

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de los
compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium*
guajava L “guayaba”. Ayacucho 2017.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

Presentado por la:

Bach. CHOQUE INFANZÓN, Aglibertha

Ayacucho-Perú

2018

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy, a mi padre Adder, a mi madre Celia y mis hermanos por el apoyo incondicional, por sus consejos, sus valores, por ser mis mejores guías durante mi formación profesional, éste es el producto de sus lecciones.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater* Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por haberme albergado durante cinco años en sus aulas y por ser forjador de excelentes profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud y en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, a los excelentes docentes que en ella laboran, quienes contribuyeron en mi formación brindando las herramientas necesarias para mi desenvolvimiento profesional.

Un reconocimiento especial a mi asesor Dr. Q.F. TINCO JAYO, Jhonny Aldo, por permitirme recurrir a su capacidad y experiencia para que sea posible realizar y culminar esta investigación.

Le agradezco a mis padres y amigas Yaqui Huaña, Shaida Cancho, Mónica Gómez, Luzmila Ore, Félix Farfán y Joel Martínez. Por el apoyo brindado en la ejecución de mi trabajo, a mi hija Suriam Pérez Choque.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”	5
2.3. Compuestos fenólicos	6
2.4. Inflamación	9
2.5. Fármacos antiinflamatorios	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	19
3.2. Definición de la población y muestra	19
3.3. Metodología y recolección de datos	19
3.4. Tipo y diseño de investigación	21
3.5. Análisis de datos	22
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	45
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Ejemplo de clases de flavonoides, su estructura y parte de sustitución.	9
Tabla 2. Acciones de los principales mediadores de la inflamación.	11
Tabla 3. Identificación de los compuestos fenólicos con reactivo cloruro férrico 5% y ensayo de shinoda presente en los extractos obtenidos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de los ácidos benzoicos.	7
Figura 2. Estructura de los ácidos cinámicos.	7
Figura 3. Las dianas moleculares de la acción de algunos fármacos antiinflamatorios.	13
Figura 4. Porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	28
Figura 5. Porcentaje de capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” vs el estándar trolox. Ayacucho 2018.	29
Figura 6. Curva Dosis-Respuesta ajustada por regresión lineal de la capacidad antioxidante (%) vs concentración de los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” y determinación de la IC ₅₀ . Ayacucho 2018.	30
Figura 7. Curva Dosis-Respuesta ajustada por regresión lineal de la capacidad antioxidante (%) vs concentración del estándar trolox y determinación de la IC ₅₀ . Ayacucho 2018.	31

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación botánica de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2017.	53
Anexo 2. Flujograma del procedimiento para la obtención de la fracción fenólica y determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	54
Anexo 3. Flujograma del procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por método DPPH de los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	55
Anexo 4. Hojas recolectadas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2017.	56
Anexo 5. Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	57
Anexo 6. Desengrasado con éter de petróleo de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	58
Anexo 7. Extracción de la fracción fenólica con acetato de etilo de los extractos desengrasados de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	59
Anexo 8. Extracto seco (fracción fenólica) de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”, obtenidas en el Laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.	60
Anexo 9. Identificación de fenoles y flavonoides en la fracción de acetato de etilo de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”, en el Laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.	61
Anexo10. Preparación de la muestra de la fracción fenólica para la evaluación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante, en el Laboratorio de Toxicología. Ayacucho 2018.	62
Anexo 11. Preparación de la albumina sérica bovina 1%, DPPH 20 µg/mL y trolox 12 mg/50mL, en el Laboratorio de Toxicología. Ayacucho 2018.	63

Anexo 12.	Preparación de la mezcla de reacción (muestra, control y estándar) y determinación de la actividad antiinflamatoria in vitro, en los laboratorios de Farmacología y Toxicología. Ayacucho 2018.	64
Anexo 13	Preparación de la mezcla de reacción (muestra, control y estándar) y determinación de la actividad antioxidante in vitro, en los laboratorios de Farmacología y Toxicología. Ayacucho 2018.	65
Anexo 14.	Porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina y capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	66
Anexo 15.	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina, para los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	67
Anexo 16.	Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey del porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina, para los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” y Diclofenaco. Ayacucho 2018.	68
Anexo 17.	Análisis de varianza de la capacidad antioxidante (%), para los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2018.	69
Anexo 18.	Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey de la capacidad antioxidante (%), para los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” y trolox. Ayacucho 2018.	70
Anexo 19.	Matriz de consistencia. Ayacucho 2017	71

RESUMEN

Las hojas de *Psidium guajava* L. “guayaba” fueron sometidas a un proceso de extracción hidroalcohólica, desengrasado con éter de petróleo y extracción de los compuestos fenólicos con acetato de etilo. Las enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y radicales libres en la actualidad es un problema real de salud, sumado al elemento de la toxicidad que los fármacos conllevan, por ello es indispensable contar con nuevas alternativas terapéuticas con efecto antiinflamatorio y antioxidante, con menor toxicidad y costo, en ese sentido los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de escasa toxicidad con variadas propiedades biológicas entre las cuales destacan el efecto antiinflamatorio y antioxidante. Sobre la base de la fuerte evidencia de las actividades beneficiosas sobre la salud de los compuestos fenólicos, el estudio realizado en los laboratorios de la escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la UNSCH se centra en la evaluación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”, con un modelo experimental por el método de inhibición de la desnaturalización de proteína y Actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteína para los compuestos fenólicos aislados se realizó a diferentes concentraciones: 100, 200, 400 y 800 µg/mL, así mismo la proteína albumina al 1% se enfrentó a una solución control (0.1 mL de agua destilada) y una solución de referencia (100 µg/mL de diclofenaco). Para determinar la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo también se usó compuestos fenólicos a 10, 50, 100 y 200 µg/mL y como estándar Trolox. Los resultados indican que la protección máxima de la desnaturalización de la albumina inducida por calor ($p < 0,05$) fue de 92,6% a la concentración de 800 µg/mL, el diclofenaco mostro 77,4% de protección de la desnaturalización de albumina y la máxima actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) fue de 81,1% a 200 µg/mL de compuestos fenólicos ($p < 0,05$), con una IC_{50} (%) de 43,5 µg/mL respecto a la del Trolox que fue de 4,2 µg/mL. Concluyéndose que en las condiciones experimentales los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los compuestos fenólicos de las hojas de *Psidium guajava* L. “guayaba” presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro*.

Palabras clave: *Psidium guajava* L. “guayaba”, compuestos fenólicos, actividad antiinflamatoria *in vitro*, actividad antioxidante *in vitro*, DPPH.

I. INTRODUCCIÓN

La actividad antiinflamatoria y antioxidante ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área farmacológica, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios crónicos.¹

La inflamación es un proceso complejo, que representa la respuesta del tejido corporal a las reacciones inmunes, las lesiones o el daño isquémico. La respuesta clásica a la inflamación incluye rubor, tumefacción, calor, dolor o malestar y pérdida de la función,^{2,3} e involucra acontecimientos tales como: el aumento de la permeabilidad vascular, el aumento de la desnaturalización de proteínas y la alteración de la membrana.¹ Se acepta comúnmente que, en una situación de estrés oxidativo, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales juegan un papel importante relacionado con los procesos inflamatorios, es decir en muchos trastornos inflamatorios hay producción de radicales O_2 , OH y especies no radicales libres (H_2O_2) que pueden dañar el tejido circundante por acción oxidante directa o indirecta. La peroxidación de lípidos da como resultado la destrucción de la membrana y a continuación la respuesta inflamatoria mediante la producción de mediadores y factores quimiotácticos, también se sabe que las especies reactivas de oxígeno activan a la metaloproteinasa de la matriz (colagenasa) provocando una mayor destrucción de los tejidos visto en diversas reacciones artríticas. Por lo tanto, los agentes que pueden secuestrar estas especies reactivas de oxígeno pueden ser beneficiosos en el tratamiento de trastornos inflamatorios.⁴

Las sustancias naturales que presentan probada acción antioxidante también se reportan como antiinflamatorias.⁵ De acuerdo con lo expresado por la Organización Mundial de la Salud, el 80% de la población mundial depende de las plantas para su atención primaria de la salud en los países en desarrollo. Así mismo, se estima que la población mundial será de 7500 millones de persona para

el año 2020, de las cuales el 75% vivirá en países en desarrollo y consumirá solo el 15% de los medicamentos totales del mercado. Estos datos permiten predecir que la mayoría de la población dependerá aún más de las plantas medicinales.⁶ Sumado a eso podemos decir que los fármacos de uso actual, inducen efectos secundarios en la mayoría de los pacientes, por todo ello es indispensable contar con nuevas alternativas terapéuticas con efecto antiinflamatorio y antioxidante, menos tóxicos y baratos.^{7,8} Esta problemática, motiva la búsqueda de antioxidantes de origen vegetal con propiedades eliminadoras de radicales libres que podrían tener gran importancia como agentes terapéuticos en varias enfermedades inflamatorias causadas por estrés oxidativo. En ese sentido los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de escasa toxicidad que pueden prevenir varias enfermedades inflamatorias producidas o no por factores oxidantes.⁹

Los flavonoides reportan actividad inhibitoria en la producción de NO, expresión de iNOS y los niveles de TNF- α en macrófagos.⁹ Y recientemente se ha relacionado con su capacidad para inhibir las metaloproteinas, así como en su capacidad para originar enlaces de hidrogeno que estabilizan las proteínas de la membrana basal, especialmente el colágeno haciéndolas menos susceptibles a la degradación proteolítica.^{4, 10}

Hay una gran variedad de especies vegetales reportadas con actividad antiinflamatoria y antioxidante, que no cuentan con un respaldo científico que corrobore dicha actividad. *Psidium guajava* L “guayaba” contiene innumerables metabolitos secundarios entre ellas los compuestos fenólicos quienes presentan diversas propiedades terapéuticas.^{11, 12}

Objetivo general.

Determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”.

Objetivos específicos.

- Identificar la presencia de fenoles y flavonoides en los extractos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” a diferentes concentraciones.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”. a diferentes concentraciones.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Leelaprakash y Mohan Dass evaluaron efecto antiinflamatorio *in vitro* del extracto metanólico de *Enicostemma axillare* por el método de inhibición de desnaturalización de albumina. El intervalo de concentración de 100-500 $\mu\text{g/mL}$ protegió significativamente ($p < 0,01$) la desnaturalización de la proteína inducida por el calor, la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ mostró la máxima protección de la desnaturalización de la proteína que fue del 71% y el estándar aspirina 100 $\mu\text{g/mL}$ ejerció 68% de protección. Concluyéndose que *Enicostemma axillare* según el modelo *in vitro* estudiado presenta actividad antiinflamatoria.¹

Alamgeer, Ultra y Hasan evaluaron el potencial antiartrítico del extracto acuoso, metanólico y varias fracciones de *Berberis orthobotrys* utilizando el método de inhibición de la desnaturalización de albumina en un intervalo de concentración de 12,5 a 800 $\mu\text{g/mL}$, tomando como estándar a la aspirina. Obteniendo resultados notables que revelaron inhibición de desnaturalización de la albúmina dependiente de la concentración de los extractos, con una inhibición máxima ($p < 0,01$) de 92,81% de desnaturalización proteínica a 800 $\mu\text{g/mL}$ que fue paralela a la aspirina 97,55% a 800 $\mu\text{g/mL}$ del extracto metanolico.¹³

Sajid et al evaluaron el efecto antiinflamatorio *in vitro* del extracto metanólico, clorofórmico y acuoso de la corteza del tallo de *Alnus nítida* por el método de la inhibición de la desnaturalización de albumina. Usaron como fármaco de referencia al diclofenaco y aspirina. Los resultados mostraron una notable inhibición porcentual ($p < 0,05$) a 500 $\mu\text{g/mL}$ de $73,3 \pm 3,81\%$ para el extracto clorofórmico, y para la fase metanólica y acuosa de $69,23 \pm 2,56\%$ y $69,1 \pm 3,79\%$ respectivamente. El diclofenaco y la aspirina exhibieron la inhibición máxima de $76,6 \pm 3,73\%$ y $74,4 \pm 3,38\%$ respectivamente ($p < 0,05$). Concluyendo que la corteza de *Alnus nitida* puede usarse para los trastornos relacionados con la inflamación.¹⁴

Naz et al evaluaron el potencial antiinflamatorio de extractos metanólicos de cuatro especies de plantas etnomedicinales de Punjab, Pakistán a concentraciones de 25 a 200 µg/mL. El potencial antiinflamatorio fue evaluado mediante el método *in vitro* por medio de la inhibición de la desnaturalización de la albumina. Obteniéndose la máxima inhibición ($p < 0,05$) a 200 µg/mL para *Cuscuta pedicellata* el cual fue de $73,3 \pm 1,3$ %, concluyéndose que es recomendable usar dicha planta como antiinflamatorio en medicina popular según el resultado de dicha investigación.¹⁵

Rojas y Tomás evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de las hojas de *Passiflora edulis* Sims “maracuyá” por el método de DPPH a 4 concentraciones de la muestra: 200, 100, 50 y 10 µg/mL. Se observó una capacidad antioxidante dependiente de la dosis, $75,85 \pm 2,06$ % a 200 µg/mL ($p < 0,05$), determinándose una $IC_{50} = 124$ µg/mL. Se concluye que el extracto metanólico de las hojas de *Passiflora edulis* Sims “maracuyá” es eficaz antioxidante *in vitro*.¹⁶

Waqas et al estudiaron la capacidad antioxidante de extractos crudos de las semillas de *Vitis vinifera*, *Tamarindus indica* y *Glycin max*, se examinaron por sus propiedades de eliminación de radicales libres usando ácido ascórbico como antioxidante estándar. La actividad de eliminación de radicales libres se evaluó usando DPPH. Cuyo resultado muestra que la actividad antioxidante general de las semillas de uva (*Vitis vinifera*) fue la más fuerte, seguida en orden descendente por la soja (*Glycin max*) y el tamarindo (*Tamarindus indica*), mostrando 85,61%; 83,45% y 79,26% de actividad de eliminación de DPPH respectivamente ($p < 0,05$). Concluyéndose que dichas plantas poseen antioxidantes que pueden ser de utilidad en algunas enfermedades degenerativas.¹⁷

Aguilar y Bonilla determinaron la actividad antioxidante de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius*. Dicha actividad fue evaluada utilizando la actividad secuestradora del DPPH. Los flavonoides aislados demostraron tener actividad antioxidante semejante a la rutina, quercetina y vitamina C, dependiente de la concentración ($p < 0,05$), la IC_{50} fue a 24,7 µg/mL. Se concluye que, los flavonoides presentes en las hojas de *Smallanthus sonchifolius* tienen actividad antioxidante.¹⁸

El objetivo de un estudio realizado por García et al fue evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los polisacáridos del tegumento de *Patallus mollis* mediante la prueba de desnaturalización de la albumina. Los polisacáridos se

extrajeron mediante digestión enzimática con bromelina, papaína y pepsina. La mezcla de reacción consistió en suero de albúmina bovina al 0,5% con polisacáridos en intervalo de concentración de 62,5 a 2000 µg/mL. Como estándar se usó diclofenaco sódico. Solo los polisacáridos extraídos con papaína presentaron inhibición de la desnaturalización de albúmina inducida por calor a una dosis de 2000 µg/mL.¹⁹

