

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos
aislados de las hojas de *Psidium guajava*L.
"guayaba". Ayacucho-2013.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

**PRESENTADO POR:
Bach.NALVARTE RUA, DALMA NERIA
AYACUCHO – PERÚ**

2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Dalma Neria NALVARTE RUA

R.D.N° 075-2014-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las 10:00 am del día 24 de julio de 2014, en el local del Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se reunieron los miembros del jurado evaluador, conformado por: Dr. Segundo Tomás Castro Carranza (Presidente), Dr. Jesús De La Cruz Arango (Miembro), Dr. Edwin Enciso Roca (Miembro), Mg. Enrique Aguilar Felices (Asesor), Q.F. Hugo Luna Molero con la finalidad de recepcionar la Tesis titulada " Actividad Antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba", Ayacucho-2013, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Srta. Dalma Neria Nalvarte Rua para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica.

El Sr. Decano, una vez visto los documentos sustentatorios de lo solicitado, y estando conforme, se invitó a la sustentante a dar inicio a la sustentación del tema en un tiempo no mayor de 45 minutos, inmediatamente, la sustentante inicio la exposición, concluida con la exposición, el Decano invito a los miembros del jurado calificador a que realicen sus interrogantes, pidan aclaración a lo que vean por conveniente con la sustentante, concluida la sección de preguntas, las mismas que fueron respondidas, el Decano invito a los asistentes y ala sustentante a que abandonen momentáneamente el local con la finalidad de que los miembros del jurado evaluador puedan discernir la calificación.

A continuación, los miembros hicieron su calificación con el siguiente resultado:

Jurado Evaluador	Exposición	Respuestas	Promedio
Dr. Jesús De La Cruz Arango	17.0	16.0	17.0
Dr. Edwin Carlos Enciso Roca	17.0	17.0	17.0
Mg. Enrique Javier Aguilar Felices	17.0	17.0	17.0
Q.F. Hugo Roberto Luna Molero	17.0	17.0	17.0
Dr. Segundo Tomás Castro Carranza	16.0	16.0	16.0
		Promedio	17.0

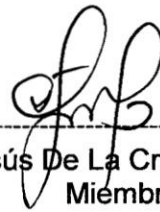
De la calificación efectuada por los miembros del jurado calificador se tiene el promedio de Diecisiete (17.0) que es Aprobado de lo cual dan fe los miembros del jurado evaluador firmando al pie de la presente.

Acto seguido, invitaron a la sustentante y al público presente a ingresar al ambiente para dar a conocer el resultado de la calificación, luego del cual se le tomó el juramento de Ley.

Se culminó el acto siendo las 11:50 am del 24 de julio de 2014, firmando al pie de la presente los miembros del jurado calificador como constancia del acto.



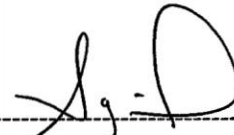
Dr. Segundo Tomás Castro Carranza
Decano



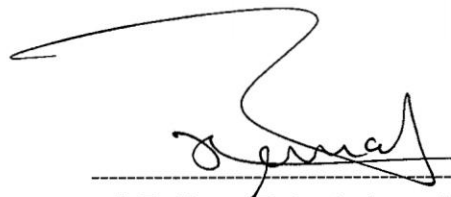
Dr. Jesús De La Cruz Arango
Miembro



Dr. Edwin Carlos Enciso Roca
Miembro



Mg. Enrique Javier Aguilar Felices
(Miembro Asesor)



Q.F. Hugo Roberto Luna Molero
Miembro - Secretario

DEDICATORIA

A Dios, a mi madre y mis hermanos.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; por brindarme una formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, y en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica.

A todos los Docentes de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica quienes contribuyeron con mi formación académica. A mi asesor Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices por compartir sus conocimientos y dedicadas orientaciones que hicieron posible el desarrollo y culminación de esta investigación.

A todas las personas que colaboraron para la culminación del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba"	5
2.3. Compuestos fenólicos	8
2.4. Radicales libres	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	16
3.2. Definición de población y muestra	16
3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos	16
3.3.1. Recolección de muestra	16
3.3.2. Preparación del extracto etanólico	17
3.3.3. Tamizaje fitoquímico	17
3.3.4. Extracción de compuestos fenólicos	17
3.3.5. Identificación de compuestos fenólicos	17
3.3.6. Aislamiento de compuestos fenólicos	18
3.4. Determinación de la actividad antioxidante	19
3.4.1. Método de capacidad secuestradora del radical DPPH	19
3.5. Análisis de datos	21
IV. RESULTADOS	22
V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIONES	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	23
Tabla 2. Características químicas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	24
Tabla 3. Características cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	25
Tabla 4. Características espectrales de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Flavonoides aislados de <i>Psidium guajava</i> L.	7
Figura 2. Estructura de los ácidos benzoicos	10
Figura 3. Estructura de los ácidos cinámicos	10
Figura 4. Núcleo básico de los flavonoides	11
Figura 5. Clasificación de flavonoides	12
Figura 6. Reacción de reducción del DPPH	19
Figura 7. Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH por efecto de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba" en comparación con el ácido caféico y la vitamina C. Ayacucho - 2013	27

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	39
Anexo 2. Flujograma de la obtención de los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	40
Anexo 3. Recolección de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L "guayaba" en la provincia de Huanta Ayacucho - 2013	41
Anexo 4. Equipo de rotavapor para la concentración del extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba"	42
Anexo 5. Tubos de ensayo del tamizaje fitoquímico, reacción de Shinoda y cloruro férrico del extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho-2013	43
Anexo 6. Extracción líquido-líquido para la obtención de compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	44
Anexo 7. Pruebas químicas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	45
Anexo 8. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba" (I), ácido clorogénico (II), quercetina (III) y ácido caféico (IV) revelado con luz ultravioleta. Ayacucho - 2013	46
Anexo 9. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba", revelados con cloruro férrico al 5%. Ayacucho - 2013	47
Anexo 10. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba", revelados con DPPH. Ayacucho - 2013	48
Anexo 11. Cromatografía en capa fina y recuperación de fracciones de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	49
Anexo 12. Curva espectral de la fracción F1 aislado de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	50
Anexo 13. Curva espectral de la fracción F2 aislado de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	51

Anexo 14.	Curva espectral de la fracción F3 aislado de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	52
Anexo 15.	Curva espectral del estándar de ácido benzoico. Ayacucho - 2013	53
Anexo 16.	Curva espectral de la quercetina. Ayacucho - 2013	54
Anexo 17.	Porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH por efecto de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba" en comparación con el ácido caféico y la vitamina C. Ayacucho - 2013	55
Anexo 18.	Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Ayacucho - 2013	56
Anexo 19.	Matriz de consistencia. Ayacucho - 2013	57

RESUMEN

Los compuestos fenólicos tienen propiedades biológicas como antiinflamatorias, antihipertensivas y antioxidantes y se encuentran ampliamente distribuidas en muchas especies vegetales. Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres. El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de determinar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba", como objetivos identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas, caracterizar mediante pruebas espectrales en el ultravioleta y evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba". sobre el radical libre del DPPH, durante los meses de agosto del 2013 a enero del 2014. La muestra fue recolectada en la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, obteniéndose los compuestos fenólicos a partir de un extracto etanólico, con solventes de diferente polaridad, realizándose su identificación mediante ensayos cualitativos, cromatográficos y espectrales. La actividad antioxidante se realizó por el método de secuestro del radical libre DPPH. Se identificó la presencia de azúcares reductores, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, fenoles y/o taninos y triterpenos. Los compuestos fenólicos fueron caracterizados como ácido fenólico y flavonoides derivados de la quercetina. La actividad antioxidante fue de 98,30% a la concentración de 100 µg/mL, comparable al ácido caféico (100%) y el ácido ascórbico (100%). Se concluye que los compuestos fenólicos aislados tienen actividad antioxidante.

Palabras clave: *Psidium guajava* L, compuestos fenólicos, antioxidante

I. INTRODUCCIÓN

A pesar del enorme progreso habido en los últimos años en el desarrollo de nuevos fármacos, la mayoría de ellos siguen presentando efectos secundarios, por lo que la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces y seguros sigue siendo una parte importante de la investigación farmacéutica. En este sentido, el reino vegetal continúa siendo una fuente interesante de nuevos agentes farmacológicos, ya que existen múltiples plantas medicinales que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios con variadas aplicaciones. Dado que nuestro país posee una enorme diversidad de plantas medicinales debido a sus diferentes ecosistemas, representa en gran medida, una rica fuente de alternativas de tratamiento de diversas enfermedades. Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tiene que ver en la iniciación en algunas enfermedades degenerativas.¹ Actualmente el estudio de alimentos con propiedades antioxidantes ha aumentado considerablemente debido al interés que se tiene sobre los efectos benéficos a la salud que previenen dichos compuestos, tales como la prevención de cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio. Además de que el

consumo frecuente de antioxidantes se relaciona con la disminución de otras enfermedades como diabetes y enfermedades coronarias.²

Los compuestos fenólicos son constituyentes importantes de la planta y les otorga múltiples efectos benéficos, estos compuestos presentan una amplia gama de actividades biológicas incluyendo la actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antihipertensiva y efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares, además pueden ejercer efectos antioxidantes como el secuestro de radicales libres, donan moléculas de hidrogeno, barren moléculas de superóxido, quelan metales de transición; todas estas propiedades se deben principalmente al grupo hidroxilo presente en su anillo estructural.¹

Por otro lado, la ingesta de frutas y vegetales está asociada con bajas incidencias de enfermedades degenerativas. Estos efectos protectores están asociados a los compuestos antioxidantes que contienen los alimentos, frutas de climas tropicales y subtropicales. Hay muchos estudios sobre la acción de compuestos fenólicos en alimentos que previenen el cáncer y enfermedades cardiacas. Estos compuestos son preferentemente oxidados en el medio biológico y funcionan como nutrientes antioxidantes, protegiendo al organismo contra el estrés oxidativo.³

La guayaba es un fruto exótico proveniente de la región tropical y subtropical del mundo. En la Amazonía peruana la guayaba es un fruto nativo, que es ampliamente conocido por su alta calidad nutricional y por sus diversas propiedades funcionales, entre las que se encuentran su actividad antiinflamatoria, actividad analgésica, actividad antipirética, actividad espasmolítica, actividad antibacterial y la actividad antioxidante.⁴

Por todas estas consideraciones y con el propósito de generar conocimiento acerca de las propiedades de esta especie, es necesario conocer la actividad

antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba", con los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba".

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba".
- Caracterizar los compuestos fenólicos de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba".
- Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba". sobre el radical libre del DPPH.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

García y col en el año 2012 evaluaron la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y flavonoides aislados de los extractos de seis colectas de flores de *Crataegus spp.* La actividad antioxidante se midió con el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y los flavonoides se identificaron con HPLC-MS. La quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-ramnósido, quercetina 3-O-ramnosil-(1→6)-glucósido y quercetina 3-O-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-glucósido fueron identificadas. Usando la prueba de DPPH con capacidad de barrido de radicales, las recolectas 52 y 77 mostraron la mayor actividad antioxidante ($IC_{50} = 431,1 \pm 27,2$ y $555,4 \pm 8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).⁵

Gutiérrez y col en el año 2008 determinaron el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos de plantas usadas en la alimentación animal. Los resultados de la actividad antioxidante indican que todos los extractos fueron capaces de atrapar radicales DPPH de una manera dependiente de la concentración. La actividad antioxidante de cada tipo de planta expresada como concentración inhibidora media (IC_{50}). *Desmodium molliculum* mostró la más fuerte actividad antioxidante con una IC_{50} de 221,30 $\mu\text{g/mL}$ comparada con la *Ipomea purpurea* la cual presentó la más baja

capacidad de atrapar radicales DPPH con una IC₅₀ de 1963,36 µg/mL.⁶

Espinal en el año 2010 en estudios anteriores realizados en frutos y hojas de guayaba se realizó la identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos asociados a la actividad antioxidante. En estos estudios se encontró que los principales compuestos polifenólicos que contribuyen a la actividad antioxidante de las hojas y de los frutos de la guayaba fueron la quercetina, quercetin-3-glucósido, morina, y los ácidos protocatéquico, elágico, gálico y clorogénico, siendo estos compuestos los patrones empleados para realizar la identificación preliminar y la cuantificación de los compuestos polifenólicos presentes en el fruto de guayaba.⁷

2.2 *Psidium guajava* L. “guayaba”

2.2.1 Clasificación taxonómica

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	MYRTACEAE
GÉNERO	:	<i>Psidium</i>
ESPECIE	:	<i>Psidium guajava</i> L.
NOMBRE COMÚN	:	“guayaba”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas (2013) (Anexo 1).

