

ARTÍCULO ORIGINAL

Composición fenólica y actividad antioxidante de las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied

Lic. Yolexis Sánchez Carrillo¹ , Dra. C. María Elisa Jorge Rodríguez² , Lic. Yumara Pozo Balmaseda¹ , Lic. Nadiachy Díaz León¹ , Dra. Migdalia Rodríguez Rivas³ , Dr. Pedro Sánchez Freire⁴ 

¹Empresa Provincial de Farmacias y Ópticas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

²Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

³Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

⁴Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

RESUMEN

Introducción: las plantas medicinales son una fuente importante de antioxidantes.

Objetivo: determinar la composición fenólica y la actividad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. **Método:** se realizó un estudio experimental preclínico con el objetivo de evaluar, desde el punto de vista toxicológico y farmacológico, extractos de las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. Se analizó cualitativamente la composición química de los extractos metanólico y en acetato de etilo, se determinó el contenido de fenoles, flavonoides y taninos. Se evaluó *in vitro* la actividad antioxidante mediante los ensayos: secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo, capacidad antioxidante total, actividad quelante, poder reductor/antioxidante férrico y método del tiocianato férrico. Se evaluó la actividad antioxidante *ex vivo* al inducir la peroxidación lipídica en ratas Wistar. **Resultados:** los fenoles, los flavonoides y los taninos fueron los principales metabolitos identificados. El extracto metanólico mostró mayor valor de compuestos fenólicos y de flavonoides. Los extractos mostraron actividad antioxidante *in vitro*, el metanólico es el de mejores resultados. La evaluación *ex vivo* del extracto mostró disminución de las concentraciones de malonildialdehído e inhibición de la peroxidación lipídica en todas las dosis estudiadas con un comportamiento dosis dependiente. **Conclusiones:** el extracto metanólico de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied muestra actividad antioxidante *in vitro* y *ex vivo*, tributan a ello sus compuestos fenólicos.

Palabras clave: antioxidante; plantas medicinales; extractos vegetales; composición

ABSTRACT

Introduction: medicinal plants are an important source of antioxidants. **Objective:** to determine the phenolic composition and antioxidant activity of extracts obtained from the leaves of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. **Method:** a preclinical experimental study was carried out with the aim of evaluating, from a toxicological and pharmacological point of view, extracts of the leaves of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. The chemical composition of the methanolic and ethyl acetate extracts was qualitatively analyzed, the content of phenols, flavonoids and tannins was determined. The antioxidant activity was evaluated *in vitro* by means of the following assays: 2,2-

diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical sequestration, total antioxidant capacity, chelating activity, ferric reducing/antioxidant power and ferric thiocyanate method. *Ex vivo* antioxidant activity was evaluated by inducing lipid peroxidation in Wistar rats. **Results:** phenols, flavonoids and tannins were the main metabolites identified. The methanolic extract showed higher value of phenolic compounds and flavonoids. The extracts showed antioxidant activity *in vitro*, the methanolic is the one with best results. *Ex vivo* evaluation of the extract showed decrease in malondialdehyde concentrations and inhibition of lipid peroxidation in all doses studied with dose-dependent behavior. **Conclusions:** the methanolic extract of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied shows *in vitro* and *ex vivo* antioxidant activity; its phenolic compounds are linked to it. **Key words:** antioxidants; plants, medicinal; plant extracts; composition

INTRODUCCIÓN

Los medicamentos herbarios formaron la base de la terapéutica desde los primeros días de la humanidad y se utilizan ampliamente pues cada día aumenta el reconocimiento de sus valores clínico, farmacéutico y económico; esto varía ampliamente entre un país y otro.

A pesar de que los medicamentos herbarios se han usado durante muchos siglos, solo una cantidad relativamente pequeña de especies de plantas se ha estudiado por sus posibles aplicaciones medicinales. Se dispone de datos sobre la seguridad y la eficacia de un número aún menor de plantas, de sus extractos y de los principios activos y de las preparaciones que las contienen.⁽¹⁾

La Organización Mundial de la Salud estructuró en 1985 un Programa de Medicina Tradicional Herbolaria y reconoció la existencia de 119 sustancias químicas de origen vegetal que pueden considerarse fármacos importantes, útiles en más de 60 categorías terapéuticas, y obtenidas principalmente de 91 especies.⁽²⁾ El Ministerio de Salud Pública de Cuba tiene establecido un Programa de Investigaciones de Medicina Tradicional, que fue aprobado en 1986, para estudiar las plantas medicinales más utilizadas por la población y evaluar científicamente sus efectos farmacológicos y tóxicos. Esto ha permitido incorporar a la llamada medicina moderna los métodos medicinales tradicionales con verdadera efectividad y ganar prestigio en la práctica médica actual al dar respuesta a las necesidades farmacoterapéuticas que responden a la situación de salud del país.

El estado redox celular ha sido reconocido, de forma cada vez más creciente, como un componente crítico de enfermedades y respuestas celulares inducidas por el estrés. Inherente a estas respuestas está la generación de especies reactivas de oxígeno, las que provocan un daño celular directo además de actuar como segundos mensajeros intracelulares al modular las vías de transducción de señales.⁽³⁾

El desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidantes conlleva a modificaciones químicas de macromoléculas de relevancia biológica: ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, lípidos y carbohidratos. Este desbalance se asocia a mecanismos fisiopatológicos para la iniciación y el desarrollo de enfermedades de notable morbilidad y mortalidad.

