

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento de Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Estudio farmacognóstico de *Psidium claraense* Urb., especie endémica de Cuba.

Autor: Susana Castro Torres

Tutores: Dra. Liliana Vicet Muro.

MSc. Dailenys Marrero Morfa.

Santa Clara, Junio 2019
Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Pharmacy Department

DIPLOMA THESIS

Title: Pharmacognostic study of *Psidium claraense* Urb., endemic species of Cuba.

Author: Susana Castro Torres.

Thesis Director: Dra. Liliana Vicet Muro.

MSc. Dailenys Marrero Morfa.

Santa Clara, June 2019
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Exergo

A decorative border in the bottom right corner of the page, featuring a dark, stylized floral or leafy pattern. The pattern consists of several dark, rounded shapes resembling leaves or petals, arranged in a somewhat circular or spiral pattern. The background of the page is a light, textured grey.

*Define el éxito en tus propios términos, consíguelo
por tus propias reglas y construye una vida de la
que estés orgulloso.*

Anne Sweeney

Dedicatoria



A mi familia, en especial a mis padres.

Agradecimientos



A mis padres, Noel y Yadenys, por estar siempre cuando necesité un abrazo, un consejo o también un regaño. Por educarme debidamente y enseñarme que todo sacrificio siempre trae consigo una recompensa. A ustedes les debo el hecho de haberme convertido hoy en la persona que soy.

A mis abuelos, por su amor infinito y confianza en mí.

A mis hermanos pequeños, Luis Enrique y Jesús Alejandro, a quienes quiero con todo mi corazón, espero ser un buen ejemplo para ustedes.

A mis tíos y primos, quienes me han ayudado durante todas las etapas de mi vida.

A mi novio, por su cariño y palabras de aliento, por darme siempre su ayuda cada vez que la necesito.

A Lily y Dailenys, por su valiosa tutoría, por sus sugerencias, cooperación y guía para la realización de esta investigación.

A mis profesores, por brindarme sus conocimientos y formarme como una buena profesional.

A Yisel, por su ayuda en estos meses de tanto trabajo.

A mis compañeros de clase, por haber compartido conmigo estos cinco años de estudio, esfuerzo, tristezas y alegrías.

A todos los que de una forma u otra me han ayudado.

Muchísimas gracias.

Resumen



Los estudios farmacognósticos son de gran utilidad para aportar criterios de calidad con vistas a la estandarización de materiales vegetales. Teniendo en consideración lo anterior y las potencialidades como antioxidante y antiinflamatorio que ha demostrado *Psidium claraense* Urb., especie endémica de la región central en peligro crítico de extinción, se desarrolla el presente trabajo. En el mismo se realizó por primera vez el estudio farmacognóstico de la especie, pudiendo establecer las características macromorfológicas de las hojas. Se efectuó la estandarización del secado por tres vías: a la sombra, al sol y en estufa a 40 °C, considerándose este último el más adecuado según los parámetros evaluados. Se determinaron los índices farmacognósticos del material vegetal procedentes de las hojas de la planta lo cual permitió emitir criterios sobre la calidad de la droga cruda, indispensable para la confección de las futuras Normas de Control de la Calidad de la especie como posible droga medicinal. Se llevó a cabo la determinación cuantitativa de fenoles y flavonoides de los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico, mostrando este último el mayor contenido en ambos metabolitos con $102,64 \pm 1,69$ mgEAG/gES y $7,04 \pm 0,19$ mgQE/gES, respectivamente. Finalmente se realizó una caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico, presentando índices adecuados tomando en consideración la correspondencia con extractos de *Psidium guajava*. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento farmacognóstico de esta planta, favoreciendo el interés por su cultivo y sentando las bases para las investigaciones encaminadas al desarrollo de nuevos ingredientes activos para la industria farmacéutica cubana.

Abstract



The pharmacognostic studies are of great utility to contribute approaches of quality with a view to the standardization of vegetable materials. Taking into consideration the potential as antioxidant and anti-inflammatory that has been demonstrated by *Psidium claraense* Urb., endemic species of the central region in critical danger of extinction, is developed the present work. In the same one it was carried out the pharmacognostic study of the species for the first time, being able to establish the macromorphological characteristic of the leaves. The standardization of the drying was made by three methods: to the shade, in the sun and in stove to 40 °C, being considered this last one the most appropriate according to the evaluated parameters. The pharmacognostic indices of the plant material from the leaves of the plant were determined, which allowed to emit positive criteria on the quality of the crude drug. indispensable for the making of the future Quality's Control Norms of the species like possible medicinal drug. It was carried out the quantitative determination of phenolics and flavonoids of the aqueous, alcoholic and hidroalcoholic extracts, showing this last one the biggest content in both metabolites with $102,64 \pm 1,69$ mgEAG/gES and $7,04 \pm 0,19$ mgQE/gES, respectively. Finally it was carried out a physical-chemical characterization of the hidroalcoholic extract, presenting appropriate indexes taking in consideration the correspondence with extracts of *Psidium guajava*. The obtained results contribute to the pharmacognostic knowledge of this plant, favoring the interest for their cultivation and sitting down the bases for the investigations guided to the development of new active ingredients for the Cuban pharmaceutical industry.