2.2.2 Descripción botánica

Árbol de 6 m, de tronco torcido y ramoso de corteza liza y parda; hojas verdes, opuestas, peciolo corto, elípticas, redondas en el ápice y en la base, múltiples venas horizontales, provistas de glándulas oleíferas; flores actinomorfas,

blancas, solitarias o en pequeños grupos, que aparecen en las axilas de las hojas, tienen 4-5 pétalos y numerosos estambres; fruto en baya redondeada con el cáliz de la flor persistiendo, aromáticos, piriformes, cáscara amarilla, carnaza rosada, por fuera firme, al centro suave, con pulpa jugosa y semillas color café, redondas y duras.^{8,9}

2.2.3 Distribución

La familia Myrtaceae posee alrededor de 131 géneros y unas 4620 especies, el género *Psidium* está ampliamente distribuido en regiones tropicales como Panamá, Brasil, Colombia, Ecuador, y Perú.¹⁰

En la Amazonía peruana la guayaba es un fruto nativo y no tiene plantaciones establecidas.⁴ El árbol puede encontrarse silvestre o cultivado en tipos de vegetación que van desde áreas cultivadas pasando por bosques de encino, bosques de pino-encino, hasta la selva alta perennifolia. Los suelos donde se desarrolla esta especie son principalmente poco drenados y calizos en altitudes que van de 850 a 1700 m.¹¹

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. 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- α -D-glucósido, quercetin-3-O- β -D-glucuronopiranosido, 1-O-galoil- α -D-glucosa. Se ha informado la presencia de ácido ascórbico y de otros flavonoides, así como azúcares reductores y alcaloides.¹²

En estudios fitoquímicos realizados en el fruto se determinó la presencia de polifenoles, taninos, terpenos, glicósidos esteroidales, antraquinonas; en la raíz se encontró leucoantocianinas, esteroides y ácido gálico. La corteza contiene 10% de elagitaninos (4 - 6 hexahidroxidifenilglucosa, telimagrandina I y II, peduncularina,

casuarinina, estaquicerina, estrictinitinina, casuarina). El extracto etanólico de flores contiene ácido oleanólico, ácido elágico, quercetina y glicósidos flavonoides (guajaverina).⁹

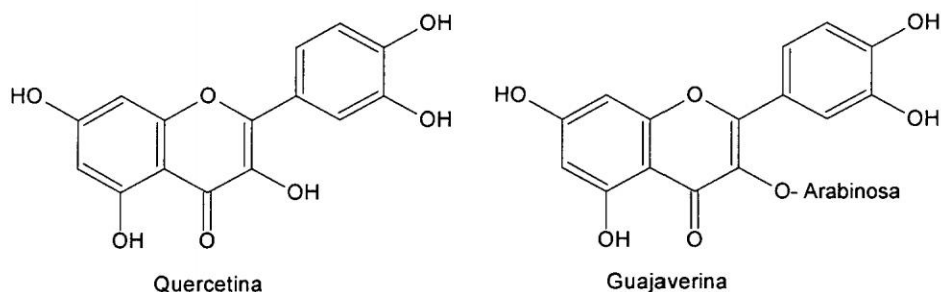


Figura 1. Flavonoides aislados de *Psidium guajava*^{9, 11}

De *Psidium guajava* se aislaron una nueva benzofenona y un flavonol de naturaleza galoil-glicósido, conjuntamente con 5 nuevos quercetin-glicósidos. Se ha informado el aislamiento de 16 nuevos flavonoides y de 4 nuevos triterpenos.¹² En las hojas también se determinó la presencia de flavonoides derivados de quercetina como guajaverina y avicularina, debido a que en estudios realizados en la que se han aislado flavonoides como la quercetina.⁹

En estudios anteriores realizados en frutos y hojas de guayaba de variedades desconocidas se realizaron la identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos. En estos estudios se encontró que los principales compuestos polifenólicos de las hojas y de los frutos de la guayaba fueron la quercetina, quercetina-3-glucosido, morina, y los ácidos protocatéquico, elágico, gálico y clorogénico.¹³

2.2.5 Usos tradicionales

La decocción de hojas y corteza se usa por vía oral para tratar afecciones digestivas (amebiasis, diarrea, disentería, cólico, dolor de estómago, parasitismo intestinal, vómito), anemia, artritis, diabetes, hemorragia, hinchazón, asma y resfío. La decocción de raíz se usa para tratar hidropesía. La decocción por vía tópica en

baños y lavados para tratar enfermedades dermatomucosas (fístulas, leucorrea, raspones, tinea, úlcera) y enjuagues para lengua inflamada.⁹

2.3 Compuestos fenólicos

Son metabolitos secundarios producidas por todas las plantas, un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glicósidos, 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 una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico.¹⁴

Actualmente el, interés en los compuestos antioxidantes (fenólicos) ha aumentado debido a la evidencia con respecto al papel importante de estos compuestos antioxidantes en la salud humana. Específicamente se han encontrado varios efectos preventivos en diferentes enfermedades como la prevención de cáncer, las enfermedades coronarias del corazón, los desórdenes inflamatorios, la degeneración neurológica, envejecimiento, etc.² Además estos compuestos fenólicos son utilizados para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desordenes cardiovasculares debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio, mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar.¹⁵

Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante, considerado la actividad biológica responsable del efecto preventivo sobre algunas enfermedades y el mecanismo por el que actúan reside en su capacidad para captar radicales libres que se pueden generar en las células del cuerpo humano y que son resultado de la combinación de muchos factores ambientales.¹⁶ Así, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto

contenido en estos compuestos, supone una disminución en la utilización de aditivos antioxidantes de origen sintético.¹⁷

2.3.1 Clasificación

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química tenemos dos grandes grupos:

Ácidos fenólicos

Derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3.¹⁸

Flavonoides (C6-C3-C6)

Formados por dos grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado, antocianos, isoflavonas, flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles, taninos condensados y lignanos.¹⁸

2.3.2 Ácidos fenólicos

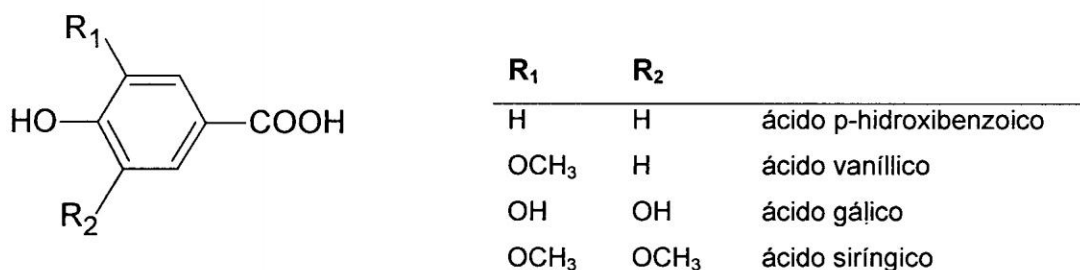
Estos compuestos tienen una función carboxílica y un grupo hidroxílico fenólico, estos compuestos derivan del ácido benzoico (anisaldehído, vanillina, ácido verátrico, ácido anísico, ácido gálico,) y del ácido cinámico (clorogénico, cafeico, ferúlico y sináptico, p-cumarico, elágico).¹⁹ Algunos autores afirman que el ácido elágico tiene como función detectar y restaurar células carentes del gen P53, gen encargado de la apoptosis y del control de la proliferación celular responsable del cáncer.¹⁰

Los ácidos fenólicos tienen propiedades antisépticas urinarias, propiedades antiinflamatorias de los derivados salicílicos. 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.²⁰

Los ácidos fenólicos tienen gran importancia debido a su amplia actividad biológica como son: antioxidantes, antivirales, antitumorales, antifúngicos, antimutagénicos, hepatoprotectores, antiinflamatorias e inmunoestimulantes. La

actividad antioxidante de los ácidos fenólicos denominados ácidos de serie cinámica son más activos que los derivados hidroxil del ácido benzoico debido a que poseen grupos OH y carbonilo no unidos directamente al anillo bencénico.²¹

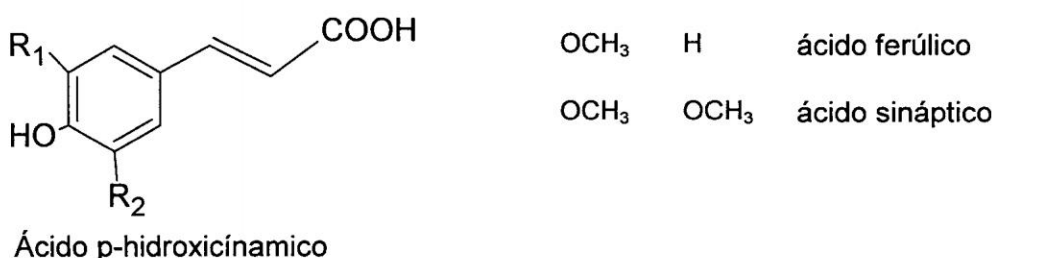
• **Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico**



Ácido p-hidroxibenzoico

Figura 2. Estructura de los ácidos benzoicos ¹⁹

• **Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico**



Ácido p-hidroxicínamico

Figura 3. Estructura de los ácidos cinámicos ¹⁹

2.3.3 Flavonoides

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzopirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas

vasculares, en forma de glicósidos. Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6, los cuales pueden formar o no un tercer anillo.²²

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. Estos contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que tienen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma).²³

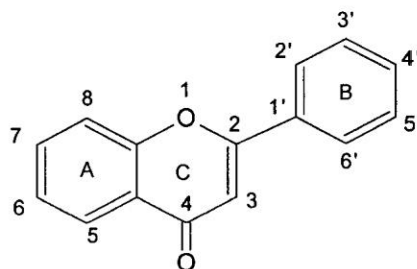


Figura 4. Núcleo básico de los flavonoides ²³

2.3.4.1 Clasificación

Los flavonoides se clasifican en varios grupos de acuerdo con las variantes estructurales que presentan: flavonas, flavonoles, flavanoles, isoflavonas y antocianidinas. Como se muestra en la Figura 5.