Ramírez E. Determinó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" por el método DPPH. Las concentraciones evaluadas fueron de 50, 100, 200 y 300 µg/mL encontrándose valores de 30,2; 49,9; 72,0; y 86,4% respectivamente; comparados frente al Trolox, este presentó una capacidad antioxidante de 44,3; 51,5; 74,0; y 85,7%. De igual forma se calculó el IC₅₀ para el Trolox 3,4 µg/mL y el IC₅₀ para el extracto fue de 218,35 µg/mL. Concluyéndose que *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" manifiesta actividad antioxidante, que la ubica como una especie nativa muy importante en la línea de los recursos naturales.²⁰

2.2. *Psidium guajava* L "guayaba"

2.2.1. Clasificación taxonómica según el sistema de Cronquist. A. 1988.

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	MYRTACEAE
GÉNERO	:	<i>Psidium</i>
ESPECIE	:	<i>Psidium guajava</i> L.
N.V	:	"guayaba"

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas (Anexo 1)

2.2.2. Descripción botánica.

Es un árbol o arbusto de 3 a 10 m, su tronco generalmente es torcido y muy ramificado, de madera dura, la corteza, de color gris, se descama con frecuencia y presenta manchas. Hojas simples, oblongas o elípticas de color verde brillante a verde parduzco. Flores solitarias o en cimas hasta de 8 cm, axilares, sépalos de 4 a 5, verdes en el exterior y blancos en el interior, pétalos de 4 a 5 de color blanco. Fruto tipo baya, hasta de 8 cm de diámetro, globosas a ovoides, con el cáliz persistente en el ápice, carnosas, de color crema amarillo a rosado, de olor fragante y sabor agrídulce, pulpa de color rosado, naranja y blanca.¹²

2.2.3. Distribución geográfica.

Se encuentra de forma silvestre desde el sur de San Luis Potosí, hasta la península de Yucatán en la vertiente del Golfo y de Sonora hasta Chiapas en la vertiente del pacífico. En su forma cultivada en el Mundo se distribuye desde Centroamérica hasta Sudamérica, sobre todo en Brasil, Perú, Venezuela y Colombia; también se encuentra en países como Pakistán, Egipto, Bangladesh, Estados Unidos, España, Malasia, Tailandia, India, Sudáfrica e Indonesia, quienes son los principales productores de guayaba a nivel mundial.^{12, 21}

2.2.4. Composición química.

Las hojas de esta planta contienen taninos y fenoles, flavonoides y triterpenos y esteroides, así como de saponinas y compuestos aminados.¹² Se ha reportado un aceite esencial y otras sustancias volátiles. Contiene, además, ácido guajanoico, β -sitosterol, uvaol, ácido oleanólico y ácido ursólico; ácido 2- α -hidroxiursólico, morin-3-O- α -L-arabopiranosido, hiperina, miricetina-3-O- β -D-glucosido, quercetin-3-O- β -D-glucuronopiranosido, 1-O-galoil- β -D-glucosa.¹² Se ha informado la presencia de ácido ascórbico y de otros flavonoides así como azúcares reductores y alcaloides. Se ha aislado una nueva benzofenona y un flavonol de naturaleza galoil-glicósido, conjuntamente con 5 nuevos quercetin-glicósidos. Se informó el aislamiento de nuevos flavonoides y triterpenos.^{21, 22}

2.2.5. Uso en medicina tradicional

Todas las partes de este árbol, incluidas las frutas, las hojas, la corteza y las raíces poseen propiedades medicinales, se usan para tratar el dolor de estómago y la diarrea en muchos países. Es bien sabido que un extracto de las hojas de *P. guajava* mejora los síntomas de la enfermedad alérgica e inflamatorias.¹²

2.3. Compuestos fenólicos

Son metabolitos secundarios producidos por todas las plantas, son un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glucósidos, combinados con unidades de azúcar, son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro, que producen cuando se les agrega cloruro ferrico.^{10, 23, 24}

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural, según su estructura química tenemos dos grandes grupos.^{10, 21}

a) No flavonoides

- **Fenoles no carboxílicos:** C6, C6-C1, C6-C3

- **Ácidos fenoles:** derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3.¹⁰

b) Flavonoides (C6-C3-C6)

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado.

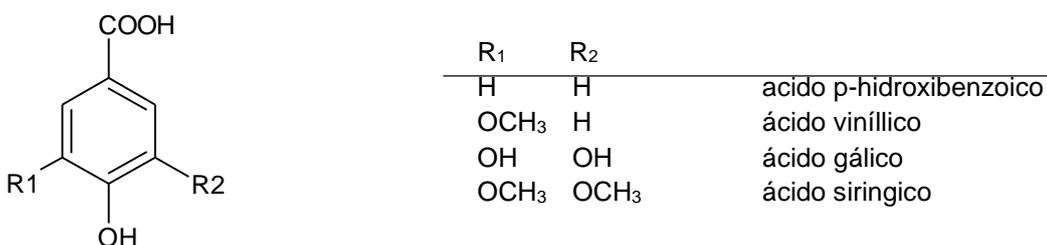
Subgrupos:

- Antocianos.
- Flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Flavanoles, taninos condensados y lignanos¹⁰

2.3.1. Ácidos fenólicos

Estos compuestos tienen una función carboxílica y un grupo hidroxilico fenólico, derivan del ácido benzoico (anisaldehido, vanillina, ácido verátrico, ácido anísico, ácido gálico) y del ácido cinámico (clorogénico, cafeico, ferúlico y sináptico, p-cumarico, elágico).^{23,25} Los ácidos fenólicos tienen propiedades antisépticas urinarias y propiedades antiinflamatorias.⁸

- **Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico**

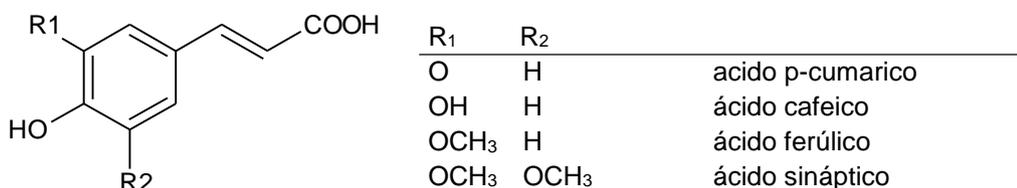


Ácido p-hidroxibenzoico

Figura 1. Estructura de los ácidos benzoicos¹⁰

Fuente: Gimeno E. Compuestos fenólicos. 2004.

- **Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico**



Ácido p-hidroxicinámico

Figura 2. Estructura de los ácidos cinámicos¹⁰

Fuente: Gimeno E. Compuestos fenólicos. 2004

- **Acción farmacológica**

Los ácidos fenólicos inhiben la 5-lipooxigenasa de granulocitos humanos, de ello resulta una inhibición en la formación de hidroperóxidos y leucotrienos que podrían justificar el empleo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o alérgicas.⁸ también posee capacidad para capturar radicales libres gracias a la presencia de grupos hidroxilo.²⁰

2.3.2. Flavonoides

Los flavonoides fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.¹⁸ Estos pigmentos naturales presentes en los vegetales protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.^{23, 25}

- **Clasificación**

Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales, modificaciones como pueden ser: adicionar (o reducir) grupos hidroxilos, la metilación de grupos hidroxilos o del núcleo del flavonoide, metilación de grupos hidroxilos en posición orto, dimerización (para producir biflavonoides), formación de bisulfatos y la más importante, glicosilación de grupos hidroxilos (para producir flavonoides O-glicósidos) o del núcleo del flavonoide (para producir flavonoides C-glicósidos) (Tabla 2).²³ Las amplias gamas de flavonoides incluyen: flavanonas, flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianinas, flavanonoles, isoflavonas, chalconas, dihidrochalconas, auronas y neoflavonas.²⁵

- **Efectos farmacológicos**

Los flavonoides actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianas, fotorreceptores, atractores visuales, repelentes de alimentación, y para la detección de la luz. Muchos estudios han sugerido que los flavonoides presentan actividades biológicas, incluyendo antialérgico, antiviral, antiinflamatorio (por inhibición de la COX), y las acciones vasodilatadoras.^{26, 27} Son compuestos polifenólicos de importancia farmacológica por exhibir actividad antioxidante, antialérgica, antitumoral, antimicrobiana y hormonal.²⁷ Se reportó la actividad

inhibitoria de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisácaridos de bacterias gram negativos (LPS), otro estudio demostró que los flavonoides también tienen propiedades de inhibir la producción de NO y la expresión de iNOS. Presentan una rápida absorción y pueden sufrir oxidación y reacciones de reducción, así como la metilación, la glucuronidación.²⁷ Los flavonoides poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres gracias al grupo oxidrilo presente en su estructura. Esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C.²²

Tabla 1. Ejemplo de clases de flavonoides, su estructura, y parte de sustitución.

Clase de flavonoide	Estructura anillo C	Parte de sustitución
Flavanona	Naringina	5,4'-OH;7-O-Neo ^a
	Hesperidina	5,3'-OH;4'-OMe ^a
	Eriodictiol	5,7,3',4'-OH
Flavona	Tangeritina	5,6,7,8,4'-OMe ^a
	Luteolina	5,7,3',4'-OH
	Apigenina	5,7,4'-OH
Flavonol	Kaemferol	5,7,3,4'-OH
	Guercetina	5,7,3,3',4'-OH
	Rutina	5,7,3',4'-OH;3-o-Rut ^a
Isoflavonoides	Genisteina	5,7,4'-OH
	Diadzeina	7,4'-OH
	Orobol	5,7,3',4'-OH
Antocianidinas	Apigenidina	5,7,4'-OH
	Luteolinidina	5,7,3,4'-OH
	Cianidina	3,5,7,3',4'-OH
Auronas	Sulfuretina	
	Leptosidina	

Neo^a: neohesperidosa; Me^a: metilo; rut^a: rutinosa

Fuente: Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica.1994.

2.4. Inflamación

Se trata de una respuesta fundamentalmente protectora, diseñada para librar al organismo de la causa inicial de la lesión (microbios, toxinas) y también de las consecuencias de estas lesiones (células y tejidos necróticos). Esto se logra mediante la dilución, destrucción o la neutralización de agentes perjudiciales.^{2,3}

La inflamación obedece a numerosas causas, pero por lo general es causa de una respuesta inmunitaria a microorganismos infecciosos, entre las otras causas de la inflamación figuran los traumatismos, sustancias químicas, calor y frío extremos y el daño isquémico de los tejidos corporales.²

Sin inflamación, las infecciones no serían controladas, las heridas nunca se cicatrizarían y los tejidos lesionados serían una fuente de lesión permanente. En la práctica de la medicina, la importancia de la inflamación radica en que en ocasiones se activa de forma inadecuada o se controla mal y es la causa de las lesiones tisulares en muchos procesos.³ Las reacciones inflamatorias son la base de enfermedades crónicas frecuentes, como la artritis reumatoide, la aterosclerosis o la fibrosis pulmonar, y también de las reacciones de hipersensibilidad que ponen en riesgo la vida frente a las picaduras de insectos, los fármacos y las toxinas. Por este motivo, nuestras farmacias son ricas en antiinflamatorios, que deberían controlar las secuelas perniciosas de la inflamación, si es posible sin interferir con sus efectos beneficiosos.³

2.4.1. Inflamación aguda

La inflamación aguda es una respuesta rápida (minutos) que sirve para hacer llegar leucocitos y proteínas plasmáticas, como los anticuerpos, al foco de infección o lesión tisular. La inflamación aguda está constituida por tres componentes esenciales: 1) alteraciones del calibre vascular que aumentan el flujo de sangre; 2) cambios estructurales de los microvasos que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos, y 3) emigración de los leucocitos de la microcirculación, acumulación de los mismos en el foco de lesión y activación para eliminar el agente.^{2, 3}

2.4.2. Inflamación crónica

A diferencia de una inflamación aguda, que suele ser autolimitada y de corta duración, la inflamación crónica se autoperpetua y puede durar semanas, meses e incluso años. Se caracteriza por infiltración de células mononucleares (macrófagos) y linfocitos en lugar del aflujo de neutrófilos que suele observarse en la inflamación aguda. También implica proliferación de fibroblastos en lugar de exudados y formación de cicatrices.^{2, 3}

2.4.3. Signos clínicos locales de la inflamación

La respuesta clásica a la inflamación incluye rubor, tumefacción, calor, dolor o malestar, producción de exudados y pérdida de la función.²

2.4.4. Efectos sistémicos de la inflamación

En condiciones óptimas la respuesta inflamatoria permanece confinada en un área localizada. Sin embargo, cuando los mediadores inflamatorios son liberados en la circulación la lesión local puede producir manifestaciones sistémicas importantes tales como: alteraciones del recuento de glóbulos blancos (leucocitosis o

leucopenia), fiebre, elevación de proteínas plasmáticas sintetizadas en el hígado (PCR), alteración del fibrinógeno y la proteína amiloide A sérica (SAA), trombocitosis, aumento del pulso y presión arterial, sepsis y shock séptico.^{2,3}

2.4.5. Mediadores de la inflamación

Se han descrito muchos mediadores que pertenecen a diferentes clases químicas tales como aminas biógenas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citoquinas, anticuerpos, quininas, etc.), especies reactivas de oxígeno y lípidos (factores activadores de plaquetas, prostanoïdes, leucotrienos) y todavía no se comprende por completo cómo funcionan de forma coordinada.⁹ La tabla 2 resume las principales fuentes de los mediadores esenciales y su implicación en la reacción inflamatoria.³

Tabla 2. Acciones de los principales mediadores de la inflamación

Mediador	Fuentes principales	Acciones
Derivados de las células		
Histamina	Mastocitos, basófilos	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación endotelial
Serotonina	Plaquetas	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular
Prostaglandinas	Mastocitos, leucocitos	Vasodilatación, dolor, fiebre
Leucotrienos	Mastocitos, leucocitos	Aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis, adherencia y activación de los leucocitos
Factor activador de plaquetas	Leucocitos, Mastocitos	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, adherencia leucocitaria, quimiotaxis, desgranulación, explosión oxidativa
ROS	Leucocitos	Destrucción de los microbios, lesión tisular
Óxido nítrico	Endotelio, macrófagos	Relajación del músculo liso vascular, destrucción de los microbios
Citocinas (TNF, IL1)	Macrófagos, células endoteliales, Mastocitos	Activación endotelial local fiebre, dolor, anorexia, hipotensión, reducción de la resistencia vascular (shock)
Quimiocinas	Leucocitos, macrófagos	Quimiotaxis, activación de los leucocitos
Derivados de las proteínas plasmáticas		
Productos del completo (C5a,C3a,C4a)	Plasma (producido en el hígado)	Quimiotaxis y activación de los leucocitos, vasodilatación (estimulación de los mastocitos)
Cininas	Plasma (producido en el hígado)	Aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, vasodilatación, dolor
Proteasas activas durante la coagulación	Plasma (producido en el hígado)	Activación endotelial, reclutamiento de leucocitos

Fuente: Robbins Y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 2010³.

