UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

CONTRIBUCIÓN A LA ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN A ESCALA DE LABORATORIO DE UN EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Psidium guajava* L.

RAFAEL ENRIQUE COMAS NOYA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2014

CONTRIBUCIÓN A LA ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN A ESCALA DE LABORATORIO DE UN EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Psidium guajava* L.

RAFAEL ENRIQUE COMAS NOYA

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Ph.D., JUAN CAMILO MARÍN LOAIZA

Línea de Investigación:

Alternativas de Aprovechamiento Farmacéutico de Productos y Subproductos de Fuentes Naturales

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales (Tecprona)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2014

Dedicatoria

A Dios, por ser fuente de luz, por haberme dado la posibilidad de existir y por su infinita misericordia.

A mi hermosa hija Mariana, por ser el motor de mi vida, a quien amo y protegeré siempre porque con su sonrisa y alegría me demuestra cada día que vale la pena vivir y me recuerda el compromiso que tengo para con ella de avanzar para darle lo mejor.

A mi esposa Saray Consuegra, por brindarme su amor, apoyo y sobretodo tenerme mucha comprensión y paciencia durante todo este tiempo. Gracias por existir en mi vida. Te amo.

A mi madre Elvia Noya Zabaleta por llenarme de sabias palabras y oportunos consejos, por su amor y apoyo incondicional. ¡Gracias Mamá!

A mi padre Rafael Comas Escamilla, por darme apoyo. Por su gran corazón, ejemplo y por estar conmigo en cada una de las etapas de mi vida.

A mis hermanos Arlines y Jean con quienes he compartido mi formación personal y profesional, por su incondicional y constante apoyo, los quiero mucho.

A mis hermosos sobrinos Wendy, Zharick y Orlandito por darle alegría a mi vida, los quiero mucho.

“A todos mil gracias; sin Ustedes a mi lado no lo hubiese logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el fruto. Que Dios los bendiga”

Rafael E. Comas Noya

Agradecimientos

El autor de la investigación expresa sus más sinceros agradecimientos:

A Dios por llenarme de perseverancia y ganas para alcanzar otra meta en mi vida.
A mi Director JUAN CAMILO MARÍN LOAIZA, por su asesoría, valiosos consejos, paciencia y apoyo brindado a lo largo de este trabajo.
A la profesora PILAR LUENGAS CAICEDO, por su colaboración al aclararme numerosas inquietudes académicas.
A la profesora NURYS REBOLLEDO, por la coordinación de todas las actividades durante el desarrollo de la Maestría.
A la empresa PROCAPS S.A. y a la UNIVERSIDAD DEL ATLÁNTICO por el apoyo brindado.
A mis compañeros de Maestría, JAEL BELEÑO, JUAN VEGA, OSCAR CAMACHO, JORGE GÓMEZ y ALBERTO HERRERA por su amistad y colaboración.
A la UNIVERSIDAD NACIONAL, por brindarme la oportunidad de nutrirme día a día de tan valioso conocimiento, para formarme como magister y de esta manera mejorar como persona.
A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este trabajo.

Resumen

Con la realización de la presente investigación se contribuye a la estandarización del proceso a escala de laboratorio para la obtención de un extracto de las hojas de *Psidium guajava* L. Se han desarrollado estudios de anatomía y morfología vegetal de las hojas de *P. guajava* L. que permiten establecer los criterios de autenticidad y control de calidad de esta droga vegetal, así como la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos obtenidos a partir de las hojas de esta planta, además de métodos químicos para la cuantificación de sus metabolitos activos. Esta investigación se llevó a cabo en seis etapas: En la primera etapa se realizaron tres colectas de las hojas de *P. guajava* L. en el Municipio de Sabanagrande (Departamento del Atlántico). En la segunda etapa se caracterizó el material incluyendo la descripción macroscópica, microscópica, la determinación de materia orgánica e inorgánica extraña y la marcha fitoquímica cualitativa que confirmó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y taninos. En la tercera etapa se llevó a cabo el proceso de estandarización de secado, molienda y determinación de cenizas totales y sustancias extraíbles; el tiempo estimado necesario para que la droga tenga un 10% de humedad es de aproximadamente 24 horas en un horno de aire circulante a una temperatura de 45 ºC; con la molienda se obtuvieron dos grupos de material con tamaños de partículas diferentes. En la cuarta etapa, se obtuvieron ocho extractos fluidos (1:1) de acuerdo al diseño experimental factorial reducido. En la quinta etapa se caracterizaron fisicoquímicamente los extractos fluidos. A estos últimos se les determinó su rendimiento, su perfil cromatográfico y se cuantificaron los flavonoides totales, obteniéndose rendimientos de aproximadamente el 40%. La sexta etapa consistió en determinar la actividad antimicrobiana de los extractos secos contra cepas de *Streptococcus mutans* y *Propionibacterium acnes*. La mayor cantidad de flavonoides totales expresados en mg equivalentes de Quercetina/mg de muestra se consiguió con el extracto elaborado bajo las condiciones del experimento 4 y la mayor actividad antibacteriana contra *S. Mutans* y *P. acnes* se presenta con el extracto elaborado por el método del experimento 6.

Palabras clave: *Psidium guajava* L., estandarización, antimicrobiano.

Abstract

Performing this investigation, it was contributed to the standardization of laboratory scale process for obtaining an extract from the leaves of *Psidium guajava* L. Anatomy and morphology studies of the leaves of *P. guajava* L. have been developed allowing to establish the criteria for authenticity and quality control of this plant drug, as well as evaluation of antimicrobial properties of extracts obtained from the leaves of this plant as well as chemical methods for the quantification of active metabolites. This research was performed in six stages: in the first stage, three collections of leaves of *P. guajava* L. were performed in Sabanagrande (Departmento del Atlantico). In the second stage, plant material was characterized including macroscopic, microscopic description, determination of organic and inorganic foreign matter and qualitative phytochemical study confirming the presence of flavonoids, phenolic compounds and tannins. In the third step processes of drying, grinding and determination of total ash and extractable matter were performed; the estimated time needed for the drug to have a 10% of moisture was about 24 hours in a flowing air oven at a temperature of 45 °C; when the material was grinded, two groups of material having different particle sizes were obtained. In the fourth stage, eight fluid extracts (1:1) were obtained according to the reduced factorial experimental design. In the fifth step, the physicochemical characterization of fluid extracts was performed. A chromatographic profile and the total flavonoids test were performed to the extracts and the yield, obtaining yields from about 40%. The sixth step was to assess the antimicrobial activity of dried extracts against *Streptococcus mutans* and *Propionibacterium acnes* strains. The higher amount of total flavonoids expressed in mg equivalents of Quercetin / mg of sample was obtained with the extract prepared under the conditions of experiment 4 and greater antibacterial activity against *S. mutans* and *P. acnes* occurred with the extract prepared by the method in experiment 6.

Keywords: *Psidium guajava* L., standardization, antimicrobial.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XV**

Lista de tablas ..... **XVII**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XIX**

Introducción **1**

1. Marco teórico **5**

1.1 Extractos vegetales 5

1.1.1 Extractos Fluidos 5

1.1.2 Extractos blandos 6

1.1.3 Extractos secos 6

1.1.4 Crioextractos 6

1.2 Estandarización de extractos vegetales 6

1.3 Empleo de extractos de plantas como ingrediente en preparados cosméticos 7

1.4 Enjuagues Bucales y Productos Antiacné 9

1.4.1 Cosméticos para la cavidad oral……...9

1.4.2 Cosméticos para el cuidado de la piel……10

1.5 Bacterias que se encuentran en la cavidad oral……...12

1.5.1 Streptococos……12

1.5.2 Lactobacilos……12

1.5.3 Actinomices……12

1.6 Bacterias que producen el acné……...12

1.7 Productos vegetales empleados como antimicrobianos……13

1.8 *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)……...13

1.8.1 Descripción Botánica……14

1.8.2 Clasificación Taxonómica……15

1.8.3 Composición química……15

1.8.4 Propiedades antimicrobianas de *Psidium guajava* (L.)……...16

2. Metodología.....21

2.1 Colecta y adecuación del material vegetal..... …22

2.2 Caracterización del material vegetal.....23

2.2.1 Descripción macroscópica del material vegetal fresco……23

2.2.2 Descripción microscópica del material vegetal fresco……24

2.2.3 Descripción microscópica de la droga vegetal……24

2.2.4 Determinación de materia orgánica extraña……24

2.2.5 Determinación de materia inorgánica extraña……..24

2.2.6 Marcha fitoquímica preliminar……25

2.3 Estandarización de las condiciones de secado, molienda, determinación de cenizas totales y sustancias extraíbles……..27

2.3.1 Estudio de secado 27

2.3.2 Secado de las hojas……..29

2.3.3 Molienda……..29

2.3.4 Determinación de cenizas totales…….…..29

2.3.5 Determinación de sustancias extraíbles……30

2.3.6 Elaboración de la monografía de las hojas de *Psidium guajava* L.……30

2.4 Preparación de los extractos hidroalcohólicos usando el diseño factorial reducido……...30

2.4.1 Obtención de extractos fluidos y extractos secos……32

2.5 Caracterización del extracto fluido y extracto seco……...34

2.5.1 Extractos fluidos……..34

2.5.2 Extractos secos……...35

2.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos de las hojas de *Psidium guajava* L……..36

2.6.1 Preparación de las muestras……36

2.6.2 Microorganismos utilizados……...36

2.6.3 Sensibilidad antimicrobiana……..37

2.7 Análisis Estadístico……..38

2.7.1 Estimación de los modelos de diseño experimental para los datos de cromatografía en capa fina para flavonoides y porcentaje de rendimiento……..38

2.7.2 Estimación de los modelos de diseño experimental para los datos de flavonoides totales y determinación de la actividad antimicrobiana……..38

3. Resultados y Discusión……...39

3.1 Caracterización del material vegetal…….39

3.1.1 Descripción macroscópica del material vegetal fresco……39

3.1.2 Descripción microscópica del material vegetal fresco…….42

3.1.3 Descripción microscópica de la droga vegetal…….44

3.1.4 Determinación de materia orgánica extraña…….44

3.1.5 Determinación de materia inorgánica extraña……..45

3.1.6 Marcha fitoquímica preliminar confirmatoria…….45

3.2 Estandarización de las condiciones de secado, molienda, determinación de cenizas totales y sustancias extraíbles……..46

3.2.1 Estudio de secado…….46

3.2.2 Secado de las hojas para elaborar los extractos…….52

3.2.3 Molienda……..53

3.2.4 Determinación de cenizas totales……...56

3.2.5 Determinación de sustancias extraíbles……56

3.2.6 Elaboración de la monografía de las hojas de *Psidium guajava* L……57

3.3 Caracterización del extracto fluido y extracto seco……59

3.3.1 Extractos fluidos……59

3.3.2 Extractos secos…….61

3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos de las hojas de *Psidium guajava* L……..68

3.5 Análisis Estadístico……70

3.5.1 Estimación de los modelos de diseño experimental para los datos de cromatografía en capa fina para flavonoides y el porcentaje de rendimiento…..70

3.5.2 Estimación de los modelos de diseño experimental para los datos de flavonoides totales y determinación de la actividad antimicrobiana……..71

4. Conclusiones y recomendaciones 75

4.1 Conclusiones……..75

4.2 Recomendaciones…….76

Anexo A: Certificado identificación taxonómica de *Psidium guajava* L. 77

Anexo B: Monografía de las Hojas de *Psidium guajava* L……78

Bibliografía 99

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: *Psidium guajava L*……..15

Figura 1-2: Flavonoides previamente identificados en las hojas de *Psidium guajava* L……..……..…16

Figura 2-1: Evaluación del largo y ancho de las hojas……..23

Figura 2-2: Marcha fitoquímica preliminar confirmatoria……25

Figura 2-3: Montaje de pérdida por secado……..…….……28

Figura 3-1: Hojas de *Psidium guajava* L…….……..40

Figura 3-2: Histograma de frecuencia para el largo de las hojas……41

Figura 3-3: Histograma de frecuencia para el ancho de las hojas……...……41

Figura 3-4: Corte transversal de la hoja de *Psidium guajava* L……43

Figura 3-5: Gráfica porcentaje de humedad residual (Septiembre)……..…….…48

Figura 3-6: Gráfica porcentaje de humedad residual (Noviembre)…..……..……49

Figura 3-7: Gráfica Porcentaje de humedad residual (Promedio)……52

Figura 3-8: Distribución del tamaño de partícula molienda (I)……..…...……55

Figura 3-9: Distribución del tamaño de partícula molienda (II)……..……..55

Figura 3-10: Perfil cromatográfico para flavonoides de los ocho extractos con luz UV 365 nm. Fase móvil: cloroformo: metanol (4.5:0.5) (Q: Quercetina)……62

Figura 3-11: Perfil cromatográfico para flavonoides de los ocho extractos con luz UV 365 nm. Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27) (Q: Quercetina)……...63

Figura 3-12: Gráfico de flavonoides totales para las muestras de los ochos experimentos expresados como mg equivalentes de Quercetina/mg muestra……..……...…….65

Figura 3-13: Actividad antibacteriana contra *S. mutans*…….……..69

Figura 3-14: Gráfica de las medias para los datos de flavonoides totales y determinación de la actividad antimicrobiana……..……72

Figura A-1: Hojas de *Psidium guajava* L……...…78

Figura A-2: Corte transversal de la hoja de *Psidium guajava* L……....81

Figura A-3: Corte transversal detallado de la nervadura de la hoja de *Psidium guajava* L……...….81

Figura A-4: Descripción microscópica de la hoja de *Psidium guajava* L…….82

Figura A-5: Flavonoides identificados en las hojas de *Psidium guajava* L……..82

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Ejemplo de algunas plantas y sus indicaciones terapéuticas…….....13

Tabla 2-1: Diseño factorial reducido para evaluar los parámetros de extracción…….31

Tabla 2-2: Combinación de los factores para la realización de los experimentos…...31

Tabla 2-3: Variables contempladas para la preparación de los extractos……..…..32

Tabla 3-1: Mediciones del largo y ancho de las hojas……..……40

Tabla 3-2: Tratamiento de los datos de largo y ancho de las hojas……...…41

Tabla 3-3: Datos de materia orgánica extraña……..……44

Tabla 3-4: Datos de materia inorgánica extraña……45

Tabla 3-5: Resultados de la marcha fitoquímica confirmatoria realizada a EE…...…46

Tabla 3-6: Datos de % humedad residual (determinada por la pérdida por secado) de los meses de Septiembre y Noviembre ……..……..……..……47

Tabla 3-7: Estudio de secado (Septiembre 2011): Promedio de las tres réplicas……47

Tabla 3-8: Estudio de secado (Noviembre 2011): Promedio de las tres réplicas…….48

Tabla 3-9: Resumen análisis de Varianza. Tratamiento de los datos……....49

Tabla 3-10: Resumen análisis de Varianza. Cálculo del factor F……50

Tabla 3-11: Estudio de secado (Septiembre – Noviembre 2011)……51

Tabla 3-12: Datos promedio del estudio de secado……...51

Tabla 3-13: Prueba de Humedad residual (determinada por pérdida por secado)……..……53

Tabla 3-14: Distribución tamaño de partícula molienda (I)……..….54

Tabla 3-15: Distribución tamaño de partícula molienda (II)……..……..……54

Tabla 3-16: Resultados de cenizas totales…….……..56

Tabla 3-17: Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles……...…….56

Tabla 3-18: Comparación de los ítems entre las diferentes monografías……58

Tabla 3-19: Características organolépticas de los ocho extractos fluidos de las hojas de *Psidium guajava* L……...……..59

Tabla 3-20: Datos primarios para el cálculo de la densidad de los ocho extractos..…60

Tabla 3-21: Densidad y pH de los ocho extractos fluidos de las hojas de *Psidium guajava* L……61

Tabla 3-22: Datos de los perfiles cromatográficos en capa fina para Flavonoides……64

Tabla 3-23: Valores de Flavonoides totales (mg de equivalentes de Quercetina / mg muestra) para cada uno de los experimentos…… .66

Tabla 3-24: Cantidad de flavonoides totales (mg de equivalentes de Quercetina/mg muestra) de los extractos de las hojas usando las mezclas hidroalcohólicas 1:1 y 7:3, diferente métodos de extracción y relación droga-solvente…….……67

Tabla 3-25: Porcentaje de rendimiento de los ocho extractos secos de *Psidium guajava* L……..…….67

Tabla 3-26: Actividad antibacteriana contra *S. mutans* y *P. acnes*……...……69

Tabla 3-27: Medidas estadísticas descriptivas…….……71

Tabla 3-28: Resumen del análisis de varianza a una vía de clasificación…….…..71

Tabla 3-29: Medidas estadísticas descriptivas……..……..71

Tabla 3-30: Resumen de estimación de modelos de análisis de varianza…….….73

Tabla 3-31: Pruebas de comparación múltiple por el método de Tukey……..73

Tabla 3-32: Resultados de los parámetros de calidad y actividad antimicrobiana…….74

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
mL	Mililitro
°C	Temperatura en grados Celsius
%	Porcentaje
m	Metros
cm	Centímetros
mm	Milimetros
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
seg	Segundos
min	Minutos
N	Normal
nm	Nanómetro
rpm	Revoluciones por minutos
L	Litros
µL	Microlitos
M	Molar

UFC	Unidades formadoras de colonia
h	Horas

Abreviaturas

Abreviatura	**Término**
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EE	Extracto etanólico
NF	National Formulary
No.	Número
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial hídrico
UV	Ultravioleta
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization

Introducción

Los productos de origen vegetal son recursos renovables con múltiples usos para el hombre. Le proporcionan alimentos para su subsistencia, fibras textiles para vestirse y material para construir casas; le deleitan con su aroma y colorido; regeneran el aire y le intoxican o curan; según sus propiedades.

Una amplia gama de especies vegetales y hierbas en bebidas, ungüentos y emplastos han sido utilizadas tradicionalmente desde tiempos ancestrales para aliviar las enfermedades. La experiencia ha demostrado que esta tendencia no está en desuso; sino que por el contrario ha ido resurgiendo con la continua adquisición de conocimientos y el advenimiento de nuevas tecnologías.

Desde hace mucho tiempo el hombre ha hecho uso del poder curativo de las plantas para combatir muchas enfermedades que afectan su salud. La experiencia adquirida por los galenos de la antigüedad, tanto en su tratamiento como en sus aplicaciones, era transmitida de generación en generación a través de los herbarios, acumulando conocimientos sobre las plantas y sus efectos curativos para posteriormente hacerlos parte íntegra de sistemas y tradiciones curativas.

La cuarta parte de los fármacos empleados hoy en los países industrializados proceden de productos vegetales; es una tendencia creciente con un inesperado punto de partida: la farmacopea tradicional (los remedios de los abuelos) y los sistemas de saneamiento de los pueblos indígenas. Dentro de esta tendencia, los “remedios tradicionales” fueron reconocidos en los años sesenta por la *Organización Mundial de la Salud (OMS),* lo que le confirió un poderoso impulso a la investigación en particular de las plantas medicinales con fines terapéuticos.

El conocimiento de nuevos principios activos farmacológicos provenientes de plantas brinda la posibilidad de tener una mayor oferta de sustancias con propiedades terapéuticas o cosméticas que sean iguales o más efectivas que las hasta el momento conocidas, y dado este caso, el beneficio se vuelve preponderante al verse la sociedad favorecida al tener a mano un buen producto (1).

En nuestra región existe una gran diversidad de especies vegetales que son recursos renovables y una fuente potencial de desarrollo sostenible, donde encontramos la familia de las Mirtaceas, dentro de esta familia se destaca la especie *Psidium guajava*, por su importancia económica y sus propiedades antimicrobianas.

Debido al descubrimiento de semillas en sitios arqueológicos peruanos se considera que la guayaba pudo haber sido cultivada en este territorio desde hace miles de años. Se han encontrado guayabas secas en las tumbas de Chongos, cerca de Nazca, que tienen una antigüedad de más de dos mil años y en los antiquísimos cementerios de Ancón, Gallinazo, Virú, Pachacamac, Cahuachi, Estaquería, Ocucaje de la región Peruana. Los pueblos indígenas tienen una larga historia de su uso para propósitos medicinales. Un té preparado con las hojas y/o corteza ha sido usado por muchas tribus para la diarrea y la disentería y otras tribus lo emplean para problemas estomacales, vértigo y trastornos menstruales (2).

A los productos fitoterapéuticos, cosméticos y a sus extractos o drogas se les deben realizar estudios con el fin de establecer las especificaciones de calidad del material vegetal y sus extractos; buscando desarrollar productos que sean seguros, eficaces y de calidad.

La estandarización de productos a base de hierbas se define como el proceso de prescribir un conjunto de estándares o características inherentes, parámetros constantes, valores cualitativos y cuantitativos definitivos que llevan a un aseguramiento de la calidad, la eficacia, la seguridad y la reproducibilidad. Es el proceso de desarrollar y acordar estándares técnicos. Los estándares específicos se resuelven por la experimentación y observaciones. Por lo tanto la estandarización es una herramienta clave en el proceso de control de calidad (3).

Mediante la presente investigación se pretende contribuir a la estandarización del proceso de obtención a escala de laboratorio de un extracto de las hojas de *Psidium guajava* L., con el fin de definir cual el más apropiado para ser empleado como ingrediente en el desarrollo de pre-formulaciones y/o formulaciones de formas cosméticas a base de extractos de esta especie vegetal.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir a la estandarización del proceso de obtención a escala de laboratorio de un extracto de las hojas de *Psidium guajava* L.

Objetivos específicos

- Caracterizar el material vegetal realizando una descripción macroscópica, una descripción microscópica.

- Determinar a través de una marcha fitoquímica confirmatoria la presencia de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Psidium guajava* L.

- Elaborar una ficha preliminar para la monografía del material vegetal *Psidium guajava* L.

- Proponer una metodología para preparar y obtener el mejor extracto utilizando las partes pulverizadas de las hojas de *Psidium guajava* L. a partir del diseño experimental factorial reducido.

- Determinar los parámetros de calidad físicos, físico-químicos y químico cualitativos del extracto de las hojas de *Psidium guajava* L.

Justificación

Para que un producto tenga reproducibilidad lote a lote tiene que contar con ciertos procedimientos de operación, métodos de análisis adecuados y estudios de sus características que den como resultado lotes iguales o lo más idénticos posibles. Es indispensable que los métodos de manufactura y análisis de los productos fitoterapéuticos sean descritos, estandarizados y validados. Es por ello que surge el interés de caracterizar y contribuir con la estandarización del proceso a escala de laboratorio para la obtención de un extracto de las hojas de *Psidium guajava* L. que permita contar con un respaldo científico que garantice la calidad de ingredientes que posiblemente serán utilizados como coadyuvantes en productos con aplicación cosmética.

Actualmente existen en el mercado enjuagues bucales y productos para el acné que incluyen en su formulación extractos naturales. Adicionalmente, se encuentran numerosas investigaciones científicas relacionadas con las propiedades antimicrobianas que posee el extracto de las hojas de *Psidium guajava* L. Con estos antecedentes, realizamos la selección de este extracto para ser utilizado de manera eficaz como un ingrediente alternativo en un producto cosmético, teniendo en cuenta la preferencia que hoy día existe por las nuevas generaciones de productos cosméticos elaborados a partir de fuentes naturales; impactando de forma positiva el medio ambiente y la industria cosmética.

1. Marco teórico

La creciente aceptación de utilizar productos naturales por la población, además de la insatisfacción respecto a la seguridad y el coste de medicamentos, son algunos de los factores que contribuyen a aumentar la utilización de productos de origen botánico. En este contexto, las investigaciones dirigidas a desarrollar productos que contienen insumos derivados de plantas medicinales, con eficacia, seguridad y calidad constante se han incrementado en todo el mundo. De acuerdo a lo anterior, a continuación se describe los diferentes tipos de extractos que se pueden elaborar a partir de las plantas medicinales:

1.1 Extractos vegetales:

Los extractos vegetales son preparados concentrados de consistencia líquida, sólida o intermedia, obtenidos generalmente a partir de materia vegetal desecada. Los diversos tipos de extractos son:

1.1.1 Extractos Fluidos:

Son preparaciones líquidas en las cuales el solvente se ha evaporado hasta conseguir una concentración de principio activo similar a la concentración de principio activo en la droga original (relación droga:solvente 1:1). Se obtienen generalmente por maceración o percolación. El solvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. También pueden obtenerse por disolución de extractos secos. Los extractos fluidos se alteran fácilmente en contacto con la luz y el aire. Son muy utilizados para obtener formas líquidas (jarabes, pociones, gotas, entre otras) ya que se manipulan y dosifican con facilidad (4).

1.1.2 Extractos blandos:

Son preparaciones que poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El solvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular (4).

1.1.3 Extractos secos:

Son preparaciones de consistencia sólida que se obtienen por evaporación total del solvente y tienen una consistencia de polvo. Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original. Son preparados bastante estables (aunque en muchas ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación que se pueden utilizar para preparar tinturas, extractos fluidos, etc. Estos son obtenidos por evaporación o por liofilización (4).

1.1.4 Crioextractos:

Se obtienen de la droga fresca congelada, de la que se extraen los principios activos mediante nitrógeno líquido y luego se añade alcohol etílico para solubilizarlos. Los crioextractos son muy útiles para la extracción de proteínas y enzimas de ciertas especies (4).

1.2 Estandarización de extractos vegetales:

La estandarización de extractos vegetales puede ser definida como el establecimiento de la calidad reproducible por medio de la comparación de un producto con sustancias de referencias establecidas y definiendo las cantidades mínimas de uno o varios componentes o de un grupo de componentes. Con ello, se persigue garantizar la potencia de los componentes en el producto final (4).

Existen varias razones para estandarizar un extracto, entre ellas tenemos:

- Obtener productos reproducibles y de calidad.
- Los productos pueden cumplir con los estándares básicos requeridos.

- Sólo los extractos estandarizados pueden ser sometidos a ensayos clínicos y probar científicamente sus efectos.
- Los extractos estandarizados ofrecen al consumidor mayor seguridad (objetiva y subjetiva) y así se incrementa el nivel de confianza en los productos.

La estandarización de los extractos vegetales es importante ya que garantiza la calidad y seguridad del consumidor así como la reproducibilidad de los distintos lotes en el producto final (4).

1.3 Empleo de extractos de plantas como ingrediente en preparados cosméticos.

Cada vez está más en auge la cosmética natural y cada vez existe una oferta mayor en el mercado de este tipo de productos, formulados en su mayor parte por extractos de plantas.

Esta tendencia viene avalada por la preocupación de una gran parte de los consumidores, por cuidarse de una forma más natural, saludable y acorde con el medio ambiente, y dentro de esta inclinación hacia lo natural, la cosmética se plantea como el cuidado personal, tanto exterior como interior, y el mantenimiento del equilibrio corporal y energético.

La cosmética natural surge como una alternativa a la cosmética convencional que utiliza en sus formulaciones componentes que pueden resultar irritantes, producir alergias, y emplean en su presentación embalajes innecesarios que encarecen el producto, así como ingentes sumas de dinero en campañas publicitarias (5).

