.</b> Porcentaje de inhibición y $CI_{50}$ del EHA de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. de la ciudad de Ibarra (provincia de Imbabura). ....	77
<b>Tabla 42.</b> Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. EHA ciudad de Ibarra. ....	78
<b>Tabla 43.</b> Resultados de la absorbancia del EHA de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. de la ciudad de Puyo (provincia de Pastaza) para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH. ....	79
<b>Tabla 44.</b> Porcentaje de inhibición y $CI_{50}$ del EHA de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. de la ciudad de Puyo (provincia de Pastaza). ....	79
<b>Tabla 45.</b> Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. EHA ciudad de Puyo. ....	80
<b>Tabla 46.</b> Resultados de la absorbancia del EHA de un PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. comercializado en el Ecuador para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH.....	82
<b>Tabla 47.</b> Porcentaje de inhibición y $CI_{50}$ del EHA de un PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. comercializado en el Ecuador. ....	82
<b>Tabla 48.</b> Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. EHA, PNPUM a base del extracto de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. comercializado en el Ecuador.....	83
<b>Tabla 49.</b> Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. Comparación entre muestras. ....	84

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Formación de metabolitos secundarios .....	13
<b>Figura 2.</b> Síntesis de terpenos y su clasificación de acuerdo a las unidades isoprenoides que contienen. ....	14
<b>Figura 3.</b> Estructura básica de un flavonoide. ....	15
<b>Figura 4.</b> Cámara cromatográfica. ....	20
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu. ....	21
<b>Figura 6.</b> Fórmula estructural del butil hidroxitolueno (BHT).....	25
<b>Figura 7.</b> Estructura química DPPH. ....	26
<b>Figura 8.</b> Reacción entre el DPPH y un antioxidante. ....	26
<b>Figura 9.</b> <i>Psidium guajava</i> L. ....	29
<b>Figura 10.</b> Dimensiones de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. de diferentes zonas geográficas del Ecuador.....	52
<b>Figura 11.</b> Área foliar y porcentaje de defoliación de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. de diferentes zonas geográficas del Ecuador .....	55
<b>Figura 12.</b> Promedio de los porcentajes de cenizas totales obtenidos de diferentes muestras geográficas de <i>Psidium guajava</i> L., según monografía ANVISA (2010).....	57
<b>Figura 13.</b> Comparación de los porcentajes de cenizas insolubles en ácido clorhídrico obtenidos de diferentes muestras geográficas de <i>Psidium guajava</i> L., según monografía ANVISA (2010) .....	58
<b>Figura 14.</b> Comparación de los porcentajes de humedad obtenidos de diferentes muestras geográficas de <i>Psidium guajava</i> L., según monografía ANVISA (2010).....	59
<b>Figura 15.</b> Comparación de los porcentajes de rendimiento obtenidos de diferentes muestras geográficas de <i>Psidium guajava</i> L., y del PNPUM de referencia.....	65
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración de ácido gálico .....	67
<b>Figura 17.</b> Promedio de la concentración de compuestos fenólicos totales obtenidos de EHA de diferentes muestras geográficas de <i>Psidium guajava</i> L.....	69
<b>Figura 18.</b> Curva de calibración de quercetina .....	70
<b>Figura 19.</b> Promedio de la concentración de flavonoides totales obtenidos de EHA de diferentes muestras geográficas de <i>Psidium guajava</i> L.....	71
<b>Figura 20.</b> Curva de referencia con el estándar butil hidroxitolueno (BHT).....	73
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de inhibición de DPPH, muestra de la ciudad de Quinindé. ....	75
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de inhibición de DPPH, muestra de la ciudad de Ibarra. ....	77
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de inhibición de DPPH, muestra de la ciudad de Puyo.....	80

<b>Figura 24.</b> Porcentaje de inhibición de DPPH, muestra del PNPUM. ....	82
<b>Figura 25.</b> Porcentajes de inhibición del radical DPPH, con diferentes muestras y concentraciones frente al estándar BHT. ....	86

## **Lista de Anexos**

<b>Anexo A.</b> Árbol de problemas.....	93
<b>Anexo B.</b> Categorización de las variables.....	94
<b>Anexo C.</b> Diagrama de flujo para la metodología planteada .....	95
<b>Anexo D.</b> Matriz de Operalización de Variables. ....	97
<b>Anexo E.</b> Instrumentos de recolección de datos. ....	98
<b>Anexo F.</b> Certificados de identificación taxonómica.....	111
<b>Anexo G.</b> Certificado analítico de materias primas y solventes. ....	113
<b>Anexo H.</b> Listado de Extractos o Recursos Naturales y sus Referencias Bibliográficas Reconocidas.....	115
<b>Anexo I.</b> Fotografías .....	116



## **Abreviaturas**

**BHT:** Butil hidroxitolueno

**BPRA:** Buenas Prácticas de Recolección Agrícola

**CCF:** Cromatografía en Capa Fina

**CI<sub>50</sub>:** Concentración media inhibitoria 50

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**EHA:** Extracto hidroalcohólico

**FHEUM:** Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos

**GA:** Ácido gálico

**GAE:** Equivalente de ácido gálico

**LOD:** Loss on drying

**MTC:** Medicina Tradicional Complementaria

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PGL:** *Psidium guajava* L.

**PNPUM:** Producto Natural Procesado de Uso Medicinal

**Q:** Quercetina

**QE:** Equivalente de quercetina

**USP-NF:** Farmacopea de los Estados Unidos de América

**TÍTULO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

Autora: Nelly Mishel Arias Jarrín

Tutor: Fernando Augusto Novillo Logroño

## RESUMEN

Se ha establecido que la presencia de metabolitos secundarios en las plantas depende de las condiciones climáticas. En esta investigación se evaluó la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos (EHA) de las hojas de *Psidium guajava* L., de diferentes zonas geográficas del Ecuador (Provincias de Esmeraldas, Imbabura y Pastaza). Se realizaron pruebas del control de calidad para evaluar la diferencia fenológica de las muestras. Los extractos hidroalcohólicos de todas las muestras se obtuvieron por maceración dinámica durante tres días con una mezcla de etanol al 96%-Agua (50:50, V/V) que demostró ser más eficiente para la extracción de los compuestos químicos de interés. Se cuantificaron los fenoles totales mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, en el que la muestra proveniente de la ciudad de Quinindé (provincia de Esmeraldas) presentó un mayor contenido ( $6,435 \pm 0,123$  mg GAE/ g EHA). El mayor contenido de flavonoides totales se encontró en la especie de la ciudad de Ibarra (provincia de Imbabura) con un contenido de ( $1,809 \pm 0,015$  mg QE/g EHA). Finalmente, se evaluó la actividad antioxidante mediante el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) usando el estándar referencial butil hidroxitolueno. En este ensayo se determinó que los EHA obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., poseen una alta capacidad de captación de radicales libres, incluso mayor que el estándar; siendo la muestra de la ciudad de Quinindé la que presenta el mayor porcentaje de inhibición (96,73%) frente al radical DPPH con  $CI_{50}$  de 0,87 ppm.

**PALABRAS CLAVE:** FARMACOGEOGRAFÍA, COMPUESTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES TOTALES, *PSIDIUM GUAJAVA* L., ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, DPPH.

**TITLE:** Evaluation of antioxidant activity, according to pharmacogeography, in hydroalcoholic extracts obtained from the leaves of *Psidium guajava* L. (guava).

Author: Nelly Mishel Arias Jarrín

Tutor: Fernando Augusto Novillo Logroño

## **ABSTRACT**

It has been established that the presence of secondary metabolites in plants depends on climatic conditions. In this investigation, the antioxidant activity of the hydroalcoholic extracts (EHA) of the leaves of *Psidium guajava* L., from different geographical areas of Ecuador (Provinces of Esmeraldas, Imbabura and Pastaza) was evaluated. Quality control tests were performed to assess the phenological stages difference of the samples. Hydroalcoholic extracts for all samples were obtained by dynamic maceration for three days with a 96% hydroalcoholic ethanol-water mixture (50:50, V / V) which proved to be more efficient for the extraction of chemical compounds of interest. Total polyphenols were quantified using the Folin-Ciocalteu colorimetric method, in which the sample from the city of Quinindé (Esmeraldas province) had a higher content ( $6,435 \pm 0,123$  mg GAE / g EHA). The highest total flavonoid content was found in the species of Ibarra city (Imbabura province) with a content of ( $1,809 \pm 0,015$  mg QE / g EHA). Finally, the antioxidant activity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) method using the reference standard butylhydroxytoluene. In this test it was determined that the EHA obtained from the leaves of *Psidium guajava* L., have a high capacity of free radical uptake, even greater than the standard; the sample of the city of Quinindé being the one with the highest percentage of inhibition (96,73%) against the DPPH radical with IC<sub>50</sub> of 0.87 ppm.

**KEY WORDS:** PHARMACOGEOGRAPHY, PHENOLIC COMPOUNDS, TOTAL FLAVONOIDS, *PSIDIUM GUAJAVA* L., ANTIOXIDANT ACTIVITY, DPPH.

## Introducción

Desde su origen, con el afán de mitigar el dolor y enfrentar a la muerte, la humanidad dispuso de las plantas que tenía en su entorno, guiada en primera instancia por su instinto (aplicación empírica) y luego en forma más razonable lo que posteriormente daría origen a ciencias como la medicina. Históricamente, se ha presentado evidencia irrefutable de que un incontable número de plantas han dado origen a los compuestos y medicamentos más importantes para el tratamiento y cura de enfermedades que han aquejado a la humanidad durante milenios. El Ecuador no es una excepción, las crónicas señalan que el país ha dado origen a medicamentos importantes para el mundo desde el siglo XVII un ejemplo de ello es la planta *Cinchona officinalis* cuyo compuesto, la quinina, se usó para prevenir y tratar la malaria.

En muchos países existen formas de curación tradicionales o indígenas firmemente arraigadas en sus respectivas culturas e historias. “Para millones de personas, los tratamientos tradicionales y a base de hierbas representan la principal fuente de atención sanitaria, y a veces la única” (Organización Mundial de la Salud OMS, 2013, p.16).

Según declaraciones de la Directora General de la OMS, Dra. Margaret Chan “las medicinas tradicionales de calidad, seguridad y eficacia comprobada contribuyen a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud. Esta forma de atención está próxima a los hogares, es accesible y asequible. Además, es culturalmente aceptada y en ella confían muchísimas personas.”

De acuerdo a lo referido en la estrategia sobre medicina tradicional 2014-2023 de la OMS (2013)

La misión principal es la de integrar la Medicina tradicional complementaria (MTC) en los sistemas de salud mediante el desarrollo de normas, directrices técnicas y metodologías relativas a la investigación de productos, prácticas y profesionales; alentar y respaldar proyectos de investigación clínica sobre seguridad y eficacia y abogar por el uso racional de la MTC. Los productos de MTC incluyen hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos ingredientes. (p.16)

La ubicación geográfica estratégica del Ecuador con sus variados sistemas ecológicos independientes hace de la biodiversidad vegetal un recurso invaluable que ha constituido una fuente importante de productos naturales de uso medicinal, en especial para las comunidades indígenas. En la actualidad existen varias especies vegetales de las que se conoce son fuente de metabolitos secundarios y que son biológicamente activos, especialmente metabolitos secundarios con actividad antioxidante. De acuerdo a Yepes y Silveira (2011)

En el caso particular de las especies tropicales y subtropicales, las temperaturas óptimas de desarrollo están entre 15 °C y 35 °C, encontrándose, obviamente, una variación de temperaturas y su adaptación a ellas debida a la altitud. La

temperatura, el estrés hídrico, la humedad y la respuesta de las plantas a una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> son los principales controladores de la actividad fisiológica de las plantas y por ende tienen influencia sobre la distribución y productividad de las plantas. (p.221)

Leos-Rivas, Rivas-Morales, & García-Hernández (2015) mencionan que el estudio de la actividad antioxidante de las plantas medicinales y alimenticias ha crecido en las últimas décadas ya que en un número importante de productos obtenidos de éstas, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, poseen efectos antioxidantes los cuales son evidenciados mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* asociados a cada uno de ellos y que debido a su elevado consumo a través de la dieta y la presencia ubicua en muchas especies vegetales, el potencial de los polifenoles como agentes antioxidantes ha sido el más estudiado.

Varios estudios en este campo reconocen a la especie *Psidium guajava* L. (guayaba) como una de las fuentes alimenticias con mayor contenido de compuestos con actividad antioxidante. Así lo menciona Metwally, Omar, Ghazy, Harraz, & Sohafy (2011) “Se demostró que la hoja tiene una fuerte actividad antioxidante, por lo tanto, la guayaba podría usarse para extender la vida útil de los alimentos, para reducir el desperdicio y las pérdidas nutricionales al inhibir y retrasar la oxidación” (p.99).

Gracias a estas investigaciones que han fundamentado el uso de las hojas de guayaba como una alternativa terapéutica se ha dado la apertura para la utilización de las hojas secas como base para el desarrollo de nuevos fármacos o como materia prima para la elaboración de Productos Naturales Procesados de Uso Medicinal (PNPUM).

Tomando como base el afán por redescubrir y fundamentar el uso tradicional de plantas medicinales en el Ecuador mediante su uso sostenible, se plantea el trabajo de investigación de evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba), en relación al estándar butil hidroxitolueno.

En el primer capítulo se describe la problemática del trabajo de investigación, mediante la formulación del problema, sus preguntas de investigación, objetivos y justificación de la realización del trabajo con el fin de establecer si el extracto hidroalcohólico obtenido de las hojas de *Psidium guajava* L. de diferentes regiones del Ecuador presenta actividad antioxidante.

En el segundo capítulo se detalla el contenido bibliográfico referencial que permite generar mediante antecedentes relacionados el fundamento teórico para llevar a cabo este trabajo de investigación. Además, se describen el fundamento legal, las hipótesis nula y alternativa y el sistema de variables.

En el tercer capítulo se establece el marco metodológico donde se especifica el planteamiento del diseño de la investigación, la muestra, materiales, equipos y técnicas con los que se contó para la investigación. También se desarrolla en este capítulo el diseño experimental, la matriz de operacionalización de variables.

En el cuarto capítulo se presentan el análisis y discusión de los resultados obtenidos de cada una de las etapas del trabajo experimental. De igual forma se detallan el análisis e interpretación de estos mismos resultados mediante tablas, gráficos y figuras.

En el quinto capítulo se establecen las conclusiones y recomendaciones que nacen de los resultados obtenidos en base a los objetivos planteados de manera inicial. Igualmente se establecen las recomendaciones generadas durante la realización del trabajo de investigación.

## Capítulo I

### 1. El problema

#### 1.1. Planteamiento del problema

La medicina ancestral, basada en la utilización de plantas medicinales ha constituido desde el inicio de la humanidad, como sociedad, una alternativa en el tratamiento terapéutico de dolencias que la han aquejado desde su origen. En la actualidad, se han reconocido varias especies vegetales que contienen compuestos químicamente activos, lo que ha acrecentado el interés científico de obtener información acerca de las actividades biológicas de los metabolitos secundarios, entre la que se destaca la actividad antioxidante.

La prevalencia de enfermedades como resultado de la producción de compuestos altamente reactivos y radicales libres; y siendo el principal interés la salud y calidad de vida humana no solo a nivel nacional sino a nivel mundial surge como consecuencia la búsqueda de alternativas fitoterapéuticas con actividad antioxidante, es por ello que se plantea el estudio farmacogeográfico de especies vegetales pertenecientes a la biodiversidad ecuatoriana que se sospecha poseen un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.

La especie vegetal *Psidium guajava* L., se encuentra distribuida geográficamente en los trópicos y subtrópicos del planeta, aunque se desconoce su lugar de origen exacto. En el Ecuador esta especie se halla en las regiones Sierra, Costa, Oriente e Insular, lo que favorece la oportunidad de realizar el estudio farmacogeográfico de la especie en nuestro territorio.

En el estudio de Bi, Liu, Zhou, Wu, & Chen (2018) acerca de la evaluación de la capacidad antioxidante de la guayaba se demostró que esta es rica en compuestos fenólicos, en particular, la cáscara de su fruto, que mostró poseer el mayor contenido de dichos compuestos que probablemente son los responsables de la actividad antioxidante.

En el estudio de Gayathri & Kiruba (2014) acerca del análisis fitoquímico preliminar de las hojas de *Psidium guajava* L. se demostró mediante reacciones de identificación cualitativa la presencia de más de 20 compuestos químicos entre los que se incluyen alcaloides, antocianinas, carotenoides, aceites esenciales, ácidos grasos, lectinas, fenoles, saponinas, taninos, triterpenos y vitamina C. Este estudio a su vez hace importantes recomendaciones como la de complementar con estudios cuantitativos sobre los compuestos bioactivos presentes en la guayaba ya que estos podrían contribuir significativamente al manejo de la salud y podrían recomendarse en la ingesta diaria.

Considerando estos aportes científicos como evidencia se planteó la necesidad de evaluar la actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de la especie *Psidium guajava* L. en relación a la farmacogeografía del Ecuador.

## **1.2. Formulación del problema**

¿Los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. recolectadas en diferentes zonas geográficas del Ecuador presentan actividad antioxidante en comparación al estándar butil hidroxitolueno?

### **1.2.1. Preguntas de investigación**

- ¿Cómo garantiza la calidad de la materia prima?
- ¿Cómo garantiza la identidad de la especie vegetal utilizada en el trabajo investigativo?
- ¿Mediante la maceración dinámica como método de extracción se obtiene un buen rendimiento de los extractos hidroalcohólicos?
- ¿El método del radical DPPH es adecuado para establecer que los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., recolectadas en diferentes zonas geográficas del Ecuador presentan actividad antioxidante?
- ¿Es comparable la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Psidium guajava* L. de diferentes zonas geográficas del Ecuador en referencia al estándar butil hidroxitolueno?

## **1.3. Objetivos de la investigación**

### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba) frente al estándar butil hidroxitolueno

### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Recolectar e identificar taxonómicamente la especie vegetal *Psidium guajava* L. de diferentes zonas geográficas del Ecuador.
- Verificar los parámetros de calidad establecidos para la materia prima.
- Preparar extractos hidroalcohólicos de las hojas de la especie *Psidium guajava* L. y del PNPUM mediante la técnica de maceración dinámica.
- Realizar la caracterización fitoquímica de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., mediante reacciones cualitativas de



identificación de compuestos químicos y por medio cromatografía en capa fina (CCF).

- Determinar los perfiles cromatográficos de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de la especie *Psidium guajava* L., de las diferentes zonas geográficas del Ecuador, y del extracto del PNPUM.
- Determinar la concentración de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., de las diferentes zonas geográficas del Ecuador.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., y del PNPUM mediante el método del radical DPPH frente al estándar butil hidroxitolueno.
- Determinar la concentración media inhibitoria del radical DPPH (CI<sub>50</sub>) de cada uno de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., y del PNPUM en relación al estándar butil hidroxitolueno.

#### **1.4. Importancia y justificación de la investigación**

La comprensión acerca del uso tradicional de las plantas, así como de sus partes específicas como: tallos, hojas, flores, frutos y raíces; su cultivo, preparación y administración son de gran importancia para el conocimiento etnobotánico del Ecuador. Recalcando que en muchos casos el uso de plantas tradicionales es la primera fuente de atención como parte de la MTC, y que en otros países puede ser la única opción terapéutica a causa del encarecimiento de los servicios de salud.

Los extractos vegetales son mezclas complejas de sustancias químicas, de estructuras tan variadas como propiedades fisicoquímicas y biológicas, que son el resultado del metabolismo de las plantas; sustancias que son responsables de la actividad biológica ya que son la fuente de productos naturales activos que no necesariamente usa la planta para su crecimiento o reproducción, pero cuya presencia se ha justificado en muchos casos debido a que las plantas los usan como un mecanismo de defensa.

Los procesos oxidativos son un conjunto de reacciones químicas en la que un compuesto cede electrones a otro compuesto, tal es el caso de la oxidación lipídica, mediada por radicales libres, moléculas altamente inestables, caracterizadas por poseer uno o más electrones desapareados y en un nivel energético superior que reaccionan químicamente con otras moléculas para extraer uno de sus electrones y de esta manera estabilizarse.

Los antioxidantes son moléculas que retardan o previenen la oxidación de otras moléculas (generalmente sustratos biológicos) por acción de los radicales libres mediante mecanismos que implican la transferencia de un átomo de hidrógeno o por cesión de un

electrón. Esto significa que el antioxidante se convierte en un radical libre y el siguiente paso es su oxidación con una baja o nula reactividad con su entorno.

Dentro de la prevención de enfermedades de tipo degenerativas los compuestos antioxidantes juegan un papel importante ya que al neutralizar a las ROS generan estructuras estables que evitan el deterioro de sustancias de importancia fisiológica celular. Los compuestos fenólicos de acuerdo a investigaciones son responsables de la actividad antioxidante, estos se presentan como metabolitos secundarios en una variedad innumerable de plantas y aunque pueden ser consumidos en forma natural con los alimentos ha surgido una tendencia, la de extraerlos de sus fuentes naturales y emplearlos como aditivos de alimentos procesados. (Olaya & Restrepo, 2012)

El Ecuador, debido a su ubicación y topografía única posee un clima que varía con la altitud de sus cuatro regiones naturales, formando microclimas que propician las condiciones para desarrollo de una amplia variedad de especies vegetales, entre las que se encuentra la especie *Psidium guajava* L. Las estaciones que se reconocen en el Ecuador, aunque no tan definidas son el invierno (de diciembre a mayo con un clima cálido y lluvioso) y el verano (de junio a noviembre con una temporada seca y con temperaturas frescas).

Cada una de las regiones naturales que presenta el Ecuador constituyen verdaderos sistemas ecológicos independientes. En la región insular y en la región costera son las corrientes oceánicas las que influyen en la temperatura, haciendo del clima húmedo y cálido. En la región interandina el clima está determinado por la altitud (desde 500 a 6000 msnm aproximadamente) y la presión atmosférica que producen significativas diferencias en la vegetación. En la región amazónica las abundantes lluvias durante todo el año determinan un clima tropical y húmedo.

Como se ha mencionado, son varios los factores climáticos, ambientales y geográficos que determinan el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales en el Ecuador, factores que se han entendido como intrascendentes en los estudios farmacognósticos hasta ahora llevados a cabo en el país, es por ello que se toma la iniciativa de incluir a la farmacogeografía dentro del trabajo de investigación como un determinante para la evaluación de la actividad antioxidante de la especie *Psidium guajava* L., de acuerdo al trabajo de Rajan, Yadava, Kumar, & Saxena (2007) se afirma. “Los patrones de distribución de las especies de plantas representan una herramienta importante en los estudios de biogeografía, evolución, ecología, conservación y manejo de especies invasivas” (p.109).

Existen diversas investigaciones acerca de la actividad antioxidante de *Psidium guajava* L., así, por ejemplo, según lo describe Wang, Wu, Bei, Shi, & Wu (2017) “Los flavonoides son los compuestos bioactivos principales y poseen actividades biológicas multidireccionales, que incluyen actividad antioxidante, efectos hipoglucémicos y efectos antihipertensivos” (p.1).

El propósito de este trabajo de investigación, además de la importancia social y cultural, al investigar la biodiversidad vegetal ecuatoriana, es el de ser un referente en el campo de los estudios farmacogeográficos en el Ecuador y con ello aportar información y datos reales acerca de la actividad antioxidante de la especie *Psidium guajava* L. (guayaba) de diferentes localidades del Ecuador frente al estándar BHT, enmarcando la importancia de la ubicación geográfica y las condiciones ambientales en la producción de metabolitos secundarios con actividad antioxidante.

Considerando que en la actualidad muchos estudios confirman el efecto dañino de los radicales libres que conducen al estrés oxidativo y que están estrechamente relacionados a patologías como el cáncer, psoriasis, diabetes mellitus, aterosclerosis e hipertensión arterial se plantea este trabajo de investigación que pretende fundamentar científicamente el uso racional y adecuado de la especie *Psidium guajava* L., como fuente de sustancias de origen natural con fines terapéuticos, ya que muchos estudios vinculan a la ingesta de una dieta balanceada de frutas y verduras con una disminución del riesgo de padecimiento de este tipo de enfermedades degenerativas, estas fuentes naturales tienen un contenido elevado de polifenoles, flavonoides, antocianidinas y vitamina C.

Finalmente, el valor adicional de este trabajo de investigación es el de ser de utilidad para investigaciones posteriores enfocadas en el reemplazo de los antioxidantes de origen sintético para la conservación de productos alimenticios y la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos en los que su principio activo sean los metabolitos con actividad antioxidante de la especie *Psidium guajava* L.

## Capítulo II

### 2. Marco teórico

#### 2.1. Antecedentes

La OMS (2019) hace énfasis en la importancia de la biodiversidad vegetal para las investigaciones sanitarias y para la MTC, en donde sigue desempeñando un papel esencial en la atención primaria de salud. Además, resalta que los medicamentos tradicionales son utilizados por el 60% de la población mundial y a pesar de que se cuenta con medicamentos sintéticos aún persiste la necesidad y la demanda de productos naturales de uso medicinal y para investigaciones biomédicas.

El Ecuador, su clima y ubicación únicos han sido un factor determinante para que su gran diversidad vegetal sea estudiada a través de los años. Crónicas del siglo XIX resaltan el trabajo “*Geografía de las plantas*” de Alexander von Humboldt en su visita al Ecuador en los años de 1802 y 1803.

Más adelante los antecedentes se presentan con el trabajo “*Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador*” de Jorgensen y León-Yáñez del año 1999 que documenta 15901 especies de plantas, de las cuales este número ha crecido un 6% lo que en la actualidad correspondería a alrededor de 17000 especies. Ya en el siglo XXI, específicamente en el año 2011 con la publicación del “*Libro rojo de las plantas vasculares*” de León Yáñez et al. se documentó la existencia de al menos 4500 especies en el Ecuador y con el trabajo de la “*Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador*” de la Torre et al., (2008) se compilan 5172 especies de las cuales el 60% son medicinales, el 55% son fuente de materiales el 30% son comestibles y el 20% son de uso social, el porcentaje sobrepasa el 100% lo que significa que muchas de estas especies tiene múltiples usos. Tal es el caso de la especie *Psidium guajava* L. que de acuerdo a la información recabada se cataloga como una de las diez especies útiles con mayor número de registro de uso por etnias amazónicas.

En los estudios realizados en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Psidium guajava* L. se han reportado resultados significativos de la actividad antioxidante. Pinho et al. (2017) describen que se encontró que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* L. (HEPG) contiene altas concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides. Los datos indicaron que HEPG exhibió actividades antioxidante y quelante de mercurio (II).

De la misma manera Wang et al. (2017) describen en su estudio acerca de los componentes y actividad antioxidante de las hojas de *Psidium guajava* L. que se logró determinar mediante tres métodos diferentes la actividad antioxidante de 15 lotes de hojas de la especie vegetal recolectados en diferentes puntos geográficos, cuyos resultados exhibieron que las muestras que presentaban contenidos altos de compuestos flavonoides, glucósidos y agliconas, poseían las capacidades antioxidantes más altas.

De acuerdo al estudio Pakistaní de Gull et al. (2012) en que se investigó la variación de los atributos antioxidantes en tres etapas de maduración de la fruta de guayaba en función de tres diferentes regiones geográficas se logró determinar que la actividad antioxidante en muestras de fruta de guayaba de zonas moderadamente calientes fue relativamente mayor que las frutas obtenidas en zonas de clima frío, lo que sugiere que los factores ambientales, geográficos, agronómicos o climáticos tienen una influencia significativa en el potencial antioxidante.

La etnobotánica respalda el uso tradicional de la planta de guayaba en el Ecuador, es por ello que se plantea el fundamentar científicamente este uso tradicional como se ha hecho en territorio asiático donde se localiza su mayor producción y también en Centroamérica que con investigaciones como la de Rojas-Garbanzo et al. (2017) afirman. “Varias investigaciones han demostrado que la guayaba es una potencial fuente de compuestos bioactivos como carotenoides y polifenoles” (p.3).

Los constituyentes químicos que se sospecha presentan actividad antioxidante son los compuestos fenólicos, metabolitos secundarios producidos por las plantas que pueden verse relacionados en su producción debido a condiciones climáticas, geográficas, características y composición del suelo. De acuerdo al trabajo de Wang, Wu, Huang, Shi, & Wu (2017) se afirma que “Bajo condiciones ambientales favorables la planta no requiere desarrollar mecanismos de adaptación al medio, pero si se encuentra bajo condiciones de estrés ambiental puede estimularse la producción de metabolitos secundarios” (p.4).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (2003) menciona en sus directrices para las Buenas Prácticas Agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales “Que la concentración de componentes con actividad biológica, así como la de los componentes vegetales autóctonos tóxicos o venenosos no deseados, varía según la etapa de crecimiento y desarrollo de la planta”(p.13). Además, las condiciones climatológicas y las condiciones óptimas de suelo garantizan el crecimiento y calidad de la planta medicinal e influyen en las cualidades físicas, químicas y biológicas de las plantas medicinales.

De acuerdo con los estudios que se presentan como respaldo bibliográfico las condiciones fenológicas influyen en el desarrollo de las especies vegetales distribuidas a nivel mundial. En el Ecuador los estudios farmacogeográficos constituyen un campo no explorado, por tanto, la finalidad de este trabajo es la de cimentar este tipo de estudios, rama de la farmacognosia, con la especie *Psidium guajava* L. que se halla ampliamente distribuida en el territorio nacional.

## **2.2.Fundamento teórico**

### **2.2.1. Farmacognosia**

Su origen como ciencia es desconocido e incierto cronológicamente, pero nace del empirismo y la intuición, en el límite entre la magia y la ciencia, con el objetivo de encontrar en las plantas la capacidad de mitigar el dolor, la enfermedad y la muerte. “Etimológicamente significa “conocimiento de los fármacos”. Proviene del griego *pharmakon* que significa remedio y *gnosis* que quiere decir conocimiento. Estudia los principios activos de origen natural que pueden poseer un potencial terapéutico o aplicación en la industria” (Cortez-Gallardo et al., 2004, p.124).

Son muchos los autores que han tratado de definir y redefinir a esta ciencia, es así que Tyler, Brady, & Robbers (2003) la definen como "Una ciencia aplicada que se ocupa de las características biológicas, bioquímicas y económicas de los medicamentos naturales y sus constituyentes"(p.2). A su vez, Brhun y Bohlin (1997) la definen como "Una ciencia molecular que explora las relaciones naturales de estructura-actividad con un potencial farmacológico” (p.246). Y definiciones más concisas como la de Cordell (2017) "La farmacognosia es el estudio de productos naturales biológicamente activos"(p.19).

Una de las definiciones más complejas es la de Cortez-Gallardo et al. (2004)

La farmacognosia abarca el estudio de la historia, el cultivo, la recolección, preparación, preservación, comercialización, distribución, identificación y evaluación de los componentes químicos de origen natural, la farmacología y el uso tradicional de esos compuestos o sus derivados para mejorar la salud y el bienestar del ser humano.(p.123)

En la actualidad, y de acuerdo a Elufioye y Badal (2017):

La farmacognosia abarca áreas como el aislamiento, análisis fitoquímico, relaciones de actividad de la estructura, fármacos naturales de uso terapéutico directo, la investigación de vías biosintéticas, el cultivo y la recolección de plantas medicinales, con lo que ha ampliado su alcance hacia otras ciencias mediante estudios que abarcan el área fitoquímica, química microbiana, biosíntesis, biotransformación, bioinformática y quimiotaxonomía; brindando resultados que se traducen en avances eficientes en fitoquímica y farmacológicos.(p.8)

### **2.2.2. Productos Naturales**

Se considera a un producto natural a toda sustancia o compuesto químico que es producido por un organismo vivo, producido por un proceso de metabolismo primario o secundario por tanto es un compuesto orgánico que se puede aislar de fuentes naturales.

De ello nace la importancia que tienen los productos naturales y como lo señalan Ravelo y Braun (2009):

La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como

agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial. (p.412)

### **2.2.3. Planta medicinal**

“Planta (silvestre o cultivada) utilizada con fines medicinales” (OMS, 2003, p.5).

Además de ser una fuente de alto valor nutricional. “El término de plantas medicinales incluye varios tipos de plantas que tienen actividad medicinal por lo que se consideran un valioso recurso que puede ser usado en el desarrollo y síntesis de medicamentos” (Rasool, 2012, p.1).

### **2.2.4. Farmacogeografía**

La gran mayoría de las drogas provienen de las regiones tropicales o subtropicales, aunque se hallen distribuidas alrededor de todo el planeta. El hábitat o fuente geográfica en que crece una especie vegetal es uno de los factores determinantes de la actividad de un compuesto biológicamente activo, ya que en su composición influyen la altitud, latitud, clima, humedad, suelo, etc.

La farmacogeografía es por tanto una de las ramas de la farmacognosia que indaga la influencia de la distribución geográfica de las plantas productoras de drogas con actividad biológica o con potencial actividad biológica.

### **2.2.5. Buenas Prácticas de Recolección Agrícola**

La OMS (2003) en sus Directrices sobre Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de plantas medicinales tiene como finalidad garantizar la supervivencia a largo plazo de las poblaciones silvestres y de sus hábitats correspondientes. Los planes de gestión de la recolección deben contemplar un sistema para establecer niveles de explotación sostenibles y describir las prácticas de recolección idóneas en función de las especies de plantas medicinales y de las partes de la planta utilizadas (raíces, hojas, frutos, etc.).

Adicionalmente, menciona que en el control de la calidad en el cultivo y la recolección de las plantas medicinales utilizadas como materias primas para medicamentos herbarios puede ser más complejo que el relativo a la producción de alimentos por lo cual plantea y describe estrategias generales y los métodos básicos de recolección, a pequeña y gran escala, de materias vegetales medicinales frescas.