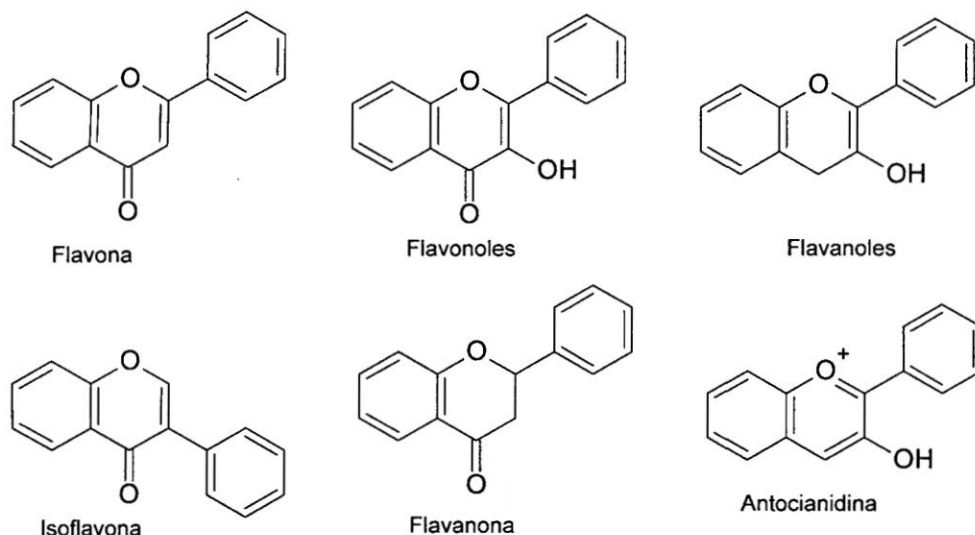


Figura 5. Clasificación de flavonoides ²⁴

2.3.4.2 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque en ocasiones también pueden promover reacciones de oxidación *in vitro*.² Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura química resultante que soporta un electrón desapareado. La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contienen en su estructura.²⁵

Para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas:

- Cuando se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre.
- El radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores.²

2.4 Radicales libres

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos. Como producto de nuestro metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres, tales como: Especies Reactivas de Oxígeno (ERO: el anión superóxido, el anión peróxido, el radical perhidroxilo, el radical hidroxilo) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN: óxido nítrico, radical peroxinitrito), entre otros, cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico, además cumplen numerosas funciones útiles en el organismo (de hecho, nuestro propio cuerpo los fabrica en cantidades moderadas para luchar, por ejemplo, contra las infecciones), pero en cantidades excesivas tienen el potencial de dañar nuestras células y el material genético allí contenido.^{26,27}

Los radicales libres también son generados por factores como: la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas, las cuales pueden ejercer su acción nociva en el organismo. En condiciones fisiológicas normales, el organismo neutraliza las ERO a través de varios mecanismos antioxidantes que involucran la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otras, para prevenir el daño oxidante.²⁶

2.4.1 Formación de los radicales libres

a) Fuentes endógenas: Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Al elevarse las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden acarrear importantes alteraciones funcionales.²⁸

b) Fuentes exógenas: los radicales libres se producen como respuesta a la: Contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, ciertas drogas, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, reactivos, solventes industriales, componentes del tabaco, los medicamentos.²⁸

2.4.2 Especies reactivas del oxígeno (ERO)

El oxígeno molecular (O_2) tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, su reactividad resulta de esta propiedad biradical. Debido a su labilidad química, puede dar origen a ERO, que son moléculas muy reactivas, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción.^{26, 29}

Las principales especies reactivas del oxígeno son:

- Radical hidroxilo (HO°)

- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O°_2)
- Oxígeno singlete ($^{\circ}O_2$)
- Peróxido (ROO°).²⁹

2.4.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición que se manifiesta en el organismo cuando la producción de sustancias altamente reactivas supera los mecanismos antioxidantes y está relacionada con numerosas enfermedades como cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares.²⁶

2.4.4 Sistema de protección antioxidante

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente—membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular.³³ El antioxidante al reaccionar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico.³⁰

2.4.5 Clasificación de los antioxidantes

- **Exógenos:** vitamina E, vitamina C, beta caroteno, flavonoides, licopenos.
- **Endógenos:** glutatión, coenzima Q, ácido tioctico.
- **Cofactores:** cobre, zinc, manganeso, hierro, selenio.²⁷

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo de Investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Farmacognosia y Farmacología del Área académica de Farmacia de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de agosto del 2013 a enero del 2014.

3.2 Definición de la población y muestra

Población: Hojas de *Psidium guajava* L. “guayaba” de la provincia de Huanta, departamento Ayacucho.

Muestra: Un kg de hojas secas de *Psidium guajava* L. “guayaba”.

3.3 Diseño metodológico para la recolección de datos

3.3.1 Recolección de la muestra

Se procedió a recolectar las hojas sanas y frescas de una sola planta de *Psidium guajava* L. “guayaba”, mediante un muestreo por conveniencia (Anexo 3), para luego lavarlos con la finalidad de eliminar posibles contaminantes, después se procedió al secado a medio ambiente durante siete días, después se trituró con un molino; una parte de la planta con hojas y flor fue utilizada para la identificación taxonómica en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Biológicas (Anexo 6).

3.3.2 Preparación del extracto etanólico

Un kg de muestra seca y molida se maceró en frascos de color ámbar por un período de una semana en nueve litros de alcohol de 96° cuyo volumen cubrió la muestra. Durante el proceso se agitó mecánicamente el frasco para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se procedió a filtrar, concentrar en un rotavapor y luego en una estufa a 40°C, hasta obtener un extracto seco (Anexo 4).

3.3.3 Tamizaje fitoquímico

La identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios se realizó mediante ensayos de coloración y precipitación ³¹ (Anexo 5).

3.3.4 Extracción de los compuestos fenólicos

El extracto etanólico seco se reconstituyó con agua destilada y se trató con 300 ml de éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que puedan interferir con la extracción de los compuestos fenólicos. La extracción líquido-líquido se realizó con 300 ml de acetato de etilo en un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo donde se encuentra los compuestos fenólicos ³² (Anexo 6).

3.3.5 Identificación de compuestos fenólicos

Pruebas cualitativas.

- Reactivo de cloruro férrico: Se añadió unas gotas de cloruro férrico, sobre la fracción de acetato de etilo.
- DPPH 2 mg%: Se añadió unas gotas de DPPH, sobre la fracción de acetato de etilo.
- Permanganato de potasio: Se añadió unas gotas de permanganato de potasio, sobre la fracción de acetato de etilo (Anexo 7).

Cromatografía en capa fina (CCF)

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: butanol: ácido acético: agua (4:1:5)
- Volumen de inyección: 20 µl
- Revelador: Luz ultravioleta, cloruro férrico y DPPH.

La fracción de acetato de etilo se disolvió en 0,5 ml de metanol y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica previamente activada (fase estacionaria), se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente butanol: ácido acético: agua (4:1:5) no sobrepase a la muestra aplicada y dejándose que el líquido ascienda por capilaridad. Posteriormente se procedió a sacar la placa cromatográfica teniendo en cuenta que el solvente haya llegado hasta los 2 cm de la parte superior de la placa, se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se observó con la lámpara UV CAMAG la presencia de fluorescencia (Anexo N° 8), finalmente se reveló con cloruro férrico al 1% y DPPH y se observó la presencia de manchas (Anexo 9 y 10).

3.3.6 Aislamiento de los compuestos fenólicos

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 5 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: butanol: ácido acético: agua (4:1:5)

La siembra de la fracción de acetato de etilo se realizó en bandas con el propósito de aislar los compuestos fenólicos, los cuales se evidenciaron en la luz

ultravioleta. Estas bandas fueron recuperados, disueltos en metanol y filtrados, obteniéndose tres bandas (anexo 11).

Pruebas espectrales

Las bandas obtenidas fueron leídas en el espectrofotómetro ultravioleta GENESYS 6, en el rango de 200 a 500 nm, registrándose los máximos picos de absorción.

3.4 Determinación de la actividad antioxidante

3.4.1 Método de la capacidad secuestradora del radical DPPH

Fundamento: El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa. Se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre en toda la molécula, de manera que las moléculas no dimerisen, como en el caso de la mayoría de otros radicales libres. La deslocalización también da lugar a un color violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción en solución de etanol a aproximadamente 517 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de este color violeta.³³

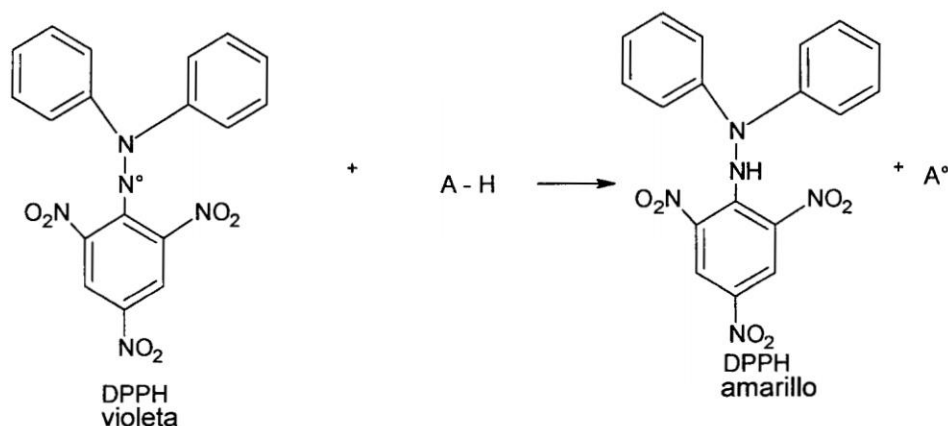


Figura 6. Reacción de Reducción del DPPH³³

Procedimiento:

Para el ensayo se utilizó lo siguiente:

- Una solución metanólica de DPPH de 20 µg/l.
- Una solución metanólica del extracto a una concentración de 300 µg/ml (solución A)
- Una solución blanco de metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- Un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) más 1,5 ml de metanol.
- Un patrón de referencia con 1,5 ml de DPPH más 0,75 ml de agua destilada.
- La muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml.
- Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 para obtener una solución final de 50 µg/ml (solución B) y luego en una proporción de 1:9, para obtener una concentración final de 10 µg/ml (solución C).
- Con la solución B y C se procedió igual que el anterior.
- Para la comparación, el estándar Vitamina C y ácido caféico, se preparó siguiendo el mismo procedimiento que conlleva a lograr concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.

Para los cálculos del porcentaje de actividad antioxidante se empleó la siguiente fórmula:

$$AA\% = \frac{Ac - (Am - Ab)}{Ac} \times 100$$

Dónde:

AA%: porcentaje de actividad antioxidante.

Ac: Absorbancia del DPPH.

Am: Absorbancia de la muestra.

Ab: Absorbancia del blanco.

3.5 Análisis de datos

Los resultados de la actividad antioxidante se representaron en forma de gráficos en función de las medias. Las diferencias entre las medias fueron contrastadas mediante el Análisis de Varianza Factorial (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Azúcares reductores	Benedict	++	Precipitado rojo
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado rojo
Flavonoides	Shinoda	+++	Fase amílica de color rojo intenso
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde intensa
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	+	Coloración verde oscura

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 2. Características químicas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

Fracción	Prueba de FeCl ₃ 5%	Prueba de KMnO ₄	DPPH	Características		
				FeCl ₃	KMnO ₄	DPPH
Acetato de etilo	+++	+++	+++	verde oscuro	decolora, precipita	decolora

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 3. Características cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

Fracción	Revelador		
	Fluorescencia	FeCl ₃	DPPH
Acetato de etilo	(violeta – púrpura)	marrón	Amarillo
Ac. clorogenico	Celeste	marrón	Amarillo
Ac. Caféico	Celeste	marrón	Amarillo
Quercetina	Amarillo	marrón	Amarillo

Tabla 4. Características espectrales de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

Fracción	Sub-fracciones	Ultravioleta (nm)
Acetato de etilo	F1(verde - celeste)	292 nm
	F2 (marrón - oscuro)	257 nm y 359 nm
	F3 (violeta - púrpura)	259 nm y 356 nm
Acido benzoico		230 nm y 270 nm