Por otro lado la cosmética natural garantiza que durante los procedimientos de elaboración de los cosméticos se extrae lo mejor de las plantas sin perjuicios para el entorno, transformando estos componentes en cosméticos sanos y efectivos (5).

Aunque no existe una definición universal de qué es la cosmética natural o vegetal, se entiende que un cosmético natural es aquel que presenta en su composición un 90% o más de materias primas naturales de origen no animal (vegetal o mineral), además no debe incluir en su composición sustancias nocivas para la piel y para la salud del usuario (5).

Los extractos que se han diseñado específicamente para los productos cosméticos vienen en muchas formas. Por lo general son extractos líquidos en un solvente cosméticamente aceptable o mezcla de solventes como el agua, butilenglicol, glicerina, aceite vegetal, o un éster cosmético. En la mayoría de los casos, el objetivo de producir un extracto es aumentar la potencia de este mediante la concentración de los componentes biológicamente activos. Aunque no es raro que un componente particular de la planta sea predominantemente el responsable por el beneficio; con frecuencia habrá una serie de compuestos relacionados, o en algunos casos compuestos no relacionados, cada uno de ellos contribuyendo de algún modo a las propiedades benéficas de la planta (6).

Algunos ingredientes y aplicaciones de los extractos de plantas son: efectos fotoprotectores y antioxidantes como la silimarina, el resveratrol, el ginkgo; efecto antiedad como el picnogenol, la centella; como crema hidratante, el extracto de soya, el aloe vera, la caléndula; como astringente el árnica; como antiirritante y antiinflamatorio el aceite de las semillas de cilantro, entre otros (7).

Sin embargo, las materias primas de origen vegetal y sus extractos pueden ser utilizados en cosmética aprovechando la información disponible de investigaciones orientadas a la evaluación farmacéutica, en particular a lo relacionado con estudios farmacognósticos, fitoquímicos, de actividad farmacológica y de seguridad. En este sentido, a partir de las actividades farmacológicas atribuidas a una planta medicinal, se pueden extrapolar posibles usos cosméticos. Con la información de ingredientes activos se puede establecer la caracterización del ingrediente natural y las bases para su control de calidad. Al considerar el ingrediente natural (extracto, aceite, aceite esencial, gomas, mucílagos, ceras, resinas, etc.) en conjunto, en lugar de los compuestos aislados se aprovechan las bondades del ingrediente natural como sistema multicomponente, en particular los efectos sinérgicos (8-10).

Los productos cosméticos naturales utilizados como enjuague bucal y para el acné a partir de extractos vegetales constituyen una alternativa interesante para el cuidado personal.

1.4 Enjuagues Bucales y Productos Antiacné

A continuación se describen los cosméticos utilizados en la cavidad oral y los cosméticos para el cuidado de la piel

1.4.1 Cosméticos para la cavidad oral.

Los cosméticos para la cavidad oral se clasifican en dentífricos y enjuagues bucales. Los primeros son indicados para la limpieza de los dientes y la cavidad oral, la prevención de la caries dental y de enfermedades periodontales. Los segundos, aunque son similares a la forma líquida de los dentífricos, no requieren del uso de cepillo. Son utilizados para prevenir afecciones que generen malestar en la cavidad oral, pero después de colocar una cantidad apropiada en la boca y enjuagar, son descartados. Ambos presentan funciones que se encuentran asociadas principalmente con limpieza, blanqueado, remoción de placa, prevención de halitosis, remoción de manchas, prevención de deposición de cálculos, así como en la prevención de la caries dental y la enfermedad periodontal (11).

- **Caries dental y enfermedad periodontal**

Las enfermedades orales como la caries dental y las afecciones periodontales son uno de los mayores problemas de salud en el mundo, que influencian de forma directa la calidad de vida (12,13). Por otro lado, la persistencia de éstas ha demostrado tener una relación directa con condiciones crónicas y enfermedades sistémicas tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide y osteoporosis (12). De manera específica, se consideran como factores preponderantes en el desarrollo de la caries dental: el consumo de azúcares, la susceptibilidad dental y la presencia de bacterias. En este último proceso, los microorganismos responsables (especies de *Streptococcus*, principalmente *S. mutans*, *Lactobacillus* y *Actinomicetos*) convierten el azúcar soluble en insoluble, y los polisacáridos generados, se agrupan y se adhieren a la superficie de los dientes produciendo lo que se conoce como placa.

Otras bacterias productoras de ácido disuelven los constituyentes inorgánicos de los dientes causando la caries dental, que si no se toman los correctivos necesarios conlleva a la posterior pérdida de las piezas dentales.

Asimismo, la enfermedad periodontal es causada, entre otras razones, por la placa, y está relacionada con la generación de gingivitis y piorrea. La inflamación de las encías es ocasionada por la liberación, por parte de bacterias anaeróbicas Gram negativas (*Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus sp*., *Prevotella sp*. y *Fusobacterium sp*.), de endotoxinas que producen enrojecimiento e hinchazón, que con la dilatación de los vasos, resultan en la formación de los huecos periodontales entre los dientes y las encías, facilitando la acumulación de placa que empeora la inflamación y ocasiona la destrucción del tejido periodontal.

Las estrategias de control para evitar la formación de la misma se han cifrado en:
- Restringir el consumo de azúcar;
- Remover la placa de la superficie de los dientes;
- Aumentar la resistencia dental al ataque por ácidos, empleando sustancias fluoradas.

Aunque la placa se puede remover con dentífricos, la formación de esta puede ser suprimida por la incorporación en el preparado cosmético de ingredientes que prevengan la proliferación de bacterias formadoras de placa ya sea a través de la ruptura de los polisacáridos generados o por la inhibición de la biosíntesis de los mismos, que son los que permiten que las bacterias se adhieran a la superficie de los dientes. Igualmente, la enfermedad periodontal, después de la infección, se traduce en un proceso inflamatorio que puede generar gingivitis o periodontitis. Por lo anterior es recomendable incluir en la formulación ingredientes que propicien una reducción de la inflamación, que supriman la proliferación bacteriana y que estimulen la circulación en las encías (11–12,14).

1.4.2 Cosméticos para el cuidado de la piel.

Son también conocidos como cosméticos faciales, este tipo de sustancias tienen como finalidad limpiar, mantener un balance de la piel y generar protección. Generalmente su presentación es como lociones emulsionadas y cremas humectantes (11).

- **Acné**

Acné vulgaris es una de las enfermedades de la piel con mayor prevalencia entre pacientes con edades comprendidas entre 11 y 25 años. Generalmente se observan casos ligeros de acné en la pubertad, pero se pueden dar casos serios dejando cicatrices aún después del tratamiento, las cuales pueden causar problemas psicológicos afectando la vida social. Desde el punto de vista cosmético un tratamiento apropiado es esencial para la recuperación de la apariencia normal (11,15-17).

La etiología del acné, que tiene una variación de individuo a individuo, incluye:
- Hiperactividad de las glándulas sebáceas;
- Hiperqueratosis en el infundíbulo del cabello;
- Efecto bacteriano;
- Otros, factores genéticos, hábitos alimenticios, exceso de trabajo y estrés.

El efecto bacteriano está estrechamente relacionado con las dos primeras causas, ya que el sebo puede acumularse como resultado de la secreción excesiva o la hiperqueratosis, lo que conlleva a que el número de bacterias causantes incremente. Las bacterias quizás no sean las directamente responsables de la producción del acné, pero sí está claro que ellas lo exacerban e inducen acné pustular (11,15-17).

Cabe mencionar que el proceso inflamatorio del acné es el resultado de la respuesta del hospedero a la bacteria *Propionibacterium acnes* que a través de las lipasas hidroliza los triglicéridos presentes en el sebo formando así ácidos grasos libres, que son los que desencadenan el proceso inflamatorio al actuar como quimoatrayentes de neutrófilos (11,15-17).

Debido a las diversas causas que lo pueden ocasionar, se pueden usar diferentes agentes para su control. Algunos de ellos son: inhibidores de la secreción de sebo, agentes queratolíticos, agentes descamantes de corneocitos y agentes antibacterianos como el cloruro de benzalconio, el cloruro de benzetonio, el halocarbano o el 2,4,4-tricloro-2-hidroxifenol, entre otros. Cuando el caso de acné es particularmente severo, se puede requerir el tratamiento con fármacos antiinflamatorios. Adicionalmente un buen cuidado de la piel es muy importante para la prevención y cura del acné (11).

1.5 Bacterias que se encuentran en la cavidad oral (18).

La boca alberga alrededor de 600 tipos de bacterias entre las cuales se encuentran:

1.5.1 Streptococos:

Son los que inician las caries, tienen propiedades ácidas por lo que desmineralizan el esmalte y la dentina, entre ellas se encuentran, *S. mutans, S. sobrinus, S. sanguis, S. salivalis.*

1.5.2 Lactobacilos:

Son acidófilos que continúan las caries ya formadas, son proteolíticas por lo que desnaturalizan las proteínas de la dentina, entre ellas se encuentra *L. casei.*

1.5.3 Actinomices:

Tienen acción acidúrica y proteolítica, entre ellas se encuentran, *A. viscosus, A. naeslundii.*

1.6 Bacterias que producen el acné.

El acné, especialmente el acné inflamatorio, es generalmente el resultado del crecimiento bacteriano profunda en el folículo piloso. Estas bacterias producen moléculas que incitan a una respuesta inmune, dando lugar a los síntomas de la inflamación y el acné. La bacteria responsable principal para el acné es *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), pero otras bacterias como *Staphylococcus aureus* también puede vivir en la piel y en los folículos pilosos. Hay muchas cepas diferentes de bacterias *P. acnes*, que han desarrollado resistencia a uno o varios antibióticos (19).

1.7 Productos vegetales empleados como antimicrobianos.

Muchos microorganismos, que causan daño a la salud humana, exhiben resistencia a los fármacos debido al uso inadecuado de los antibióticos. Por lo tanto existe la necesidad de descubrir nuevas sustancias de fuentes naturales (20). Gran cantidad de plantas se han usado tradicionalmente para tratar enfermedades infecciosas y muchos compuestos antibacterianos se han aislado de estas. Brasil, Cuba, India, Jordania y México son países que tienen una diversa flora que poseen propiedades antimicrobianos (21). En la tabla 1-1 se describen algunos ejemplos de plantas y sus indicaciones (22).

Tabla 1-1: Ejemplo de algunas plantas y sus indicaciones terapéuticas.

PLANTA	INDICACIÓN TERAPÉUTICA
Aceite de Té	Tratamiento del acné
Extracto de Neem	Tratamiento del acné / Psoriasis / Sarna / Eccema
Extracto de Jengibre	Antimicrobiano
Extracto de Mandarina	Antimicrobiano
Extracto de Salvia	Reducir la halitosis / Combatir la gingivitis
Extracto de Menta	Reducir la halitosis / Combatir la gingivitis
Extracto de Manzanilla	Reducir la halitosis / Combatir la gingivitis

1.8 *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)

La voz guayaba procede de las antillas y es de origen Quiche: se compone de estas dos raíces: Va (gua)=comida y Yab=enfermo; significa pues "comida enferma" y se llamó así aludiendo, sin duda, al mal estado de la fruta, cuando está madura (23).

El nombre científico de la guayaba es *Psidium guajava* y es nativo de América tropical. Cultivada y naturalizada en trópicos del viejo mundo, fue llevada por los primeros exploradores Europeos a México y Perú. En Perú se encontraron en tumbas precolombinas sus frutos y hojas.

Tradicionalmente se le atribuyen propiedades antibacteriana, antiemética, antiinflamatoria, antihelmíntica, antiséptica, antitusiva, astringente, carminativa, espasmolítica y tónica a las hojas y a la corteza. El fruto se usa para aliviar la congestión respiratoria y se le confieren propiedades como astringente, febrífuga y desinflamante; por vía tópica se recomienda para tratar afecciones de la piel y lengua inflamada. La decocción de hojas y corteza se usa para tratar enfermedades dermatomucosas (fístulas, leucorrea, piodermia, raspones, tinea, úlcera) y diabetes (24).

1.8.1 Descripción Botánica

Psidium guajava (L.) es un árbol perenne de 5 a 10 m de altura, de tronco grisáceo-café con la corteza lisa, escamosa de color rojizo, polidérmica. Las ramas son cuadrangulares de color pardo-verdoso con hojas de forma desde elíptica a oblonga, de 4 a 12 cm de longitud y 3 a 5 cm de ancho; son opuestas con el pecíolo corto y sus márgenes son enteros de color verde-grisáceo por el haz y verde claro por el envés en donde se observa su prominente venación con 12 a 16 nervios laterales de cada lado. Posee pedúnculos axilares, pubescentes con 1 a 3 flores pubescentes. Las flores forman cimas o son solitarias, con pétalos de 2 a 3 cm de longitud, de color blanco en número 5, perfumadas, de cáliz verdoso, numerosos estambres en forma de filamentos blancos y con anteras amarillas.

El fruto es globuloso, de color amarillo, cremoso, con numerosas semillas duras y pequeñas, como piedrecillas, de color rosado-amarillento. El fruto alcanza un diámetro de 4 hasta 10 cm. Florece en América de mayo a septiembre **(Figura 1-1).** 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 a1700 m (25).

Figura 1-1: *Psidium guajava* L.

1.8.2 Clasificación Taxonómica

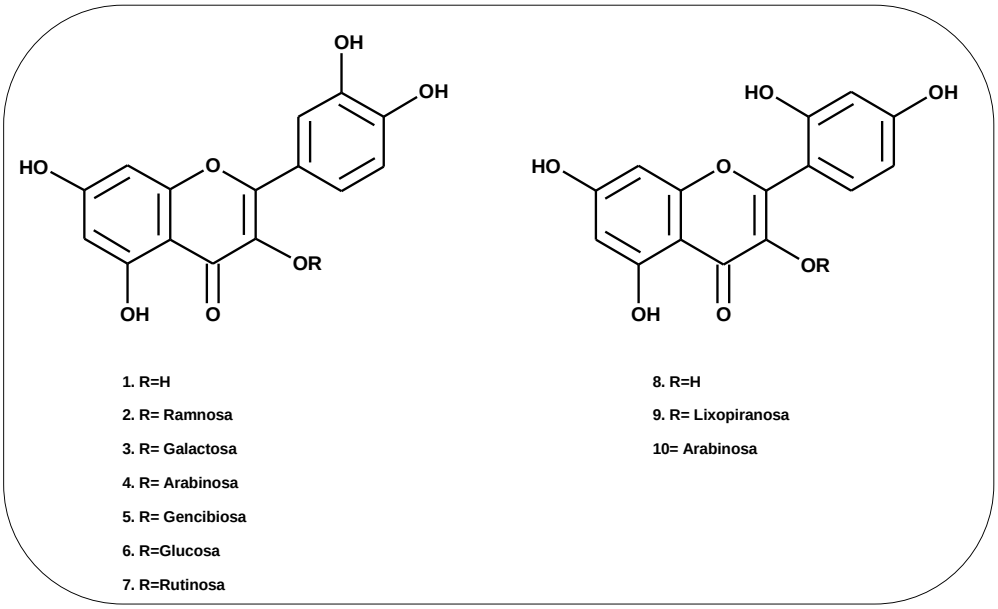
Reino:	Plantae
Subreino:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Mirtales
Familia:	Myrtaceae
Subfamilia:	Mirtoideae
Género:	*Psidium*
Especie:	*guajava*
Descriptor:	Linneo (L.)
Nombre Binomial:	*Psidium guajava* L.

1.8.3 Composición química

En las hojas de *Psidium guajava* L. se han identificado los siguientes fitoconstituyentes: taninos, fenoles, flavonoides, aceites esenciales, carotenoides, lecitinas, vitaminas, fibra y ácidos grasos (26).

A continuación se muestra algunos flavonoides aislados e identificados de las hojas de *Psidium guajava* L **(Figura 1-2.).**

Figura 1-2: Flavonoides previamente identificados en las hojas de *Psidium guajava* L.



1.Quercetina (3,5,7,3',4'-Pentahidroxiflavona); 2, Quercitrina (3-O-α-L-Rhamnosil- quercetina); 3. 3-O-β-D-Galactosil-quercetina; 4. Guajaverina (3-O-α-L- Arabinosil-quercetina); 5. 3-O-Genciobiosil-quercetina; 6. 3-O-β-D-Glucosil- quercetina; 7. 3-O-β-D-Rutinosil-quercetina; 8. Morina (3,5,7,2',4'-Pentahidroxiflavona); 9. 3-O-α-L-Lixopiranosil-morina; 10. 3-O-α-L-Arabinosil-morina.

1.8.4 Propiedades antimicrobianas de *Psidium guajava* (L.)

Son numerosas las investigaciones científicas de las propiedades antimicrobianas de los extractos de las hojas de *Psidium guajava* L. La primera publicación formal de los extractos acuosos de hoja de guayaba la realizó, en Indonesia, Colliere quien observó que el extracto acuoso inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de otros microorganismos patógenos cultivados *in vitro* (27). Más tarde, El-Khadem y Mohamed, observaron lo mismo con el extracto metanólico de las hojas, del cual aislaron e identificaron como responsables de esta actividad, dos derivados glicosilados del flavonoide Quercetina denominados avicularina (3-O-gentobiósido-quercetina) y guajaverina (3-O-α-L-arabinósido-quercetina) (28). Además de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, el extracto metanólico de las hojas de *Psidium guajava* inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis, Escherichia coli* y *Candida*.

El extracto exhibe actividad variable contra microorganismos con rangos de inhibición de 14-35 mm, rangos de CMI de 1.25 – 10 mg/mL y concentración bactericida mínima (CBM)/concentración fungicida mínima (CFM) de 2.5 - 20 mg/mL para organismos sensibles en las concentraciones ensayadas. La más alta actividad se presentó a una CMI de 1.25 mg/mL y a una concentración bactericida mínima de 2.5 mg/mL (29).

Los extractos acuosos tienen actividad antibacteriana contra *Salmonella typhy* y *Klebsiella pneumoniae* (30). De igual forma la fracción soluble en acetato de etilo del extracto acuoso de las hojas de *Psidium guajava* posee propiedades antibacterianas de amplio espectro contra bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, y bacterias gram-negativas como *Salmonella typhymurium, Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (31).

En otro estudio, cuatro compuestos antibacterianos fueron aislados de las hojas de guayaba. Las estructuras de estos se establecieron mediante análisis químicos y espectroscópicos. Dos nuevos glicósidos de flavonoides, Morin-3-O-alfa-L-lixopiranósido y Morin-3-O-alfa-L-arabopiranósido, y dos flavonoides conocidos guaijavarina y quercetina, fueron identificados. La CMI de Morin-3-O-alfa-L-lixopiranósido y Morin-3-O-alfa-L-arabopiranósido fue de 200 µg/mL para cada uno contra *Salmonella enteritidis*, y 250 µg/mL y 300 µg/mL contra *Bacillus cereus*, respectivamente (32).

Diferentes investigadores, de manera selectiva, han realizado además algunos tamizajes para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de guayaba. El efecto antimicrobiano del aceite esencial de hojas de guayaba fué analizado frente a las cepas de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Salmonella spp* aisladas del camarón *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). El extracto del aceite esencial mostró actividad inhibitoria contra *S. aureus y Salmonella spp* lo que lo hace una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos (33). Una mayor concentración de compuestos químicos activos en los aceites esenciales explica su mayor acción inhibitoria. El aceite esencial extraído de hojas de *Psidium guajava* L. se probó empleando el método de difusión en agar, contra 5 cepas de bacterias gram positivas, 5 cepas de bacterias gram negativas, así como tres cepas de hongos.

El aceite mostró actividad antibacteriana principalmente contra*, Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus,* sugiriendo que el aceite esencial contiene compuestos que pueden formar la base para el desarrollo de nuevas formulaciones de amplio espectro antimicrobiano. Estos resultados apoyan la noción de que los aceites esenciales de las plantas pueden tener muchos usos como productos farmacéuticos (34). Recientemente, se ha extraído el aceite esencial de las hojas de la guayaba mostrando efecto inhibitorio contra *Bacillus cereus, Enterobactor aerogenes* y *Pseudomonas fluorescens*. Dentro del género *Psidium*, los componentes de los aceites esenciales están compuestos principalmente por monoterpenos 1,8 cineol, p-Cimeno y acetato de α-terpenil (35).

- **Actividad de *Psidium guajava* L. contra bacterias de la cavidad oral**

La quercetina es el principal núcleo de flavonoide presente en los glicósidos de las hojas de la guayaba. Ensayos antimicrobianos mostraron que los extractos y los compuestos aislados, quercetina, 3-O-α-L-arabinofuranósido-quercetina, 3-O-β-D-arabinopiranósido-quercetina, 3-O-β-D-glicósido-quercetina y 3-O-β-D-galactósido-quercetina, poseen actividad antibacteriana, explicando el uso tradicional de los extractos como bactericida para aliviar las úlceras orales y las encías inflamadas (36). Los extractos de *P. guajava* pueden trabajar inicialmente previniendo y reduciendo la adherencia de colonizadores bacterianos primarios a la superficie del diente y segundo, para prevenir o inhibir el crecimiento y proliferación de microorganismos que se adhieren a la superficie del diente y pueden potenciar sus actividades antiplaca (37). El mecanismo de acción del efecto anti-adherente de *Psidium guajava* podría envolver una modificación del enlace hidrofóbico entre las bacterias y los componentes salivales que cubren las superficies de los dientes (38). En lo que concierne a patógenos involucrados en enfermedades bucales, el flavonoide, quercetina-3-O-alfa-L-arabinopiranósido (guaijaverina) aislado de *Psidium guajava* demostró un alto potencial como agente para evitar la formación de la placa al inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* (39), además los extractos de *P. guajava* tienen efecto bacteriostático sobre la placa bacteriana creando un ambiente de estrés al suprimir el crecimiento y la propagación celular. En el contexto de la placa dental, esto garantizaría la consecución de una placa delgada. Por lo tanto, la decocción de esta planta sería adecuada si se usa en el control de la placa dental (40).

El extracto acuoso de las hojas de *P. Guajava* a una concentración de 1 mg/mL, tuvo un efecto profundo sobre la ultraestructura de tres bacterias formadoras de la placa bacteriana, *Streptococcus sanguinis, Streptococcus mitis* y *Actinomyces* sp. reduciendo la hidrofobicidad de la superficie celular de estos en un 54.1%, 49.9% y 40.6%, respectivamente (41). Los extractos interfieren con el ciclo de crecimiento y el desarrollo de las células bacterianas haciéndolas menos eficientes para dividirse y multiplicarse. Por lo tanto, el crecimiento de la placa dental puede ser lento y controlado, indicando la actividad antiplaca de los extractos acuosos, tal como se mencionó anteriormente (42). Estos resultados dan un soporte científico que permiten pensar en el uso de las hojas de *Psidium guajava* para el tratamiento de enfermedades dentales o el control de los microorganismos asociados a ellas (43).

- **Actividad de *Psidium guajava* L. contra bacterias que producen el acné**

Un estudio con diferentes especies provenientes de Tailandia reveló el efecto antimicrobiano de extractos de la *P. guajava* contra bacterias que inducen el acné, el valor de la CMI fue de 2.5 mg/mL contra *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* (44). De igual forma, la actividad antibacterial de los extractos acuosos y de etanol-agua de las hojas de *Psidium guajava* fue estudiada usando ensayos de microdilución. Los extractos acuosos de las hojas fueron activos contra *Staphylococcus aureus* (CMI=500 µg/mL) y *Bacillus subtilis* (CMI=500 µg/mL), sin embargo los extractos hidroalcohólicos mostraron la más alta actividad comparada con los extractos acuosos. Los extractos de etanol:agua (50:50) y (70:30) fueron más activos contra *Staphylococcus aureus* (CMI=125 µg/mL) y *Bacillus subtilis* (CMI=125 µg/mL). El extracto etanol:agua (7:3) fue activo contra *S. epidermidis* (CMI=250 µg/mL) (45).

Otro estudió reveló que los extractos de las hojas de *P. guajava* poseen actividad antimicrobiana contra bacterias asociadas con heridas quirúrgicas, infecciones en la piel y otros tejidos blandos; pudiéndose utilizar esta planta para la formulación de productos antibacterianos para manejar este tipo de infecciones (46). Las lociones hidroalcohólicas de las cáscaras liofilizadas de *Psidium guajava* al 1% presentaron buena actividad para el tratamiento del acné contra las cepas *S. epidermidis* y *S. aureus,* semejante a clindamicina (47).

También se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *P. guajava* contra *Propionibacterium acnes, Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* por el método de difusión en disco (zona de inhibición), concluyendo que los extractos de las hojas son beneficiosas en el tratamiento del acné especialmente cuando se conoce que tienen actividades antiinflamatorias (48).

Basados en estos importantes hallazgos, se confirma que un extracto elaborado a partir de las hojas de *Psidium guajava* L. posee propiedades antimicrobianas y puede ser utilizado de manera eficaz y segura como un coadyuvante en productos cosméticos, teniendo en cuenta que hoy día existe preferencia por las nuevas generaciones de productos cosméticos elaborados a partir de recursos naturales renovables; impactando de forma positiva el medio ambiente y la industria cosmética.

2. Metodología

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en seis etapas, las cuales se relacionan a continuación.

Etapa I: Colecta y adecuación del material vegetal: Esta etapa consistió básicamente en la descripción del método empleado para la recolección de las hojas de *Psidium guajava* L.

Etapa II: Caracterización del material vegetal: Esta etapa incluyó la descripción macroscópica, la descripción microscópica de las hojas, la descripción microscópica de la droga vegetal y la determinación de materias orgánicas e inorgánicas extrañas; estos ensayos se realizaron de acuerdo a los procedimientos descritos en los métodos de control de calidad para los materiales a base de hierbas de la OMS (49). Se realizó una marcha fitoquímica preliminar con el extracto etanólico de las hojas, con el fin de confirmar de una forma cualitativa los metabolitos secundarios presentes.

Con los resultados obtenidos se elaboró la monografía para este material vegetal.

Etapa III: Estandarización de las condiciones de secado, molienda, y determinación de cenizas totales y sustancias extraíbles: Esta etapa consistió básicamente en la realización de un ensayo experimental que permitió construir una curva de pérdida por secado vs tiempo que sirvió para estimar el tiempo necesario que debe permanecer el material en la estufa de aire circulante para que esta tenga una humedad de aproximadamente 10%. El material vegetal seco con una humedad conocida se molió utilizando un molino casero y la molienda se pasó por tamices lo que permitió caracterizar la distribución del tamaño de partícula. Al material se le realizó la determinación de cenizas totales. Con el fin de escoger las dos relaciones etanol-agua que se utilizaron en el diseño experimental factorial reducido para la preparación de los extractos se realizó la determinación de sustancias extraíbles. Con los resultados obtenidos se elaboró la monografía para este material vegetal.

Etapa IV: Preparación de los extractos: Esta etapa consistió, de acuerdo a los resultados del diseño experimental factorial reducido, en la preparación de los diferentes extractos fluidos.