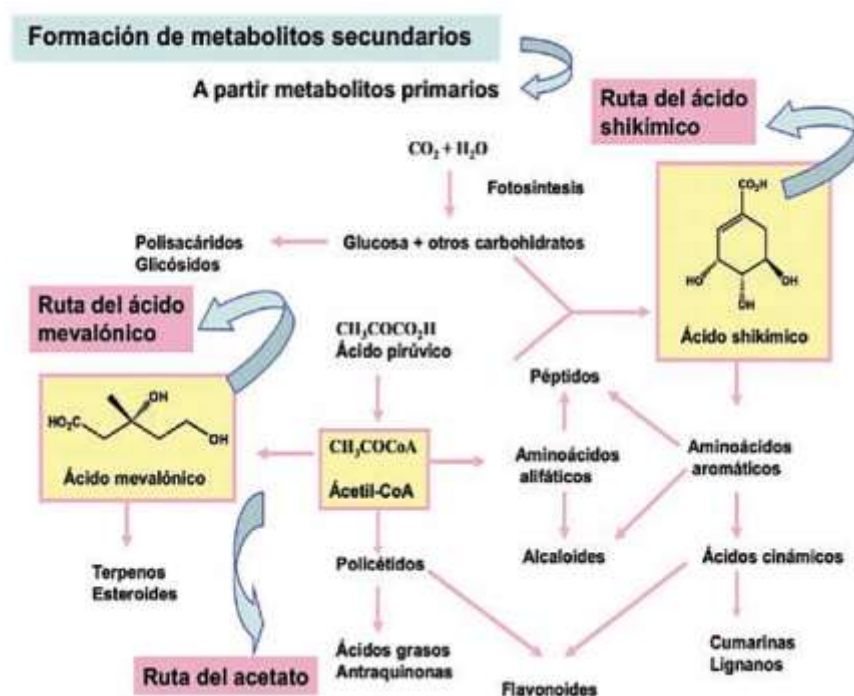
### **2.2.6. Metabolitos primarios y secundarios.**

De acuerdo con la quimiotaxonomía, los metabolitos primarios son aquellos que participan en los procesos fisiológicos vegetales, son absolutamente necesarios para la vida y están presentes en todo el reino vegetal.

Por su parte, los metabolitos secundarios son compuestos no absolutamente necesarios para los procesos vegetales, pero pueden tener funciones importantes en las

interacciones de las plantas con otros organismos, como interacciones alelopáticas; en la defensa química contra herbívoros y patógenos vegetales, y en las señales para atraer animales polinizadores. Además del hecho conocido de que muchos metabolitos secundarios tienen actividad farmacológica debido a su variada clasificación química como lo son los aminoácidos no proteicos, flavonoides, xantonas, cumarinas, poliacetilenos, policétidos cíclicos, monoterpénos, sesquiterpénos, iridoides, triterpénos, esteroides, terpenos que contienen nitrógeno y alcaloides. Estas clases químicas no se encuentran en todo el reino vegetal, sino que tienden a ser específicas para determinadas clases, órdenes y familias botánicas. (The United States Pharmacopeial Convention, 2016).

De acuerdo a Ravelo y Braun (2009) “Los metabolitos secundarios pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular” (p.409).



**Figura 1.** Formación de metabolitos secundarios

**Fuente:** (Ravelo & Braun, 2009)

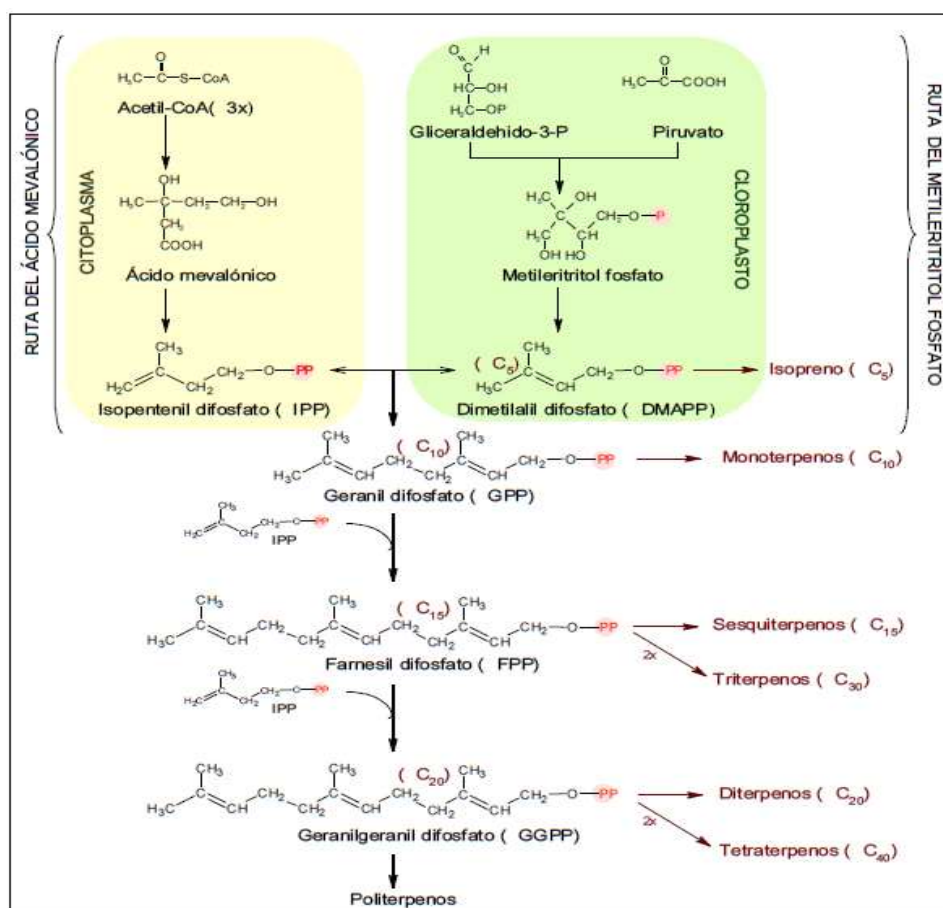
### 2.2.6.1. Terpenos

Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno que contienen: monoterpénos (10 C); sesquiterpénos (15 C); diterpénos (20 C); triterpénos (30 C); tetraterpénos (40 C) y politerpénos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno.



El grupo de los terpenos incluye hormonas, pigmentos carotenoides, esteroides, derivados de los esteroides, látex y aceites esenciales.

Muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial. “Por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalarías, antimicrobianas, etc” (Ávalos-García & Pérez-Urria, 2009, p.125)



**Figura 2.** Síntesis de terpenos y su clasificación de acuerdo a las unidades isoprenoides que contienen.

**Fuente:** (Ávalos-García & Pérez-Urria, 2009)

#### 2.2.6.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos juegan una serie de funciones metabólicas en las plantas, en el crecimiento y reproducción, y en la protección contra patógenos externos y el estrés, como la radiación UV y los depredadores. Son responsables del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos, por ejemplo, la astringencia de frutas y hortalizas. (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014, p.68)

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol (reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o

fenilpropanoides). “Son un grupo diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides, muchos de ellos están implicados en las interacciones planta-herbívoro” (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009, p.130).

### ***Taninos***

“Son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero” (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009, p.136). Por su capacidad de unirse a proteínas por lo general son toxinas.

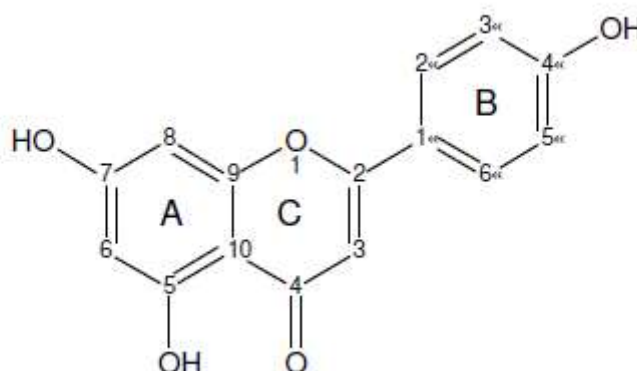
“Estos compuestos complejos son parte de la protección de las plantas contra las infecciones y los herbívoros. Los taninos se clasifican en tres grupos según su estructura química: condensada, hidrolizables y complejos” (Peñarrieta et al., 2014, p.77).

### ***Flavonoides***

Son un tipo particular de polifenoles presentes en plantas, son los responsables del color de flores y frutas.

El término flavonoide viene del latín "*flavus*", que significa amarillo, ya que muchos flavonoides purificados son de color amarillo. La estructura química típica de flavonoides consta de tres anillos: benzopirano 2-fenil, un anillo dihidroxilados fenólicos en las posiciones 5 y 7, (A), un segundo anillo fenólico generalmente mono-hidroxilado, orto-dihidroxilados o vic- trihidroxilados (B), que también pueden contener grupos metoxi (O-CH<sub>3</sub>) como sustituyentes y el anillo (C), que puede ser un anillo heterocíclicos con oxígeno pirano, pirylium o de forma pirona. (Peñarrieta et al., 2014, p.71)

Su clasificación se da en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales: antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009). Las funciones en que se destacan son la defensa y la pigmentación.



**Figura 3.** Estructura básica de un flavonoide.

**Fuente:** (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014)

### **2.2.7. Extractos botánicos.**

Son preparados que permiten extraer diferentes sustancias químicas que provienen del metabolismo de las plantas y que pueden tener diferentes efectos que pueden ser aprovechados en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Se obtienen directamente de los frutos, hojas, semillas o raíces de la planta de interés.

De acuerdo a la USP- NF (2016) para la preparación de extractos los componentes de interés se separan total o parcialmente de los otros componentes con ayuda de agua, alcohol, mezclas de alcohol y agua u otros disolventes adecuados.

#### **2.2.7.1. Tipos de extractos.**

##### ***Extractos líquidos***

Son preparaciones de materia de origen vegetal que contienen alcohol como disolvente o conservante, o ambos, y están hechos de forma que cada mL contiene los componentes extraídos de 1 g del material crudo que representa. Se producen por percolación, a menudo después de un período de maceración.

##### ***Extractos en polvo***

Son preparaciones sólidas que tienen una consistencia polvorienta. Se obtienen por evaporación del disolvente de extracción. Pueden contener sustancias adecuadas agregadas, como excipientes, estabilizantes y conservantes.

##### ***Extractos semisólidos***

También conocidos como extractos blandos o extractos pilulares, son preparaciones que tienen una consistencia entre la de los extractos líquidos y en polvo. Se obtienen por evaporación parcial del disolvente de extracción.

### **2.2.8. Método de extracción**

Los métodos de extracción son técnicas que permiten la obtención de diversas sustancias químicas provenientes del metabolismo de las plantas y que pueden tener una posible

actividad terapéutica. Estos métodos requieren de un líquido extractivo, dependen de la técnica del método y de la naturaleza química del principio activo.

#### ***Maceración***

El material crudo a extraer se reduce a un tamaño adecuado, se mezcla con el disolvente de extracción y se deja en reposo a temperatura ambiente en un recipiente cerrado durante un tiempo adecuado, agitando frecuentemente hasta que la materia soluble se disuelva. La mezcla se filtra, la materia insoluble se lava con el mismo disolvente de maceración. Los filtrados se combinan y concentran, por lo general a presión reducida, hasta lograr la consistencia deseada. (USP- NF, 2016, p.432)

### **2.2.9. Control de calidad**

La finalidad de las siguientes pautas es definir criterios básicos para la evaluación de la calidad, inocuidad y eficacia de las materias primas de origen vegetal.

#### **2.2.9.1. Limpieza y desinfección**

Para el uso adecuado de muestras vegetales las directrices BPAR de la OMS son claras en sus parámetros, por tanto, es necesario verificar que las muestras estén completamente libres de señales visibles de contaminación (material sólido adherido, hongos, insectos y excrementos). Además de asegurar la ausencia de aromas anormales, decoloración de las muestras o señales de deterioro.

#### **2.2.9.2. Identificación macroscópica.**

De acuerdo a lo referido en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, las pruebas sensoriales macroscópicas de los materiales provenientes de las plantas medicinales son las de mayor importancia debido a que gran parte de la información sobre la identidad, pureza y con frecuencia la calidad del material puede obtenerse de dichas observaciones.

La identidad, pureza y calidad de un material vegetal debe establecerse mediante un examen visual, macroscópico detallado. Siempre que sea posible, el material vegetal debe compararse con la materia prima auténtica de una muestra Farmacopeica perfectamente identificada. Las muestras que no sean similares en color, consistencia, olor y sabor deben desecharse ya que no cumplen con los requisitos mínimos especificados en las monografías. La identificación macroscópica de drogas, cuando está completa, se basa en la forma, tamaño, color, olor y sabor. (ANVISA, 2010, p.192)

#### ***Tamaño***

“Las medidas de longitud, ancho y grosor deben coincidir con las citadas en las monografías. Una regla graduada en milímetros es adecuada para medir estos parámetros” (ANVISA, 2010, p.193).

#### ***Color***

“Se debe examinar la materia prima antes de cualquier tratamiento, a la luz del día o bajo lámparas de longitud de onda similares a la luz del día. El color de la muestra debe compararse con el material de referencia” (ANVISA, 2010, p.193).

#### ***Olor***

Se debe asegurar que no haya riesgo alguno antes de revisar el olor del material vegetal.

El proceso consiste en colocar una pequeña muestra en la palma o en un recipiente de vidrio e inhalar lenta y repetidamente. Si el olor es indistinto, se debe presionar parte del material entre los dedos e inhalar nuevamente. Se debe determinar la intensidad del olor: ninguno; débil distinta o fuerte, y luego la sensación causada

por el olor: aromático; fructífero mohoso o rancio. Cuando sea posible, es importante comparar el olor con una sustancia definida. (ANVISA, 2010, p. 193)

### ***Sabor***

“Solo se debe realizar cuando sea necesario o se especifique en la monografía” (ANVISA, 2010, p.193).

### ***Área foliar***

Comprende la extensión o superficie de hoja que posee una planta y se expresa en unidades de medida superficial (cm<sup>2</sup>).

Este parámetro se puede medir con el empleo de modelos matemáticos destructivos y no destructivos. Los destructivos: la defoliación de la copa y medida de la superficie con un planímetro o la defoliación de la copa para hallar las relaciones entre el peso fresco de las hojas y su área. Los indirectos emplean medidas de iluminación para estimar el área foliar mediante modelos matemáticos basados en la interceptación de la radiación por parte de la vegetación. Las estimaciones de superficie foliar se realizan, en su mayoría, mediante métodos destructivos (Calderón, Soto, Calderón, & Fundora, 2009).

Por otra parte, las mediciones electrónicas, más precisas y modernas pueden requerir de aplicaciones electrónicas especializadas, la finalidad es conocer en cuanto a fisiología vegetal la eficiencia fotosintética y la estimación de crecimiento celular con referencia a otras plantas y su influencia a en el crecimiento y proliferación de tejidos y compuestos de metabolitos secundarios de importancia.

### ***Porcentaje de defoliación***

Este parámetro identifica las zonas damnificadas de la hoja causados por insectos herbívoros y luego estima el porcentaje de defoliación en relación con la superficie total. El procedimiento se puede llevar a cabo con aplicaciones electrónicas especializadas que proporciona una cuantificación precisa y automática de la pérdida foliar por medio de una reconstrucción interactiva de las extremidades de las hojas usando curvas y zoom (BioLeaf-Foliar Analysis, 2018).

## **2.2.9.3. Desecación, fragmentación y almacenamiento**

### ***Secado***

Es la etapa más importante del procesamiento post-cosecha, pues facilita la conservación de una muestra vegetal por lapsos prolongados. Ya que permite interrumpir los procesos de degradación provocados por enzimas o fermentos, impide el desarrollo de microorganismos y las reacciones de oxidación e hidrólisis. El proceso debe ser desarrollado para cada planta y de acuerdo a las sustancias de interés que se busca aislar (Sharapin, 2000).

Existen varios métodos de secado de plantas medicinales: al aire libre (protegidas de la exposición directa al sol), colocadas en capas delgadas sobre bastidores de

secado, salas o edificios protegidos con malla metálica, por exposición directa al sol, en hornos o salas de secado y secadores solares y mediante fuego indirecto, horneado, liofilización, microondas o dispositivos de infrarrojos. Cuando sea posible, deben controlarse la temperatura y la humedad para evitar dañar los componentes químicos activos. El método y la temperatura utilizados para el secado pueden influir considerablemente en la calidad de las materias vegetales medicinales obtenidas. (OMS, 2003, p.24)

#### **2.2.9.4. Determinación de cenizas totales.**

El método está diseñado para medir la cantidad total de material restante después de la ignición. “Incluye la "ceniza fisiológica", que se deriva del tejido propio de la planta y la ceniza "no fisiológica", que es el residuo de la materia extraña (arena y tierra) que se adhiere a la superficie de la planta” (OMS, 1998, p.34).

Este parámetro se cuantifica de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ *Cenizas totales* } = \left[ \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

**Donde:**

***m***: Masa del crisol vacío

***m*<sub>1</sub>**: Masa del crisol con la muestra vegetal

***m*<sub>2</sub>**: Masa del crisol más las cenizas

#### **2.2.9.5. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

“Son el residuo obtenido después de hervir las cenizas totales con ácido clorhídrico diluido y de llevar a ignición la materia insoluble restante. Este parámetro mide la cantidad de sílice presente, en especial arena y tierra silíceas” (OMS, 1998, p.34).

Este parámetro se cuantifica de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ *Cenizas insolubles en ácido* } = \left[ \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

**Donde:**

***m***: Masa del crisol vacío

***m*<sub>1</sub>**: Masa del crisol con la muestra vegetal

***m*<sub>2</sub>**: Masa del crisol más las cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

#### **2.2.9.6. Determinación de humedad**

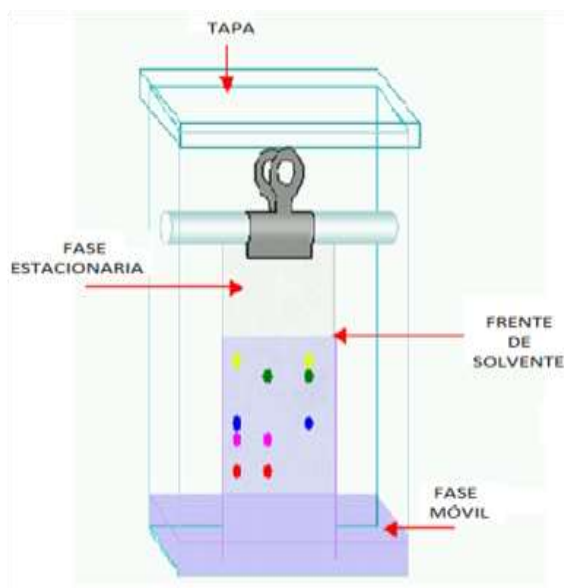
La humedad es todo lo que se evapora con el calentamiento, además del agua, la proporción de humedad incluye grasas, alcohol y disolventes. “La prueba de pérdida por secado determina tanto el agua como la materia volátil. El secado puede llevarse a cabo calentando a 100-105 °C” (OMS, 1998, p.36).

Uno de los procedimientos para determinación de humedad funciona según el principio termogravimétrico, también conocido como principio de “pérdida por secado” (Loss on drying, LOD). Este método determina la proporción de humedad de una muestra mediante el análisis de la pérdida de peso de una muestra al calentarla. La pérdida de peso se interpreta como la pérdida de humedad de la muestra que entonces se calcula comparando el peso inicial de la muestra con el peso de la muestra final (Mettler Toledo, s.f.).

#### 2.2.10. Cromatografía en capa fina

La cromatografía es una técnica mediante la cual los componentes de una mezcla se separan según las distintas velocidades con las que se desplazan a través de una fase estacionaria cuando son transportados por una fase móvil líquida o gaseosa (Skoog, West, & Holler, 2001).

Esencialmente consiste en el empleo de capas finas y uniformes de adsorbentes normalizados sobre soportes rígidos (placas de vidrio, porta-objetos de microscopía, poliéster, etc.), en las que se depositan mezclas o sustancias puras, para que mediante desarrollo con una fase móvil (disolventes) en una cubeta, puedan separarse e incluso identificarse por medida de la capacidad de adsorción. (Areal & Bessa, 1966, p.7)



**Figura 4.** Cámara cromatográfica.

#### **Revelado**

Para revelar la presencia de las sustancias eluidas se reconocen las manchas características (generalmente no coloreadas) sobre la capa que y se revelan con una lámpara fluorescente, o se marcan los contornos de la mancha con un lápiz. Pueden usarse reveladores corrosivos, reveladores de ácido sulfúrico (reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras) o yodo (forma complejos coloreados con los componentes orgánicos) (Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, 2007).

### Factor de retención

“Cociente de dividir el recorrido de la sustancia por el disolvente, esto es, la distancia media desde el origen hasta el centro de la mancha dividida por la distancia que media desde el origen hasta el frente del disolvente” (UNAM, 2007, p. 4).

$$Rf = \frac{x}{s} \quad \text{Ecuación 3}$$

**Donde:**

**x:** recorrido de la sustancia

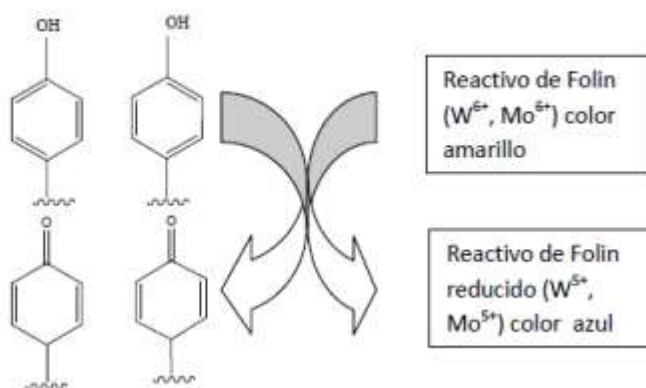
**s:** recorrido del solvente

#### 2.2.11. Tamizaje fitoquímico

También llamado *screening* fitoquímico es un método simple, rápido, que emplea un mínimo de equipamiento y que se puede emplear como técnica preliminar para detectar la presencia de los principales metabolitos secundarios de los extractos y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Su mayor limitante es que ni define la presencia o ausencia de miembros específicos del grupo químico que se evalúa (Cuesta, Márquez, & Campo, 2015).

##### 2.2.11.1. Cuantificación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales en productos vegetales se realiza por espectrofotometría, basándose en la reacción colorimétrica de óxido-reducción. Esta reacción se basa en que “Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm” (García, Fernández, & Fuentes, 2015, p.2). El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico (color amarillo) pero al ser reducido por los grupos fenólicos de la muestra da lugar a un complejo azul intenso, cuya intensidad se mide para evaluar el contenido en polifenoles (García et al., 2015).



**Figura 5.** Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

**Fuente:** (García, Fernández, & Fuentes, 2015)



### **2.2.11.2. Cuantificación de flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales se realiza mediante el método colorimétrico del aluminio, en el que se usa un estándar de quercetina de concentración conocida. Soares, Bassani, Gonzáles, & Petrovick (2003) afirman:

La reacción consiste en la hidrólisis ácida de los glucósidos y la determinación espectrofotométrica del complejo formado con  $AlCl_3$ . Aunque el método se usa para muchos medicamentos derivados de plantas, factores como el tiempo de reacción, el tipo y la concentración de flavonoides pueden influir en los resultados. (p.203)

### **2.2.12. Producto Natural Procesado de Uso Medicinal (PNPUM)**

“Producto medicinal terminado y etiquetado cuyos, ingredientes activos están formados por cualquier parte de los recursos naturales de uso medicinal o sus combinaciones, como droga cruda, extracto estandarizado o en una forma farmacéutica reconocida, que se utiliza con fines terapéuticos” (Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria, ARCSA, 2016, p.2).

#### **2.2.12.1. Clasificación de los Productos Naturales Procesados de Uso Medicinal**

***Productos Naturales Procesados de Uso Medicinal Demostrado Clínicamente:*** son aquellos que han demostrado su seguridad y eficacia en seres humanos mediante estudios preclínicos y ensayos clínicos (ARCSA, 2016).

***Productos Naturales Procesados de Uso Medicinal Demostrado Preclínicamente:*** son aquellos de los que no se han realizado ensayos clínicos y para demostrar su seguridad y eficacia se han presentado estudios preclínicos o etnofarmacológicos, o etnobotánicos (ARCSA, 2016).

#### **2.2.12.1.1. Formas farmacéuticas**

“En la formulación de productos fitoterapéuticos deben ser consideradas no solamente la solubilidad y la estabilidad de los principios activos, sino también las características de los componentes secundarios del extracto” (Sharapin, 2000, p. 113). Prácticamente todas las formas farmacéuticas se pueden preparar a partir de extractos.

Las formas farmacéuticas se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Formulaciones líquidas: gotas, jarabes, soluciones o suspensiones.
- Formulaciones sólidas: comprimidos, comprimidos recubiertos, capsulas de gelatina y gránulos
- Preparaciones semisólidas: cremas, lociones, pomadas y supositorios (Sharapin, 2000).

## **2.2.12.2. Control de calidad de formas farmacéuticas sólidas**

### **2.2.12.2.1. Uniformidad de unidades de dosificación**

“El término "uniformidad de unidades de dosificación" se define como el grado de uniformidad en el contenido del fármaco entre las unidades de dosificación” (USP-NF, 2016, p.82). Se basa en la valoración del contenido individual de fármacos en un número de unidades de dosificación para determinar si los contenidos individuales son lo suficientemente cercanos a la cantidad declarada. Esta prueba se puede demostrar mediante la prueba de Uniformidad de Contenido y la prueba de Variación de peso (USP-NF, 2016).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{Ecuación 4}$$

### **2.2.12.2.2. Friabilidad**

“Determina la capacidad de las tabletas para soportar las tensiones mecánicas y su resistencia a la formación de astillas y a la abrasión en la superficie” (USP-NF, 2016, p.83). La prueba se realiza una vez, si al finalizar se encuentran tabletas agrietadas, segmentadas o rotas, la muestra no ha pasado la prueba. Se considera aceptable una pérdida media máxima de peso de no más de 1,0% (USP- NF, 2016).

$$\%f = \frac{W_0 - W_f}{W_0} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

### **2.2.12.2.3. Fuerza de ruptura**

La fuerza de ruptura, también llamada “dureza” de las tabletas mide la integridad mecánica de las tabletas, que es la fuerza requerida para provocar su fractura en un plano específico (USP-NF, 2016).

### **2.2.12.2.4. Desintegración**

“Esta prueba sirve para determinar si las tabletas o cápsulas se desintegran dentro del tiempo establecido cuando se colocan en un medio líquido en determinadas condiciones experimentales” (USP-NF, 2016, p.574). Se define como desintegración completa al estado en el cual los residuos de la unidad constituyen una masa blanda sin un núcleo firme al tacto que permanezcan en el tamiz del aparato de prueba o adheridos a la superficie inferior del disco. Cabe considerar que la desintegración no implica la disolución completa de la unidad ni de su ingrediente activo (USP- NF, 2016).

## **2.2.13. Actividad antioxidante.**

“Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas caracterizadas por tener uno o más electrones desapareados en su orbital externo, condición que los torna altamente reactivos” (Guija-Poma, Inocente-Camones, Ponce-Pardo, & Zarzosa-Norabuena, 2015, p. 58).

A bajas concentraciones las especies reactivas del oxígeno como del nitrógeno (ROS y RNS) son necesarios para el funcionamiento celular al actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular o actuando como mediador para la activación celular, en cambio su excesiva acumulación da como resultado reacciones adversas sobre el metabolismo primario que pueden causar daño oxidativo de macromoléculas biológicas (Leos-Rivas et al., 2015).

Se conoce de acuerdo a varios estudios que la formación excesiva de las especies reactivas del oxígeno como del nitrógeno (ROS y RNS) ya sea por radiación UV, hábitos fumadores, por el metabolismo de las drogas o generados de la auto- oxidación lipídica; son potenciales causas para desencadenar daños severos para los componentes celulares, sea por procesos de oxidación o nitración; especialmente las ROS pueden causar inflamación o lesiones en varios órganos los cuales están asociados a varias enfermedades degenerativas incluyendo cáncer envejecimiento, arteriosclerosis y reumatismos.

Cada vez son más abundantes los estudios que afirman que varias especies de origen vegetal son capaces de producir gran cantidad de fracciones químicas que actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo; mientras que las funciones que cumplen y que se demuestran a simple vista son prevenir la rancidez, pérdida de color y deterioro de aromas.

“Los antioxidantes son compuestos que pueden prevenir inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas, inhabilitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres” (Leos-Rivas et al., 2015, p. 43). Se pueden distinguir dos categorías: sintéticos que son compuestos de estructura fenólica con sustitución alquílica y naturales que pueden ser compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides.

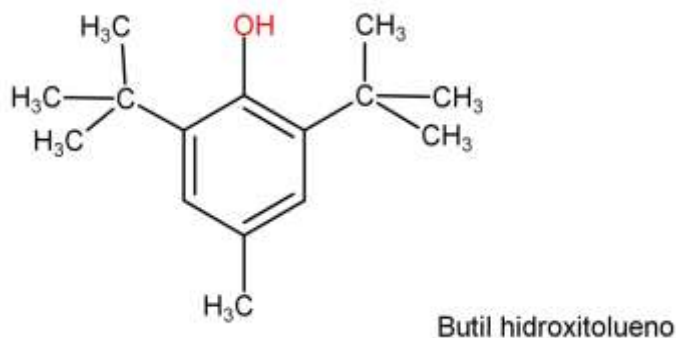
#### **Mecanismo de acción de los antioxidantes:**

- Previniendo la formación de ROS
- Interceptando el ataque de ROS
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas al ataque de ROS. (Leos-Rivas et al., 2015, p.44)

#### **2.2.14. Butil hidroxitolueno, 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT)**

Uno de los antioxidantes sintéticos más utilizados desde principios del siglo pasado ha sido el BHT, se usa como antioxidante en cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos. Principalmente es usado para retrasar o prevenir la ranciedad oxidativa de

grasas y aceites y para prevenir la pérdida de actividad de las vitaminas liposolubles. Aunque ha habido algunos informes aislados de reacciones adversas en la piel, el BHT generalmente se considera no irritante y no sensibilizante a los niveles empleados como antioxidante. “Se ha informado que la ingestión de 4 g de BHT, aunque causa náuseas y vómitos intensos, no es fatal” (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009, p. 76).



**Figura 6.** Fórmula estructural del butil hidroxitolueno (BHT).

**Fuente:** (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009)

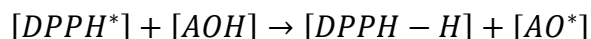
#### 2.2.15. Método del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Este método ya descrito desde la década de 1950 se fundamenta en la captación de radicales libres, un método relativamente sencillo y económico, comparado con otros métodos.

El 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.

Guija-Poma et al. (2015) afirman: “Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo” (p.58). Para esta reacción se observan dos fases, una inicial muy rápida y una final relativamente lenta que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos de ésta. Además, el método es colorimétrico en el que se observa un cambio de color del reactivo de violeta a amarillo

La reacción antes descrita entre el DPPH y un antioxidante, podemos representarla de la siguiente manera:



Es así que la actividad antioxidante se puede expresar como el porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, cálculo que se representa de la siguiente manera:

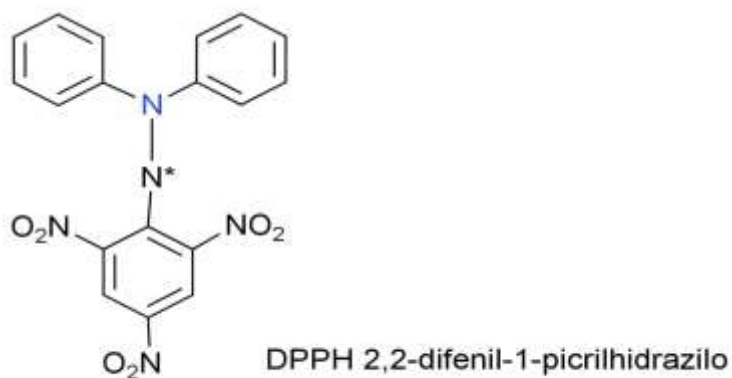
$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH} = \left(1 - \frac{A_M - A_B}{A_{PR}}\right) * 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

**Donde:**

$A_M$  = absorbancia de la muestra (EHA + DPPH + metanol)

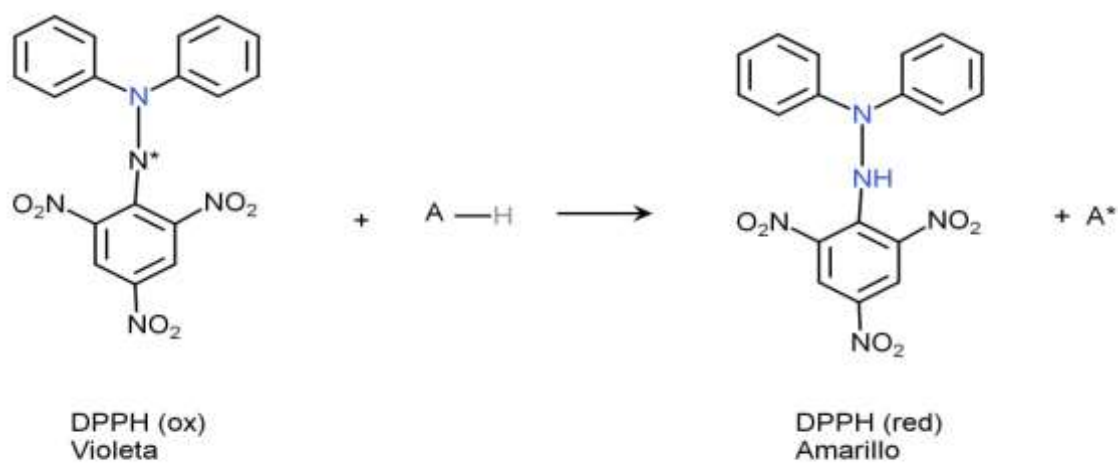
$A_B$  = absorbancia del blanco de la muestra (EHA + metanol)

$A_{PR}$  = absorbancia del patrón de referencia (DPPH + metanol)



**Figura 7.** Estructura química DPPH.

**Fuente:** (National Center for Biotechnology Information, s.f.)



**Figura 8.** Reacción entre el DPPH y un antioxidante.

**Fuente:** (National Center for Biotechnology Information, s.f.)

## 2.2.16. Descripción botánica de *Psidium guajava* L. (Guayaba).

### 2.2.16.1. Generalidades de la familia Myrtaceae.

“Familia representada por alrededor de 30 géneros y 1500 especies en el Neotrópico. Las especies nativas son útiles, principalmente por sus frutos comestibles y su madera. En el Ecuador se encuentran 15 géneros nativos y alrededor de 200 especies”

(Kawasaki, Holst, & Bazante, 2011, p. 432). Muchas de estas especies no son bien conocidas taxonómicamente o son probablemente nuevas para la ciencia.

#### 2.2.16.2. Jerarquía taxonómica

**Tabla 1.** Taxonomía de *Psidium guajava* L. (guayaba).

Taxonomía	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Myrtales
<b>Familia</b>	Myrtaceae
<b>Género</b>	<i>Psidium</i>
<b>Especie</b>	<i>Psidium guajava</i> L.
<b>Nombre común</b>	Guayaba

**Fuente:** (CONABIO)

#### 2.2.16.3. Nombre científico

*Psidium guajava* L.