2.5. Fármacos antiinflamatorios

El tratamiento de los pacientes con inflamación incluye: El alivio del dolor, disminución o suspensión del proceso lesivo tisular.^{2, 28}

Existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

- Fármacos antiinflamatorios esteroideos o corticosteroides (hormonas glucocorticoides suprarrenales), cuyo prototipo es la hidrocortisona.
- Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), cuyo prototipo es la aspirina.²⁸

2.5.1. Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides

Son sustancias semisintéticas análogas estructurales de los corticoides (hormonas producidas en la corteza suprarrenal). Su principal acción antiinflamatoria consiste en inhibir la liberación del ácido araquidónico en las membranas celulares disminuyendo la producción de leucotrienos y prostaglandinas. La acción considerada más importante es la inhibición de la producción de citocinas.²⁸ La mayor parte de los efectos conocidos de los glucocorticoides tiene la mediación de sus receptores, distribuidos de forma amplia. Estas proteínas son miembros de la superfamilia de receptores nucleares al cual se unen y producen cambios en el proceso de transcripción. Estos cambios tienen acciones amplias sobre la regulación de factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias como interleukina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) y factor estimulante de colonias granulocíticas y macrofágicas (GM-CSF) y en un alto grado median los efectos inmunomoduladores e inmunodepresores de los glucocorticoides.²⁹ En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona, entre otros.⁹

2.5.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos. Actúan inhibiendo la síntesis de eicosanoides. Que se producen por las acciones de dos ciclooxigenasas, la COX-1 que se expresa de forma constitutiva y la COX-2, inducible. Las prostaglandinas se dividen en series según sus características estructurales, las más importantes para la inflamación son PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂ (prostaciclina) y TxA₂ (tromboxano), cada uno de los cuales se genera mediante la acción de una enzima específica en un producto intermedio de la vía (figura 3).

Estos fármacos también ejercen efectos antipiréticos y analgésicos.^{28,29}

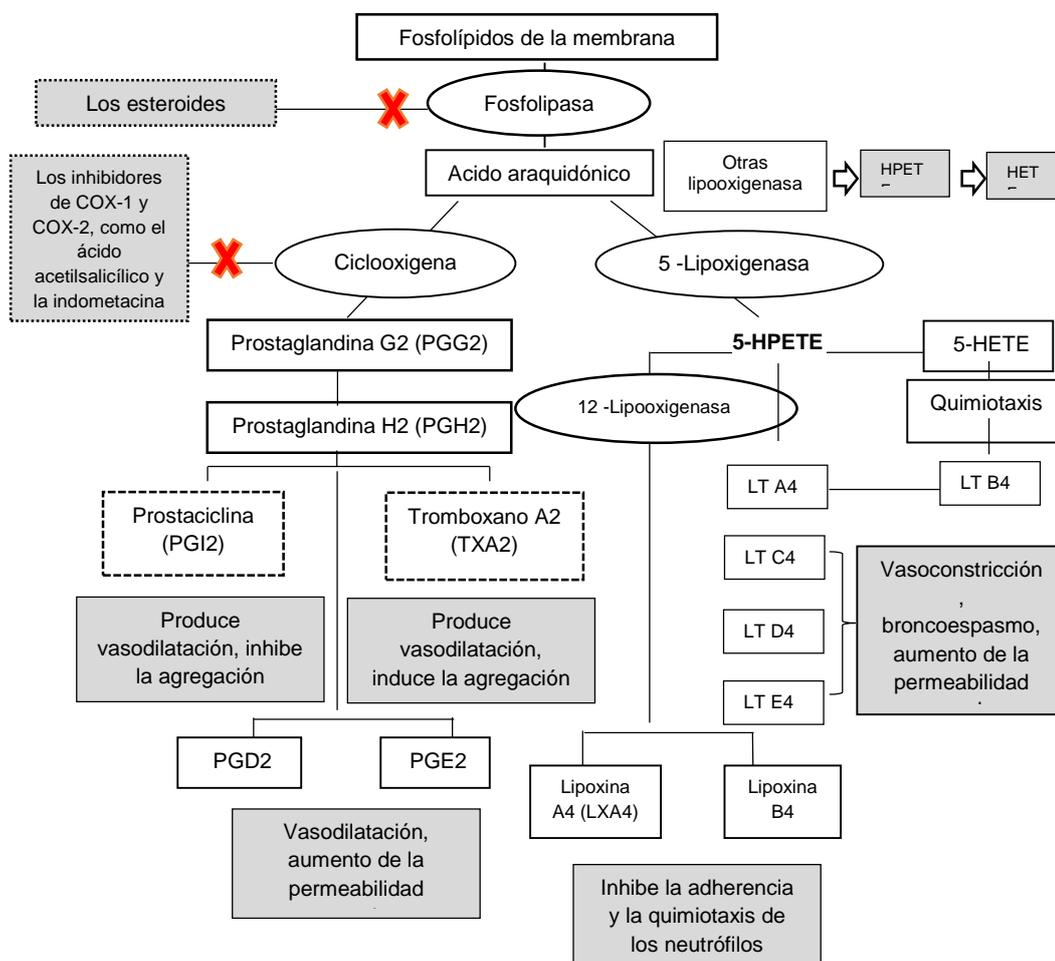


Figura 3. Las dianas moleculares de la acción de algunos fármacos antiinflamatorios.

Fuente: Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. Farmacología Básica y Clínica. 2010²⁹.

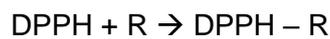
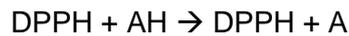
2.5.3. Radicales libres y antioxidantes

a. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas que poseen un número impar de electrones, o sea que poseen un electrón desapareado, lo que las hace muy inestables. En los sistemas vivos tienden a reaccionar rápidamente con diversas macromoléculas como ácidos nucleicos, cadenas de aminoácidos y los dobles enlaces en ácidos grasos poliinsaturados, provocando modificaciones estructurales y funcionales; entre éstas últimas sobresale la peroxidación lipídica, en la que los lípidos insaturados de membrana son oxidados a través de una reacción en cadena iniciada por un radical libre, durante este proceso las funciones de la membrana son afectadas y provocándose con ello la muerte celular.^{30, 31}

- **DPPH**

Viene a ser el 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; radical libre y estable, es un indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. Su mecanismo de reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno de un donador (ej. un compuesto fenólico) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazina y una especie radical (ej. radical fenoxil). La reducción del DPPH sigue la siguiente reacción.^{4, 32}



Donde

DPPH: Forma radical de DPPH

AH: antioxidante

R: especies radicales

- **Radicales libres en el ser humano y su patogenia**

Los organismos aeróbicos generan normalmente radicales libres de oxígeno como parte de su metabolismo. Estas especies activas (anión superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radical hidroxilo OH^\cdot) se originan en transferencias univalentes de electrones, durante la reducción del oxígeno a agua. Estas transferencias pueden darse como subproductos de procesos metabólicos como la respiración celular.^{28, 29} Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante relacionado con los procesos degenerativos o patológicos de diversas enfermedades graves como envejecimiento, cáncer, enfermedad coronaria, enfermedad de Alzheimer, trastornos neurodegenerativos, aterosclerosis, cataratas e inflamación.^{32, 33}

Anión superóxido (O_2^-)

El anión superóxido se genera en las células fagocíticas como: monocitos, neutrófilos, eosinófilos, para incrementar su función bactericida. Existen enfermedades como la gastritis o la inflamación intestinal en las que hay una activación fagocíticas excesiva, lo cual provoca lesiones en los tejidos y la formación de radicales de oxígeno.⁴

Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico cumple muchas funciones fisiológicas como, desencadenar la actividad citotóxica de los fagocitos y juega un papel fundamental en la lisis de las células tumorales, pero una cantidad elevada de NO está relacionada con

enfermedades como la inflamación crónica, accidente cerebro vascular y choque séptico.⁴

Radical hidroxilo (OH[·])

El radical hidroxilo, es una molécula muy tóxica para el organismo, y su generación parece ser accidental, probablemente por una reacción inicial en el O₂ y el NO, o derivado de reacciones promovidas por iones metálicos de transición como el Fe⁺² y Cu⁺⁴.

a. Fuentes de radicales libres

Fuentes externas: contaminación ambiental, humo del cigarro, productos alimenticios carcinógenos, luz solar, algunas drogas (anticancerosas).

Fuentes internas: metabolismo celular del oxígeno, fagocitosis, peroxidación lipídica.^{32, 33}

b. Antioxidantes

Es definido como una sustancia que, presente a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato, retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato.^{32, 33} Los antioxidantes pertenecen a dos clases:

Los preventivos se encuentran en el organismo de los seres vivos, por ejemplo, la superóxido dismutasa, que cataliza la disminución del anión superóxido, originando peróxido de hidrógeno; la catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua; y también tenemos el glutatión peroxidasa que participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno como dador de electrones utiliza el glutatión reducido.³¹

Los interruptores están presentes en la dieta ingerida sobre todo en las frutas y verduras (fenoles, aminos, vitamina E, C, A).³³

Ácidos fenólicos y flavonoides como antioxidantes naturales

Los ácidos fenólicos han sido implicados como efectivos antioxidantes como por ejemplo el ácido cafeico, el ácido clorogénico.³³ Así mismo se ha demostrado que los flavonoides como los flavonoles (quercetina y rutina) y flavonas han tenido notables propiedades antioxidantes.^{16,18} Esto debido a que son compuestos que son capaces de donar hidrógeno a un radical libre para eliminar el electrón extraño, que son responsables de la reactividad de los radicales. Esto implica que estos metabolitos presentes en las plantas podrían ser útiles para tratar el daño patológico relacionado con los radicales.^{32, 33}

2.3.6. Método para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro*

Existen varios métodos para determinar la actividad antiinflamatoria.

Lo que se señala en la presente investigación es el método de la inhibición de la desnaturalización de proteica.^{1, 4}

Método de la inhibición de la desnaturalización de proteína inducida por el calor.

La desnaturalización de proteínas es un proceso en el cual las proteínas pierden su estructura terciaria y su estructura secundaria por la aplicación de un estrés o compuesto externo, como ácido o base fuerte, una sal inorgánica concentrada, un solvente orgánico o calor.^{1,13} La mayoría de las proteínas biológicas pierden su función biológica cuando se desnaturalizan. La desnaturalización de proteínas es una causa bien documentada de inflamación.^{1, 15}

La desnaturalización de proteínas es uno de los marcadores fundamentales durante la inflamación y la artritis. La desnaturalización de proteínas puede ser explicada por la producción de autoantígenos en ciertas enfermedades reumáticas. Así mismo la alteración en los enlaces electrostáticos, hidrógeno, hidrofóbico y disulfuro generalmente están implicados en el mecanismo de desnaturalización de proteínas.^{13, 14}

Por ejemplo, las proteasas plasmáticas que consisten en Cinasas, proteínas activas del complemento y factores de la coagulación, son sustancias proinflamatorias derivados de proteínas, una de las Cinasas la bradicinina causa un aumento de la permeabilidad capilar y dolor, el sistema de la coagulación contribuye a la fase vascular de la inflamación, sobre todo a través de fibrinopéptidos que se forman durante los pasos finales del proceso de la coagulación. El sistema del complemento consiste en una cascada de proteínas plasmáticas que desempeñan un papel importante en la inmunidad y la inflamación, es decir los fragmentos del complemento contribuyen a la respuesta inflamatoria porque: 1) causan vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, 2) estimulan la activación, adherencia y quimiotaxis de los leucocitos, 3) aumentan la fagocitosis. Las citocinas por su parte son productos polipeptídicos de muchos tipos celulares (sobre todo linfocitos y macrófagos) que modulan la función de otros tipos celulares importantes en la respuesta inflamatoria.^{2, 3}

Por lo tanto el determinar la actividad antiinflamatoria mediante este método se fundamenta en inhibir o reducir la desnaturalización térmica de la proteína (albumina) por un efecto protector del extracto frente a la acción del calor.^{1, 13}

2.3.7. Método para evaluar la actividad antioxidante

Se usará el método de la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).^{11, 16, 17, 18, 34}

Actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo.

La técnica empleando el radical DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazilo hidratado), que tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, se basa en la desaparición de dicho color hacia el amarillo pálido por la reacción de la sustancia antioxidante, pudiendo cuantificarse la reacción espectrofotométricamente a 517 nm por diferencia de absorbancias, con lo que se determina el porcentaje de inhibición del radical DPPH.^{16, 18}

Se ha demostrado que los grupos fenólicos en los polifenoles pueden aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables, por lo tanto, romper la cadena de reacciones de oxidación en los componentes celulares.¹⁶

Las estructuras de los compuestos fenólicos tienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos, que son capaces de donar hidrógeno o electrones, evitando la oxidación de otras sustancias, particularmente los lípidos. Otro mecanismo por el cual estos compuestos ejercen actividad antioxidante es a través de la inactivación de enzimas (xantina oxidasa, proteína quinasa C, ácido ascórbico oxidasa) involucradas en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).^{11, 34}

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga durante los meses de noviembre de 2017 a marzo de 2018.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población: Hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”, que crecen a 730 msnm en el distrito de Santa Rosa en la provincia de La Mar de departamento de Ayacucho.

3.2.2. Muestra: 1 Kg de hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” que se obtuvo por muestreo no probabilístico por conveniencia en el mes de setiembre de 2017. El procedimiento para la recolección, clasificación de las muestras se realizaron de acuerdo a los procedimientos de recolección y conservación dadas por Villar del Fresno.³⁵ Las hojas fueron recolectadas en el distrito de Santa Rosa en la provincia de La Mar. En horas de la mañana y transportadas en bolsas de papel para evitar su descomposición, se seleccionaron las hojas que presentaron buenas condiciones procediendo a su secado durante siete días, previa limpieza de las mismas cuidando extenderlas para evitar su descomposición. Una parte de la planta con hojas y flor fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para la identificación taxonómica.²³

Criterios de inclusión: Hojas en buen estado, maduras

Criterios de exclusión: Hojas en mal estado, inmaduras

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Preparación del extracto hidroalcohólico

Se pesaron 200 gramos de hojas secas de *Psidium guajava* L “guayaba”, las cuales fueron molidas en un mortero hasta su pulverización, luego sometidas a

extracción hidroalcohólica con etanol de 96°, por maceración por 7 días, el extracto obtenido fue concentrada a sequedad en un rota vapor.

3.3.2. Aislamiento de la fracción fenólica

El extracto obtenido anteriormente fue desengrasado con éter de petróleo (con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos), seguido de ensayo de solubilidad. Luego se hizo una extracción líquido-líquido con acetato de etilo utilizando un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo la cual fue evaporada a sequedad.^{16, 18}

La fracción de acetato de etilo obtenida se utilizó en la determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante.