Etapa V: Caracterización de los extractos fluidos y secos: Esta etapa consistió básicamente en la caracterización de los ocho extractos fluidos preparados de acuerdo a los resultados del diseño experimental factorial reducido, a estos extractos se les realizó una evaluación física (determinación de las características organolépticas y la densidad); y una evaluación química (determinación del pH). Estos ensayos se realizaron de acuerdo a los procedimientos descritos en la USP35 – NF30 (50). A los extractos secos se les determinó el porcentaje de rendimiento y se estableció el perfil cromatográfico para flavonoides utilizando la técnica de Cromatografía en capa delgada, un análisis de flavonoides totales.

Etapa VI: Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos de las hojas de *Psidium guajava* L.: Esta etapa comprendió la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *Psidium guajava* L.

A continuación se describen las metodologías y los procedimientos empleados para la realización de este trabajo de investigación:

2.1 Colecta y adecuación del material vegetal

Se realizaron dos recolecciones de las hojas en estado adulto de *Psidium guajava* L. en la finca Villa Karol ubicada en el Municipio de Sabanagrande, Departamento del Atlántico (ubicada a 10°47'25"N, 74°45'20"O; latitud: 10.7880, longitud:-74.7675) una en el mes de Septiembre y otra en el mes de Noviembre del 2011; en horas tempranas de la mañana, a la sombra. Las hojas se recolectaron de 8 especímenes, estas se limpiaron cuidadosamente. Un ejemplar de esta planta se envió al Herbario Nacional Colombiano para la identificación taxonómica de la especie asignándole como número de voucher 558071 (Ver anexo A), la primera recolección se utilizó para desarrollar la caracterización del material vegetal y ambas recolecciones sirvieron para estimar el tiempo necesario para que la droga tuviera una humedad de aproximadamente 10%.

Se realizó una tercera recolección de las hojas de *Psidium guajava* L. de la finca Villa Karol en el mes de Febrero del 2012; bajo las mismas condiciones de las anteriores. Las hojas después de estar libre de partículas extrañas, se utilizaron para la obtención de los extractos fluidos.

2.2 Caracterización del material vegetal

2.2.1 Descripción macroscópica del material vegetal fresco

- **Examen visual, olor y sabor:** Se observaron las características de forma, textura, color, olor y condición. Se colocó una muestra de las hojas en un vidrio reloj para determinar el color y la condición que esta presentaba. Se evaluó que tipo de textura presentaban las hojas, tocándolas para indicar si presentaban una textura blanda o suave. El olor fue evaluado colocando una parte de la hoja en la palma de la mano y se trituró clasificándola como inodora, débil o fuerte y la sensación del olor clasificándola como aromática, frutal, húmeda, mohosa o rancia. El sabor también fue evaluado para determinar si presentaba un sabor dulce, amargo o astringente.

- **Determinación de las dimensiones de las hojas:** A las hojas se le evaluaron sus dimensiones (largo y ancho) **(Figura 2-1)**, para ello se seleccionó un tamaño de muestra n = 50 y con la ayuda de un pie de Rey se determinó el largo y el ancho de las mismas.

Figura 2-1: Evaluación del largo y ancho de las hojas.

2.2.2 Descripción microscópica del material vegetal fresco

A las hojas se les realizó un estudio micromorfológico para el cual se utilizó un microscopio Leica CME 1349521X. Para esta identificación se realizaron cortes transversales a las hojas y se utilizó fluoroglucinol para teñir los tejidos lignificados.

2.2.3 Descripción microscópica de la droga vegetal

A la droga vegetal pulverizada se le realizó un estudio micromorfológico utilizando el microscopio Leica CME 1349521X.

2.2.4 Determinación de materia orgánica extraña

Partiendo de 100 g de hojas, se procedió a la separación manual de las materias orgánicas extrañas tales como hojas, raíces u otro órgano no perteneciente a la planta en estudio. Este ensayo se realizó por triplicado. El porcentaje de materia orgánica extraña (MO), se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$MO= (m/M) \times 100$$

Donde:
m = masa de materia orgánica extraña
M = masa de las hojas
100 = factor matemático

2.2.5 Determinación de materia inorgánica extraña

Partiendo de 100 g de hojas se procedió a la separación manual de todas partículas de tierra, arena y piedras pequeñas presentes en la misma. Este ensayo se realizó por triplicado. El porcentaje de materia inorgánica extraña (MI), se calculó mediante la fórmula siguiente:

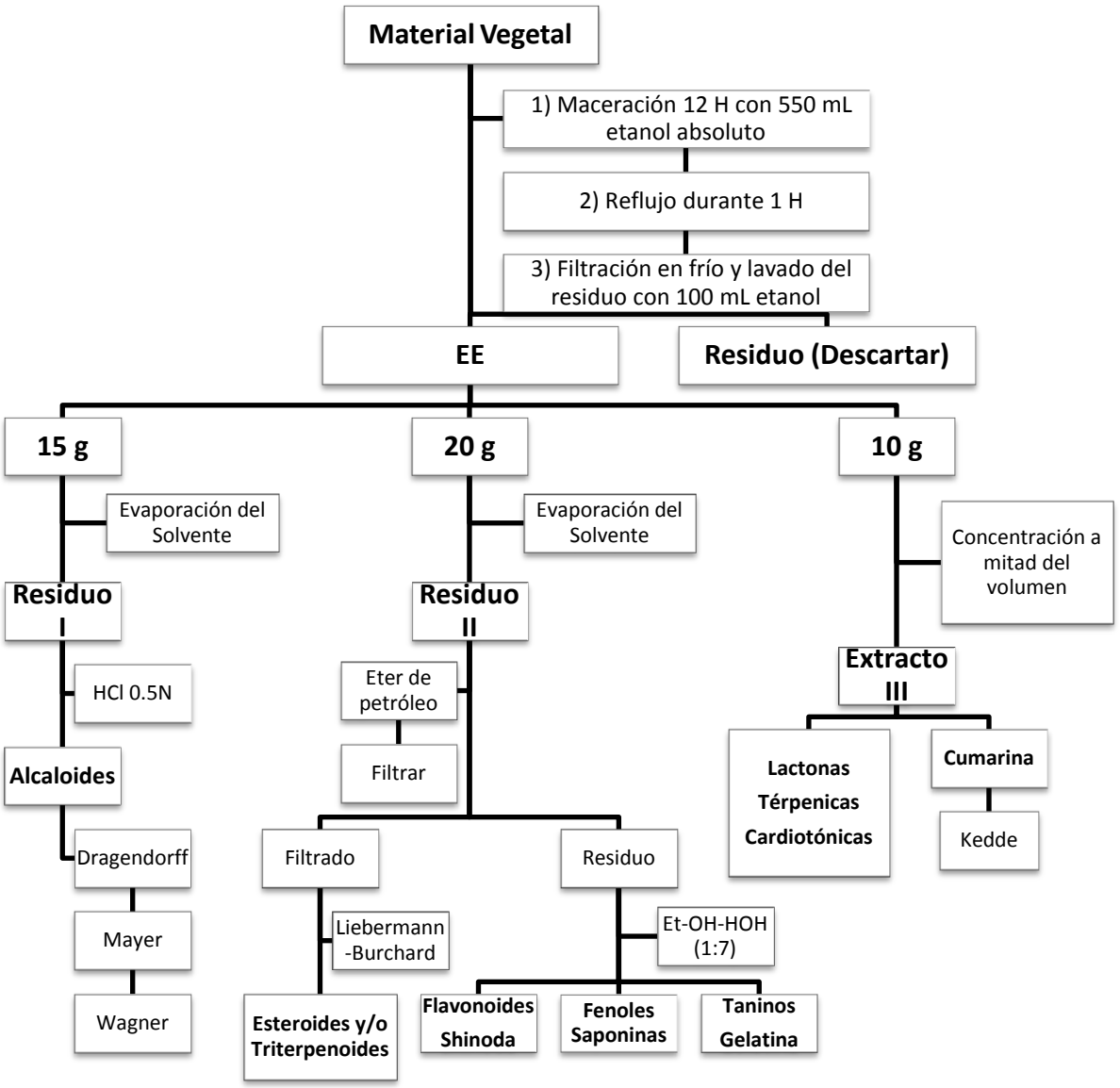
$$MI = (m/M) \times 100$$

Donde:
m = masa de materia inorgánica extraña
M = masa de la muestra ensayo
100 = factor matemático

2.2.6 Marcha fitoquímica preliminar

Se realizó la marcha fitoquímica cualitativa confirmatoria al extracto etanólico (EE) de las hojas de *Psidium guajava* L. con el fin de confirmar la presencia de diversos tipos de metabolitos secundarios. En la **figura 2-2** se describe la marcha fitoquímica preliminar confirmatoria y se especifican los ensayos realizados con el EE.

Figura 2-2: Marcha fitoquímica preliminar confirmatoria.



- **Métodos de Identificación química**

Reactivos para saponinas: Prueba de la espuma: 3 mL de la solución etanol:agua 1:7 de la muestra se coloca en un tubo de ensayo y se agita vigorosamente por 30 seg. La presencia de saponinas es indicada por la formación de una espuma persistente por 30 min.

Reactivo para taninos o compuestos fenólicos: Reactivo de cloruro férrico: 4 gotas de tricloruro férrico al 10% sobre una parte de la solución etanol:agua 1:7 de la muestra, dió una coloración negra. **Gelatina-cloruro de sodio:** 1 g de gelatina en 100 mL de agua se añade 10 g de cloruro de sodio; a la muestra se le adiciona 1 mL de la solución anterior, se obtiene un precipitado blanco. A este se le adiciona 2 mL de solución de úrea y unas gotas de cloruro férrico al 10%, una coloración verde oscura indica la presencia de taninos.

Determinación de flavonoides: Reacción de Shinoda: una parte de la solución etanol:agua 1:7 de la muestra se agrega aproximadamente 0.5 mg de limadura de magnesio seguido por unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Una vez terminada la efervescencia, se adicionan 0.5 mL de alcohol amílico. Se observa aparición de un color naranja.

Determinación de Alcaloides: Se tomaron aproximadamente 15 gramos de EE y se llevó a sequedad en una cápsula de porcelana, el residuo obtenido se extrajo con 20 mL de HCl 0.5 N en un baño de María a 60°C por 15 minutos y se filtró empleando papel de filtro Wathman No. 1. Este filtrado se dividió en tres tubos de ensayos a los cuales se le adicionaron de dos a tres gotas de los reactivos de Wagner, Mayer y Dragendorff dando positivo si se observa la presencia de turbidez o precipitado.

Prueba para Leucoantocianidinas: A otra parte de la solución etanol:agua 1:7 de la muestra se adicionaron unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y se colocó en baño de María hirviendo por 10 minutos. La prueba es positiva si se obtiene una coloración roja.

Determinación de Triterpenoides y/o Esteroides: Reacción de Salkowski: Se toman 10 mL de EE, se llevan a sequedad y se adicionaron 10 mL de Cloroformo, se filtró y al filtrado se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. **Cromatografía de capa fina:** El filtrado obtenido de la extracción con éter de petróleo se concentra a 5 mL, se adiciona 10 mL de una mezcla de metanol:agua 90:10, se agita fuertemente y se espera la separación de las fases.

Se toma una alícuota de la fase etérea y se realiza el análisis por cromatografía de capa fina empleando como fase móvil ciclohexano:acetato de etilo (95:5) y como revelador el reactivo de Liebermann-Burchard secando la placa en una estufa a 110°C. La aparición de manchas de tonalidad roja indica una prueba positiva.

Determinación de Cumarinas: En un tubo de ensayo grande se colocó 1 g de material vegetal fresco y macerado y se agregó una cantidad suficiente de etanol hasta cubrir el material vegetal. Se cubrió la boca del tubo de ensayo con un papel filtro blanco, se agregaron unas gotas de NaOH diluido en el papel filtro que cubría la boca del tubo de ensayo. Se calentó hasta ebullición el tubo de ensayo por 5 minutos, se enfrió y se retiró el papel filtro. Se observó bajo luz ultravioleta a 365 nm, la aparición de una coloración fluorescente que puede ser verde, amarilla, roja en el papel filtro indica la prueba positiva.

Determinación de Antraquinonas por Cromatografía de capa fina: A la muestra se le realiza una cromatografía en capa fina empleando como fase móvil acetato de etilo:metanol:agua (100:17:13), la detección se realizó bajo luz ultravioleta a 365 nm, la aparición de una coloración fluorescente amarilla indica la prueba positiva. Se utilizó como estándar un extracto etanólico de Sen.

2.3 Estandarización de las condiciones de secado, molienda, determinación de cenizas totales y sustancias extraíbles.

2.3.1 Estudio de secado

Se realizaron dos estudios de secado con aproximadamente 100 g del material proveniente de la finca Villa Karol de los meses de Septiembre y Noviembre del 2011.

Se utilizó un horno de aire circulante marca Termo Scientific – Lindberg Blue M calibrado a una temperatura de 43±2°C. De la muestra se toman de 3 a 5 gramos a diferentes intervalos de tiempo (1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas y 36 horas). La cantidad tomada de cada intervalo de tiempo fue dividida en tres partes y transferida a una botella previamente tarada y secada para conocer la humedad residual determinada por la pérdida por secado por triplicado hasta peso constante, cada 30 minutos a una temperatura de 105°C (**Figura No. 2-3**).

Los resultados fueron expresados en porcentaje y se construyó una curva de humedad residual (determinada por la pérdida por secado) con el promedio de las tres determinaciones. Se realizó un análisis estadístico de Anova con el fin de estimar si estas dos pruebas de secado eran suficientes. Posteriormente se compararon los resultados obtenidos de las dos recolecciones y se estimó el tiempo necesario para que la droga tenga una humedad residual de aproximadamente 10%.

La pérdida por secado (H) de la droga se expresa en porcentaje mediante la fórmula siguiente:

$$H = [(M_2 – M_1) / (M_2 – M)] \times 100$$

Donde:

H = Pérdida en peso por secado (%)

M_2 = Masa de la botella con la droga (g)

M_1 = Masa de la botella con la droga desecada (g)

M = Masa de la botella vacía (g)

100 = Factor matemático.

Figura 2-3: Montaje de pérdida por secado.

2.3.2 Secado de las hojas.

Las hojas de la tercera recolección se secaron en el horno de aire circulante marca Termo Scientific – Lindberg Blue M calibrado a una temperatura de 45°C por 24 horas. A una muestra por triplicado de estas hojas secas se les realizó la prueba de pérdida por secado hasta peso constante determinándolo cada 30 minutos a una temperatura de 105°C, obteniéndose así el contenido de humedad residual.

2.3.3 Molienda

Una primera porción de las hojas secas con humedad conocida se molieron utilizando un molino corona de disco marca Landers & Cia S.A.; esta porción fue molida apretando completamente el disco de molienda. La segunda porción de las hojas secas fue molida aflojando una vuelta el disco con el fin de obtener dos grupos de molienda a las cuales se les determinó la distribución del tamaño de partícula.

- **Distribución del tamaño de partícula:** La determinación de la distribución de tamaño de partícula se realizó empleando el método de tamizaje descrito por la USP 35 NF 30 (50). El material se dejó pasar a través de tamices con mallas No. 80, 60, 30, 16 y 8. Inicialmente se pesaron en un vaso de precipitados de tamaño apropiado 50 gramos del material a evaluar con ayuda de una balanza de precisión Mettler Toledo. El material pesado se dejó caer en el tamiz superior de la batería de tamices y se tapó adecuadamente, luego se sometió a vibración utilizando un vibrador con una intensidad de 6 por 20 minutos; al final de este tiempo se determinó el peso retenido en cada tamiz.

  Para este ensayo se efectuaron tres repeticiones. Los datos obtenidos se graficaron utilizando gráficos de barras.

2.3.4 Determinación de cenizas totales

El método de cenizas totales diseñado para medir la cantidad total de material que queda después de la ignición. Esto incluye tanto "ceniza fisiológica", que se deriva del propio tejido de la planta, y la ceniza "no fisiológica", que es el residuo de la materia extraña (por ejemplo, arena y tierra) que se adhiere a la superficie de la planta. Esta determinación se realizó utilizando el método descrito en los métodos de control de calidad para los materiales a base de hierbas de la OMS (51).

2.3.5. Determinación de sustancias extraíbles

La determinación de sustancias extraíbles representa los compuestos presentes en la droga que son extraídos por el solvente, dentro de los cuales se encontrarán los metabolitos secundarios y otros compuestos presentes en la hoja.

Con el fin de escoger las dos relaciones etanol-agua que se utilizarán en el diseño experimental factorial reducido para la elaboración de los extractos se realizó la determinación de sustancias extraíbles utilizando el método 2 de maceración en frio descrito en los métodos de control de calidad para los materiales a base de hierbas de la OMS (51). Basados en los hallazgos encontrados en la revisión bibliográfica se tiene que las relaciones de solventes etanol-agua 1:1; 3,5:6,5; 7:3 y 9:1 son las mejores. De estas se seleccionaron dos de ellas para la elaboración de los extractos.

2.3.6 Elaboración de la monografía de las hojas de *Psidium guajava* L.

Con los resultados obtenidos en la descripción macroscópica y microscópica del material vegetal fresco, la descripción microscópica de la droga vegetal, la determinación de materias orgánicas e inorgánicas extrañas, la marcha fitoquímica confirmatoria, la determinación de cenizas totales y la determinación de sustancias extraíbles se elaboró la monografía de estas hojas utilizando como guía la WHO monographs on selected medicinal plants (52). Ver anexo B.

2.4 Preparación de los extractos hidroalcohólicos usando el diseño factorial reducido

Se evaluó la influencia de los parámetros de extracción utilizando un diseño factorial reducido 2^5, en donde fueron estudiados cinco factores en dos niveles. Las variables independientes estudiadas fueron: tamaño de partícula, tipo de solvente, relación droga:solvente, el método de extracción y el tiempo de extracción. Las variables dependientes fueron el porcentaje de rendimiento, el perfil cromatográfico para flavonoides, el análisis de flavonoides totales y la evaluación antibacterial (**Tabla 2-1**).

Tabla 2-1: Diseño factorial reducido para evaluar los parámetros de extracción.

FACTOR		NIVEL (-1)	NIVEL (+1)
X1	Tamaño de partícula	Tamaño de partícula I	Tamaño de partícula II
X2	Relación EtOH - Agua	1:1	7:3
X3	Relación Droga - Solvente	1:10	1:20
X4	Método de extracción	Maceración	Percolación
X5	Tiempo de extracción	Para Maceración: 12 horas	Para Maceración: 36 horas
		Para percolación: 12 horas	Para percolación: 36 horas

Los experimentos fueron ordenados al azar y escogidos a partir de la matriz representada en la **Tabla 2-2**.

Tabla 2-2: Combinación de los factores para la realización de los experimentos.

		Tamaño de partícula I				Tamaño de partícula II			
		Etanol-Agua 1:1		Etanol-Agua 7:3		Etanol-Agua 1:1		Etanol-Agua 7:3	
		Droga-Solvente 1:10	Droga-Solvente 1:20	Droga-Solvente 1:10	Droga-Solvente 1:20	Droga-Solvente 1:10	Droga-Solvente 1:20	Droga-Solvente 1:10	Droga-Solvente 1:20
Maceración	12 horas	1					5		
	36 horas			3					7
Percolación	12 horas			4					8
	36 horas	2					6		

A partir de estos resultados fueron preparados los ocho extractos que se resumen en la **tabla 2-3**.

Tabla 2-3: Variables contempladas para la preparación de los extractos.

Experimento	Tamaño de partícula	Relación Etanol-Agua	Relación Droga-Solvente	Método de Extracción	Tiempo de Extracción
1	Tamaño de partícula I	1:1	1:10	Maceración	12 horas
2	Tamaño de partícula I	1:1	1:10	Percolación	36 horas
3	Tamaño de partícula I	7:3	1:10	Maceración	36 horas
4	Tamaño de partícula I	7:3	1:10	Percolación	12 horas
5	Tamaño de partícula II	1:1	1:20	Maceración	12 horas
6	Tamaño de partícula II	1:1	1:20	Percolación	36 horas
7	Tamaño de partícula II	7:3	1:20	Maceración	36 horas
8	Tamaño de partícula II	7:3	1:20	Percolación	12 horas

2.4.1 Obtención de extractos fluidos y extractos secos

- **Prueba de humectación:** Con el fin de definir un proceso de extracción efectivo, se realiza una prueba para determinar la cantidad de solvente necesario para humectar la droga antes de la extracción; para esto se pesó aproximadamente 1g de droga y se fue agregando poco a poco el solvente a temperatura ambiente, hasta observar que la droga quedaba completamente humectada. Esto se consiguió al agregar 4 mL de una solución hidroalcohólica.

- **Preparación de extractos por maceración:** Se pesaron 100 g de material vegetal seco de tamaño de partícula I o II y con una humedad conocida en una balanza de precisión Mettler Toledo, con la ayuda de un mortero se humectó el material con 400 mL del solvente a utilizar.

  El material humectado se colocó en una botella ámbar para someterlo a extracción por maceración con la cantidad de solvente a temperatura ambiente por el tiempo requerido de acuerdo a la matriz de los parámetros de extracción basados en el diseño experimental factorial reducido dependiendo del extracto a preparar con agitación ocasional. Después de este tiempo, el líquido de extracción se obtuvo por decantación y posterior filtración a través de un papel filtro Whatman No. 1. Una vez recolectado el extracto se concentró removiendo parcialmente el solvente por destilación a presión reducida en rotavapor (relación droga:solvente 1:10 o 1:20).

  Para obtener el extracto fluido, este se concentró en un rotavapor a presión reducida, a una temperatura de 50°C y con una velocidad de rotación de 50 rpm. Al extracto fluido obtenido se le evaluaron las características organolépticas y se le midió el pH y la densidad. Para obtener el extracto seco, se removió la mayoría del solvente en el rotavapor y se llevó a sequedad en baño maría. El extracto seco se protegió de la luz y se almacenó a una temperatura de 4°C hasta su uso.

- **Preparación de extractos por percolación:** Se pesaron 100 g de material vegetal seco de tamaño de partícula I o II y con una humedad conocida en una balanza de precisión Mettler Toledo, con la ayuda de un mortero se humectó el material con 400 mL del solvente a utilizar. El material humectado se colocó en el percolador; posteriormente, se adicionó la tercera parte de la cantidad de solvente a temperatura ambiente. Después del tiempo requerido, se procedió a abrir la llave del percolador, con una velocidad de goteo medio (aproximadamente 10 gotas por minuto), el líquido de extracción se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1. Una vez recolectado el extracto se concentró removiendo parcialmente el solvente por destilación a presión reducida en rotavapor.

El proceso de extracción se realizó de acuerdo a los tiempos establecidos en la matriz de los parámetros de extracción según el diseño experimental factorial reducido dependiendo del extracto a preparar (3 pasadas de solvente) para el total de solvente de acuerdo a esta matriz (relación droga:solvente 1:10 o 1:20).

Para obtener el extracto fluido, este se concentró en un rotavapor a presión reducida, con temperatura de 50°C y con una velocidad de rotación de 50 rpm. El punto final se obtuvo al tener 100 mL de extracto al que se le evaluaron las características organolépticas y se le midió el pH y la densidad. Para obtener el extracto seco, se removió la mayoría del solvente en el rotavapor y se llevó a sequedad en baño maría. El extracto seco se protegió de la luz y se almacenó a una temperatura de 4°C hasta su uso.

2.5 Caracterización del extracto fluido y extracto seco

2.5.1 Extractos fluidos

A los ocho extractos fluidos se les evaluaron las siguientes propiedades físicas y químicas:

- Evaluación física:

Características organolépticas: Se determinaron diferentes características organolépticas, como el aspecto del extracto fluido (color y apariencia), olor, sabor y sensación táctil.

Densidad: Determinada con picnómetro de 5 mL, no termostatado, a una temperatura de 25±3°C, medido en una balanza de precisión Mettler Toledo. Los resultados fueron expresados como el promedio de las tres determinaciones.

- Evaluación química:

pH: Determinado con tirillas reactiva marca Merck®.

2.5.2 Extractos secos

A los ocho extractos secos se les realizó la siguiente evaluación química y se les determinó el porcentaje de rendimiento.

- Evaluación química:

Cromatografía en capa fina para flavonoides

Para la cromatografía en capa fina se utilizó el mismo procedimiento para cada uno de los extractos secos.

Se pesaron 0,5 g de extracto seco y se disolvieron en 10 mL de etanol por 5 minutos.

Se realizaron dos pruebas de cromatografía en capa fina para flavonoides, en la primera las muestras se aplicaron en cromatofolios TLC sílica gel 60 F254 y se eluyeron con una fase móvil de cloroformo: metanol (4.5:0.5). Se usó como revelador el reactivo NP-PEG que se preparó disolviendo 0,25 gramos de difenil-boril-oxietilamina en 25 mL de metanol; un típico color fluorescente intenso en UV-365 nm es producido inmediatamente al agregar el revelador.

En la segunda prueba, las muestras se aplicaron en cromatofolios TLC sílica gel 60 F254 y se eluyeron con fase móvil de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27), usando el mismo revelador.

Estimación de Flavonoides Totales

Para la determinación de flavonoides totales se usó el método reportado por Mărghitaş Liviu et al, 2009 (53). Para la elaboración de la curva de calibración se emplearon diferentes concentraciones de quercetina (Sigma Aldrich) (13,88 – 138,89 mg/L). El valor del coeficiente de determinación de la línea recta fue de 0,9975 (R^2). A continuación se dará una breve descripción del procedimiento realizado. De 8,5 a 17 mg de la muestra seca fueron disueltos en 150 µL de $NaNO_2$ al 5%, luego de 5 min, se añadieron 150 µL de $AlCl_3$ al 10% y se agitó para homogenizar la solución; después de seis minutos la muestra fue neutralizada con 1000 µL de una solución de NaOH (1 M).

La absorbancia fue leída a 500 nm y la cuantificación se realizó empleando la curva de calibración. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de quercetina (EQ)/mg de muestra. Cada medida es la media de 2 repeticiones.

Porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento de cada extracto seco fue calculado usando la siguiente fórmula:

$$\boldsymbol{Porcentaje\ de\ Rendimiento} = \frac{\boldsymbol{Peso\ del\ extracto\ seco}}{\boldsymbol{Peso\ de\ la\ droga\ seca}}\ \boldsymbol{X\ 100}$$

2.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos de las hojas de *Psidium guajava* L.

2.6.1 Preparación de las muestras

La solución stock del extracto fue preparada disolviendo 250 mg del extracto seco en 10 mL de una solución al 5% de dimetilsulfóxido. Para la prueba antimicrobiana, se empleó una concentración de 25 µg/mL (ppm). Se utilizó como control positivo ampicilina y como control negativo la solución de dimetilsulfóxido al 5%.

Para la determinación de la CMI se prepararon concentraciones de 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, 0.098, 0.049 y 0.024 µg/mL del extracto crudo.

2.6.2 Microorganismos utilizados

Debido al especial interés en el desarrollo de pre-formulaciones y/o formulaciones de formas cosméticas que contengan extractos naturales, especialmente en enjuagues bucales y el tratamiento del acné, se han seleccionado las cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* (código ATCC 31989) y *Propionibacterium acnes* (código ATCC 11827) ya que estas son las responsables de iniciar los episodios de caries y de la formación del acné, respectivamente.