#### 2.2.16.4. Nombre común

**A nivel mundial:** “Guava (Egypt, USA, América Latina, Asia, África), guyaba (Cuba), guayaba (Guatemala, Nicaragua, Paraguay), amrood (India)” (Metwally et al., 2011, p.89).

**De acuerdo a etnias ecuatorianas:** “Sampul (awapit), dungui tape (chafi’ki), donkila (tsafi’ki), sawintu (kichwa), sacha guayaba, Zulema panka (castellano- kichwa), samindo’cho (a’ingae), quëma (pai coca), paiganka, paigonkamo (wao tededo), sampi, wampa, wayap (shuar chicham), rache (lengua no especificada)” (de la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008, p. 469).

#### 2.2.16.5. Distribución geográfica

La guayaba es una especie nativa de los trópicos americanos pero debido a las colonizaciones tanto españolas como portuguesas la especie fue diseminada rápidamente hacia todo el mundo. A partir de este momento la especie fue naturalizada en diferentes países, por lo que hoy en día la guayaba crece en las zonas de los subtrópicos, desde México en Centroamérica hasta Brasil y Perú en Sudamérica. La zona ecológica se halla definida en la franja paralela al ecuador, con límites que no van más allá de los 30° a cada hemisferio (Metwally et al., 2011).

#### 2.2.16.6. Descripción botánica

Es un árbol o arbusto perennifolio o caducifolio, de hasta 20 m de altura, su tronco por lo general es torcido y muy ramificado. La corteza externa es escamosa, delgada, irregular y con escamas grisáceas. La corteza interna es fibrosa, ligeramente amarga, de

color crema o pardo rosado. La copa de este árbol es irregular, sus hojas son decusadas simples, oblanceoladas, oblongas, margen entero; verde brillantes a verde parduscas y fragantes cuando se estrujan. (CONABIO)

Sus inflorescencias son de tipo cimosa, solitaria y axilar, se caracterizan por ser perfumadas, son actinomorfas, completas, hermafroditas, pentámeras; con 4 o 5 pétalos blancos. Los frutos que posee son bayas de hasta 10 cm de diámetro, con el cáliz persistente en el ápice, carnosas, con pulpa de color crema amarillento a rosado, de olor fragante y sabor agrídulce que contiene numerosas semillas redondas de 3 a 5 mm incrustadas en la pulpa (Metwally et al, 2011).

#### **2.2.16.7. Identificación microscópica**

**Constituyentes químicos:** de acuerdo a la monografía aceptada por el ARCSA para la especie *Psidium guajava* L. y que corresponde a Metwally et al. (2011) mencionan que entre los flavonoides que presenta esta especie está la quercetina y sus glicósidos, taninos como amritosido, guavin A, B, C y D, agentes antidiabéticos como isostrictinin, estrictinin y pedunculagina, agentes antimutagénicos como (+) galocatequina y finalmente isoprenoides como monoterpenos y terpenoides.

**Rasgos característicos:** la hoja seca en polvo es de color verde claro con sabor aromático y un olor característico. Microscópicamente presenta los siguientes elementos: tricomas unicelulares lanudos, grandes y fuertemente engrosados con cutícula lisa, fragmentos de tricomas no patulares rotos, fragmentos de la epidermis superior e inferior (Metwally et al., 2011).

#### **2.2.16.8. Aspectos del cultivo**

La fertilización incrementa la calidad de los frutos durante su desarrollo. La poda se utiliza para adelantar o retrasar la floración, para mejorar el tamaño y la calidad de fruto. La distancia óptima de plantación es de 10 m, pero se pueden plantar a 5 m para establecer una barrera o cerco vivo (CONABIO).

#### **2.2.16.9. Usos.**

**Usos farmacológicos:** posee actividades farmacológicas como actividad antitusígena, antiespasmódica, antibacteriana, antifúngica, antidiarreica, hipoglucemiante, antioxidante y cardioprotector (Metwally et al., 2011).

**Comestible:** el fruto contiene más del doble de Vitamina C que la naranja y puede contener según la variedad entre 486 mg y 871 mg de Vitamina C por 100 g de fruto fresco (CONABIO).

#### **2.2.16.10. Actividad farmacológica de las hojas de *Psidium guajava* L.**

Las hojas de la especie *Psidium guajava* L., tiene las siguientes propiedades y actividades: antitusígeno, espasmolítico, antibacterial, antifúngico, antidiarreico, anticéstdo; antidiabético, hipoglicemiante, antioxidante, cardioprotector, antimutagénico (Ortíz et al., 2016). Actividad inhibitoria relativa de la transcriptasa

inversa retroviral, actividad depresora en el sistema nervioso central, actividad antinociceptiva, analgésica, antiinflamatoria, actividad antiulcerosa, actividad hepatoprotectora. “El extracto de hoja inhibe la actividad alfa-amilasa y puede ser utilizado como bebida saludable” (Metwally et al., 2011, p.100).



**Figura 9.** *Psidium guajava* L.

**Fuente:** (Metwally, Omar, Ghazy, Harraz, & Sohafy, 2011)

### **2.3. Fundamento legal.**

El presente estudio tiene su base legal representada por la Constitución de la República del Ecuador, expedida por la Asamblea Constituyente de Montecristi en el año 2008 y publicada en el Registro Oficial No. 449 el 20 de octubre de 2008.

#### **Sección segunda**

##### **Ambiente sano**

**Art. 14.** Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados

#### **Sección cuarta**

##### **Cultura y ciencia**

**Art. 22.** Las personas tienen derecho a desarrollar su capacidad creativa, al ejercicio digno y sostenido de las actividades culturales y artísticas, y a beneficiarse de la protección de los derechos morales y patrimoniales que les correspondan por las producciones científicas, literarias o artísticas de su autoría.



**Art. 25.** Las personas tienen derecho a gozar de los beneficios y aplicaciones del progreso científico y de los saberes ancestrales.

## **Capítulo cuarto**

### **Derechos de las comunidades, pueblos y nacionalidades**

**Art. 57.** Se reconoce y garantizará a las comunas, comunidades, pueblos y nacionalidades indígenas, de conformidad con la Constitución y con los pactos, convenios, declaraciones y demás instrumentos internacionales de derechos humanos, los siguientes derechos colectivos:

Mantener, proteger y desarrollar los conocimientos colectivos; sus ciencias, tecnologías y saberes ancestrales; los recursos genéticos que contienen la diversidad biológica y la agrobiodiversidad; sus medicinas y prácticas de medicina tradicional, con inclusión del derecho a recuperar, promover y proteger los lugares rituales y sagrados, así como plantas, animales, minerales y ecosistemas dentro de sus territorios; y el conocimiento de los recursos y propiedades de la fauna y la flora.

Se prohíbe toda forma de apropiación sobre sus conocimientos, innovaciones y prácticas.

## **Sección segunda**

### **Salud**

**Art. 363.** El Estado será responsable de:

Garantizar la disponibilidad y acceso a medicamentos de calidad, seguros y eficaces, regular su comercialización y promover la producción nacional y la utilización de medicamentos genéricos que respondan a las necesidades epidemiológicas de la población. En el acceso a medicamentos, los intereses de la salud pública prevalecerán sobre los económicos y comerciales.

## **Sección octava**

### **Ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales**

**Art. 385.** El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales, en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía, tendrá como finalidad:

- Generar, adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.
- Recuperar, fortalecer y potenciar los saberes ancestrales.
- Desarrollar tecnologías e innovaciones que impulsen la producción nacional, eleven la eficiencia y productividad, mejoren la calidad de vida y contribuyan a la realización del buen vivir.

**Art. 386.** El sistema comprenderá programas, políticas, recursos, acciones, e incorporará a instituciones del Estado, universidades y escuelas politécnicas, institutos de investigación públicos y particulares, empresas públicas y privadas, organismos no gubernamentales y personas naturales o jurídicas, en tanto realizan actividades de investigación, desarrollo tecnológico, innovación y aquellas ligadas a los saberes ancestrales.

El Estado, a través del organismo competente, coordinará el sistema, establecerá los objetivos y políticas, de conformidad con el Plan Nacional de Desarrollo, con la participación de los actores que lo conforman.

**Art. 387.** Será responsabilidad del Estado:

- Facilitar e impulsar la incorporación a la sociedad del conocimiento para alcanzar los objetivos del régimen de desarrollo.
- Promover la generación y producción de conocimiento, fomentar la investigación científica y tecnológica, y potenciar los saberes ancestrales, para así contribuir a la realización del buen vivir, al sumak kawsay.
- Asegurar la difusión y el acceso a los conocimientos científicos y tecnológicos, el usufructo de sus descubrimientos y hallazgos en el marco de lo establecido en la Constitución y la Ley.
- Garantizar la libertad de creación e investigación en el marco del respeto a la ética, la naturaleza, el ambiente, y el rescate de los conocimientos ancestrales.
- Reconocer la condición de investigador de acuerdo con la Ley.

**Art. 388.** El Estado destinará los recursos necesarios para la investigación científica, el desarrollo tecnológico, la innovación, la formación científica, la recuperación y desarrollo de saberes ancestrales y la difusión del conocimiento. Un porcentaje de estos recursos se destinará a financiar proyectos mediante fondos concursables. Las organizaciones que reciban fondos públicos estarán sujetas a la rendición de cuentas y al control estatal respectivo.

## **Ley Orgánica de salud**

### **Capítulo IV**

#### **De los productos naturales procesados de uso medicinal**

**Art. 164.** Los productos naturales procesados de uso medicinal, se producirán, almacenarán, comercializarán e importarán siempre que cuenten con registro sanitario nacional, de conformidad con la ley y el reglamento correspondiente y bajo las normas de calidad emitidas por la autoridad sanitaria nacional a través de la entidad competente. Nota: Artículo reformado por Disposición reformativa Séptima, numeral 2 de Ley No. 0, publicada en Registro Oficial Suplemento 652 de 18 de diciembre del 2015.

## 2.4. Hipótesis

### 2.4.1. Hipótesis alternativa. (Hi)

Los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* L. recolectada en diferentes zonas geográficas del Ecuador presentan actividad antioxidante.

### 2.4.2. Hipótesis Nula. (Ho)

Los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* L. recolectada en diferentes zonas geográficas del Ecuador no presentan actividad antioxidante.

## 2.5. Sistema de variables

El trabajo de investigación consta de tres etapas:

**Primera Etapa:** recolección, identificación y control de calidad.

Para esta etapa no se presenta un diseño experimental pero si se aplica una estadística básica.

**Segunda Etapa:** caracterización de los extractos hidroalcohólicos, cuantificación de compuestos fenólicos totales y cuantificación de flavonoides totales.

Para esta etapa se plantea una estadística básica para la caracterización de los EHA y un análisis ANOVA para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales.

Variable dependiente	Variable independiente
Cuantificación de compuestos fenólicos totales (mg GAE/ g EHA)	Ubicación geográfica del sitio de recolección
Cuantificación de flavonoides totales (mg QE /g EHA)	Ubicación geográfica del sitio de recolección

**Tercera Etapa:** evaluación de la actividad antioxidante.

Para esta etapa se plantea un diseño experimental ANOVA multifactorial.

Variable dependiente	Variable independiente
Actividad antioxidante (% inhibición del radical DPPH)	- Ubicación geográfica del sitio de recolección - PNPUM - Concentración de EHA y PNPUM - Estándar de BHT

## Capítulo III

### 3. Marco metodológico

#### 3.1. Diseño de la investigación

El enfoque en el que se fundamenta esta investigación es el paradigma cuantitativo, en el que fueron aplicados métodos experimentales basados en técnicas ya desarrolladas y aprobadas, en cuanto al nivel de investigación este corresponde a un nivel explicativo puesto que las hipótesis y variables planteadas han surgido de preguntas de investigación en lo que se evidencia una relación de causa y efecto, lo cual permite la manipulación de las variables planteadas, dicho mecanismo permite establecer un diseño experimental capaz de probar y medir variables.

Este trabajo a su vez se respaldó de otros tipos de investigación como lo son la investigación bibliográfica o documental, que estudia el problema con la finalidad de ampliar los conocimientos sobre las variables planteadas, y de la investigación de laboratorio, ya que en un ambiente elaborado se tuvo control de las variables para su mejor estudio y entendimiento.

#### 3.2. Población

La población descrita para esta investigación corresponde a la especie vegetal que fue identificada como *Psidium guajava* L., en las tres regiones (Costa, Sierra y Oriente) del Ecuador.

#### 3.3. Muestra o materia prima

La muestra descrita para esta investigación corresponde a las hojas de la especie identificada como *Psidium guajava* L., obtenida en la ciudad de Quinindé, provincia de Esmeraldas (Costa), ciudad de Ibarra provincia de Imbabura (Sierra) y en la ciudad de Puyo, provincia de Pastaza (Oriente).

#### 3.4. Método

Se detalla el método experimental por etapas en el **Anexo C**.

##### 3.4.1. Materiales

Los materiales, reactivos y equipos que fueron empleados en el desarrollo experimental del trabajo de investigación se detallan a continuación:

**Tabla 2.** Reactivos.

Reactivos	Grado	N° CAS
Acetato de etilo	Técnico	141-78-6
Acetato de plomo	Técnico	6080-56-4
Acetona	Técnico	67-64-1
Ácido acético glacial	Analítico	64-19-7
Ácido clorhídrico	Técnico	7647-01-0

Ácido fosfomolibdico	Analítico	51429-74-4
Ácido fosfórico	Analítico	9066-91-5
Ácido gálico 99.5%	Analítico	5995-86-8
Ácido sulfúrico (c)	Técnico	7664-93-9
Agua destilada	-	7732-18-5
Anhídrido acético	Analítico	108-24-7
Butil hidroxitolueno (BHT)	Técnico	128-37-0
Cloroformo	Técnico	67-66-3
Cloruro férrico	Analítico	10025-77-1
Diclorometano	Técnico	75-09-2
Etanol 96%	Técnico	64-17-5
Hexano	Técnico	110-54-3
Hipoclorito de sodio	-	-
Metanol	HPLC	67-56-1
Quercetina	Técnico	117-39-5
Radical DPPH	Analítico	1898-66-4
Sulfato cérico amoniacal	Técnico	-
Tolueno	Técnico	108-88-3
Tricloruro de aluminio	Técnico	7446-70-0
Wolframato de sodio	Analítico	10213-10-2

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 3.** Materiales.

<b>Materiales</b>	<b>Descripción</b>
Balón aforado	Capacidad 10, 50, 100, 500 y 1000 mL
Balón aforado ámbar	Capacidad 10 mL
Balón de extracción	Capacidad 100 y 1000 mL
Bureta	Capacidad 25 mL
Cajas Petri vidrio	-
Cinta adhesiva	-
Papel film	-
Desecador	-
Embudos de cristal	-
Espátula	Pequeña
Frascos ámbar	Capacidad 30, 500 y 1000 mL
Frascos transparentes	Capacidad de 30 mL
Fundas plásticas	Mediana/ grande
Gradilla	Capacidad de 30 tubos
Guantes nitrilo	Talla S
Marcador para vidrio	Color negro
Matraz Erlenmeyer	Capacidad 100, 250, 500 y 1000 mL
Matraz Kitasato	Capacidad 250, 500 mL

Mortero y pistilo	-
Micropipetas	Capacidad 2-20 $\mu$ L; 20- 1000 $\mu$ L
Papel absorbente	-
Papel aluminio	-
Papel empaque	-
Papel filtro	-
Pera de succión	-
Pinza	-
Pinza para crisol	-
Pinzas para bureta	-
Pipetas aforadas	Capacidad 2, 10, 25 mL
Pipetas volumétricas	Capacidad 1, 5, 10 mL
Placas de sílica gel	-
Probeta	Capacidad 10, 25, 250 mL
Placas micropocillos	Capacidad 300 $\mu$ L
Regla	30 cm
Soporte universal	-
Termómetro	Rango ( 0 - 110) $\pm$ 0,1 $^{\circ}$ C
Tubos de ensayos	Capacidad 3, 5, 10 y 20 mL
Varilla de agitación	-
Vasos de precipitación	Capacidad 50, 100, 250, 500 mL

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 4.** Equipos.

<b>Equipos</b>	<b>Descripción</b>
Analizador de humedad	Mettler Toledo, modelo HX204
Balanza analítica	Adam, modelo PW 254. Intervalo de operación 1-250 g; d= 0,0001 g
	Scientech, modelo SA 210. Intervalo de operación Max 210 g; d= 0,0001 g
	Min 0,01 g e= 0,001 g
	Mettler Toledo, modelo AZ 204 Intervalo de operación 1-250 g; d= 0,0001 g
Bomba de vacío	Thomas Medi- pump, modelo 1630GL
Cocineta	-
Espectrofotómetro UV	Modelo SP2100 UV-PC
Estufa	Binder
Durómetro	Key, modelo HT-300 serie 6306. Rango: 5- 300 Newtons
Friabilizador	Erweka, modelo TA-3
Lámpara UV	Cole-Palmer, modelo 9818- series Darkrooms
Lector de microplacas	BioTek, modelo Synergy H1 (Hybrid Reader)
Mufla	Carbolite, modelo RHF1400
Placa de calentamiento	Barnstead, Thermolyne CIMAREC

Placa de agitación	VEB MLW Labortechnik ILMENAU
Rotavapor	IKA IRV10
Vortex	VELP Scientific, classic advanced Vortex Mixer

Elaborado por Arias Mishel

### 3.4.2. Desarrollo Experimental

El trabajo de investigación estuvo constituido por tres etapas que a continuación se describen:

#### Primera Etapa.

Recolección del material vegetal e identificación taxonómica de *Psidium guajava* L.; procesamiento de limpieza, desinfección, secado, fragmentación, determinación de dimensiones, determinación de cenizas totales y cenizas insolubles en ácido clorhídrico, contenido de humedad, preparación de micro- extractos, obtención de extractos hidroalcohólicos por el método de maceración dinámica y porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos.

#### Segunda Etapa.

Caracterización de los extractos hidroalcohólicos obtenido de las hojas de *Psidium guajava* L., mediante parámetros organolépticos, tamizaje fitoquímico, cuantificación de compuestos fenólicos totales y cuantificación de flavonoides totales.

#### Tercera Etapa.


Evaluación de la actividad antioxidante a diferentes concentraciones en las muestras correspondientes a los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. mediante el método del radical DPPH, usando como referencia el estándar BHT.

### 3.4.3. Procedimientos

#### Primera etapa

##### 3.4.3.1. Recolección de la muestra vegetal

Las muestras correspondientes a las hojas de la especie *Psidium guajava* L. se obtuvieron en las propiedades: Escuela 9 de octubre de la ciudad de Quinindé, provincia de Esmeraldas; Tolas de Socapamba en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura y en el Hotel Ecopark en la ciudad de Puyo, provincia de Pastaza.

<b>Descripción geográfica</b>	
<b>Muestra 1</b>	
<b>Región:</b> Costa	
<b>Provincia:</b> Esmeraldas	
<b>Cantón:</b> Quinindé	
<b>Parroquia:</b> Rosa Zárate	
<b>Coordenada Este:</b> 79° 28' 15,78" W	
<b>Coordenada Norte:</b> 0° 19' 50,36" N	
<b>Elevación:</b> 400 m.s.n.m.	

<b>Descripción geográfica</b>	
<b>Muestra 2</b>	
<b>Región:</b> Sierra	
<b>Provincia:</b> Imbabura	
<b>Cantón:</b> Ibarra	
<b>Parroquia:</b> Tolas de Socapamba	
<b>Coordenada Este:</b> 78° 7' 4,52" W	
<b>Coordenada Norte:</b> 0° 24' 8,43" N	
<b>Elevación:</b> 2.150 m.s.n.m.	

<b>Descripción geográfica</b>	
<b>Muestra 3</b>	
<b>Región:</b> Oriente	
<b>Provincia:</b> Pastaza	
<b>Cantón:</b> Puyo	
<b>Parroquia:</b> Santa Rosa	
<b>Coordenada Este:</b> 78° 2' 8,80" W	
<b>Coordenada Norte:</b> 1° 30' 9,44" S	
<b>Elevación:</b> 924 m.s.n.m.	



### **3.4.3.2. Identificación taxonómica**

En el momento de selección y recolección se obtuvieron muestras representativas de la especie vegetal de interés en cada una de las localidades involucradas en el estudio. De estas muestras se seleccionaron ramas y hojas completas y limpias, con presencia de inflorescencias y frutos antes de su maduración. Las muestras botánicas se entregaron al Herbario Alfredo Paredes (QAP) de la Universidad Central del Ecuador para la correspondiente identificación. Una vez que fueron revisadas las características morfológicas de las muestras botánicas se emitió el certificado de identificación taxonómica para todas las muestras recolectadas como correspondientes a la especie *Psidium guajava* L., de la familia Myrtaceae, una especie nativa del Ecuador. (**Anexo F**)

### **3.4.3.3. Limpieza y desinfección**

Para la limpieza se siguieron los parámetros establecidos en las Directrices BPAR de la OMS. Las muestras de hojas de guayaba de cada región fueron separadas de sus ramas y dispuestas de manera dispersa sobre papel empaque clasificadas de acuerdo con parámetros de calidad ya mencionados, por lo tanto, se realizó la limpieza de forma manual mediante el empleo de brochas para retirar polvo y material sólido adherido.

La desinfección se realizó de acuerdo al método establecido por Carballo et al., (2002) para *Plantago lanceolata* L. (llantén), con algunas modificaciones; se lavaron las hojas en agua potable para retirar remanentes de sólidos adheridos, luego se sumergieron las hojas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 3 minutos, finalmente se lavaron en agua destilada y se colocaron sobre papel periódico para su secado previo al proceso de secado en estufa por 24 horas a 40 °C.

### **3.4.3.4. Identificación macroscópica.**

La identificación macroscópica de las muestras se llevó a cabo de acuerdo con lo referido en la Farmacopea Brasileña. (ANVISA, 2010)

#### **3.4.3.4.1. Examen visual**

Es el más simple y rápido, depende en gran medida de la percepción del observador, especialmente para observaciones sensoriales (color, olor y sabor). Para ello se procedió de acuerdo con la metodología establecida en la Farmacopea Brasileña. (ANVISA, 2010)

Para el tamaño de la lámina y del peciolo se midieron muestras de las hojas de guayaba sobre una hoja de papel cuadriculado y usando una regla de 30 cm. Para el color se examinó bajo luz de día; para el olor se prensó una pequeña porción de la muestra seca en la palma de la mano y se inhaló lenta y repetidamente el aire emanado por la muestra. (ANVISA, 2010)

**Tabla 5.** Parámetros de control de calidad de la materia prima, hojas de *Psidium guajava* L.

Parámetro	Descripción
<b>Lámina</b>	7- 15 cm de largo 3- 6 cm de ancho
<b>Pecíolo</b>	0,5- 0,7 cm longitud
<b>Color</b>	La lámina del haz es glabrescente, de color verde brillante y con un envés verde pálido.
<b>Nervaduras</b>	Nervaduras primarias y secundarias evidentes. 1 a 20 pares, más o menos paralelas entre sí, formando un ángulo de 45° a 60°
<b>Olor</b>	Característico
<b>Sabor</b>	Ligeramente astringente

Monografía Guayaba, hoja.

**Fuente:** (ANVISA, 2010)

#### 3.4.3.4.2. *Área foliar*

De acuerdo a la zona de recolección de las muestras son notorias las diferencias macroscópicas, como tamaño y defoliación, por tanto se determinó el incluir esta diferencia entre los rangos macroscópicos a evaluar, para la medición de dimensiones se empleó la aplicación móvil *Petiole*, esta herramienta permite medir el área de la superficie foliar mediante una escala de calibración, para el procedimiento se tomaron aleatoriamente 50 hojas de cada una de las muestras botánicas y se midió utilizando esta aplicación móvil.

#### 3.4.3.4.3. *Porcentaje de defoliación*

El porcentaje de defoliación se determinó mediante el uso de la aplicación móvil *BioLeaf*, que usa los contrastes de luz para determinar el porcentaje de defoliación. Para el procedimiento se tomaron 20 hojas de cada una de las muestras de manera aleatoria y se determinó el porcentaje de defoliación.

#### 3.4.3.5. *Desecación, fragmentación y almacenamiento*

Las muestras vegetales previa limpieza y desinfección fueron secadas en la estufa durante 24 horas a 45 °C. Una vez secas se disminuyó el tamaño de partícula de forma manual hasta un tamaño menor a 1 cm<sup>2</sup>.

Finalizada la operación de fragmentación y para evitar la contaminación o deterioro de las muestras, estas se almacenaron en frascos de vidrio ámbar, sellados, etiquetados y en un lugar fresco y seco hasta su posterior uso en los diferentes análisis.

#### **3.4.3.6. Control de calidad.**

De acuerdo con Metwally et al., (2011) se realizó la descripción macroscópica del polvo obtenido de las hojas de *Psidium guajava* L.

Adicionalmente se llevó a cabo la determinación de cenizas totales, cenizas insolubles en ácido y humedad.

##### **3.4.3.6.1. Determinación de cenizas totales**

En un crisol previamente tarado (procedimiento interno FCQ) se agregaron 2 g de muestra seca y triturada (tamiz No. 20), y se lo dejó en una placa de calentamiento a 540 °C hasta que deje de emanar humo negro. Posteriormente el crisol se colocó en una mufla a 550 °C por un lapso de 120 minutos. Finalmente, el crisol con los residuos obtenidos se colocó en un desecador hasta su total enfriamiento y posteriormente se pesó el crisol hasta obtener un peso constante. OMS (1998)

El porcentaje de cenizas totales se expresó de acuerdo a la **Ecuación 1.** (pág. 19)

##### **3.4.3.6.2. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

Al crisol que contiene las cenizas obtenidas en *Cenizas totales* se adicionaron 25 mL de HCl 3M, se cubrió con un vidrio reloj y se dejó hervir ligeramente por 5 minutos. El material insoluble se recolectó en un papel filtro libre de cenizas, se enjuagó el crisol y el vidrio reloj con agua destilada caliente hasta que el filtrado esté libre de ácido, para lo cual se adicionó una gota de nitrato de plata. Se transfirió el papel filtro con los residuos al crisol y se secó en la placa de calentamiento, el crisol se llevó a temperatura de calcinación en la mufla a 500 °C durante 3 horas y a 675 °C por 1 hora, finalmente el crisol se colocó en un desecador y una vez frío se pesó. El proceso se repitió hasta que el peso del crisol fue constante. OMS (1998)

El porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico se expresó de acuerdo a la **Ecuación 2.** (pág. 19)

##### **3.4.3.6.3. Determinación de humedad de la muestra vegetal**

De acuerdo al método termogravimétrico de pérdida por secado (LOD) se pesaron 0,5 g de muestra seca y triturada en la unidad de pesaje del Analizador de Humedad Mettler Toledo HX 204, la muestra se sometió a una condición de calentamiento del radiador halógeno de 105°C por un lapso de 5 minutos en que el equipo registró el peso real inicial de la muestra y graficó una pérdida de peso en tiempo real, una vez que el peso se estabilizó el equipo empleó la pérdida total de peso para calcular la proporción de humedad.

**Tabla 6.** Parámetros de control de calidad de la materia prima, hojas secas y fragmentadas de *Psidium guajava* L.

Parámetro	Descripción
<b>Rasgos característicos</b>	La hoja seca en polvo es de color verde claro con sabor aromático y un olor característico.
<b>Cenizas totales</b>	No mayor a 9%
<b>Humedad (LOD)</b>	No mayor a 12%

Fuente: ANVISA, 2010

### **3.4.3.7. Control de calidad de formas farmacéuticas sólidas**

#### **3.4.3.7.1. Uniformidad de unidades de dosificación**

Se pesaron diez comprimidos no recubiertos del PNPUM de referencia en una balanza analítica para determinar el grado de uniformidad en el contenido de la forma farmacéutica sólida. Se realizó un tratamiento estadístico básico de acuerdo a la **Ecuación 4** (pág. 23)

#### **3.4.3.7.2. Friabilidad**

Una vez determinado el peso promedio de los comprimidos del PNPUM de referencia y de acuerdo a lo establecido en la USP- NF, para comprimidos con peso menor a 0,650 g, se pesaron 23 comprimidos, se colocaron en el tambor del friabilizador Erweka modelo TA-3 y se dejaron girar durante 3 minutos. Los comprimidos se retiraron del tambor, se volvieron a pesar y de acuerdo a la pérdida de peso se calculó el porcentaje de friabilidad con la **Ecuación 5** (pág. 23)

#### **3.4.3.7.3. Fuerza de ruptura**

La fuerza de ruptura de las tabletas midió colocando uno a uno los comprimidos del PNPUM de referencia entre las platinas del durómetro Key, modelo HT-300. El equipo devolvió el valor de la fuerza requerida para provocar la fractura de los comprimidos. Se realizó un tratamiento estadístico básico de acuerdo a la **Ecuación 4** (pág. 23)

#### **3.4.3.7.4. Desintegración**

Para determinar el tiempo de desintegración de los comprimidos del PNPUM de referencia se colocó un comprimido y un disco en cada tubo de la canastilla del aparato de desintegración. Se dejó la muestra en el desintegrador por 30 minutos usando agua a 37 °C.

### **3.4.3.8. Extracción del material vegetal por maceración dinámica**

#### **3.4.3.8.1. Preparación de micro- extractos**

Se pesó 1,00 g de muestra seca y fragmentada de hojas de *Psidium guajava* L. y se colocó en frascos de vidrio ámbar con 5 mL de soluciones hidroalcohólicas de etanol

al 16% y 50%, hexano, diclorometano y acetona. Los frascos se maceraron por un lapso de 24 horas bajo agitación. Una vez finalizada la maceración se procedió a filtrar.

#### **3.4.3.8.2. Perfil cromatográfico**

El filtrado se analizó mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF) utilizando como referencia una solución metanólica de quercetina (0,001 g / mL) para determinación de flavonoides, con las fases móviles: Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10), Acetato de etilo-Metanol (10:1), Diclorometano-Metanol (10:1) y Diclorometano. Para la determinación de fenoles se usó una solución estándar de ácido gálico (0,001 g / mL) con una fase móvil de Acetato de etilo-Tolueno (7:3).

La CCF se realizó sembrando en banda aproximadamente 5 µL de cada uno de los micro- extractos, para ello la cámara cromatográfica fue saturada por 30 minutos con las fases móviles antes mencionadas. A continuación, fueron colocadas una a una las placas en la cámara cromatográfica, se dejó eluir la fase móvil hasta una distancia de 0,5 cm del borde superior de la placa, luego se dejaron secar las placas y una vez secas las placas cromatográficas se examinaron en la lámpara UV Cole Palmer 9818 (luz UV - 365 nm). Para el revelado químico de las placas se usó una solución de sulfato cérico amoniacal y se midieron las distancias recorridas para calcular el factor de retención (RF) correspondiente a cada micro- extracto.

#### **3.4.3.8.3. Preparación de los extractos hidroalcohólicos**

Se pesó 80 g de la muestra seca y se colocó en frascos de vidrio de capacidad de 2000 mL, en los cuales se adicionó 1000 mL de la solución hidroalcohólica de Etanol 96%-Agua (50:50 V/V). Para el PNPUM de referencia se pesó 4 g de polvo de los comprimidos y se maceraron con 80 mL de la solución hidroalcohólica de etanol al 50%. Los frascos correctamente etiquetados se cubrieron en su totalidad con papel aluminio protegidos de la luz por un lapso de 24 horas bajo agitación. Una vez finalizada la maceración se procedió a filtrar al vacío. El filtrado se colocó en un frasco de vidrio ámbar debidamente identificado y se almacenó en refrigeración hasta realizar el proceso de concentración en un Rotavapor.

Este procedimiento se repitió con las fracciones que fueron obtenidas en el mismo tiempo de maceración por dos ocasiones más.

La concentración de los filtrados se realizó en el Rotavapor IKA IRV10 del laboratorio de Nanotecnología del Instituto de Investigación y Postgrado.

Los extractos concentrados se almacenaron en cajas Petri de vidrio, debidamente etiquetados y en estufa a 35 °C por 48 horas para completar la evaporación total del solvente. Finalmente, los extractos secos fueron almacenados en frascos de vidrio bajo refrigeración y protegidos de la luz. El porcentaje de rendimiento fue determinado en base al peso final obtenido del extracto con referencia al peso de la muestra inicial de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{gramos de extracto obtenido}}{\text{gramos de muestra vegetal inicial}} * 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

## Segunda etapa

### 3.4.4. Tamizaje fitoquímico, caracterización de los extractos.

El tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos (EHA) obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., es un ensayo de identidad que permitió la determinación de los grupos de productos naturales presentes. Para ello se emplearon diferentes reacciones cuyos procedimientos a continuación se describen

#### 3.4.4.1. Identificación de alcaloides.

Siguiendo la metodología propuesta por Iqbal et al. (2015) se pesó aproximadamente 15 mg de cada uno de los EHA *Psidium guajava* L. y se separó mediante agitación con 6 mL de HCl 1% en un baño de agua por 5 minutos. Se filtró y dividió el volumen en tres partes iguales; se realizó la identificación con los reactivos Dragendorff, Mayer y Wagner en tubos de ensayo de 3 mL.

#### 3.4.4.2. Identificación de Terpenoides (test de Salkowski)

Se pesó aproximadamente 0,100 g de cada EHA de *Psidium guajava* L., se adicionó 2 mL de cloroformo y se agitó por 5 minutos. A continuación, se colocó 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado por las paredes del tubo de ensayo. La presencia de un anillo rojo-café en la interfaz indica la presencia de terpenoides.

#### 3.4.4.3. Identificación de Esteroides (test de Liebermann- Burchard)

Se pesó aproximadamente 0,0500 g de cada EHA de *Psidium guajava* L. y se adicionó 2 mL de cloroformo en un tubo de ensayo y se agitó durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió 10 gotas de anhídrido acético por las paredes del tubo y se mantuvo en baño maría hasta ebullición por 2 minutos. Se enfrió en hielo y se añadió 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado por las paredes del tubo. La formación de un anillo café en la interfase y si la capa superior es de color verde es un indicador de la presencia de esteroides.

#### 3.4.4.4. Taninos

Se pesó aproximadamente 0,200 g de cada EHA de *Psidium guajava* L., se adicionó 10 mL de agua destilada, se agitó durante 5 minutos y se filtró. Al filtrado se adicionaron 5 gotas de FeCl<sub>3</sub> al 5%. La presencia de una coloración negra, azul verdoso, o a su vez la aparición de un precipitado es un indicador de la presencia de taninos.

#### 3.4.4.5. Saponinas

Se pesó aproximadamente 0,100 g de cada EHA de *Psidium guajava* L., se adicionó 10 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente. La formación de espuma

persistente tras el calentamiento en baño maría por 5 minutos es un indicativo de la presencia de saponinas.