Índice



ÍNDICE	
INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 Flora de cuba	3
1.2 Zona de Casilda	3
1.2.1 Ubicación	3
1.2.2 Tipo de suelo	4
1.2.3 Estado de conservación	4
1.3 Familia <i>Myrtaceae</i>	5
1.3.1 Generalidades	5
1.3.2 Descripción	6
1.3.3 Propiedades farmacológicas	6
1.4 Género <i>Psidium</i>	7
1.4.1 Descripción	7
1.4.2 Composición química	8
1.6 <i>Psidium claraensis</i> Urb.	8
1.6.1 Descripción botánica	8
1.6.2 Distribución	9
1.6.3 Estado de conservación	9
1.6.4 Usos conocidos	10
1.6.5 Propiedades farmacológicas	10
1.7 Estudios farmacognósticos	10
1.7.1 Ensayos botánicos	11
1.7.2 Ensayos fisicoquímicos	12
1.8 Estudios fitoquímicos	12
1.9 Proceso de secado	13
1.10 Consideraciones generales	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Recolección y descripción del material vegetal	15
2.2 Estandarización de secado	15
2.2.1 Determinación de las características organolépticas	16
2.2.2 Determinación del contenido de humedad	16
2.2.3 Tamizaje fitoquímico	16
2.3 Determinación de índices farmacognósticos	17
2.3.1 Determinación del contenido de humedad	17

2.3.2 Determinación de cenizas.....	17
2.3.3 Determinación de extractivos solubles.....	19
2.4 Determinación del Índice de Polifenoles Totales (IPT).....	20
2.5 Determinación cuantitativa de los compuestos fenólicos totales....	20
2.6 Determinación cuantitativa del contenido de flavonoides totales....	22
2.7 Caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico.....	22
2.7.1 Determinación del olor.....	23
2.7.2 Determinación del color.....	23
2.7.3 Determinación del pH.....	23
2.7.4 Determinación del índice de refracción.....	23
2.7.5 Determinación de la densidad relativa.....	23
2.7.6 Análisis capilar.....	23
2.7.7 Determinación de sólidos totales.....	24
2.7.8 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico.....	25
2.8 Análisis estadístico.....	25
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1 Recolección y descripción del material vegetal.....	26
3.2 Estandarización del secado.....	27
3.2.1 Características organolépticas.....	29
3.2.2 Determinación del contenido de humedad.....	29
3.2.3 Tamizaje fitoquímico.....	30
3.3 Determinación de índices farmacognósticos	33
3.3.1 Determinación de humedad residual y cenizas.....	33
3.3.2 Determinación de extractivos solubles.....	34
3.4 Determinación del índice de polifenoles totales.....	36
3.5 Determinación del contenido de compuestos fenólicos.....	36
3.6 Determinación del contenido de flavonoides totales.....	38
3.7 Caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico.....	40
3.7.1 Tamizaje fitoquímico.....	42
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características macromorfológicas de las hojas de <i>P. claraense</i> y las reportadas por la literatura (León, 1953). ⁽⁵²⁾	26
Tabla 2. Pérdida en peso durante la estandarización del secado.	28
Tabla 3. Determinación de humedad para cada uno de los métodos de secado.	30
Tabla 4. Resultado del tamizaje fitoquímico	31
Tabla 5. Determinación de humedad residual y cenizas.	33
Tabla 6. Extractivos solubles (%) obtenidos para los extractos de <i>P. claraense</i>	35
Tabla 7. IPT obtenidos para los extractos de <i>P. claraense</i>	36
Tabla 8. Cuantificación del contenido de fenoles totales (mgEAG/gES).	37
Tabla 9. Cuantificación del contenido de flavonoides totales (mgQE/gES).	39
Tabla 10. Resultados de la caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico.	40
Tabla 11. Parámetros físico-químicos del extracto fluido de <i>Psidium guajava</i> L.	41
Tabla 12. Resultado del tamizaje fitoquímico para el extracto hidroalcohólico.	42

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Estandarización del secado.	27
Gráfico 2. Curva de calibración del ácido gálico.	37
Gráfico 3. Curva de calibración de quercetina.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del área de arenas cuarcíticas de Casilda, Sancti Spíritus, Cuba. ⁽¹⁴⁾	4
Figura 2. Esquema del estado de conservación de la vegetación en el área de arenas cuarcíticas de Casilda, Trinidad, Sancti Spíritus, Cuba.	5
Figura 3. Material vegetal molinado procedente de las hojas de <i>P. claraense</i> Urb.	29
Figura 4. Resultados del análisis capilar.	42

Introducción



INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha tratado de mitigar sus dolencias y prolongar su vida. Aun así, en pleno siglo XXI, no ha podido evitar la muerte limitándose a mitigar síntomas de enfermedades e impedir el desarrollo de otras. En épocas en que sólo tenía a su disposición los recursos que el planeta le otorgaba, buscó en éstos las herramientas para disminuir el dolor físico y evitar la muerte. Entre los recursos más aprovechados por distintas culturas a través de la historia, se encuentran los recursos minerales, animales y vegetales.⁽¹⁾

Las plantas, gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico, por lo que cada región del mundo desarrolló su forma de curar a partir de plantas medicinales, que es única y característica, puesto que se utilizaban especies endémicas de las regiones en cuestión. Con el tiempo estas terapias locales pasaron a conformar la llamada medicina tradicional.⁽¹⁾

El uso de los medicamentos herbarios y el rol que deben cumplir en la medicina actual lo determina la Organización Mundial de la Salud desde el año 1978, la cual estructuró en 1985 un Programa de Medicina Tradicional Herbolaria, reconociendo la existencia de 119 sustancias químicas de origen vegetal que pueden considerarse fármacos importantes.⁽²⁾ Así mismo, 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 con métodos científicos actuales sus efectos farmacológicos y tóxicos. Esto permitirá incorporar a la llamada medicina moderna los productos medicinales tradicionales con verdadera efectividad, ganando prestigio en la práctica médica actual.⁽³⁾