Las cepas fueron obtenidas del laboratorio de microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Estas cepas fueron crecidas en agar Müeller Hinton bajo condiciones de anaerobiosis.

2.6.3 Sensibilidad antimicrobiana

Los cultivos se mantuvieron en condiciones de refrigeración. Estos fueron preparados al momento de utilizarlos. La suspensión bacteriana se preparó en agua peptonada mediante la transferencia del organismo a partir de cultivos frescos (1×10^8UFC/mL)

- **Método de difusión en agar**

Para determinar la actividad antibacteriana del extracto crudo, 1 mL de cultivo de las bacterias fue vertido en cajas Petri de 90 mm. Posteriormente 30 mL de agar Müeller Hinton fueron adicionados, las cajas se agitaron y se dejaron en reposo hasta su solidificación. Luego con un sacabocados No. 4, se realizaron cuatro perforaciones (pozos) equidistantes sobre el agar. A cada uno de los pozos se le adicionaron 80 µL de cada una de las muestras. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h. Después de la incubación, se determinó la actividad inhibitoria de los extractos midiendo, en mm, las zonas donde se presentó formación de halo.

La sensibilidad o susceptibilidad de las bacterias al fármaco estándar fue realizado utilizando una caja Petri de agar inoculada y ampicilina en diferentes concentraciones. Se midieron las zonas de inhibición y se comparó con las de los extractos. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se presentan como media ± desviación estándar.

- **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Para la determinación de la CMI se empleó el método turbidimétrico o el método de dilución en tubo. El extracto (concentración de 25 µg/mL) se diluyó en serie para dar concentraciones de 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, 0.098, 0.049 y 0.024µg/mL en tubos de ensayo que contenían 2 mL de caldo Müeller Hinton. A continuación, los tubos se inocularon con 0.1mL de suspensión bacteriana y se incubaron a 37°C durante 24 h bajo condiciones de anaerobiosis. Un tubo que contiene caldo de nutriente sólo se sembró con el microorganismo de ensayo para que sirviera como control. Todos los tubos se incubaron a continuación a 37°C durante 24 h y después se examinaron para el crecimiento mediante la observación de turbidez.

Para corroborar la inhibición se realizó un subcultivo de cada uno de los tubos en agar Müeller Hinton.

2.7 Análisis Estadístico

2.7.1 Estimación de los modelos de diseño experimental para los datos de cromatografía en capa fina para flavonoides y el porcentaje de rendimiento

- **Métodos estadísticos**

Fueron desarrollados análisis de varianza a una vía de clasificación por medio de pruebas F de Fisher para evaluar el efecto de cada uno de los factores considerados en la cromatografía en capa fina y el porcentaje de rendimiento. Los análisis se realizaron en el paquete estadístico R versión 3.0.1 y la estimación de los parámetros de los modelos (efectos de los factores) se hicieron por el método de los mínimos cuadrados ordinarios.

2.7.2 Estimación de los modelos de diseño experimental para los datos de flavonoides totales y determinación de la actividad antimicrobiana

- **Métodos estadísticos**

Para cada una de las respuestas medidas se desarrolló el análisis de la varianza correspondiente para el modelo de diseño experimental implementado. En primer lugar, se hizo un análisis exploratorio que incluyó las medidas descriptivas de cada variable explicada y las correspondientes gráficas de promedios para explorar el resultado de cada tratamiento. Luego se estimaron los efectos de cada combinación de factores por medio de pruebas F de Fisher y se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk a los residuales de cada modelo para hacer la validación de supuestos. Finalmente, fue aplicada la prueba de Tukey para la comparación de medias y así poder establecer el mejor tratamiento. Los análisis se realizaron en el paquete estadístico R versión 3.0.1 y la estimación de los parámetros de los modelos (efectos de los tratamientos) se hicieron por el método de los mínimos cuadrados ordinarios.

3. Resultados y Discusión

3.1 Caracterización del material vegetal

3.1.1 Descripción macroscópica del material vegetal fresco

- **Examen visual y olor:** Este material se describió identificando las siguientes características:

  Forma: Hojas oblongas con base truncada redondeada y ápice cuspidado, de bordes enteros y pecíolo corto; en el envés se observa su prominente venación con 12 a 16 nervios laterales de cada lado **(Figura 3-1).**

  Textura: Las hojas presentan por la cara superior una superficie glabra o espaciadamente pubescente y por la cara inferior una superficie pubescente, confiriéndole una textura suave.

  Color: Las hojas presentan un color verde-grisáceo por el haz y verde claro por el envés.

  Olor: Cuando se estrujan las hojas presentan un olor fuerte característico y frutal.

  Sabor: Las hojas presentan un sabor astringente.

  Condición: Las hojas se encuentran frescas y completas.

Figura 3-1: Hojas de *Psidium guajava* L.

- **Determinación de las dimensiones de las hojas:** A las hojas se le evaluaron las dimensiones de largo y ancho (**Tabla 3-1**).

Tabla 3-1: Mediciones del largo y ancho de las hojas

DIMENSIONES DE LAS HOJAS					
n Muestra	**Largo (cm)**	**Ancho (cm)**	**n Muestra**	**Largo (cm)**	**Ancho (cm)**
n1	13.270	5.948	n26	13.196	5.828
n2	14.269	5.163	n27	13.468	5.846
n3	15.330	6.243	n28	12.339	5.113
n4	13.520	6.051	n29	12.859	5.991
n5	13.974	6.488	n30	13.423	5.697
n6	14.796	5.855	n31	13.257	6.589
n7	14.339	5.514	n32	13.972	6.763
n8	13.759	6.098	n33	13.374	5.878
n9	15.332	5.444	n34	13.703	5.240
n10	13.495	5.894	n35	13.335	5.798
n11	13.761	6.357	n36	14.104	6.011
n12	13.790	6.477	n37	13.412	5.691
n13	13.203	5.342	n38	14.141	5.619
n14	13.327	5.776	n39	14.081	6.243
n15	12.666	6.206	n40	12.776	5.396
n16	13.573	6.108	n41	14.370	5.690
n17	14.780	5.539	n42	14.693	5.569
n18	15.331	6.540	n43	13.016	5.640
n19	14.130	5.982	n44	15.209	5.106
n20	13.927	5.486	n45	11.905	6.002
n21	12.967	5.372	n46	13.194	5.366
n22	15.331	6.130	n47	13.172	4.995
n23	13.236	6.467	n48	13.088	5.345
n24	12.157	5.929	n49	13.575	5.712
n25	13.684	5.714	n50	12.700	5.915

A partir de estos datos se obtuvieron los resultados de la **tabla 3-2** y se realizaron los respectivos histogramas de frecuencia utilizando el software StatGraphics (**Figura 3-2 y 3-3).**

Tabla 3-2: Tratamiento de los datos de largo y ancho de las hojas

	Largo de las Hojas (cm)	Ancho de las Hojas (cm)
Promedio	13.686± 0.82	5.823± 0.42
Valor Máximo	15.33	6.76
Valor Mínimo	11.90	4.99

Figura 3-2: Histograma de frecuencia para el largo de las hojas

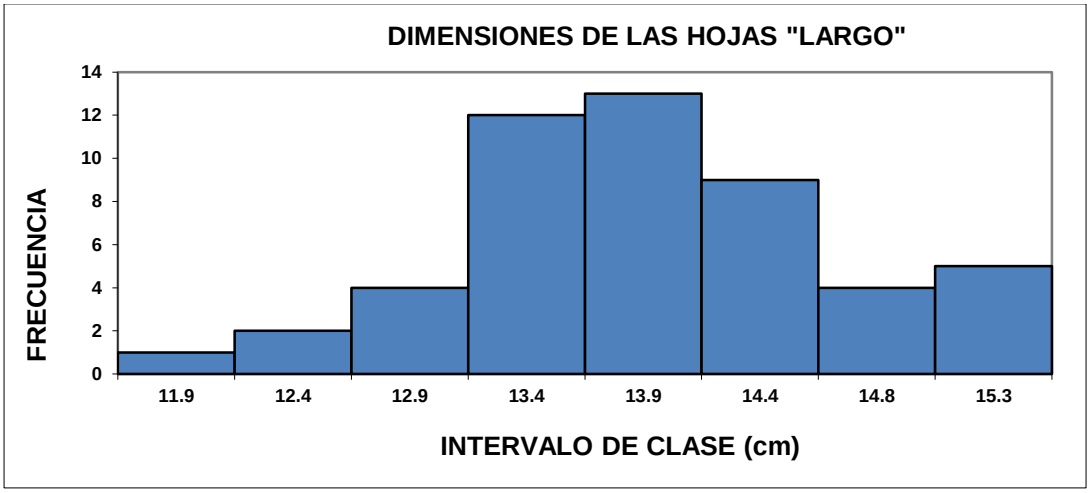
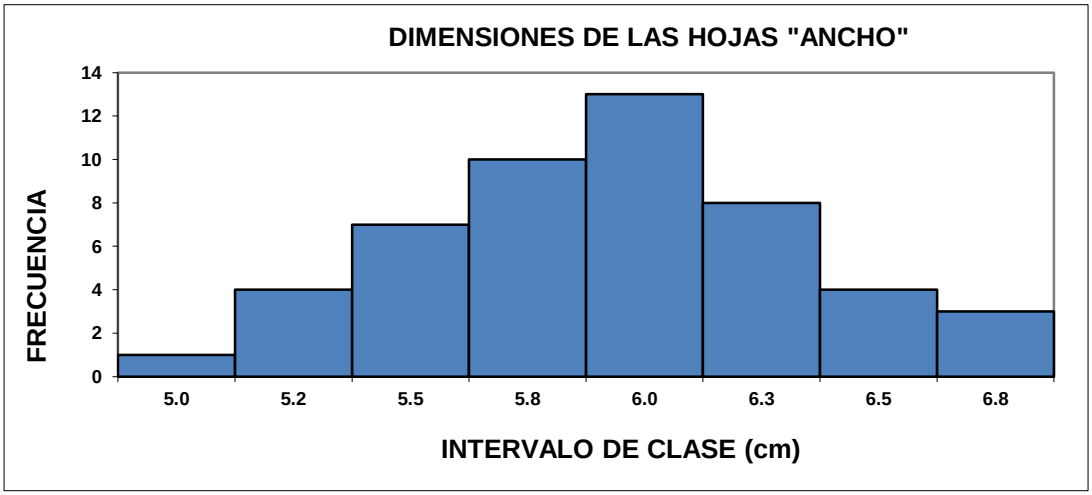


Figura 3-3: Histograma de frecuencia para el ancho de las hojas



A partir de las gráficas es posible establecer una especificación para el valor del largo y ancho de las hojas, obteniéndose para el largo un valor de 13.9 cm ± 2.0 y para el ancho un valor de 6.0 cm ± 1.0; datos similares reportados por Metwally y otros en Monograph of *Psidium guajava* L. leaves (54) donde establecen que las hojas son de 10 a 12 cm de largo y de 5 a 7 cm de ancho.

3.1.2 Descripción microscópica del material vegetal fresco

En el corte transversal, la lámina de la hoja presenta mesófilo dorsiventral con capas de parénquima en empalizada; el tejido esponjoso está formado de 5-8 filas de células más o menos esféricas.

La epidermis superior de la lámina consta de células poligonales, casi isodiamétricas o ligeramente alargadas con paredes rectas cubiertas con cutícula lisa y delgada, carente de estomas y con unas pocas glándulas sebáceas. La epidermis inferior consta de células poligonales, casi isodiamétricas con paredes rectas y cubiertas de una cutícula delgada y lisa; los estomas están presentes solamente en la epidermis inferior y son de forma oval y de tipo anomocítico. Hipodermis desarrollada junto a la epidermis adaxial está constituida por dos a tres capas de células colenquimatosas. En posición subepidérmica y a nivel del nervio central se observa colénquima laminar. Cavidades esquizolisígenas se hallan localizadas en el mesófilo y en la hipodermis. El nervio central, de gran tamaño, presenta forma cóncavo-convexa y está constituido por haces bicolaterales y rodeado por una vaina de fibras esclerenquimáticas; contiene de 3–4 capas de células de parénquima con paredes delgadas con distintos espacios intercelulares, las células del parénquima contienen pocos prismas y grupos numerosos de oxalato de calcio; el periciclo está formado por dos arcos de fibras lignificadas por encima y por debajo del haz vascular; el xilema está formado por espirales lignificados, vasos anulares, donde se distinguen bien los radios medulares que bordean la zona por un floema no lignificado que se compone de elementos cribosos y células parénquimaticas.

El pecíolo presenta sección transversal planoconvexa ligeramente acanalado en la parte superior. Ambas epidermis contienen tricomas; sin embargo, en la epidermis inferior son más numerosos, estos son uniseriados de paredes lisas gruesas, no glandulares, rectos, curvados o doblados y además presenta estomas. En posición subepidérmica presenta un colénquima laminar formado por 2 ó 3 estratos celulares. El nervio principal adopta forma de herradura, está constituido por haces bicolaterales y se halla rodeado por una vaina de fibras.

Las características más destacadas de las hojas que fueron empleadas para la elaboración de la monografía de esta planta fueron que las hojas presentan un haz vascular en forma de arco, con estomas de forma oval y de tipo anomocítico, presenta vasos de xilema, se encuentran prismas y grupo de cristales de oxalato de calcio (**Figura 3-4)**, características que coinciden con las reportadas por Kaneria y Chanda (55).

Figura 3-4: Corte transversal de la hoja de *Psidium guajava* L.

c. colénquima; hip. hipodermis; e.i. epidermis inferior; e. empalizada; f.p. fibras periciclicas; fl. floema; t. tricoma; e.s. epidermis superior; xi. xilema.

3.1.3 Descripción microscópica de la droga vegetal

La hoja seca pulverizada es de color verde con un sabor astringente y olor característico. En la misma se pueden observar fragmentos de parénquima en empalizada con cavidades secretoras; abundantes estomas y numerosos tricomas unicelulares no glandulares, fuertemente engrosados con cutícula suave; numerosos fragmentos de tricomas no glandulares rotos, epidermis adaxial con pelos simples; parénquima con pocos prismas de oxalato de calcio; tricomas unicelulares sueltos. Se observan fragmentos de pecíolo con restos de tejido vascular lignificado constituido por traqueidas, vasos anillados, espiralados y porciones de epidermis.

3.1.4 Determinación de materia orgánica extraña

Los materiales a base de plantas deben estar totalmente libres de signos visibles de contaminación por hojas, raíces u otro órgano no perteneciente a la planta que constituyen la materia orgánica extraña; sin embargo, está plenamente admitida la dificultad de obtener drogas vegetales en condiciones de completa pureza (56). En la **Tabla 3-3** se muestran los resultados de la determinación de materia orgánica extraña obteniéndose un valor de 0,498% que por ser un valor inferior al 1% se puede considerar que este material cumple este requerimiento.

Tabla 3-3: Datos de materia orgánica extraña.

No.	Materia Orgánica (g)	Muestra (g)
1	0,496	100
2	0,499	100
3	0.498	100
Promedio	0,498 ± 0.001	100
Porcentaje Materia Orgánica Extraña = 0,498%		

3.1.5 Determinación de materia inorgánica extraña

Los materiales a base de plantas deben estar totalmente libres de signos visibles de contaminación por tierra, arena y piedras pequeñas que constituyen la materia inorgánica extraña. En la **tabla 3-4** se muestran los resultados de la determinación de materia inorgánica extraña obteniéndose un valor de 0,142% que por ser un valor inferior al 1% se puede considerar que este material cumple este requerimiento.

Tabla 3-4: Datos de materia inorgánica extraña.

No.	Materia Inorgánica (g)	Muestra (g)
1	0,141	100
2	0,142	100
3	0.142	100
Promedio	0,142	100
Porcentaje Materia Inorgánica Extraña = 0,142%		

3.1.6 Marcha fitoquímica preliminar confirmatoria

En la marcha fitoquímica realizada sobre el extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. se confirmó la presencia de fenoles, flavonoides y taninos, metabolitos también reportados por Metwally y otros en *Monograph of Psidium guajava L. leaves* (54) y en *WHO Monographs on selected medicinal plants volumen 4 "Folium guavae*" (52). Sin embargo, Vikrant y otros reportan la presencia de saponinas en extractos hidroalcohólicos (57); Kaneria y Chanda reportan la presencia de alcaloides y terpenos (55) metabolitos no identificados en la marcha fitoquímica desarrollada debido posiblemente a la sensibilidad de estas pruebas o a que estos metabolitos se encontraban a una baja concentración durante la época de colecta. Adicionalmente la no presencia de saponinas podría deberse quizás al solvente de extracción empleado. Para la elaboración de nuestros extractos utilizamos como solvente etanol, y por lo general, y teniendo en cuenta sus características estructurales, este tipo de compuestos se extraen con solventes más polares como el agua. En la prueba con tricloruro férrico al 10% para la determinación de fenoles se observa una coloración verde oscura característica de este tipo de compuestos. La prueba para taninos con el reactivo de gelatina-sal al adicionar 2 mL de solución de úrea 10 M y unas gotas cloruro férrico al 10% se evidencia una coloración verde oscura lo que indica presencia de taninos.

Las pruebas para la identificación de flavonoides resultaron positivas observándose una coloración naranja, que indica la presencia de este tipo de metabolitos.

La **tabla 3-5** recopila los resultados de la marcha fitoquímica confirmatoria efectuada al EE. La reacción positiva se designó con el símbolo (+) y la reacción negativa con (-).

Tabla 3-5: Resultados de la marcha fitoquímica confirmatoria realizada a EE.

METABOLITO	RESULTADO
CUMARINAS	(-)
ALCALOIDES	(-)
TRITERPENOIDES Y/O ESTEROIDES	(-)
FENOLES	(+)
FLAVONOIDES	(+)
TANINOS	(+)
LEUCOANTOCIANIDINAS	(-)
SAPONINAS	(-)
ANTRAQUINONA	(-)

3.2 Estandarización de las condiciones de secado, molienda, determinación de cenizas totales y sustancias extraíbles.

3.2.1 Estudio de secado

Los resultados obtenidos se expresan en porcentaje y se construye una curva de humedad residual (determinada por la pérdida por secado) con el promedio de las tres determinaciones (**Tabla 3-6; 3-7 y 3-8**).

Tabla 3-6: Datos de % humedad residual (determinada por la pérdida por secado) de los meses de Septiembre y Noviembre.

Lote	Secado (Septiembre)			Secado (Noviembre)		
Muestra	M1	M2	M3	M1	M2	M3
Tiempo (horas)	% Humedad residual (Determinada por pérdida por secado)			% Humedad residual (Determinada por pérdida por secado)		
0	88,12	88,78	88,62	89,26	88,35	84,65
1	69,38	69,53	70,50	67,46	67,87	70,58
2	61,02	60,39	61,25	58,73	63,70	62,25
4	44,36	43,07	44,30	45,88	37,49	48,76
8	20,75	21,07	23,81	17,98	21,70	24,63
12	18,19	19,57	20,09	18,03	20,23	20,23
18	18,34	20,44	18,04	17,78	21,83	16,63
24	9,04	9,93	8,79	9,19	10,60	8,46
36	7,65	8,23	8,64	7,43	8,76	8,97

Tabla 3-7: Estudio de Secado (Septiembre 2011): Promedio de las tres réplicas.

ESTUDIO DE SECADO	
Tiempo (h)	% Humedad residual (Determinada por pérdida por secado)
0	88,51 ± 0,34
1,0	69,80 ± 0,61
2,0	60,89 ± 0,45
4,0	43,91 ± 0,63
8,0	21,88 ± 1,68
12,0	19,28 ± 0,98
18,0	18,94 ± 1,31
24,0	9,25 ± 0,60
36,0	8,17 ± 0,50

Graficando el % humedad residual versus el tiempo se tiene la gráfica de la **figura 3-5**

Figura 3-5: Gráfica porcentaje de humedad residual (Septiembre).

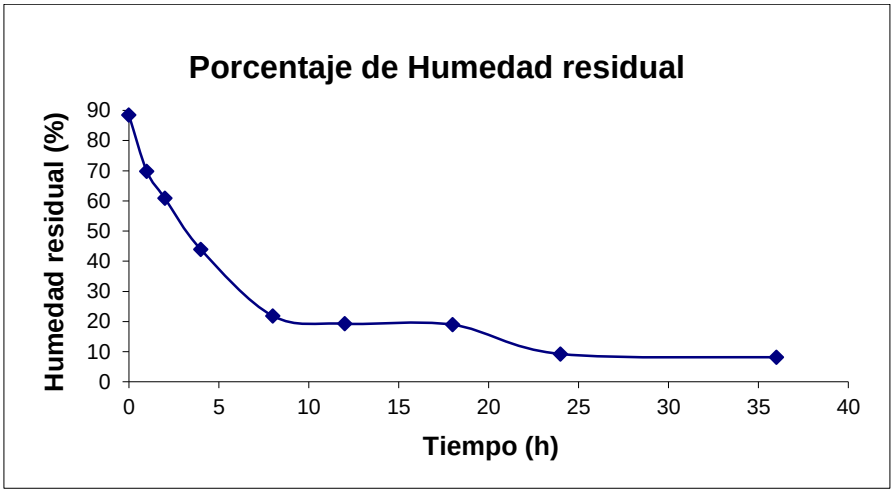
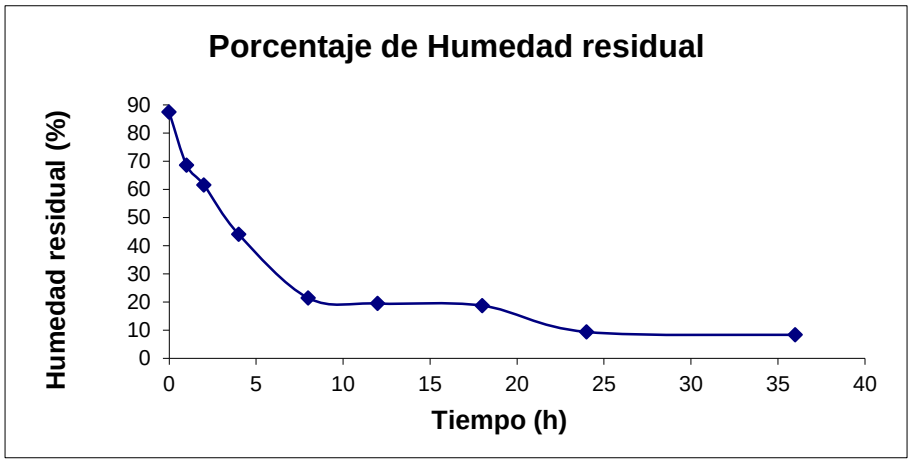


Tabla 3-8: Estudio de Secado (Noviembre 2011): Promedio de las tres réplicas.

ESTUDIO DE SECADO	
Tiempo (h)	**% Humedad residual (Determinada por pérdida por secado)**
0	87,42 ± 2,44
1,0	68,64 ± 1,70
2,0	61,56 ± 2,56
4,0	44,04 ± 5,86
8,0	21,44 ± 3,33
12,0	19,50 ± 1,27
18,0	18,75 ± 2,73
24,0	9,41 ± 1,09
36,0	8,39 ± 0,84

Graficando el % humedad residual versus el tiempo se tiene la gráfica de la **figura 3-6**

Figura 3-6: Gráfica porcentaje de humedad residual (Noviembre).



Para determinar si hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos se utilizó el análisis estadístico de Anova de dos factores (varias muestras por grupo) donde se plantea la siguiente hipótesis nula (H_0), las medias de los resultados de porcentaje de humedad residual obtenidos en cada estudio son iguales:

$$H_0: \text{Media}_{\text{Secado Septiembre}} = \text{Media}_{\text{Secado Noviembre}}$$

Al realizar el tratamiento de los datos se obtuvieron los siguientes resultados de la **Tabla 3-9**

Tabla 3-9: Resumen análisis de Varianza. Tratamiento de los datos.

Tiempo	Secado Septiembre				Secado Noviembre			
	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
0	3	265.52	88.5067	0.1185	3	262.26	87.4200	5.9617
1	3	209.41	69.8033	0.3696	3	205.91	68.6367	2.8744
2	3	182.66	60.8867	0.1982	3	184.68	61.5600	6.5323
4	3	131.73	43.9100	0.5301	3	132.13	44.0433	34.2832
8	3	65.63	21.8767	2.8289	3	64.31	21.4367	11.1076
12	3	57.85	19.2833	0.9641	3	58.49	19.4967	1.6133
18	3	56.82	18.9400	1.7100	3	56.24	18.7467	7.4608
24	3	27.76	9.2533	0.3590	3	28.25	9.4167	1.1834
36	3	24.52	8.1733	0.2474	3	25.16	8.3867	0.6974
TOTAL	**27**	**1021.9**	**37.8481**	**786.385**	**27**	**1017.43**	**37.6826**	**773.17**

Con los datos de la tabla 3-9, se procedió a calcular el factor F (**Tabla 3-10)**

Tabla 3-10: Resumen análisis de Varianza. Cálculo del factor F

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico para F*
Entre Grupos	0.37001667	1	0.37001667	0.08426454	4.11316528
Interacción	4.67266667	8	0.58408333	0.13301431	2.20851807
Dentro del grupo	158.080733	36	4.39113148		

Teniendo en cuenta los resultados expresados en la **Tabla 3-10**, se evidencia que el valor F calculado es menor que el valor de F critico por lo cual podríamos afirmar que la hipótesis nula se acepta. Es decir que las medias comparadas en los dos estudios no presentan diferencias significativas.

Posteriormente se compararon los resultados obtenidos de las dos recolecciones (**Tabla 3-11**) y con el promedio se estimó el tiempo necesario para que la droga tenga una humedad residual de aproximadamente 10% (**Tabla 3-12**), cantidad que se encuentra dentro de los límites de agua establecidos en la Farmacopea para las drogas (8% - 14%) con el fin de evitar que en la droga se dé un crecimiento microbiano, la presencia de hongos o insectos y el deterioro, seguido de la hidrólisis de los metabolitos (58) (**Figura 3-7**).