Los antioxidantes permiten retrasar, prevenir o eliminar el daño oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno⁽⁴⁾ sobre las macromoléculas

citadas; una gran fuente de antioxidantes son las plantas medicinales. De manera particular se destaca la familia *myrtaceae* porque sus especies, por lo general, se caracterizan por una rica composición de compuestos fenólicos que se asocian a la actividad antioxidante comprobada en algunas de ellas;^(5,6) sin embargo, pocas especies del género *Psidium* de esta familia han sido estudiadas con esta finalidad. *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied, conocida como guayaba ácida, guayaba agria, guayabo de monte o guayaba de fresco es una de las especies no estudiadas. El Ministerio de la Agricultura en Cuba extiende y propaga su cultivo en el país por su resistencia a plagas y enfermedades,⁽⁷⁾ por lo que resulta factible el aprovechamiento de su potencial con fines medicinales.

Las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied no poseen estudios científicos informados que permitan justificar su uso farmacéutico en la medicina tradicional cubana. Estudios que permitan conocer el rendimiento, la composición y la actividad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied serían un aporte importante a la información necesaria para proponer su uso en la medicina tradicional cubana. Este trabajo tiene el objetivo de determinar la composición fenólica y la actividad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied.

MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental preclínico en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química-Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV) de la Ciudad de Santa Clara, Provincia de Villa Clara, en el período comprendido entre los meses de enero y junio de 2015. La realización del estudio se llevó a cabo en tres etapas:

- 1- Obtención del material vegetal y determinación del contenido fenólico
- 2- Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante
- 3- Evaluación *ex vivo* de la actividad antioxidante.

Las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied fueron recolectadas en horas de la mañana en el Jardín Botánico de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, identificadas taxonómicamente y comparadas con la muestra correspondiente a la serie UCLV 10874 del Herbario "Dr. Alberto Alonso Triana" (ULV) del mismo centro de estudios. El material fue sometido a un proceso de lavado con abundante agua potable y secado en la estufa a 38°C y, posteriormente, fue triturado con un molino de cuchillas, con un tamiz de talla 3mm, a 4 750rpm.

1- Obtención del material vegetal y determinación del contenido fenólico

Los extractos metanólico y en acetato de etilo de las hojas de la planta se obtuvieron con el empleo de 10g de material vegetal seco y pulverizado al que se adicionaron 100ml del solvente, en cada caso, fueron colocados en un agitador a temperatura ambiente y se realizaron separadamente dos extracciones.

Se evaluó cualitativamente la composición química de los extractos, se siguió la técnica para el tamizaje fitoquímico establecida por Miranda.⁽⁸⁾ Se realizaron los

ensayos para los principales grupos de metabolitos y, en cada caso, se ensayaron tres réplicas.

El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied se determinó al emplear el reactivo de Folin-Ciocalteu, según el método de Nurmi,⁽⁹⁾ y utilizar ácido gálico como compuesto fenólico de referencia.

2- Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante

Se evaluó a través de:

Secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (ensayo DPPH)

Procedimiento: a 3ml de la disolución de DPPH -0,004% (peso/volumen)- se le adicionó 1ml de cada muestra evaluada. Después se colocaron durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517nm frente a un blanco (con todos los reactivos menos la muestra). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

- Se calculó el por ciento de inhibición de la formación del radical libre DPPH; se utilizó la expresión:

Por ciento de inhibición de la formación del radical libre

$$\text{DPPH}\bullet = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

donde:

A_{DPPH} : absorbancia del control (contiene todos los reactivos excepto la muestra)

A_{S} : absorbancia de la muestra

Se calculó el valor de IC_{50} (concentración de muestra que se requiere para reducir el 50% de los radicales libres) para cada muestra utilizando la ecuación de regresión obtenida a partir de concentraciones de extractos y de sustancias de referencia y el por ciento de inhibición de la formación del radical libre DPPH.

- Capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total se determinó por el ensayo de molibdato de amonio según el método de Umamaheswari;⁽¹⁰⁾ se utilizó ácido ascórbico como sustancia de referencia.

Procedimiento: se tomaron 300 μ l de cada extracto (metanólico y en acetato de etilo), por separado, y se adicionaron 3ml de la mezcla de los siguientes reactivos: 1ml de ácido sulfúrico 0,6M, 1ml de fosfato de sodio 28mM y 1ml de molibdato de amonio 4mM. Las muestras se calentaron durante 90 minutos a 95°C, se enfriaron y se midió la absorbancia a 695nm; se utilizó como blanco una solución preparada y se siguió el mismo procedimiento sin la muestra.

La capacidad antioxidante total de cada extracto se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración de ácido ascórbico y se expresó como miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de extracto seco.

- Determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP)

La determinación del FRAP de los dos extractos evaluados fue determinado por el método del 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), según el método de Benzie y Strain;⁽¹¹⁾ se utilizó sulfato ferroso como sustancia de referencia.

Procedimiento: se toman 100µl de cada muestra y se le adicionan 1,9ml del reactivo FRAP. Transcurridos cinco minutos se realiza la lectura a 593nm.

- Determinación de la actividad quelante

Para estimar la actividad quelante en el ion ferroso de los extractos fue usado el método descrito por Dinis y colaboradores⁽¹²⁾ con algunas modificaciones: 0,2ml de cada extracto y la sustancia de referencia (concentración 50µg/ml) fueron mezclados con 0,1 y 0,2ml de ferrozina (5mM). Se completó el volumen con 2ml de etanol. La mezcla fue dejada en reposo 10 minutos a temperatura ambiente y se procedió a leer la absorbancia a 562nm. El agua ultrapura que sustituía la ferrozina fue usada como blanco y sustituyó el extracto como control. El ácido etilendiaminotetracético disódico (EDTA-Na₂) constituyó la sustancia de referencia.