El uso de las plantas medicinales es común en la población de Cuba, aunque gran parte de ella desconoce mucho de sus propiedades, formas de empleo y modo de aplicación.⁽⁴⁾ Una de las más empleadas es *Psidium guajava* L., especie de gran distribución en todas las zonas tropicales y por lo tanto la más estudiada.⁽⁵⁾ Su variedad de actividades farmacológicas, además de su amplia

composición de metabolitos ha permitido su inclusión en la Guía de fitofármacos y apifármacos con una gran variedad de formulaciones como extracto fluido, tintura al 20%, talco y polvo de guayaba.⁽⁶⁾

Sin embargo en la región de Casilda, poblado del municipio de Sancti Spíritus, se encuentra una especie endémica, *Psidium claraense* Urb., actualmente en peligro de extinción⁽⁷⁾ y a la cual se le ha probado en estudios anteriores efecto antioxidante y antiinflamatorio.⁽⁸⁾ Esto pudiera constituir un recurso potencial en el campo de los productos fitoterapéuticos, pero para que se pueda desarrollar una investigación confiable, se necesita cumplir con ciertos parámetros de calidad que garantice su identidad, inocuidad, pureza, contenido de principios activos, así como también su efectividad y estabilidad.⁽⁹⁾

Tomando en consideración estos aspectos se propone el siguiente **problema científico**: La especie *P. claraense* Urb. ha demostrado tener potencialidad farmacológica fundamentalmente como antioxidante y antiinflamatorio, sin embargo, son escasos los estudios farmacognósticos disponibles que permitan su propuesta como droga vegetal y posible introducción en la terapéutica.

Por lo tanto este trabajo científico parte de la **hipótesis** de que: Los estudios farmacognósticos permiten emitir criterios sobre la calidad de la droga compuesta por las hojas de *P. claraense* para su posible propuesta como planta medicinal.

Para comprobar dicha hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar desde el punto de vista farmacognóstico el material vegetal procedente de las hojas de *P. claraense* Urb.

Objetivos específicos

1. Estandarizar el método de secado del material vegetal procedente de hojas de *P. claraense* Urb.
2. Determinar índices farmacognósticos del material vegetal procedente de hojas de *P. claraense* Urb.
3. Caracterizar el extracto hidroalcohólico de las hojas de *P. claraense* Urb. a través de determinaciones físico-químicas.

*Revisión
Bibliográfica*



1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Flora de cuba

La diversidad vegetal de Cuba es impresionante. El número de plantas vasculares alcanza 7020 taxones y de ellos un 50 % son endémicos.⁽¹⁰⁾ Por otro lado, la vegetación exhibe cerca de 30 tipos distintos de formaciones vegetales, lo cual hace que el archipiélago cubano se incluya en una de las zonas claves de biodiversidad en el planeta.⁽¹⁰⁾

Pese a la singularidad e importancia de su flora, Cuba es la segunda isla con mayor cantidad de especies de plantas extintas en el mundo. Cabe destacar la histórica explotación a la que fueron sometidos sus bosques desde el siglo XV hasta mediados del XX, como consecuencia del desarrollo agrícola y forestal, lo cual redujo la cobertura boscosa en más de un 80 %.⁽¹¹⁾

En el territorio cubano la distribución de las especies no es uniforme, ya que se concentra en las regiones más antiguas y estables, como son los macizos montañosos de occidente, centro, norte oriental, y sur oriental de la isla, así como en áreas de condiciones extremas, como las colinas y llanuras serpentinosas, las costas semiáridas surorientales y las llanuras de arenas silíceas del occidente.⁽¹²⁾

El elevado endemismo de la biodiversidad terrestre cubana, se debe, entre otros factores, al aislamiento geográfico dado por la condición de insularidad del archipiélago cubano, el mosaico de suelos a partir de la complejidad y heterogeneidad geológica, así como las diferencias latitudinales y climáticas.⁽¹²⁾

Una zona con un alto grado de endemismo es la localidad de Casilda, municipio de Trinidad, provincia de Sancti Spíritus, donde se encuentran 10 taxones endémicos cubanos.⁽¹³⁾

1.2 Zona de Casilda

1.2.1 Ubicación

La localidad de Casilda se ubica en el municipio de Trinidad, provincia de Sancti Spíritus, hacia el centro y sur de Cuba, entre los 21°39' - 21°46'N y los 79°50' - 80°01'W. Es una llanura fluvio-acumulativa arenosa, que se extiende

como un margen costero, desde la Ensenada de Casilda hasta la desembocadura del río Agabama donde ocupa una superficie de 70 km². Desde el punto de vista fitogeográfico, el área forma parte del extremo más oriental de distrito Casildense, en el sector Cuba centro-occidental (*Havanicum*) correspondiente a la subprovincia Cuba Central.⁽¹³⁾ En la figura 1 se muestra su localización.