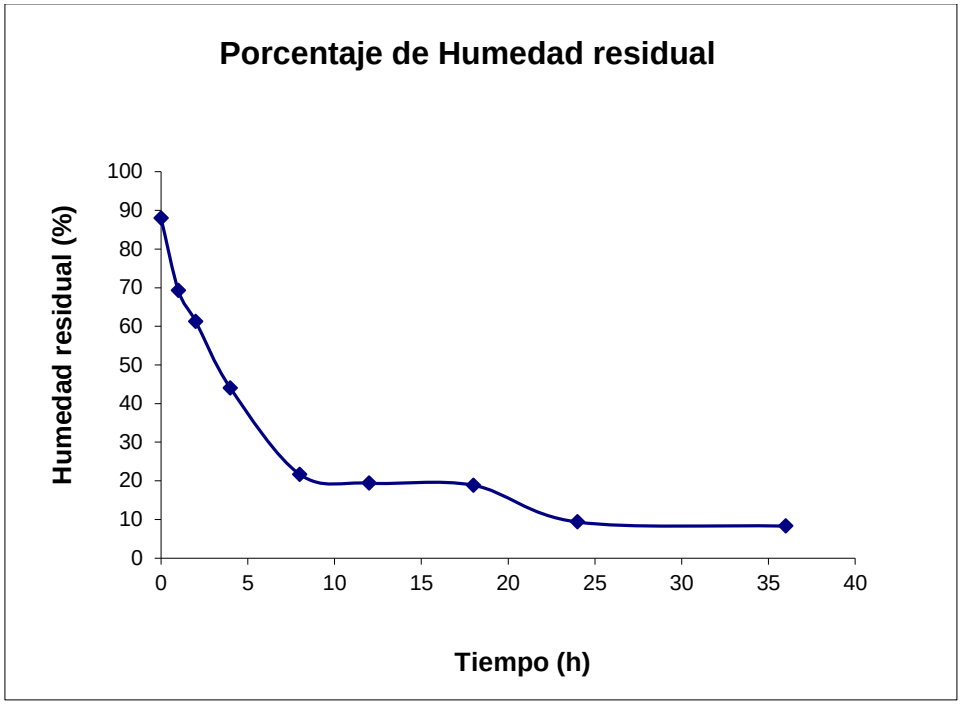
Tabla 3-11: Estudio de secado (Septiembre - Noviembre 2011).

Tiempo (h)	% Humedad residual (Determinada por pérdida por secado) Septiembre	% Humedad residual (Determinada por pérdida por secado) Noviembre
0	88,51 ± 0,34	87,42 ± 2,44
1,0	69,80 ± 0,61	68,64 ± 1,70
2,0	60,89 ± 0,45	61,56 ± 2,56
4,0	43,91 ± 0,63	44,04 ± 5,86
8,0	21,88 ± 1,68	21,44 ± 3,33
12,0	19,28 ± 0,98	19,50 ± 1,27
18,0	18,94 ± 1,31	18,75 ± 2,73
24,0	9,25 ± 0,60	9,41 ± 1,09
36,0	8,17 ± 0,50	8,39 ± 0,84

Tabla 3-12: Datos promedio del estudio de secado

Tiempo (h)	% Humedad residual (Promedio)
0	87,96 ± 0,77
1,0	69,22 ± 0,82
2,0	61,22 ± 0,47
4,0	43,97 ± 0,09
8,0	21,66 ± 0,31
12,0	19,39 ± 0,16
18,0	18,84 ± 0,13
24,0	9,33 ± 0,11
36,0	8,28 ± 0,16

Figura 3-7: Gráfica porcentaje de humedad residual (Promedio).



Según los resultados de la **Tabla 3-12** se puede deducir que el tiempo necesario para que la droga tenga un 10% de humedad residual, se consigue secando las hojas, en un horno de aire circulante, a una temperatura de 45 ºC por un tiempo aproximado de 24 horas.

3.2.2 Secado de las hojas para elaborar los extractos.

A una muestra de las hojas secas se le realizó la determinación de humedad residual por el método de pérdida por desecación a una temperatura de 105°C hasta peso constante, se obtuvo un contenido de humedad residual de 8.50%. Este ensayo se realizó por triplicado (**Tabla 3-13**).

Tabla 3-13: Prueba de Humedad residual (determinada por pérdida por secado).

MUESTRA	% Humedad residual (Determinada por pérdida por secado)
1	8.40
2	8.55
3	8.54
Promedio	8.50 ± 0.08

3.2.3 Molienda

- **Distribución del tamaño de partícula:** A mayor grado de división de una droga, mayor será la superficie entre las fases del proceso de extracción y por tanto, mayor será la difusión a través de la membrana porosa. No obstante, este análisis teórico no se cumple totalmente en la práctica, ya que a mayor grado de división de la droga, la misma se compacta más en presencia del solvente y el proceso de difusión se dificulta en vez de mejorar. Por otra parte, una división muy grande del tejido vegetal puede romper células y esto puede aportar a la extracción sustancias indeseables. La determinación de la distribución del tamaño de partícula de una droga es considerada uno de los factores determinantes para la homogeneidad y reproducibilidad de los procesos de extracción (58). En la **tabla 3-14** y la **tabla 3-15** se presentan los datos de la distribución del tamaño de partícula para la muestra de tamaño de partícula I y para la muestra de tamaño de partícula II respectivamente, concluyendo que el proceso de molienda utilizado permitió obtener dos grupos de tamaño de partículas diferenciados. Esta distribución se representa en el gráfico de barras del promedio peso neto retenido de la **Figura 3-8** y **3-9**. Analizando esta variable se tiene que la mayor cantidad de flavonoides totales (mg de equivalentes de quercetina/mg de muestra) se obtuvo utilizando la muestra con el tamaño de partícula I.

Tabla 3-14: Distribución tamaño de partícula molienda (I).

No. Tamiz	Apertura de malla (µm)	PESO RETENIDO (g)			Promedio	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulada
		1	2	3			
8	2360	0,02	0,02	0,04	0,03	0,06%	0%
16	1180	0,95	0,93	3,18	1,69	3,39%	3%
30	600	7,15	10,86	9,56	9,19	18,45%	22%
60	250	17,68	20,04	19,61	19,11	38,36%	60%
80	180	7,91	8,77	8,44	8,37	16,80%	77%
Colector	NA	15,90	9,19	9,19	11,43	22,94%	100%
Total	-	49,61	49,81	50,02	49,82	-	-

Tabla 3-15: Distribución tamaño de partícula molienda (II).

No. Tamiz	Apertura de malla (µm)	PESO RETENIDO (g)			Promedio	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulada
		1	2	3			
8	2360	0,11	0,08	0,05	0,08	0,16%	0%
16	1180	10,33	8,44	9,18	9,32	18,72%	19%
30	600	18,13	17,26	17,66	17,68	35,52%	54%
60	250	14,74	16,51	15,84	15,70	31,54%	86%
80	180	2,66	3,37	3,05	3,03	6,09%	92%
Colector	NA	3,32	4,41	4,18	3,97	7,98%	100%
Total	-	49,29	50,07	49,96	49,78	-	-

Figura 3-8: Distribución del tamaño de partícula molienda (I).

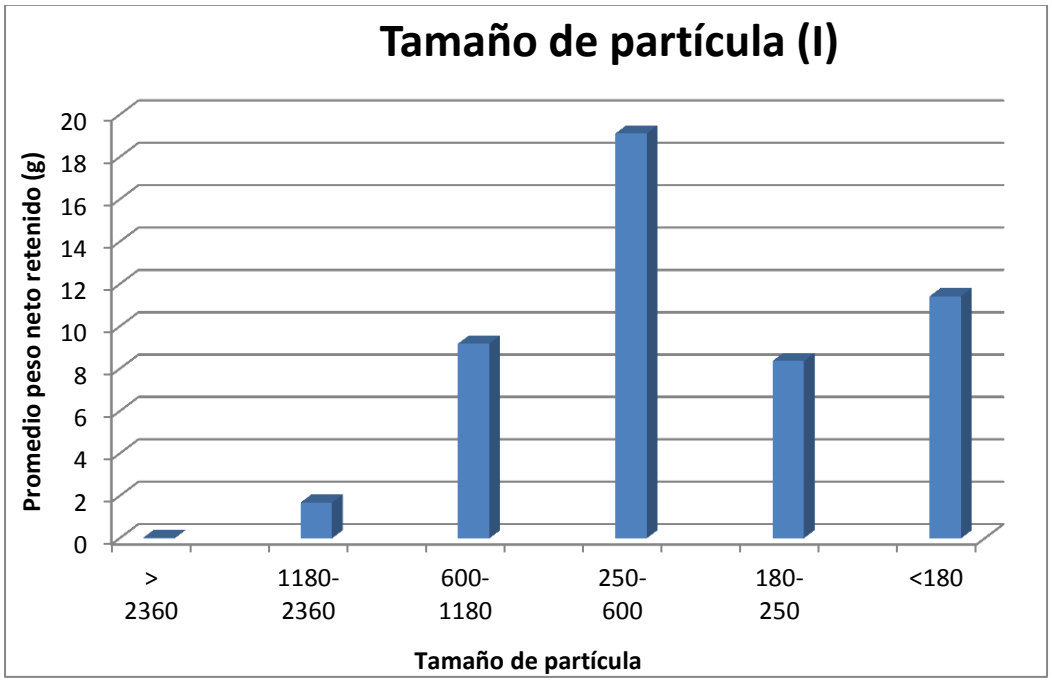
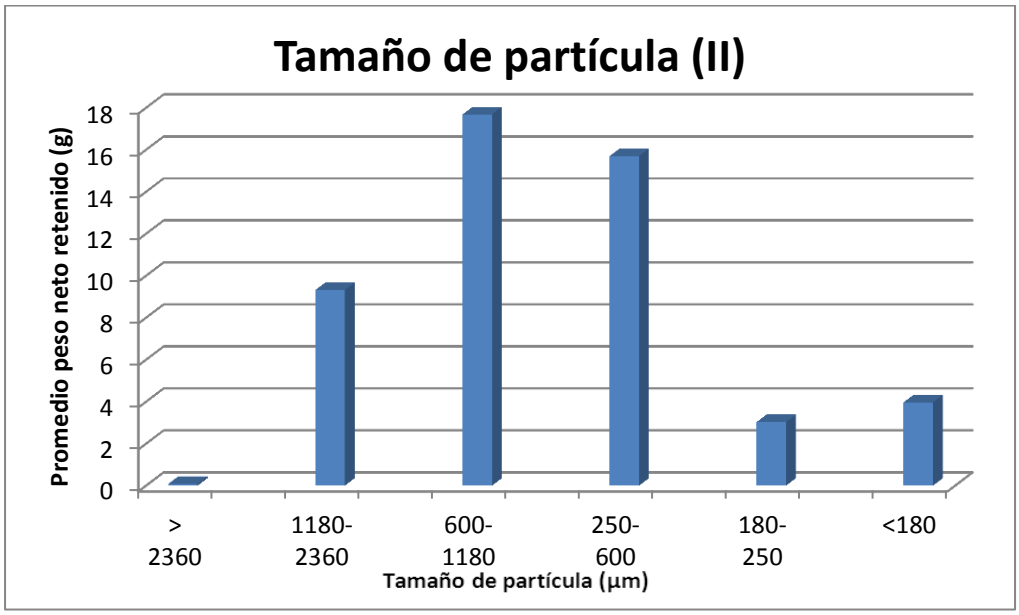


Figura 3-9: Distribución del tamaño de partícula molienda (II).



3.2.4 Determinación de cenizas totales

La determinación de cenizas totales es particularmente importante en la evaluación de la pureza e identidad de la droga cruda (58). En la **tabla 3-16** se muestran los resultados de la determinación de cenizas totales, obteniéndose un valor de 7.11% ± 0,40, dato cercano al reportado por Kaneria y Chanda de 7.65% (55).

Tabla 3-16: Resultados de cenizas totales.

PRUEBA	X_1	X_2	X_3	PROMEDIO (%)
Cenizas totales (%)	6,62	7,21	7,49	7,11 ± 0,44

3.2.5 Determinación de sustancias extraíbles

La determinación de sustancias extraíbles establece la cantidad de metabolitos secundarios y otros compuestos presentes en una cantidad dada de droga, extraíble con un solvente (58). En la **Tabla 3-17** se muestran los resultados de la determinación de las sustancias extraíbles utilizando las relaciones etanol-agua 1:1; 3,5:6,5; 7:3 y 9:1.

Estas mezclas se seleccionaron basándonos en la revisión bibliográfica, ya que estas proporciones son las mayormente usadas en el monitoreo de plantas con actividad antimicrobiana y debido a que los flavonoides y sus derivados, metabolitos secundarios de interés, son solubles en agua y en alcohol (59).

Tabla 3-17: Determinación del porcentaje de sustancias extraíbles.

PRUEBA	SOLUCIONES HIDROALCOHÓLICAS											
	1:1			3,5:6,5			7:3			9:1		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Sustancias extraíbles (%)	1,33	1,38	1,35	1,18	1,13	1,15	1,29	1,35	1,33	1,23	1,15	1,18
Promedio (%)	1,35 ± 0,03			1,15± 0,03			1,32± 0,03			1,19± 0,04		

De acuerdo a los resultados obtenidos y enunciados en la **Tabla 3-17** se seleccionaron las mezclas hidroalcohólicas 1:1 y 7:3 para la elaboración de los extractos por ser estas las que presentan el mayor porcentaje de sustancias extraíbles debido a la afinidad de los constituyentes de esta droga por estas mezclas polares y, aunque este parámetro no se refiere exclusivamente a la cantidad de metabolitos secundarios disueltos, sí puede dar una medida de que a mayor valor del mismo, mayor probabilidad de existencia de los metabolitos secundarios de interés.

3.2.6 Elaboración de la monografía de las hojas de *Psidium guajava* L.

Debido a que las hojas de *Psidium guajava* L. poseen múltiples propiedades que pueden ser aprovechadas para el desarrollo de productos se realiza la monografía con el fin de proveer información científica sobre seguridad, eficacia, control y aseguramiento de calidad de esta planta en Colombia teniendo en cuenta que puede haber variaciones entre las diferentes zonas geográficas.

En el **Anexo B** se encuentra la monografía propuesta utilizando como guía la de WHO (52). En el año 2011 se publicó en el Pharmacognosy Journal de Egipto una “Monograph of *Psidium guajava* L. leaves” (54), en esta publicación se referencia información no reportada en la monografía de la OMS, como la cuantificación del contenido de quercetina utilizando la cromatografía de capa fina de alto desempeño y otras acciones farmacológicas experimentales.

Convirtiéndose entonces en información complementaria a la previamente descrita en otras monografías.

En la **Tabla 3-18** se hace una comparación entre la monografía propuesta, la publicada por la WHO y la de Egipto.

Tabla 3-18: Comparación de los ítems entre las diferentes monografías.

ITEMS	Monografía Propuesta	WHO Monographs on selected medicinal plants	Pharmacognosy Journal (Egipto)
Nombre Común	D	D	D
Nombre Científico	D	D	D
Introducción	ND	ND	D
Definición	D	D	D
Sinónimos	D	D	ND
Nombres vernáculos seleccionados	D	D	ND
Materiales y métodos	ND	ND	D
Familia	D	D	D
Distribución geográfica	D	D	D
Descripción	D	D	D
Parte utilizada	D	D	D
Apariencia general	D	D	D
Características organolépticas	D	D	D
Descripción macroscópica	D	D	D
Descripción microscópica	D	D	D
Material vegetal en polvo	D	D	D
Fotografías	D	ND	D
Pruebas generales de identidad	D	D	D
Pruebas de pureza	D	D	ND
Valoración	ND	D	D
Principales constituyentes	D	D	D
Usos reportados de datos clínicos	D	D	ND
Usos tradicionales	D	D	ND
Actividad Farmacológica	D	D	D
Toxicidad	D	D	D
Reacciones adversas	D	D	ND
Contraindicaciones y advertencias	D	D	ND
Peligros	D	D	ND
Precauciones	D	D	ND
Formas de dosificación	D	D	ND
Posología	D	D	ND
Referencias	D	D	D

D: Información disponible; ND: Información no disponible.

3.3 Caracterización del extracto fluido y extracto seco

3.3.1 Extractos fluidos

- Evaluación física:

Características organolépticas: En la **Tabla 3-19** se presentan los resultados comparativos en donde se resumen las características organolépticas en cada una de los extractos preparados. Todos los extractos presentan un olor característico.

Tabla 3-19: Características organolépticas de los ocho extractos fluidos de las hojas de *Psidium guajava* L.

Característica Organoléptica	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8
Coloración	Marrón Claro	Marrón Claro	Marrón Oscuro	Marrón Oscuro	Marrón Claro	Marrón Claro	Marrón Oscuro	Marrón Oscuro
Sabor	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo
Sensación Táctil	Fluida Suave	Fluida Suave	Fluida Suave	Fluida Suave	Fluida Suave	Fluida Suave	Fluida Suave	Fluida Suave

Densidad y pH: En la **Tabla 3-20** se presentan los datos primarios para el cálculo de la densidad de cada uno de los extractos preparados y en la **Tabla 3-21** se presentan los resultados de la densidad y pH. Al realizar el análisis de los valores obtenidos en la prueba de densidad, se observa claramente que el extracto del experimento 5 presenta el mayor valor de densidad; mientras que los extractos de los experimentos 4 y 6 presentan los valores más bajos. Una de las posibles razones de la diferencia en los valores de densidad puede deberse al método de extracción utilizado en cada experimento puesto que algunos de los extractos trabajados utilizando la maceración como método de extracción presentan resultados de densidad más altos que aquellos en los que se utiliza la percolación como método de extracción, lo que se detalla claramente en los valores de los extractos de los experimentos 4 y 6, debido a que cada uno de ellos utiliza un proceso de extracción diferente.

Al realizar el análisis de los valores obtenidos durante la prueba de pH, se puede apreciar que los extractos obtenidos presentaron una tendencia a presentar un pH de 4, pero todos mostraron un pH ácido que osciló entre 4 – 4,5.

Lo anterior indica que no existen diferencias significativas entre ellos, debido a que presentaron resultados cercanos y que evidencia la presencia en estos extractos de compuestos químicos con características ácidas débiles, tales como los flavonoides y taninos.

Tabla 3-20: Datos primarios para el cálculo de la densidad de los ocho extractos

Peso del picnómetro vacío (g)	Peso del picnómetro + Agua (g)	Temperatura (°C)	Densidad del Agua (g/mL)	Peso del picnómetro + Extracto (g)	Densidad del extracto
EXPERIMENTO 1					
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,6308	1,0497
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,4116	1,0406
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,4098	1,0405
EXPERIMENTO 2					
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,4201	1.0413
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,4188	1,0413
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,4178	1,0412
EXPERIMENTO 3					
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,6124	1,0493
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,6403	1,0504
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,6381	1,0503
EXPERIMENTO 4					
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,1628	1,0307
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,4572	1,0429
31,2246	55,4199	25,0	1,0000	56,4739	1,0436
EXPERIMENTO 5					
31,2599	54,4256	25,0	1,0000	56,4577	1,0877
31,2599	54,4256	25,0	1,0000	56,4326	1,0866
31,2599	54,4256	25,0	1,0000	56,5699	1,0926
EXPERIMENTO 6					
31,2448	55,4861	25,0	1,0000	56,2843	1,0329
31,2448	55,4861	25,0	1,0000	56,2805	1,0328
31,2448	55,4861	25,0	1,0000	56,2778	1,0327
EXPERIMENTO 7					
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,3517	1,0381
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,3526	1,0382
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,5062	1,0445
EXPERIMENTO 8					
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,4811	1,0435
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,5166	1,0449
31,2241	55,4290	25,0	1,0000	56,4755	1,0432

Tabla 3-21: Densidad y pH de los ocho extractos fluidos de las hojas de *Psidium guajava* L.

EXPERIMENTOS	DENSIDAD	pH
	PROMEDIO	
Experimento1	1,0436 ± 0,0053	4,5
Experimento 2	1,0413	4,5
Experimento 3	1,0500	4,0
Experimento 4	1,0391 ± 0,0073	4,0
Experimento 5	1,0890 ± 0,0032	4,5
Experimento 6	1,0328 ± 0,0001	4,5
Experimento 7	1,0403 ± 0,0037	4,0
Experimento 8	1,0439 ± 0,0009	4,0

3.3.2 Extractos secos

- Variables respuesta

Evaluación química:

Cromatografía en capa fina para flavonoides

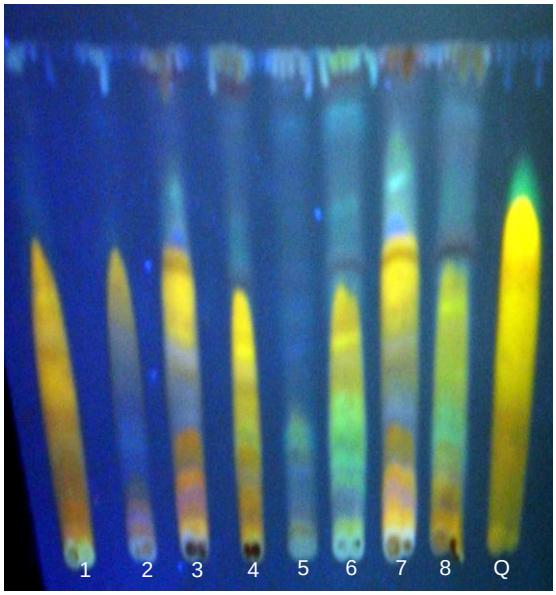
No siempre se conoce la constitución química del extracto, cuando esto sucede es indispensable realizar su perfil cromatográfico. El extracto, en condiciones definidas de análisis, presentará un perfil característico debido a la migración diferencial de sus constituyentes que se conoce como la huella digital (60).

Por medio del perfil cromatográfico es posible visualizar los compuestos constitutivos, en este caso flavonoides, de los diferentes extractos y así evidenciar las diferencias que puedan existir entre sus componentes.

Las muestras de los 8 diferentes extractos obtenidos por la combinación de las diferentes variables de acuerdo a la matriz de los parámetros de extracción basados en el diseño experimental factorial reducido fueron aplicadas en la placa de sílice.

En donde en la primera prueba se eluyó la placa empleando como fase móvil cloroformo: metanol (4.5:0.5), se utilizó como revelador el reactivo específico NP-PEG, para detectar la presencia de flavonoides. Al observar la placa a una lambda de 365 nm se observan manchas amarillas características de flavonoides **(Figura 3-10).**

Figura 3-10: Perfil cromatográfico para flavonoides de los ocho extractos con luz UV 365 nm. Fase móvil: cloroformo: metanol (4.5:0.5) (Q: Quercetina)



En la segunda prueba la placa se eluyó empleando como fase móvil acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27) utilizando el mismo revelador.

Esta placa presentó una serie de similitudes entre los experimentos, en las que se puede observar una mancha de color naranja de alta intensidad con un Rf de 0,96 característica para todos los extractos y que corresponde al flavonol quercetina.

Este resultado es similar al reportado por Pérez F. en su tesis de grado sobre la Caracterización de extractos farmacéuticos de cuatro árboles de uso medicinal en Guatemala, en donde reporta la presencia de quercetina en los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Psidium guajava* L. con Rf de 0,96 de color naranja, así como también Rfs de 0,60 a 0,64; 0,74 a 0,77 y 0,83 a 0,84 con manchas de color naranja y purpura (61).

Adicionalmente en la placa se observan otras manchas de color naranja y púrpura (**Tabla 3-22**) debido a que el revelador permite la identificación de diferentes tipos de flavonoides de acuerdo a su estructura (62).

La caracterización cromatográfica para flavonoides de los ocho extractos de las hojas de *Psidium guajava* L. muestra que en términos generales no existen diferencias significativas entre los diferentes extractos.

Sin embargo, el extracto del experimento 4 muestra una mancha adicional con un Rf de 0,77 que no está presente en el resto de los extractos, siendo este extracto el que presentó el mayor contenido de flavonoides totales (0,3554 mg de quivalentes de quercetina/mg de muestra).

El experimento 8 solo muestra tres de las cuatro manchas características del resto de los extractos con un contenido de flavonoides totales de 0,1421 mg de equivalentes de quercetina/mg de muestra siendo el cuarto extracto con mayor concentración de este tipo de compuestos (**Figura 3-11)**

Figura 3-11: Perfil cromatográfico para flavonoides de los ocho extractos con luz UV 365 nm. Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27) (Q: Quercetina).

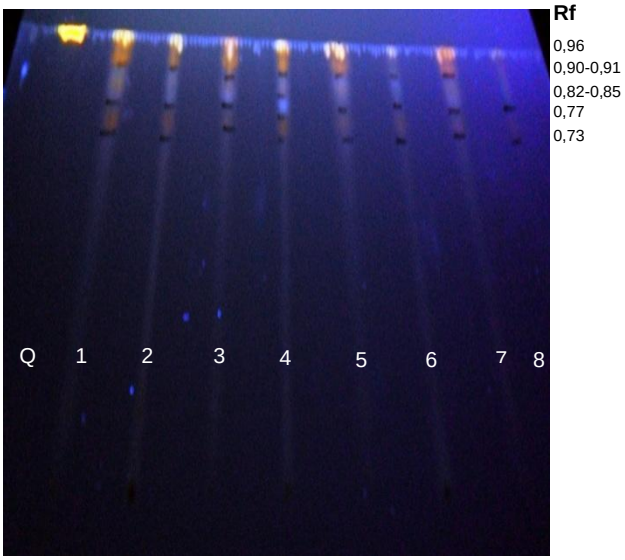


Tabla 3-22: Datos de los perfiles cromatográficos en capa fina para flavonoides.

EXPERIMENTOS	Rf	INTENSIDAD	EXPERIMENTOS	Rf	INTENSIDAD
Experimento 1	0,73	+	Experimento 5	0,73	+
	0,83	++		0,83	+
	0,91	++		0,90	++
	0,96	+++		0,96	++
Experimento 2	0,73	+	Experimento 6	0,73	+
	0,83	++		0,83	++
	0,91	++		0,91	++
	0,96	+++		0,96	+++
Experimento 3	0,73	+	Experimento 7	0,73	+
	0,82	++		0,83	++
	0,90	++		0,91	++
	0,96	+++		0,96	+++
Experimento 4	0,73	+	Experimento 8	0,73	+
	0,77	+		0,85	++
	0,83	++			
	0,91	++		0,96	+++
	0,96	+++			

Estimación de Flavonoides totales

La estimación de flavonoides totales en los diferentes experimentos representa un importante parámetro para evaluar la efectividad de los procesos de extracción y las diferentes condiciones ya que se conoce que estos y otros compuestos fenólicos vegetales tienen múltiples efectos biológicos, tales como actividad antioxidante, antiinflamatorios, inhiben la agregación de plaquetas, tienen actividades antimicrobianas, entre otros (63). La quercetina es un flavonoide que consta de tres anillos y cinco grupos hidroxilo. El añadir $AlCl_3$ al 10% a las muestras se fundamenta en que este forma complejos estables con el grupo ceto del C-4, o bien el grupo hidroxilo del C-3 o C-5 de las flavonas y flavonoles. Además, el $AlCl_3$ forma complejos de ácidos lábiles con los grupos ortodihidroxilos en los anillos A o B de los flavonoides (64).

Usando la curva de calibración generada para la quercetina y=0,0079x - 0,0388; R^2 = 0,9975, el contenido de flavonoides totales en las diferentes muestras de los ocho experimentos (mg de equivalentes de quercetina/mg de muestra) se encuentran entre 0,0908–0,3554 ± 0,0046 mg (**Tabla 3-23**). Los valores obtenidos para las muestras de los ocho experimentos se presentan en el gráfico de la **Figura 3-12.**

Al realizar el análisis de los valores obtenidos en la determinación de flavonoides totales (mg de equivalentes de quercetina/mg muestra) para cada uno de los experimentos, se puede observar claramente que el extracto del experimento 4 presenta el mayor valor de flavonoides totales y es el que presenta el mayor número de manchas en los perfiles cromatográficos en capa fina para flavonoides y un porcentaje de rendimiento de 32,52%; mientras que los extractos de los experimentos 1 y 5 presentan los valores más bajos y presentaron ambos las 4 manchas características de todos los ocho extractos y porcentajes de rendimiento de 33,65% y 35,85%, respectivamente.