#### **3.4.4.6. Identificación de antraquinonas (test de Borntrager)**

Se pesó aproximadamente 0,100 g de cada EHA de *Psidium guajava* L. y se añadió 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%. La mezcla se llevó a ebullición en baño maría por 1 minuto, se enfrió y se filtró. El filtrado se agitó con un volumen igual de cloroformo y se dejó reposar por 5 minutos. La capa inferior clorofórmica se agitó con la mitad de su volumen en amoníaco diluido. La aparición de un color rosa a rojo en la capa amoniacal es un indicativo de la presencia de antraquinonas.

#### **3.4.4.7. Identificación de glicósidos cardiotónicos (test de Keller- Killiani)**

Se pesó aproximadamente 0,100 g de cada EHA de *Psidium guajava* L., se añadió 5 mL de agua destilada y se agitó por 5 minutos. A esta mezcla se agregó 2 mL de ácido acético glacial, 3 gotas de FeCl<sub>3</sub> y 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por las paredes del tubo. La formación de un anillo café en la interfase indica la presencia de glicósidos cardiotónicos.

#### **3.4.4.8. Identificación de fenoles**

Se pesó aproximadamente 0,100 g de cada EHA de *Psidium guajava* L., se añadió 10 mL de agua destilada, se agitó y se filtró. Al filtrado se agregó 3 gotas de una solución de acetato de plomo. La formación de un precipitado indica la presencia de compuestos fenólicos.

#### **3.4.5. Cuantificación de fenoles totales**

El contenido de fenoles totales fue analizado por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato de tungsteno). Para la preparación de la curva de calibración se prepararon soluciones etanólicas de ácido gálico (GA) de concentración conocida.

Una vez obtenida la ecuación mediante una regresión lineal de los datos experimentales, se calculó el contenido de fenoles totales en las diferentes muestras.

#### ***Preparación de la curva de calibración***

Se prepararon 10 mL de solución etanólica de ácido gálico (GA) de concentración: 100, 200, 300, 500 y 600 ppm. En un tubo de ensayo cubierto con papel aluminio se colocó 0,1 mL de solución etanólica de GA de 100 ppm con 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se llevó a un volumen de 10 mL con agua destilada. Este procedimiento, se aplicó para las demás concentraciones de GA. La preparación del blanco fue una solución de reactivo de Folin-Ciocalteu (0,5 mL) con agua (9,5 mL). Los tubos de ensayo y el blanco se dejaron reposar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas para finalmente ser leídos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

**Tabla 7.** Curva de calibración de ácido gálico.

<b>Tubo de ensayo</b>	<b>Concentración de la solución etanólica GA, de la cual se tomó 0,1 mL, ppm</b>	<b>Reactivo Folin-Ciocalteu, mL</b>	<b>Volumen de agua destilada, mL</b>	<b>Concentración final de la solución etanólica GA, ppm</b>
Blanco	0	0.5	9.5	0
Estándar 1	100	0.5	9.4	1
Estándar 2	200	0.5	9.4	2
Estándar 3	300	0.5	9.4	3
Estándar 4	500	0.5	9.4	5
Estándar 5	600	0.5	9.4	6

Elaborado por Arias Mishel

### ***Preparación de las muestras***

Se pesó 0,100 g de cada extracto de *Psidium guajava* L. y se aforó a 10 mL con etanol al 96%. De estas soluciones se tomó 0,1 mL, se agregó 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se aforó a 10 mL con agua destilada. La muestra preparada se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente por 2 horas. Finalmente, la absorbancia de las muestras fue leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

La cuantificación de compuestos fenólicos totales en los EHA de *Psidium guajava* L. se determinó con la siguiente ecuación.

$$y = mx - b \quad \text{Ecuación 8}$$

**Donde:**

**y**= absorbancia

**x**=concentración de las soluciones de GA

**m**= pendiente de la recta

**b**= Intersección a la recta

Los resultados de Fenoles Totales fueron expresados como mg GAE/g EHA

### **3.4.6. Cuantificación de flavonoides totales.**

El contenido de flavonoides totales fue analizado por el método colorimétrico del aluminio. Para la preparación de la curva de calibración se prepararon soluciones etanólicas de Quercetina de concentración conocida.

Una vez obtenida la ecuación mediante una regresión lineal de los datos experimentales, se calculó el contenido de flavonoides totales en las diferentes muestras.



### ***Preparación de la curva de calibración***

Se prepararon 25 mL de una solución etanólica de quercetina de 200 ppm. A partir de esta solución y mediante diluciones se prepararon soluciones de concentraciones: 1, 2, 4, 6 y 8 ppm. Para ello se colocaron en tubos de ensayo cubiertos con papel aluminio los volúmenes respectivos de solución etanólica de quercetina (200 ppm), se adicionó 200 µL tricloruro de aluminio al 10% y se llevó a un volumen de 5mL con etanol al 96%. El blanco fue etanol al 96%. Los estándares se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos para finalmente ser leídos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 425 nm.

**Tabla 8.** Curva de calibración de quercetina.

<b>Tubo de ensayo</b>	<b>Volumen de la solución etanólica de quercetina de 200 ppm, µL</b>	<b>Reactivo AlCl<sub>3</sub> 10% µL</b>	<b>Volumen de etanol 96% mL</b>	<b>Concentración final de la solución de quercetina, ppm</b>
Blanco	0	0	5,000	0
Estándar 1	25	200	4,775	1
Estándar 2	50	200	4,750	2
Estándar 3	100	200	4,700	4
Estándar 4	150	200	4,650	6
Estándar 5	200	200	4,600	8

Elaborado por Arias Mishel

### ***Preparación de las muestras***

Se pesó 0,100 g de cada extracto de *Psidium guajava* L. y se aforó a 10 mL con etanol al 96%. De estas soluciones se tomaron 500 µL, se agregaron 200 µL de tricloruro de aluminio al 10% y se aforó a 5 mL con etanol al 96%. La muestra preparada se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, la absorbancia de las muestras fue leída en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 425 nm.

La cuantificación de Flavonoides totales en los EHA de *Psidium guajava* L. se determinó con la siguiente ecuación.

$$y = mx - b \quad \text{Ecuación 8}$$

#### **Donde:**

**y** = absorbancia

**x** = concentración de las soluciones de quercetina

**m** = pendiente de la recta

**b** = intersección a la recta

Los resultados de Flavonoides Totales se expresaron como mg QE/ g EHA

### Tercera etapa

#### 3.4.7. Evaluación de la actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones planteadas para cada EHA de *Psidium guajava* L.

##### 3.4.7.1. Preparación de la solución del radical DPPH

Se prepararon 10 mL de una solución patrón de 200 ppm de 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) en metanol grado HPLC. Esta solución se conservó protegida de la luz hasta antes de su uso y se realizó un barrido espectral para determinar la longitud de onda máxima de absorción, la cual fue de 517 nm.

##### 3.4.7.2. Preparación de la curva de referencia con el estándar BHT

Se prepararon 10 mL de solución metanólica estándar de BHT de 2000 ppm. Se utilizaron micropocillos en los que se colocaron volúmenes correspondientes a la solución estándar indicados en la tabla 9, se adicionó 60 µL de DPPH (200 ppm) y se llevó a un volumen 200 µL con metanol grado HPLC hasta obtener diluciones de concentraciones: 1000, 750, 500, 250, 100 y 50 ppm. El blanco fue DPPH con metanol HPLC. Los estándares y blanco se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos para finalmente ser leídos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm.

**Tabla 9.** Curva de referencia con el estándar BHT.

Estándar	Concentración de BHT, ppm	Volumen de solución estándar de BHT (2000 ppm), µL	Volumen de solución de DPPH, µL	Metanol HPLC, µL
Blanco	0	0	60	140
1	1000	100	60	40
2	750	75	60	65
3	500	50	60	90
4	250	25	60	115
5	100	10	60	130
6	50	5	60	135

Elaborado por Arias Mishel

### 3.4.7.3. Preparación de las muestras

Para las muestras, se pesaron 10,0 mg de EHA de *Psidium guajava* L. y se aforó a 5 mL. Una vez disueltos los extractos en metanol grado HPLC se tomaron los volúmenes necesarios para alcanzar las mismas concentraciones que los estándares, se adicionó 60 µL de DPPH y se completó a un volumen de 200 µL con metanol grado HPLC. El blanco fue la solución de cada EHA con metanol grado HPLC. Las muestras se agitaron de forma orbital por 30 segundos. Los pocillos se protegieron de la luz por 30 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se leyó la placa a una longitud de onda de 517 nm utilizando el programa Gen5™.

### 3.5. Diseño experimental

El diseño experimental del trabajo investigativo se planteó de acuerdo a sus diferentes etapas.

#### 3.5.1. Primera etapa

De acuerdo con los procedimientos planteados para esta etapa, en su mayoría procedimientos de control de calidad, no se estableció un diseño experimental, pero si se planteó una estadística básica.

#### 3.5.2. Segunda etapa

La segunda etapa no contó con un diseño experimental para su totalidad, únicamente se aplicó un modelo de análisis de varianza ANOVA unifactorial para la cuantificación de fenoles totales expresados como miligramo de ácido gálico por gramo de extracto seco; y para la cuantificación de flavonoides totales, expresado como miligramos de quercetina por gramo de extracto seco.

Variable	Dimensiones	Indicadores
<b>Cuantificación de metabolitos secundarios de interés biológico en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.</b>	- Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu - Método colorimétrico del aluminio	- Concentración de compuestos fenólicos totales expresados como mg GAE/ g EHA - Concentración de flavonoides totales expresados como mg QE/ g EHA

Elaborado por Arias Mishel

#### Tercera etapa

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó aplicando el método del radical DPPH, en el que las variables son las concentraciones de las muestras analizadas, el lugar de procedencia de las muestras y su variable respuesta el porcentaje de inhibición de DPPH. Lo que se resumen en un diseño experimental de análisis de varianza de dos factores con tres repeticiones por grupo.

<b>Variable</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>
<b>Evaluación de la actividad antioxidante mediante el método del radical DPPH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extracto vegetal hidroalcohólico</li> <li>- Extracto hidroalcohólico del PNPUM</li> <li>- Estándar butil hidroxitolueno (BHT)</li> <li>- Concentraciones evaluadas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Porcentaje de inhibición del radical DPPH.</li> <li>- Concentración media inhibitoria <math>CI_{50}</math> de los EHA.</li> <li>- Comparación del porcentaje de inhibición de DPPH de los EHA y PNPUM frente al estándar BHT y diferentes concentraciones ensayadas</li> </ul>

Elaborado por Arias Mishel

## Capítulo IV

### 4. Análisis y discusión de resultados

#### Primera etapa

##### 4.1. Recolección de la muestra vegetal

Se seleccionaron y recolectaron únicamente hojas enteras de las muestras correspondientes a la especie *Psidium guajava* L. en las propiedades: Escuela 9 de octubre de la ciudad de Quinindé, provincia de Esmeraldas; Tolas de Socapamba en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura y en el Hotel Ecopark en la ciudad de Puyo, provincia de Pastaza. Este procedimiento se llevó a cabo durante la estación invernal ya que de acuerdo con el estudio de Rathore (2015) se menciona que durante esta época la presencia de compuestos químicos en la especie de *Psidium guajava* L. es mayor. Esto lo confirman los estudios de Chetri, Sanyal y Kar (1999) en que concluyeron que el contenido foliar de macronutrientes de la guayaba aumenta en agosto para alcanzar el máximo desde septiembre hasta diciembre. A su vez, Adhikari y Kandel (2015) afirman: “Las frutas de guayaba producidas durante el invierno son de una calidad superior” (p.2).

Se recolectaron únicamente hojas jóvenes de las tres localidades siguiendo el argumento presentado por Pérez-Pérez et al. (2014) Las hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) fenológicamente jóvenes presentaron mayor contenido de fenoles totales y flavonoides totales que las hojas de guayabo recientemente maduras, ya que las hojas jóvenes son más susceptibles a factores externos debido a su baja lignificación, que aumenta con la edad del tejido. Previo al periodo de maduración foliar las hojas muestran una mayor vulnerabilidad a factores bióticos y abióticos.

Se tomaron en cuenta las directrices de la OMS (2003) que se menciona que para cosechar plantas medicinales se deben buscar las mejores condiciones posibles, como la ausencia de rocío, lluvias y humedad excesivos.

##### 4.2. Identificación taxonómica

La identificación de las muestras botánicas se llevó a cabo en el Herbario Alfredo Paredes (QAP) de la Universidad Central del Ecuador en donde se corroboró que las muestras recolectadas en la ciudad de Quinindé, provincia de Esmeraldas; ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura y en la ciudad de Puyo, provincia de Pastaza corresponden a la especie *Psidium guajava* L., de la familia Myrtaceae, una especie nativa del Ecuador. Asimismo, se emitió el certificado de identificación taxonómica adjunto en el **Anexo F**.

##### 4.3. Limpieza y desinfección

Una vez identificada la especie de cada locación se procedió con la recolección de acuerdo a lo estipulado en el apartado número 3 de las Directrices de la OMS sobre BPAR de plantas medicinales. Se cumplió además con los procedimientos ya descritos de limpieza y desinfección de la materia seca correspondiente a las hojas de *Psidium guajava* L.

#### 4.4. Identificación macroscópica.

##### 4.4.1. Examen visual

De acuerdo a lo referido en la monografía de la ANVISA (2010) y de Metwally et al. (2011) para las hojas de *Psidium guajava* L. se midieron las dimensiones: tamaño de lámina (largo y ancho) y peciolo de 20 muestras aleatoriamente seleccionadas. Se evaluaron además las características organolépticas de color y olor.

**Tabla 10.** Determinación de dimensiones de la lámina foliar.

Localidad	Quinindé			Ibarra			Puyo		
Número de hoja	Largo, cm	Ancho, cm	Peciolo, cm	Largo, cm	Ancho, cm	Peciolo, cm	Largo, cm	Ancho, cm	Peciolo, cm
1	11,80	4,00	0,80	8,60	5,00	0,80	11,90	4,80	0,50
2	16,00	5,20	0,70	8,50	4,80	1,00	13,80	5,30	0,70
3	17,30	6,00	0,80	8,90	4,70	0,70	13,00	4,30	0,70
4	13,30	4,70	0,70	11,60	5,80	0,80	12,50	3,80	0,70
5	13,60	4,50	0,70	10,60	4,80	0,70	13,40	4,30	0,60
6	14,00	4,60	0,60	10,40	4,70	0,90	12,10	4,40	0,50
7	11,60	4,50	0,60	10,50	5,50	0,90	12,60	4,20	0,40
8	12,70	5,50	0,60	10,60	5,20	0,80	14,50	5,00	0,60
9	12,50	4,60	0,60	10,50	4,90	0,90	9,70	3,60	0,50
10	11,50	4,70	0,50	8,80	4,60	0,90	10,10	4,00	0,40
11	15,50	6,00	0,50	11,00	5,90	0,90	13,20	5,70	0,70
12	12,50	5,00	0,50	10,50	4,70	0,70	15,20	5,00	0,50
13	12,70	4,70	0,50	10,00	5,30	0,60	12,80	5,20	0,60
14	10,50	4,50	0,50	9,40	5,00	0,80	13,60	5,00	0,40
15	11,70	4,20	0,60	9,20	5,30	0,80	14,70	4,60	0,60
16	14,40	5,00	0,80	9,00	5,10	1,00	15,20	4,90	0,50
17	15,20	4,70	0,50	10,40	5,00	0,70	11,70	4,30	0,50
18	13,70	4,60	0,60	9,90	5,00	0,60	14,20	4,80	0,60
19	16,60	5,00	0,60	8,50	4,90	1,00	13,50	5,00	0,50
20	15,50	4,90	0,60	10,30	5,00	0,90	12,40	4,40	0,50

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 11.** Resumen de dimensiones de las hojas de *Psidium guajava* L.

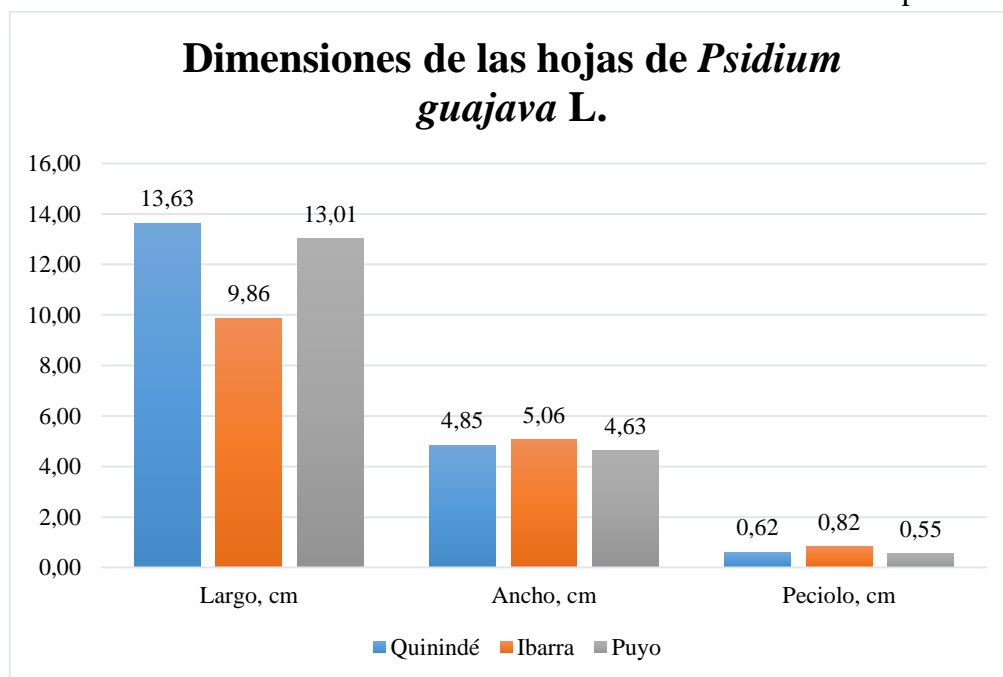
Localidad	Quinindé	Ibarra	Puyo	Especificación
Parámetro				
Tamaño de la lámina				
- Largo, cm	13,63 ± 1,89	9,86 ± 0,92	13,01 ± 1,48	7- 15 cm
- Ancho, cm	4,85 ± 0,52	5,06 ± 0,35	4,63 ± 0,53	3- 6 cm
Tamaño de peciolo	0,62 ± 0,10	0,82 ± 0,12	0,55 ± 0,10	0,5- 0,7 cm

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 12.** Características organolépticas de las hojas de *Psidium guajava* L.

Parámetro	Especificación	Localidad		
		Quinindé	Ibarra	Puyo
<b>Color</b>	La lámina del haz es glabrescente, de color verde brillante y con un envés verde pálido.	Cumple	Cumple	Cumple
<b>Olor</b>	Característico	Cumple	Cumple	Cumple
<b>Sabor</b>	Ligeramente astringente	Cumple	Cumple	Cumple

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 10.** Dimensiones de las hojas de *Psidium guajava* L. de diferentes zonas geográficas del Ecuador

En la tabla 11 y en la figura 10 se muestran los resultados de las dimensiones (largo, ancho y peciolo) para las muestras de hojas de *Psidium guajava* L. de diferentes zonas geográficas y tomando como referencia la monografía para hojas de PGL de la ANVISA (2010) y de Metwally et al. (2011) se observa que todas las muestras cumplen con los valores referenciales pero notando que las hojas recolectadas en la ciudad de Quinindé son más largas ( $13,63 \pm 1,89$  cm) mientras que las hojas recolectadas de la ciudad de Ibarra son más anchas y con un peciolo más largo.

Para los parámetros organolépticos de olor, color y sabor nuevamente se observa en la tabla 12 que todas las muestras cumplen con las monografías de referencia.

#### 4.4.2. Determinación de área foliar

Para medir las diferencias macroscópicas de las muestras respecto a su superficie foliar se empleó la aplicación móvil *Petiole*.

**Tabla 13.** Datos de medición de área foliar.

<b>Número de hoja</b>	<b>Muestra Quinindé, cm<sup>2</sup></b>	<b>Muestra Ibarra, cm<sup>2</sup></b>	<b>Muestra Puyo, cm<sup>2</sup></b>
<b>1</b>	27,70	28,90	50,90
<b>2</b>	59,70	35,00	56,30
<b>3</b>	46,40	27,30	38,00
<b>4</b>	55,20	31,20	36,60
<b>5</b>	35,70	15,30	38,00
<b>6</b>	40,60	33,20	30,90
<b>7</b>	44,90	24,00	24,90
<b>8</b>	65,20	32,20	33,40
<b>9</b>	52,10	22,10	38,10
<b>10</b>	66,90	23,00	29,70
<b>11</b>	49,60	15,90	27,00
<b>12</b>	28,10	10,40	32,10
<b>13</b>	18,20	26,60	17,60
<b>14</b>	33,00	23,80	22,70
<b>15</b>	21,70	26,50	24,00
<b>16</b>	27,50	17,80	24,80
<b>17</b>	25,60	32,70	35,40
<b>18</b>	50,90	8,90	45,80
<b>19</b>	45,60	8,40	30,90
<b>20</b>	22,70	12,10	27,30
<b>21</b>	41,70	20,40	48,90
<b>22</b>	21,70	19,40	37,10
<b>23</b>	62,20	29,40	44,50
<b>24</b>	54,40	27,20	48,80
<b>25</b>	41,50	24,20	41,00
<b>26</b>	31,00	13,10	48,60
<b>27</b>	37,90	25,30	35,80
<b>28</b>	30,50	25,10	29,60
<b>29</b>	18,10	26,30	32,90
<b>30</b>	36,10	29,20	56,60
<b>31</b>	41,90	32,60	33,00
<b>32</b>	34,90	27,10	33,90
<b>33</b>	37,20	15,80	57,00
<b>34</b>	41,70	31,30	43,60
<b>35</b>	28,00	18,60	37,20
<b>36</b>	45,60	32,30	34,80
<b>37</b>	37,20	23,50	52,90
<b>38</b>	46,40	25,60	24,60
<b>39</b>	21,50	30,80	56,40



40	18,90	13,20	29,50
41	44,00	27,00	36,10
42	50,90	20,30	57,20
43	52,00	14,80	44,80
44	54,40	9,00	33,00
45	55,20	27,70	37,40
46	18,40	34,20	55,10
47	54,20	19,90	45,50
48	21,60	23,00	38,20
49	58,20	14,40	24,30
50	33,00	15,40	19,70

Elaborado por Arias Mishel

#### 4.4.3. Porcentaje de defoliación

Para cuantificar el deterioro de las hojas se midió el porcentaje de defoliación mediante el uso de la aplicación móvil *BioLeaf*.

**Tabla 14.** Porcentaje de defoliación.

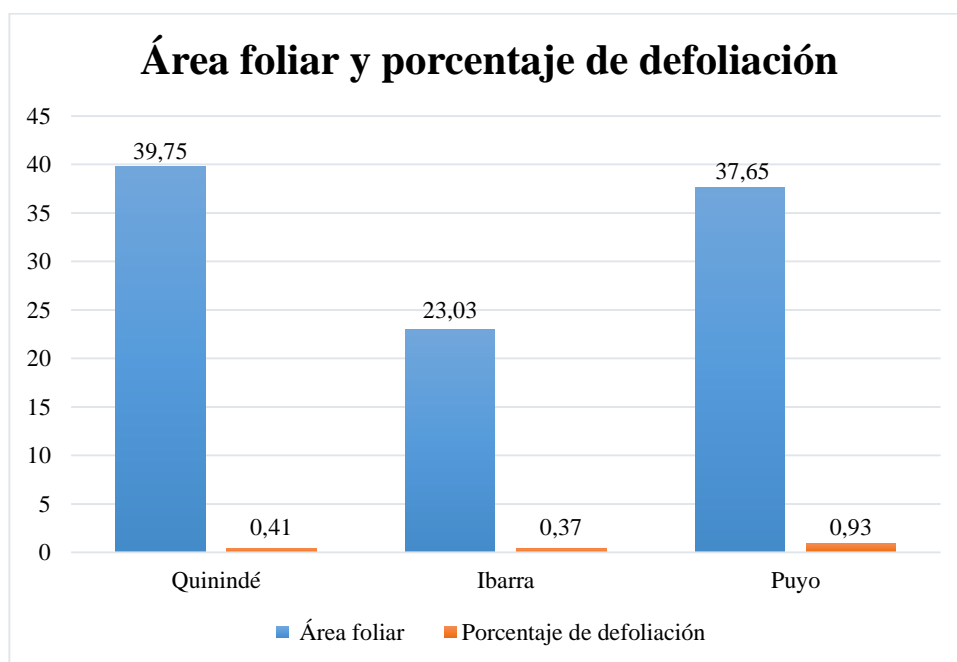
Número de hoja	Muestra Quinindé, %	Muestra Ibarra, %	Muestra Puyo, %
1	0,47	0,26	0,72
2	0,76	0,65	0,77
3	0,04	0,50	0,00
4	0,26	0,00	0,29
5	0,13	0,43	0,15
6	0,28	0,50	0,60
7	1,19	0,00	3,90
8	0,50	0,06	0,33
9	0,26	0,07	1,17
10	0,74	0,78	1,12
11	0,33	0,80	0,00
12	1,13	0,24	0,60
13	0,09	0,33	1,00
14	0,24	0,78	0,30
15	0,04	0,00	3,57
16	0,08	0,12	1,23
17	0,20	0,30	0,70
18	0,91	0,33	1,30
19	0,30	0,86	0,22
20	0,24	0,40	0,61

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 15.** Resumen de resultados obtenidos de área foliar y porcentaje de defoliación de las hojas de *Psidium guajava* L.

Localidad	Quinindé	Ibarra	Puyo
Parámetro			
Área foliar, cm <sup>2</sup>	39,75 ± 13,65	23,03 ± 7,44	37,65 ± 10,75
Porcentaje de defoliación, %	0,41 ± 0,35	0,37 ± 0,29	0,93 ± 1,04

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 11.** Área foliar y porcentaje de defoliación de las hojas de *Psidium guajava* L. de diferentes zonas geográficas del Ecuador

La tabla 15 y la figura 11 se muestran los resultados obtenidos para el área foliar y porcentaje de defoliación, siendo la muestra proveniente de la ciudad de Quinindé la que expresa una mayor superficie foliar ( $39,75 \pm 13,65 \text{ cm}^2$ ) y la muestra proveniente de la ciudad de Puyo es la que presenta un mayor porcentaje de defoliación ( $0,41 \pm 0,35\%$ ). Cabe mencionar que estos parámetros tienen aplicaciones útiles, el área foliar sirve para evaluar el desarrollo y crecimiento de los cultivos en los estudios de requerimientos hídricos y evaluaciones sobre eficiencia bioenergética y el porcentaje de defoliación permite determinar el daño producido por plagas y enfermedades sobre el follaje (INTAGRI, 2016).

#### 4.5. Dsecación, fragmentación y almacenamiento

Las muestras vegetales fueron secadas en estufa durante 24 horas a 45 °C, considerando lo referido por la OMS (2003) en la que se menciona que siempre que sea posible se deben controlar la temperatura y la humedad de las muestras para evitar dañar los componentes químicos activos y en el caso de materias vegetales medicinales que contienen sustancias naturales volátiles deben emplearse temperaturas bajas de secado de acuerdo a la parte vegetal

de interés. Cabe mencionar que debido a las condiciones de alta humedad de las ciudades Quinindé y Puyo se transportaron las muestras inmediatamente para su secado y así evitar los posibles efectos perjudiciales de los niveles de humedad altos, que fomentan la fermentación microbiana y el enmohecimiento.

Una vez secas las hojas se redujo su tamaño de partícula de forma manual hasta un tamaño menor a 1 cm<sup>2</sup> para aumentar la superficie de contacto solvente- muestra seca, lo que se traduce en una mayor facilidad de extracción de los compuestos químicos de interés. Finalmente, para evitar la contaminación o deterioro de las muestras se almacenaron de acuerdo a lo descrito por la OMS (2003) en frascos de vidrio y en un lugar fresco y seco hasta su posterior uso en los diferentes análisis, ya que un correcto almacenamiento asegura la protección de la muestra a agentes físicos químicos o biológicos que puedan perjudicar la actividad o componentes presentes en la droga fraccionada.

#### 4.6. Control de calidad

Para el control de calidad del polvo obtenido de *Psidium guajava* L. se siguió la metodología de la monografía propuesta por Metwally et al. (2011) que consta en el listado de Extractos o Recursos Naturales y sus Referencias Bibliográficas Reconocidas de acuerdo al ARCSA. Adicionalmente se llevó a cabo la determinación de cenizas totales, cenizas insolubles en ácido y humedad de acuerdo a lo parámetros establecidos en la monografía de la ANVISA (2010).

##### 4.6.1. Determinación de cenizas totales

$$\% \text{ Cenizas totales} = \left[ \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \right] \times 100$$

**Donde:**

**m:** Masa del crisol vacío

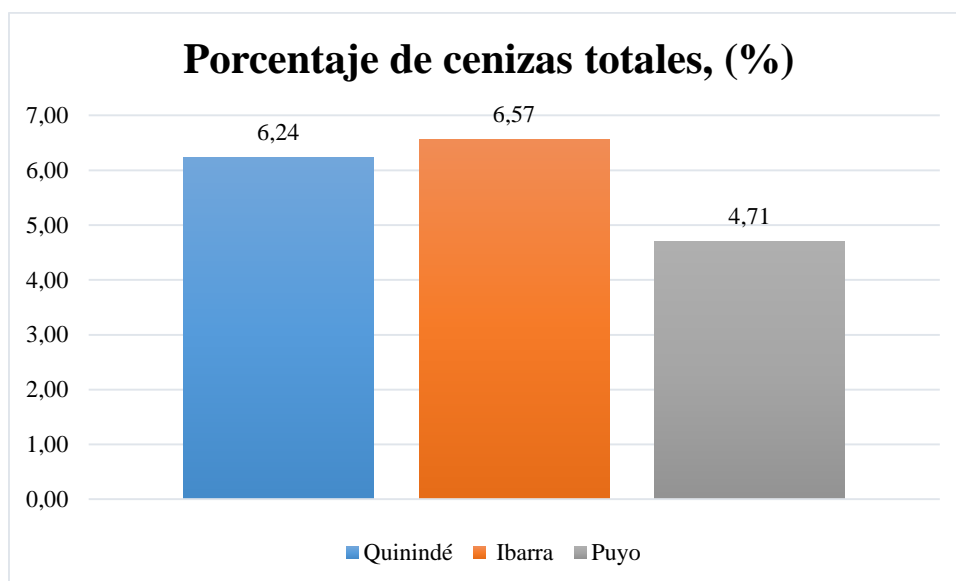
**m<sub>1</sub>:** Masa del crisol con la muestra vegetal

**m<sub>2</sub>:** Masa del crisol más las cenizas

**Tabla 16.** Resultados de los ensayos de control de calidad. Cenizas totales de *Psidium guajava* L.

Localidad	Repetición	Cenizas totales, %	$\bar{X} \pm \delta$	Especificación
Quinindé	1	6,01	$6,24 \pm 0,326$	No más de 9%
	2	6,47		
Ibarra	1	6,55	$6,57 \pm 0,024$	
	2	6,58		
Puyo	1	4,46	$4,71 \pm 0,354$	
	2	4,96		

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 12.** Promedio de los porcentajes de cenizas totales obtenidos de diferentes muestras geográficas de *Psidium guajava* L., según monografía ANVISA (2010).

Tal como se observa en la tabla 16 y en la figura 12, el mayor porcentaje de cenizas totales corresponde a la muestra recolectada en la ciudad de Ibarra con un promedio de  $(6,57 \pm 0,024\%)$ . Mientras que el menor porcentaje de cenizas totales corresponde a la muestra recolectada en la ciudad de Puyo con un promedio de  $(4,71 \pm 0,354\%)$ .

Considerando que la monografía para hojas de *Psidium guajava* L. de la ANVISA (2010) indica que el porcentaje de ceniza totales no debe superar el 9%, se observa que los valores obtenidos para todas las muestras se encuentran dentro del rango establecido.

Ese parámetro es particularmente importante para la evaluación de la pureza de las drogas ya que como lo sugiere Kaneria y Chanda (2011) la ceniza total determina la presencia o ausencia de materia inorgánica extraña como las sales metálicas o sílice”, recalcando que la variación que presentan las muestras puede deberse a la presencia de metales pesados o agentes extraños propios del suelo y de la ubicación geográfica de la que procede cada muestra.

#### 4.6.2. Determinación de Cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

$$\% \text{ Cenizas insolubles en ácido} = \left[ \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \right] \times 100$$

**Donde:**

**m:** Masa del crisol vacío

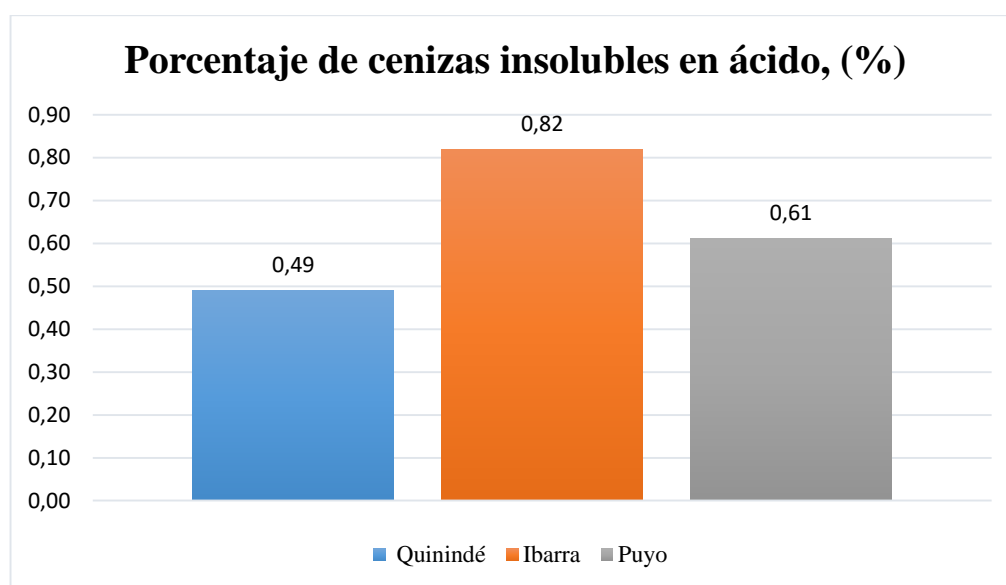
**m<sub>1</sub>:** Masa del crisol con la muestra vegetal

**m<sub>2</sub>:** Masa del crisol más las cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

**Tabla 17.** Resultados de los ensayos de control de calidad. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico 3M de *Psidium guajava* L.