3.3.3. Identificación de fenoles y flavonoides

Los extractos secos que se obtuvieron anteriormente (fracción de acetato de etilo) fueron disueltos con alcohol etílico 96° en tubos de ensayos, para la identificación de fenoles y flavonoides con reactivo cloruro férrico al 5% y ensayo de Shinoda respectivamente.¹⁶

3.3.4. Determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro*

3.3.4.1. Determinación de la actividad antiinflamatoria

Se ha utilizado el método de inhibición de la desnaturalización de proteínas para determinar la actividad antiinflamatoria de acuerdo con el método usado por Leelaprakash y Mohan Dass³, Sakat et al.⁴ y Naz et al.¹⁵

Se prepararon varias concentraciones de los extractos (100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL y 800 µg/mL) y solución acuosa al 1% de albumina sérica bovina en agua destilada.

La mezcla de reacción (1mL) se compuso de 0,1 mL de los extractos a diferentes concentraciones y 0,9 mL de albumina sérica bovina al 1%. Cada solución se ajustó a pH 6,8 con HCl 1N. Para el estándar se usó 100 µg/mL de diclofenaco potásico. Las muestras se calentaron a 37 °C durante 20 min y luego a 57 °C durante 20 min, y se dejaron enfriar. La turbidez de las muestras fue medida a 660 nm. El experimento se realizó por cuadruplicado. El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteínas se calculó de la siguiente manera³:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \right) \times 100$$

3.3.4.2. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó siguiendo el método usado por Rojas y Tomás.¹⁶

Se preparó una solución de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) a una concentración de 20 µg/mL en metanol y los extractos a concentraciones de 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL en metanol. Se colocó 0,4 mL de cada concentración de la muestra y se le adicióno 0,8 mL de DPPH, al mismo tiempo se preparó un control con 0,4 mL de etanol y 0,8 mL de DPPH, un blanco con 0,4 mL de etanol y 0,8 mL de metanol y se tomó como estándar el Trolox. Se mezclaron los tubos y se dejó en reposo a temperatura ambiente alejado de la luz durante 30 minutos. Luego se midió la absorbancia de estas soluciones en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 517 nm. Se calculó la Capacidad Antioxidante (CA) según la siguiente ecuación:

$$CA (\%) = 100 \times (A_c - A_s) / A_c$$

Donde A_s es la absorbancia de la muestra y A_c es la absorbancia del control. El experimento se realizó 4 veces y se calculó la concentración del extracto que determinó una disminución del 50% de absorbancia de la solución de DPPH (IC_{50}) el cual fue comparado con el estándar Trolox.¹⁶

3.3.4.3. Métodos instrumentales para la recolección de datos

En la determinación de la actividad antiinflamatoria para la recolección de datos se empleó el espectrofotómetro UV-VIS el cual a una longitud de onda de 660 nm registró las absorbancias obtenidas del estándar, de las muestras tratadas y del control, para luego calcular el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteínas y así determinar la actividad antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados. Y en la determinación de la actividad antioxidante para la recolección de datos se empleó también el espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 517 nm en el cual se registró las absorbancias del estándar, de las muestras tratadas y del control, luego se calculó el porcentaje de la capacidad antioxidante de los tratamientos.¹⁶

3.4. Tipo y diseño de investigación

3.4.1. Tipo de investigación

Básico-Experimental³⁶

Según Hernández R., et al. La investigación realizada es de tipo experimental ya que hubo manipulación de la variable independiente (compuestos fenólicos a diferentes concentraciones) y medición del efecto que la variable independiente tuvo en la variable dependiente (actividad antiinflamatoria y antioxidante), el muestreo fue por conveniencia o intencional y no al azar. Así mismo la generalización de los resultados es factible.

3.4.2. Método de investigación

Hipotético-deductivo³⁶

Según Hernández R., et al. El método usado es del tipo hipotético-deductivo, ya que considera las siguientes premisas:

- Se llevó a cabo la observación y evaluación de fenómenos.
- Se derivaron hipótesis.
- Las hipótesis se sometieron a prueba utilizando los diseños de investigación apropiados.
- Los resultados corroboraron las hipótesis o fueron consistentes con éstas, por ende aportaron evidencia en su favor.

3.4.2. Diseño de investigación

El diseño planteado es un diseño con pos prueba únicamente y grupo de control.³⁶

El diseño incluye dos grupos, uno recibió el tratamiento experimental y el otro no (grupo de control). Cuando concluyó la manipulación, a ambos grupos se les hizo una medición sobre la variable dependiente en estudio. En el estudio se incluyeron cuatro concentraciones de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” para evaluar la actividad antiinflamatoria (100, 200, 400, 800 µg/mL) y antioxidante (10, 50, 100, 200 µg/mL).

Se hicieron 4 repeticiones para cada ensayo, luego se harán las comparaciones entre las pos pruebas de ambos grupos (O1 y O2). En ese sentido para saber si hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de protección entre las concentraciones estudiadas y estándar se hará un análisis de varianza y para averiguar qué concentraciones se diferencian y lógicamente cuáles se parecen se harán las comparaciones múltiples HSD de Tukey. El resultado nos indicó que el tratamiento experimental tuvo un efecto a considerar, es decir hubo efecto en la manipulación de la variable estudiada, ya que ambos grupos difirieron significativamente ($O1 \neq O2$), de esta forma se pudo contrastar la hipótesis de investigación planteada.³⁶

3.5. Análisis de datos

Los datos que se obtuvieron de la evaluación de los estudiados fueron procesados en una base de datos con el paquete estadístico SPSS 22. Se determinaron en forma de medias y desviación estándar, y se representaron mediante gráficos en forma de barras. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para analizar si más de dos grupos difieren entre sí de manera significativa ($p < 0.05$) en sus medidas y

varianzas, así mismo se hizo la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para ver similitudes o diferencias entre las medias de los grupos y del estándar.

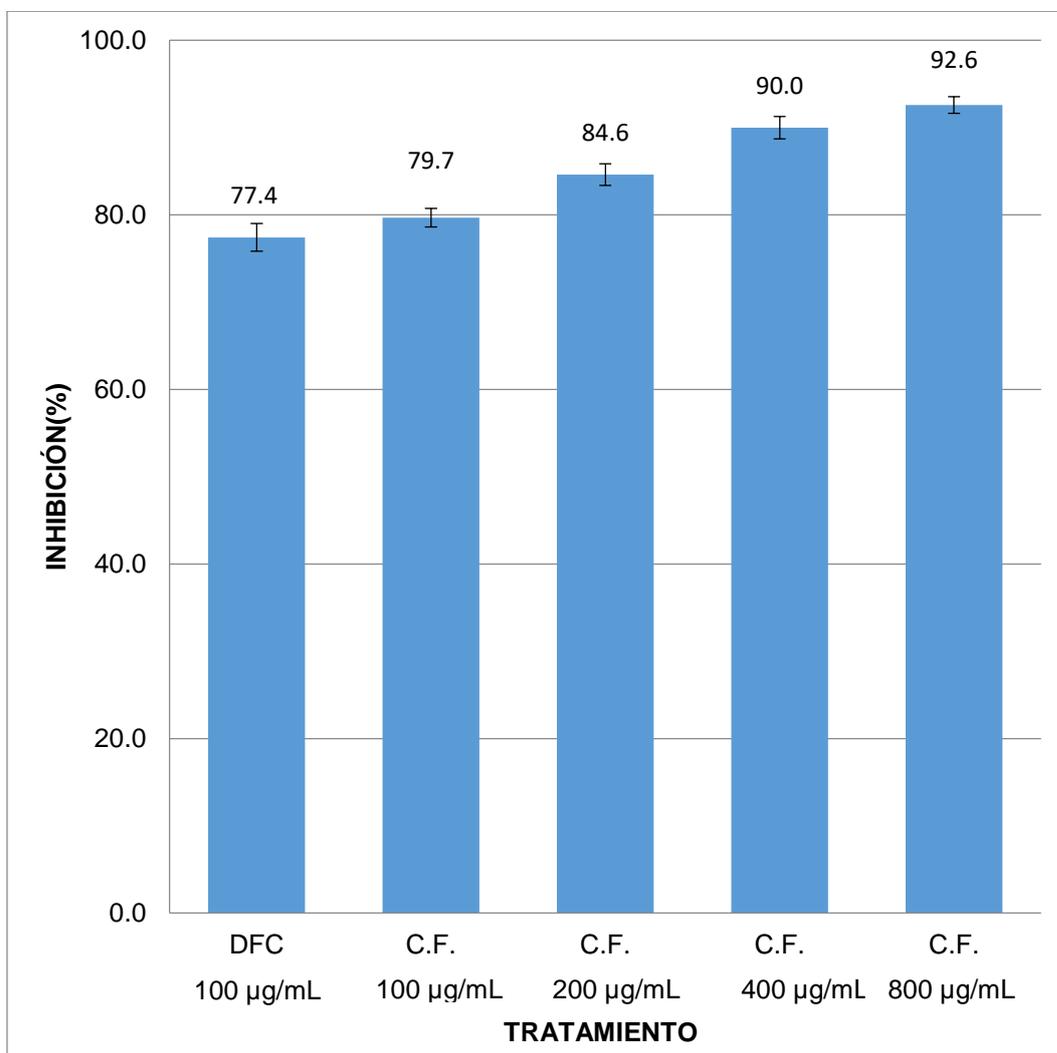
IV. RESULTADOS

Tabla 3. Identificación de los compuestos fenólicos con reactivo cloruro férrico 5% y ensayo de shinoda presente en los extractos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”. Ayacucho-2018.

Metabolitos Secundarios	Reactivo usado	Resultado	Observaciones
Fenoles	Cloruro férrico 5%	+++	Coloración verde oscuro intenso
Flavonoides	Shinoda (magnesio metálico + HCl concentrado)	+++	Coloración rosa a rojo ladrillo

LEYENDA:

- (+) : Escaso
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

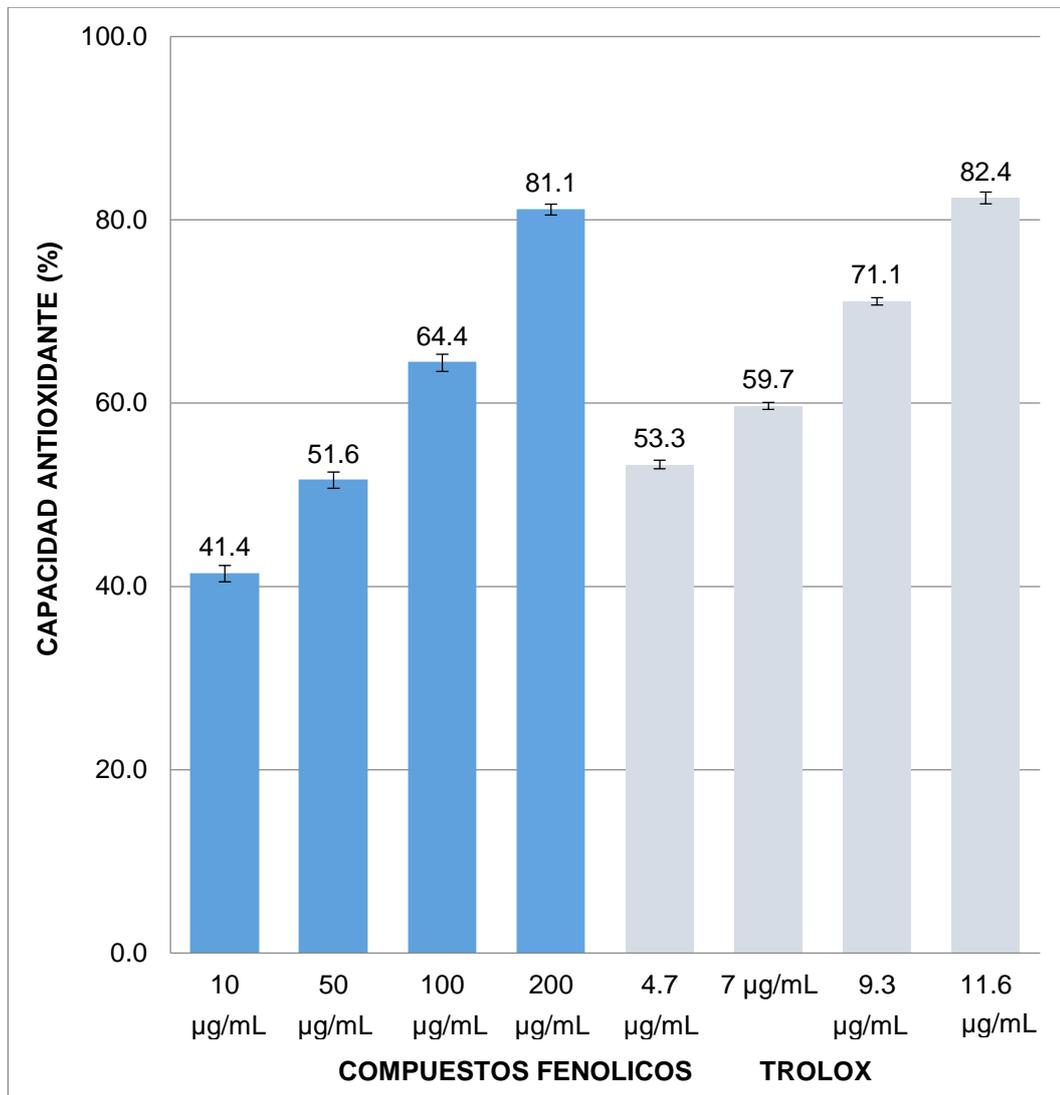


ANOVA: $p = ,000$

CF: Compuestos fenólicos

DFC: Diclofenaco

Figura 4. Porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina por los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L "guayaba". Ayacucho 2018.



ANOVA: $p = ,000$

Figura 5. Porcentaje de capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” vs el estándar trolox. Ayacucho 2018.

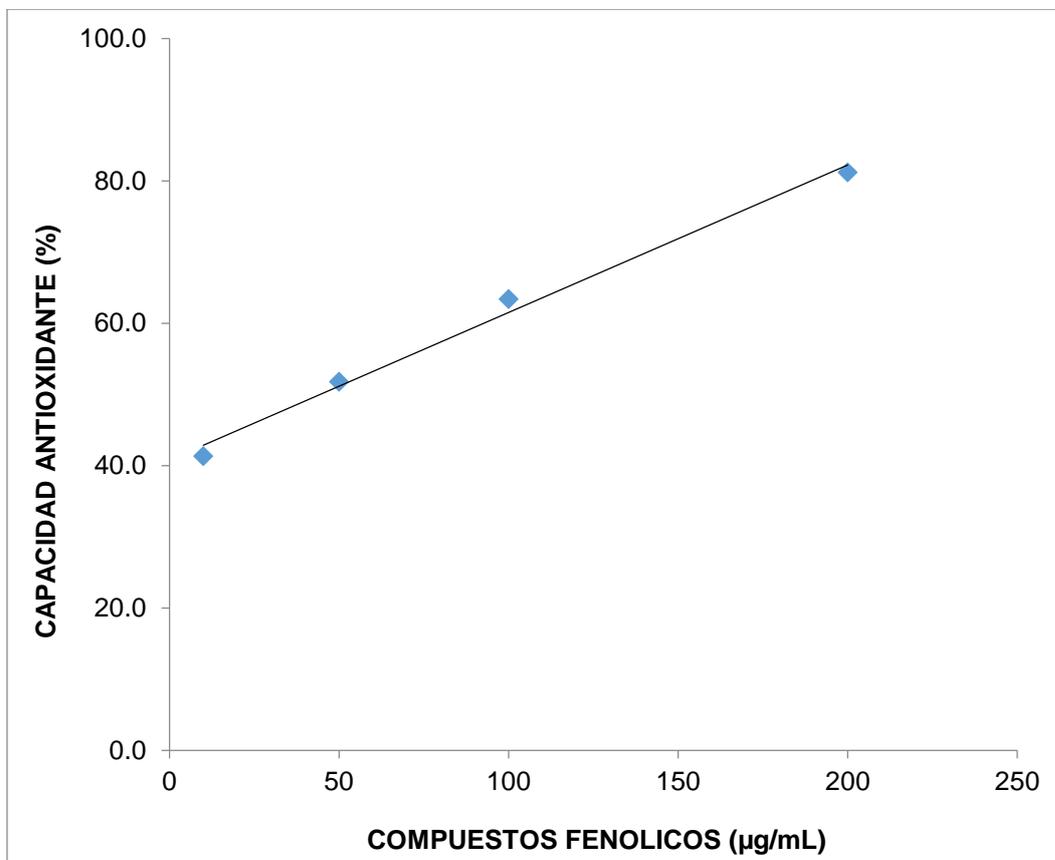


Figura 6. Curva Dosis-Respuesta ajustada por regresión lineal de la capacidad antioxidante (%) vs concentración de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba” y determinación de la IC₅₀. Ayacucho 2018.