El extracto seco del experimento 4 presentó un contenido de flavonoides totales de 0.3554 (quercetina/mg muestra), valor superior al reportado por Chetia y otros, (65) quienes reportan un contenido de flavonoides totales de 2,46 (mg de equivalentes de quercetina /g material seco) y un contenido de flavonoides totales de 3,86 (mg de equivalentes de quercetina/g material seco) para extractos metanólicos y etanólicos de ramas de *Psidium guajava* L., respectivamente. Así como también al reportado por A. A. El Bedawey y otros (66) quienes reportan un contenido de flavonoides totales de 35,46 (mg de equivalentes de quercetina/g extracto seco) de hojas.

Figura 3-12: Gráfico de flavonoides totales para las muestras de los ochos experimentos, expresados como mg de equivalentes de quercetina/mg muestra.

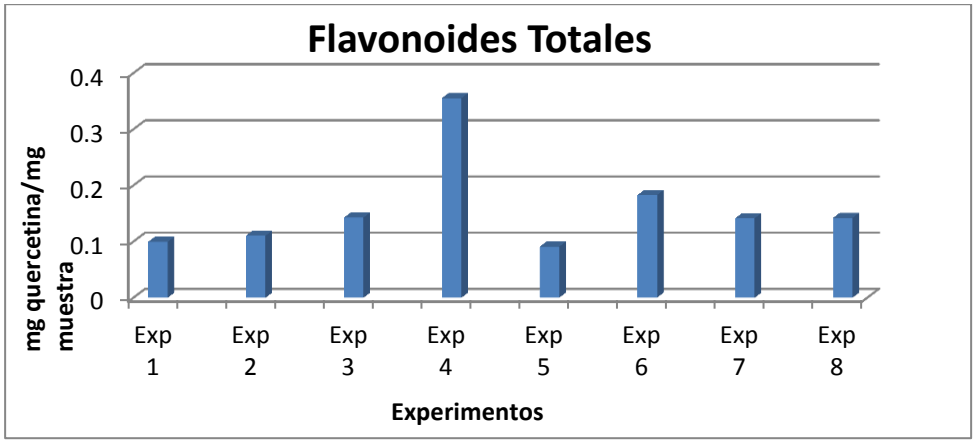


Tabla 3-23: Valores de Flavonoides totales (mg de equivalentes de quercetina/mg muestra) para cada uno de los experimentos.

Experimento	Quercetina en muestra(mg)	Peso de muestra(mg)	Flavonoides totales (mg de equivalentes de Quercetina/mg muestra)	Promedio
1	1,3802	14,1	0,0979	0,0995 ± 0,0023
	1,4258	14,1	0,1011	
2	1,8282	16,7	0,1095	0.1104 ± 0,0013
	1,8591	16,7	0,1113	
3	1,9202	12,6	0,1524	0.1426 ± 0,0138
	1,6737	12,6	0,1328	
4	4,5907	13,1	0,3504	0.3554 ± 0,0070
	4,7206	13,1	0,3603	
5	0,8830	9,9	0,0892	0.0908 ± 0,0022
	0,9145	9,9	0,0924	
6	1,6017	8,5	0,1884	0.1828 ± 0,0079
	1,5064	8,5	0,1772	
7	1,6135	11,7	0,1379	0.1415 ± 0,0051
	1,6974	11,7	0,1451	
8	1,9088	13,5	0,1414	0.1421 ± 0,0010
	1,9284	13,5	0,1428	

En la **Tabla 3-24** se observa que la mejor proporción de solventes empleada para la extracción de flavonoides es la mezcla hidroalcohólica 7:3, con un tamaño de partícula I, una relación de droga-solvente 1:10 y utilizando como método de extracción la percolación por 12 horas, esto se corrobora a que también este extracto, con estas características mostró el mayor valor de flavonoides totales (0.3554 ± 0,0070); sin embargo, el aumentar el tiempo de extracción de la percolación a 36 horas no incrementa la cantidad de flavonoides totales obtenida. Para la extracción, utilizando la mezcla hidroalcohólica 1:1 se observa que la percolación es también el mejor método de extracción comparado con la maceración. Además se puede apreciar que una relación de droga-solvente 1:10 en la percolación y una mezcla hidroalcohólica 1:1 es suficiente para la extracción y que incrementar la cantidad de solvente utilizando una relación de droga-solvente 1:20 no incrementa significativamente la cantidad de flavonoides extraída.

Tabla 3-24: Cantidad de flavonoides totales (mg de equivalentes de quercetina/mg muestra) de los extractos de las hojas usando las mezclas hidroalcohólicas 1:1 y 7:3, diferente métodos de extracción y relación droga-solvente.

Exp	Tamaño de partícula	Relación Etanol-Agua	Relación Droga-Solvente	Método de Extracción por tiempo	Flavonoides totales (mg de equivalentes de Quercetina/mg muestra)
1	Tamaño de partícula I	1:1	1:10	Maceración por 12 horas	0,0995 ± 0,0023
2	Tamaño de partícula I	1:1	1:10	Percolación por 36 horas	0.1104 ± 0,0013
3	Tamaño de partícula I	7:3	1:10	Maceración por 36 horas	0.1426 ± 0,0138
4	Tamaño de partícula I	7:3	1:10	Percolación por 12 horas	0.3554 ± 0,0070
5	Tamaño de partícula II	1:1	1:20	Maceración por 12 horas	0.0908 ± 0,0022
6	Tamaño de partícula II	1:1	1:20	Percolación por 36 horas	0.1828 ± 0,0079
7	Tamaño de partícula II	7:3	1:20	Maceración por 36 horas	0.1415 ± 0,0051
8	Tamaño de partícula II	7:3	1:20	Percolación por 12 horas	0.1421 ± 0,0010

Porcentaje de rendimiento

En la **Tabla 3-25** se muestra el porcentaje de rendimiento de cada extracto seco.

Tabla 3-25: Porcentaje de rendimiento de los ocho extractos secos de *Psidium guajava* L.

Evaluación	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8
Porcentaje de rendimiento	33,65%	35,85%	25,26%	32,52%	35,52%	40,38%	24,48%	40,13%

Los experimentos que presentaron el mayor rendimiento fueron los extractos de los experimentos 2, 6 y 8; el experimento 2, con un rendimiento de 35,85%; el experimento 6 con un rendimiento de 40,38%; y el experimento 8 con un rendimiento de 40,13%, respectivamente; mientras que los extractos de los experimentos 3 y 7 presentan los valores más bajos.

Una de las razones de la diferencia en el porcentaje de rendimiento puede deberse al método de extracción utilizado en cada experimento puesto que los extractos preparados con el método de extracción de percolación arrojan resultados más altos que aquellos preparados por maceración , debido a que en los extractos preparados por percolación se presentan los mayores porcentajes de rendimiento.

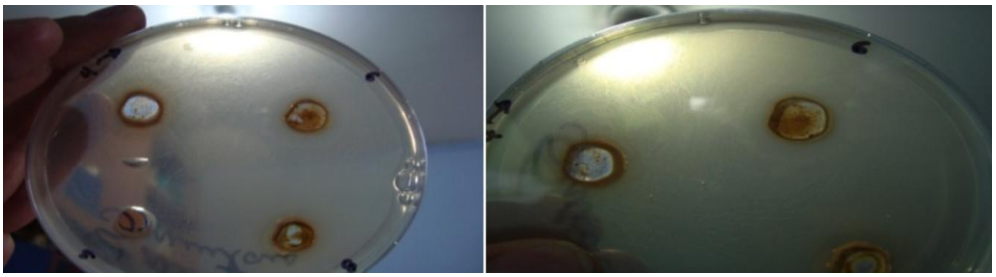
Esto se explica ya que la percolación es un método de extracción continua o progresiva en el que el solvente utilizado para la extracción se va renovando y actúa en una sola dirección consiguiéndose una extracción prácticamente completa de los metabolitos secundarios de las drogas; a diferencia de la maceración que es una extracción discontinua o simultánea en la que se sumerge la droga en el solvente y la totalidad de la droga entra en contacto con el solvente utilizado para la extracción y la difusión de los metabolitos secundarios se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio (4).

3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos de las hojas de *Psidium guajava* L.

Investigar el efecto antimicrobiano de las hojas de *P. guajava* L. implicó una comparación de los ocho extractos hidroalcohólicos con un antibiótico disponible en el mercado mediante la comparación de las zonas de inhibición. Se observó que el antibiótico comercial mostró un efecto inhibidor mayor que los extractos de hoja de *P. guajava* L. Sin embargo, los extractos presentaron una actividad moderada contra las bacterias gram positivas *Streptococcus mutans* y *Propionibacterium acnes*.

Lo anterior está de acuerdo con estudios realizados previamente, donde se ha identificado que las bacterias gram positivas son más sensibles a la permeación de los extractos de plantas al poseer una capa de peptidoglicano en forma de malla, contrario a las bacterias gram negativas, las cuales son generalmente más resistentes a los antimicrobianos de origen vegetal (67) (**Figura 3-13**). Indicando el potencial uso de estos extractos como coadyuvantes para el desarrollo de productos cosméticos. La actividad antibacteriana de los ocho extractos de las hojas de *Psidium guajava* L. fue determinada a una concentración de 25 µg/mL contra *Streptococcus mutans* y *Propionibacterium acnes.* Los extractos de los experimentos 1, 2, 3, 5 y 7 no presentaron actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano contra *Streptococcus mutans* y *Propionibacterium acnes*.

Figura 3-13: Actividad antibacteriana contra *S. mutans.*



Los extractos que mostraron una actividad antibacteriana significativa, en comparación con el fármaco control, fueron los extractos de los experimentos 4, 6 y 8 que obtuvieron la mayor cantidad de flavonoides totales, porcentajes de rendimiento superior a 30% y todos fueron preparados utilizando la percolación como método de extracción (**Tabla 3-26).**

Tabla 3-26: Actividad antibacteriana contra *S. mutans* y *P. acnes*.

Microorganismo	Exp	Prueba 1 (mm)	Prueba 2 (mm)	Prueba 3 (mm)	Promedio (mm)	Control (mm)
S. mutans	**4**	12	12	12	12	31
	6	20	18	16	18 ± 2.0	31
	8	18	15	17	17 ± 1.5	27
Microorganismo	**Exp**	**Prueba 1 (mm)**	**Prueba 2 (mm)**	**Prueba 3 (mm)**	**Promedio (mm)**	**Control (mm)**
P. acnes	**4**	11	n.d.	11	11	31
	6	15	17	16	16 ± 1.0	29
	8	16	15	15	15 ± 0.6	29

La actividad antibacteriana exhibida en los experimentos se presume que se debe a la presencia de los metabolitos secundarios tipo flavonoide. Aunque los alcaloides, saponinas y terpenos no fueron detectados, otros componentes como los flavonoides y taninos han sido ampliamente reportados que exhiben actividad antibacteriana (28, 32, 36, 39, 48, 68). El mecanismo por el cual estos extractos pueden inhibir los microorganismos puede implicar diferentes modos de acción. Se ha reportado que estos penetran la bicapa lipídica de la membrana celular, lo que hace que sea más permeable, conduciendo a la filtración de los contenidos celulares vitales (69). Para el cálculo de la CMI, los extractos de las hojas a la concentración de 25 µg/mL de los experimentos 4, 6 y 8 fueron diluidos, observándose que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas de *S. mutans* y *P. acnes* en todas las diluciones realizadas. Debido a que antes de las diluciones realizadas a los extractos de los experimentos 4, 6 y 8, estos presentaron actividad antimicrobiana a una concentración de 25 µg/mL, se puede concluir que la CMI de los extractos de las hojas de *Psidium guajava* L. de los experimentos 4, 6 y 8 es mayor a 25 µg/mL.

3.5 Análisis Estadístico

3.5.1 Estimación de los modelos de diseño experimental para los datos de cromatografía en capa fina para flavonoides y el porcentaje de rendimiento

- **Resultados**

La **Tabla 3-27** muestra las medidas resumen de las variables medidas en la investigación, los resultados muestran que estas presentan de manera aproximada el mismo comportamiento expresado en similitud de las medidas de tendencia central (promedio y mediana), por lo que el promedio parece ser un buen indicador del centro de cada conjunto de datos y, alta variabilidad (heterogeneidad en los valores muestrales) debido a que los coeficientes de variación son superiores al 30%. La **Tabla 3-28** muestra el resumen de los resultados de las pruebas F de las tablas de análisis de varianza a una vía de clasificación. Los resultados muestran que no hay evidencia estadísticamente significativa para concluir que los factores evaluados generan un cambio en los niveles promedio de las variables medidas.

Tabla 3-27: Medidas estadísticas descriptivas.

Variable	Cromatografía	% Rendimiento
Mínimo	0	0
Máximo	3.0	0.4
Promedio	1.1	0.2
Mediana	1.5	0.3
Desviación estándar	1.1	0.2
Coef. Var. Promedio(%)	96.2	92.8

Tabla 3-28: Resumen del análisis de varianza a una vía de clasificación.

Factor	Cromatografía		% Rendimiento	
	F - value	p - value	F - value	p - value
1	1.118	0.311	0.135	0.719
2	0.298	0.595	0.86	0.372
3	1.118	0.311	0.135	0.719
4	4.256	0.061	2.180	0.166
5	0.298	0.595	0.108	0.748

3.5.2 Estimación de los modelos de diseño experimental para los datos de flavonoides totales y determinación de la actividad antimicrobiana

- **Resultados**

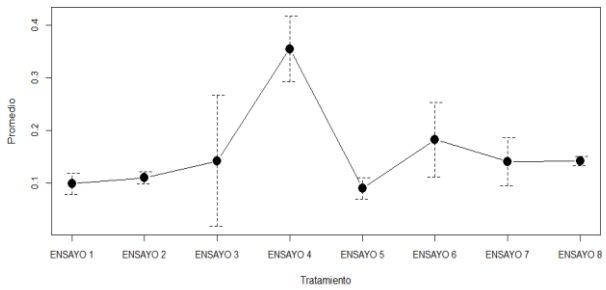
La **Tabla 3-29** muestra las medidas resumen de las variables medidas en la investigación, los resultados muestran que estas presentan de manera aproximada el mismo comportamiento expresado en similitud de las medidas de tendencia central (promedio y mediana), por lo que el promedio parece ser un buen indicador del centro de cada conjunto de datos y, alta variabilidad (heterogeneidad en los valores muestrales) debido a que los coeficientes de variación son superiores al 30%.

Tabla 3-29: Medidas estadísticas descriptivas.

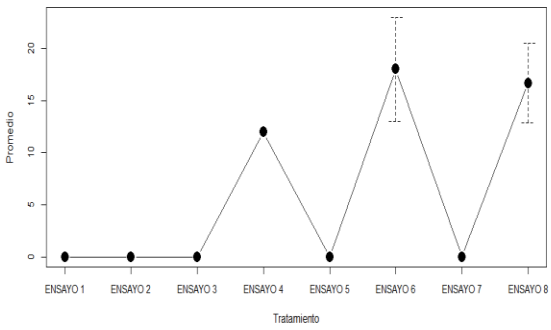
Variable	Flavonoides	*S.mutans*	*P.acnes*
Mínimo	0.09	0	0
Máximo	0.36	20	17
Promedio	0.16	10	8.92
Mediana	0.14	12	11
Desviación estándar	0.08	8.09	7.54
Coef. Var. Promedio(%)	52.00	80.86	84.54

La **Figura 3-14** muestra los gráficos de promedios de cada variable respuesta en cada uno de los tratamientos considerados. En ellos se observa que en el caso de los flavonoides, el ensayo 4 tiene los mayores valores y que las respuestas correspondientes al ensayo 3 presentan una alta variabilidad. En el caso de la actividad microbiana, tanto para el *S. mutans* como el *P.acnes* los ensayos 6 y 8 muestran promedios más altos que en los demás. La **Tabla 3-30** muestra el resumen de los resultados del desarrollo de las tablas de análisis de varianza y las medidas de ajuste y validación para el diseño experimental planteado. Los resultados indican que las combinaciones de factores consideradas son significativas en las tres variables estudiadas.

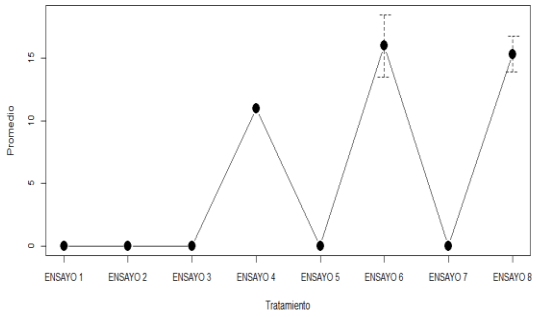
Figura 3-14: Gráfica de las medias para los datos de flavonoides totales y determinación de la actividad antimicrobiana



(a) Flavonoides



(b) Actividad antimicrobiana (*S. mutans)*



(c) Actividad antimicrobiana (*P. acnes*)

En la **Tabla 3-31** se presentan los resultados de las pruebas de comparaciones múltiples por el método de Tukey. Se observa que en el caso de las variables asociadas a la actividad antimicrobiana los ensayos son clasificados en tres grupos, los promedios menores rotulados con “a”, los intermedios con “b” y los mayores con “c”.

Tabla 3-30: Resumen de estimación de modelos de análisis de varianza.

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumas de cuadrados	Cuadrados medios	F value	p - value	R^2	Shapiro Wilk
FLAVONOIDES							
Ensayo	7	0.101	0.0144	337.8	3.01e-09***	0.99	0.95
Residuals	8	3.4e-04	4.3e-05				
S.mutans							
Ensayo	7	837.3	119.62	56.66	4.65e-05***	0.99	0.36
Residuals	6	12.7	2.11				
P.acnes							
Ensayo	7	680.3	97.18	182.2	1.03e-05***	0.99	0.93
Residuals	5	2.7	0.53				

Las clases en ambos casos son casi las mismas salvo por el hecho de que el ensayo 8 en el *S.mutans* puede estar en dos grupos. Para los flavonoides los tratamientos son clasificados en 4 grupos, donde el ensayo 4 es el que mayores contenidos presenta.

Tabla 3-31: Pruebas de comparación múltiple por el método de Tukey.

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Flavonoides	"a"	"a"	"b"	"d"	"a"	"c"	"b"	"b"
S.mutans	"a"	"a"	"a"	"b"	"a"	"c"	"a"	"bc"
P.acnes	"a"	"a"	"a"	"b"	"a"	"c"	"a"	"c"

En la **Tabla 3-32** se resumen los resultados del control de calidad físico, físico-químico y de actividad antimicrobiana de los ocho extractos.El mayor porcentaje de rendimiento de los extractos secos se obtuvo con el método empleado en el experimento 6 con un porcentaje de 40,38%; sin embargo, al realizar el análisis estadístico utilizando las pruebas de comparaciones múltiples por el método de Tukey se observa que la condición óptima para obtener la mayor cantidad de flavonoides totales expresados en mg Quercetina/mg de muestra fue el propuesto para el experimento 4 utilizando una droga con un tamaño de partícula I, una mezcla hidroalcohólica como solvente de extracción con una relación etanol-agua de 7:3, una relación droga-solvente de 1:10 y utilizar la percolación como método de extracción por un tiempo de 12 horas para su obtención con el que se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 32.52% y flavonoides totales de 0.3554 (mg de equivalentes de Quercetina/mg muestra); seguido por el propuesto en el experimento 6 con un contenido de flavonoides totales de 0.1828 (mg de equivalentes de Quercetina/mg muestra).

Tabla 3-32: Resultados de los parámetros de calidad y actividad antimicrobiana.

CO: características organolépticas; DE: densidad; FT: flavonoides totales; RE: rendimiento; ZI: zona de inhibición; *S.m: Streptococcus mutans; P.a: Propinebacterium acnes.*

EXP	CO	DE	pH	Rf	FT (mg Q/mg M)	RE (%)	ZI (mm) (*S.m*)	ZI (mm) (*P.a*)
1	Color marrón claro, sabor amargo y sensación táctil fluida suave	1,0436 ± 0,0053	4,5	0,73 0,83 0,91 0,96	0,0995 ± 0,0023	33,65	-	-
2	Color marrón claro, sabor amargo y sensación táctil fluida suave	1,0413	4,5	0,73 0,83 0,91 0,96	0,1104 ± 0,0013	35,85	-	-
3	Color marrón oscuro, sabor amargo y sensación táctil fluida suave	1,0500	4,0	0,73 0,82 0,90 0,96	0,1426 ± 0,0138	25,26	-	-
4	Color marrón oscuro, sabor amargo y sensación táctil fluida suave	1,0391 ± 0,0073	4,0	0,73 0,77 0,83 0,91 0,96	0,3554 ± 0,0070	32,52	12	11
5	Color marrón claro, sabor amargo y sensación táctil fluida suave	1,0890 ± 0,0032	4,5	0,73 0,83 0,90 0,96	0,0908 ± 0,0022	35,52	-	-
6	Color marrón claro, sabor amargo y sensación táctil fluida suave	1,0328 ± 0,0001	4,5	0,73 0,83 0,91 0,96	0,1828 ± 0,0079	40,38	18 ± 2.0	16 ± 1.0
7	Color marrón oscuro, sabor amargo y sensación táctil fluida suave	1,0403 ± 0,0037	4,0	0,73 0,83 0,91 0,96	0,1415 ± 0,0051	24,48	-	-
8	Color marrón oscuro, sabor amargo y sensación táctil fluida suave	1,0439 ± 0,0009	4,0	0,73 0,85 0,96	0,1421 ± 0,0010	40,13	17 ± 1,5	15 ± 0,6

La mayor actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* y *Propionibacterium acnes* fue mostrada por el extracto hidroalcohólico seco obtenido por el método empleado en el experimento 6, del cual se obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento (40,38%), lo que podría indicar que esta actividad antimicrobiana podría no deberse únicamente a la quercetina, o a los flavonoides allí presentes, sino que pueden estar implicados otros grupos de metabolitos secundarios (por ejemplo taninos).

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Mediante la utilización de un diseño factorial reducido 2^5 fue posible evaluar la influencia de los parámetros de extracción tales como tamaño de partícula, tipo de solvente, relación droga:solvente, método de extracción y el tiempo de extracción permitiendo de esta manera contribuir con la estandarización del proceso a escala de laboratorio para la obtención de un extracto de las hojas de *Psidium guajava* L.

Las dimensiones para el largo y ancho de las hojas de *Psidium guajava* L. son 13.9 cm ± 2.0 y 6.0 cm ± 1.0 respectivamente.

Como características diagnósticas más destacadas de las hojas se tiene que presentan un haz vascular en forma de arco, con estomas de tipo anomocítico, también se observan cristales de oxalato de calcio; estos resultados diagnósticos pueden ser utilizados como parámetros de identificación para evaluar la autenticidad de esta droga.

A partir del resultado del estudio de secado se concluye que el tiempo necesario para que la droga tenga una humedad residual no mayor a 10% se deben secar las hojas en un horno de aire circulante a una temperatura de 45 ºC por un tiempo aproximado de 24 horas.

En las hojas de *Psidium guajava* L. se corroboró la presencia de metabolitos secundarios tales como taninos, fenoles y flavonoides.

Los extractos hidroalcohólicos fluidos de las hojas de *P. guajava* L. poseen un color marrón que varían de claro a oscuro, además tienen un sabor amargo característico que permanece, su textura es fluida y suave.

De acuerdo al análisis estadístico utilizando las pruebas de comparaciones múltiples por el método de Tukey se observa que la mayor actividad antibacteriana tanto para *Streptococcus mutans* como para *Propionibacterium acnes* se presenta con el extracto hidroalcohólico seco obtenido por el método empleado en el experimento 6 que corresponde a utilizar una droga con un tamaño de partícula II, una mezcla hidroalcohólica como solvente de extracción con una relación etanol-agua de 1:1, una relación droga-solvente de 1:20 y utilizar la percolación como método de extracción por un tiempo de 36 horas para su obtención.

4.2 Recomendaciones

- Las metodologías adoptadas para la obtención de los extractos secos; estuvieron sujetas a la infraestructura disponible en el área de trabajo; por lo que se recomienda, evaluar metodologías complementarias con equipos que permitan en lo posible, disminuir la inversión del tiempo y de solventes.
- Se recomienda que para la obtención de extractos a partir de las hojas de *Psidium guajava* L. se tengan en cuenta las condiciones edáficas y época de recolección, con el fin de obtener mayores concentraciones de metabolitos secundarios que tengan actividad antimicrobiana.
- Se recomienda incluir otras variables independientes al proceso de extracción tales como: temperatura, agitación, u otro método de extracción para obtener resultados que permitan determinar el extracto con mayor actividad antimicrobiana.
- Con el fin de conocer si las diferencias observadas en los datos son estadísticamente significativas; se recomienda, trabajar réplicas de todos los ocho experimentos para obtener una estimación del error experimental y calcular una estimación del efecto de los tratamientos considerados en el experimento.

Anexo A: Certificado identificación taxonómica de *Psidium guajava* L.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL-614
Bogotá D.C., 01 de diciembre de 2011

Señores
JUAN CAMILO MARÍN LOAIZA
Profesor Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia
Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica.**

Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

- Nombre: *Psidium guajava* L.
- Familia: MYRTACEAE

No. COL	558071
Colector	Rafael E. Comas Noya
No Colecta	001
Determinó	**C. PARRA-O. /2011**

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Prof. CARLOS A. PARRA
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano –COL
Universidad Nacional de Colombia
E-mail: herbacol_fcbog@unal.edu.co

Copia: Archivo COL

Anexo B: Monografía de las Hojas de *Psidium guajava* L.

Guayaba

Hojas de *Psidium guajava* L.

Definición

Hojas de *Psidium guajava* L. (**figura A-1**) consiste de hojas jóvenes y/o secas de *Psidium guajava* Linneo. (Myrtaceae) (1)

Figura A-1: Hojas de *Psidium guajava* L.

Sinónimos

Psidium aromaticum Linneo
Psidium cujavillus Burn.f.
Psidium pomiferum Linneo
Psidium pumilum Vahl
Psidium pyriferum Linneo
Psidium sapidissimum Linneo(2) (3).

Nombres vernáculos seleccionados

Abas, aduoba, aguoba, amba, amrood, amrud, amrut, amruta-phalam, araca-goiba, arasa, banjiro, banziro, bidji, bihi, bilauti, borimak, bugoyab, buyaki, dijamboé, coloc, djambu bidji, djambu klutuk, eguabe, fa-rang, goavy, goejaba, goiaba, goiabeira, goiabeira-vermelha, goiabeiro, gouyav, gouyavier, goyav, goyavier, goyya, grosse gelbe, gua, guafa, guajave, guava, guava tree, Guave, guayaba, guayaba cak, guayaba colorada, guayaba cotorrera, guayaba de gusano, guayaba de venado, guayaba del Perú,guayaba peruana, guayabe,

guayabero, guayabo, guayabo agrio, guayabo blanco, guayava, Guayave, guega, guyaba, gwaabaa, gwawa, hind armudu, ipera, jaama, jamba, jambu biji, kautonga, Kiswahili, koyya, krue, ku'ava, kuabas, kuava, kuawa, kuiaba, kuliabas, mabera, maduriam, manssla, motiram, mpera, mugwavha, ngoaba, nulu, oguawa, pat'a, perala, perodelle Indie, peyara, posh, psidio, psidium, punjo, quwawa, sari guafa, sigra, ikra, tuava, warakel-guafa, wariafa, woba, xalxoctl (1).