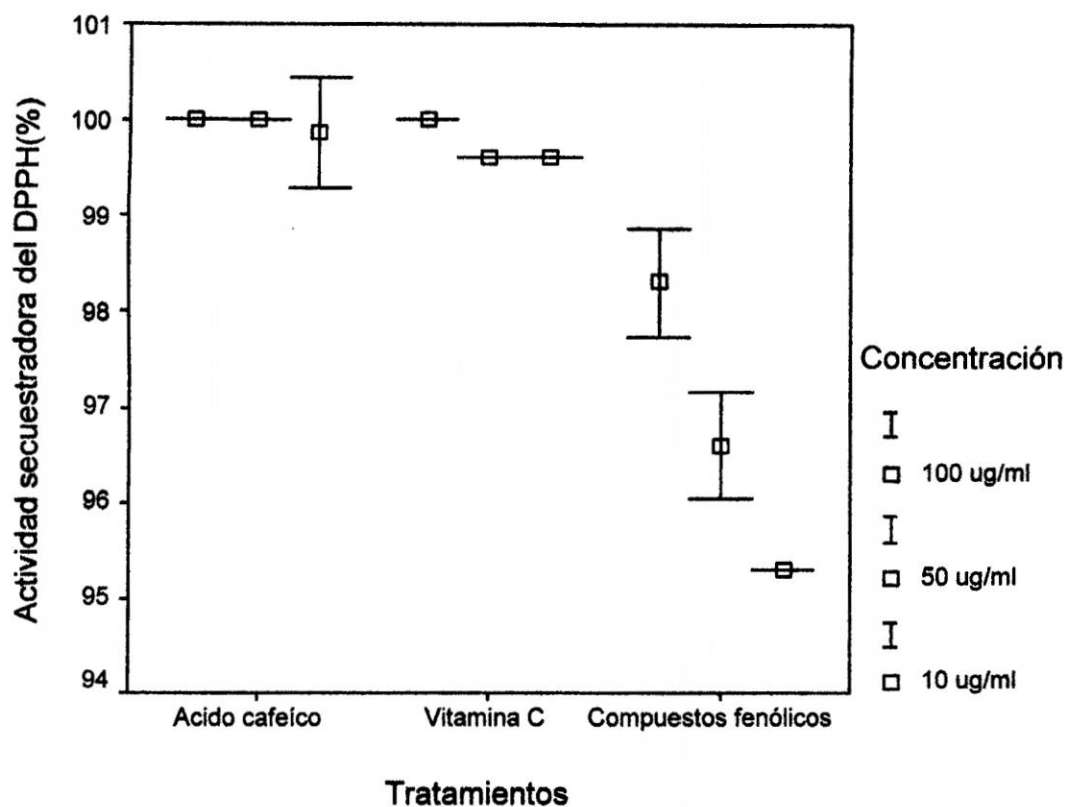


Figura 7. Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH por efecto de los compuestos fenolicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayava" en comparación con el ácido cafeico y la vitamina C. Ayacucho - 2013

V. DISCUSIÓN

Los procesos normales del organismo producen radicales libres (sustancias químicas inestables) como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio. Estos pueden producir daños oxidativos en diversas macromoléculas biológicas, lo que puede propiciar el inicio de enfermedades degenerativas como: cáncer, inflamación, cardiopatías, cataratas, etc. Por lo que, se ha generado un gran interés hacia el papel que ejercen los antioxidantes.³⁴

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se utilizó una secuencia de disolventes con polaridad creciente.³⁵ De esta manera, se procedió a la extracción de los compuestos fenólicos con diferentes solventes, primero con etanol para la extracción de los metabolitos secundarios presentes en la planta, segundo con el éter de petróleo para poder eliminar las resinas y grasas del extracto, después se trató con acetato de etilo para extraer los compuestos fenólicos presentes ¹ (Anexo 6).

En el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico desarrollado según la técnica de Lock de Ugaz¹⁴ y Miranda³¹, se reporta la presencia de los metabolitos secundarios como: azúcares reductores, catequinas, lactonas y/o cumarinas, flavonoides, fenoles y/o taninos, triterpenos y/o esteroides (Tabla 1 y Anexo 5), lo cual coincide con lo reportado por Rodríguez.¹² Por lo que, asumimos que la presencia de estos metabolitos secundarios podrían ser los responsables de su

capacidad antioxidante. Los metabolitos secundarios encontrados en abundancia fueron: fenoles y/o taninos, flavonoides, azúcares reductores, lactonas y/o cumarinas, los compuestos fenólicos pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro que producen cuando se le agrega el cloruro férrico al 5%.¹⁴ En la reacción de Shinoda para identificar flavonoides da una coloración roja, el cambio de color de amarillo a rojo indica la presencia de flavonas y flavonoles, color rojo presencia de flavanonas¹⁵, así mismo, en la reacción de cloruro férrico para identificar fenoles y/o taninos da una coloración verde intensa y en concentraciones moderadas se encontró azúcares reductores, lactonas y/o cumarinas, en la prueba de Benedict para los azúcares reductores dan un precipitado de color rojo, la prueba de Baljet para identificar lactonas y/o cumarinas dan un precipitado de color rojo.

En las pruebas químicas realizadas de los compuestos fenólicos aislados (Tabla 2 y Anexo 7), fueron diferenciadas por las pruebas de cloruro férrico al 5%, con KMnO_4 y DPPH, en la prueba química con FeCl_3 al 5% se produjo un color verde oscuro identificándose presencia de grupos fenólicos en abundante concentración. La prueba química con KMnO_4 produce un cambio de coloración y un precipitado intenso, este cambio de coloración del KMnO_4 se debe a que ésta se reduce debido a la acción de los compuestos fenolicos.¹⁹ En la prueba química con DPPH se observa la decoloración del radical libre, debido a que el radical libre tiene un electrón desapareado y es de color violeta decolorándose a amarillo cuando reacciona con los compuestos fenólicos que pueden donar un átomo de hidrogeno.^{6,35} Dado que todas las reacciones son positivas podemos afirmar que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. tienen actividad antioxidante.

En la Tabla 3 y Anexo 8, se observa la presencia de manchas fluorescentes de color violeta-púrpura a la luz ultravioleta, de lo cual se deduce que se trata de un

compuesto fenólico, cuando se revela la misma placa con cloruro férrico al 1% y DPPH (Anexo 9 y 10), se observan manchas de color marrón y amarillo a la luz visible. Esta mancha de color púrpura a la luz UV indican que se trata de compuestos fenólicos.¹⁴ Estudios realizados en *Psidium guajava* L. se determinaron la presencia de flavonoides derivados de quercetina (guajaverina y avicularina), un flavonol de naturaleza galoi-glicósido, conjuntamente con 5 nuevos quercetin-glicósidos y se han aislado flavonoides como la quercetina.^{9, 12}

Para la caracterización de los compuestos fenólicos se utilizó la espectroscopia ultravioleta, lográndose separar tres bandas a partir de la fracción de acetato de etilo (F1, F2 y F3) (Anexo11). La fracción F1 que corresponde a un compuesto fenólico con una fluorescencia verde-celeste y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 292 nm, la fracción F2 corresponde a un compuesto fenólico con una fluorescencia marrón-oscuro y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 257 y 359 nm, la fracción F3 corresponde a otro compuesto fenólico con una fluorescencia violeta-púrpura y muestra una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 259 y 356 nm (Anexo 12, 13 y 14).

La quercetina en el espectro UV-Vis tiene picos de absorción de 259 - 356 nm (Anexo 16).³⁶ La absorbancia de las fracciones F2 y F3 son similares al espectro de absorción de la quercetina, por lo que podemos asumir que se trata de dos flavonoides derivados de la quercetina, lo cual coincide con lo reportado por Ordoñez y Rodríguez.^{4, 12} El ácido benzoico tiene una absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a 230 y 270 nm (Anexo 15), que es similar a la absorbancia de la fracción F1. Por lo que, se asume que se trata de un derivado del ácido benzoico.

En la Figura 7, se muestra que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. demostraron tener actividad antioxidante al captar el radical

libre DPPH. Esta capacidad antioxidante de estos compuestos se debe principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agente reductor donante de hidrógeno, desactivadores de hidrógeno singlete o quelantes de metales, además depende de su estructura con gran presencia de dobles enlaces, y los propios grupos fenólicos, que según su número y posición puede actuar como dadores de protones y reductores, le permite capturar radicales libres y neutralizarlos sin alterar grandemente su estructura.³⁷

La concentración de 10 µg/ml tuvo una actividad antioxidante del 95,29%, los de 50 µg/ml en un 96,60% y los de 100 µg/ml en 98,30%, y los estándares ácido caféico y ácido ascórbico en 99,62% y 99,73%. Si comparamos los porcentajes de captación de radicales libres de los estándares con los compuestos fenólico aislados podemos decir que las concentraciones de 10 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml de compuestos fenólicos tiene una actividad antioxidante ligeramente inferior a los estándares. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, la cual influye en la facilidad con la que un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y en la habilidad de un fenol de soportar un electrón no apareado.³⁸ Por lo tanto, un nutriente tiene propiedades antioxidantes cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de la molécula inestable de un radical libre sin perder su propia estabilidad electroquímica.³⁹ La vitamina C es un poderoso antioxidante hidrosoluble tiene la propiedad de reaccionar con el anión O^{2-} y el radical OH, inhibe la oxidación de los lípidos, actúa contra las enfermedades cardiacas, cáncer y otros trastornos degenerativos.^{28, 8}

Con estos resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba" tiene actividad antioxidante.

VI. CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas *Psidium guajava* L. "guayaba" tienen actividad antioxidante.
2. El extracto etanólico de las hojas *Psidium guajava* L. "guayaba", presenta metabolitos secundarios como: azúcares reductores, cumarinas, flavonoides, fenoles y taninos, triterpenos y/o esteroides.
3. Se aislaron tres compuestos fenólicos de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba", un ácido fenólico y dos flavonoides derivados de la quercetina.
4. Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba" en concentraciones de 10 µg/ml presentaron una actividad antioxidante de 95,29%, de 50 µg/ml un 96,60% y de 100 µg/ml en un 98,30%, respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

1. Proseguir con el estudio de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba" cuantificando cada uno de los componentes por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
2. Realizar estudios de formulación de los compuestos fenólicos en distintas presentaciones para su empleo como antioxidante.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muñoz A, Ramos F. componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. Horizonte Médico [revista en internet] 2007. [acceso setiembre del 2013]; Vol. 7: N°1: 23-31. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v73n3/a03v73n3.pdf>.
2. González J. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispanica* L.), mediante electroforesis capilar. [tesis maestría]. México, D. F. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional 2010.
3. Benites V, Díaz G, López V, Gajardo S, Kusch F, Rojas A. Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. [revista en internet]. 2011. [acceso octubre 2013]; Vol. 19(1). 1 - 7. Disponible en: <http://www.unap.cl/admision/carreras/pregrado/2012/images/farmacia/papers/2011-B.pdf>
4. Ordoñez G, León A, Reátegui D, Sandoval C. Cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante en hojas, corteza, flores y fruto de dos variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.). Investigación y Amazonía [revista en internet] 2012. [acceso setiembre 2013]; 1(2): 48-52. Disponible en: http://www.concytec.gob.pe/portalsinacyt/images/stories/corcytecs/huanuco/antioxidantes_en_hojas_de_guayaba.pdf
5. García M, Aguilar S, Soto H, Nieto A. Compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus spp.* De México. Agrociencia, [revista en internet] 2012. [acceso enero 2014]; 46: 651-662. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a2.pdf>
6. Gutiérrez M, Ortiz C, Mendoza C. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimento animal. Simposio de Metrología [revista en internet] 2008. [acceso octubre 2013]; Vol. 1(1). Disponible en: https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/ SM2008-M220-1108.pdf
7. Espinal R, Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira Ica I (*Psidium guajava*). [tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Departamento de Química Maestría en Ciencias Químicas Bogotá D.C. 2010.
8. Palomino P. Propiedades antioxidantes y prooxidantes de *Psidium guajava* L. "guayaba" [tesis de maestría]. Universidad Nacional Mayor de san marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Postgrado Lima – Perú 2006.
9. Velásquez V. Validación farmacológica de la actividad antiinflamatoria de las infusiones acuosas de las hojas de *Buddleja americana* L. (salvia), hojas de *Eupatorium semialatum* (bacché), y hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba) en ratas hembras albinas. [tesis pregrado]. Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia 2008.