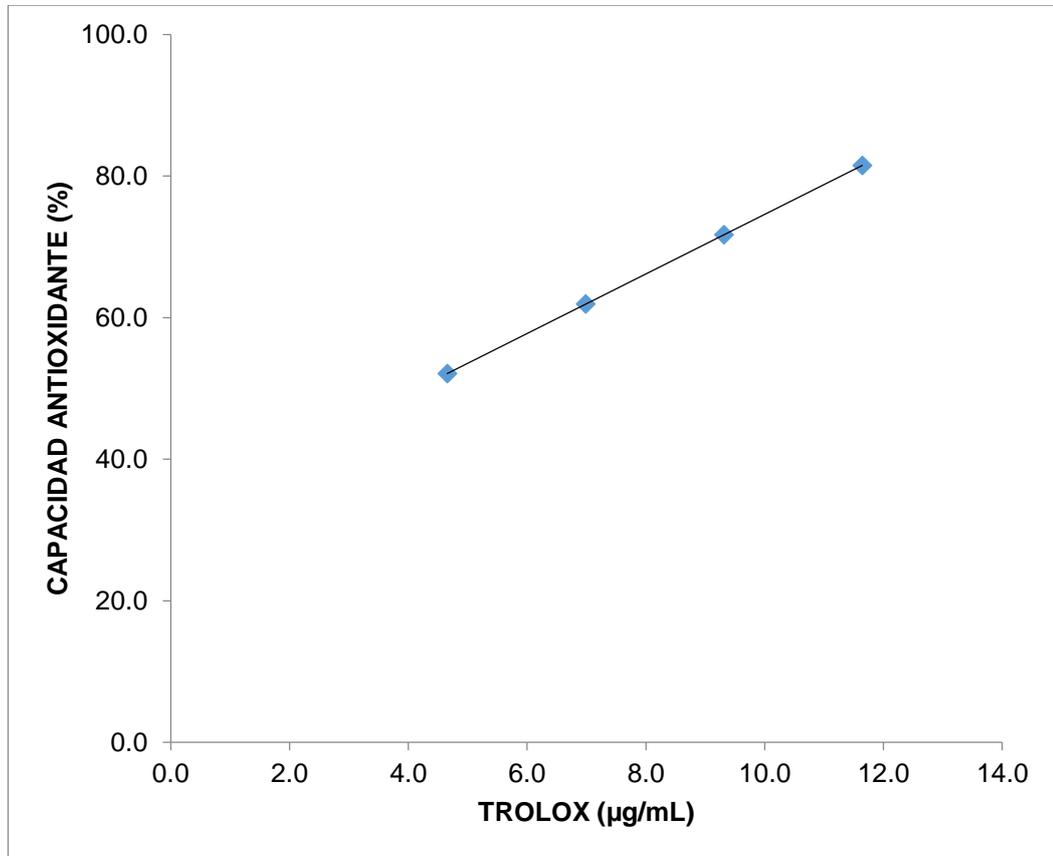


Figura 7. Curva Dosis-Respuesta ajustada por regresión lineal de la capacidad antioxidante (%) vs concentración del estándar trolox y determinación de la IC₅₀. Ayacucho 2018.

V. DISCUSIÓN

El uso de las plantas con fines medicinales es una práctica que se viene realizando desde hace mucho tiempo, en la actualidad se profundiza el conocimiento de estas especies vegetales que poseen propiedades medicinales, y se amplía su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen. Es así que el uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia, muchas especies vegetales utilizadas por nuestros antepasados se siguen utilizando hoy en día en diversas patologías.²⁰

Existen muchos trabajos sobre la evaluación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante que se han realizado tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Cuyos estudios se han realizado guiados a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*. En la ejecución de la presente investigación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante se empleó el modelo *in vitro* de inhibición de la desnaturalización de proteínas y actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo respectivamente.^{3,16}

Los compuestos bioactivos en plantas medicinales están presentes en bajas concentraciones. Por lo tanto, es muy importante aplicar métodos de extracción adecuados y eficaces para la recuperación de estos compuestos.⁸ Para obtener la fracción de compuestos fenólicos se realizó en primer lugar una extracción hidroalcohólica con etanol 96° de las hojas secas y molidas de *Psidium guajava* L “guayaba” el cual fue macerado por 7 días y filtrado para obtener el extracto deseado, el extracto obtenido anteriormente fue desengrasado con éter de petróleo y cloroformo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que pudieran interferir en la extracción, luego se hizo una extracción líquido-líquido con acetato de etilo utilizando un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo y evaporarla a sequedad.¹⁸ la fracción de acetato de etilo fue la fracción de fenoles el cual se usó en la

determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante. Al final de este proceso se hizo dos pruebas específicas para verificar la presencia de los compuestos fenólicos en la fracción de acetato de etilo según Lock De Ugaz O²² la prueba con reactivo cloruro férrico al 5% y ensayo de Shinoda, estas pruebas nos indicaron que efectivamente se extrajeron los compuestos fenólicos, el ensayo de shinoda dio una coloración roja el cual es un indicador positivo para flavonoides y la prueba con cloruro férrico al 5% dio una coloración azul negro positivo para fenoles ²² (Anexo 9). Estos metabolitos también fueron reportados por Matsuzaki et al, flavonoides de tipo flavonol principalmente (kaempferol, quercetina, rutina) ¹², Metwally et al, aislaron de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” flavonoides derivados de la quercetina²¹, dichos metabolitos serían los responsables de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Psidium guajava* L “guayaba”. La extracción de los compuestos fenólicos se realizó siguiendo sus propiedades de solubilidad según reporto Ramírez E. la solubilidad de los flavonoides, depende de la forma en que se encuentren, del número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.²⁰

Psidium guajava L. tiene una larga historia de usos medicinales populares en todo el mundo como sedante para la tos, antidiarreico, en el tratamiento de la hipertensión, la obesidad y el control de la diabetes mellitus, antiinflamatorio, hepatoprotectora, antioxidante. El extracto de hoja contiene taninos y otros compuestos fenólicos, triterpenoides y carotenoides¹², flavonoides, principalmente derivados de quercetina, que se hidrolizan en el cuerpo para dar la aglicona quercetina que es responsable de la actividad antioxidante y antiinflamatoria dependientes de la dosis.²¹

Los compuestos fenólicos vegetales aumentan la rigidez de las paredes celulares de la planta actuando como puentes moleculares entre los componentes de la pared celular. Son precursores de la lignina, que es un polímero fenólico principal en las plantas, y se producen por acción de las peroxidasas mediante la polimerización de estos compuestos fenólicos en caso de lesiones, de estrés o para protegerse del medio ambiente³⁷.

Los compuestos fenólicos aislados se usaron para realizar pruebas de protección o inhibición de la desnaturalización de proteínas que es una medida para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de diversas sustancias, para el cual se usó albumina sérica bovina al 1% y los compuestos fenólicos a concentraciones de 100, 200, 400 y 800 µg/mL versus un estándar diclofenaco 100 µg/mL, como resultado se observó que los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba” presenta buena actividad antiinflamatoria dependiente de la concentración.

En la figura 4 se observa el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteínas de los compuestos fenólicos aislados de *Psidium guajava* L “guayaba” y su respectivo estándar. El resultado mostro mayor protección o inhibición de la desnaturalización de proteína inducida por el calor (albumina) al utilizar compuestos fenólicos a concentraciones de 400-800 µg/mL y la inhibición máxima de la desnaturalización de proteína fue de 92,6% a una concentración de 800 µg/mL respecto a la protección ejercida por el estándar diclofenaco que fue del 77,4%.

El análisis de varianza se realizó para analizar si los tratamientos difieren significativamente entre sí en cuanto a sus medias y varianzas.³⁵

Del análisis estadístico (Anexo 15), prueba de ANOVA, se demuestra que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en la media de la disminución de la desnaturalización de albumina por los compuestos fenólicos a diferentes concentraciones (100, 200, 400, 800 µg/mL) y el estándar diclofenaco 100 µg/mL, por lo que es necesario recurrir a la prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey que nos permitió determinar que medias difirieron y que medias eran subconjuntos homogéneos que no se diferencian entre sí (Anexo 16)

El porcentaje de inhibición ejercido por el compuesto fenólico a 100 µg/mL es estadísticamente similar ($p < 0,05$) al porcentaje de inhibición ejercido por el diclofenaco, así mismo el porcentaje de inhibición ejercido por los compuestos fenólicos a 400 y 800 µg/mL son estadísticamente similar ($p < 0,05$) es decir ambos poseen similar actividad antiinflamatoria a un nivel de confianza del 95% según la prueba de HSD Tukey (Anexo 16).

En estudios previos realizados por Leelaprakash y Mohan Dass en el extracto metanólico de *Enicostemma axillare*, el intervalo de concentración de 100-500 µg/mL protegió significativamente ($p < 0,01$) la desnaturalización de la proteína inducida por el calor, la concentración de 500 µg/mL mostró la máxima protección

de la desnaturalización de la proteína que fue del 71% y el estándar aspirina 100 µg/mL ejerció 68% de protección.³

En otro estudio realizado por Sajid et al, Los resultados de la actividad de inhibición de desnaturalización de la albúmina inducida por calor indicaron que, entre los extractos metanólicos, la fracción de cloroformo en el intervalo de concentración de 100-500 µg/mL protege notablemente la desnaturalización de la albúmina inducida por el calor ($p < 0,05$), obteniéndose un máximo de protección de $73,3 \pm 3,81\%$ a 500 µg/mL y el estándar diclofenaco 100 µg/mL de $76,6 \pm 3,73$.¹⁴ La actividad ejercida por los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba” fue superior a la acción ejercida por el extracto metanólico de *Enicostemma axillare* y la fracción clorofórmica de *Alnus nitida*, por ejemplo; a la concentración de 500 µg/mL de extracto metanólico de *Enicostemma axillare* y *Alnus nitida* el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina fue de 71% y $73,3 \pm 3,81\%$ respectivamente respecto a los 90% ejercida a 400 µg/mL por los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”, esta variación es probablemente debida a que Leelaprakash y Mohan Dass trabajaron con el extracto crudo (metanólico), respecto a los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba” que serían teóricamente puros y por tanto presentaría mayor protección sobre la desnaturalización de proteína inducida por el calor, en ese sentido es necesaria la purificación de cada compuesto bioactivo y se puede usar esta forma purificada del compuesto que puede mostrar una actividad incrementada. En cuanto al resultado obtenido por Sajid et al, no es conocida la composición en compuestos fenólicos de *Alnus nitida* ya que este estudio es el primer estudio farmacológico que se hace, esto sumado al tipo de extracto de la planta puede explicar la diferencia que existe en el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina respecto a los ejercidos por los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”.¹⁴

Así mismo Alamgeer, Uttra y Hasan al usar extracto metanólico de *Berberis orthobotrys*, obtuvieron resultados notables que revelaron inhibición de desnaturalización de la albúmina dependiente de la concentración de los extractos, con una inhibición máxima ($p < 0,01$) de 92,81% de desnaturalización proteínica a 800 µg/mL que fue paralela a la aspirina, es decir, 97,55% a 800 µg/mL.¹³

Naz et al, obtuvieron la máxima inhibición de la desnaturalización de albumina ($p < 0,05$) a 200 µg/mL para el extracto metanólico de *Cuscuta pedicellata* el cual

fue de $73,3\pm 1,3\%$ y aspirina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $91,8\pm 1,1\%$.¹⁵ En estos casos se observa similar porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina entre el extracto metanólico de *Berberis orthobotrys*, *Cuscuta pedicellata* y los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”, 92,81% y 92,6% respectivamente a la concentración de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $73,3\pm 1,3\%$ a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto metanólico de *Cuscuta pedicellata*, esto debido a que *Berberis orthobotrys* es rico en compuestos fenólicos ya que al realizarle análisis por HPLC de *n*-fracción butanol reveló la presencia de quercetina, ácido gálico, ácido cafeico, *p*-cumárico, ácido *M*-cumárico, ácido ferúlico, *trans*-4-hidroxi-3-metoxi ácido cinámico y ácido sinápico.¹³ y *Cuscuta pedicellata* según el estudio realizado presento buena cantidad de fenoles 497 ± 4 mg GAE/g y flavonoides 385 ± 8 mg QE/g las cuales seguramente se extrajeron muy bien, es por ello el alto porcentaje de actividad que presenta, ya que dichos metabolitos son los responsables de la actividad antiinflamatoria.¹⁵

En los resultados se observa que el porcentaje de protección de la desnaturalización de albumina inducida por el calor (eficacia antiinflamatoria) de los compuestos fenólicos aislados de *Psidium guajava* L “guayaba” es relativamente alto e incluso igual o mayor al porcentaje de protección ejercida por el diclofenaco un fármaco antiinflamatorio comercializado actualmente. Esto se explicaría por la extensa acción que poseen dichos metabolitos en el proceso inflamatorio.