Localidad	Repetición	Cenizas insolubles en ácido, %	$\bar{X} \pm \delta$
Quinindé	1	0,432	0,490 $\pm$ 0,082
	2	0,548	
Ibarra	1	0,755	0,820 $\pm$ 0,093
	2	0,886	
Puyo	1	0,475	0,611 $\pm$ 0,193
	2	0,748	

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 13.** Comparación de los porcentajes de cenizas insolubles en ácido clorhídrico obtenidos de diferentes muestras geográficas de *Psidium guajava* L., según monografía ANVISA (2010)

En la tabla 17 y en la figura 13, se observa los resultados obtenidos para la determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico para las muestras analizadas de *Psidium guajava* L., según estos resultados la muestra de la ciudad de Ibarra es la que presenta un mayor porcentaje de cenizas insolubles en HCl 3 M con un promedio de (0,82  $\pm$  0,093%). Mientras que el menor porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico corresponde a la muestra recolectada en la ciudad de Quinindé con un promedio de (0,49  $\pm$  0,082%).

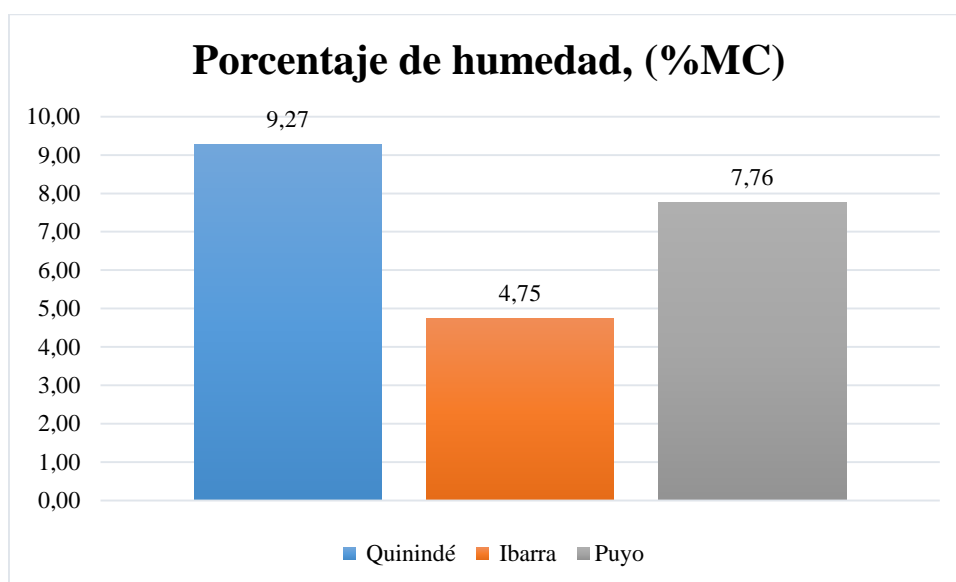
Las farmacopeas oficiales (ANVISA y FHEUM) dentro de sus monografías para las hojas de *Psidium guajava* L., no indican un valor referencial para este parámetro, pero es importante mencionar que este parámetro mide la presencia de sílice presente, especialmente de arena presentes en el material vegetal, recalcando que la variación que presentan las muestras puede deberse a las condiciones propias del suelo y de la ubicación geográfica de la que procede cada muestra.

#### 4.6.3. Determinación de humedad según método termogravimétrico (LOD)

**Tabla 18.** Resultado de los ensayos de control de calidad. Porcentaje de humedad por el método termogravimétrico (LOD) para las hojas fragmentadas de *Psidium guajava* L.

Localidad	Repetición	Humedad, %	$\bar{X} \pm \delta$	Especificación
Quinindé	1	9,78	9,27 ± 0,44	No mayor a 12%
	2	9,02		
	3	9,02		
Ibarra	1	4,79	4,81 ± 0,10	
	2	4,82		
	3	4,63		
Puyo	1	7,46	7,85 ± 0,27	
	2	7,98		
	3	7,85		

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 14.** Comparación de los porcentajes de humedad obtenidos de diferentes muestras geográficas de *Psidium guajava* L., según monografía ANVISA (2010)

Los valores de la tabla 18 y en la figura 14, corresponden al porcentaje de humedad (determinado por LOD), para las hojas de la especie *Psidium guajava* L., de acuerdo a estos resultados se observa que el mayor porcentaje de humedad corresponde a la muestra recolectada en la ciudad de Quinindé con un promedio de  $(9,27 \pm 0,44\%)$ . Mientras que el menor porcentaje de humedad corresponde a la muestra recolectada en la ciudad de Ibarra con un promedio de  $(4,75 \pm 0,10\%)$ .

La monografía de la ANVISA (2010) refiere que este valor no debe superar el 12%, por lo tanto, los resultados obtenidos para todas las muestras cumplen con este parámetro y se

acuerdo a Kaneria y Chanda (2011) los valores altos de humedad alentarían el crecimiento de bacterias, hongos o levaduras.

Se debe tomar en consideración que la humedad es todo lo que se evapora con el calentamiento, además del agua, incluye material volátil como aceites esenciales. La prueba de pérdida por secado (LOD) determina tanto el agua como la materia volátil.

#### 4.7. Control de calidad de formas farmacéuticas sólidas.

##### 4.7.1. Uniformidad de unidades de dosificación de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L.

**Tabla 19.** Determinación de Uniformidad de unidades de dosificación de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L.

Número de comprimido	Peso, g
1	0,3010
2	0,2966
3	0,3010
4	0,3021
5	0,3005
6	0,3052
7	0,3056
8	0,2972
9	0,3010
10	0,2998
$\bar{X} \pm \delta$	0,3010 $\pm$ 0,0029

Elaborado por Arias Mishel

##### 4.7.2. Friabilidad de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L.

Peso inicial,  $W_0$  : 6,5857 g

Peso final,  $W_f$ : 6,5826 g

$$\%f = \frac{W_0 - W_f}{W_0} * 100$$

$$\%f = \frac{6,5857 \text{ g} - 6,5826 \text{ g}}{6,5857 \text{ g}} * 100$$

$$\%f = 0,047\%$$

#### 4.7.3. Fuerza de ruptura de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L.

**Tabla 20.** Determinación de la fuerza de ruptura de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L.

Número	Fuerza de ruptura, Kgf
1	5,13
2	6,20
3	6,10
4	5,4
5	5,5
$\bar{X} \pm \delta$	5,66 $\pm$ 0,46

Elaborado por Arias Mishel

#### 4.7.4. Desintegración de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L.

**Tabla 21.** Determinación del tiempo de desintegración de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L.

No. Comprimido	Tiempo, Min	Especificación
1	< 30	Menor a 30 minutos
2	< 30	
3	< 30	
4	< 30	
5	< 30	

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 22.** Resultados de los ensayos físicos de los comprimidos del PNPUM a base del extracto de las hojas de *Psidium guajava* L.

Parámetro	Referencia	Resultado	Cumplimiento
Unidad de dosificación	0,3000 g	0,3010 $\pm$ 0,0029 g	Cumple
Fuerza de ruptura	Mayor a 5 Kgf	5,66 $\pm$ 0,46 Kgf	Cumple
Friabilidad	Menor a 1%	0,047%	Cumple
Desintegración	Menor a 30 min	Menor a 30 min	Cumple

Elaborado por Arias Mishel

Para los parámetros de control de calidad de formas farmacéuticas sólidas (tabla 22) el PNPUM cumple con todos los valores referenciales, según lo establecido en la USP- NF, (2014). El valor de unidad de dosificación garantiza que el PNPUM contiene para cada una de sus unidades un peso uniforme. Los valores encontrados para la friabilidad y la fuerza de ruptura (dureza) significan que el comprimido mantendrá la forma original hasta llegar al consumidor.



Finalmente, el tiempo de desintegración indica que hay una rápida disolución de la forma farmacéutica, lo que es un factor importante para el proceso de liberación del principio activo.

En conjunto estos parámetros son importantes para conocer si un medicamento sea de origen natural o sintético cumplen con el enunciado de seguridad, eficacia y calidad.

#### 4.8. Extracción del material vegetal por maceración dinámica.

Se seleccionó la técnica de maceración dinámica debido a lo sencillo de la técnica, además de la ventaja de no someter la muestra a temperaturas altas como en la técnica de decocción. Además es adecuada para cantidades pequeñas de muestra.

##### 4.8.1. Preparación de micro- extractos y perfil cromatográfico

Se realizaron las corridas cromatográficas de los extractos obtenidos con diferentes solventes: acetona, hexano, diclorometano, Etanol 96%-Agua (50:50 V/V) y Etanol 96%-Agua (16:84 V/V), con las diferentes fases móviles propuestas en el apartado 3.4.3.8.2. siendo únicamente la fase móvil Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10) la que mostró una adecuada polaridad que permitió identificar las marcas dejadas por los compuestos químicos de interés. Las placas cromatográficas de este análisis preliminar se encuentran en el **Anexo I**.

Las muestras obtenidas con la mezcla hidroalcohólica Etanol 96%-Agua (50:50 V/V) presentaron bandas más definidas y claras que las obtenidas con la mezcla hidroalcohólica al 16% de las cuales no se incluyó su RF.

Los Factores de Retención (RF) obtenidos con la fase móvil Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10) para los micro-extractos con los solventes de extracción: acetona, hexano, diclorometano, Etanol 96%-Agua (50:50 V/V) se muestran a continuación:

**Tabla 23.** Factores de retención de los extractos de *Psidium guajava* L. obtenidos con diferentes solventes de extracción. Ensayo de identidad de compuestos fenólicos por CCF.

<b>Hojas de <i>Psidium guajava</i> L., localidad Quinindé</b>				
<b>Rf, estándar de ácido gálico</b>	<b>Rf, Solvente: acetona</b>	<b>Rf, Solvente: hexano</b>	<b>Rf, Solvente: diclorometano</b>	<b>Rf, Solvente: Etanol 96%-Agua (50:50 V/V)</b>
0,65	0,63	0,60	0,63	0,63
	0,68	0,65	0,68	0,93
	0,88	0,88	0,85	
	0,93	0,95	0,93	
<b>Hojas de <i>Psidium guajava</i> L., localidad Ibarra</b>				
<b>Rf, estándar de ácido gálico</b>	<b>Rf, Solvente: acetona</b>	<b>Rf, Solvente: hexano</b>	<b>Rf, Solvente: diclorometano</b>	<b>Rf, Solvente: Etanol 96%-Agua (50:50 V/V)</b>
0,65	0,65	0,75	0,75	0,63
	0,73	1,00	0,93	0,93
	0,88			
	1,00			

Hojas de <i>Psidium guajava</i> L., localidad Puyo				
Rf, estándar de ácido gálico	Rf, Solvente: acetona	Rf, Solvente: hexano	Rf, Solvente: diclorometano	Rf, Solvente: Etanol 96%-Agua (50:50 V/V)
0,65	0,43	0,71	0,71	0,68
	0,66	0,88	0,83	0,90
		0,98	0,93	
Producto Natural Procesado de Uso Medicinal (PNPUM)				
Rf, estándar de ácido gálico	Rf, Solvente: Etanol 96%-Agua (50:50 V/V)			
0,65	0,71			
	0,93			

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 24.** Factores de retención de los extractos de *Psidium guajava* L. obtenidos con diferentes solventes de extracción. Ensayo de identidad de flavonoides por CCF.

Hojas de <i>Psidium guajava</i> L., localidad Quinindé				
Rf, estándar de quercetina	Rf, Solvente: acetona	Rf, Solvente: hexano	Rf, Solvente: diclorometano	Rf, Solvente: Etanol 96%-Agua (50:50 V/V)
0,88	0,53	0,83	0,55	0,80
	0,73	0,88	0,85	0,88
	0,83			
	0,90			
Hojas de <i>Psidium guajava</i> L., localidad Ibarra				
Rf, estándar de quercetina	Rf, Solvente: acetona	Rf, Solvente: hexano	Rf, Solvente: diclorometano	Rf, Solvente: Etanol 96%-Agua (50:50 V/V)
0,88	0,90	0,90	0,90	0,85
				0,90
Hojas de <i>Psidium guajava</i> L., localidad Puyo				
Rf, estándar de quercetina	Rf, Solvente: acetona	Rf, Solvente: hexano	Rf, Solvente: diclorometano	Rf, Solvente: Etanol 96%-Agua (50:50 V/V)
0,88	0,85	0,83	0,63	0,63
	0,93		0,88	0,85
	0,65			
Producto Natural Procesado de Uso Medicinal (PNPUM)				
Rf, estándar de quercetina	Rf, Solvente: Etanol 96%-Agua (50:50 V/V)			
0,88	0,60			
	0,85			

Elaborado por Arias Mishel

En las tablas 23 y 24 se observan los resultados para los ensayos de identidad por CCF para fenoles y flavonoides realizados para cada uno de los micro-extractos, los resultados mostraron que los extractos hidroalcohólicos Etanol 96%-Agua (50:50 V/V) para todas las muestras mostraron marcas definidas correspondientes al estándar referencial dieron un resultado más parecido a los factores de retención obtenidos para el estándar de quercetina (0,65) y ácido gálico (0,88).

Este resultado concuerda con Seo y et al. (2013) que afirman que para la selección del mejor solvente de extracción para hojas de guayaba se debe tomar en cuenta la polaridad del mismo, reconociendo que la mezcla hidroalcohólica favorece la extracción de compuestos fenólicos y flavonoides por presencia de grupos hidroxilo. Las imágenes correspondientes a este ensayo se encuentran en el **Anexo I**.

#### 4.8.2. Preparación de extractos hidroalcohólicos

La metodología para la preparación de los extractos hidroalcohólicos se detalla en el apartado 3.4.3.8.3. del capítulo 3.

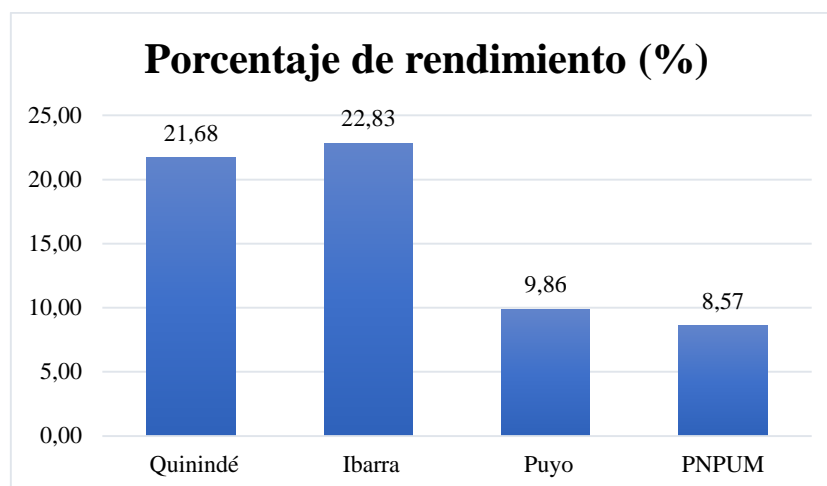
#### Porcentaje de rendimiento

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{gramos de extracto obtenido}}{\text{gramos de muestra vegetal inicial}} * 100$$

**Tabla 25.** Pesos y porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos de hojas de *Psidium guajava* L., de diferentes localidades de Ecuador.

Lugar de obtención de la muestra	Peso inicial de la muestra, g	Peso final del extracto, g	Porcentaje de rendimiento, %
Quinindé	80,1869	17,3839	21,68
Ibarra	80,0231	18,2665	22,83
Puyo	80,1338	7,8993	9,86
PNPUM	3,9939	0,3423	8,57

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 15.** Comparación de los porcentajes de rendimiento obtenidos de diferentes muestras geográficas de *Psidium guajava* L., y del PNPUM de referencia.

En la tabla 25 y en la figura 15 se observan los resultados de los porcentajes de rendimiento para los extractos hidroalcohólicos Etanol 96%-Agua (50:50 V/V) de *Psidium guajava* L., y del PNPUM de referencia, de acuerdo a estos resultados, la muestra proveniente de la ciudad de Ibarra (22,83%) es la que mostró un mayor rendimiento y la muestra del PNPUM tuvo un menor rendimiento (8,57%).

De acuerdo con el estudio de Seo et al. (2013) en el que se ensayaron diferentes solventes de extracción, la mezcla hidroalcohólica Etanol 96%-Agua (50:50 V/V) fue el que presentó una mejor capacidad de extracción más que etanol y metanol absolutos y sus variaciones hidroalcohólicas para obtener una alta eficacia antioxidante de las hojas de guayaba.

El etanol se seleccionó por ser un disolvente con baja toxicidad y costo, adecuado punto de ebullición, y una fuerte capacidad de penetrar en las células vegetales y por ser ampliamente utilizado para la extracción ya que la mayoría de los compuestos orgánicos se pueden disolver en etanol. Cabe mencionar que debido a la naturaleza del solvente Etanol 96%-Agua (50:50 V/V) se probaron diferentes condiciones de concentración, con respecto a la presión, temperatura y revoluciones por minuto, considerando las recomendaciones de control de temperatura que la OMS recomienda en sus directrices BPAR para evitar la degradación de los compuestos químicos de interés.

## Segunda etapa

### 4.9. Tamizaje fitoquímico

**Tabla 26.** Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Psidium guajava* L.

Ensayo	Quinindé	Ibarra	Puyo
<b>Alcaloides</b>			
a. Test Dragendorff	-	-	-
b. Test Mayer	-	-	-
c. Test Wagner	-	-	-
<b>Esteroides/ terpenoides</b>			
a. Test Salkowski	+	+	+
b. Test de Liebermann- Burchard	+	+	+
<b>Taninos</b>			
a. Cloruro Férrico 5%	++	++	++
<b>Saponinas</b>			
a. Agua	++	+	++
<b>Fenoles</b>			
a. Acetato de plomo	++	++	++
<b>Glicósidos</b>			
a. Antraquinonas (test de Borntrager)	-	-	-
b. Glicósidos cardiacos (test de Keller Killiani)	-	-	-

Elaborado por Arias Mishel

### Interpretación

(++) Abundante

(+) Moderado

(+/-) Escaso

(-) Ausencia

En la tabla 26 se observa el resultado de las pruebas cualitativas del tamizaje fitoquímico de acuerdo a los procedimientos mencionados, en estos resultados se observa una ausencia de alcaloides para las tres pruebas establecidas, pero se observa la presencia notoria de taninos saponinas y fenoles, lo cual concuerda con lo mencionado en el estudio de Gayathri & Kiruba (2014) que se realizó para evaluar los compuestos fitoquímicos presentes en el polvo de hoja de guayaba, el estudio mostró la presencia de fenoles, terpenoides y flavonoides y una total ausencia de alcaloides.

Es importante mencionar que el tamizaje fitoquímico no es una técnica concluyente debido a que emplea reacciones cualitativas y en el caso de los extractos obtenidos de hojas debido la presencia de la clorofila y otros pigmento puede originar resultados negativos al enmascarar la visualización de cambios de color que no son concluyentes y como menciona

Cuesta et al. (2015) puede haber interferencias que podrían enmascarar la visualización de cambios de color, sobre todo las tonalidades similares al verde.

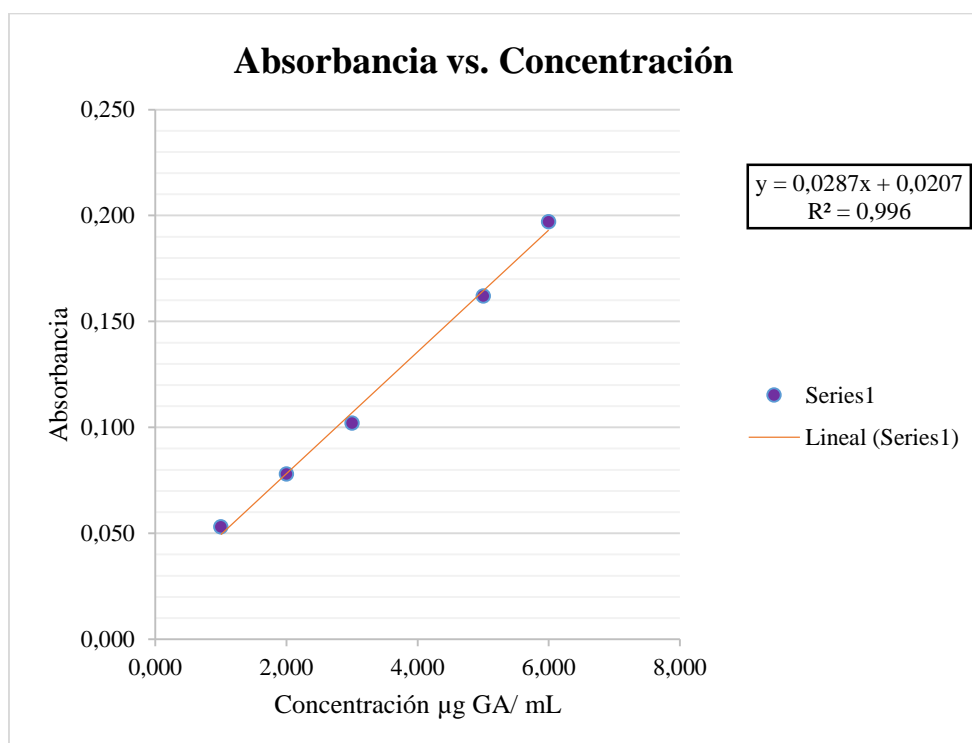
#### 4.10. Cuantificación de fenoles totales en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L.

Realizada la curva de calibración con ácido gálico (figura 17) se obtuvo la ecuación de la regresión lineal,  $y = 0,0287x + 0,0207$ , con un coeficiente de correlación de 0,996 que indica una dependencia total entre las dos variables, es decir, cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante. El marcador fue el ácido gálico.

**Tabla 27.** Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Estándar	Concentración de ácido gálico, ppm	Absorbancia
Blanco	0	0
1	1,000	0,053
2	2,000	0,078
3	3,000	0,102
4	5,000	0,162
5	6,000	0,197

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 16.** Curva de calibración de ácido gálico

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - 0,0207}{0,0287}$$

$$C \text{ fenoles totales} = \frac{0,099 - 0,0207}{0,0287} = 2,728 \frac{\mu g \text{ GAE}}{mL}$$

**Tabla 28.** Datos experimentales de absorbancia y concentración de compuestos fenólicos en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Psidium guajava* L.

Muestra	Absorbancia			Concentración, $\frac{\mu g \text{ GAE}}{mL}$		
	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3
<b>Quinindé</b>	0,099	0,101	0,102	2,728	2,798	2,833
<b>Ibarra</b>	0,087	0,085	0,087	2,310	2,240	2,310
<b>Puyo</b>	0,078	0,074	0,076	1,997	1,857	1,927

Elaborado por Arias Mishel

Finalmente, para expresar por gramo de extracto hidroalcohólico se realiza la siguiente corrección:

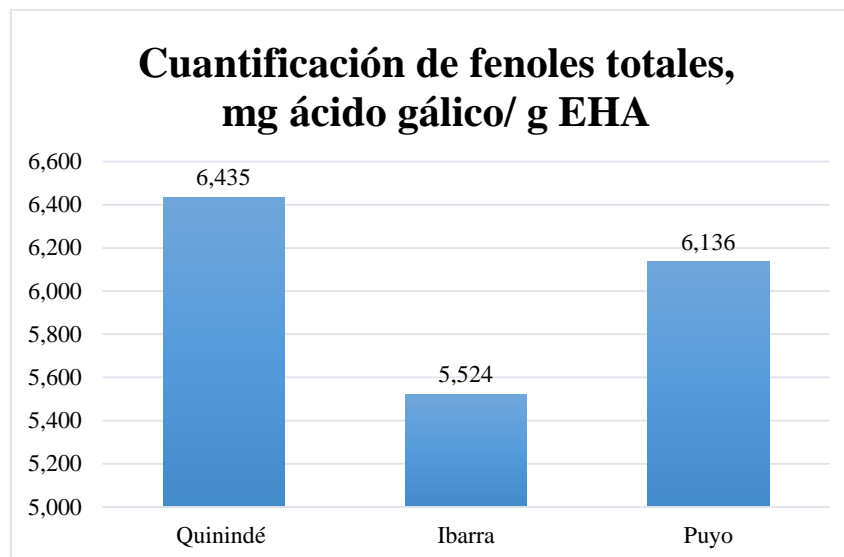
$$C \text{ fenoles totales} = 2,728 \frac{\mu g \text{ GAE}}{mL} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu g} \times \frac{1 \text{ mL}}{0,0433 \text{ g}} \times 100$$

$$C \text{ fenoles totales} = 6,301 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ EHA}}$$

**Tabla 29.** Concentración de compuestos fenólicos expresados como mg de ácido gálico/ g de EHA

Codificación	Concentración mg GAE/ g EHA			Promedio
	R 1	R 2	R 3	
<b>Quinindé</b>	6,301	6,462	6,542	6,435 $\pm$ 0,123
<b>Ibarra</b>	5,580	5,412	5,580	5,524 $\pm$ 0,097
<b>Puyo</b>	6,358	5,914	6,136	6,136 $\pm$ 0,222

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 17.** Promedio de la concentración de compuestos fenólicos totales obtenidos de EHA de diferentes muestras geográficas de *Psidium guajava* L.

#### Análisis estadístico.

**Tabla 30.** Análisis de varianza de un factor. Cuantificación de fenoles totales.

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé	3	19,305	6,435	0,015
<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra	3	16,572	5,524	0,009
<i>Psidium guajava</i> L. Puyo	3	18,409	6,136	0,049

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,2942	2	0,6471	26,3029	0,0011	5,1433
Dentro de los grupos	0,1476	6	0,0246			
<b>Total</b>	<b>1,4418</b>	<b>8</b>				

Elaborado por Arias Mishel

La tabla 29 y la figura 17 muestran los resultados obtenidos para la cuantificación de fenoles totales en los EHA obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., mismos que indican que la muestra proveniente de la ciudad de Quinindé es la que contiene mayor cantidad de fenoles siendo su promedio de (6,435 mg GAE/ g EHA) y la muestra proveniente de la ciudad de Ibarra tiene el menor promedio de fenoles totales (5,524 mg GAE/ g EHA), y de acuerdo al análisis estadístico de la tabla 29 se determina que las muestras son significativamente diferentes ya que el origen geográfico de las muestras tienen un efecto significativo en la concentración de compuestos fenólicos.



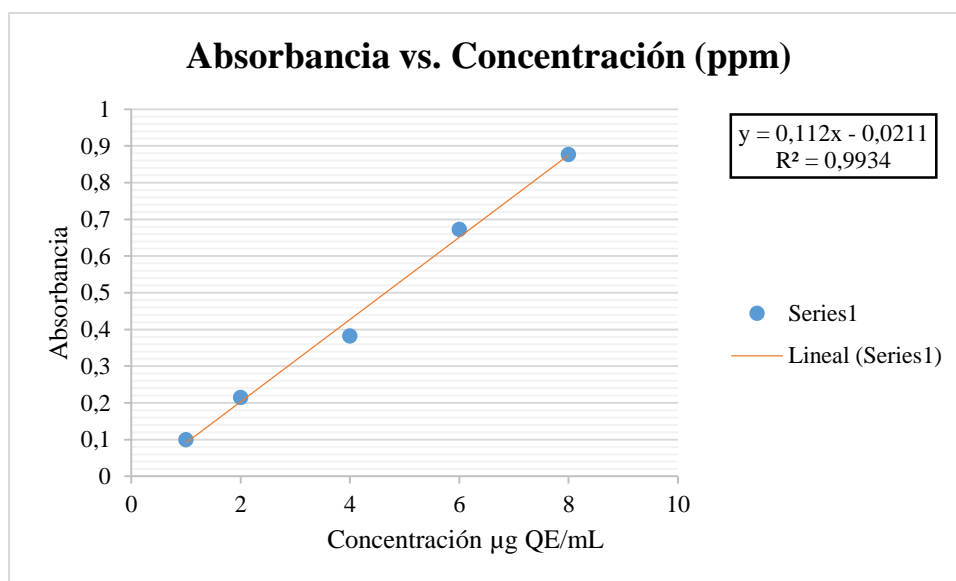
#### 4.11. Cuantificación de flavonoides totales en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L.

Realizada la curva de calibración con quercetina (figura 19) se obtuvo la ecuación de la regresión lineal,  $y = 0,112x + 0,0211$ , con un coeficiente de correlación de 0,9934 que muestra la presencia de una correlación positiva, es decir, hay una dependencia total entre las dos variables. El marcador fue la quercetina.

**Tabla 31.** Curva de calibración de Quercetina para la cuantificación de flavonoides totales.

Estándar	Concentración de quercetina, ppm	Absorbancia
Blanco	0	0
1	1	0,100
2	2	0,215
3	4	0,382
4	6	0,673
5	8	0,877

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 18.** Curva de calibración de quercetina

La concentración de flavonoides totales se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y + 0,0211}{0,1120}$$

$$C \text{ flavonoides totales} = \frac{0,603 + 0,0211}{0,1120} = 5,571 \frac{\mu g \text{ QE}}{mL}$$

**Tabla 32.** Datos experimentales de absorbancia y concentración de flavonoides en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Psidium guajava* L.

Muestra	Absorbancia			Concentración, $\frac{\mu g\ QE}{mL}$		
	R 1	R 2	R 3	R 1	R 2	R 3
Quinindé	0,603	0,598	0,604	5,571	5,526	5,580
Ibarra	0,811	0,817	0,825	7,428	7,481	7,553
Puyo	0,385	0,342	0,389	3,625	3,241	3,661

Elaborado por Arias Mishel

Finalmente para expresar por gramo de extracto se realiza la siguiente corrección:

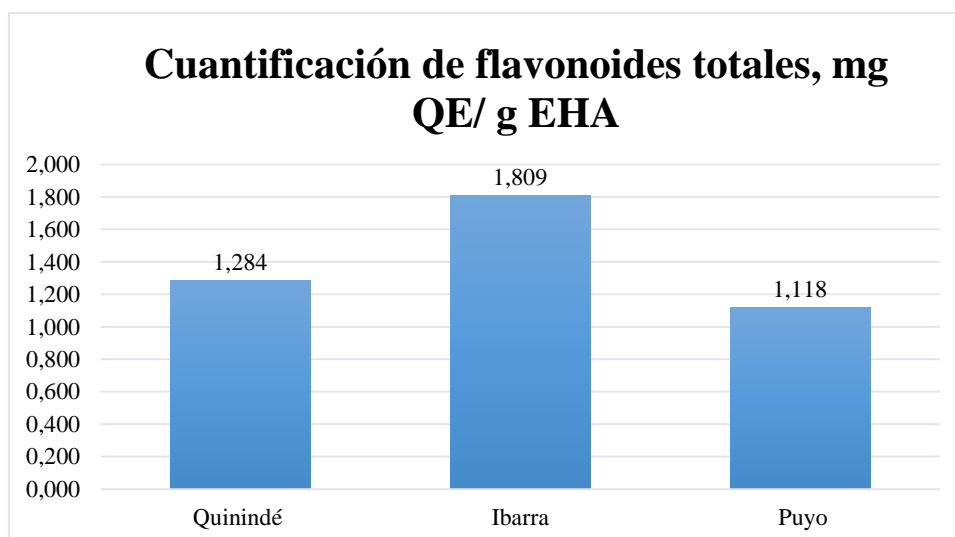
$$C\ flavonoides\ totales = 5,572 \frac{\mu g\ QE}{mL} \times \frac{1\ mg}{1000\ \mu g} \times \frac{1\ mL}{0,0433\ g} \times 10$$

$$C\ flavonoides\ totales = 1,287 \frac{mg\ QE}{g\ EHA}$$

**Tabla 33.** Concentración de flavonoides expresados como mg de quercetina/ g de EHA

Codificación	Concentración mg QE/g EHA			Promedio
	R 1	R 2	R 3	$\bar{X} \pm s$
Quinindé	1,287	1,276	1,289	1,284 $\pm$ 0,007
Ibarra	1,794	1,807	1,824	1,809 $\pm$ 0,015
Puyo	1,155	1,032	1,166	1,118 $\pm$ 0,074

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 19.** Promedio de la concentración de flavonoides totales obtenidos de EHA de diferentes muestras geográficas de *Psidium guajava* L.

## Análisis estadístico

**Tabla 34.** Análisis de varianza de un factor. Cuantificación de flavonoides totales.

### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé	3	3,852	1,284	4,39E-05
<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra	3	5,426	1,809	2,29E-04
<i>Psidium guajava</i> L. Puyo	3	3,353	1,118	5,49E-03

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,7803	2	0,3902	203,196	3,08E-06	5,143
Dentro de los grupos	0,0115	6	0,0019			
Total	0,7918	8				

La tabla 33 y la figura 19 muestran los resultados obtenidos para la cuantificación de flavonoides totales en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L., mismos que indican que la muestra proveniente de la ciudad de Ibarra es la que contiene mayor cantidad de flavonoides totales siendo su promedio de (1,809 mg QE/ g EHA) y la muestra con un menor promedio corresponde a la muestra de la ciudad de Puyo (1,118 mg QE / g EHA), y de acuerdo al análisis estadístico de la tabla 32 se determina que las muestras son significativamente diferentes ya que el origen geográfico de las muestras tienen un efecto significativo en la concentración de flavonoides.

### Tercera etapa

#### 4.12. Evaluación de actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Psidium guajava* L.

Una vez cuantificados los compuestos fenólicos y flavonoides en las muestras de las diferentes regiones del Ecuador se procedió con la evaluación de la actividad antioxidante usando el método del radical DPPH con la inclusión referencial de un PNPUM declarado en el ARCSA como un producto natural cuyo único principio activo es el extracto hidroalcohólico (50%) de hojas de *Psidium guajava* L. disponible en el mercado.

##### 4.12.1. Curva de referencia con el estándar butil hidroxitolueno (BHT).

La metodología para la construcción de la curva de referencia con el estándar Butil hidroxitolueno se detalla en el apartado 3.4.7.2. del tercer capítulo.