10. Zapata k, Cortes F, Rojano B. Polifenoles y actividad antioxidante del fruto de guayaba agria (*Psidium araca*) alimentos y biotecnología [revista en internet] 2013. [acceso octubre 2013]; 24(5): 1- 14. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642013000500012&script=sci_arttext
11. Rivera A, Chavez S, Lozoya L. La hoja de guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Revista de fitoterapia. [revista en internet] 2003. [acceso setiembre 2013]; 3(2): 101-111. Disponible en: http://www.fitoterapia.net/revista/revista_desglose.php?rev=3&num=5
12. Rodríguez A, Lafourcade A, Prez L. Hojas de *Psidium guajava* L. [revista en internet] 2013. [acceso noviembre 2013]; vol 47(1): 1-8. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubfar/rcf-2013/rcf131n.pdf>
13. Miranda E, Espinosa J, Hidalgo C, Velázquez J. Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas [revista en internet] 2012. [acceso diciembre 2013]; 11 (4): 354 - 361. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85623048007.pdf>
14. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo Editorial; 1994.
15. Soler Cantero A. Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional [tesis doctoral]. Universidad de Lleida; 2009
16. Echavarría B, Franco A, Martínez A. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de Macroalgas del Caribe de Colombia. VITAE, Rev. de la Facultad de Química Farmacéutica [revista en internet] 2009. [acceso enero 2014]; 16(1): 126-131. Disponible en: <https://www.cenam.mx/simposio2009/sm2009/compuestosfenolicos/M2/S M2009-M220-1108.pdf>
17. Espinal M, Olaya J, Restrepo P, Silva K, Parada F. La guayaba, fuente de fenoles con actividad Antioxidante. [revista en internet] 2008. [acceso diciembre 2013]; 7: 177-185. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/8536/9/09_Parte03_Cap07.pdf
18. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM, ámbito Farmacéutico nutrición [revista en internet] 2004. [acceso diciembre 2013]; 23(6). Disponible en: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet_f=10&pident_articulo=13063508&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v23n06a13063508pdf001.pdf
19. Villar del Fresno, A. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España. 1999.
20. Bruneton J. Plantas medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza-España. 2001
21. Edna A. Determinación del perfil de compuestos fenólicos en arazá (*Eugenia stipitata*). [tesis de maestría]. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., Colombia. 2012
22. Cartaya O, Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal [revista en internet] 2001. [acceso diciembre 2013]; Vol. 22, Núm. 2, 2001, Pp. 5-14. Disponible en:

- <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
23. Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Rev. Nutr. Hosp [revista en internet]. 2002. [acceso noviembre 2013]; 17 (6): 271-278. Disponible en: http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002/2002_los_flavonoides_propiedades-y_acciones_antioxidantes.pdf
 24. Hollman P, Arts. Flavonols, flavones and flavanols: Nature, occurrence and dietary burden. J Sci Food Agric. [revista en internet] 2000. [acceso enero 2014]; 19(4): 1487-1496. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/AGR/IND22079368/reload=0;jsessionid=gCBU5iyUzFclzt7fSZ0.4>
 25. Inocente C. Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L. (tangerana colorada). [tesis pregrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica Lima-Perú 2009.
 26. Maldonado S, Jiménez V, Guapillo V, Ceballos R, Méndez B, Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev Med UV, [revista en internet] 2010. [acceso diciembre 2013]; Vol. 1(1): 1-8 Disponible en: http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf
 27. Criado C, Moya M. Vitaminas y antioxidantes. Servicio de Medicina Interna y Urgencias. Ed. Sanidad y Ediciones, S.L. Barcelona. actuaciones el médico; 2009
 28. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Rev. Med. Milit. "Dr. Luís Díaz Soto" Cuba [revista en internet]. 2001. [acceso noviembre 2013]; Vol. 30 (1): 36-44. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf
 29. Venero J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cubana Med. Milit. [revista en internet]. 2002. [acceso noviembre 2013]; 30(1):15-20. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf
 30. Céspedes T, Sánchez D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Rev. Cubana Cardiol. [revista en internet] 2000. [acceso noviembre 2013]; 14(1): 55-60. disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/car/vol14_1_00/car08100.pdf
 31. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y productos naturales, Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. 2000.
 32. Aguilar Felices E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante y antirradicalaria. [tesis de maestría]. Lima. UNMSM; 2007.
 33. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenyl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sangklanakarín J. sci. technol. [revista en internet] 2003. [acceso diciembre 2013]; 26(2): 211-219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.pdf>
 34. Ramírez I. Efecto de la administración oral de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en ratas [tesis doctoral]. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Química y Farmacia; 2004
 35. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico

- [revista en internet]. 2008 [acceso enero de 2014]; Vol. 8 N°1. Disponible en: <http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008-I/Art4-Vol8-N1.pdf>.
36. Dimarco F, Muñoz V, Ferrari G, Montaña P. Determinación de parámetros termodinámicos y cinéticos de la reacción de complejación de quercetina y Al (III). CONICET- UNSL. [revista en internet]. 2004. [acceso noviembre 2013]; 1(1):1-3. Disponible en: <http://aqa.org.ar/pdf99/cd/Qca.%20Fisica/18.pdf>
 37. Banerjee S, Bonde C. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location Journal of medicinal plants research [revista en internet]. 2011. [acceso enero 2014]; Vol. 5(5). 817-822. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/jmpr/pdf/pdf2011/4Mar/Banerjee%20and%20Bonde.pdf>
 38. Calderón P. Determinación de las propiedades antioxidantes del jugo de naranja comercial sometido a distintas condiciones de almacenamiento. [tesis pregrado]. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.
 39. Palomino P. Propiedades antioxidantes y prooxidantes de *Psidium guajava* L. "guayaba" [tesis de maestría]. Universidad Nacional Mayor de san marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Postgrado Lima – Perú 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 5. Certificado de identificación taxonómica de *psidium guajava* L. "guayaba" según el sistema de clasificación de Cronquist. A. Ayacucho - 2013



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. Dalma Neria, NALVARTE RÚA**, 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:

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, 07 de Agosto del 2013

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

Blga. Laura Antonette Medina
JEFE

ANEXO 2

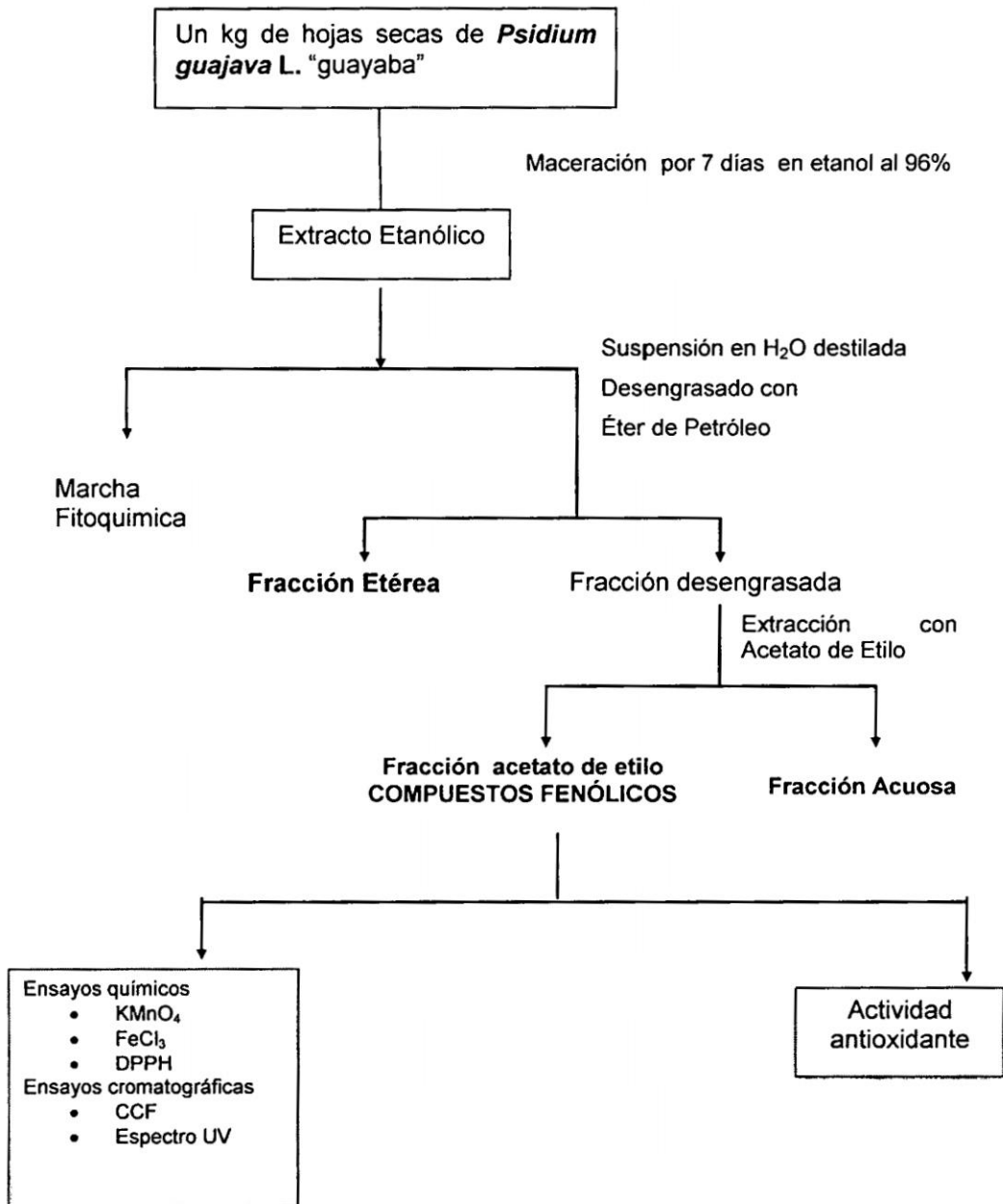


Figura 8. Flujograma de la obtención de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 3



Figura 9. Recolección de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba" en la provincia de Huanta. Ayacucho - 2013

ANEXO 4

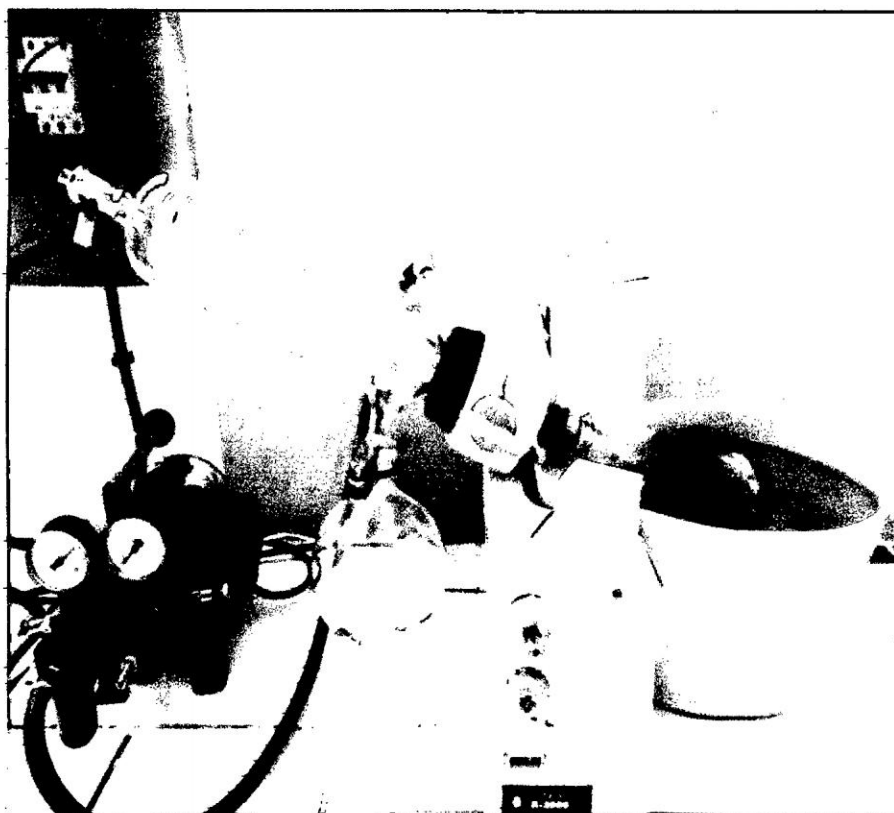


Figura 10. Equipo de rotavapor para la concentración del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 5