La desnaturalización de proteínas es un proceso en el cual las proteínas pierden su estructura terciaria y su estructura secundaria por la aplicación de un estrés o compuesto externo, como ácido o base fuerte, una sal inorgánica concentrada, un solvente orgánico o calor.^{3,13} La mayoría de las proteínas biológicas pierden su función biológica cuando se desnaturalizan. La desnaturalización de proteínas es una causa bien documentada de inflamación.^{3, 15, 31}

La desnaturalización de proteínas es uno de los marcadores fundamentales durante la inflamación. La desnaturalización de proteínas puede ser explicada por la producción de autoantígenos en ciertas enfermedades reumáticas. Así mismo la alteración en los enlaces electrostáticos, hidrógeno, hidrofóbico y disulfuro generalmente están implicados en el mecanismo de desnaturalización de proteínas.^{13, 14}

Por ejemplo las proteasas plasmáticas que consisten en Cinasas, proteínas activas del complemento y factores de la coagulación, son sustancias proinflamatorias

derivados de proteínas, una de las Cininas la bradicinina causa un aumento de la permeabilidad capilar y dolor, el sistema de la coagulación contribuye a la fase vascular de la inflamación, sobre todo a través de fibrinopéptidos que se forman durante los pasos finales del proceso de la coagulación. El sistema del complemento consiste en una cascada de proteínas plasmáticas que desempeñan un papel importante en la inmunidad y la inflamación, es decir los fragmentos del complemento contribuyen a la respuesta inflamatoria porque: 1) causan vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, 2) estimulan la activación, adherencia y quimiotaxis de los leucocitos, 3) aumentan la fagocitosis. Las citocinas por su parte son productos polipeptídicos de muchos tipos celulares (sobre todo linfocitos y macrófagos) que modulan la función de otros tipos celulares importantes en la respuesta inflamatoria.^{1, 2}

Por lo tanto, se ha demostrado que tratar la inflamación según el método estudiado consiste en inhibir o reducir la desnaturalización de la proteína por un efecto protector de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”.

Otros mecanismos que explican la Acción antiinflamatoria de los flavonoides se detallan a continuación; Los ácidos fenólicos y flavonoides poseen capacidad para capturar radicales libres gracias a la presencia de grupos hidroxilo por lo tanto si puede secuestrar especies reactivas de oxígeno son beneficiosos en el tratamiento de trastornos inflamatorios debido a que se acepta comúnmente que, en una situación de estrés oxidativo, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales juegan un papel importante relacionado con los procesos inflamatorios, es decir en muchos trastornos inflamatorios hay producción de radicales O_2 , OH y especies no radicales libres (H_2O_2) que pueden dañar el tejido circundante por acción oxidante directa o indirecta. La peroxidación de lípidos da como resultado la destrucción de la membrana y a continuación la respuesta inflamatoria mediante la producción de mediadores y factores quimiotácticos.⁴

También se sabe que las especies reactivas de oxígeno activan a la metaloproteinasa de la matriz (colagenasa) provocando una mayor destrucción de los tejidos visto en diversas reacciones artríticas.⁴ La inflamación involucra acontecimientos tales como: el aumento de la permeabilidad vascular, el aumento de la desnaturalización de proteínas y la alteración de la membrana.³ por tanto si se inhibe la desnaturalización o destrucción del colágeno se previene el proceso inflamatorio en las enfermedades.¹

Los ácidos fenólicos actúan inhibiendo la 5-lipooxigenasa de granulocitos humanos, de ello resulta una inhibición en la formación de hidroperóxidos y leucotrienos que podrían justificar el empleo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o alérgicas.⁸

Los flavonoides reportan actividad inhibitoria en la producción de NO, expresión de iNOS y los niveles de TNF- α en macrófagos.⁹ Y recientemente se ha relacionado con su capacidad para inhibir las metaloproteinas, así como en su capacidad para originar enlaces de hidrogeno que estabilizan las proteínas de la membrana basal, especialmente el colágeno haciéndolas menos susceptibles a la degradación proteolítica.^{4, 10} así mismo presenta Acción inhibitoria de la enzima ciclooxigenasa.^{26,27}

Como se ve el mecanismo de acción de los flavonoides y fenoles es amplio, actuando de múltiples formas, ya sea directamente protegiendo o evitando la destrucción de proteínas, ya que esta destrucción o desnaturalización puede conllevar a la aparición de mediadores de la inflamación derivados de dichas proteínas o actuando a nivel de enzimas tal es el caso de la lipooxigenasas y ciclooxigenasa que también generan mediadores de la inflamación. Es por ello su alta actividad antiinflamatoria que puede estar a la par con los AINES comercializados actualmente o incluso por encima y tranquilamente puede usarse en el tratamiento de diversas enfermedades que cursan con procesos inflamatorios crónicos o agudos, o puede consumirse el fruto o mate de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” como nutracéutico y preventivo.²⁶

Los compuestos fenólicos aislados se usaron también para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*, para el cual se usó solución de DPPH 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y los compuestos fenólicos a concentraciones de 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ versus un estándar Trolox 4,7; 7; 9,3 y 11,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ según la metodología descrita por Rojas J., Tomás G.¹⁶ y Ramírez E.²⁰ Como resultado se observó que los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba” presenta buena actividad antioxidante dependiente de la concentración según el método de la decoloración del radical 1,1-difenil-2-picril hidrazilo (DPPH). La figura 5 representa la capacidad antioxidante expresada en porcentaje obtenida a las concentraciones de 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que fueron de 41,4; 51,6; 64,4 y 81,1%; comparados frente al Trolox, el cual presentó una capacidad antioxidante de 53,3; 59,7; 71,1 y 82,4% respectivamente.²⁰

Si bien es cierto existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el método del DPPH *in vitro* permite tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*.

Este método presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones por presentar un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que otros como el ABTS tienen que ser generados tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica.²⁰

De igual forma se calculó la concentración del extracto que determinó una disminución del 50% de absorbancia de la solución de DPPH (CI₅₀), obteniéndose los resultados siguientes: para el Trolox fue de 4,2 µg/mL y para los compuestos fenólicos 43,5 µg/mL. De acuerdo a los resultados de la identificación de fenoles y flavonoides (Tabla 3), dichos metabolitos serían los responsables de la actividad antioxidante (figura 6 y 7).

En estudios previos realizados por Rojas J. y Tomás G. Se observó una capacidad antioxidante dependiente de la dosis 75,85±2,06% a 200 µg/mL del extracto metanólico de las hojas de *Passiflora edulis* Sims “maracuyá” (p<0,05), determinándose una CI₅₀=124 µg/mL.¹⁶ Así mismo Waqas et al, obtuvieron como resultado que las semillas *Vitis vinifera* tuvo una fuerte actividad de eliminación de DPPH (p<0,05) mostrando 85,61% a 50% de extracto etanólico.¹⁷

Respecto a los flavonoides se sabe que las flavonas y sobre todo los flavonoles se muestran como los más activos sobre los radicales libres.¹⁸ La rutina, quercetina y sus derivados que se encuentran en mayor cantidad en las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” son flavonoles. Esto explica la buena actividad antioxidante de la fracción de acetato de etilo de *Psidium guajava* L “guayaba” comparado al estándar Trolox.^{12, 21}

Aguilar E. y Bonilla P. Utilizando la fracción flavonoica de *Smallanthus sonchifolius* sin hidrolizar determinaron que el IC₅₀ (µg/mL) necesario para neutralizar al DPPH es de 24,7 µg/mL, mientras que en el presente trabajo usando la fracción de acetato de etilo, el IC₅₀ (µg/mL) fue de 43,5 µg/mL, mostrando que la actividad antioxidante de *Psidium guajava* L “guayaba” es menor respecto a la ejercida por *Smallanthus sonchifolius*. Mientras que Ramírez E. al evaluar el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” obtuvo un IC₅₀ de 218,35 µg/mL. El mismo autor señala un porcentaje de capacidad antioxidante máxima de 86,4% a 300 µg/mL, en nuestro caso fue de 81,1% a 200 µg/mL, que significa que se logró una mejor actividad antioxidante *in vitro*. Respecto al Trolox

el mismo autor señala que la capacidad antioxidante fue de 85,7% a 11,52 µg/mL y el IC₅₀ fue de 3,4 µg/mL, el cual en nuestro caso fue de 82,4% a 11,6 µg/mL y el IC₅₀ de 4,2 µg/mL. (Figura 5). Los buenos resultados obtenidos son gracias a que los fenoles y flavonoides tienen capacidad para capturar radicales libres gracias a la presencia de grupos hidroxilo presentes en su estructura. Esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C.²²

En la actualidad como se sabe existe relación entre la actividad antioxidante de los flavonoides y actividad antiinflamatoria como ya se explicó en párrafos anteriores. Por lo tanto, los agentes que ejercen actividad antioxidante pueden ser beneficiosos en el tratamiento de trastornos inflamatorios. El hecho que de los extractos crudos y metabolitos aislados presenten actividad protectora de la desnaturalización de proteína inducida por el calor y capacidad para neutralizar radicales libres, da un aporte a la medicina en cuanto al tratamiento de enfermedades ya que en la actualidad se conocen varias enfermedades que tienen una base en la respuesta inflamatoria y el daño celular ejercido por sustancias oxidantes, como la artritis reumatoidea y el cáncer respectivamente. Que en la actualidad se están convirtiendo en un mercado multimillonario para los fármacos producidos por la industria farmacéutica en ese sentido para la gestión de estas enfermedades es necesario el uso de fármacos alternativos, tales como sustancias producidas a partir de plantas medicinales con efecto farmacológico, menor toxicidad y costo.^{26,27}

Se concluye que los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba" presentan actividad antiinflamatoria y antioxidante en las condiciones experimentales estudiadas.

VI. CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *psidium guajava* L. “guayaba” presentan propiedades antiinflamatorias según el modelo de inhibición de la desnaturalización de proteína inducida por el calor también presentan propiedades antioxidantes según el modelo de la actividad secuestradora del radical 1, 1 difenil -2-picrilhidrazilo (DDPH).
2. Se identificó la presencia de los compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”.
3. La concentración de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” presentaron propiedades antiinflamatorias que ejerció mayor actividad antiinflamatoria (92,6%) fue de 800 µg/mL respectivamente.
4. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” presentaron propiedades antioxidantes que ejerció mayor capacidad antioxidante (81,1%) fue de 200 µg/mL respectivamente, Se obtuvo una IC₅₀ (%) a 43,5 µg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios químicos que permitan separar y caracterizar los compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”.
2. Purificar cada compuesto aislado de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”, de manera que se pueda usar esta forma purificada del compuesto que puede mostrar una actividad incrementada.
3. Realizar otros estudios sobre la actividad antiinflamatoria y antioxidante empleando otros modelos experimentales.
4. Recomendar el uso de *Psidium guajava* L “guayaba” como medicina complementaria en procesos inflamatorios agudos y crónicos.
5. Realizar estudios que propongan su conservación, propagación y uso racional, ya que esta especie es considerada como un recurso natural muy promisorio en el Perú.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leelaprakash G, Mohan Dass S. *In vitro* Anti-Inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. Int. J. Drug Dev. & Res. 2011; 3(3): 189-196.
2. Porth CM. Fisiopatología: Salud-Enfermedad: Un Enfoque Conceptual. 7ª ed. Buenos aires: Editorial médica panamericana; 2006.
3. Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; 2010.
4. Sakat S, Juvekar R and Gambhire N. *In vitro* antioxidant and antiinflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. Int. J. of Pharm and Pharm Sci. 2010; 2(1): 146-155.
5. Hassing A, Liang WX, Schwabl H, Stampfli K. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. Med Hypotheses. 2010; 52(5): 479-481.
6. Organización Mundial de la Salud. Guías para el asesoramiento y la regulación de las medicinas tradicionales, Ginebra; 2012.
7. Felipe A, Scull R, Herrera Y, Fernández Y. Efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos y secos de *Caesalpinia bahamensis*. Anim. 2011; 3(2): 70-75.
8. Carciochi R.A., Manrique G.D., Dimitrov K. Optimization of antioxidant phenolic compounds extraction from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. J Food Sci Technol. 2015; 52(7): 4396-4304.
9. Gómez H., González K., Domingo J. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2011; 10(3): 182-217.
10. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM. Ámbito Farmacéutico nutrición. [Revista en internet] 2004. [Acceso septiembre 2017]; 23(6). Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>.
11. Martins R. et al. Chemical Composition, an Antioxidant, Cytotoxic and Microbiological Activity of the Essential Oil from the Leaves of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. PLOS ONE. 2016; 11(12): 14.
12. Matsuzaki K, Ishii R, Kobiyama K, Kitanaka S. New benzophenone and quercetin galloyl glycosides from *Psidium guajava* L. J Nat Med. 2010; 64(3): 252-256.

13. Alamgeer, Ultra A., Hasan U. Anti-arthritic activity of aqueous-methanolic extract and various fractions of *Berberis orthobotrys* Bien ex Aitch. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17 (1): 371.
14. Sajid M, Khan MR, Shah SA, Majid M, Ismail H, Maryam S, et al. Investigations on anti-inflammatory and analgesic activities of *Alnus nitida* Spach (Endl). Stem bark in Sprague Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2017; 198: 407-416.
15. Naz R, Ayub H, Nawaz S, Islam ZU, Yasmin T, Bano A, et al. Antimicrobial activity, toxicity and antiinflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017; 17 (1): 302
16. Rojas J., Tomás G. Tamizaje Fitoquímico Y Actividad Antioxidante In Vitro De *Passiflora edulis* sims (Maracuyá). *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* 2010; 13(1): 23-29.
17. Waqas M, Saqib N, Rashid S, Shah P, Akhtar N, Murtaza G. Screening of various botanical extracts for antioxidant activity using DPPH free radical method. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2013; 10(6): 452-455.
18. Aguilar E., Bonilla P. Actividad antioxidante e inmunológica de flavonoides aislados de hojas de *Smalanthus sonchifolius* (YACÓN). *Ciencia e Investigación* 2009; 12(1): 15-23.
19. García J, Pariona C, Londoño R. Actividad antiinflamatoria in vitro de los polisacáridos sulfatados de *Patallus mollis* extraídos mediante digestión enzimática. *Rev Perú Med Integrativa.* 2017; 2(3):759-64.
20. Ramírez E. Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de Chuquiraga lessing "Huamanpinta" [Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
21. Metwally AM, Omar AA, Harraz FM, El Sohafy SM. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L leaves. *Pharmacogn Mag.* 2010; 6(23): 212-218.
22. Begum S, Hassan SI, Ali SN, Siddiqui BS. *Chemical* constituents from the leaves of *Psidium* L. guajava. *Nat Prod Res* 2004; 18(2): 135-140.
23. Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2da edición. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.