La solución de ferrozina (sal sódica del ácido 3-[2-Piridil]-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4,4'-disulfónico) de 5mM fue preparada en agua ultrapura, almacenada a temperatura ambiente y protegida de la luz. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

La habilidad de la muestra para quelar el ion ferroso fue calculada relativa al control (que incluye solo al FeSO₄ y la ferrozina) a través de la siguiente fórmula:

habilidad quelante del ion ferroso (%) = $[(\text{Abs control} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs control}] \times 100$

- Método del tiocianato férrico

La actividad antioxidante determinada por el método del tiocianato férrico fue realizada considerando el ensayo propuesto por Haraguchi.⁽¹³⁾

Procedimiento: cada muestra fue colocada en un medio de reacción con la siguiente composición: 0,04ml de disolución A de cada muestra, 0,4ml de ácido linoleico al 2,5%, 0,8ml de buffer fosfato 0,04M, pH=7 y 0,38ml de agua destilada. Las muestras fueron incubadas a 40°C en la oscuridad. La disolución de ácido linoleico se empleó como control negativo.

Se realizó una determinación espectrofotométrica de cada muestra cada 24 horas durante cinco días y se siguió el siguiente procedimiento: se tomó 0,05ml de cada muestra, se diluyó con 2,85ml de etanol al 75% y se adicionó 0,05ml de cloruro de hierro (II) 0,02M en ácido clorhídrico al 3,5%. Se esperaron tres minutos y se añadió 0,05ml de tiocianato de amonio al 30%. Se midió la absorbancia a 500nm y se empleó etanol al 75% como blanco hasta alcanzar un valor de absorbancia máximo para el patrón utilizado.

3- Evaluación *ex vivo* de la actividad antioxidante

La evaluación *ex vivo* de la actividad antioxidante se realizó al considerar el fundamento del método descrito por Ohkawa,⁽¹⁴⁾ en el que reacciona el ácido 2-tiobarbitúrico con el malondialdehído, uno de los principales productos generados de la peroxidación lipídica experimentalmente inducida tras el daño provocado por la administración de tetracloruro de carbono.⁽¹⁵⁾

Modelo biológico: se emplearon ratas machos, de la línea Wistar, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB) con su correspondiente Certificado de Calidad.

Procedimiento experimental: las ratas fueron divididas aleatoriamente en seis grupos de seis animales, se conformaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo I: cloruro de sodio 0,9%, 10ml/kg (peso vivo -pv-)

Grupo II: cloruro de sodio 0,9%, 10ml/kg (pv)

Grupo III: α -Tocoferol (vitamina E), 50mg/kg (pv)

Grupo IV: extracto de *Psidium friedrichsthalianum*, 200mg/kg (pv)

Grupo V: extracto *Psidium friedrichsthalianum*, 400mg/kg (pv)

Grupo VI: extracto *Psidium friedrichsthalianum*, 800mg/kg (pv)

Las sustancias ensayadas fueron administradas durante siete días por vía oral mediante una sonda intragástrica 16G con ayuno previo de 12 horas. El séptimo día del ensayo se administró, pasados 60 minutos de la administración de las sustancias ensayadas, el inductor de la peroxidación lipídica: tetracloruro de carbono/aceite de oliva (1:1) en una dosis de 1ml/kg (pv) por vía intraperitoneal a los animales que conformaron los grupos del II al VI. Pasadas 24 horas de la administración del inductor de la peroxidación lipídica se procedió al sacrificio de los animales previa anestesia con halotano y posterior dislocación cervical (se cumplió con los procedimientos internacionales bioéticos establecidos al efecto).

Se procedió a la disección del animal y se extrajo el hígado, se lavó con solución buffer fosfato 50mM y fue troceado. Se homogenizó el tejido hepático (50mg tejido/ml) con solución buffer fosfato 50mM, pH 7,4. Los homogenados de tejido fueron sonicados durante 10 segundos (tres veces con intervalos de 20 segundos) y, posteriormente, fueron centrifugados durante 20 minutos a 5 500rpm a una temperatura de 5°C. El sobrenadante constituyó la muestra a analizar, se tomaron 0,14ml del mismo (tres replicas por cada muestra biológica) y se adicionaron en el orden que sigue los siguientes reactivos: 1ml de ácido fosfórico al 1%, 33 μ L de butilhidroxitolueno al 0,01% y 0,3ml de ácido 2-tiobarbitúrico al 0,6%. Fue preparado un blanco con los mismos reactivos, pero en lugar de la muestra se añadió 0,14ml de solución buffer fosfato 50mM, pH 7,4. Los tubos de ensayo con la mezcla de muestra y los reactivos fueron introducidos en un baño de recirculación de agua a 100°C durante 45 minutos, posteriormente la reacción fue detenida al introducir los tubos de ensayo en frío. A cada tubo se le añadió 1,4ml de n-butanol, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron por 15 minutos a 4 000rpm a una temperatura de 5°C. Pasado un minuto después de la centrifugación fue tomada la fase orgánica y se leyó la absorbancia a 535nm.