Distribución geográfica

Originaria de los trópicos americanos (4).

Descripción

Árbol perenne de 5 a 10 m de altura, de tronco grisáceo-café con la corteza lisa, escamosa de color rojizo, polidérmica. Las ramas son cuadrangulares de color pardo-verdoso con hojas de 12 a 16 cm de largo por 5 a 7 cm de ancho. Posee pedúnculos axilares, pubescentes con 1 a 3 flores pubescentes. Las flores forman cimas o son solitarias, con pétalos de 2 a 3 cm de longitud, de color blanco en número de 5, perfumadas, de cáliz verdoso, numerosos estambres en forma de filamentos blancos y con anteras amarillas. El fruto es globuloso, de color amarillo, cremoso, con numerosas semillas duras y pequeñas, como piedrecillas, de color rosado-amarillento. El fruto alcanza un diámetro de 4 hasta 10 cm (3).

Material de la planta de interés: Hojas frescas

Apariencia General

Hojas de forma oblonga con bordes enteros y pecíolo corto; en el envés se observa su prominente venación con 12 a 16 nervios laterales de cada lado. Las hojas presentan por la cara una superficie glabra o espaciadamente pubescente y por la cara inferior una superficie pubescente, confiriéndole una textura suave.

Características organolépticas

Olor: Cuando se estrujan las hojas presentan un olor fuerte característico y frutal. Sabor: Astringente.

Color: verde-grisáceo por el haz y verde claro por el envés.

Descripción macroscópica

Presenta base truncada redondeada y ápice cuspidado. Las dimensiones para el largo y ancho son 13.9 cm ± 2.0 y 6.0 cm ± 1.0 respectivamente.

Descripción microscópica

En el corte transversal, la lámina de la hoja presenta mesófilo dorsiventral con capas de parénquima en empalizada; el tejido esponjoso está formado de 5-8 filas de más o menos células esféricas.

La epidermis superior de la lámina consta de células poligonales, casi isodiamétricas o ligeramente alargadas con paredes rectas cubiertas con cutícula lisa y delgada, carente de estomas y con unas pocas glándulas sebáceas.

La epidermis inferior consta de células poligonales, casi isodiamétricas con paredes rectas y cubiertas de una cutícula delgada y lisa; los estomas están presentes en la epidermis inferior solamente y son de forma oval y de tipo anomocítico. Hipodermis desarrollada junto a la epidermis adaxial constituida por dos a tres capas de células colenquimatosas.

En posición subepidérmica y a nivel del nervio central se observa colénquima laminar. Cavidades esquizolisígenas se hallan localizadas en el mesófilo y en la hipodermis. El nervio central es de gran desarrollo presenta forma cóncavo-convexa.

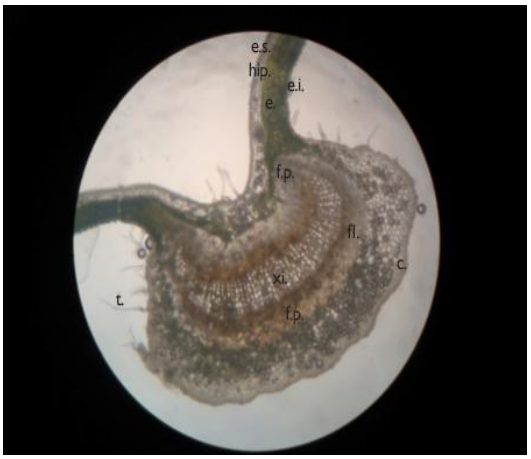
Está constituido por haces bicolaterales y rodeado por una vaina de fibras esclerenquimáticas; contiene de 3–4 capas de células de parénquima con paredes delgadas con distintos espacios intercelulares, las células del parénquima contienen pocos prismas y grupos numerosos de oxalato de calcio;

el pericicIo está formado por dos arcos de fibras lignificadas por encima y por debajo del haz vascular; el xilema está formado por espirales lignificados, vasos anulares, donde se distinguen bien los radios medulares que bordean la zona por un floema no lignificado que se compone de elementos cribosos y células parénquimaticas.

El pecíolo presenta sección transversal planoconvexa ligeramente acanalado en la parte superior. Ambas epidermis contienen tricomas; sin embargo, en la epidermis inferior son más numerosos, estos son uniseriados de paredes lisas gruesas, no glandulares, rectos, curvados o doblados y además presenta estomas. En posición subepidérmica presenta un colénquima laminar formado por 2 ó 3 estratos celulares. El nervio principal adopta forma de herradura, está constituido por haces bicolaterales y se halla rodeado por una vaina de fibras.

Como características diagnósticas más destacadas de las hojas se tiene que las hojas presentan un haz vascular en forma de arco, con estomas de forma oval y de tipo anomocítico, presenta vasos de xilema, se encuentran prismas y grupo de cristales de oxalato de calcio. (**Figuras A-2 –A-4**).

Figura A-2: Corte transversal de la hoja de *Psidium guajava* L.
c. colénquima; hip. hipodermis; e.i. epidermis inferior; e. empalizada; f.p. fibras pericíclicas; fl. floema; t. tricoma; e.s. epidermis superior; xi. xilema.



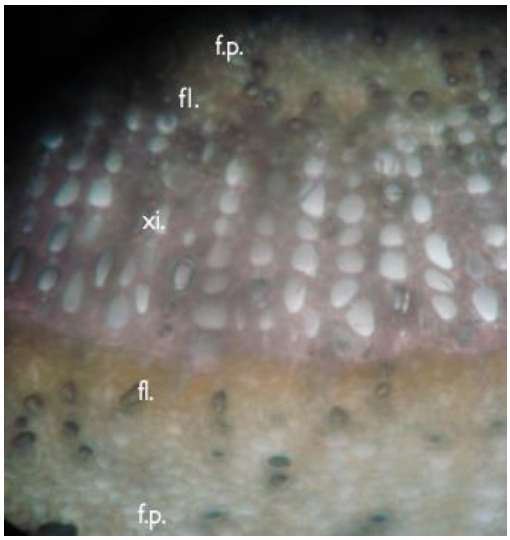
Material vegetal en polvo

La hoja seca pulverizada es de color verde con un sabor astringente y olor característico. En la misma se pueden observar fragmentos de parénquima en empalizada con cavidades secretoras; abundantes estomas y numerosos tricomas no glandulares unicelulares, fuertemente engrosados con suave cutícula; numerosos fragmentos de tricomas no glandulares rotos, epidermis adaxial con pelos simples. Parénquima con pocos prismas de oxalato de calcio; pelos unicelulares sueltos. Se observan fragmentos de pecíolo con restos de tejido vascular lignificados constituido por traqueidas anilladas y espiraladas y porciones de epidermis.

Pruebas generales de identidad

Observaciones macroscópicas y microscópicas, análisis fitoquímico preliminar y cromatografía en capa fina de flavonoides.

Figura A-3: Corte transversal detallado de la nervadura de la hoja de *Psidium guajava* L.
f.p. fibras pericíclicas; fl. floema; xi. xilema.



Pruebas de pureza

Material orgánico extraño

No más de 3%.

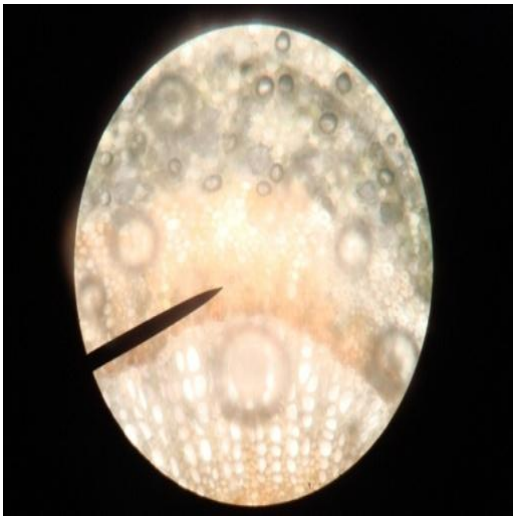
Cenizas totales

No más del 8%

Perdida por secado

No más del 10%

Figura A-4: Descripción microscópica de la hoja de *Psidium guajava* L. se observan cristales de oxalato de calcio.



Principales componentes químicos

En las hojas de *Psidium guajava* L. se han identificado los siguientes metabolitos secundarios: taninos, fenoles, flavonoides, aceites esenciales, carotenoides, lecitinas, vitaminas, fibra y ácidos grasos (5).

A continuación se ilustran algunos flavonoides aislados e identificados de las hojas de *Psidium guajava* L **(Figura A-5).**

Aplicaciones medicinales

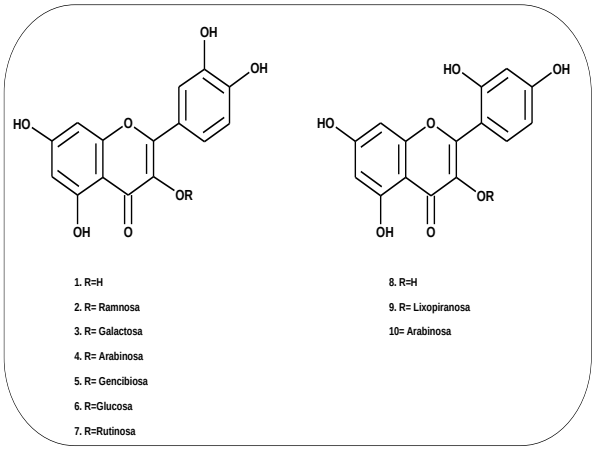
Usos reportados de datos clínicos

Coadyuvante en el tratamiento de la diarrea aguda de origen no bacteriano (3, 6), gingivitis y enteritis rotaviral (1).

Usos descritos en farmacopeas y documentos bien establecidos

No se encuentra información.

Figura A-5: Flavonoides identificados en las hojas de *Psidium guajava* L.



1.Quercetina (3,5,7,3',4'-Pentahidroxiflavona); 2, Quercitrina (3-O-α-L-Rhamnosil- quercetina); 3. 3-O-β-D-Galactosil-quercetina; 4. Guajaverina (3-O-α-L-Arabinosil-quercetina); 5. 3-O-Genciobiosil-quercetina; 6. 3-O-β-D-Glucosil- quercetina; 7. 3-O-β-D- Rutinosil-quercetina; 8. Morina (3,5,7,2',4'-Pentahidroxiflavona); 9. 3-O-α-L-Lixopiranosil-morina; 10. 3-O-α-L-Arabinosil-morina.

Usos descritos en la medicina tradicional.

Se usa en el tratamiento del dolor abdominal, sangrado de las encías, tos, gastritis, dolor de cabeza, tiña, vaginitis, heridas. También se utiliza como astringente, antiemético y emenagogo (1).

Farmacología

Farmacología Experimental

Actividad analgésica

La administración intragástrica de 100, 200 o 400 mg/Kg de peso corporal del aceite esencial de las hojas produce un efecto antinociceptivo en ratones según la evaluación de la prueba de la formalina. Una dosis de 200.0 mg/Kg de peso corporal del aceite esencial a los ratones redujo el dolor como se mide en la prueba de *writhing* inducido con ácido acético. Uno de los principales constituyentes, α-pineno, también mostró un efecto antinociceptivo en la prueba de la formalina, y cuando se administra por vía intragástrica en dosis de 100 mg/Kg y 200 mg/Kg, se observó una reducción al lamer la pata de 72% y 76%, respectivamente.

A una dosis de 400 mg/Kg el lamer la pata se redujo en un 37% en la primera fase (aguda) y el 81% en la segunda fase (crónica) (1).

Actividad antidiarreica

Una decocción de las hojas inhibió la diarrea inducida por Microlax cuando se administró por lavado gástrico a ratas a una dosis de 10.0 mL/Kg de peso corporal. La administración intragástrica a ratones de un extracto metanólico de las hojas a una dosis de 200.0 mg/Kg de peso corporal previno la diarrea inducida por aceite de ricino.

La administración intragástrica a ratas de un extracto acuoso o metanólico de las hojas a una dosis de 400.0 mg/Kg de peso corporal previno la diarrea inducida por aceite de ricino, redujo de la motilidad gástrica y el entero estancamiento inducido por la prostaglandina E2 (1).

Un extracto seco metanólico al 70% de las hojas inhibió el reflejo peristáltico inducido eléctricamente del íleon aislado de cobaya a una concentración de 100 µm/mL. El principal constituyente activo del extracto fue la quercetina 1.4×10^{-5} (72.1%), con isoquercetina e hiperina siendo activos débiles (7).

Actividad Antihiperglicémica

La administración intragástrica a ratas de un extracto etanólico al 50% de las hojas a una dosis de 200.0 mg/kg de peso corporal, previno la hiperglicemia inducida por aloxano. Una fracción butanólica del extracto etanólico al 50 redujo la hiperglicemia inducida por aloxano en ratas cuando se administra a una dosis de 25.0 mg/Kg de peso corporal por lavado gástrico (1).

La administración intragástrica a ratas de un extracto etanólico al 50% a una dosis de 200.0 mg/Kg de peso corporal no estimuló la biosíntesis de insulina (1).

Actividad antiinflamatoria y antipirética

La administración intragástrica a ratas de 0.8 mL/Kg de peso corporal del aceite esencial de las hojas disminuyó la inflamación en el edema inducido por la carragenina en la prueba de la pata trasera y la prueba del granuloma con algodón (8). La administración intragástrica a ratones de un extracto seco metanólico de las hojas a una dosis de 200,0 mg/Kg de peso corporal redujeron el edema de pedal inducido por carragenina.

La administración intragástrica a ratones de un extracto seco metanólico de las hojas en una dosis de 200,0 mg/Kg de peso corporal redujo la pirexia inducida por levaduras (1)

Actividad antimalaria

Los siguientes extractos de la droga cruda tuvieron actividad contra *Plasmodium falciparum in vitro* a una concentración media inhibitoria, así: acetato de etilo, 10.0 µg/mL; etanol, 36.0 µg/mL; acuoso, 80.0 µg/mL; y éter de petróleo, 13.0 µg/mL (1)

Actividad antimicrobiana

Son numerosas las investigaciones científicas que evidencian las propiedades antimicrobianas de los extractos de las hojas de *Psidium guajava* L. La primera publicación formal de los extractos acuosos de hoja de guayaba la realizó, en Indonesia, Colliere quien observó que el extracto acuoso inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de otros microorganismos patógenos cultivados *in vitro* (9).

Más tarde, El-Khadem y Mohamed, observaron lo mismo con el extracto metanólico de las hojas, del cual aislaron e identificaron como responsables de esta actividad, dos derivados glicosilados del flavonoide Quercetina denominados avicularina (3-O-gentobiósido-quercetina) y guajaverina (3-O-α-L-arabinósido-quercetina)(10).

Además de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, el extracto metanólico de las hojas de *Psidium guajava* inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis, Escherichia coli* y cepas de *Candida*.

El extracto exhibe actividad variable contra microbios con rangos de inhibición de 14-35 mm, rangos de CMI de 1.25 – 10 mg/mL y concentración bactericida mínima/concentración fungicida mínima de 2.5 - 20 mg/mL para organismos sensibles en las concentraciones ensayadas. La más alta actividad se presentó a una concentración inhibitoria mínima de 1.25 mg/mL y a una concentración bactericida mínima de 2.5 mg/mL (11).

Los extractos acuosos tienen actividad antibacteriana contra algunas bacterias tales como *Salmonella typhy* y *Klebsiella pneumoniae.* (12).

De igual forma la fracción soluble en acetato de etilo del extracto acuoso de las hojas de *Psidium guajava* posee propiedades antibacterianas de amplio espectro contra bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, y bacterias gram-negativas como *Salmonella typhymurium, Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli.*(13).

En otro estudio, cuatro compuestos antibacterianos fueron aislados de las hojas de guayaba. Las estructuras de estos se establecieron mediante análisis químicos y espectroscópicos. Dos nuevos glicósidos de flavonoides, Morin-3-O-alfa-L-lixopiranósido y Morin-3-O-alfa-L-arabopiranósido, y dos flavonoides conocidos guaijavarina y quercetina, fueron identificados. La concentración mínima inhibitoria de Morin-3-O-alfa-L-lixopiranósido y Morin-3-O-alfa-L-arabopiranósido fue de 200 µg/mL para cada uno contra *Salmonella enteritidis*, y 250 µg/mL y 300 µg/mL contra *Bacillus cereus*, respectivamente (14).

Diferentes investigadores, de manera selectiva, han realizado además algunos tamizajes para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de guayaba.

El efecto antimicrobiano del aceite esencial de hojas de guayaba fué analizado frente a las cepas de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Salmonella spp* aisladas del camarón *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). El extracto del aceite esencial mostró actividad inhibitoria contra *S. aureus y Salmonella spp* lo que lo hace una importante fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos (15).

Una mayor concentración de compuestos químicos activos en los aceites esenciales explica su más fuerte acción inhibitoria.

El aceite esencial extraído de hojas de *Psidium guajava* L. se probó empleando el método de difusión en agar, contra 5 cepas de bacterias gram positivas, 5 cepas de bacterias gram negativas, así como tres cepas de hongos. El aceite mostró actividad antibacteriana principalmente contra*, Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus,* sugiriendo que este contiene compuestos que pueden formar la base para el desarrollo de nuevas formulaciones de amplio espectro antimicrobiano.

Estos resultados apoyan la noción de que los aceites esenciales de las plantas pueden tener muchos usos como productos farmacéuticos (16).

Recientemente, se reportó que el aceite esencial de las hojas de la guayaba mostró efecto inhibitorio contra *Bacillus cereus, Enterobactor aerogenes* y *Pseudomonas fluorescens*. Dentro del género *Psidium*, los componentes mayoritarios de los aceites esenciales son monoterpenos como el 1,8 cineol, p-Cimeno y acetato de α-terpenil (17).

Actividad de *Psidium guajava* L. contra bacterias de la cavidad oral

La quercetina es la principal aglicona que se encuentra en los flavonoides glicosidados de las hojas de la guayaba.

Ensayos antimicrobianos mostraron que los extractos y los compuestos aislados, quercetina, 3-O-α-L-arabinofuranósido-quercetina, 3-O-β-D-arabinopiranósido-quercetina, 3-O-β-D-glicósido-quercetina y 3-O-β-D-galactósido-quercetina, poseen actividad antibacteriana, explicando el uso tradicional de los extractos como bactericida para aliviar las úlceras orales y las encías inflamadas (18).

Los extractos de *P. guajava* pueden ejercer su efecto inicialmente previniendo y reduciendo la adherencia de colonizadores bacterianos primarios a la superficie del diente y segundo,

previniendo o inhibiendo el crecimiento y proliferación de microorganismos que se adhieren a la superficie del diente potenciando su actividad antiplaca (19).

El mecanismo de acción del efecto anti-adherente de *Psidium guajava* podría involucrar una modificación del enlace hidrofóbico entre las bacterias y los componentes salivales que cubren las superficies de los dientes (20). En relación con patógenos involucrados en enfermedades bucales, el flavonoide, quercetina-3-O-alfa-L-arabinopiranósido (guaijaverina) demostró un alto potencial como agente para evitar la formación de la placa al inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* (21).

Además los extractos de *P. guajava* tienen efecto bacteriostático sobre la placa bacteriana creando un ambiente de estrés al suprimir el crecimiento y la propagación celular. En el contexto de la placa dental, esto garantizaría la consecución de una placa delgada. Por lo tanto, la decocción de esta planta sería adecuada si se usa en el control de la placa dental (22).

1 mg/mL del extracto acuoso de las hojas de *P. guajava* tiene un profundo efecto sobre la ultraestructura de tres bacterias formadoras de la placa bacteriana, *Streptococcus sanguinis, Streptococcus mitis* y *Actinomyces sp*. reduciendo la hidrofobicidad de la superficie celular de estos por 54.1%, 49.9% y 40.6% (23). Los extractos interfieren con el ciclo de crecimiento y el desarrollo de las células bacterianas haciéndolas menos eficientes para dividirse y multiplicarse. Por lo tanto, el crecimiento de la placa dental puede ser lento y controlado, indicando la actividad antiplaca de los extractos acuosos, tal como se mencionó anteriormente (24). Estos resultados dan un soporte científico que permiten pensar en el uso de las hojas de *Psidium guajava* para el tratamiento de enfermedades dentales o el control de los microorganismos asociados a ellas (25).

Actividad de *Psidium guajava* L. contra bacterias que producen el acné

Un estudio con diferentes especies provenientes de Tailandia reveló el efecto antimicrobiano de extractos de la *P. guajava* contra bacterias que inducen el acné, el valor de la CMI fue de 2.5 mg/mL contra *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* (26).

De igual forma, la actividad antibacterial de los extractos acuosos y de etanol-agua de las hojas de *Psidium guajava*

fue estudiada usando ensayos de microdilución.

Los extractos acuosos de las hojas fueron activos contra *Staphylococcus aureus* (CMI=500 µg/mL) y *Bacillus subtilis* (CMI=500 µg/mL), sin embargo los extractos hidroalcohólicos mostraron la más alta actividad comparada con los extractos acuosos.

Los extractos etanol:agua 50:50 y 70:30 fueron más activos contra *Staphylococcus aureus* (CMI=125 µg/mL) y *Bacillus subtilis* (CMI=125 µg/mL).

El extracto etanol:agua (7:3) fue activo contra *S. epidermidis* (CMI=250 µg/mL) (27).

Otro estudió reveló que los extractos de las hojas de *P. guajava* poseen actividad antimicrobiana contra bacterias que comúnmente causan heridas quirúrgicas, infecciones en la piel y otros tejidos blandos; pudiéndose utilizar esta planta para la formulación de productos antibacterianos para manejar este tipo de infecciones (28).

Las lociones hidroalcohólicas de las cáscaras liofilizadas de *Psidium guajava* al 1% presentaron buena actividad para el tratamiento del acné contra las cepas *S. epidermidis* y *S. aureus,* semejante a clindamicina (29).

También se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *P. guajava* contra *Propionibacterium acnes, Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* por el método de difusión en disco (zona de inhibición), concluyendo que los extractos de las hojas son beneficiosas en el tratamiento del acné especialmente cuando se conoce que tienen actividades antiinflamatorias (30).

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de un extracto acuoso y un extracto etanólico al 50% de las hojas se evaluaron usando el radical colorimétrico 1,1-difenil-2-picrilhidrazil.

En comparación con el ácido ascórbico, los extractos de la droga cruda tenían un efecto antioxidante significativamente más bajo (31).

La quercetina ha pasado a formar parte de los flavonoides de origen natural con potencial efecto farmacológico en los

procesos patológicos relacionados con el estrés oxidativo.

La actividad antioxidante de la quercetina está directamente relacionada con la presencia en su molécula de grupos hidroxilo en los anillos A y B, con el doble enlace en la posición 2-3 y el hidroxilo en la posición 3. Los estudios en diversos modelos *in vitro,* señalan que este compuesto posee propiedades antioxidantes y de captador de radicales libres, inhibe la peroxidación lipídica y la oxidación en la membrana mitocondrial (3) (32).

En estudios con animales se ha reportado que la quercetina, administrada por la vía oral a dosis de 250 mg/kg, se absorbe y se transforma en quercetin-3-O-β-D-glucurónido, que actúa como antioxidante de la lipoproteína LDL plasmática (3).

Actividad antiespasmódica

Un extracto metanólico seco de las hojas redujo las contracciones espontáneas del íleon aislado de rata y de cobayo cuando se añade al medio en las concentraciones de 20.0 mL/L y 80 µg/mL, respectivamente (1).

Un extracto acuoso, metanólico o de hexano de las hojas tuvo actividad relajante *in vitro* del músculo liso en el íleon de cobaya, a una concentración de 250.0 a 1000.o µg/mL (1).

Un extracto butanólico de las hojas a una concentración de 0.2 mg/mL redujo las contracciones inducidas por la acetilcolina en el íleon de cobaya en un 95-100% (1).

Actividad antitusiva

La administración intragástrica de un extracto acuoso de las hojas a ratas y cobayos en una dosis de 5.0 g/Kg de peso corporal redujo la tos inducida por la capsaicina (1).

Efecto sobre el sistema nervioso central

La administración intragástrica de un extracto metanólico seco de las hojas a ratones a una dosis de 200 mg/Kg de peso corporal redujo las retorcidas inducidas por el ácido acético, lo que demuestra la actividad analgésica (1).

La administración intragástrica de un extracto metanólico seco a ratones a una dosis de 200 mg/Kg de peso corporal también potenció el tiempo de dormida inducido por el fenobarbital (1).

La administración intraperitoneal de un extracto de las hojas obtenido en hexano a ratones a una dosis de 100 mg/Kg de peso corporal potenció la hipnosis inducida por el pentobarbital sódico e incrementó la latencia de las convulsiones inducidas por el leptazol (1).

La administración intragástrica o intraperitoneal de un extracto metanólico seco de las hojas a una dosis de 3,3 mg/Kg de peso corporal redujo la actividad motora espontánea en ratones (1).

La administración intragástrica de extractos de hexano, de etilacetato o de metanol de la droga cruda a dosis de 100.0 – 125.0 mg/Kg de peso corporal produjo efectos antinociceptivos dependientes de la dosis en ratones y prolongó el sueño inducido por el pentobarbital (1).

Efecto hemostático

Se investigaron los efectos de un extracto de las hojas sobre el tiempo de sangrado y los tres principales mecanismos de hemostasia: vasoconstricción, agregación de plaquetas y coagulación de la sangre. La aplicación tópica de un extracto acuoso a una concentración de 0,05 mg/mL no redujo los tiempos de hemorragia en ratas heridas. Sin embargo, el extracto (2-6 µg/mL) potenció la contracción muscular vascular inducida por la fenilefrina (4.0 µg/mL) en pedazos de aorta aislada de conejos. El extracto también prolongó significativamente el tiempo de coagulación de la sangre en el plasma normal tratado con 6.0 mg/mL de extracto en la prueba del tiempo de tromboplastina parcial activada (p<0.05) (1).

Efecto Inotrópico

En las aurículas de una cobaya, el extracto etanólico de las hojas redujo las contracciones auriculares mediante la depresión de la fuerza del miocardio en una manera dependiente de la concentración (concentración efectiva media (EC_{50})= 1.4 g/L.

Concentraciones mayores que 2.5 g/L suprimieron completamente la contractilidad miocárdica.

Por otra parte, una fracción de ácido acético (EC_{50}= 0.07 g/L) del extracto aumentó el tiempo de relajación medido a 20 y 50% de la curva de fuerza de 30 y 15%, respectivamente, pero no cambió el tiempo de contracción.