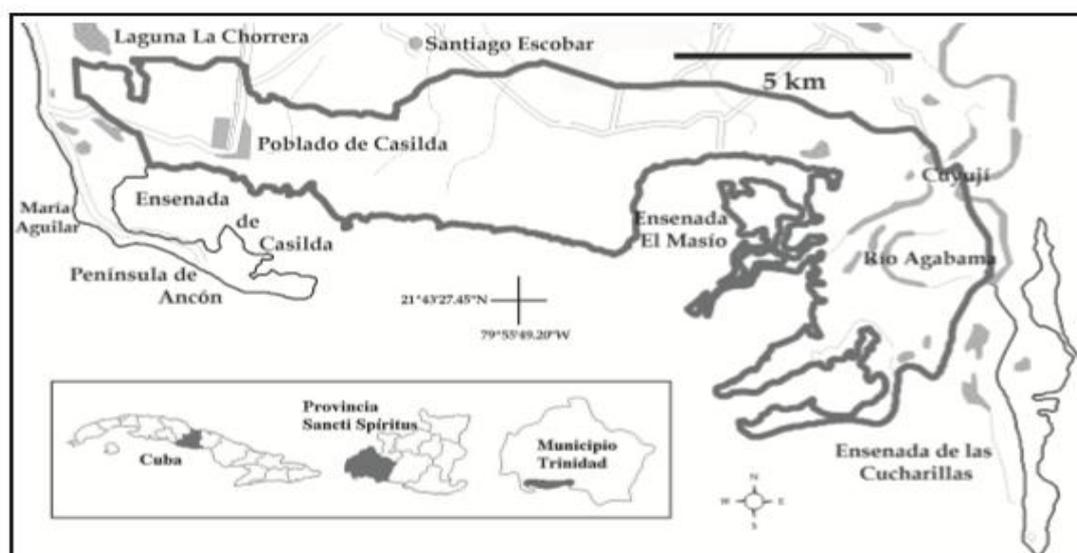


Figura 1. Ubicación geográfica del área de arenas cuarcíticas de Casilda, Sancti Spíritus, Cuba.⁽¹⁴⁾

1.2.2 Tipo de suelo

El suelo que predomina son suelos arenoso cuarcíticos (silíceos) los cuales constituyen centros muy importantes de diversidad y endemismo para la flora de Cuba.⁽¹³⁾ No obstante, estos ecosistemas están entre los más afectados por la intervención humana, sobre todo por la extracción minera, pero también por la agricultura, la ganadería y la explotación forestal.⁽¹³⁾

1.2.3 Estado de conservación

La flórua de las arenas blancas de Casilda está conformada por 307 taxones infragenéricos,⁽¹⁴⁾ de los cuales 20 se encuentran amenazados (6,8 % del total), y de estos 10 son endémicos cubanos. Cinco taxones están categorizados En Peligro Crítico (CR), entre ellos la situación más preocupante la tienen *Hyptis rivularis* Britton (*Lamiaceae*) y *P. claraense* Urb. (*Myrtaceae*), por su condición

de endémicos locales. Otros cinco taxones poseen la categoría de En Peligro (EN), tres se encuentran referidos como Vulnerable (VU) y los restantes siete taxones han sido categorizados como Amenazados según el procedimiento de categorización preliminar, y otros seis están notificados como Casi Amenazados (NT).⁽¹³⁾ En la figura 2 se muestra un esquema con el estado de conservación de la región.

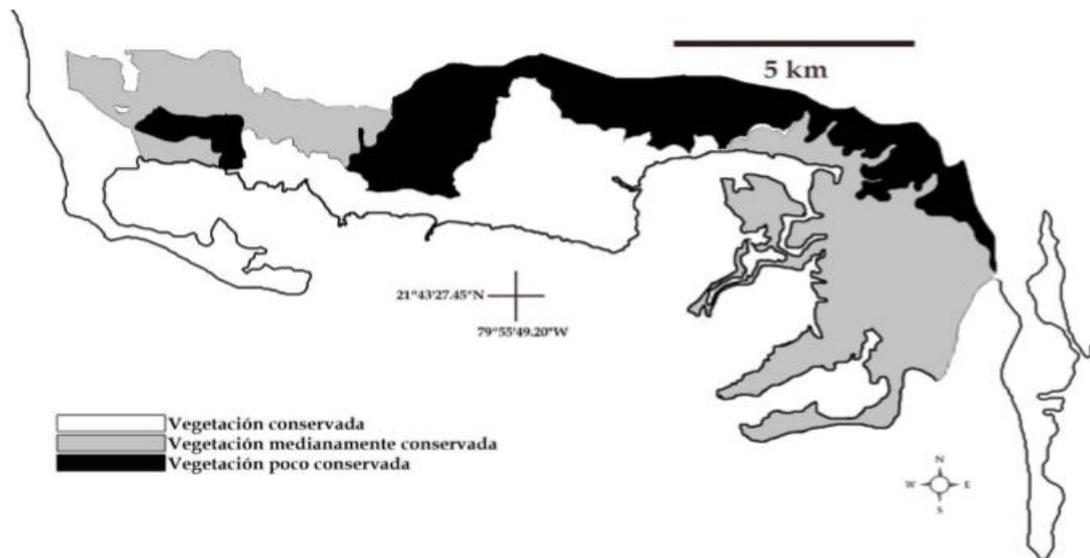


Figura 2. Esquema del estado de conservación de la vegetación en el área de arenas cuarcíticas de Casilda, Trinidad, Sancti Spíritus, Cuba.⁽¹³⁾

1.3 Familia *Myrtaceae*

1.3.1 Generalidades

La familia *Myrtaceae* cuenta con una elevada riqueza florística y gran importancia fitosociológica para los bosques, con 150 géneros y alrededor de 3600 especies. Los representantes cubanos de esta familia se incluyen en la subfamilia *Myrtinae* con una distribución típica pantropical.⁽¹⁵⁾ La subtribu *Myrtinae* en Cuba está representada por 57 taxones infragenéricos en los géneros *Pimenta*, *Mosiera*, *Psidium* y *Calycolpus*. *Mosiera* resulta el género más diverso de la subtribu en la Isla, con 29 taxones. Le siguen en diversidad los géneros *Pimenta* con 12 taxones, *Psidium* con 11 especies y finalmente *Calycolpus* con solo 5 especies.⁽¹⁶⁾