Los resultados se expresaron en concentración de malonildialdehído (MDA):

$$\mu\text{M MDA/g tej.} = \frac{10(A - b)}{m(g) \cdot a}$$

donde: A=absorbancia

a=pendiente de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración

b=intercepto de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración

m=masa de tejido expresada en gramos

10=factor de dilución

El por ciento de inhibición de la peroxidación lipídica fue determinado a través de la expresión:

$$\text{Inhibición de la peroxidación lipídica (\%)} = \frac{Ac - Am}{Ac} \cdot 100$$

donde:

Ac=absorbancia del grupo control (II)

Am=absorbancia de la muestra

Todos los investigadores respetaron los principios éticos que rigen la experimentación animal, garantizaron su bienestar y su protección y cumplieron con las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas. Los estudios se realizaron cumpliendo las guías de buenas prácticas para el cuidado y el uso de animales de laboratorio.⁽¹⁶⁾

Análisis estadístico: los resultados fueron expresados como por cientos o valores medios con su desviación estándar. Se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 11.5 para Windows. La comparación entre los grupos se realizó mediante técnicas no paramétricas, se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney y de Friedman, con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Etapa 1: obtención del material vegetal y determinación del contenido fenólico

El tamizaje fitoquímico del extracto metanólico y en acetato de etilo de las hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied permitió evaluar cualitativamente la composición de la planta en estudio (tabla 1).

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico y en acetato de etilo de hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied

Ensayo	Metabolito	Extracto metanólico	Extracto acetato de etilo
Dragendorff	Alcaloides	++	++
Sudán	Ácidos grasos	+	+
Baljet A-B	Coumarinas	++	++
Resinas	Resinas	-	-
Espuma	Saponinas	+	-
Kedde A-B	Glicósidos cardiotónicos	-	-
Cloruro férrico	Fenoles y taninos (o ambos)	++	++
Shinoda	Flavonoides	++	++
Liebermann-Buchard	Triterpenos y esteroides (o ambos)	+	+
Fehling A-B	Azúcares reductores	+	+
Bortrager	Quinonas	+	-
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-	-

Leyenda: ++ (ensayo muy positivo), + (ensayo positivo), - (ensayo negativo)

Fuente: Registro de datos primarios

Los resultados de la determinación de compuestos fenólicos para los extractos metanólico y en acetato de etilo de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Contenido total de compuestos fenólicos del extracto metanólico y en acetato de etilo de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied

Compuestos fenólicos	Extracto metanólico	Extracto acetato de etilo
Contenido total (mgEAG/gES)	527,56	21,89

Fuente: Registro de datos primarios

Etapa 2: evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante

Los valores de IC₅₀ obtenidos para las muestras evaluadas aparecen descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Actividad secuestradora del radical DPPH• de los patrones y extractos de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied en el ensayo DPPH

Muestras	Concentraciones (µg/mL)	Efecto secuestrador (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
α-tocoferol (vitamina E)	2	18,77	5,6
	4	34,78	
	6	53,02	
	8	72,22	
	10	87,06	
Rutina	5	40,26	10,29
	10	50,90	
	15	55,19	
Quercetina	20	70,58	4,6
	2,5	36,22	
	5	53,95	
	7,5	67,52	
Extracto metanólico de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	10	83,01	44,3
	12,5	94,66	
	25	36,45	
	50	55,68	
	75	69,34	
Extracto acetato de etilo de <i>Psidium friedrichsthalianum</i>	100	81,31	295,05
	125	90,50	
	125	33,85	
	250	47,00	
	375	57,02	
	500	69,74	
	625	78,07	

Fuente: Registro de datos primarios

El extracto metanólico mostró una actividad antioxidante total cuatro veces superior a la del extracto en acetato de etilo, con un valor de 18,48mg equivalentes de ácido ascórbico/g de extracto. La actividad antioxidante total del

extracto en acetato de etilo fue de 4,756mg equivalentes de ácido ascórbico/g de extracto.

La determinación del poder reductor/antioxidante férrico mostró los mejores resultados para el extracto metanólico, para el que se obtuvieron valores tres veces superiores al extracto de acetato de etilo (figura 1).

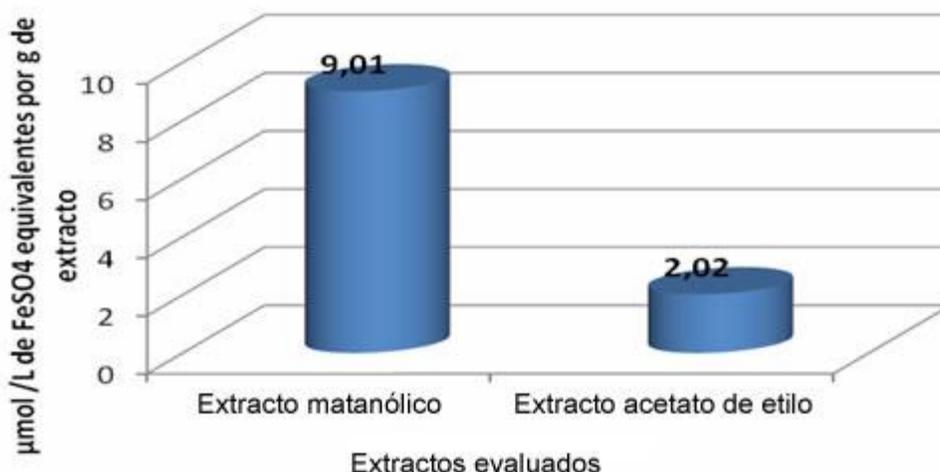


Figura 1. Resultados del comportamiento del poder reductor/antioxidante para los extractos evaluados

El extracto metanólico mostró un por ciento de actividad quelante similar al EDTA (patrón), mientras que el extracto de acetato de etilo es tres veces inferior (figura 2).