**Tabla 35.** Datos obtenidos de la absorbancia para la curva de referencia con el estándar butil hidroxitolueno (BHT).

Estándar	Concentración de BHT, ppm	Absorbancia, BHT		
		Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1	1000	0,090	0,087	0,082
2	750	0,160	0,153	0,156
3	500	0,251	0,254	0,258
4	250	0,330	0,323	0,326
5	100	0,403	0,399	0,406
6	50	0,425	0,433	0,427

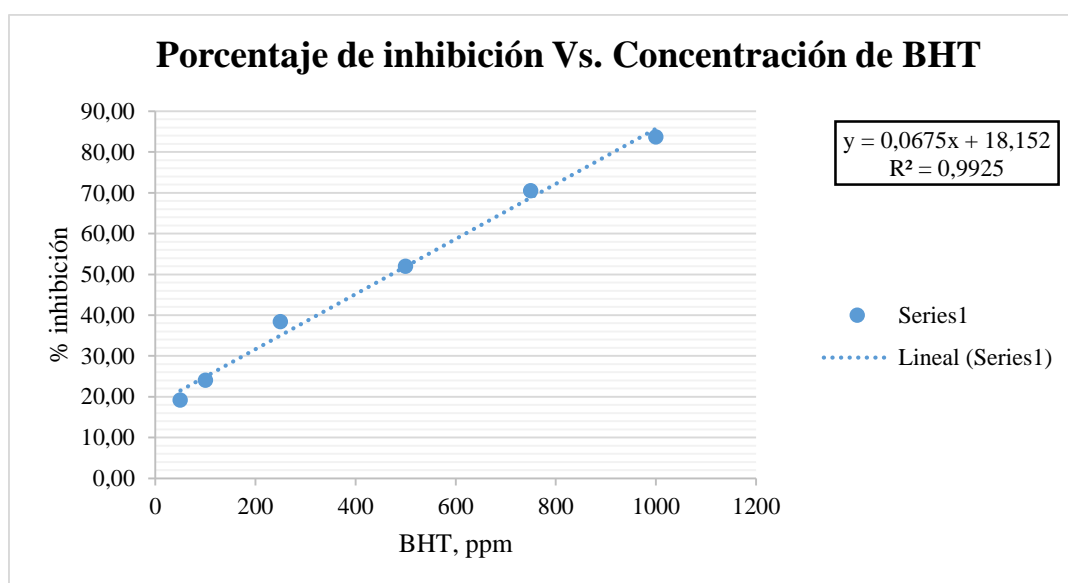
Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 36.** Porcentaje de inhibición y CI<sub>50</sub> del estándar butil hidroxitolueno (BHT).

Concentración de BHT, ppm	Porcentaje de inhibición de DPPH				CI <sub>50</sub>
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	
1000	83,02	83,58	84,53	83,71	471,82
750	69,81	71,13	70,57	70,50	
500	52,64	52,08	51,32	52,01	
250	37,74	39,06	38,49	38,43	
100	23,96	24,72	23,40	24,03	
50	19,81	18,30	19,43	19,18	

Elaborado por Arias Mishel

Realizada la curva de calibración con BHT (figura 21) se obtuvo la ecuación de la regresión lineal,  $y = 0,0675x + 18,152$ , con un coeficiente de correlación de 0,9925 que indica una dependencia total entre las dos variables, es decir, cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante. Con la ecuación de la recta se calculó la CI<sub>50</sub> para el BHT siendo este valor de 471,82 ppm.



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 20.** Curva de referencia con el estándar butil hidroxitolueno (BHT).

Para las diferentes muestras se calculó el porcentaje de inhibición del radical DPPH de acuerdo a la **Ecuación 6**.

$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH} = \left(1 - \frac{A_M - A_B}{A_{PR}}\right) * 100$$

**Donde:**

$A_M$  = absorbancia de la muestra (EHA + DPPH + metanol)

$A_B$  = absorbancia del blanco de la muestra (EHA + metanol)

$A_{PR}$  = absorbancia del patrón de referencia (DPPH + metanol)

**Tabla 37.** Resultados de la absorbancia del EHA de hojas de *Psidium guajava* L. de la ciudad de Quinindé (provincia de Esmeraldas) para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH.

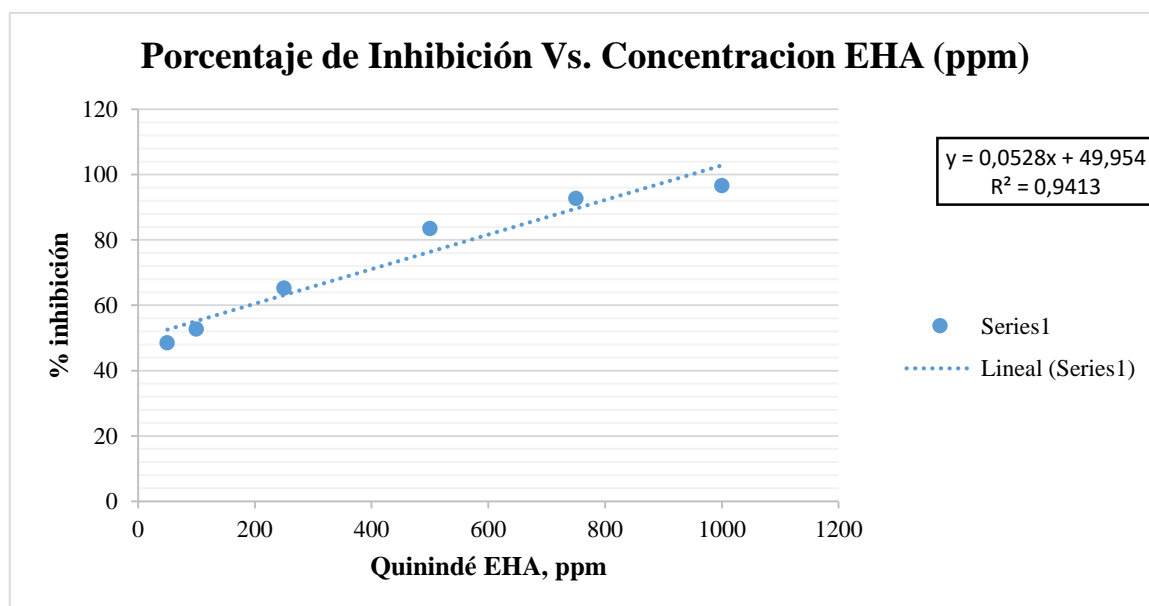
<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé			
Concentración	Absorbancia		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1000	0,087	0,091	0,105
750	0,104	0,105	0,110
500	0,146	0,146	0,144
250	0,242	0,238	0,233
100	0,296	0,297	0,292
50	0,316	0,319	0,312

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 38.** Porcentaje de inhibición y  $CI_{50}$  del EHA de hojas de *Psidium guajava* L. de la ciudad de Quinindé (provincia de Esmeraldas).

<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé					
Concentración	% de inhibición de DPPH				
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	$CI_{50}$
1000	98,11	97,36	94,72	96,73	0,87
750	93,21	93,02	92,08	92,77	
500	83,40	83,40	83,77	83,52	
250	64,53	65,28	66,23	65,35	
100	52,64	52,45	53,40	52,83	
50	48,49	47,92	49,25	48,55	

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 21.** Porcentaje de inhibición de DPPH, muestra de la ciudad de Quinindé.

Con el promedio de las tres repeticiones se construyó la curva de porcentaje de inhibición de DPPH (figura 21) y con la ecuación de la recta se calculó la  $CI_{50}$ . De acuerdo con los resultados, a una concentración de 1000 ppm del EHA de la ciudad de Quinindé se presenta el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH de 96,73% con un  $CI_{50}$  de 0,87 ppm.

### Análisis estadístico

**Tabla 39.** Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. EHA ciudad de Quinindé.

RESUMEN	QUININDÉ	BHT	Total
	<i>1000</i>		
Cuenta	3	3	6
Suma	290,189	251,132	541,321
Promedio	96,730	83,711	90,220
Varianza	3,180	0,581	52,352
	<i>750</i>		
Cuenta	3	3	6
Suma	278,302	211,509	489,811
Promedio	92,767	70,503	81,635
Varianza	0,368	0,439	149,030
	<i>500</i>		
Cuenta	3	3	6
Suma	250,566	156,038	406,604
Promedio	83,522	52,013	67,767
Varianza	0,047	0,439	298,048

<b>250</b>			
<b>Cuenta</b>	3	3	6
<b>Suma</b>	196,038	115,283	311,321
<b>Promedio</b>	65,346	38,428	51,887
<b>Varianza</b>	0,724	0,439	217,843
<b>100</b>			
<b>Cuenta</b>	3	3	6
<b>Suma</b>	158,491	72,075	230,566
<b>Promedio</b>	52,830	24,025	38,428
<b>Varianza</b>	0,249	0,439	249,194
<b>50</b>			
<b>Cuenta</b>	3	3	6
<b>Suma</b>	145,660	57,547	203,208
<b>Promedio</b>	48,553	19,182	33,868
<b>Varianza</b>	0,439	0,617	259,220
<b>Total</b>			
<b>Cuenta</b>	18	18	
<b>Suma</b>	1319,245	863,585	
<b>Promedio</b>	73,291	47,977	
<b>Varianza</b>	375,956	581,751	

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Muestra</b>	15919,988	5	3183,998	4798,489	3,592E-35	2,621
<b>Columnas</b>	5767,399	1	5767,399	8691,841	3,067E-32	4,260
<b>Interacción</b>	345,114	5	69,023	104,022	1,848E-15	2,621
<b>Dentro del grupo</b>	15,925	24	0,664			
<b>Total</b>	22048,427	35				

Elaborado por Arias Mishel

Mediante el análisis del diseño factorial con dos factores (tabla 39) se comprueba estadísticamente que existe una diferencia significativa entre el EHA de la ciudad de Quinindé (provincia de Esmeraldas) y el estándar BHT ya que la F experimental es mayor que la F tabulada, razón por la que se puede decir que no se comportan de la misma manera al momento de inhibir al radical DPPH. Esto se debe a que el EHA de Quinindé en todas las concentraciones ensayadas posee valores para el porcentaje de inhibición de DPPH más altos que los del estándar BHT

**Tabla 40.** Resultados de la absorbancia del EHA de hojas de *Psidium guajava* L. de la ciudad de Ibarra (provincia de Imbabura) para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH.

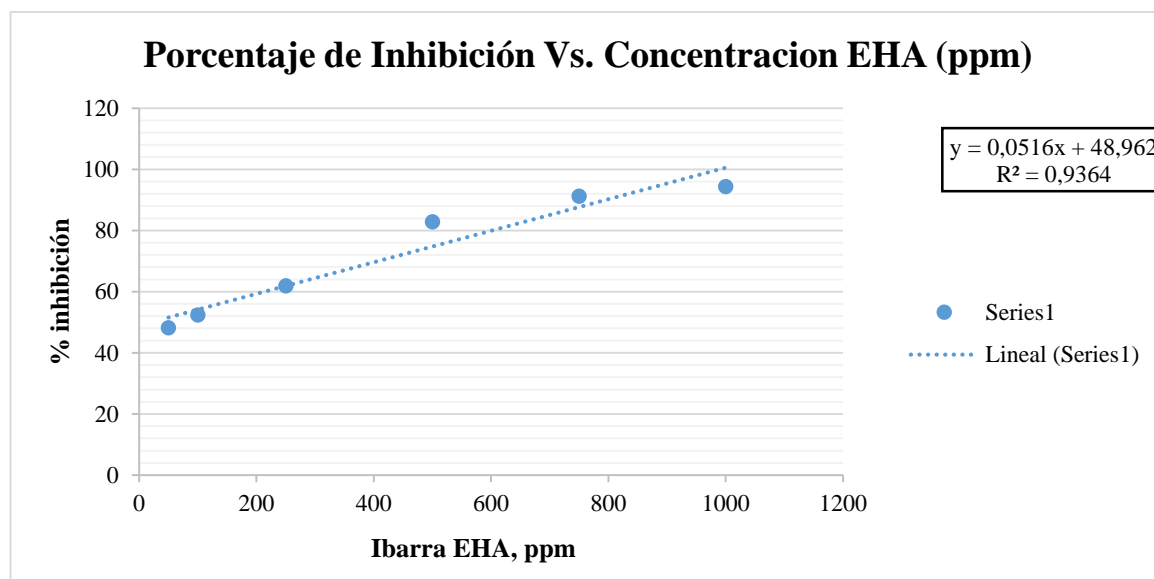
<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra			
Concentración	Absorbancia		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1000	0,125	0,129	0,124
750	0,120	0,121	0,119
500	0,159	0,156	0,157
250	0,262	0,260	0,261
100	0,294	0,298	0,298
50	0,318	0,319	0,317

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 41.** Porcentaje de inhibición y  $CI_{50}$  del EHA de hojas de *Psidium guajava* L. de la ciudad de Ibarra (provincia de Imbabura).

<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra					
Concentración	% de inhibición de DPPH				$CI_{50}$
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	
1000	94,53	93,77	94,72	94,34	20,12
750	91,13	90,94	91,32	91,13	
500	82,45	83,02	82,83	82,77	
250	61,70	62,08	61,89	61,89	
100	52,83	52,08	52,08	52,33	
50	48,11	47,92	48,30	48,11	

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 22.** Porcentaje de inhibición de DPPH, muestra de la ciudad de Ibarra.

Con el promedio de las tres repeticiones se construyó la curva de porcentaje de inhibición de DPPH (figura 22) y con la ecuación de la recta se calculó la  $CI_{50}$ . De acuerdo con



los resultados, a una concentración de 1000 ppm del EHA de la ciudad de Ibarra se presenta el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH de 94,34% con un  $CI_{50}$  de 20,12 ppm.

### Análisis estadístico

**Tabla 42.** Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. EHA ciudad de Ibarra.

RESUMEN	IBARRA	BHT	Total
<b>1000</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	283,019	251,132	534,151
Promedio	94,340	83,711	89,025
Varianza	0,249	0,581	34,225
<b>750</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	273,396	211,509	484,906
Promedio	91,132	70,503	80,818
Varianza	0,036	0,439	127,856
<b>500</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	248,302	156,038	404,340
Promedio	82,767	52,013	67,390
Varianza	0,083	0,439	283,965
<b>250</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	185,660	115,283	300,943
Promedio	61,887	38,428	50,157
Varianza	0,036	0,439	165,289
<b>100</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	156,981	72,075	229,057
Promedio	52,327	24,025	38,176
Varianza	0,190	0,439	240,551
<b>50</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	144,340	57,547	201,887
Promedio	48,113	19,182	33,648
Varianza	0,036	0,617	251,359
<b>Total</b>			
Cuenta	18	18	
Suma	1291,698	863,585	
Promedio	71,761	47,977	
Varianza	360,174	581,751	

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Muestra</b>	15587,652	5	3117,530	10438,978	3,220E-39	2,621
<b>Columnas</b>	5091,137	1	5091,137	17047,553	9,613E-36	4,260
<b>Interacción Dentro del grupo</b>	417,912	5	83,582	279,874	1,871E-20	2,621
	7,167	24	0,299			
<b>Total</b>	21103,868	35				

Elaborado por Arias Mishel

Mediante el análisis del diseño factorial con dos factores (tabla 42) se comprueba estadísticamente que existe una diferencia significativa entre el EHA de la ciudad de Ibarra (provincia de Imbabura) y el estándar BHT ya que la F experimental es mayor que la F tabulada, razón por la que se puede decir que no se comportan de la misma manera al momento de inhibir al radical DPPH. Esto se debe a que el EHA de Ibarra en todas las concentraciones ensayadas posee valores para el porcentaje de inhibición de DPPH más altos que los del estándar BHT.

**Tabla 43.** Resultados de la absorbancia del EHA de hojas de *Psidium guajava* L. de la ciudad de Puyo (provincia de Pastaza) para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH.

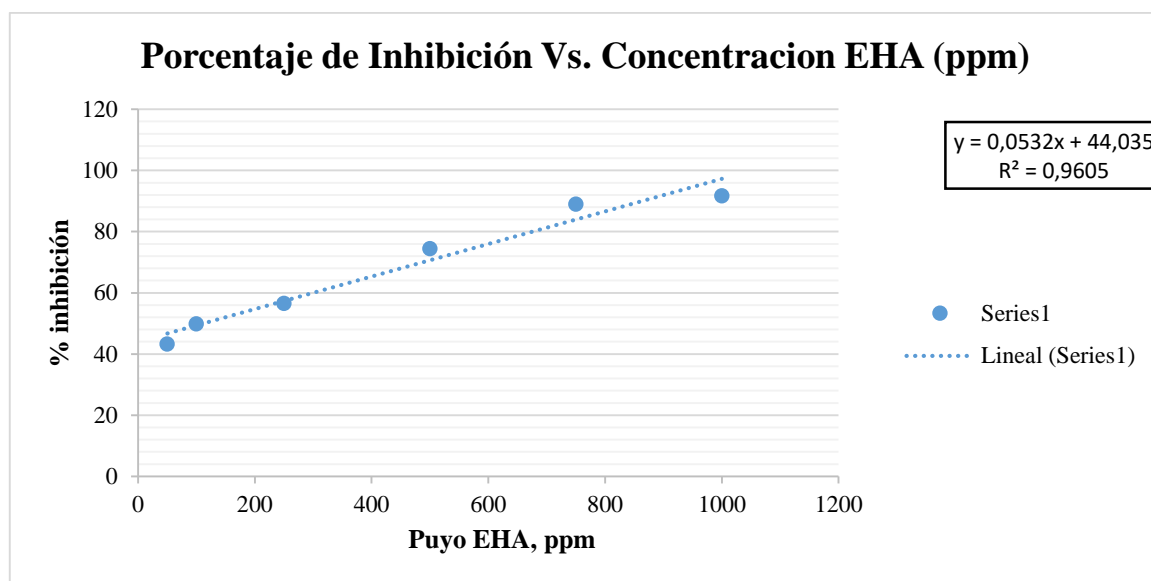
<i>Psidium guajava</i> L. Puyo			
Concentración	Absorbancia		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
<b>1000</b>	0,114	0,129	0,125
<b>750</b>	0,126	0,129	0,123
<b>500</b>	0,197	0,196	0,198
<b>250</b>	0,279	0,278	0,280
<b>100</b>	0,308	0,309	0,311
<b>50</b>	0,344	0,341	0,345

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 44.** Porcentaje de inhibición y CI<sub>50</sub> del EHA de hojas de *Psidium guajava* L. de la ciudad de Puyo (provincia de Pastaza).

<i>Psidium guajava</i> L. Puyo					
Concentración	% de inhibición de DPPH				
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	CI <sub>50</sub>
<b>1000</b>	93,40	90,57	91,32	91,76	112,12
<b>750</b>	89,06	88,49	89,62	89,06	
<b>500</b>	74,53	74,72	74,34	74,53	
<b>250</b>	56,60	56,79	56,42	56,60	
<b>100</b>	50,19	50,00	49,62	49,94	
<b>50</b>	43,21	43,77	43,02	43,33	

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 23.** Porcentaje de inhibición de DPPH, muestra de la ciudad de Puyo.

Con el promedio de las tres repeticiones se construyó la curva de porcentaje de inhibición de DPPH (figura 23) y con la ecuación de la recta se calculó la  $CI_{50}$ . De acuerdo con los resultados, a una concentración de 1000 ppm del EHA de la ciudad de Puyo se presenta el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH de 91,76% con un  $CI_{50}$  de 112,12 ppm.

#### Análisis estadístico

**Tabla 45.** Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. EHA ciudad de Puyo.

RESUMEN	PUYO	BHT	Total
<b>1000</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	275,283	251,132	526,415
Promedio	91,761	83,711	87,736
Varianza	2,148	0,581	20,534
<b>750</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	267,170	211,509	478,679
Promedio	89,057	70,503	79,780
Varianza	0,320	0,439	103,573
<b>500</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	223,585	156,038	379,623
Promedio	74,528	52,013	63,270
Varianza	0,036	0,439	152,277

<b>250</b>			
<b>Cuenta</b>	3	3	6
<b>Suma</b>	169,811	115,283	285,094
<b>Promedio</b>	56,604	38,428	47,516
<b>Varianza</b>	0,036	0,439	99,301
<b>100</b>			
<b>Cuenta</b>	3	3	6
<b>Suma</b>	149,811	72,075	221,887
<b>Promedio</b>	49,937	24,025	36,981
<b>Varianza</b>	0,083	0,439	201,638
<b>50</b>			
<b>Cuenta</b>	3	3	6
<b>Suma</b>	130,000	57,547	187,547
<b>Promedio</b>	43,333	19,182	31,258
<b>Varianza</b>	0,154	0,617	175,289
<b>Total</b>			
<b>Cuenta</b>	18	18	
<b>Suma</b>	1215,660	863,585	
<b>Promedio</b>	67,537	47,977	
<b>Varianza</b>	373,365	581,751	

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Muestra</b>	15917,167	5	3183,433	6665,042	6,991E-37	2,621
<b>Columnas</b>	3443,254	1	3443,254	7209,019	2,875E-31	4,260
<b>Interacción</b>	308,342	5	61,668	129,113	1,551E-16	2,621
<b>Dentro del grupo</b>	11,463	24	0,478			
<b>Total</b>	19680,226	35				

Elaborado por Arias Mishel

Mediante el análisis del diseño factorial con dos factores (tabla 45) se comprueba estadísticamente que existe una diferencia significativa entre el EHA de la ciudad de Puyo (provincia de Pastaza y el estándar BHT ya que la F experimental es mayor que la F tabulada, razón por la que se puede decir que no se comportan de la misma manera al momento de inhibir al radical DPPH. Esto se debe a que el EHA de Puyo en todas las concentraciones ensayadas posee valores para el porcentaje de inhibición de DPPH más altos que los del estándar BHT.

**Tabla 46.** Resultados de la absorbancia del EHA de un PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L. comercializado en el Ecuador para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH.

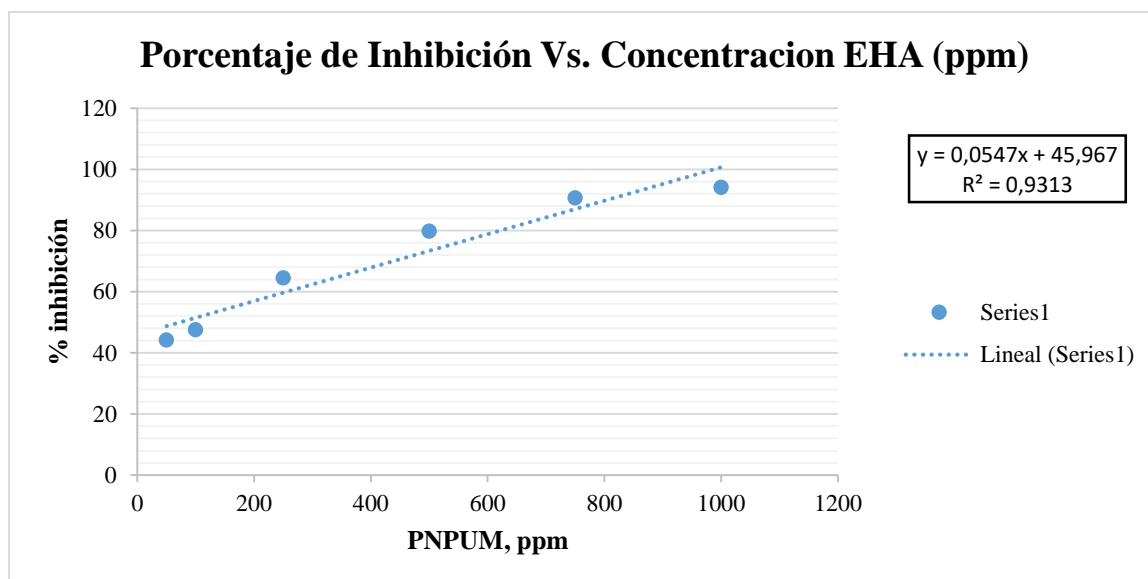
<i>Psidium guajava</i> L. PNPUM			
Concentración	Absorbancia		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1000	0,159	0,175	0,180
750	0,168	0,165	0,167
500	0,207	0,210	0,204
250	0,238	0,233	0,240
100	0,321	0,311	0,335
50	0,337	0,339	0,331

Elaborado por Arias Mishel

**Tabla 47.** Porcentaje de inhibición y CI<sub>50</sub> del EHA de un PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L. comercializado en el Ecuador.

<i>Psidium guajava</i> L. PNPUM					
Concentración	% de inhibición de DPPH				CI <sub>50</sub>
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	
1000	96,42	93,40	92,45	94,09	73,73
750	90,38	90,94	90,57	90,63	
500	79,81	79,25	80,38	79,81	
250	64,34	65,28	63,96	64,53	
100	47,74	49,62	45,09	47,48	
50	43,96	43,58	45,09	44,21	

Elaborado por Arias Mishel



Elaborado por Arias Mishel

**Figura 24.** Porcentaje de inhibición de DPPH, muestra del PNPUM.

Con el promedio de las tres repeticiones se construyó la curva de porcentaje de inhibición de DPPH (figura 24) y con la ecuación de la recta se calculó la CI<sub>50</sub>. De acuerdo con

los resultados, a una concentración de 1000 ppm del EHA del PNPUM se presenta el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH de 94,04% con un  $CI_{50}$  de 73,73 ppm.

### Análisis estadístico

**Tabla 48.** Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. EHA, PNPUM a base del extracto de hojas de *Psidium guajava* L. comercializado en el Ecuador.

RESUMEN	PNPUM	BHT	Total
<b>1000</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	282,264	251,132	533,396
Promedio	94,088	83,711	88,899
Varianza	4,284	0,581	34,253
<b>750</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	271,887	211,509	483,396
Promedio	90,629	70,503	80,566
Varianza	0,083	0,439	121,723
<b>500</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	239,434	156,038	395,472
Promedio	79,811	52,013	65,912
Varianza	0,320	0,439	232,135
<b>250</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	193,585	115,283	308,868
Promedio	64,528	38,428	51,478
Varianza	0,463	0,439	204,734
<b>100</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	142,453	72,075	214,528
Promedio	47,484	24,025	35,755
Varianza	5,174	0,439	167,344
<b>50</b>			
Cuenta	3	3	6
Suma	132,642	57,547	190,189
Promedio	44,214	19,182	31,698
Varianza	0,617	0,617	188,466
<b>Total</b>			
Cuenta	18	18	
Suma	1262,264	863,585	
Promedio	70,126	47,977	
Varianza	407,836	581,751	

## ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Muestra</b>	16494,855	5	3298,971	2848,891	1,856E-32	2,621
<b>Columnas</b>	4415,143	1	4415,143	3812,783	5,801E-28	4,260
<b>Interacción Dentro del grupo</b>	300,337	5	60,067	51,872	4,374E-12	2,621
	27,792	24	1,158			
<b>Total</b>	21238,126	35				

Elaborado por Arias Mishel

Mediante el análisis del diseño factorial con dos factores (tabla 48) se comprueba estadísticamente que existe una diferencia significativa entre el EHA del PNPUM y el estándar BHT ya que la F experimental es mayor que la F tabulada, razón por la que se puede decir que no se comportan de la misma manera al momento de inhibir al radical DPPH. Esto se debe a que el EHA del PNPUM en todas las concentraciones ensayadas posee valores para el porcentaje de inhibición de DPPH más altos que los del estándar BHT.

### Análisis estadístico.

**Tabla 49.** Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. Comparación entre muestras.

RESUMEN	QUININDÉ	IBARRA	PUYO	PNPUM	Total
<b>1000</b>					
<b>Cuenta</b>	3	3	3	3	12
<b>Suma</b>	290,189	283,019	275,283	282,264	1130,755
<b>Promedio</b>	96,730	94,340	91,761	94,088	94,230
<b>Varianza</b>	3,180	0,249	2,148	4,284	5,168
<b>750</b>					
<b>Cuenta</b>	3	3	3	3	12
<b>Suma</b>	278,302	273,396	267,170	271,887	1090,755
<b>Promedio</b>	92,767	91,132	89,057	90,629	90,896
<b>Varianza</b>	0,368	0,036	0,320	0,083	2,059
<b>500</b>					
<b>Cuenta</b>	3	3	3	3	12
<b>Suma</b>	250,566	248,302	223,585	239,434	961,887
<b>Promedio</b>	83,522	82,767	74,528	79,811	80,157
<b>Varianza</b>	0,047	0,083	0,036	0,320	13,708

**250**

<b>Cuenta</b>	3	3	3	3	12
<b>Suma</b>	196,038	185,660	169,811	193,585	745,094
<b>Promedio</b>	65,346	61,887	56,604	64,528	62,091
<b>Varianza</b>	0,724	0,036	0,036	0,463	12,961

**100**

<b>Cuenta</b>	3	3	3	3	12
<b>Suma</b>	158,491	156,981	149,811	142,453	607,736
<b>Promedio</b>	52,830	52,327	49,937	47,484	50,645
<b>Varianza</b>	0,249	0,190	0,083	5,174	5,971

**50**

<b>Cuenta</b>	3	3	3	3	12
<b>Suma</b>	145,660	144,340	130,000	132,642	552,642
<b>Promedio</b>	48,553	48,113	43,333	44,214	46,053
<b>Varianza</b>	0,439	0,036	0,154	0,617	6,029

**Total**

<b>Cuenta</b>	18	18	18	18	
<b>Suma</b>	1319,245	1291,698	1215,660	1262,264	
<b>Promedio</b>	73,291	71,761	67,537	70,126	
<b>Varianza</b>	375,956	360,174	373,365	407,836	

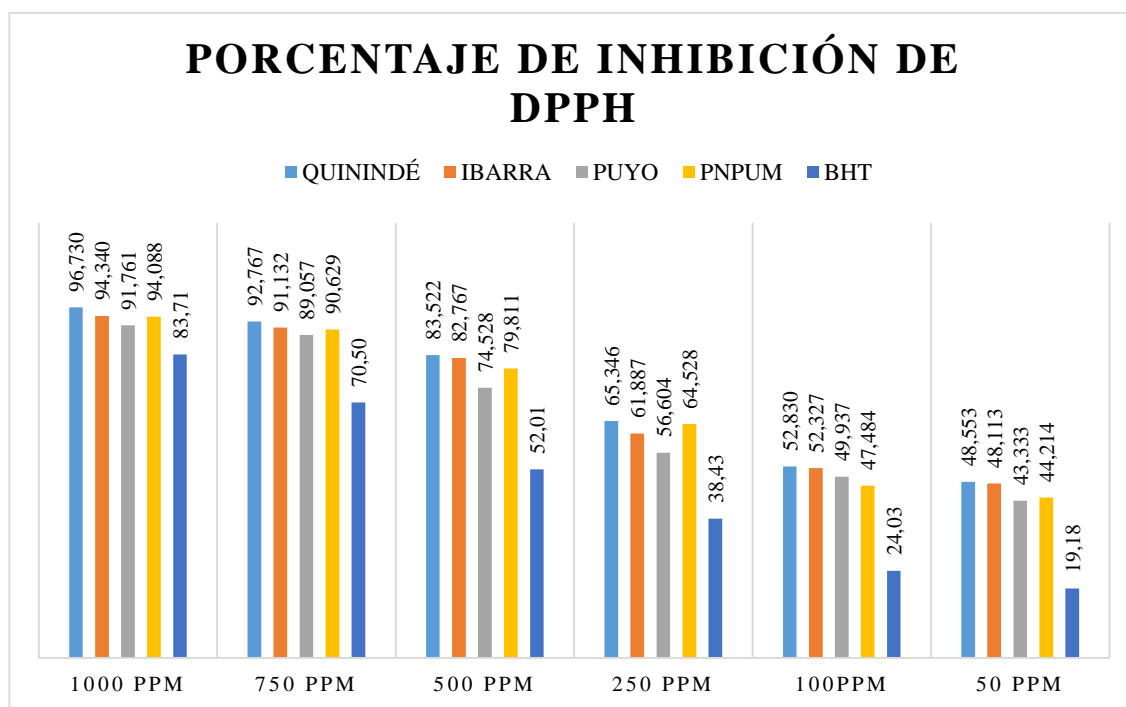
**ANÁLISIS DE VARIANZA**

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Valor crítico para F</b>
<b>Muestra</b>	25616,936	5	5123,387	6353,126	1,844E-66	2,409
<b>Columnas</b>	327,160	3	109,053	135,229	2,059E-23	2,798
<b>Interacción</b>	138,993	15	9,266	11,490	3,599E-11	1,880
<b>Dentro del grupo</b>	38,709	48	0,806			
<b>Total</b>	26121,798	71				

Elaborado por Arias Mishel

Mediante el análisis del diseño factorial con dos factores (tabla 49) se comprueba estadísticamente que existe una diferencia significativa entre los EHA de todas las localidades ya que la F experimental es mayor que la F tabulada, razón por la que se puede decir que no se comportan de la misma manera al momento de inhibir al radical DPPH.





Elaborado por Arias Mishel

**Figura 25.** Porcentajes de inhibición del radical DPPH, con diferentes muestras y concentraciones frente al estándar BHT.

De los resultados obtenidos se observa en la tabla 49 y la figura 25 que el EHA correspondiente a la ciudad de Quinindé (provincia de Esmeraldas) a una concentración de 1000 ppm presenta una mayor actividad antioxidante representada como porcentaje de inhibición del radical DPPH (96,73%) y a su vez presenta un  $CI_{50}$  (0,87 ppm), lo que significa que a esta concentración el EHA es capaz de inhibir el 50% de radical DPPH. A su vez la muestra de Puyo presenta un menor porcentaje de inhibición del radical DPPH (91,76 %) y el menor  $CI_{50}$  de todas las muestras ensayadas (112,12 ppm). Es válido mencionar que la muestra de la ciudad de Quinindé fue la que presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos, y es la muestra que está expuesta a un mayor estrés ambiental definido por una alta humedad que las muestras de las ciudades restantes.

El PNPUM presenta un porcentaje de inhibición del radical DPPH (94,09%) y un  $CI_{50}$  (73,73 ppm).

Los resultados muestran que todos los extractos fueron capaces de captar al radical DPPH y al presentarse una correlación positiva se dice que hay una dependencia total entre las dos variables, ya que el porcentaje de inhibición del radical DPPH es directamente proporcional a la concentración del EHA ensayada. Además, según el estudio de Seo et al. (2014) se determinó que los extractos hidroalcohólicos Etanol 96%-Agua (50:50 V/V) de las hojas de *Psidium guajava* L., a una concentración de 1000 ppm tienen un porcentaje de inhibición de DPPH de 95,68 %, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para las muestras de las tres ubicaciones geográficas del Ecuador.