Está integrada por árboles, arbustos o, raras veces, subarbustos, con abundantes y pequeñas glándulas circulares embebidas en el tallo. Son plantas frecuentemente aromáticas, elementos florísticos y ecológicos importantes, de muchos bosques tropicales. Presentan floema interno, con glándulas aceitosas.⁽¹⁵⁾

1.3.2 Descripción

Las hojas en *Myrtaceae* son mayormente pecioladas, estipuladas, opuestas, alternas o rara vez trifoliadas y la lámina es coriácea o membranosa, entera, rara vez crenulada y presentan glándulas aceitosas. La nerviación es pinnada, nervio central por lo general prominente en el envés, los laterales anastomosándose formando un nervio marginal extendiéndose paralelamente al margen y arqueado entre los secundarios.⁽¹⁵⁾

1.3.3 Propiedades farmacológicas

Myrtaceae es una familia farmacológicamente importante. Las infusiones de hojas de muchas de estas plantas son usadas para el tratamiento de la diabetes; este grupo de plantas incluye *Myrcia* (M.) *punicifolia* (Kunth) DC., *M. speciosa* (Amsh.), *M. Vaugh*, *M. amazonica* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. guianensis* (Aubl.) DC., *M. multiflora* (Lam.) DC., *M. salicifolia* DC., *M. sylvatica* (G. Mey) DC. y *M. uniflora*.⁽¹⁷⁾ *Myrcia uniflora* es vendida como extracto seco en cápsulas o como tintura para el tratamiento de la diabetes⁽¹⁸⁾ y *M. salicifolia* es empleada para las úlceras bucales.⁽¹⁹⁾ Otras especies de *Myrcia* tienen usos tradicionales como *Myrcia bracteata* DC. que se emplea en el tratamiento de la dispepsia⁽²⁰⁾ y *M. ovata* Cambess utilizada para el tratamiento de gastritis y diarrea.⁽²¹⁾

Los aceites esenciales presentes en estas plantas son fundamentalmente mezclas de sesquiterpenos con concentraciones pequeñas de monoterpenos. Estos aceites volátiles muestran actividades biológicas como antiinflamatorios,⁽²²⁾ anticonceptivos,⁽²³⁾ antimicrobianos,^(24, 25) entre otros. Estudios químicos con los compuestos no volátiles mostró que las especies de *Myrtaceae* son una fuente rica de flavonoides,⁽²⁶⁾ triterpenos,⁽²⁷⁾ ácidos orgánicos^(28, 29) y acetofenonas.^(26, 30) Algunos de los flavonoides aislados y las

acetofenonas derivadas han mostrado potencial hipoglucemiante; lo cual podría explicar su uso como antidiabético.⁽²⁶⁾ Las acetofenonas también están relacionadas con efectos hipolipemiantes.⁽¹⁸⁾

1.4 Género *Psidium*.

1.4.1 Descripción

El género *Psidium* cuenta con alrededor de 100 especies, donde la más importante es el *Psidium guajava*⁽³¹⁾ debido a su gran potencialidad farmacológica.^(5, 32, 33) Entre sus propiedades se encuentra el efecto anticatarral.⁽³³⁾ El extracto acuoso de las hojas de guayaba, disminuye la tos y tiene efecto anticatarral en ratas y coballos, en dosis de 2 a 5 g/kg respectivamente y posee una DL₅₀ mayor de 5g/kg.⁽⁵⁾ También presenta efecto antiinflamatorio^(5, 33, 34) y analgésico,^(5, 33) efecto hipoglucemiante^(5, 33, 35, 36) e hipotensor,⁽⁵⁾ efecto genotóxico y mutagénico,⁽⁵⁾ actividad antibacteriana,^(5, 33, 37, 38) actividad citotóxica,^(5, 33) efecto antioxidante,^(5, 33, 37, 39-41) actividad hepatoprotectora^(5, 33) y actividad antidiarreica.⁽⁵⁾

El extracto acuoso de las hojas en dosis de 400 mg/dL, tiene efecto estabilizador de la membrana eritrocítica *in vitro*. Se reporta, además, que mejora los niveles de triglicéridos y colesterol en modelos de ratones en tejido hepático, mejorando el balance del perfil lipídico.⁽⁵⁾

En la literatura se reportan como formas farmacéuticas de las hojas, la tintura 20%, el polvo y el talco de guayaba. Se reportó una suspensión oral utilizando polvo de las hojas secas. Se ha reportado una formulación de cápsulas duras de 500mg, a partir del polvo de las hojas secas.⁽⁵⁾

Este género comprende árboles y arbustos, aromáticos, de flores cimosas provistas de numerosos estambres. Fruto en baya, que puede o no estar coronada por los restos del cáliz, provista de numerosas semillas de forma arriñonada y testa ósea. Existen además varias especies de este género que son productoras de frutos comestibles, maderables y ornamentales.⁽⁴²⁾ De estas especies se puede destacar las características de sus frutos los cuales tienen un sabor exótico y un elevado contenido de vitamina C.⁽³¹⁾ Comprende entre 120 y 150 especies de las Antillas y la América tropical y subtropical.