24. Chiclla N. Estudio fitoquímico y farmacológico de *Roripa nasturtium-aquaticum* “berro” [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2003.
25. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002; 18(1): 75-81
26. Drago M.E. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2007; 38(4): 42-47.
27. Middleton Jr. E., Kandaswami C. and Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*. 52(4); 673–751.
28. Tinco J.A. Farmacología básica y avanzada. 1ra edición. Huamanga: Editorial Dermofarm-Perú; 2014.
29. Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. Farmacología Básica y Clínica. 12a edición. México: Editorial MC Gran Hill; 2010.
30. Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *Rev. Anales de la Facultad de Medicina*. 1996; 57(4): 278-281
31. Fernandini L, Vera M. Ácido ascórbico en el desarrollo de sarcoma 180 de ratón. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
32. Ansari K. Enfermedades inducidas por radicales libres. *J Indian Med Assoc*. 1996; 94(6): 238-239.
33. Chavez R, Plaza A, Lock O. Antioxidantes de origen vegetal. *Revista de Química*. Vol. X. N°1. junio de 1996. Publicada por la sección de Química del Departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú
34. Bonamigo T, Ferreira J, Santos A, Vieira F, Perrella J, Lima C, et al. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. *PLoS ONE* 2017; 12 (9): 19-28.
35. Villar de Fresno M. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España. 1999.
36. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 5ta edición. México: Editorial McGraw-Hill; 1991.
37. Pérez E, Ettiene G, Marín M, Casassa A, Silva N, Raga J. Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de *Pisidium guajaba* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2014, 31: 60-77

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación botánica de *Psidium guajava* L "guayaba".
Ayacucho 2017.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE
"SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA"

C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Srta. Aglibertha, CHOQUE INFANZÓN**,
ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación
de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación
de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	MYRTACEAE
GENERO	:	Psidium
ESPECIE	:	<i>Psidium guajava</i> L.
N.V.	:	"guayaba"

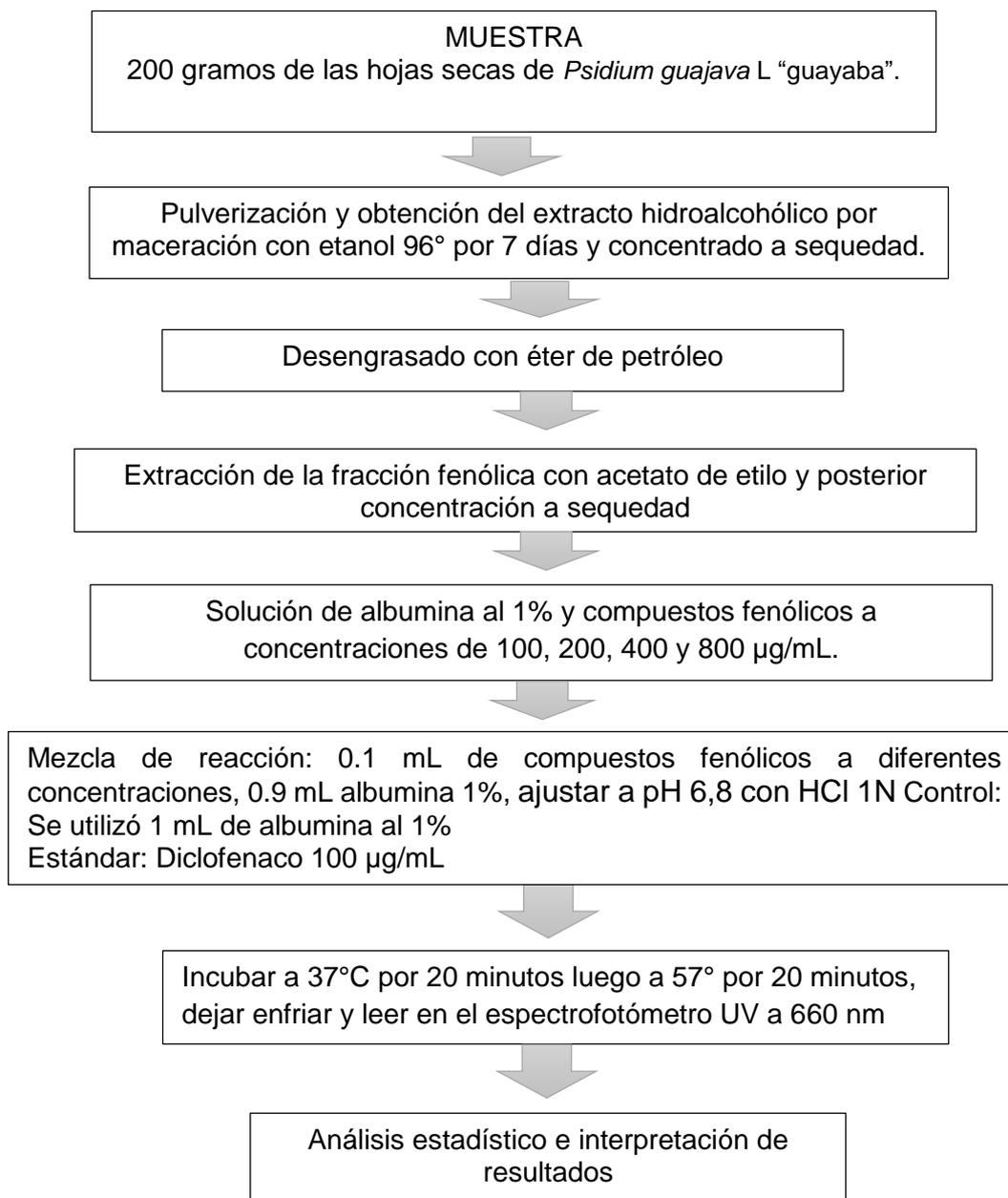
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para
los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 11 de Setiembre del 2017

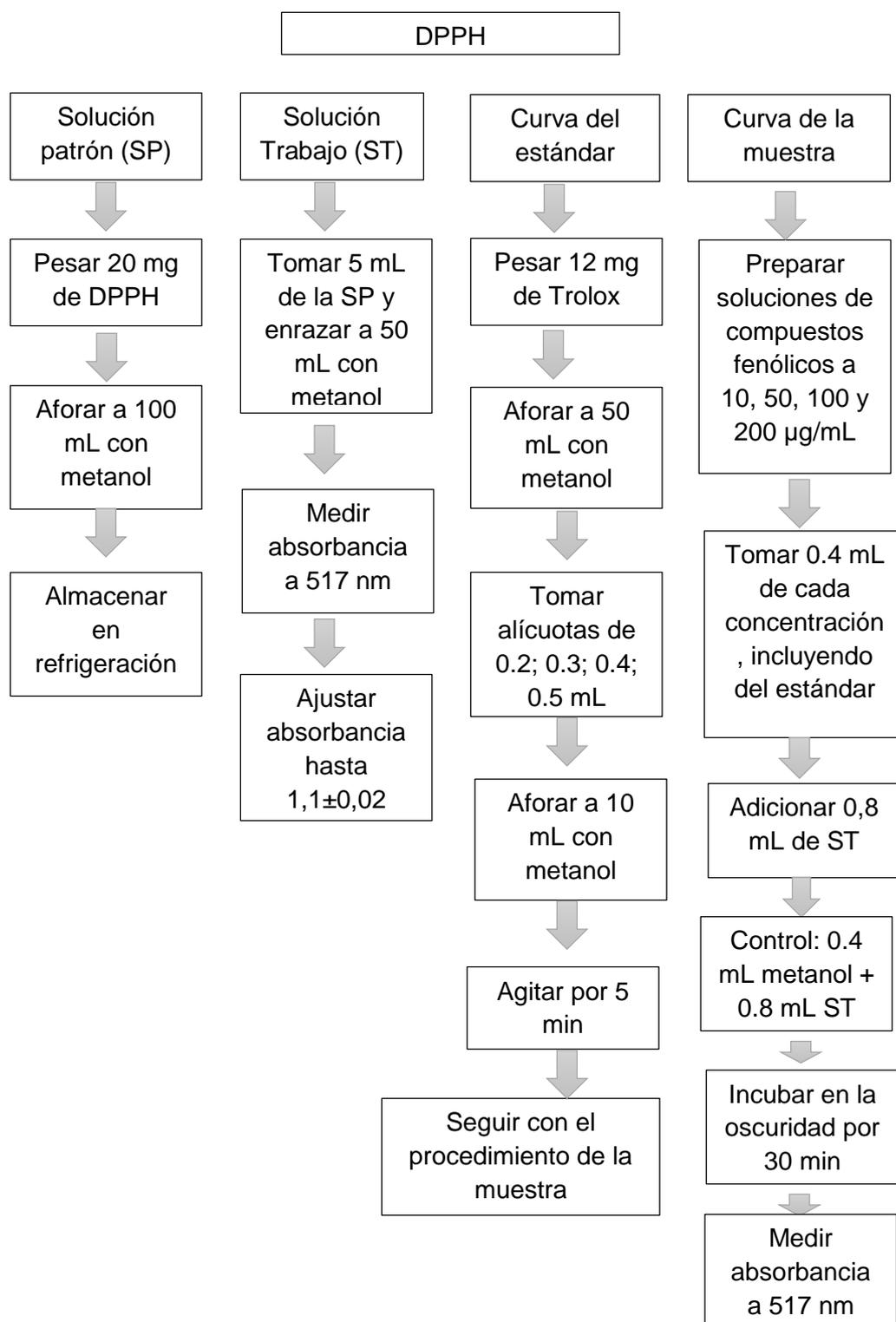
UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Dña. Lorena Rucanque Huarcas
JEFE

Anexo 2. Flujograma del procedimiento para la obtención de la fracción fenólica y determinación de la actividad antiinflamatoria de *in vitro* de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L "guayaba". Ayacucho 2018.



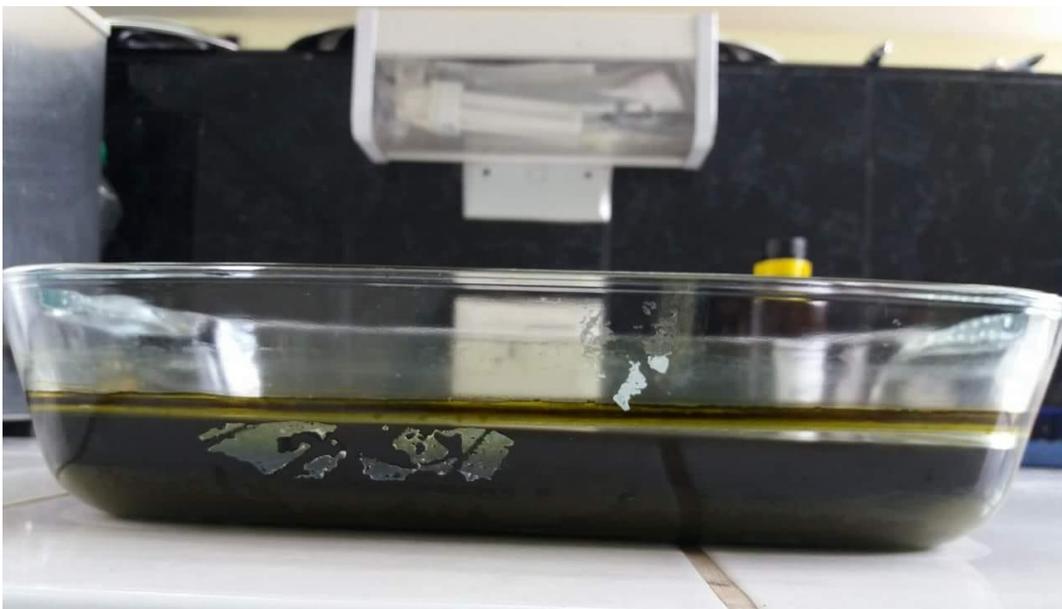
Anexo 3. Flujograma del procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por método DPPH de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”. Ayacucho 2018.



Anexo 4. Hojas recolectadas de *Psidium guajava* L “guayaba”. Ayacucho 2017.



Anexo 5. Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”. Ayacucho 2018.



Anexo 6. Desengrasado del extracto hidroalcoholico con éter de petróleo de las hojas de *Psidium guajava* L "guayaba". Ayacucho 2018.



Desengrasado con éter de petróleo en la pera de bromo



Recuperando el éter de petróleo en el rotavapor



Extracto desengrasado

Anexo 7. Extracción de la fracción fenólica con acetato de etilo de los extractos desengrasados de *Psidium guajava* L "guayaba". Ayacucho 2018.



Separación de la fracción de acetato de etilo



Concentrando la fracción de acetato de etilo en el rotavapor

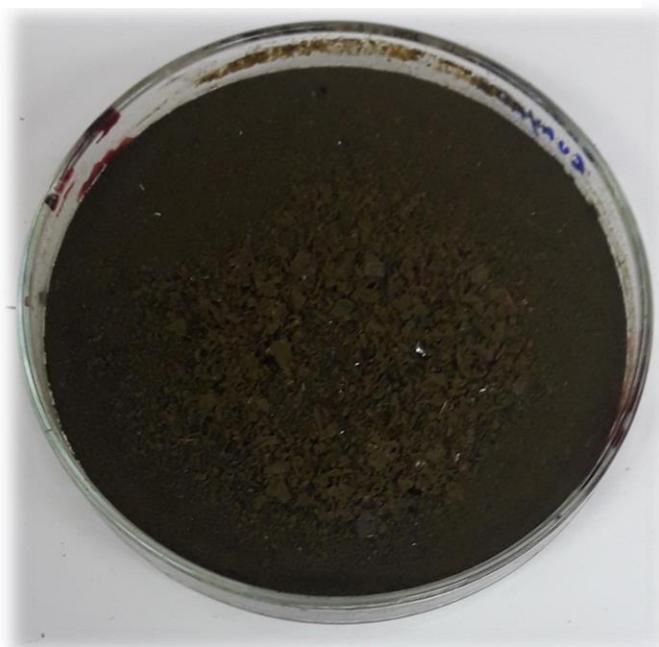


Fase de acetato de etilo concentrado

Anexo 8. Extracto seco (fracción fenólica) de *Psidium guajava* L “guayaba”, obtenidas en el Laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.



Raspado del extracto seco de *Psidium guajava* L “guayaba”



Extracto seco (fracción fenólica) de *Psidium guajava* L “guayaba”

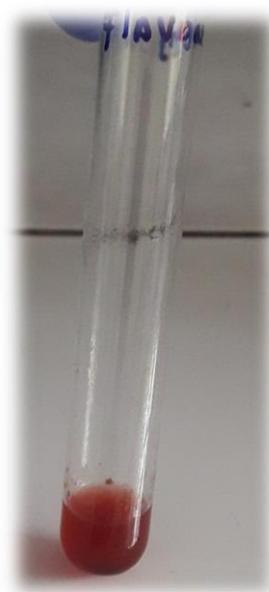
Anexo 9. Identificación de fenoles y flavonoides en los extractos aislados de *Psidium guajava* L “guayaba”, en el Laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.