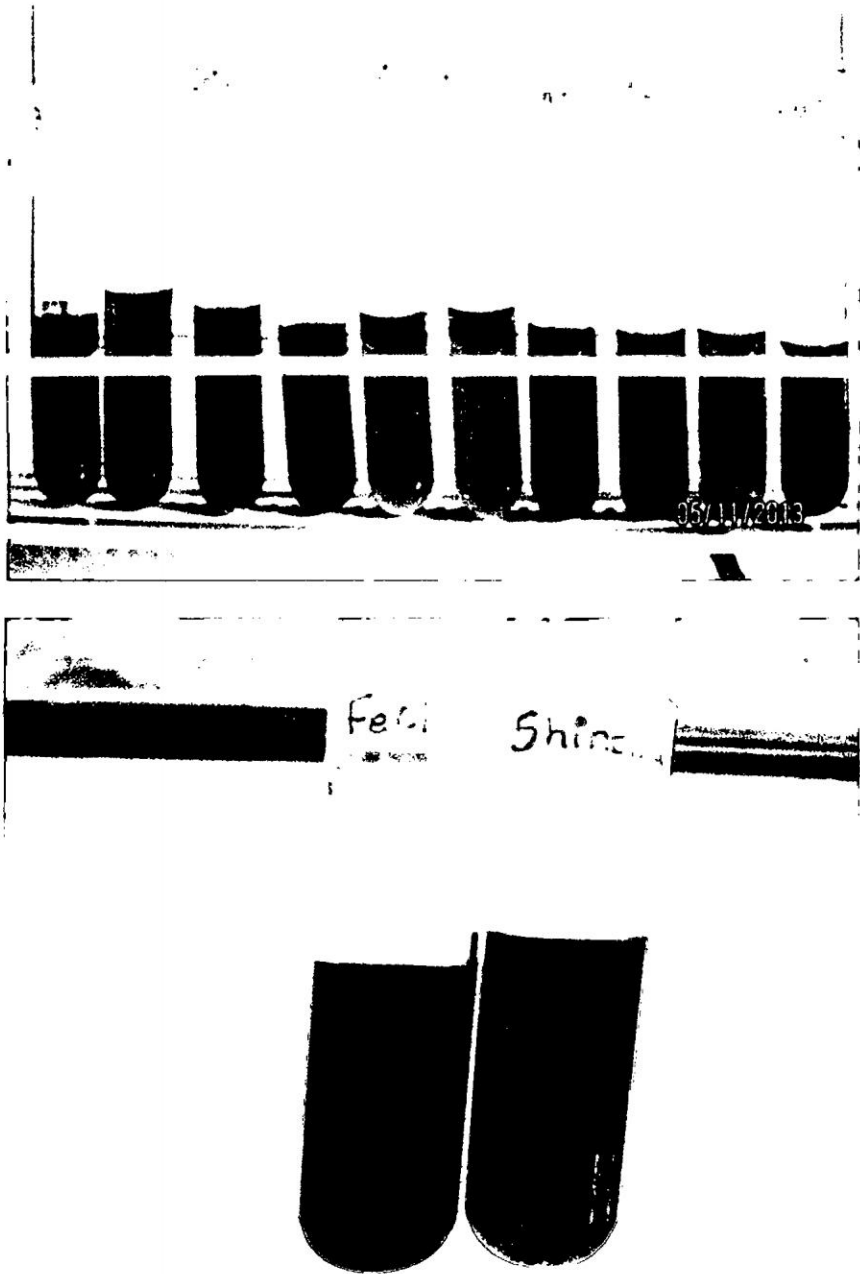


Figura 11. Tubos de ensayo del tamizaje fitoquímico, reacción de Shinoda y cloruro férrico del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 6

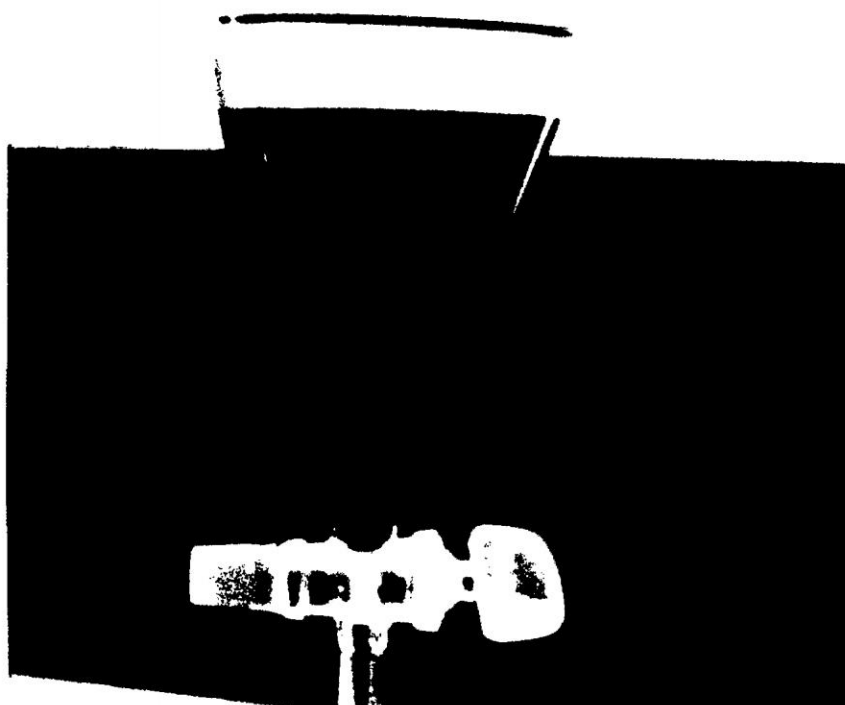


Figura 12. Equipo de extracción líquido – líquido para la obtención de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 7

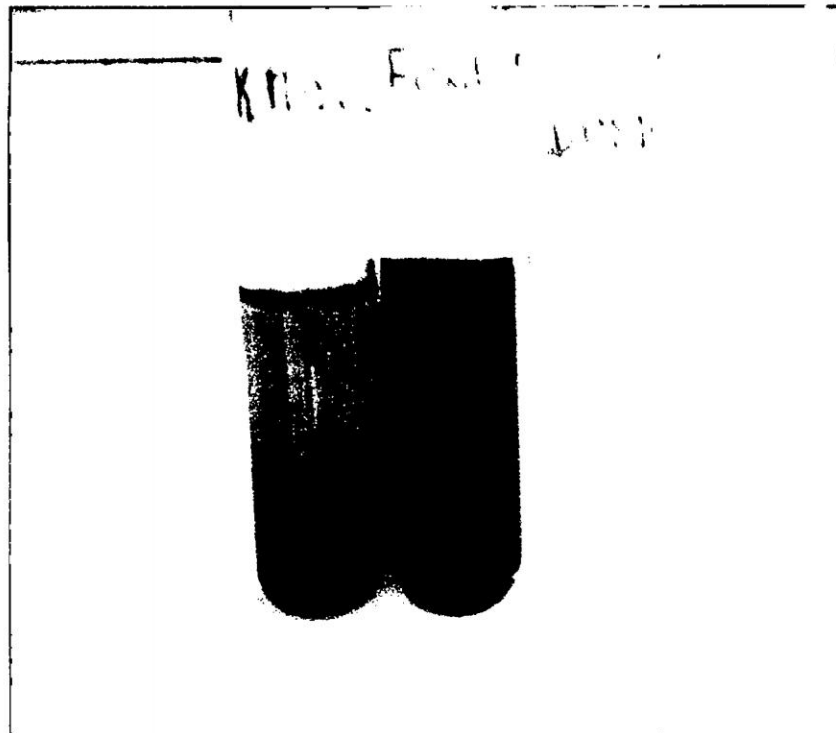
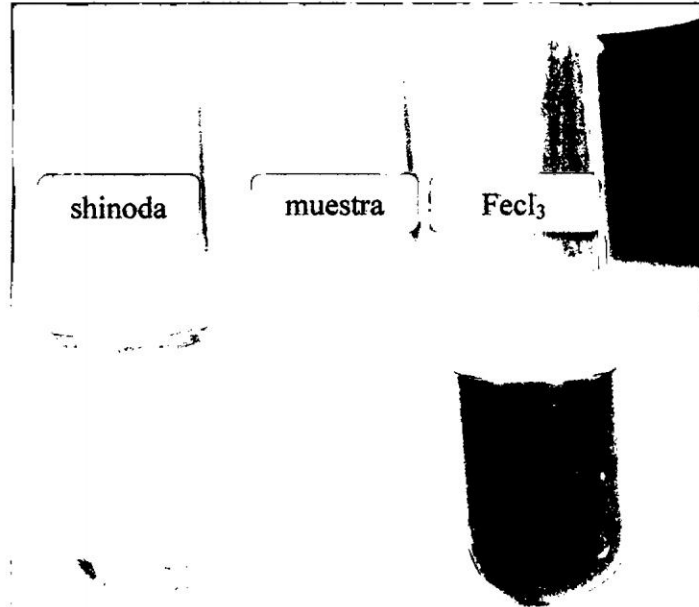


Figura 13. Pruebas químicas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 8

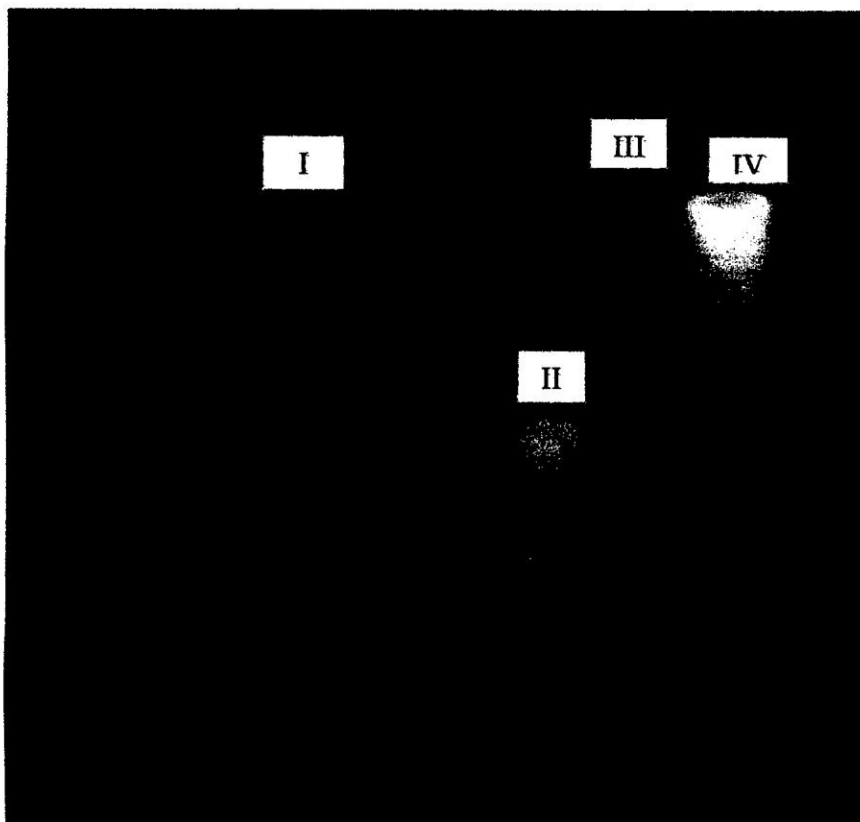


Figura 14. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados de *Psidium guajava* L. "guayaba" (I), ácido clorogénico (II), quercetina (III) y ácido caféico (IV) revelado con luz ultravioleta. Ayacucho - 2013.