## Capítulo V

### 5. Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1. Conclusiones

- Los extractos hidroalcohólicos preparados a partir de las hojas de *Psidium guajava* L., son una fuente de antioxidantes naturales ya que mostraron una buena capacidad de captación de radicales libres, incluso mayor que el antioxidante sintético butil hidroxitolueno.
- Las especies vegetales se recolectaron en Quinindé (Provincia de Esmeraldas), Ibarra (Provincia de Imbabura) y en Puyo (Provincia de Pastaza), Ecuador. Las identificaciones taxonómicas se realizaron en el Herbario Alfredo Paredes (QAP), en el cual se verificaron que las especies corresponde a *Psidium guajava* L.
- Las muestras cumplen con los parámetros de calidad evaluados, los cuales son establecidos por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria ANVISA y por la monografía aceptada por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria ARCSA para la especie vegetal *Psidium guajava* L.
- El PNPUM a base de extracto de hojas de *Psidium guajava* L. cumple con los parámetros de calidad para formas farmacéuticas sólidas establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos de América USP-NF.
- En la preparación de los EHA, Etanol 96%-Agua (50:50, V/V), la muestra de la ciudad de Ibarra tuvo el mayor rendimiento (22,83%) y la de la ciudad del Puyo resultó ser la de menor rendimiento (9,86%). El porcentaje de rendimiento del EHA del PNPUM fue de 8,57%.
- El perfil cromatográfico de los EHA, Etanol 96%-Agua (50:50, V/V) mostró la presencia de flavonoides y fenoles de acuerdo a los estándares de quercetina (RF= 0,65) y ácido gálico (RF= 0,88).
- El tamizaje fitoquímico realizado en los tres extractos hidroalcohólicos de las especies de las tres zonas geográficas poseen similares características, presencia abundante de taninos, saponinas y fenoles y ausencia total de alcaloides.
- La muestra recolectada en Quinindé presentó el mayor contenido fenoles totales ( $6,435 \pm 0,123$  mg GAE/g EHA) de acuerdo al método colorimétrico de Folin- Ciocalteu y la muestra de la ciudad de Ibarra posee el mayor contenido de flavonoides totales ( $1,809 \pm 0,015$  mg QE/g EHA) de acuerdo método colorimétrico del aluminio.
- La muestra de la ciudad de Quinindé resultó poseer una mejor inhibición del radical DPPH que el estándar BHT, por lo tanto, tiene la mejor actividad antioxidante de todas las muestras a una concentración de 1000 ppm con un porcentaje de inhibición de

96,73% y un  $CI_{50}$  de 0,87 ppm. La muestra de la ciudad de Puyo presentó la menor actividad antioxidante de las muestras analizadas con un porcentaje de inhibición de DPPH de 91,76% y un  $CI_{50}$  de 112,12 ppm.

## 5.2. Recomendaciones

- Evaluar la actividad antioxidante de las otras partes aéreas (ramas, frutos, flores) de la especie vegetal *Psidium guajava* L., tomando en cuenta el aspecto farmacogeográfico.
- Comprobada la actividad antioxidante de las hojas de *Psidium guajava* L. se recomienda realizar estudios adicionales para evaluar otras actividades biológicas potenciales.
- Evaluar la estabilidad de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a corto y largo plazo para un posterior análisis de reemplazo de los antioxidantes sintéticos, así como de sus posibles aplicaciones industriales.
- Ampliar el estudio de evaluación de actividad antioxidante a otras variedades de guayaba cultivadas en el Ecuador.

## Referencias bibliográficas

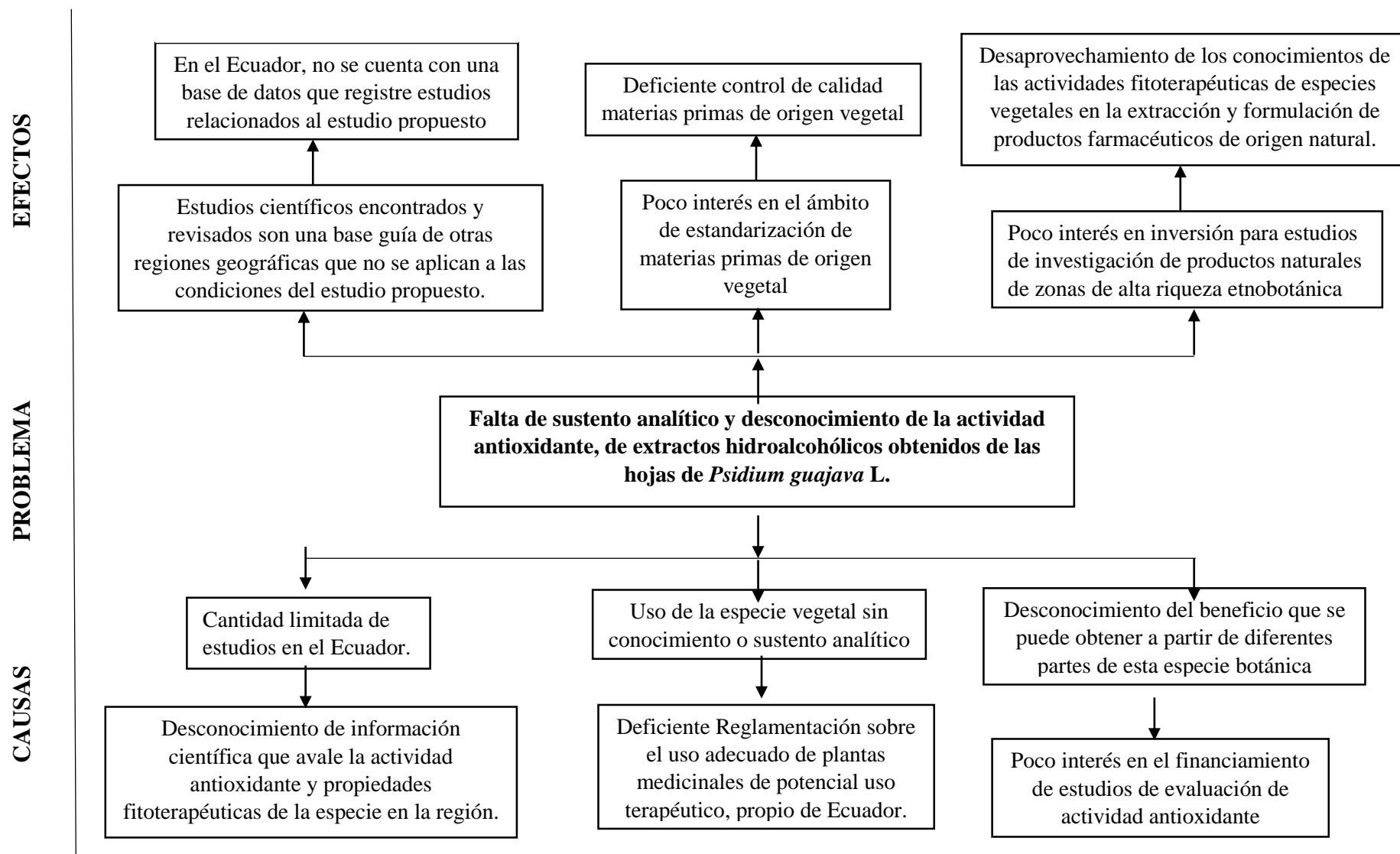
- Adhikari, & Kandel. (2015). Effect of Time and Level of Pruning on Vegetative Growth, Flowering, Yield, and Quality of Guava. *International Journal of Fruit Science*, 1-12.
- Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria, ARCSA. (28 de Noviembre de 2016). *Normativa sanitaria para la obtención del Registro Sanitario*. Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- ANVISA. (2010). *Farmacopeia Brasileira* (Vol. I). Brasilia, Brasil.
- Areal, & Bessa. (1966). La Cromatografía de capa fina y sus aplicaciones al campo textil. 6-26.
- Ávalos-García, & Pérez-Urria. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal*, 119-145.
- Bi, J., Liu, J., Zhou, M., Wu, X., & Chen, Q. (10 de 04 de 2018). Determination of Phenolic Compounds and Antioxidant Activities from Peel, Flesh, Seed of Guava (*Psidium guajava* L.). *Electrophoresis journal*, 1- 32.
- BioLeaf-Foliar Analysis. (19 de Febrero de 2018). <http://bioleaf.icmc.usp.br/>. Obtenido de [https://play.google.com/store/apps/details?id=upvision.bioleaf&hl=es\\_EC](https://play.google.com/store/apps/details?id=upvision.bioleaf&hl=es_EC)
- Bruhn, J., & Bohlin, L. (1997). Molecular pharmacognosy: an explanatory model. *Drug Discovery Today*, II, 243-246.
- Calderón, Soto, Calderón, & Fundora. (2009). Estimación de área foliar en posturas de mango (*Mangifera indica* L.) y aguacatero (*Persea spp*) en fase de vivero a partir de las medidas lineales de las hojas. *Cultivos tropicales*, 43-48.
- Carballo, C., Alfaro, T., Palazón, Z., Ramos, R., Rodríguez, C., Cabezas, C., . . . Reyes, M. (06 de Diciembre de 2002). Desinfección química de plantas medicinales II. *Plantago lanceolata* L. *Revista cubana de plantas medicinales*, 131- 134.
- Cazares-Sánchez, Nuñez-Colín, Domínguez-Álvarez, Luna-Morales, Martínez, R., & Seguraa-Ledesma. (2010). Potential Biogeographic Distribution of Guava (*Psidium guajava* L.) in Mexico. 55-62. Recuperado el 9 de Octubre de 2018
- Chetri, Sanyal, & Kar. (1999). Changes in nutrient element composition of guava leaves in relation to season, cultivar, direction of shoot, and zone of leaf sampling. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 121-128.
- CONABIO. (s.f.). [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx). Obtenido de [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/52-myrt3m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/52-myrt3m.pdf)
- Cordell, G. (2017). Foreword. En S. Badal, & R. Delgoda, *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*.
- Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., & Rodríguez-Landa, J. F. (2004). Farmacognosia: breve historia

- de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *BIOMED*, 123-136. Obtenido de <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb041527.pdf>
- Cuesta, Márquez, & Campo. (2015). *Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides*. Machala, Ecuador: UTMACH.
- de la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador* (Primera ed.). Quito, Ecuador.
- Elufioye, & Badal. (2017). Background to Pharmacognosy. En R. D. Simone Badal McCreath, *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies* (págs. 3-12).
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (s.f.). *Métodos Generales de Análisis* (Segunda ed.). Mexico.
- Fried, R. (2014). The Polyphenolic Antioxidant Resveratrol, the Carotinoid Lycopene, and the Proanthocyanidin Pycnogenol. En R. Fried, *Erectile Dysfunction as a Cardiovascular Impairment* (págs. 259-251).
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu*. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos.
- Gayathri, V., & Kiruba, D. (2014). Preliminary Phytochemical Analysis of Leaf Powder Extracts of *Psidium guajava* L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 332-334.
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 57-60.
- Gull, Sultana, Anwar, Naseer, Ashraf, & Ashrafuzzaman. (2012). Variation in Antioxidant Attributes at Three Ripening Stages of Guava (*Psidium guajava* L.) Fruit from Different Geographical Regions of Pakistan. *Molecules*, 3165- 3180.
- INTAGRI. (2016). Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/cereales/el-indice-de-area-foliar-iaf>
- Iqbal, E., Abu Salim, K., & Lim, L. (14 de febrero de 2015). Phytochemical screening, total phenolic and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) form Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University- Science*, 224-232.
- Jørgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*.
- Kaneria, M., & Chanda, S. (Julio de 2011). Phytochemical and Pharmacognostic Evaluation of Leaves of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). *Pharmacognosy Journal*, 3(23), 41-45.
- Kawasaki, L., Holst, B., & Bazante, G. (20 de Junio de 2011). Familia Myrtaceae. En S. León-Yáñez, R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa, & H. Navarrete, *Libro rojo de plantas endémicas del Ecuador* (Segunda ed.). Quito, Ecuador. Obtenido de Flora web: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500315>

- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (Segunda ed.). Quito, Ecuador.
- Leos-Rivas, Rivas-Morales, & García-Hernández. (2015). *Investigación en plantas de importancia médica*. Nuevo León, Mexico: Omnia Science.
- Mettler Toledo. (s.f.). *www.mt.com*. Obtenido de [https://www.mt.com/int/es/home/products/Laboratory\\_Weighing\\_Solutions/moisture-analyzer.html#custom4](https://www.mt.com/int/es/home/products/Laboratory_Weighing_Solutions/moisture-analyzer.html#custom4)
- Metwally, A. M., Omar, A. A., Ghazy, N. M., Harraz, F. M., & Sohafy, S. M. (Abril de 2011). Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy Journal*.
- National Center for Biotechnology Information. (s.f.). *PubChem*. Obtenido de pubchem.ncbi.nlm.nih.gov: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox>
- Olaya, J., & Restrepo, P. (2012). Estudio del contenido de fenoles y actividad antioxidante de guayaba en diferentes estados de madurez. *Acta Biológica Colombiana*, XVII(3), 611-624.
- Organización Mundial de la Salud. (1998). *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). *Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales*.
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014- 2023*. Obtenido de <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- Ortíz, Aguilera, Jorge, Guzmán, Cobo, & Bravo. (2016). Desarrollo y validación de Técnicas Espectrofotométricas para la determinación de Flavonoides totales, basada en Quercetina, en las hojas de *Psidium guajava* L. *Revista Amazónica de Ciencia y Tecnología*, V(3), 276- 288.
- Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo. (2014). PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD. *Revista Boliviana de Química*, 68- 81.
- Pérez-Pérez, Ettiene, Marín, Casassa-Padron, Silva, Raga, . . . Medina. (2014). Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Facultad Agronomía LUZ*, 60-67.
- Pinho, A. I., Oliveira, C. S., Lovato, F. L., Waczuk, E. P., Piccoli, B. C., Boligon, A. A., . . . Lui, J. (11 de Octubre de 2017). Antioxidant and mercury chelating activity of *Psidium guajava* var. pomifera L. leaves hydroalcoholic extract. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1- 12.
- Rajan, Yadava, Kumar, & Saxena. (2007). GIS Based Diversity Analysis of Guava Growing Distribution in Uttar. *International Society for Horticultural Science*, 109- 114. Recuperado el 9 de Octubre de 2018, de [https://www.ishs.org/ishs-article/735\\_14](https://www.ishs.org/ishs-article/735_14)
- Rasool, H. A. (2012). Medicinal Plants (Importance and Uses). *Pharmaceutica Analytica Acta*.

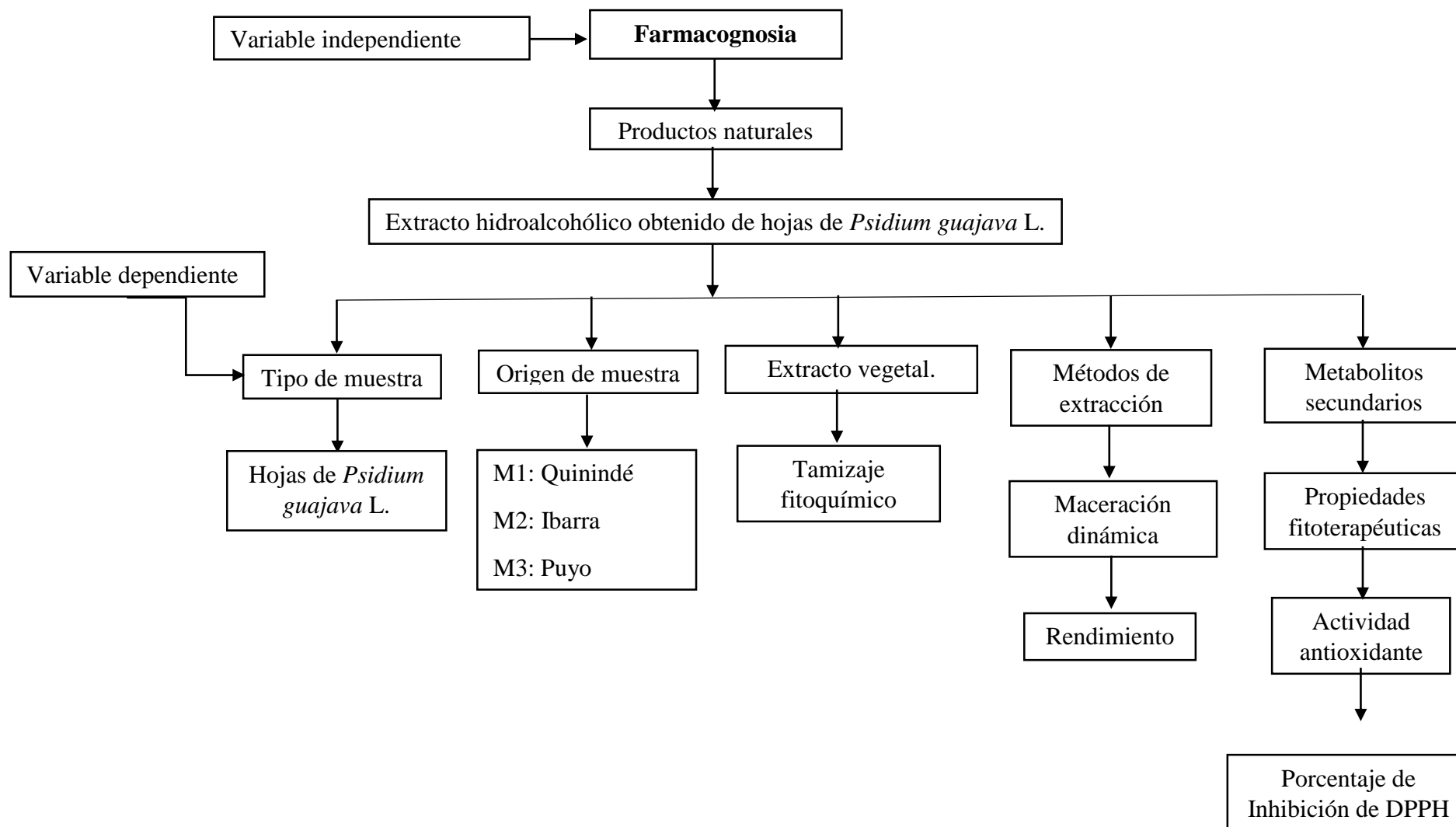
- Rathore. (27 de Noviembre de 2015). Effect of Season on the Growth and Chemical Composition of Guava (*Psidium Guajava* L.) Fruits. *Journal of Horticultural Science*, 41.17.
- Ravelo, Á. G., & Braun, A. E. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. xxi. *Revista Académica de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 409- 419. Obtenido de <http://www.rac.es/ficheros/doc/00899.pdf>
- Rojas-Garbanzo, C., Gleichenhagen, M., Heller, A., Esquivel, P., Schulze-Kaysers, N., & Schieber, A. (18 de Marzo de 2017). Carotenoid profile, antioxidant capacity, and chromoplasts of pink guava (*Psidium guajava* L. cv. 'Criolla') during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1- 50.
- Rowe, R., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipient* (Sexta ed.).
- Seo, J., Lee, S., Elam, M., Johnson, S., Jonghoon, K., & Arjmandi, B. (12 de Diciembre de 2013). Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. *Food, Science and Nutrition*, 174-180.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá.
- Skoog, West, & Holler. (2001). *Fundamentos de Química Analítica* (Cuarta ed.). Reverté S.A.
- Soares, L., Bassani, V., Gonzáles, G., & Petrovick, P. (2003). Total Flavonoid Determination for the Quality Control of Aqueous Extractives from *Phyllanthus niruri* L. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(3), 203-207.
- The United States Pharmacopeial Convention. (2016). *Farmacopea de los Estados Unidos de América* (Trigesimo Novena ed.).
- Tyler, V., Brady, L., & Robbers, J. (2003). *Pharmacognosy* (Novena ed.).
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). *Técnicas Cromatográficas*. Obtenido de [depa.fquim.unam.mx](http://depa.fquim.unam.mx):  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- Wang, L., Wu, Y., Bei, Q., Shi, K., & Wu, Z. (28 de Julio de 2017). Fingerprint profiles of flavonoid compounds from different *Psidium guajava* leaves and their antioxidant activities. *Journal Of Separation Sciencie*, 1- 13.
- Wang, L., Wu, Y., Huang, T., Shi, K., & Wu, Z. (15 de Junio de 2017). Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves from different geographic regions in China. *Chemistry & Biodiversity*, 1- 33. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.201700114>
- Yepes, A., & Silveira, M. (2011). Respuesta de las plantas ante los factores ambientales del cambio climático global. *Colombia Forestal*, XIV(2), 213-232. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4239/423939616005.pdf>

## Anexo A. Árbol de problemas.

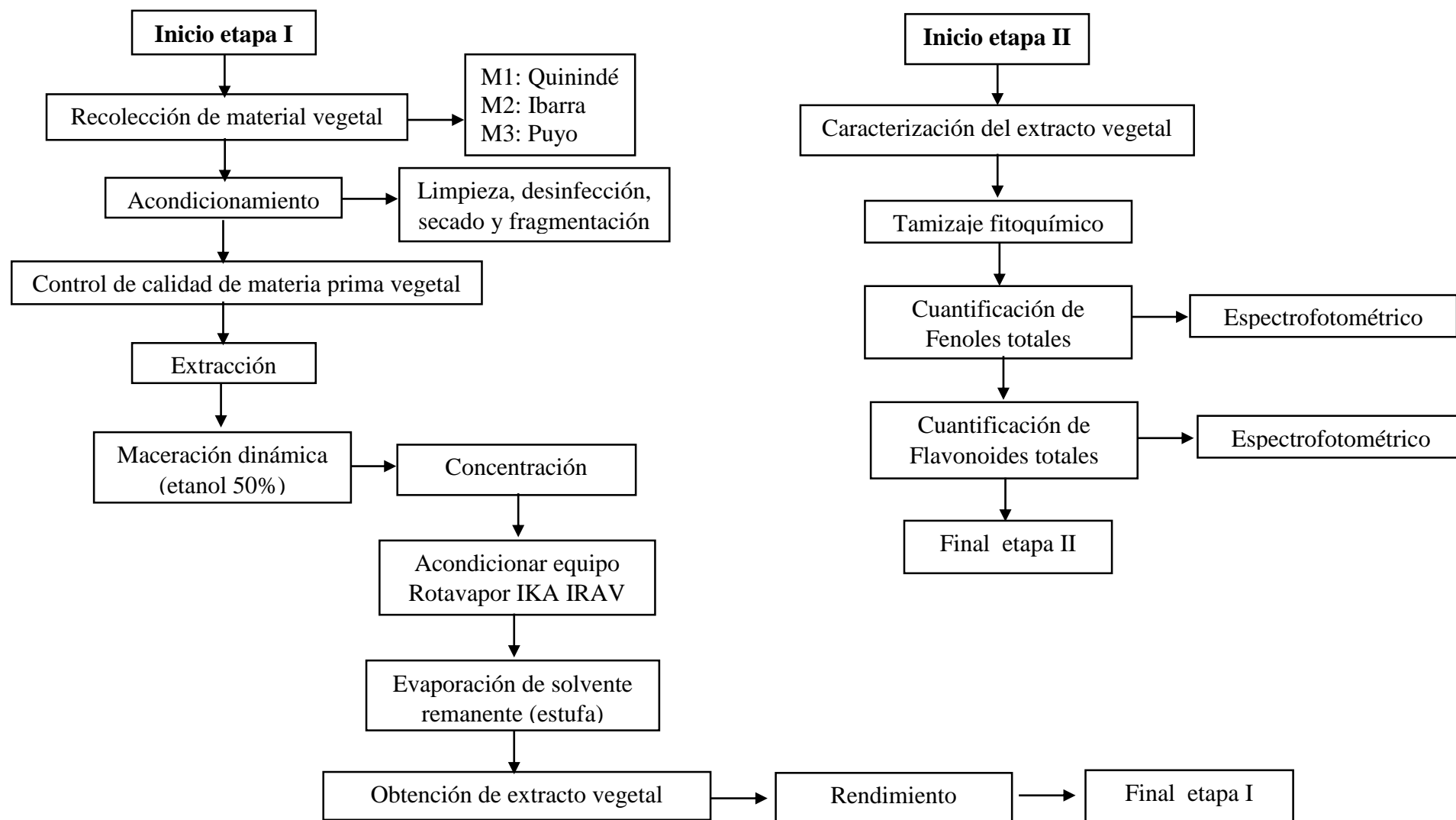


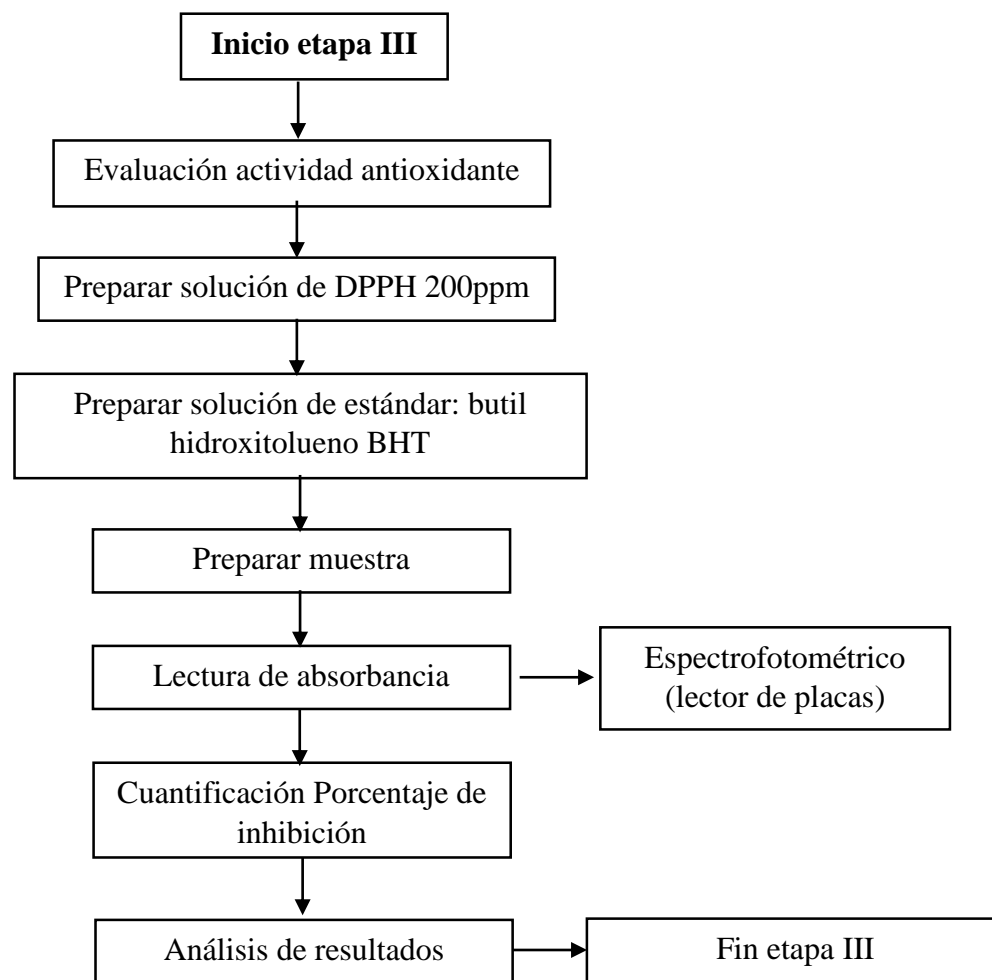


## Anexo B. Categorización de las variables



**Anexo C.** Diagrama de flujo para la metodología planteada







**Anexo D.** Matriz de Operalización de Variables.

<b>Objetivo general</b>			
Evaluar la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.			
<b>Objetivo específico 1:</b>	Recolectar e identificar taxonómicamente la especie vegetal <i>Psidium guajava</i> L.		
<b>Objetivo específico 2:</b>	Obtener el extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie <i>Psidium guajava</i> L. mediante la aplicación de la técnica de maceración dinámica.		
<b>Variable</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Nivel</b>	<b>Indicador</b>
Recolección	Ubicación geográfica	Características organolépticas	- Olor - Color - Textura
Método de extracción	Maceración dinámica		Rendimiento
Control de calidad	- Determinación de cenizas totales - Determinación de cenizas insolubles en HCl 3M - Determinación de humedad (LOD)	Características fenológicas	- Porcentaje de cenizas totales - Porcentaje de cenizas insolubles en HCl 3 M - Porcentaje de humedad (% MC)
<b>Objetivo específico 3:</b>	Realizar la caracterización fitoquímica del extracto vegetal de hojas de <i>Psidium guajava</i> L.		
Tamizaje fitoquímico	- Reacciones cualitativas - Cromatografía en capa fina (CCF)	Composición fitoquímica	- Presencia o ausencia de compuestos químicos - Factores de retención (RF)
Cuantificación de metabolitos secundarios	- Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu - Método colorimétrico del aluminio	Cuantificación de compuestos químicos de interés	- Fenoles: mg GAE / g EHA - Flavonoides: mg QE / g EHA
<b>Objetivo específico 4:</b>	Evaluar la actividad antioxidante en el extracto vegetal de las hojas de la especie <i>Psidium guajava</i> L.		
Actividad antioxidante	Método del radical DPPH	- Extracto vegetal hidroalcohólico - Extracto hidroalcohólico del PNPUM - Estándar butil hidroxitolueno (BHT) - Concentraciones evaluadas	- Porcentaje de inhibición, capacidad de captación de radicales libres. - Concentración media inhibitoria (CI <sub>50</sub> )

**Anexo E.** Instrumentos de recolección de datos.

	<b>UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS</b>		
	<b>GUÍA DE OBSERVACIÓN</b>	<b>ETAPA : 1</b>	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**

**Determinación de dimensiones de la lámina foliar.**

Localidad	Quinindé			Ibarra			Puyo		
Número de hoja	Largo, cm	Ancho, cm	Pecíolo, cm	Largo, cm	Ancho, cm	Pecíolo, cm	Largo, cm	Ancho, cm	Pecíolo, cm
<b>Promedio</b>									

Elaborado por Arias Mishel

**Observaciones:**

.....  
 .....  
 .....



**Características organolépticas de las hojas de *Psidium guajava* L. de diferente ubicación geográfica del Ecuador.**

Parámetro	Especificación	Localidad		
		Quinindé	Ibarra	Puyo
<b>Color</b>	La lámina del haz es glabrescente, de color verde brillante y con un envés verde pálido.			
<b>Olor</b>	Característico			
<b>Sabor</b>	Ligeramente astringente			

Elaborado por Arias Mishel

**Observaciones:**

.....  
 .....  
 .....

	<b>UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS</b>		
	<b>GUÍA DE OBSERVACIÓN</b>	<b>ETAPA : 1</b>	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**

**Área foliar.**

Número de hoja	Muestra Quinindé	Muestra Ibarra	Muestra Puyo
<b>Promedio</b>			

Elaborado por Arias Mishel

**Observaciones:**

.....  
 .....  
 .....



**Porcentaje de defoliación.**

Número de hoja	Muestra Quinindé	Muestra Ibarra	Muestra Puyo
<b>Promedio</b>			

Elaborado por Arias Mishel

**Observaciones:**

.....  
 .....  
 .....

	<b>UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS</b>		
	<b>GUÍA DE OBSERVACIÓN</b>	<b>ETAPA : 1</b>	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**



**Evaluación de contenido de humedad.**

<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé		
Número de muestra	Peso muestra (g)	Humedad (% MC)
Muestra 1		
Muestra 2		
Muestra 3		
Promedio		
<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra		
Número de muestra	Peso muestra (g)	Humedad (% MC)
Muestra 1		
Muestra 2		
Muestra 3		
Promedio		
<i>Psidium guajava</i> L. Puyo		
Número de muestra	Peso muestra (g)	Humedad (% MC)
Muestra 1		
Muestra 2		
Muestra 3		
Promedio		

Elaborado por Arias Mishel

**Observaciones:**

.....  
.....  
.....

	UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS		
	GUÍA DE OBSERVACIÓN	ETAPA : 1	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**

**Evaluación de contenido de Cenizas totales.**



<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé				
Número de muestra	Peso crisol vacío (g)	Peso crisol + muestra (g)	Peso crisol + cenizas (g)	Porcentaje de cenizas totales (%)
Muestra 1				
Muestra 2				
Promedio				
<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra				
Número de muestra	Peso crisol vacío (g)	Peso crisol + muestra (g)	Peso crisol + cenizas (g)	Porcentaje de cenizas totales (%)
Muestra 1				
Muestra 2				
Promedio				
<i>Psidium guajava</i> L. Puyo				
Número de muestra	Peso crisol vacío (g)	Peso crisol + muestra (g)	Peso crisol + cenizas (g)	Porcentaje de cenizas totales (%)
Muestra 1				
Muestra 2				
Promedio				

Elaborado por Arias Mishel

**Observaciones:**

.....  
 .....  
 .....



	UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS		
	GUÍA DE OBSERVACIÓN	ETAPA : 1	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**



**Evaluación de contenido de Cenizas insolubles en ácido.**

<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé				
Número de muestra	Peso crisol vacío (g)	Volumen de HCl 3M (mL)	Peso crisol + cenizas insolubles en ácido (g)	Porcentaje de cenizas insolubles en ácido (%)
Muestra 1				
Muestra 2				
Promedio				
<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra				
Número de muestra	Peso crisol vacío (g)	Volumen de HCl 3M (mL)	Peso crisol + cenizas insolubles en ácido (g)	Porcentaje de cenizas insolubles en ácido (%)
Muestra 1				
Muestra 2				
Promedio				
<i>Psidium guajava</i> L. Puyo				
Número de muestra	Peso crisol vacío (g)	Volumen de HCl 3M (mL)	Peso crisol + cenizas insolubles en ácido (g)	Porcentaje de cenizas insolubles en ácido (%)
Muestra 1				
Muestra 2				
Promedio				

Elaborado por Arias Mishel

**Observaciones:**

.....

	<b>UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS</b>		
	<b>GUÍA DE OBSERVACIÓN</b>	<b>ETAPA : 1</b>	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**

**Extracción por maceración dinámica.**

**Muestra:**



Condiciones de extracción								
Localidad	Quinindé		Ibarra		Puyo		PNPUM	
Peso inicial de la muestra (g)								
Volumen de solvente (mL)	Día 1		Día 1		Día 1		Día 1	
	Día 2		Día 2		Día 2		Día 2	
	Día 3		Día 3		Día 3		Día 3	
Peso del extracto final (g)								
Porcentaje de rendimiento (%)								
Características organolépticas								
Color								
Olor								
Textura								

Elaborado por Arias Mishel

**Observaciones:**

.....

.....