Adicionando los reactivos respectivos para la identificación de fenoles (cloruro ferrico 5%) y flavonoides (magnesio metálico + HCl concentrado)

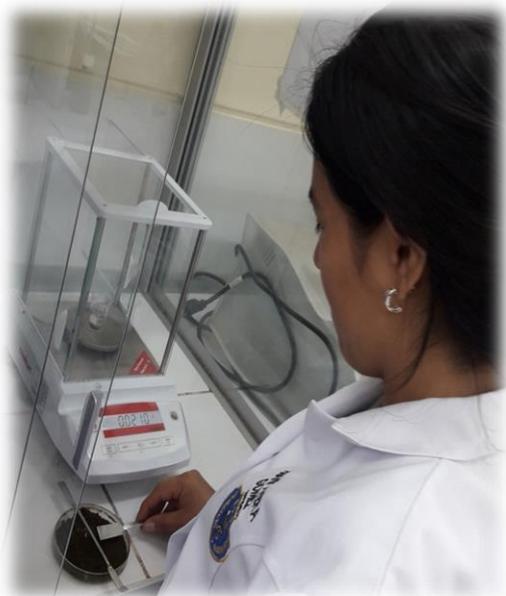


Coloración azul negruzca que indica la presencia abundante de fenoles



Coloración rosa a rojo ladrillo que indica la presencia abundante de flavonoides

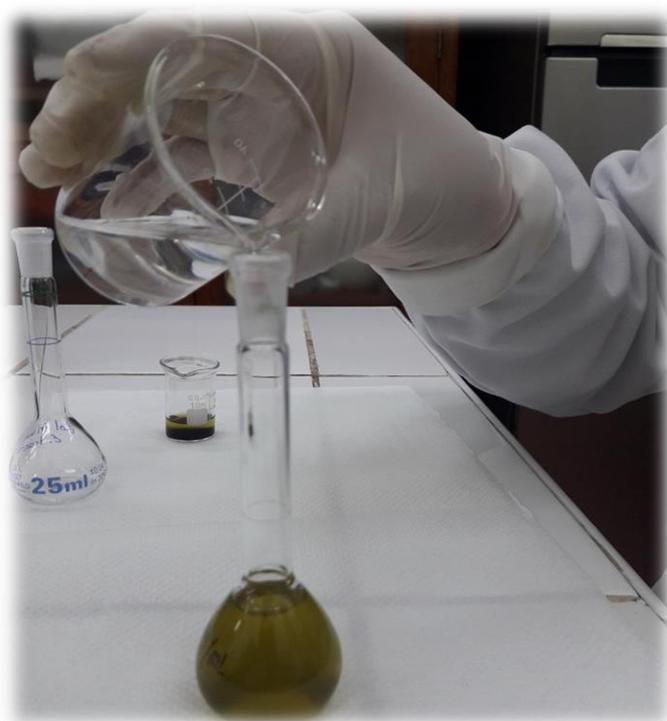
Anexo 10. Preparación de las soluciones de la fracción fenólica para la evaluación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante, en el Laboratorio de Toxicología. Ayacucho 2018.



Pesando el extracto aislado

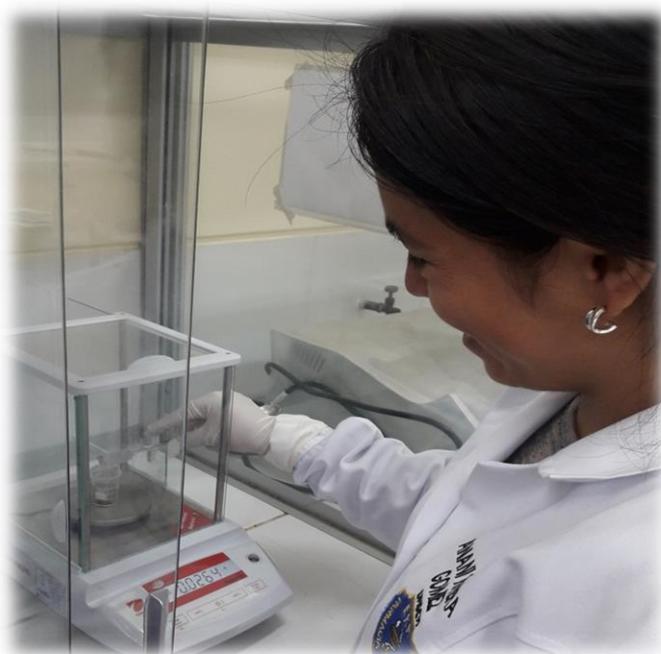


Diluyendo el extracto con metanol (antioxidante) y suero fisiológico (antiinflamatorio)



Enrazando a 50 mL con metanol para la actividad antioxidante y con suero fisiológico para la actividad antiinflamatoria

Anexo 11. Preparación de la albumina sérica bovina al 1%, DPPH 20 µg/mL, Trolox 12 mg/50mL, en el Laboratorio de Toxicología. Ayacucho 2018.



Pesando 20 mg de DPPH y 12 mg de Trolox



Solución de albumina sérica bovina al 1%

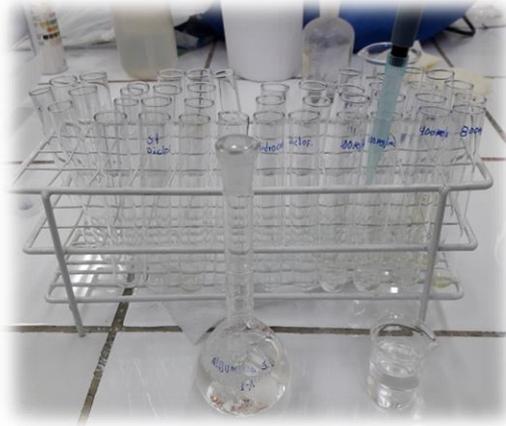


Solución patrón de DPPH (fiola) y Solución de trabajo 20 µg/mL (vaso precipitado)



Trolox en una dilución de 12 mg/50mL

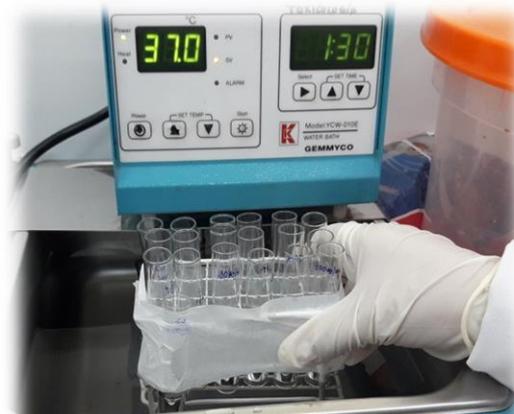
Anexo 12. Preparación de la mezcla de reacción (muestra, control y estándar) y determinación de la actividad antiinflamatoria in vitro, en los laboratorios de Farmacología y Toxicología. Ayacucho 2018.



Agregando a cada tubo de ensayo rotulado 0.1 mL de muestra, diclofenaco (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 0.9 mL de albumina 1%, el control tendrá 1 mL de albumina al 1%



Ajustando el pH 6,8 con HCl 1N

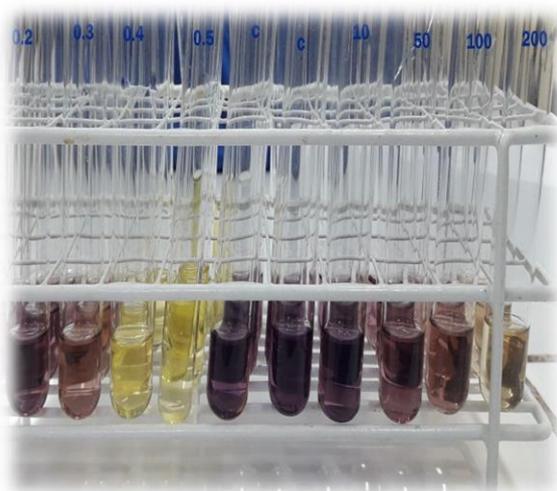


Incubando la mezcla de reacción a 37 °C durante 20 min y luego a 57 °C durante 20 min

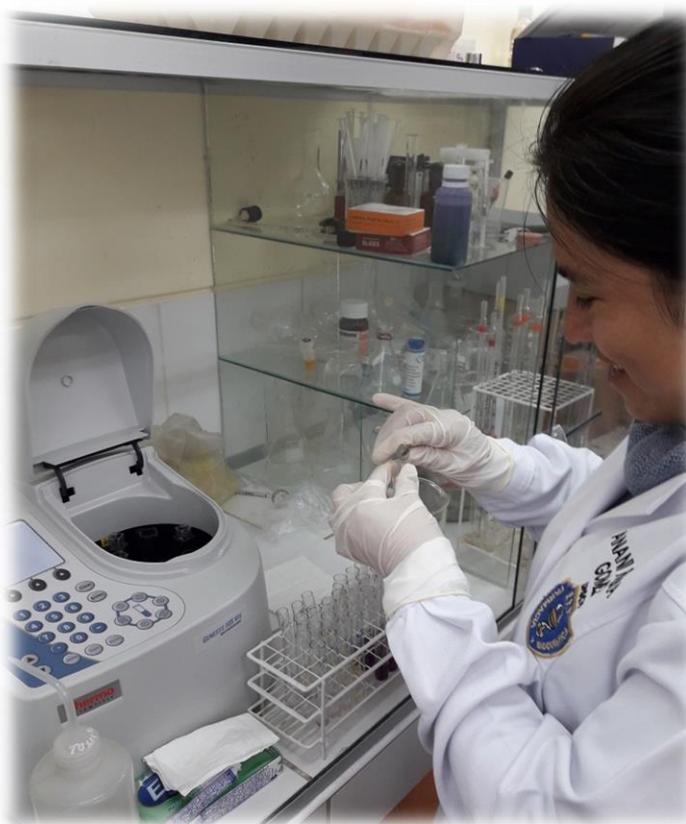
Se dejó enfriar la mezcla de reacción y luego se midió las absorbancias a 660 nm



Anexo 13. Preparación de la mezcla de reacción (muestra, control y estándar) y determinación de la actividad antioxidante in vitro, en los laboratorios de Farmacología y Toxicología. Ayacucho 2018.



Preparación de la mezcla de reacción de la muestra y del estándar.



Después de reposar 30 minutos en la oscuridad se procedió a medir las absorbancias a 517 nm.

Anexo 14. Porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina y capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”. Ayacucho 2018.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA			ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		
Concentración	Abs	Inhibición (%)	Concentración	Abs	Capacidad antioxidante (%)
Compuestos fenólicos			Compuestos fenólicos		
100 µg/mL	0,044	81,08	10 µg/mL	0,648	40,276
100 µg/mL	0,047	79,78	10 µg/mL	0,632	41,751
100 µg/mL	0,050	78,49	10 µg/mL	0,637	41,290
100 µg/mL	0,048	79,35	10 µg/mL	0,625	42,396
200 µg/mL	0,032	86,24	50 µg/mL	0,536	50,599
200 µg/mL	0,036	84,52	50 µg/mL	0,530	51,152
200 µg/mL	0,036	84,52	50 µg/mL	0,514	52,627
200 µg/mL	0,039	83,23	50 µg/mL	0,521	51,982
400 µg/mL	0,020	91,40	100 µg/mL	0,388	64,240
400 µg/mL	0,027	88,39	100 µg/mL	0,371	65,806
400 µg/mL	0,022	90,54	100 µg/mL	0,389	64,147
400 µg/mL	0,024	89,68	100 µg/mL	0,395	63,594
800 µg/mL	0,014	93,98	200 µg/mL	0,196	81,935
800 µg/mL	0,018	92,26	200 µg/mL	0,204	81,198
800 µg/mL	0,018	92,26	200 µg/mL	0,210	80,645
800 µg/mL	0,019	91,83	200 µg/mL	0,209	80,737
Diclofenaco			Trolox		
100 µg/mL	0,050	78,49	4,7 µg/mL	0,511	52,9
100 µg/mL	0,057	75,48	4,7 µg/mL	0,507	53,3
100 µg/mL	0,049	78,92	4,7 µg/mL	0,501	53,8
100 µg/mL	0,054	76,77	7,0 µg/mL	0,433	60,1
Control	0,233		7,0 µg/mL	0,441	59,4
			7,0 µg/mL	0,439	59,5
			9,3 µg/mL	0,306	71,8
			9,3 µg/mL	0,304	72,0
			9,3 µg/mL	0,312	71,2
			11,6 µg/mL	0,184	83,0
			11,6 µg/mL	0,191	82,4
			11,6 µg/mL	0,198	81,8
			Control	1,085	

Anexo 15. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina, para los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”. Ayacucho 2018.

ANOVA

% INHIBICIÓN	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	673,794	4	168,449	108,325	,000
Dentro de grupos	23,325	15	1,555		
Total	697,120	19			

Anexo 16. Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey del porcentaje de inhibición de la desnaturalización de albumina, para los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba” y Diclofenaco. Ayacucho 2018.

% INHIBICIÓN

HSD Tukey^a

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
DFC 100 µg/mL	4	77,4150		
C.F. 100 µg/mL	4	79,6750		
C.F. 200 µg/mL	4		84,6275	
C.F. 400 µg/mL	4			90,0025
C.F. 800 µg/mL	4			92,5825
Sig.		0,128	1,000	,067

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Anexo 17. Análisis de varianza de la capacidad antioxidante (%), para los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”. Ayacucho 2018.

ANOVA

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (%)	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5361,512	7	765,930	1496,323	,000
Dentro de grupos	10,238	20	,512		
Total	5371,750	27			

Anexo 18. Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey de la capacidad antioxidante (%), para los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L “guayaba”. y Diclofenaco. Ayacucho 2018.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (%)

HSD Tukey ^{a,b}

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
C.F. 10 µg/mL	4	41,4500					
C.F. 50 µg/mL	4		51,6000				
TROLOX 4,7 µg/mL	3		53,3333				
TROLOX 7,0 µg/mL	3			59,6667			
C.F. 100 µg/mL	4				64,4250		
TROLOX 9,3 µg/mL	3					71,6667	
C.F. 200 µg/mL	4						81,1000
TROLOX 11,6 µg/mL	3						82,4000
Sig.		1,000	,075	1,000	1,000	1,000	,303

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,429.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Anexo 19. Matriz de consistencia. Ayacucho 2017.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	MARCO TEORICO	VARIABLE	DISEÑO METODOLOGICO
Actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” Ayacucho 2017.	¿Tendrán actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”?	<p>Objetivo general. Determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Ayacucho 2017.</p> <p>Objetivos específicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar la presencia de fenoles y flavonoides en los extractos obtenidos de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Evaluar la actividad antiinflamatoria in vitro de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” a diferentes concentraciones. Evaluar la actividad antioxidante in vitro de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” a diferentes concentraciones. 	<p>Hi: Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” presentan actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i>.</p>	<p><i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Descripción botánica. Habitad y distribución Usos tradicionales Composición química. Compuestos fenólicos. Clasificación (ácidos fenólicos y flavonoides). Efectos farmacológicos. Inflamación. Inflamación aguda. Inflamación crónica Mediadores de la inflamación Fármacos antiinflamatorios. Antiinflamatorio no esteroideo Antiinflamatorios esteroideos Radicales libres y antioxidantes. Método para evaluar la actividad antiinflamatoria in vitro. método de inhibición de la desnaturalización de albumina Método para evaluar la actividad antioxidante. Actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo.</p>	<p>Variable independiente Compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Indicador: Extracto de 100, 200, 400 y 800 µg/mL. (actividad antiinflamatoria) 10, 50, 100 y 200 µg/mL (actividad antioxidante) Variable dependiente Actividad antiinflamatoria y antioxidante Indicador: % de inhibición de la desnaturalización de albumina y capacidad antioxidante (%).</p>	<p>Tipo de investigación: Experimental Población: Hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba” que crece a 730 msnm en el distrito de Santa Rosa en la provincia de La Mar. Tipo de muestreo: por conveniencia Muestra: 1 kg de hojas de <i>Psidium guajava</i> L “guayaba”. Unidad experimental: compuestos fenólicos aislados Aislamiento de los compuestos fenólicos (flavonoides): el aislamiento se realizará según la referencia bibliográfica de Aguilar E, Bonilla P. Determinación de la actividad antiinflamatoria: Se realizará por el método de inhibición de la desnaturalización de albumina. Determinación de la actividad antioxidante. Mediante el método de la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo. Análisis de datos: análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95% (p<0.05) y la prueba de Tukey.</p>