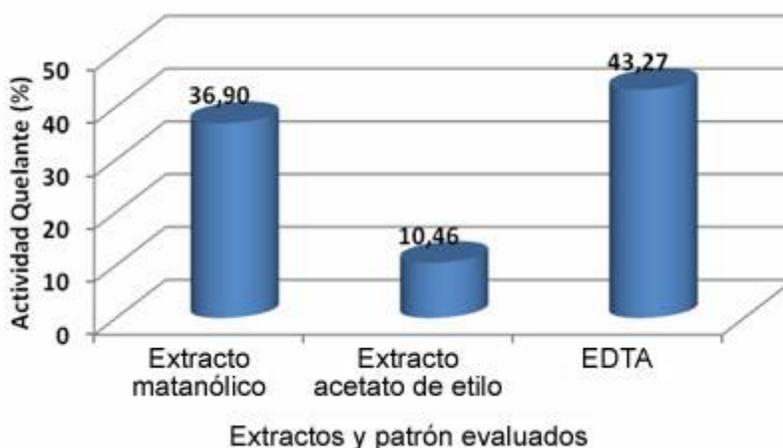


Figura 2. Resultados del comportamiento de la actividad quelante evaluada para los extractos estudiados

Con el método del tiocianato férrico los extractos evaluados mostraron valores disminuidos de absorbancia en relación al ácido linoleico (control), a las 96 horas del estudio el extracto metanólico mostró mejor comportamiento antioxidante al compararlo con el extracto en acetato de etilo (figura 3).

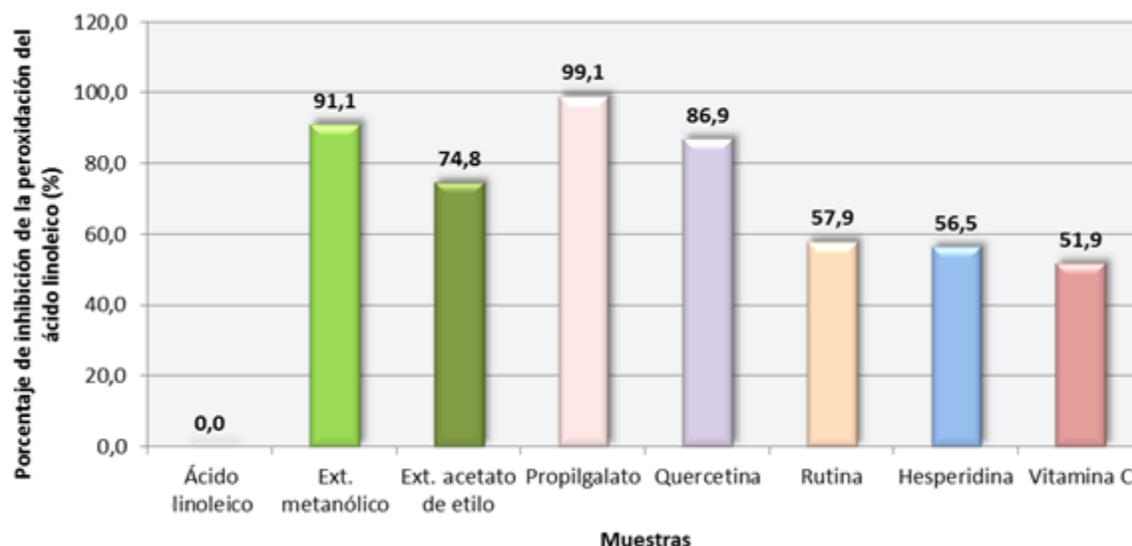


Figura 3. Por ciento de inhibición de la peroxidación del ácido linoleico por los antioxidantes patrones y extractos de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied en el método del tiocianato férrico

Etapa 3: evaluación *ex vivo* de la actividad antioxidante

La tabla 4 muestra los valores de concentración de malondialdehído de cada grupo experimental.

Tabla 4. Valores de concentración de malondialdehído en los grupos experimentales (media aritmética±desviación estándar, n=6)

Grupo experimental	Concentración MDA (μM /g de tejido)
I	44,35±6,39
II	242,76±17,24
III	142,20±37,92a
IV	196,98±7,12a,b
V	144,98±16,77a
VI	83,64±10,81a,b

Prueba de Mann-Whitney

a- diferencia significativa respecto al control negativo (Grupo II: cloruro de sodio) ($p < 0,05$)

b- diferencia significativa respecto al control positivo (vitamina E) ($p < 0,05$)

Fuente: Registro de datos primarios

DISCUSIÓN

Los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto metanólico y en acetato de etilo de hojas de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied ofrecen una visión cualitativa de la composición química de la planta estudiada y no pueden considerarse como un resultado concluyente porque la presencia o la ausencia de un metabolito está influenciada por varios factores como por ejemplo: la época de recolección, el tipo de secado y la conservación (o ambos), el estado vegetativo

de la planta, la solubilidad en el solvente empleado y la interferencia de otros metabolitos, entre otros.⁽⁸⁾