Aunque el género no ha sido exhaustivamente estudiado en Cuba en tiempos recientes, la cifra de especies referidas para el mismo, oscila entre 20 y 30.⁽⁴²⁾

1.4.2 Composición química

Los frutos contienen vitaminas A y C⁽³⁸⁾ además de algunos minerales como hierro, calcio y fósforo^(18, 43). Las hojas contienen aceites esenciales,^(5, 18) taninos,^(33, 43) flavonoides^(44, 45) y triterpenos, así como saponinas y compuestos aminados.^(5, 33, 38, 43, 46, 47) Se ha reportado un aceite esencial y otras sustancias volátiles.⁽⁵⁾

Contienen, además, ácido guajanoico, β -sitosterol, uvaol, ácido oleanólico y ácido ursólico; ácido 2- α -hidroxiursólico, morin-3-O- α -L-arabopiranosido, hiperina, miricetina-3-O- β -D-glucosido, quercetin-3-O- β -D-glucuronopiranosido, 1-O-galoil- β -D-glucosa. Se ha informado la presencia de ácido ascórbico y de otros flavonoides así como azúcares reductores y alcaloides. Se ha aislado una nueva benzofenona y un flavonol de naturaleza galoil-glicósido, conjuntamente con 5 nuevos quercetin-glicósidos. Se ha informado el aislamiento de nuevos flavonoides y de 4 nuevos triterpenos.⁽⁵⁾ Las yemas de los brotes con características más juveniles (rebrotos de la raíz) provenientes de la copa del árbol son las que poseen el mayor contenido de fenoles y flavonoides.^(44, 48)

Estos compuestos son generalmente asociados con propiedades biológicas importantes, tales como aumento de la protección contra la oxidación celular, actividad antimicrobiana y anticancerígena.⁽⁴⁹⁾ Se les han atribuido usos como antidiarreicos,⁽⁴⁹⁾ hipoglucemiantes⁽⁵⁰⁾ y antiinflamatorios.⁽⁵¹⁾

1.6 *Psidium claraense* Urb.

1.6.1 Descripción botánica

Arbusto o arbolito; hojas ovales u ovalelípticas, de 2-2.7 cm., brevemente acuminadas en el ápice obtusito, la base aguda estrechada en el pecíolo, densamente translúcido-punteadas, con glándulas prominulas, lampiñas; pedicelos axilares, de 10-15 mm; flores blancas; cáliz glanduloso; óvulos 15 en cada celda.⁽⁵²⁾

1.6.2 Distribución

Endémica estricta de las llanuras costeras y subcosteras con predominio en arenas cuarcíticas de Casilda, municipio Trinidad, provincia Sancti Spíritus. Su única población está restringida a dos puntos, muy próximos, de la zona oeste del repositorio arenoso, cercana al poblado de Casilda, que es la parte más afectada por la actividad humana. Se conoce por el nombre de guayabita de Casilda.^(7, 14)

1.6.3 Estado de conservación

P. claraense está categorizada como En Peligro Crítico.^(11, 53) Las amenazas que tiene la especie en su área de distribución natural son la minería, el pastoreo excesivo de ganado vacuno y otros, la actividad forestal, las plantas invasoras y el fuego intencionado.⁽⁵⁴⁾

La mayor parte de la población de *P. claraense* se encuentra donde existe una concesión minera de 135 ha, de cual se extrae arena sílice de forma industrial. El proceso extractivo destruye el hábitat. En cuanto al pastoreo extensivo de ganado vacuno y otros, esta actividad, además de los perjuicios directos a las plántulas por ramoneo y pisoteo, provoca eutrofización del sustrato, lo cual propicia a su vez la implantación y desarrollo de especies oportunistas.⁽⁵⁴⁾

Por su parte el fuego intencionado afecta el follaje de los adultos de *P. claraense* y la regeneración natural, y probablemente se vean afectados también otros componentes de la biocenosis natural del ecosistema que tengan que ver en la polinización o dispersión de la planta. Se han plantado grandes extensiones de *Casuarina equisetifolia* (pino australiano), esta especie exótica provoca afectaciones importantes en la estructura de la comunidad vegetal por la gran incorporación de biomasa al sustrato y su efecto alelopático.⁽⁵⁴⁾

En la zona donde se manifiesta *P. claraense* proliferan varias plantas invasoras, con destaque para la gramínea *Heteropogon contortus* (pasto asesino), que colma casi completamente el espacio disponible e impide el desarrollo de otras especies.⁽⁵⁴⁾

1.6.4 Usos conocidos

Se registran el uso de los tallos como varas diversas para el trabajo agrícola. Desde el punto de vista cultural es muy importante pues forma parte de un grupo de plantas endémicas estrictas de la zona, patrimonio exclusivo que fortalece el sentido de pertenencia de los pobladores de esa localidad trinitaria. El apego se manifiesta incluso desde el nombre común de la especie, específicamente esta planta se conoce allí como “guayabita de Casilda”. Tiene potencialidades ornamentales por su condición perennifolia y sus hojas brillantes, en diversos tonos de verde, también en época de floración y fructificación la planta es agradable a la vista. También se presume su utilidad medicinal. El fruto (relativamente pequeño y un tanto astringente), es parte de la dieta de la fauna local, sobre todo insectos, aves y reptiles.⁽⁷⁾

1.6.5 Propiedades farmacológicas

Esta planta es muy poco estudiada, debido fundamentalmente a que es poco conocida, dado que su distribución se orienta solo en la región de Casilda.⁽⁷⁾ Solamente se ha realizado un estudio donde se demostró que presenta actividad antiinflamatoria según el test de edema auricular inducido por TPA y actividad antioxidante según la actividad secuestradora del radical DPPH.⁽⁸⁾