ANEXO 9

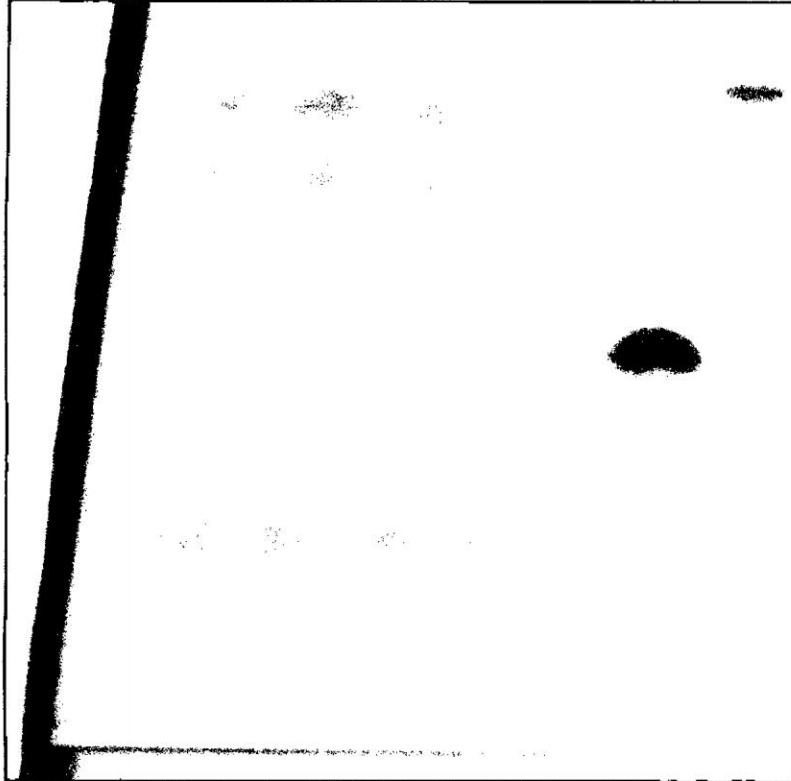


Figura 15. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L. "guayaba", revelados con cloruro férrico al 5%. Ayacucho - 2013

ANEXO 10

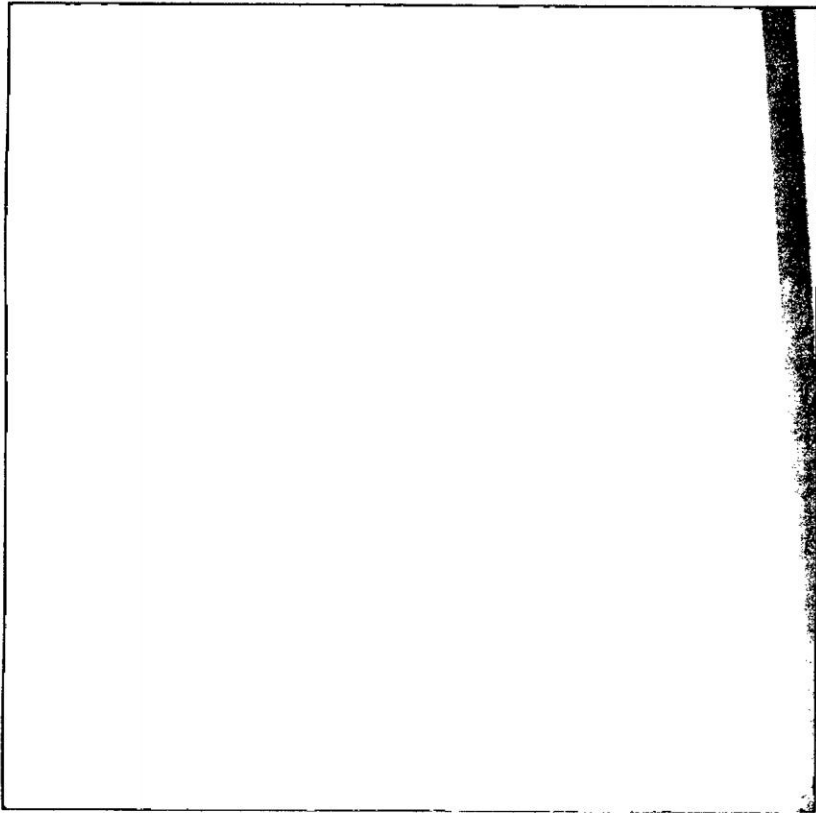


Figura 16. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos de *Psidium guajava* L. "guayaba", revelados con DPPH. Ayacucho - 2013

ANEXO 11

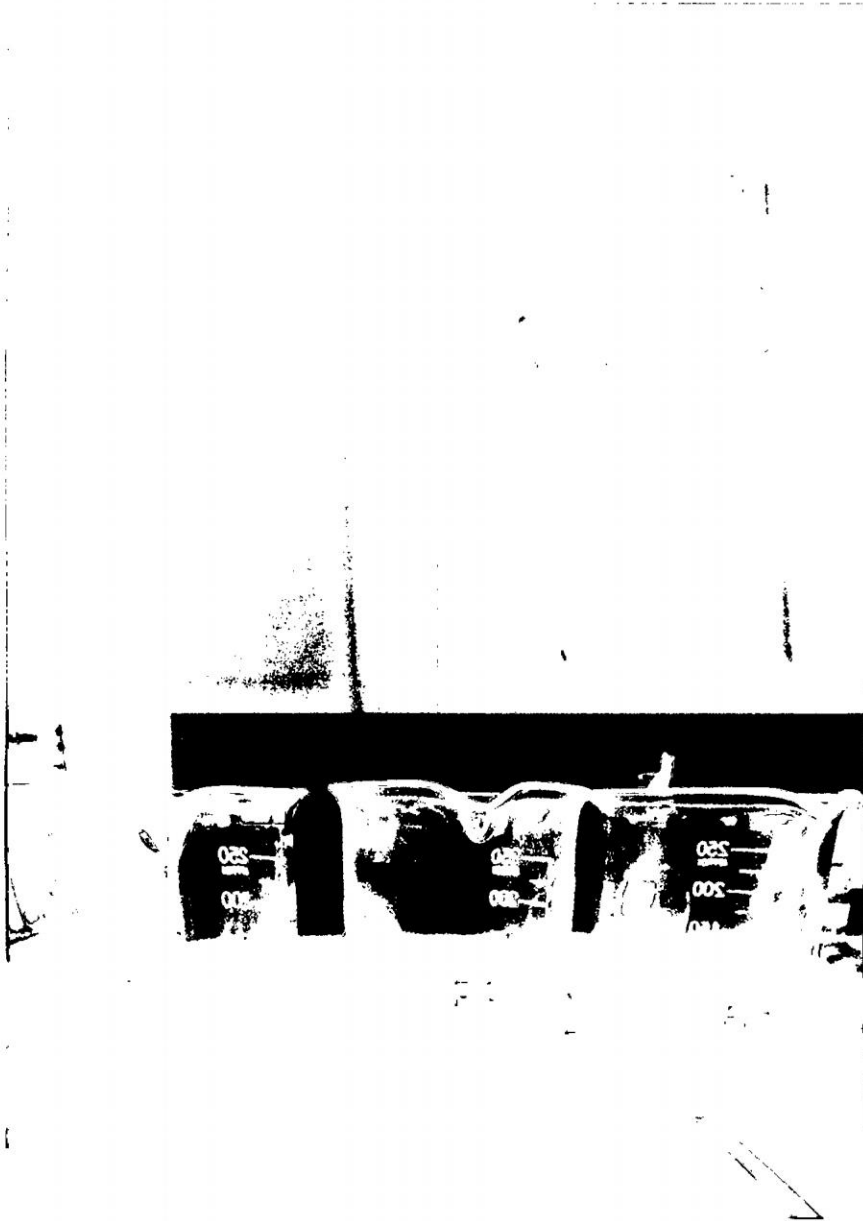


Figura 17. Cromatografía en capa fina y recuperación de las fracciones de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 12

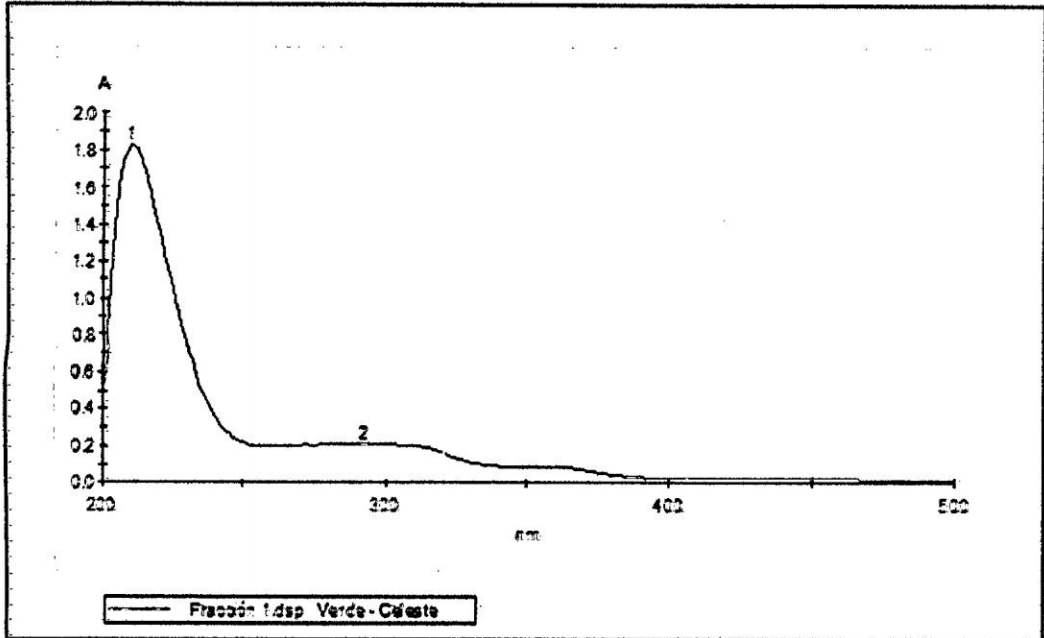


Figura 18. Curva espectral de la fracción F1 aislado de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 13