No se informan estudios sobre la composición cualitativa de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. En el presente trabajo se identificó, de forma acentuada, en ambos extractos, la presencia de fenoles y taninos (o ambos), de flavonoides y alcaloides y de metabolitos a los que se les atribuye parte de la responsabilidad de las propiedades antioxidantes de las plantas medicinales.⁽¹⁷⁾ También fueron identificados coumarinas, ácidos grasos, triterpenos y esteroides (o ambos), entre otros; se pueden asociar a otras propiedades medicinales que este género de *Psidium* puede manifestar.⁽¹⁸⁾

Los resultados para el extracto metanólico mostraron la mayor cantidad de compuestos fenólicos en comparación con el extracto en acetato de etilo. El contenido total de compuestos fenólicos para los extractos estudiados no aparece informado en la literatura para la especie; sin embargo, se ha determinado para otras especies⁽¹⁹⁻²¹⁾ y muchas⁽¹⁹⁾ pertenecen a géneros de la familia *Myrtaceae* a la que corresponde la planta medicinal objeto de estudio. Al comparar los valores obtenidos con el contenido de flavonoides presente en otros extractos de plantas medicinales informados en la literatura se observa que el valor de flavonoides del extracto metanólico de las hojas de la planta estudiada es muy superior a los valores conseguidos en otras plantas. Lo anterior permite inferir que este extracto pudiera tener una alta actividad antioxidante si se tiene en cuenta que estos metabolitos están considerados como los que más aportan a esta actividad farmacológica.⁽²²⁾

Bajos valores de IC₅₀ son indicativos de buena actividad antioxidante.⁽²³⁾ Al observar los resultados obtenidos para los extractos se observa que manifestaron una actividad inferior a los patrones antioxidantes utilizados como referencia, lo que se considera adecuado si se tiene en cuenta que la concentración de los metabolitos responsables de la acción en los extractos siempre sería muy inferior a la concentración referida de los compuestos puros. El valor de IC₅₀ obtenido para el extracto metanólico es cuatro veces inferior al extracto de acetato de etilo, lo que infiere la actividad antioxidante superior del primero y tiene total correspondencia con la concentración de los compuestos fenólicos presentes en cada extracto.

El ensayo DPPH es empleado en numerosos estudios de evaluación de la actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de diversas especies de plantas medicinales, en estos se realizan comparaciones con diversos patrones antioxidantes y los resultados son variables en relación a la capacidad antioxidante que manifiestan los extractos. Al comparar los resultados alcanzados para el extracto metanólico con los valores de otras plantas medicinales informadas en la literatura consultada se destaca que el valor obtenido supera a plantas reconocidas como antioxidantes: las semillas de la *N. sativa* con un valor de IC₅₀ de 624,7±12,77µg/ml y de la *N. damascena* con un IC₅₀ de 177,6±3,71, así como el patrón Trolox, antioxidante conocido, que posee un IC₅₀ de 50,4±0,21.⁽²⁴⁾

El efecto de secuestro del radical DPPH• de las muestras estudiadas se resume en el siguiente orden: quercetina>vitamina E>rutina>extracto metanólico de

Psidium friedrichsthalianum (O. Berg) Nied>extracto en acetato de etilo de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied.

Estos resultados avalan que la planta en estudio pudiera considerarse una fuente de compuestos antioxidantes.

Los valores de actividad antioxidante total de los extractos no aparecen informados en la literatura científica para esta planta, son específicos para cada extracto y en este caso están en correspondencia con el contenido de compuestos fenólicos de cada uno de los extractos evaluados.

Al comparar los resultados obtenidos en el ensayo con los que aparecen en la literatura para extractos y aceites esenciales de otras plantas medicinales se observa que los resultados obtenidos en las muestras evaluadas en el presente trabajo superan lo informado para el fruto de la *Cydonia oblonga* y de la *Vaccinium macrocarpon* y posee valores similares a la *Ribes nigrum*. La habilidad para reducir el Fe (III) podría ser atribuida a la donación de hidrógeno de los compuestos fenólicos presentes, a la presencia de agentes reductores y al número y la posición de grupos hidroxilos que juegan un rol importante en la actividad antioxidante que manifiesta cualquier compuesto; esto explica la gran variabilidad de dichos parámetros de una planta a la otra.⁽²⁵⁾

Los extractos metanólicos y en acetato de etilo mostraron elevados por cientos de inhibición de la peroxidación del ácido linoleico; el extracto metanólico mostró mejor actividad antioxidante. Superaron la actividad antioxidante de los extractos el propilgalato en comparación con el extracto metanólico y la quercetina en comparación con el extracto en acetato de etilo. Gulcin y colaboradores⁽²⁶⁾ emplean este método para demostrar la actividad antioxidante de especies pertenecientes a la familia *Myrtaceae*.

Mayor concentración de malondialdehído (MDA) indica mayor extensión de la peroxidación lipídica y, por el contrario, menor concentración de malondialdehído se traduce en un efecto protector de las sustancias administradas con potencial actividad antioxidante.⁽²⁷⁾

Los grupos tratados con dosis del extracto muestran valores significativamente inferiores con respecto a la concentración de MDA del grupo II, lo que evidencia su acción antioxidante. El grupo experimental tratado con dosis de extracto de 200mg/kg mostró valores medios de concentración de MDA superiores al grupo tratado con vitamina E, lo que demuestra su potencial efecto antioxidante. En dosis de extracto de 400mg/kg no hay diferencias significativas en relación al grupo tratado con vitamina E; sin embargo, en dosis de 800mg/kg del extracto la concentración de MDA disminuyó de manera significativa en comparación con todos los grupos experimentales y, de manera particular, con respecto al grupo tratado con vitamina E, y la superó en relación a su efecto antioxidante.