1.7 Estudios farmacognósticos

La farmacognosia es una ciencia aplicada relacionada con las características biológicas, bioquímicas y económicas de las drogas naturales. Comprende el estudio tanto de las drogas crudas de origen vegetal y animal como también de sus constituyentes. En un sentido amplio la farmacognosia es la ciencia que trata del estudio de las drogas de origen vegetal y animal, su historia, distribución geográfica, cultivo, recolección, selección, preparación, preservación, comercio, caracterización morfológica e histológica, identificación, extracción de sus principios activos, determinación de su composición química, ensayos y valoración, adulteraciones, formas farmacéuticas, posología, acción farmacológica e importancia socioeconómica.⁽⁵⁵⁾

Antes de utilizar una droga vegetal, o un producto derivado de ella, en terapéutica, es necesario verificar su identidad, tanto botánica como química, buscar las posibles falsificaciones y controlar su actividad, es decir, se le debe realizar un control de calidad, el cual debe contemplar el estudio de la identidad, pureza, potencia y eficacia.⁽⁵⁶⁾

En diversas farmacopeas se describen métodos generales de ensayos para evaluar las drogas oficiales, pero la Organización Mundial de la Salud ha recomendado la realización de monografías y la implementación de normas o especificaciones de calidad, basadas en las experiencias de cada país, para aquellas drogas no incluidas en las farmacopeas y que son ampliamente utilizadas en medicina tradicional.^(55, 57)

Los exámenes para tal fin se clasifican de forma sencilla en botánicos, físico-químicos y biológicos. Los dos primeros se agrupan bajo el término de estudios farmacognósticos.⁽⁵⁶⁾

1.7.1 Ensayos botánicos.

Los ensayos botánicos permiten identificar la droga y detectar posibles falsificaciones, comprenden características microscópicas y macroscópicas.⁽⁵⁶⁾ Para el ensayo macroscópico se observan las características propias de cada órgano vegetal. Es de tipo organoléptico, pues se vale de los órganos sensoriales del observador. Es necesario informar la nomenclatura, la presentación, la conformación, las dimensiones, el color, olor y sabor. Además para las hojas debe determinarse la forma de la base, del ápice, de los bordes, la textura, la presencia o no de pelos y las nervaduras.^(55, 56)

Los ensayos microscópicos pueden realizarse mediante polvos, cortes histológicos, tejidos disociados, detección histoquímica, determinación del índice estomático o determinación del radio de empalizada. Los cortes histológicos se obtienen a mano alzada o con micrótomos manuales. En general se realizan cortes transversales en donde se examinan los tejidos y el contenido celular. En las hojas se deben observar las células epidérmicas, estomas, tejido parenquimático, y también presencia y características de los pelos tectores y secretores.⁽⁵⁶⁾

1.7.2 Ensayos físico-químicos

Los ensayos fisicoquímicos nos permiten detectar el valor de una droga con miras a su normalización. Dentro de estos se encuentran la determinación de cenizas, que no es más que el residuo que queda después de la ignición de una droga y se determina por tres métodos diferentes: cenizas totales, ácido-insolubles y solubles en agua. También se encuentra la determinación de arsénico y metales pesados ya que puede ser fuente de contaminación. La determinación de agua o humedad residual es otro ensayo que se realiza, puesto que un exceso de agua en la droga puede provocar el crecimiento microbiano, la presencia de hongos o insectos y el deterioro, seguido de la hidrólisis de los principios activos. También son usuales la determinación del índice de espuma y la actividad hemolítica, en caso de compuestos con saponinas, y la cromatografía en capa delgada para la determinación cualitativa de pequeñas cantidades de impurezas.^(55, 56)

1.8 Estudios fitoquímicos

La fitoquímica comprende el estudio de los métodos de extracción, separación, purificación y elucidación estructural de las sustancias de origen vegetal.⁽⁵⁵⁾ Para determinar la composición química de las plantas medicinales y conocer sus constituyentes biológicamente activos pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico preliminar hasta estudios químicos sistemáticos bio guiados. Puesto que este último tipo de estudio requiere una inversión considerable de tiempo y recursos, lo ideal es iniciar con estudios fitoquímicos preliminares que permitan hacer una discriminación de las plantas a estudiar en términos de su composición química, con el fin de seleccionar únicamente aquellas más interesantes para posteriores estudios sistemáticos.⁽⁵⁸⁾

El mismo consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.⁽⁵⁹⁾ Los resultados de dichos ensayos constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico.

1.9 Proceso de secado

El proceso de secado es uno de los más importantes durante el estudio de una droga vegetal; nos permite una buena conservación de la planta, ya que interrumpe los procesos de degradación enzimática, las reacciones de oxidación e hidrólisis y el desarrollo de microorganismos. Los métodos empleados para el secado del material vegetal dependerán de las características del mismo, y la forma en que puede efectuarse el proceso debe determinarse experimentalmente para cada especie.⁽⁵⁵⁾ El secado de plantas medicinales puede efectuarse de varias formas, de acuerdo con la fuente de energía que se emplee para la realización de este proceso, de la especie que será secada, del órgano de la misma, de la sensibilidad del producto a la temperatura y del costo del proceso.⁽⁶⁰⁾

Se utilizan las formas naturales al aire libre o al sol, y artificialmente con aire caliente por medio de secadores y/o estufas lo cual garantiza un secado uniforme de toda la planta. En este proceso se disminuye el contenido de humedad de la planta a 0,5% - 12%. Se debe tener precaución al momento de realizar un secado artificial ya que podría darse una pérdida de aceites volátiles de ciertas plantas y la degradación de ciertas sustancias termolábiles. El método más antiguo y fácil de secado es el secado al sol, el cual es utilizado en regiones de clima cálido y seco.^(60, 61)