	<b>UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS</b>		
	<b>GUÍA DE OBSERVACIÓN</b>	<b>ETAPA : 1</b>	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**

**Control de calidad de formas farmacéuticas sólidas del Producto Natural  
Procesado de Uso Medicinal (PNPUM) a base de extracto de *Psidium guajava* L.**

**1. Uniformidad de unidades de dosificación.**

Número de comprimido	Peso, g
$\bar{X} \pm \delta$	

Elaborado por Arias Mishel

**2. Friabilidad de los comprimidos del PNPUM a base de *Psidium guajava* L.**

**Peso inicial,  $W_0$  :**

**Peso final,  $W_f$ :**

$$\%f = \frac{W_0 - W_f}{W_0} * 100$$

**3. Fuerza de ruptura.**

Número	Fuerza de ruptura, Kgf
--------	------------------------



$\bar{X} \pm \delta$	

Elaborado por Arias Mishel

#### 4. Desintegración

No. Comprimido	Tiempo, Min	Especificación
		<b>Menor a 30 minutos</b>

Elaborado por Arias Mishel

	UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS		
	GUÍA DE OBSERVACIÓN	ETAPA : 2	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**

**Perfil cromatográfico:** Identificación de fenoles

**Estándar:** ácido gálico

**Fase móvil:** Acetato de etilo-Tolueno (7:3)

<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé				
Solvente de extracción	Acetona	Hexano	Diclorometano	Etanol (50%)
Recorrido de la fase móvil, cm				
Factor de retención, R <sub>f</sub>				
<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra				
Recorrido de la fase móvil, cm				
Factor de retención, R <sub>f</sub>				
<i>Psidium guajava</i> L. Puyo				
Recorrido de la fase móvil, cm				
Factor de retención, R <sub>f</sub>				
Producto Natural Procesado de Uso Medicinal (PNPUM)				
Recorrido de la fase móvil, cm				
Factor de retención, R <sub>f</sub>				

Elaborado por Arias Mishel



**Perfil cromatográfico:** Identificación de flavonoides

**Estándar:** quercetina

**Fase móvil:** Acetato de etilo-Metanol- Agua (100:13,5:10)

<i>Psidium guajava</i> L. Quinindé				
Solvente de extracción	Acetona	Hexano	Diclorometano	Etanol (50%)
Recorrido de la fase móvil, cm				
Factor de retención, R <sub>f</sub>				
<i>Psidium guajava</i> L. Ibarra				
Recorrido de la fase móvil, cm				
Factor de retención, R <sub>f</sub>				
<i>Psidium guajava</i> L. Puyo				
Recorrido de la fase móvil, cm				
Factor de retención, R <sub>f</sub>				
Producto Natural Procesado de Uso Medicinal (PNPUM)				
Recorrido de la fase móvil, cm				
Factor de retención, R <sub>f</sub>				

Elaborado por Arias Mishel

	<b>UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS</b>		
	<b>GUÍA DE OBSERVACIÓN</b>	<b>ETAPA : 2</b>	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**



**Tamizaje fitoquímico.**

Tamizaje fitoquímico			
Muestra	Quinindé	Ibarra	Puyo
<b>Reacciones</b> <b>Alcaloides</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Test Dragendorff</li> <li>- Test Mayer</li> <li>- Test Wagner</li> </ul>			
<b>Esteroides/ Terpenoides</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Test Salkowski</li> <li>- Test Lieberman-Burchard</li> </ul>			
<b>Taninos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- FeCl<sub>3</sub> 5%</li> </ul>			
<b>Saponinas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- H<sub>2</sub>O</li> </ul>			
<b>Fenoles</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Acetato de plomo</li> </ul>			
<b>Glucósidos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Antraquinonas (test de Borntrager)</li> <li>- Glicosidos cardiacos (test de Keller-Killiani)</li> </ul>			

Elaborado por Arias Mishel.

### Interpretación

- (++) Abundante
- (+) Moderado
- (+/-) Escaso
- (-) Ausencia

	<b>UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS</b>		
	<b>GUÍA DE OBSERVACIÓN</b>	<b>ETAPA : 2</b>	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**

**Curva de calibración de ácido gálico para cuantificación de compuestos fenólicos.**

Tubo de ensayo	Concentración de ácido gálico ppm	Volumen de ácido gálico mL	Volumen de agua mL	Reactivo Folin Ciocalteu mL	Abs
Blanco	0				
Estándar 1	1				
Estándar 2	2				
Estándar 3	3				
Estándar 4	5				
Estándar 5	6				



Muestra	Absorbancia		
	R1	R2	R3
Quinindé			
Ibarra			
Puyo			

**Observaciones:**

.....

.....

.....

	<b>UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS</b>		
	<b>GUÍA DE OBSERVACIÓN</b>	<b>ETAPA : 2</b>	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas.

**Fecha de estudio:**

**Curva de calibración de Quercetina para cuantificación de Flavonoides totales.**

Tubo de ensayo	Concentración de Quercetina ppm	Volumen de AlCl <sub>3</sub> 10% $\mu$ L	Volumen de etanol mL	Abs
Blanco				
Estándar 1				
Estándar 2				
Estándar 3				
Estándar 4				
Estándar 5				

Muestra	Absorbancia		
	R1	R2	R3
Quinindé			
Ibarra			
Puyo			



**Observaciones:**

.....

.....

.....



	UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS		
	GUÍA DE OBSERVACIÓN	ETAPA : 3	

**TRABAJO:** Evaluación de la actividad antioxidante, según la farmacogeografía, en extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba).

**OBJETIVO:** Recolectar datos para la evaluación de los efectos relacionados a las variables propuestas

**Fecha de estudio:**

**Curva de referencia de BHT para cuantificación de porcentaje de inhibición de DPPH**

Estándar	Concentración BHT ppm	Volumen BHT μL	Volumen de DPPH μL	Volumen de Metanol HPLC μL	Abs.
Blanco					
Estándar 1					
Estándar 2					
Estándar 3					
Estándar 4					
Estándar 5					
Estándar 6					

**Observaciones:**

.....  
.....  
.....



**Herbario Alfredo Paredes (QAP)**  
**Universidad Central del Ecuador**



## CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

El suscrito director del HERBARIO QAP DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, certifica que la tesista de la Facultad de Ciencias Químicas, señorita **Nelly Mishel Arias Jarrín**, identificada con cédula de identidad 1725961344, solicita el servicio de identificación taxonómica para una muestra botánica la cual contienen la siguiente información:

Nombre común reportado: Guayaba  
Lugar de Colecta: Imbabura, Tolas de Socapamba, Ibarra  
Altura sobre el nivel del mar: 2150 m  
Fecha de Colecta: 14-octubre-2018

Una vez revisadas las características morfológicas del ejemplar y comparando con los existentes registros en el Herbario, las muestras corresponden a las especies:

***Psidium guajava* L.**

Familia Myrtaceae, especie nativa de Ecuador.

Se expide a solicitud de la interesada, a los 13 días del mes de noviembre del 2018.

**Dr. Carlos E. Cerón Martínez MSc.**  
**DIRECTOR HERBARIO ALFREDO PAREDES (QAP)**  
**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**





## **CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA**

El suscrito director del **HERBARIO QAP DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**, certifica que la tesista de la Facultad de Ciencias Químicas, señorita **Nelly Mishel Arias Jarrín**, identificada con cédula de identidad 1725961344, solicita el servicio de identificación taxonómica para dos muestras botánicas las cuales contienen la siguiente información:

Nombre común reportado: Guayaba  
Lugar de Colecta: Puyo y Quinindé  
Altura sobre el nivel del mar: no reporta  
Fecha de Colecta: no reporta

Una vez revisadas las características morfológicas del ejemplar y comparando con los existentes registros en el Herbario, las muestras de las dos localidades corresponden a la especie:

***Psidium guajava* L.**

Familia Myrtaceae, especie nativa de Ecuador.

Se expide a solicitud de la interesada, a los 13 días del mes de diciembre del 2018.

Dr. Carlos E. Cerón Martínez MSc.  
**DIRECTOR HERBARIO ALFREDO PAREDES (QAP)**  
**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**



Herbario  
Alfredo Paredes  
Universidad Central del Ecuador

**Anexo G. Certificado analítico de materias primas y solventes.**



ISO 9001-2008 REGISTERED

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Product Name : - GALLIC ACID EXTRA PURE  
Mol. Formula : -  $C_7H_6O_5 \cdot H_2O$   
Mol. Weight : - 188.14  
Code no. : - 03910  
CAS No. : - 5995-86-8  
Lot no. : - L184141604  
Mfg date : - APR-2016  
Exp date : - MAR-2021

Analyzed on: - 10/04/16

<u>Sr no.</u>	Tests	Specifications	Results
1	Description	Off white powder	Off white powder
2	Assay	Min. 99.5%	100.41%
3	Chloride (Cl)	Max. 0.01%	0.0029%
4	Sulphate (SO <sub>4</sub> )	Max. 0.005%	0.005%
5	Water	8.0 – 10.0%	9.88%
6	Sulphated ash	Max. 0.1%	0.053%
7	Tannic Acid	Passes test	Passes test

*This above product complies as per the specifications of LOBA CHEMIE PVT. LTD.*

*This document has been produced electronically and it is valid without signature.*

Loba Chemie Pvt. Ltd.

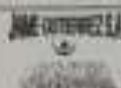
Works : Plot No. D-22, MIDC, Tarapur Industrial Area, Boisar, Taluka- Palghar, District - Palghar, Pin - 401506 Tel: 91 02525- 300000/300030  
Regd office : 107 Wode House Road, Jehanghir Villa, Colaba, Mumbai – 400005 Tel: 91 22 6663 6663, Fax: 91 22 22151099

[info@lobachemie.com](mailto:info@lobachemie.com), [www.lobachemie.com](http://www.lobachemie.com)

LOBA/QC/FM/01

Rev.: 01/23.02.2015





N° Reporte: MP-776

**REPORTE DE ANALISIS DE EXCIPIENTES**  
**QUERCETINA**  
**CONTROL DE CALIDAD**

VERSION: 01

PAG: 1 DE 1

EMISION: 2014-01-31

CODIGO PRODUCTO:	EAC 066	ANALIZADO POR:	SONIA CAMPAÑA
LOTE PROVEEDOR:	00-0276	FECHA DE ANALISIS:	2014-11-24
PROVEEDOR:	DORLAND	FECHA DE INGRESO:	2014-11-18
CANTIDAD:	1 x 20 kg	FECHA DE EXPIRACIÓN:	2018-04

MUESTREO	
ROTULADO:	PRESENTA <input checked="" type="checkbox"/> NO PRESENTA <input type="checkbox"/>
N° Bultos muestreados:	2
Envase primario:	FUNDA PLASTICA
Envase secundario:	TAMBOR
Responsable:	DAVID ORTIZ
Fecha muestreo:	2014-11-18

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADO
ASPECTO	Pólvo fino de color amarillo a crema, libre de impurezas, apelmazado	CUMPLE
SOLUBILIDAD	Muy soluble en éter y metanol, soluble en metanol y ácido acético. Insoluble en agua	CUMPLE
IDENTIFICACIÓN	Absorción en el infrarrojo El espectro de la muestra corresponde a el espectro del estándar	CUMPLE
HUMEDAD POR IR (105°C - 0 min - 0-100% humedad)	Máximo 4.0%	0.64%; CUMPLE
INTERVALO DE FUSION	123°C - 125°C	123.5°C; CUMPLE
TAMAÑO DE LA PARTICULA	100% a través de malla 80	82.14%; NO CUMPLE
DENSIDAD APARENTE	(0.25 - 0.40) g/ml	0.2461 g/ml; CUMPLE

Observaciones:

N/A

Cuaderno Materia Prima	# 2	Pág	157 A
------------------------	-----	-----	-------

**DISPOSICIÓN:**APROBADO ☐RECHAZADO ☐ANALIZADO POR:  
FECHA:SONIA CAMPAÑA  
2014-11-24APROBADO POR:  
FECHA:

## Anexo H. Listado de Extractos o Recursos Naturales y sus Referencias Bibliográficas Reconocidas

AGENCIA NACIONAL DE  
REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA







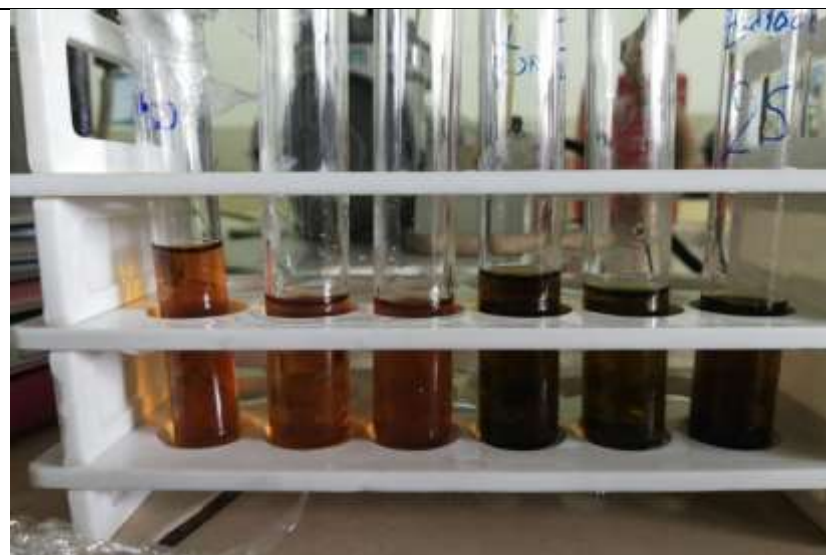
Dirección Técnica de Registro Sanitario, Notificación Sanitaria Obligatoria y Autorizaciones

69	Forskolina, <i>Coleus forskohlii</i>	<i>Plectranthus barbatus</i>	Inhibition of HIV-1 enzymes, antioxidant and anti-inflammatory activities of <i>Plectranthus barbatus</i> . <i>Journal of Ethnopharmacology</i> . Volume 149, Issue 1, 26 August 2013, Pages 184–190
70	Fruto de Agnocasto	<i>Vitex agnus-castus</i>	1.- Assessment report on <i>Vitex agnus-castus</i> L., fructus. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) 25 November 2010 EMA/HMPC/144003/2009
71	Fucoidan	<i>Undaria pinnatifida</i>	Abdul-Rehman Phull & Col. In vitro and in vivo evaluation of anti-arthritis, antioxidant efficacy of fucoidan from <i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar. <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> 97 (2017) p468–480
72	Garra del Diablo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	B. Vanaclocha; S. Cañigüeral. <i>Fitoterapia Vademécum de Prescripción</i> . 4° Edición. p284-288.
73	Genciana	<i>Gentiana lutea</i> L.	B. Vanaclocha; S. Cañigüeral. <i>Fitoterapia Vademécum de Prescripción</i> . 4° Edición. p257-258
74	Ginkgo biloba	<i>Ginkgo biloba</i>	B. Vanaclocha; S. Cañigüeral. <i>Fitoterapia Vademécum de Prescripción</i> . 4° Edición. p259-261.
75	Ginseng o Ginseng Rojo	<i>Panax Ginseng C.A. Meyer</i>	B. Vanaclocha; S. Cañigüeral. <i>Fitoterapia Vademécum de Prescripción</i> . 3° Edición. p264-270
76	Gotu Kola	<i>Centella asiatica</i>	Handbook of medicinal herbs / James A. Duke, with Mary Jo Bogenschutz-Godwin, Judi duCellier, Peggy-Ann K. Duke. –2nd ed. CRC PRESS – ISBN 0-8493-1284-1. P. 344-345
77	Granada	<i>Punica granatum</i>	B. Vanaclocha; S. Cañigüeral. <i>Fitoterapia Vademécum de Prescripción</i> . 4° Edición. p274-275
78	Grosella negra	<i>Ribes nigrum</i>	B. Vanaclocha; S. Cañigüeral. <i>Fitoterapia Vademécum de Prescripción</i> . 4° Edición. p276-277
79	Guanabana	<i>Annona muricata</i>	1.- Shi Sun & Col. Three New Anti-Proliferative Annonaceous Acetogenins with Mono-Tetrahydrofuran Ring from Graviola Fruit ( <i>Annona Muricata</i> ). <i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters</i> (2014) Volume 24, Issue 12, 15 June 2014, Pages 2773–2776
80	Guarana	<i>Paullinia cupana</i>	Vanaclocha; S. Cañigüeral. <i>Fitoterapia Vademécum de Prescripción</i> . 4° Edición. p278-279
81	Guayaba	<i>Psidium guajava</i> L.	Metwally A. M. & col. Monograph of <i>Psidium guajava</i> L. leaves. <i>Pharmacognosy Journal</i> . Volumen 3 (21). p89-104
82	Hamamelis	<i>Hamamelis virginiana</i>	B. Vanaclocha; S. Cañigüeral. <i>Fitoterapia Vademécum de Prescripción</i> . 4° Edición. p282-284

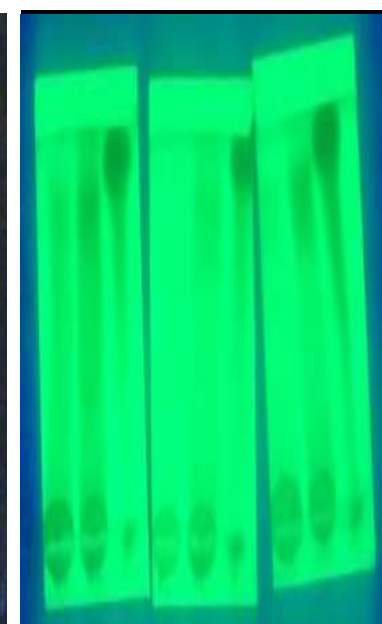


## Anexo I. Fotografías

		
<p>Muestras vegetales de <i>Psidium guajava</i> L.</p>	<p>Lavado y desinfección de las muestras vegetales.</p>	<p>Examen visual macroscópico (dimensiones) y control organoléptico</p>
		
<p>Examen visual macroscópico, área y porcentaje de defoliación mediante el uso de aplicaciones móviles.</p>	<p>DEFOLIACIÓN: 1.24% LAI: 6.51</p>	<p>Proceso de secado de la muestra vegetal.</p>
		
<p>Fragmentación manual de las muestras vegetales</p>	<p>Almacenamiento de muestra vegetal seca y fragmentada</p>	<p>Preparación de micro- extractos con diferentes solventes de extracción</p>



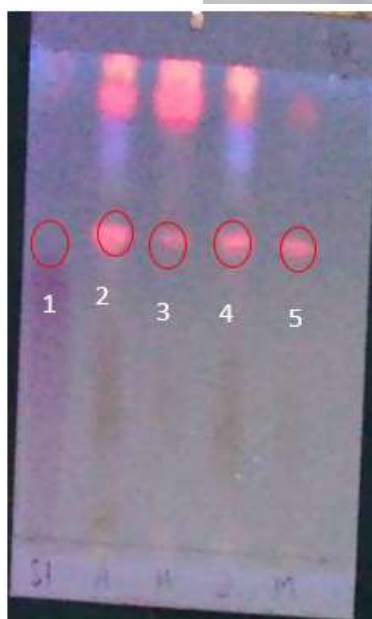
Micro- extractos, solventes: etanol 16%, etanol 50%, acetona, hexano, diclorometano



Procedimiento de cromatografía en capa fina de extractos de hojas de *Psidium guajava* L. en diferentes fases móviles



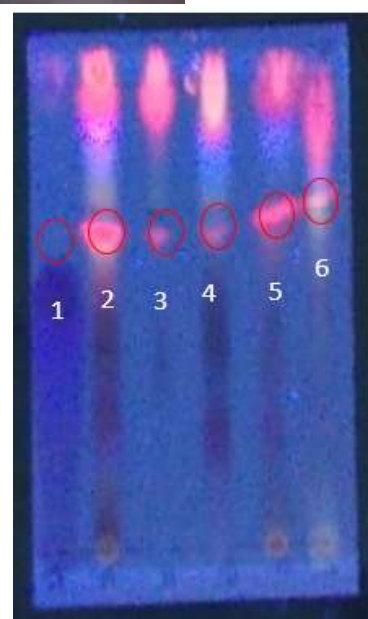
Cromatografía en capa fina, identificación de fenoles (estándar ácido gálico)



Quinindé



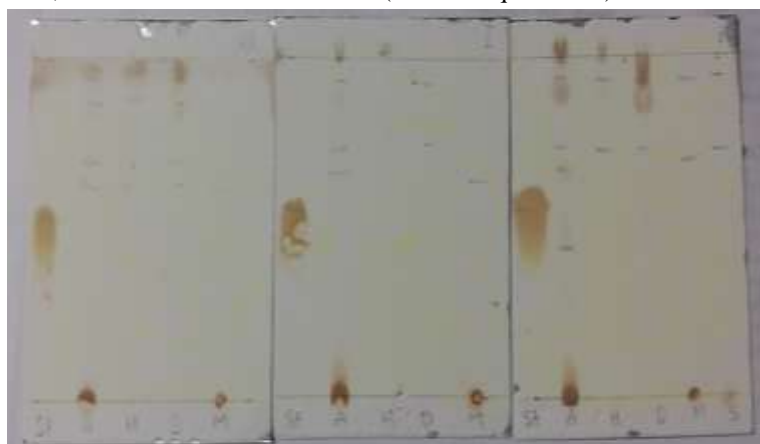
Ibarra

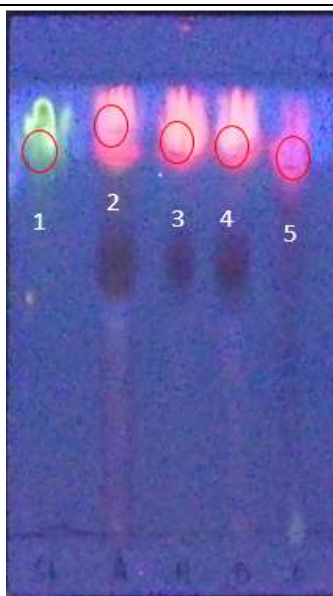


Puyo

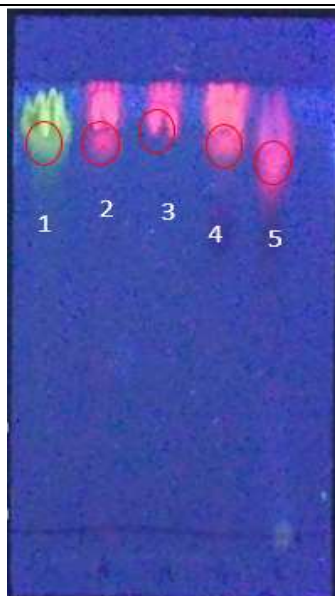
1. Ácido gálico (0,001 g/mL)
2. Extracto acetona
3. Extracto hexano
4. Extracto diclorometano
5. Extracto etanol 50%
6. Extracto etanol 50%, PNPUM

Cromatografía en capa fina, identificación de flavonoides (estándar: quercetina)

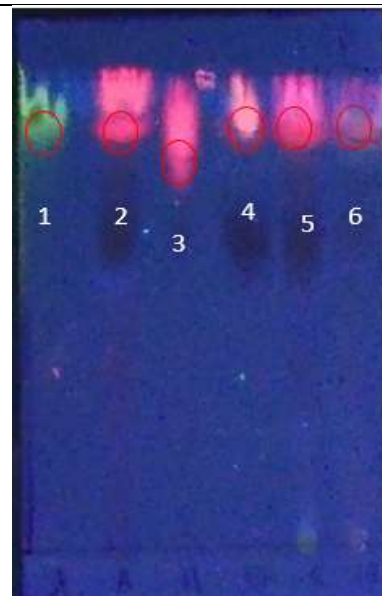




Quinindé



Ibarra


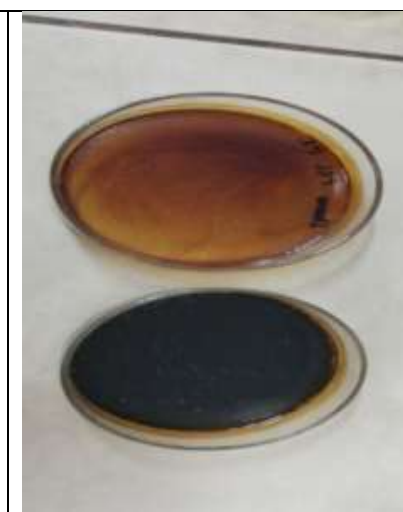








Puyo

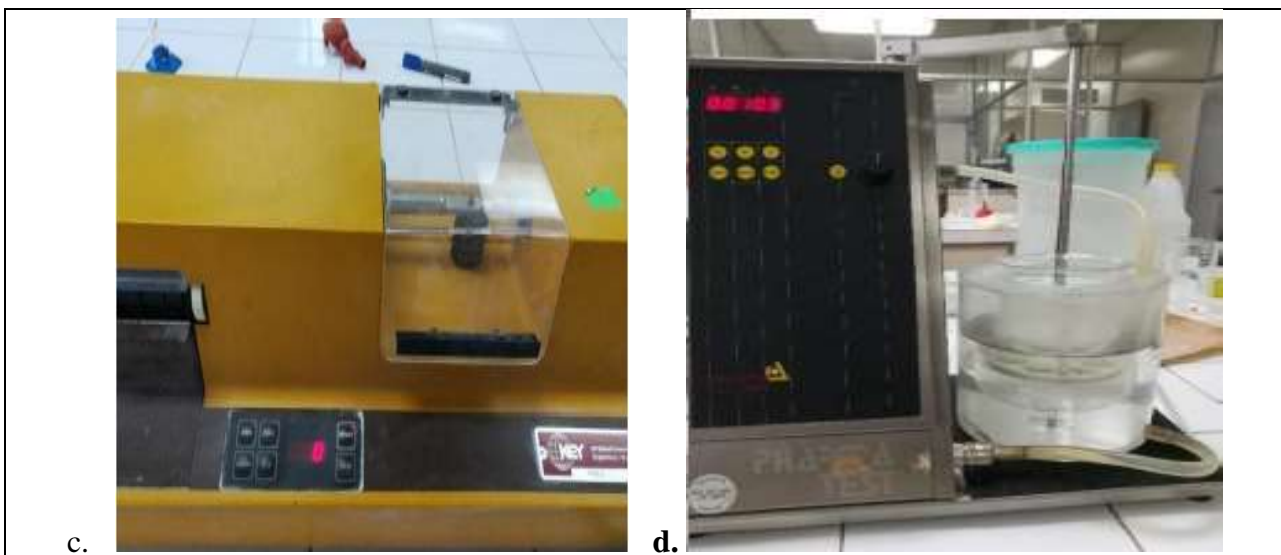
1. Quercetina (0,001 g/mL)
2. Extracto acetona
3. Extracto hexano
4. Extracto diclorometano
5. Extracto etanol 50%
6. Extracto etanol 50%, PNPUM



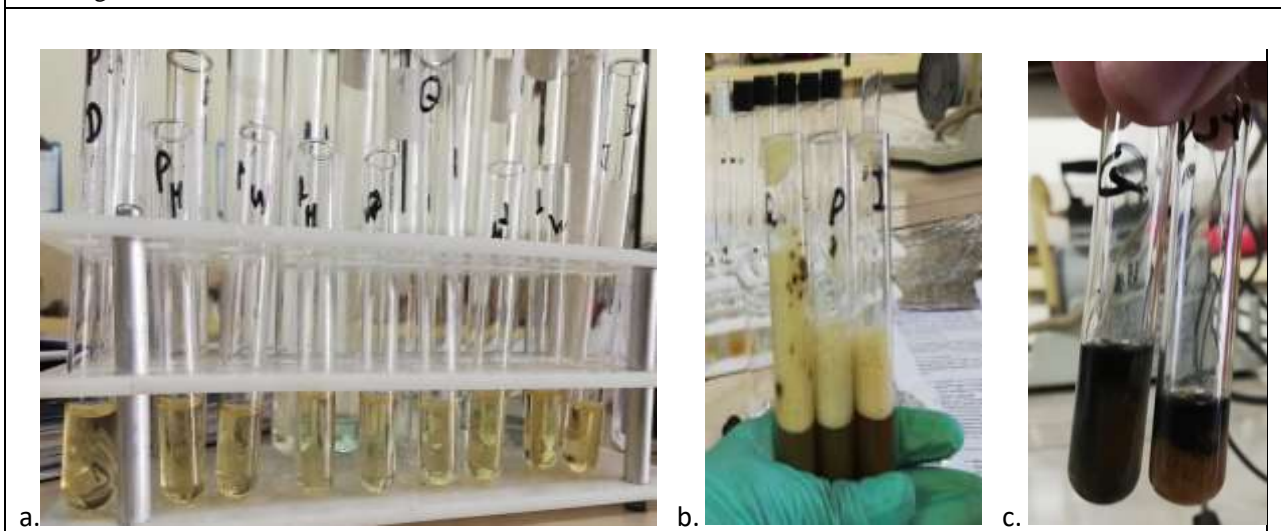
Maceración dinámica de muestra vegetal de *Psidium guajava* L. y procedimiento filtración al vacío

		
<p>Rotavapor IKA IRV10 usado en el proceso de concentración del EHA de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L.</p>	<p>EHA obtenidos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L</p>	<p>EHA obtenidos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L</p>
		
<p>Determinación de cenizas totales y cenizas insolubles en ácido clorhídrico y humedad (LOD)</p>		
<p>a.</p> 	<p>b.</p> 	





Control de calidad de FF sólidas, a. uniformidad de dosificación; b. friabilidad; c. fuerza de ruptura; d. tiempo de desintegración

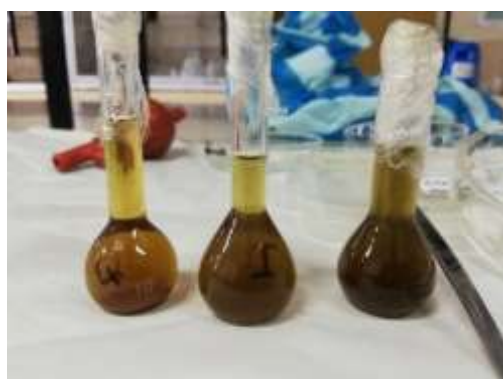


Tamizaje fitoquímico: a. detección de Alcaloides. b. detección de Saponinas. c. detección de taninos y fenoles. d. detección de terpenoides. e. detección de Esteroides. f. detección de glicósidos.



765,0		0,244		765	
No	Sample	Abs	Conc	Type	Ti
1	1	0.053	0.10600	A	14:
2	2	0.078	0.15600	A	14:
3	3	0.102	0.20400		
4	4	0.162	0.32400		
5	5	0.197	0.39400		
6	6	0.242	0.48400	A	15:
7	Sample-2				

Cuantificación de fenoles totales, método colorimétrico de Folin-Ciocalteu

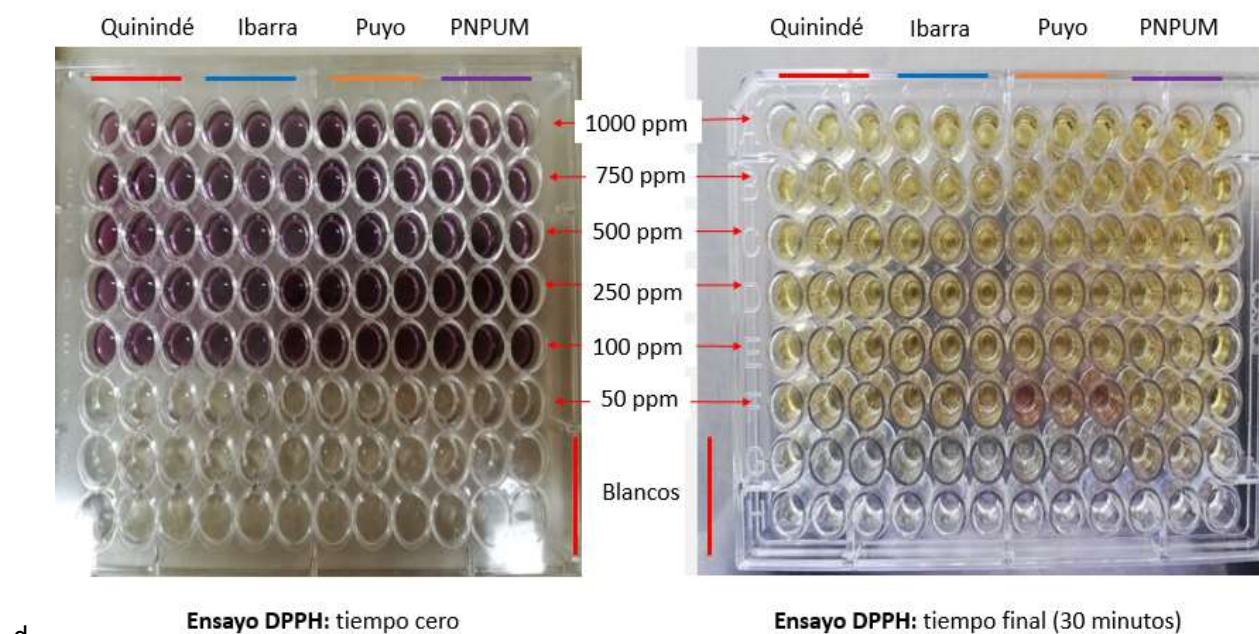
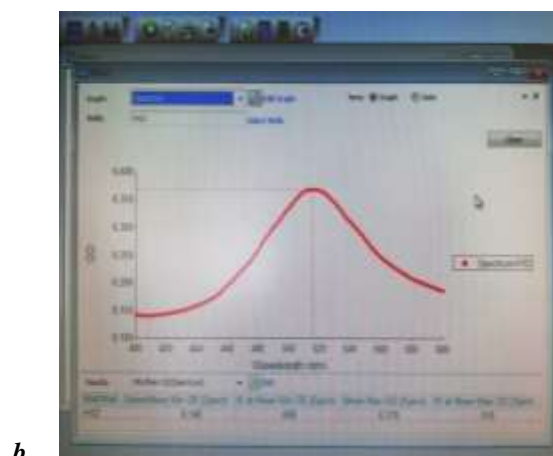
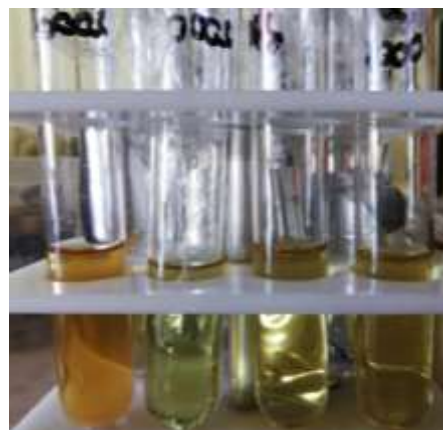


425,0		0,000		425	
No	Sample	Abs	Conc	Type	Ti
1	STANDARD-1	0.110	1	A	11:
2	STANDARD-2	0.215	2	A	11:
3	STANDARD-3	0.330	3	A	11:
4	STANDARD-4	0.470	4	A	11:
5	STANDARD-5	0.625	5	A	11:
6	STANDARD-6	1.222	10	A	11:
7	STANDARD-7				

Cuantificación de flavonoides totales, método colorimétrico del aluminio



# Evaluación de la actividad antioxidante



a. Preparación de soluciones (DPPH 200 ppm- BHT 2000ppm- muestras) b. Barrido espectral de DPPH c. Curva de referencia BHT. d. Ensayo del radical DPPH (t=0; t= 30 min)