La evaluación *ex vivo* del extracto demostró su actividad antioxidante en todas las dosis evaluadas con un posible comportamiento dosis dependiente.

Múltiples informes dan cuenta de la relación directa entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total en los extractos de plantas medicinales. Los compuestos fenólicos juegan un rol importante como antioxidantes y también contribuyen eficientemente a estabilizar los procesos de peroxidación lipídica, de

ahí la gran importancia que posee su presencia en la planta para su uso en la terapéutica.^(28,29)

Al observarse el comportamiento de la composición fenólica, analizada por los ensayos desarrollados en el trabajo, se observó que los valores obtenidos para el extracto metanólico superaron completamente al extracto de acetato de etilo. De igual manera el análisis de los ensayos que miden la actividad quelante y la actividad antioxidante total poseen igual comportamiento, lo que hace deducir una relación directa del contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la planta. Para tener una confirmación se precisarían estudios estadísticos comparativos que se proponen para ser realizados en investigaciones futuras.

Los ensayos realizados en el presente trabajo abarcan los principales mecanismos de acción que aparecen descritos en la literatura por los que se desarrolla la acción antioxidante: la peroxidación lipídica, la actividad secuestradora o antiradicalica y las propiedades de quelación o transición de metales (usualmente del hierro). El análisis global de los resultados obtenidos permite asegurar que de los extractos evaluados de *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied el metanólico mostró mejor actividad antioxidante mediante los métodos y las condiciones bajo las que fue evaluada esta actividad, lo que tiene total correspondencia con la mayor composición de compuestos fenólicos que los caracterizan.

La gran diferencia en la actividad de los dos extractos pudiera estar relacionada a la gran variabilidad que poseen en el contenido de polifenoles, aunque no se puede descartar el poder extractivo de ambos solventes, con superioridad para el metanol, lo que favorecería la extracción de metabolitos de otra naturaleza que por efecto sinérgico (efecto corroborado en las plantas medicinales) estuvieran involucrados en los efectos observados porque estos otros compuestos antioxidantes podrían actuar sinérgicamente e interferir no solamente con reacciones de propagación sino también con la formación de radicales por quelación de los metales de transición involucrados en la reacción de iniciación.⁽³⁰⁾

CONCLUSIONES

La planta estudiada posee un contenido de taninos considerado alto en comparación con los informados para otras plantas medicinales. El extracto metanólico posee un contenido fenólico y de flavonoides muy superior al extracto de acetato de etilo y mostró una actividad antioxidante *in vitro* muy superior. En las dosis evaluadas el extracto metanólico mostró *ex vivo* actividad antioxidante al inhibir la peroxidación lipídica con un posible comportamiento dosis dependiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios - Una reseña mundial [Internet]. Ginebra: OMS; 2000 [citado 8 May 2019].

Disponible:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66629/WHO_TRM_98.1_spa.pdf

2. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: OMS; 2013 [citado 8 May 2019]. Disponible en: <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
3. Valencia E, Marín A. Balance redox (oxidantes/antioxidantes) en pacientes críticamente enfermos. *Rec Act Enferm* [Internet]. 2015 [citado 8 May 2019]; 4(3):[aprox. 11 p.]. Disponible en: <https://encolombia.com/medicina/revistas-medicas/enfermeria/ve-43/enfermeria4301-balance/>
4. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2007 Oct [citado 25 Feb 2019];35(5):1147-1150. Disponible en: <http://www.biochemsoctrans.org/content/35/5/1147>
5. Yadav M, Yadav A & Parkash-Yadav J. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2014 Sep [citado 25 Feb 2019];7(supl 1):S256-S261. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S199576451460242X?via%3Dihub>
6. Sobral Souza CE, Leite NF, Cunha FA, Pinho AI, Costa JG, Coutinho HD. Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium soblealeanum* Proença & Landrum contra metais pesados. *Rev Cienc Salud* [Internet]. 2014 Sep [citado 25 Feb 2019];12(3): 401-9. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/recis/v12n3/v12n3a09.pdf>
7. Cuadra R, Ortega J, Meléndez O, Ramos N, Soto S, González, Sotomayor E. La guayaba ácida (*Psidium friedrichthalianum*) un nuevo frutal para Cuba. *Rev Agrotecnia* [Internet]. 2008 [citado 25 Feb 2019];5:[aprox. 7 p.]. Disponible en: http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2007-1/Agricultura%20Urbana/Agricultura%20Urbana13.pdf
8. Miranda MM, Cuellar CA. Farmacognosia y productos naturales. La Habana: Editorial Félix Varela; 2001. p. 437.
9. Nurmi K. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *J Chem Ecol* [Internet]. 1996 Nov [citado 25 Feb 2019];22(11):2023-2040. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02040093>
10. Umamaheswari M, Chatterjee T. In vitro antioxidant activities of the fractions of *Cocciniagrandis* L leaf extract. *AJTcam* [Internet]. 2007 [citado 25 Feb 2019];5(1):61-3. Disponible en: <https://journals.athmsi.org/index.php/ajtcam/article/view/326>
11. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* [Internet]. 1996 Jul [citado 25 Feb 2019];239(1):70-76. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796902924?via%3Dihub>
12. Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida MLM. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1994 Nov [citado 25 Feb 2019];315(1):161-169. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979394>
13. Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Antioxidant substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1992 [citado 25 Feb 2019];40(8):1349-1351. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00020a011>

14. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi A. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* [Internet]. 1979 Jun [citado 25 Feb 2019];95(2):351-358. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810>
15. Karthikeyan R, Somasundaram ST, Manivasagam T, Balasubramanian T, Anantharaman P. Hepatoprotective activity of brown alga *Padina boergesenii* against CCl₄ induced oxidative damage in Wistar rats. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2010 Sep [citado 25 Feb 2019];9(3):696-701. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S199576451060168X?via%3Dihub>
16. Kishore Chandrul K, Davinder S. Good Laboratory Practice (GLP): an inclusive review. *World J Pharm Res* [Internet]. 2016 [citado 25 Feb 2019];5(4):1985-2003. Disponible en: <http://www.wjpr.net/download/article/1460078994.pdf>
17. Al Jaber N, Awaad A, Moses J. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. *J Saudi Chem Soc* [Internet]. 2011 Oct [citado 25 Feb 2019];15(4): 293-307. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S131961031100144X>
18. Miranda Cruz E, Espinosa Moreno J, Centurión Hidalgo D, Velázquez Martínez JR, Alor Chávez M. Antimicrobial activity of *Psidium friedrichsthalianum* L *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* [Internet]. 2012 [citado 26 Feb 2019];11(4):354-361. Disponible en: https://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/008_articulo_6_7.pdf
19. Cruz Arzola D. Formulario Nacional Fitofármacos y Apifármacos [Internet]. 2^{da} ed. La Habana: Ecimed; 2017 [citado 25 Febr 2019]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/libros_texto/fitofarmacos formularios/formulario_fitofarmacos_%20completo.pdf
20. Khalid M, Siddiqui H, Freed S. Free radical scavenging and total phenolic content of *saccharum spontaneum* L. Root extracts. *IJRPC* [Internet]. 2011 [citado 25 Feb 2019];1(4):1160-1166. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/fd06/a3eda2966f463cb493fc12cbdd3fffc0407d.pdf>
21. Doroteo VH, Díaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Rev Soc Quím Perú* [Internet]. 2013 Ene-Feb [citado 25 Feb 2019];79(1):13-20. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000100003&lng=es&nrm=iso
22. Teleszco M, Wojdylo A. Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *J Funct Foods* [Internet]. 2015 Apr [citado 25 Feb 2019];14:736-746. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615001036?via%3Dihub>
23. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochem & Anal Biochem* [Internet]. 2011 [citado 25 Feb 2019];1(1):106. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/methods-for-total-antioxidant-activity-determination-a-review-2161-1009.1000106.php?aid=3538>
24. Claudia-Crina T, Neli-Kinga O, Laurian V, Mogosan C, Mocan A. Comparative Studies on Polyphenolic Composition, Antioxidant and Diuretic Effects of *Nigella sativa* L. (Black Cumin) and *Nigella damascena* L. (Lady-in-a-Mist) Seeds. *Molecules* [Internet]. 2015 Jun [citado 25 Feb 2019];20(6):9560-9574. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6272570/>
25. Krimat S, Dob T, Toumi M, Lamari L, Dahmane D. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Salvia qchudaei* Batt. Et Trab endemic plant from Algeria. *J of Essent Oil Res* [Internet]. 2015 [citado 25 Feb

- 2019];27(5):447-453. Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2015.1025921>
26. Gulcin I, Elmastas H, Aboul Enein Y. Antioxidant activity of clove oil - A powerful antioxidant source. Arabian J Chem [Internet]. 2012 Oct [citado 25 Feb 2019];5(4):489-499. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210001899>
27. Barriuso B, Astiasarán I, Ansorena D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. Eur Food Res Technol [Internet]. 2013 Jan [citado 25 Feb 2019];236(1):1-15. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-012-1866-9#citeas>
28. Huyut Z, Beydemir S, Gülçin I. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. Biochem Res Int [Internet]. 2017 [citado 25 Feb 2019];2017:[aprox. 10 p.]. Disponible en:
<https://www.hindawi.com/journals/bri/2017/7616791/>
29. Sinh R, Kumari N. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of Sapindus mukorossi Gaertn. - A valuable medicinal tree. Ind Crops Prod [Internet]. 2015 Oct [citado 25 Feb 2019];73:1-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015300212>
30. Kevers C, Pincemail J, Defraigne JE, Dommes J. Antioxidant capacity of small dark fruits: Influence of cultivars and harvest time. J Berry Res [Internet]. 2014 [citado 25 Feb 2019];4(2014):97-105. Disponible en:
<https://content.iospress.com/download/journal-of-berry-research/jbr071?id=journal-of-berry-research%2Fjbr071>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

YSC y MEJR: Contribuyeron con el diseño del estudio, el análisis de los datos y la confección de la primera versión del manuscrito.

YPB y NDL: Realizaron búsquedas bibliográficas, el procesamiento de los datos y contribuyeron a la confección del manuscrito.

MRR y PSF: Realizaron búsquedas bibliográficas y contribuyeron a la redacción del manuscrito.

Todos los autores aprobaron la versión del manuscrito finalmente remitida a la revista.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

Recibido: 9-3-2019 Aprobado: 16-5-2019

Yolexis Sánchez Carrillo. Empresa Provincial de Farmacias y Ópticas de Villa Clara. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

yolexisc@infomed.sld.cu

<http://orcid.org/0000-0001-8690-2715>