El efecto inotrópico negativo del extracto fue abolido por sulfato de atropina, lo que sugiere que, o bien la sustancia activa actúa como un agonista colinérgico o que podría liberar acetilcolina de las sinapsis parasimpática (33).

Actividad antimutagénica

Las hojas de *P. guajava* L. poseen actividad antimutagénica, las hojas contienen flavonoides que podrían ser los responsables de esta actividad y probablemente las propiedades anticarcinogénicas de las hojas (4).

Se encontró que la (+)-galocatecina aislada del extracto metanólico de las hojas de guayaba era un compuesto bio-antimutagénico contra la mutación inducida por la luz ultravioleta en *Escherichia coli* (4).

Actividad inhibitoria de la transcriptasa reversa retroviral relativa

A una concentración de 125 µg/mL, un extracto de agua caliente mostró un 61% de actividad inhibitoria de la transcriptasa reversa retroviral relativa (4).

Actividad Hepatoprotectora

El extracto acuoso de las hojas de la planta de guayaba posee buena actividad hepatoprotectora (4).

Toxicidad

La administración intragástrica a ratas de un extracto acuoso de las hojas exhibió una dosis letal media de 50.0 g/Kg de peso corporal (1).

En pruebas de toxicidad crónica, un extracto acuoso de las hojas se administró por sondas a 128 ratas de ambos sexos en dosis de 0.2, 2.0 y 20.0 g/día (1, 10 y 100 veces la dosis terapéutica normal para el tratamiento de la diarrea) durante 6 meses.

Los resultados mostraron que la ganancia de peso corporal en las ratas macho fue más bajo en todos los animales tratados.

Se observó un aumento significativo en los niveles de recuento de leucocitos, fosfatasa alcalina, transaminasa piruvato glutamato y nitrógeno urea en suero ($p< 0.05$).

Los niveles de sodio sérico y colesterol se redujeron significativamente ($p< 0.05$) indicando señales de hepatotoxicidad.

En ratas hembra, los niveles en suero de sodio, potasio y albumina aumentaron significativamente ($p< 0.05$), mientras que los niveles de plaquetas y globulina en suero se redujeron significativamente ($p< 0.05$).

La evaluación histopatológica mostró un grado leve de cambio en las grasas e hidronefrosis en ratas macho y nefrocalcinosis y pielonefritis en ratas hembra (1).

Farmacología clínica

Setenta pacientes con gingivitis estuvieron envueltos en un ensayo clínico controlado doble ciego de tres semanas para evaluar la eficacia de un enjuague bucal que contenía una decocción de las hojas secas (3 Kg en 30 L de agua hervida durante 20 minutos).

El placebo del enjuague bucal contenía el mismo ingrediente con la excepción de la decocción de las hojas. Los pacientes fueron estratificados en dos grupos balanceados de acuerdo a sus resultados de la línea base de su gingivitis pre-profilaxis calculado usando el índice de anotaciones de gingivitis de Loe-Silness. Los sujetos se enjuagaron la boca tres veces al día durante 1 minuto con 15 mL de su enjuague bucal asignado. Los pacientes que utilizaron el enjuague bucal que contenía el extracto de las hojas tuvieron menor inflamación de la encía (19,8%) y menos sitios de la enfermedad gingival severa (40,5%) que los que utilizaron el placebo del enjuague bucal (1).

Un ensayo clínico aleatorio y controlado evaluó la eficacia de una decocción de la droga cruda para el tratamiento de la enteritis por el rotavirus infantil.

Sesenta y dos pacientes con enteritis por rotavirus fueron asignados al azar ya sea para el grupo tratado con la decocción o para el grupo control.

Se registró el tiempo hasta el cese de la diarrea, el contenido de sodio en la sangre, el contenido de sodio y glucosa en las heces, y la tasa de conversión negativa del antígeno del rotavirus humano.

Después de 3 días, el 87% de los sujetos en el grupo tratado se había recuperado, significativamente más que el número en el grupo control (58.1%, $p< 0.05$).

El tiempo transcurrido hasta el cese de la diarrea en el grupo tratado (25.1 ± 9.5 h) fue significativamente más corto que para el grupo control (38.7 ± 15.2 h, $p< 0.01$).

El contenido de sodio y glucosa en las heces se redujo en el grupo tratado ($p< 0.05$), mientras que la reducción en el grupo control fue insignificante.

La tasa de conversión negativa del rotavirus humano en las heces del grupo tratado fue de 87.1%, significativamente mejor que la del grupo control (58.1%, $p< 0.05$) (1).

Un extracto acuoso de la droga cruda se puso a prueba en un estudio clínico que incluyó pequeños grupos de pacientes de 5 años y más jóvenes o de 20-40 años.

Los pacientes con diarrea aguda recibieron el extracto, mientras que un grupo comparativo recibió una suspensión de caolín o pectina.

Los resultados fueron similares en todos los tres grupos con una eficacia de tratamiento por encima de 70% (1).

Un estudio clínico aleatorio doble ciego, se realizó para evaluar la seguridad y eficacia de un extracto crudo de la droga con un contenido de quercetina estandarizado. El extracto se administró por la vía oral a un grupo de pacientes adultos con diarrea aguda.

Se incluyeron pacientes adultos de ambos sexos entre 20 y 59 años de edad que sufrían de diarrea aguda no complicada.

La enfermedad diarreica aguda se definió como una condición clínica caracterizada por pasar al menos tres deposiciones líquidas durante las 24 h previas y dolor abdominal o calambres.

Las mujeres embarazadas y los pacientes con enfermedades sistémicas concomitantes a la enfermedad diarrea aguda (tales como inmunodeficiencia y el síndrome intestinal), fueron excluidos. Las cápsulas que contenían 500 mg del extracto se administraron cada 8 h durante 3 días para el grupo de tratamiento (*n*=50), mientras que el grupo control (*n*=50) recibió cápsulas del mismo tamaño, sabor y color que contenían 500 mg de placebo cada 8 horas durante 3 días.

La terapia de rehidratación oral fue administrada a todos los pacientes de acuerdo con los procedimientos convencionales seguidos en la institución médica para el tratamiento de la enfermedad diarreica aguda.

Los resultados mostraron que el producto que contenía guayaba disminuyó la duración del dolor abdominal en estos pacientes (1).

Se realizó un ensayo clínico aleatorio, doble ciego con 122 pacientes (64 hombres y 58 mujeres) para comparar la eficacia de la droga cruda pulverizada con la tetraciclina para el tratamiento de la diarrea aguda (1).

Los pacientes fueron tratados con 500 mg de la droga cruda pulverizada (2 cápsulas de 250 mg cada una), o coincidiendo con las cápsulas de tetraciclina (2 cápsulas de 250 mg cada una) cada 6 horas por 3 días.

Los resultados del estudio demostraron que la droga pulverizada disminuyó la producción de heces, la ingesta de líquidos y la duración de la diarrea.

Las diferencias entre los resultados del grupo tratado con tetraciclina y el grupo que recibió la droga cruda pulverizada no fue estadísticamente significativa (1).

Reacciones adversas

Un informe de dermatitis alérgica se ha registrado después de la aplicación externa de un té preparado a partir de la droga cruda (1).

Contraindicaciones y advertencias

Hipersensibilidad o alergia a los componentes de la planta, obstrucción intestinal, deposiciones con sangre, diarrea persistente por más de tres días, menores de 12 años, embarazo, lactancia.

En caso de deshidratación es recomendable la rehidratación oral (34).

Peligros

No exceder la dosis recomendada o duración del tratamiento (1).

Precauciones

Carcinogénesis, mutagénesis, deterioro de la fertilidad

No se encontró información.

Embarazo: Efectos teratogénicos

No se encontró información.

Embarazo: Efectos no-teratogénicos

Debido a que no se cuenta con evidencia clínica suficiente para justificar su seguridad durante el embarazo, no se recomienda su uso (6).

Lactancia

Debido a que no se cuenta con evidencia clínica suficiente para justificar su seguridad durante la lactancia, no se recomienda su uso (6).

Uso en pediatría

Debido a la falta de datos sobre la seguridad, no se recomienda su uso en niños menores de 12 años (1)(6).

Otras precauciones

No se encontró información.

Forma de dosificación

Droga cruda, decocciones, extractos, té y tabletas (hojas).

Posología

(A menos que se indique lo contrario)

Como enjuague bucal: 15 mL del extracto acuoso tres veces al día durante al menos 1 minuto por sesión (1).

Para la diarrea: 500 mg de la hoja pulverizada tres o cuatro veces al día (1).

En la diarrea aguda no infecciosa: se recomienda una tableta tres veces al día durante 2 ó 3 días (6).

Como antiespasmódico y antiinflamatorio intestinal: se recomienda tomar una tableta tres veces al día, durante un mes (6).

Referencias

1. WHO Monographs on selected medicinal plants, Volume 4, pp. 127-139, 2009.

2. National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, MD (disponible en: http://www.ars-grin.gov/cgi-in/npgs/html/tax_search.pl?psidium+guajava).

3. E. Rivera, M. Chávez, M. Gattuso, X. Lozoya. La hoja de guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales. *Revista de Fitoterapia*; 3 (2): 101-111,2003.

4. A.M. Metwally, A.A. Omar, N.M. Ghazy, F.M. Harraz, S.M. El Sohafy. Monograph of Psidium guajava L. leaves. *Pharmacognosy Journal* Vol 3, pp 89-104, April 2011.

5. J.V. Kamath, N. Rahul, C.K. Ashok, S. Mohana, Psidium guajava L: A review, *International Journal of Green Pharmacy* (2:9-12), 2008.

6. Sala Especializada de Productos Naturales INVIMA, Acta No. 13 de 2010, numeral 3.1.23, pp 30-32

7. X. Lozoya et al. Quercetine glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Archives of Medical Research*, 25:11-15, 1994.

8. S. Kavimani et al. Anti-inflammatory activity of volatile oil of *Psidium guajava*. *Science of Life*, Vol.No.17 (4), pages 300-304, April 1998.

9. W.A. Colliere, The Antibiotic actions of plants, especially de higher plants, results with Indonesian plants. *Chronic of nature,*105:8-19, 1949.

10. H. El-Kadem, YS Mohammed, Constituents of the leaves of *Psidium guajava* L. Part II. Quercetin, avicularin and guajaberin, *J. Chem. Soc*.; 3320-3324,1958.

11. H. Egharevba, I. Hililla, N. Ibekwe, M. Abdullahi, S. Okwute, J. Okogun, Broad Spectrum Antimicrobial Activity of *Psidium guajava* Linn. Leaf. Nature and Science; (2010) 8(12): 43-50.

12. YA. Geidam, AG. Ambali, PA Onyeyili. Preliminary Phytochemical and Antibacterial Evaluation of Aqueous Extract of *Psidium guajava* Leaf.*Journal of Applied Sciences* 7 (4):511-514, 2007.

13. YA. Geidam, AG. Ambali, PA Onyeyili. Phytochemical Screening and Antibacterial Properties of Organic Solvent Fractions of *Psidium guajava* Aqueous Extracts. *International Journal of Pharmacology* 3 (1): 68-73, 2007.

14. H. Arima, G. Danno, Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation, *Biosci Biotechnol Biochem*; 66(8): 1727-1730,2002.

15. F.A. Goncalve, M.A. Neto, J.N.S. Becerra, A. Macrae, O. Viana de Sousa, A.A. Fonteles-Filho, R.M.S.F. Vieira, Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated (from seabob shrimp, Xiphopenaeus kroyeri (Heller), *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*50(1): 11-15,2008.

16. B. Joseph, M. Priya, In vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. Leaf essential oil and extracts using agar well diffusion method, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, Vol. 2, Issue 3. pp 28-32, 2010.

17. B. Joseph, R.M. Priya, Phytochemical and Biopharmaceutical aspects of *Psidium guajava* (L.) Essential oil: A Review, *Research Journal of Medicinal Plant*5 (4): 432-442, 2011.

18. AM. Metwally, AA. Omar, FM. Harraz, S.M. El Sohafy, Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. *Phcog Mag*; 6:212-218,2010.

19. AR. Fathilah, *Piper bettle* L. and *Psidium guajava* L. in oral health maintenance.*J of Medicinal Plants Research*; Vol. 5(2): 156-163, 2011.

20. AR. Fathilah, HAR Zubaidah. The anti-adherence effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to saliva-coated glass surfaces. *Journal of Oral Science* Vol 45, No. 4, 201-206, 2003.

21. G.R. Prabu, A. Gnanamani, S. Sadulla, Guaijaverin- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans. J. Appl Microbiol*.; 101(2): 487-495, 2006.

22. AR. Fathilah, ZHA. Rahim, Y. Othman, M. Yusoff, Bacteriostatic effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on dental plaque bacteria. *Pak J of Biological Sci*; 12 (6): 518-521,2009.

23. AR. Fathilah, et al, The effect of *Piper bettle* and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *Journal of Oral Science*48, 71-75, 2006.

24. AR. Fathilah, M. Yusoff, ZHA. Rahim, The effect of *Psidium guajava* and *Piper bettle* extracts on the morphology of dental plaque bacteria. *Pak J Med Sci*; 25(6): 928-933,2009.

25. RM. Pérez, S. Mitchell, RV. Solis. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 1-27, 2008.

26. M. T. Chomnawang, S. Surassmo, V.S. Nukoolkarn, W. Gritsanapan. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005.

27. N. Sanches, D. Garcia, M. Schiavini, C. Vataru, B. Dias, An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* (L.). *Brazilian archives of Biology and Technology*, () Vol. 48 n. 3: pp. 429-436, 2005.

28. E. Muhammad, The use of *Psidium guajava* Linn. in treating wound, skin and soft tissue infections. *Scientific Research and Essay* Vol. 4 (6) pp. 605-611, June, 2009.

29. M. Troncoso, S. Gajardo, J. Benites, J. López, M. Rojas. *Mangifera indica* y *Psidium guayava*: determinación de la actividad antimicrobiana de las cáscaras liofilizadas en la formulación de una loción hidroalcohólica para el acné. BIOFARBO, 18 (2),1-9, Diciembre 2010.

30. F. Qa`dan, A. Thewaini, D. Ali, R. Afifi, A. Elkhawad, K. Maltaka, The Antimicrobial Activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to Acne-developing organisms. *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 33, No. 2, 197-204, 2005.

31. H. Qian, V. Nihorimbere. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University Science*, , 5:676-683, 2004.

32. K. Nakagawa, M. Kaawagoe, M. Yoshimura, H. Arata, T. Minamikawa, M. Nakamura, A. Matsumoto. Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generators in hepatic lysosomal fractions. *Journal of Health Science*; 46: 509-512, 2000.

33. EA. Conde Garcia, VT. Nascimento, AB. Santiago Santos. Inotropic effects of extracts of *Psidium guajava L*. (guava) leaves on the guinea pig atrium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36:661–668, 2003.

34. Sala Especializada de Productos Naturales INVIMA, Acta No. 02 de 2012, numeral 3.1.3, pp 5-7

Bibliografía

1. C. De La Rosa, R. Marquez, R. Comas, A. Acosta, Acción repelente y/o insecticida de los extractos de las hojas de *Calotropis procera, El Caribe las Ciencias Básicas e Ingeniería.* 99-113, 2008.

2. F. Cabieses. Apuntes de Medicina Tradicional. La racionalización de lo irracional. Perú210-211, 1993.

3. O. Kunle, H. Egharevba, P. Ahmadu, Standardization of Herbal medicines – A review, *International Journal of Biodiversity and Conservation*, Vol. 4(3), pp 101-112, 2012.

4. E. Osorio, Aspectos Básicos de Farmacognosia, Facultad de Química Farmacéutica Universidad de Antioquia, pp.30-31, 60-61, 2009.

5. A. De Andrés, Cosmética Natural. URL: http://www.talleramapola.com 2004.

6. Z. Draelos, L. Thaman. Cosmetic formulations of skin care products, *Cosmetics Science and Technologies Series*, Vol. 30, pp 300-302, 2006.

7. D. Chanchal, S. Swarnlata, Novel approaches in Herbal Cosmetics, *Journal of Cosmetics Dermatology*, 7, 89-95, 2008.

8. Aburjai T, Natsheh FM, Plants used in cosmetics. Phytother Res.17(9):987-1000, Nov. 2003.

9. Curelea A., Bolcu C. Natural Extracts Utilized in Cosmetology and Pharmacology. Annals of West University of Timisoara. Series Chemistry 14 (2): 199-204, 2005.

10. Cáceres A. Actividad antioxidante de plantas de uso popular en Guatemala y su potencial aplicación en la industria de fitoterápicos, alimentos y cosméticos. IV Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas con énfasis en cosmética natural. Palmira, Colombia, 2010.

11. Mitsui T. New Cosmetic Science Edited By Takeo Mitsui. Amsterdam. ELSEVIER. 522 p, 1998.

12. Palombo EA. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity Against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. eCAM; 1-15, 2009.

13. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. Bull World Health Organ;83:661-9, 2005.

14. Maltz M., Jardim JJ., Alves LS. Health promotion and dental caries. Braz Oral Res;18 24 (Spec Iss 1):18-25, 2010.

15. Ayer J, Burrows N. Acne: more than skin deep. Postgrad Med J;82:500-506. doi: 10.1136/pgmj.2006.045377, 2006.

16. James, WD. Acne. N Engl J Med 2005; 352:1463-1472. April 7, 2005.

17. Webster GF. Acne vulgaris. BMJ. Aug 31;325(7362):475-9, 2002.

18. W. Wade, Hallan nuevos tipos de bacterias en la boca humana Instituto Dental del King's College, 2010.

19. Toyoda, What causes acne, *The Science of Acne,* 2010.

20. A. Sartoratto, A.L.M. Machado, C. Delarmelina, G.M. Figueroa, M.C.T. Duarte, V.L.G. Rehder, Composition and Antimicrobial activity of essential oils from Aromatic plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*35:275-280, 2004.

21. R.R. Watson, V.R. Preedy, Botanical Medicine in Clinical Practice, CAB International pp. 141-174*,* 2008.

22. L. Barreto, M. Costa, J. De Arango, K. Chagas, K. Costa, Acción antimicrobiana *in vitro* de dentífricos conteniendo fitoterápicos, *Avances en Odontoestomatologìa* Vol. 21. Núm. 4. pp 195-201, 2005

23. H. Valdizan, A. Maldonado, "La medicina popular Peruana"*.* Imprenta Torres Aguirre, Lima,Tomo II, 1992.

24. C.R. Morales, “Efecto de extractos con actividad antifúngica sobre protoplastos de *Neurospora crassa.”,* Tesis de Grado, Universidad de San Carlos de Guatemala, pp. 7-9, 1998.

25. E. Rivera-Arce, M.A. Chávez-Soto, M. Gattuso, X. Lozoya Legorreta, La hoja de guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales, *Revista de Fitoterapia;* 3 (2): 101-111, 2003.

26. J.V. Kamath, N. Rahul, C.K. Ashok, S. Mohana, *Psidium guajava* L: A review, International Journal of Green Pharmacy; 2:9-12, 2008

27. W.A. Colliere, The Antibiotic actions of plants, especially de higher plants, results with Indonesian plants. Chronic of nature 105:8-19, 1949.

28. H. El-Kadem, YS Mohammed, Constituents of the leaves of *Psidium guajava* L. Part II. Quercetin, avicularin and guajaberin, *J. Chem*. *Soc*; 3320-3324, 1958.

29. H. Egharevba, I. Hililla, N. Ibekwe, M. Abdullahi, S. Okwute, J.Okogun, Broad Spectrum Antimicrobial Activity of *Psidium guajava Linn.*Leaf.*Nature and Science;* 8(12): 43-50, 2010.

30. YA. Geidam, AG. Ambali, PA Onyeyili. Preliminary Phytochemical and Antibacterial Evaluation of Aqueous Extract of *Psidium guajava* Leaf. Journal of Applied Sciences 7 (4): 511-514, 2007.

31. YA. Geidam, AG. Ambali, PA Onyeyili. Phytochemical Screening and Antibacterial Properties of Organic Solvent Fractions of *Psidium guajava* Aqueous Extracts. International Journal of Pharmacology 3(1): 68-73, 2007.

32. H. Arima, G. Danno, Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation, *Biosci Biotechnol Biochem,*66(8): 1727-1730, 2002.

33. F.A. Goncalve, M.A. Neto, J.N.S. Becerra, A. Macrae, O. Viana de Sousa, A.A. Fonteles-Filho, R.M.S.F. Vieira, Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated (from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller), *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*50(1): 11-15, 2008.

34. B. Joseph, M. Priya, In vitro antimicrobial activity of *Psidium Guajava* L. Leaf essential oil and extracts using agar well diffusion method, *International Journal of Current Pharmaceutical Research,* Vol. 2, Issue 3. pp 28-32, 2010.

35. B. Joseph, R.M. Priya, Phytochemical and Biopharmaceutical aspects of *Psidium guajava* (L.) Essential oil: A Review, *Research Journal of Medicinal Plant* 5 (4): 432-442, 2011.

36. AM. Metwally, AA. Omar, FM. Harraz, S.M. El Sohafy, Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L*.* leaves. *Phcog Mag;* 6:212-218, 2010*.*

37. AR. Fathilah, *Piper bettle*L. and *Psidium guajava* L. in oral health maintenance. J of Medicinal Plants Research; Vol. 5(2): 156-163, 2011.

38. AR. Fathilah, HAR Zubaidah. The anti-adherence effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to saliva-coated glass surfaces. Journal of Oral Science Vol 45, No. 4, 201-206, 2003.

39. G.R. Prabu, A. Gnanamani, S. Sadulla, Guaijaverin- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J. Appl Microbiol;* 101(2): 487-495, 2006.

40. AR. Fathilah, ZHA. Rahim, Y. Othman, M. Yusoff, Bacteriostatic effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on dental plaque bacteria*. Pak J of Biological Sci;* 12 (6): 518-521, 2009.

41. AR. Fathilah, et al, The effect of *Piper bettle* and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *Journal of Oral Science* 48, 71-75, 2006.

42. AR. Fathilah, M. Yusoff, ZHA. Rahim, The effect of *Psidium guajava* and *Piper bettle* extracts on the morphology of dental plaque bacteria*. Pak J Med Sci;* 25(6): 928-933, 2009.

43. RM. Pérez, S. Mitchell, RV. Solis. *Psidium guajava:* A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology 117 1-27, 2008.

44. M. T. Chomnawang, S. Surassmo, V.S. Nukoolkarn, W. Gritsanapan. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. Journal of Ethnopharmacology, 2005.

45. N. Sanches, D. Garcia, M. Schiavini, C. Vataru, B.Dias, An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava (L.). Brazilian archives of Biology and Technology,* Vol. 48 n. 3: pp. 429-436, 2005.

46. E. Muhammad, The use of *Psidium guajava* Linn. in treating wound, skin and soft tissue infections. Scientific Research and Essay, Vol. 4 (6) pp. 605-611, June, 2009.

47. M. Troncoso, S. Gajardo, J. Benites, J. López, M. Rojas. *Mangifera indica* y *Psidium guayava:* determinación de la actividad antimicrobiana de las cáscaras liofilizadas en la formulación de una loción hidroalcohólica para el acné. BIOFARBO, 18 (2),1-9 Diciembre 2010.

48. F. Qa`dan, A. Thewaini, D. Ali, R. Afifi, A. Elkhawad, K. Maltaka, The Antimicrobial Activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to Acne-developing organisms*. The American Journal of Chinese Medicine,* Vol. 33, No. 2, 197-204, 2005.

49. World Health Organization. **Quality Control Methods for Herbal Material**. Geneva: WHO. pp 9-21, 2011.

50. The United States Pharmacopeia Convention “USP 35 NF 30”, 2011.

51. World Health Organization. **Quality Control Methods for Herbal Material**. Geneva : WHO. pp 29-31, 2011.

52. World Health Organization. **Monographs on selected medicinal plants.** Volume 4. pp 127-139, 2009.

53. M. Liviu AL, D. Daniel, A. Moise, O. Bobis, L. Laslo, S. Bogdanov. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry* 112 863-867, 2009.

54. AM. Metwally, AA. Omar, NM. Ghazy, FM. Harraz, S.M. El Sohafy, Monograph of *Psidium guajava* L. leaves.*Phcog J;* Vol 3 Issue 21. pp 89-104, April 2011.

55. M. Kaneria, S. Chanda. Phytochemical and pharmacognostic evaluation of leaves of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). *Pharmacognosy Journal;* Vol 3 issue 23, pp 41-45, July 2011.

56. M. Vidaurre, L. Querevalú, E. De los Rios, S. Ruiz. Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia. Rev. Med. Vallejiana; Vol 4 No. 2. Pp 127*

57. A. Vikrant, T. Narender, C.P. Kashyap, Preliminary Analysis of the Extracts of Psidium Leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry:* Vol. 1 No. 1 2012.

58. M. Miranda, Métodos de análisis de drogas y extractos; Universidad de la Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos; pp 10-13, 37-38, 2002.

59. A. Martínez, Flavonoides; Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia; pp 16, Septiembre 2005.

60. N. Sharapin, L. Machado, E. Carvalho, E. Santos, E. Albuquerque, J. Almeida Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello : CYTED; 2000.

61. F. Perez. Tesis Caracterización de extractos farmacéuticos de cuatro árboles de uso medicinal en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, Septiembre de 2005.

62. H. Wagner, S. Bladt. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Second edition 2001; pp 197

63. S. Jayakumari, J. Anbu, V. Ravichandiran, S. Nithya, Ashwini Anjana and D. Sudharani. Evaluation of toothache activity of methanolic extract and its various fractions from the leaves *Psidium guajava* Linn. School of Pharmaceutical Sciences, India. Vol 3/ Issue 2/ April – June 2012.

64. S. M. Hassan, A. A. Al Aqil, M. Attimarad. Determination of crude saponin and total flavonoids content in guar meal. *Advancement in Medicinal Plant Research* Vol. 1(1), pp. 24-28, February 2013.

65. J. Chetia, S. Upadhyaya, D.K. Bora y L.R. Saikia. Phenolic content, anti-oxidant and antimicrobial activity and nutritive value of Young twig of *Psidium guagava* Linn. From Dibrugarh, Assam. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 6, Suppl 2, 2014.

66. A. A. El Bedawey, E. H. Mansour, M. S. Zaky, Amal A. Hassan. Characteristics of Antioxidant Isolated from Some Plant Sources. *Food and Nutrition Sciences*, 1, 5-12, 2010,

67. B. Biswas, K. Rogers, F. Mclaughlin, D. Daniels, A. Yadav. Antimicrobial activities of leaf extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on two gram negative and gram positive bacteria. *International Journal of Microbiology ,* pp 5; 2013

68. O.F. Kunle, H.O. Egharevba. Preliminary studies on *Vernonia ambigua:* phytochemistry and antimicrobial Screening of the whole plant. *Ethnobotanical Leaftles,* 13: 1216-21, 2009.

69. B. Biswas, K. Rogers, F. McLaughlin, D. Daniels, and A. Yadav. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava *(Psidium guajava L.)* on Two Gram-negative and Gram-positive bacteria International Journal of Microbiology Volume 2013, Article ID 746165, 7 pages.