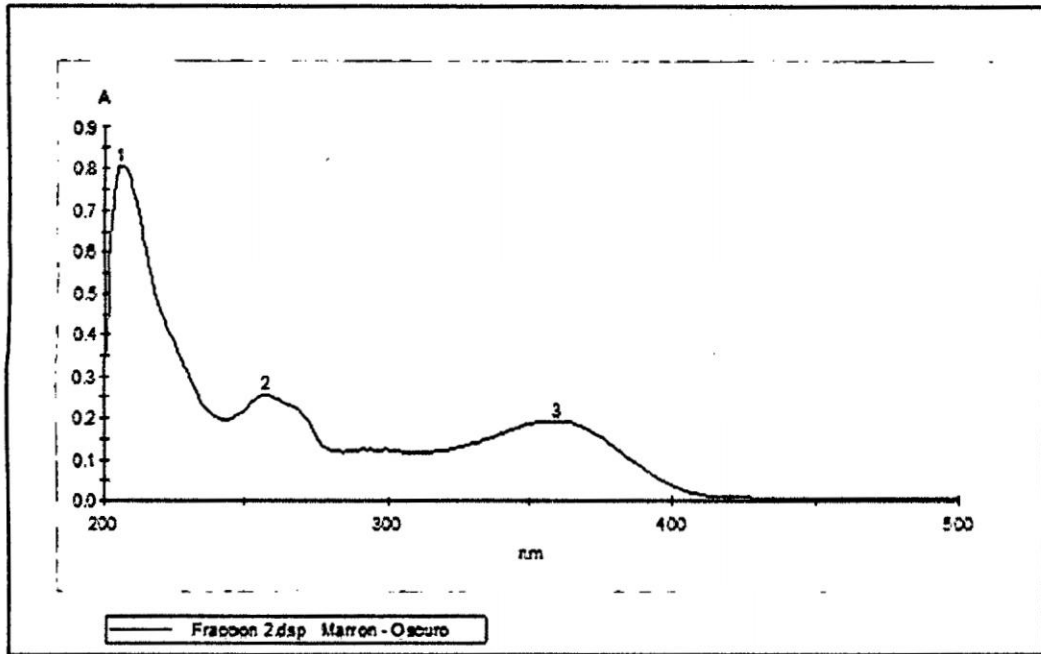


Figura 19. Curva espectral de la fracción F2 aislado de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 14

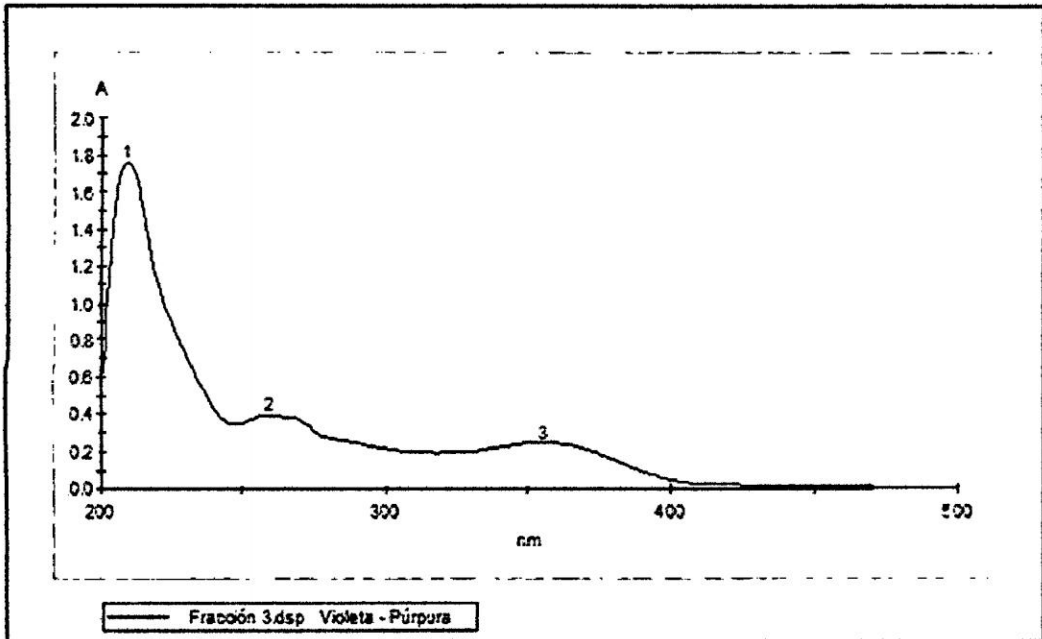


Figura 20. Curva espectral de la fracción F3 aislado de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

ANEXO 15

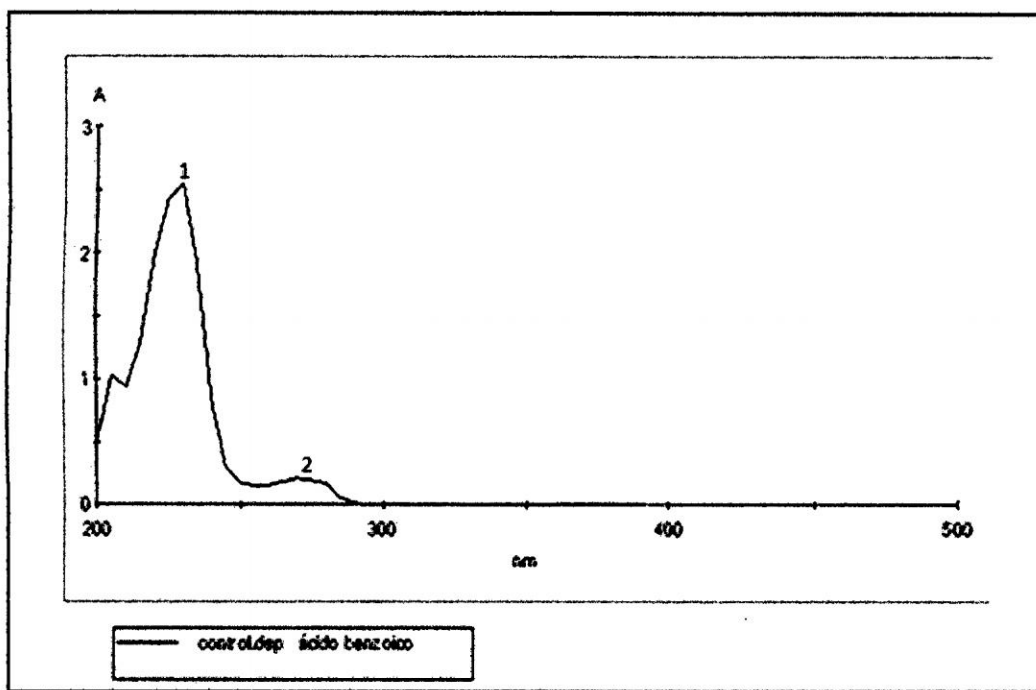


Figura 21. Curva espectral del estándar de ácido benzoico. Ayacucho - 2013

ANEXO 16

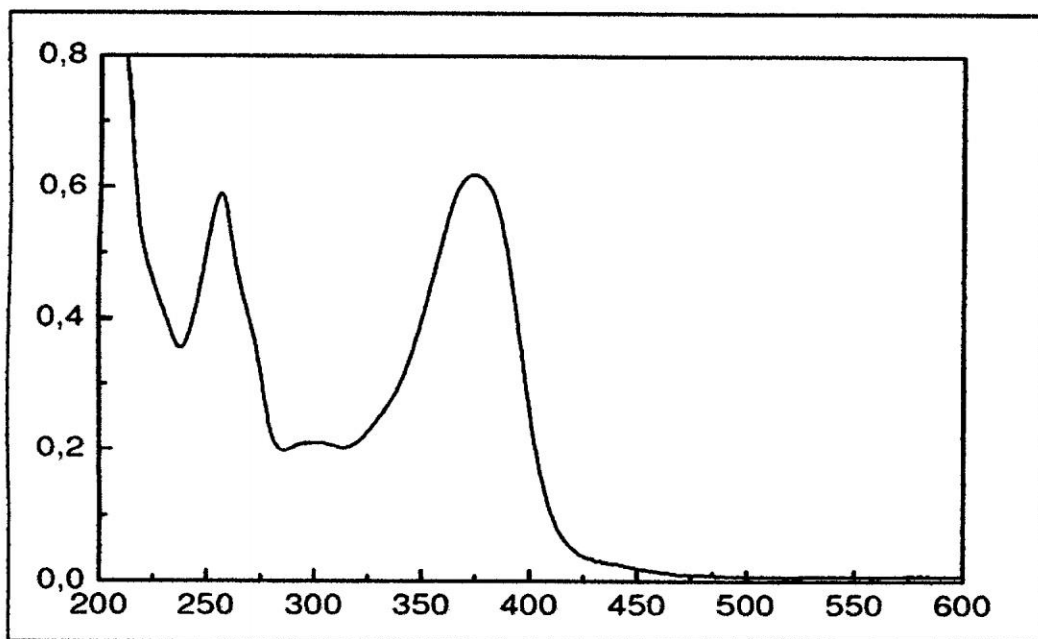


Figura 22 Curva espectral de la quercetina³⁶. Ayacucho - 2013

ANEXO 17

Tabla 6. Porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH por efecto de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba" en comparación con el ácido caféico y la vitamina C. Ayacucho - 2013

Repeticiones	Estándares								
	Ácido caféico			Vitamina C			Compuestos fenólicos		
	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml
1	100	100	100	100	99,60	99,60	98,04	96,47	95,29
2	100	100	99,60	100	99,60	99,60	98,43	96,47	95,29
3	100	100	100	100	99,60	99,60	98,43	96,86	95,29
Promedio	100	100	99,86	100	99,60	99,60	98,30	96,60	95,29

ANEXO 18

Tabla 7. Análisis de varianza del porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH. De los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Psidium guajava* L. "guayaba". Ayacucho - 2013

			Método único				
			Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig
Captación de radical libre (%)	Covariables	Tratamientos	46.368	1	46.368	29.581	0.000
	Efectos principales	Concentracion (ug/ml)	8.205	2	4.103	2.617	0.095
	Modelo		54.574	3	18.191	11.605	0.000
	Residual		36.053	23	1.568		
	Total		90.626	26	3.486		

- a. Actividad secuestradora del DPPH (%) por concentración ($\mu\text{g/ml}$) con tratamientos
- b. Todos los efectos introducidos simultáneamente

ANEXO 19

Tabla 8. Matriz de consistencia. Ayacucho - 2013

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba" Ayacucho-2013.	¿Tendrá actividad antioxidante los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba" a diferente concentración?	<p>Objetivo general:</p> <p>Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba".</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Caracterizar los compuestos fenólicos de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba", sobre el radical libre del DPPH. 	<p><i>Psidium guajava</i> L. "guayaba":</p> <p>Árbol de 6 m de altura; hojas verdes, opuestas; flores blancas, solitarias o en pequeños grupos, que aparecen en las axilas de las hojas, tienen 4-5 pétalos y numerosos estambres; fruto en baya redondeada con el cáliz de la flor persistiendo, aromáticos, piriformes, 2-10 cm de largo, cáscara amarilla, carnaza rosada, por fuera firme, al centro suave, con pulpa jugosa y semillas color café, 3-5 mm de largo, redondas y duras.^{8,9}</p> <p>Usos Tradicionales:</p> <p>Como antiinflamatorio, golpes, heridas, contra la diarrea, disentería, dolor de estómago, artritis, anemia.</p> <p>Estrés oxidativo</p> <p>Sistema de protección antioxidante</p> <p>Compuestos fenólicos</p> <p>Flavonoides: son pigmentos naturales presentes en los vegetales, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo.</p>	Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Posee actividad antioxidante a diferente concentración	<p>Variable Independiente:</p> <p>compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba".</p> <p>Actividad antioxidante</p> <p>Indicador:</p> <p>Concentración a: 10, 50 y 100 ug/mL.</p> <p>Variable dependiente</p> <p>Actividad antioxidante.</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> Porcentaje de la actividad secuestradora del DPPH. 	<p>Tipo de Estudio: Básico Descriptivo.</p> <p>Población: Hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba". Que de la provincia de Huanta, región Ayacucho.</p> <p>Muestra:</p> <p>Un Kg de hojas secas de <i>Psidium guajava</i> L. "guayaba".</p> <p>Diseño metodológico para la recolección de los datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Recolección, identificación y selección de la muestra. Preparación del extracto etanólico. Tamizaje fitoquímico Extracción e identificación de los flavonoides <p>Determinación de la actividad antioxidante:</p> <p>Método de la capacidad secuestradora del radical DPPH (Aguilar, 2007). Actividad secuestradora del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo, DPPH</p> <p>Análisis Estadístico.</p> <p>Los resultados de la actividad antioxidante serán representados en forma de gráfico de barras en función de las medias. Las diferencias entre las medias serán contrastadas mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a una nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).</p>