La temperatura de secado de las plantas puede variar entre 30°C y 60°C, pero aquellas plantas que poseen aceites esenciales u otras sustancias volátiles tienen que ser secadas a una temperatura menor a los 40°C. Por esta razón se debe determinar experimentalmente un tipo de secado para cada planta ya que al darse un secado natural o lento se va a producir alteraciones causadas por hongos, bacterias y enzimas; mientras que al darse un secado artificial o rápido va a ocasionar el endurecimiento de la superficie de la planta o de las partes utilizadas, e impedirá la evaporación del agua, lo que traerá como consecuencia la acción enzimática causando la pérdida de aceites volátiles y alterando la presencia del producto.^(60, 61)

1.10 Consideraciones generales

1. El género *Psidium* está compuesto por una gran variedad de especies donde se destaca el *P guajava L.*; siendo esta la especie más estudiada y con una gran variedad de propiedades farmacológicas.
2. La especie *P claraense Urb* manifestó en estudios farmacológicos potencialidades como antiinflamatoria y antioxidante.
3. No existe hasta el momento ningún reporte de estudios farmacognósticos de la especie *P claraense Urb* que permitan el control de calidad de la misma como droga vegetal.
4. Los estudios farmacognósticos son de gran utilidad para establecer los criterios de calidad con vistas a la estandarización del material vegetal.
5. Es importante establecer el proceso de secado adecuado de la planta para garantizar una adecuada conservación de la misma.

A decorative border featuring a climbing plant with leaves and small flowers, positioned in the bottom right corner of the page.

Materialles y Métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio farmacognóstico y fitoquímico en el Departamento de Farmacia, Facultad Química-Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en el período comprendido entre los meses de febrero y junio de 2019. Se utilizó, en todos los procedimientos desarrollados, cristalería específica de laboratorio, previamente descontaminada, equipos certificados como aptos para el uso y reactivos de calidad analítica, los cuales se muestran en el anexo 1.

2.1 Recolección y descripción del material vegetal.

Las hojas de *P. claraense* Urb. fueron recolectadas en la región de Los Diasmones de la localidad de Casilda, municipio Trinidad, provincia Sancti Spíritus, el 11 de febrero de 2019. El material recolectado fue trasladado al Laboratorio de Química Farmacéutica y lavado con abundante agua potable. El mismo fue recolectado e identificado por los especialistas Onel Benigno García Espinosa, Elonay Lisandi Mederos Yumar y Roberto Guerra Meriño.

La descripción macromorfológica se llevó a cabo según la técnica descrita por Miranda y Cuéllar,⁽⁵⁵⁾ para la cual se tomaron 100 hojas pertenecientes al material vegetal y se observó a simple vista y con ayuda de una lupa. Las hojas se clasificaron según la disposición en el tallo, el recorrido de las venas, contorno, forma del ápice, de la base, por el margen o borde, la consistencia y la superficie del limbo; se determinó además la textura, superficie, color, olor y peculiaridades que estas pudieran presentar. Se efectuaron además las mediciones de largo y ancho con ayuda de una regla y se calcularon los valores promedios.

2.2 Estandarización de secado.

El secado se realizó por tres vías: a la sombra, al sol, y mediante calor artificial utilizando estufa (Binder USA) a 40°C, extendiendo las hojas en capas delgadas sobre bandejas metálicas; para cada método se emplearon tres réplicas. El registro de secado se siguió pesando la muestra cada 12 horas hasta obtener peso constante. En todos los casos el material se removió varias veces para favorecer el secado homogéneo y evitar fermentaciones o

contaminaciones microbiológicas. Las mediciones se realizaron en balanza analítica digital Sartorius (modelo-TER4S, Alemania).

Parámetros evaluados: Para la estandarización del secado se evaluaron los siguientes parámetros: características organolépticas de la droga, pérdida en peso, tiempo de secado, humedad residual y composición química a través del tamizaje fitoquímico.

2.2.1 Determinación de las características organolépticas

Para la determinación de las características organolépticas se colocó muestra molinada de cada una de los métodos de secado sobre placas Petri y se determinó el olor y el color de cada una.

2.2.2 Determinación del contenido de humedad

Se determinó el contenido de humedad empleando el método gravimétrico. Se tomó la muestra de ensayo, se transfirió a un pesa filtro previamente tarado y se desecó a 105⁰C durante 3h. El pesa filtro se pasó a una desecadora donde se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante 1 h. Esta operación se repitió hasta obtener masa constante. Se realizaron un total de tres réplicas.

El contenido de humedad de la muestra de ensayo expresada en porciento se calculó por la fórmula siguiente:⁽⁶²⁾

$$H = \frac{M_2 - M_1}{M} 100(\%) m/m$$

M₂: Masa del pesa filtro con la muestra (g).

M₁: Masa del pesa filtro con la muestra desecada (g).

M: Masa de ensayo (g).

100: Factor matemático para los cálculos.

2.2.3 Tamizaje fitoquímico

Para evaluar la influencia del método de secado en la posible composición química de las hojas de *P. claraense* se realizó el tamizaje fitoquímico a las

muestras correspondientes a cada lote de droga resultante de cada método de secado empleado en el estudio.

Se tomaron 3 g del material vegetal seco y molido de las hojas de *P. claraense* y fueron añadidos a un balón, posteriormente se le adicionaron 30 mL de éter y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. Se realizaron extracciones sucesivas con etanol absoluto y agua destilada bajo las mismas condiciones, con la diferencia de que estos fueron colocados en zaranda marca Thys 2, durante las 24 horas siguientes. Una vez filtrados se obtuvieron los respectivos extractos etéreos, etanólicos, y acuosos. Este procedimiento se llevó a cabo para cada muestra de secado: al sol, a la sombra y en estufa.

A los extractos etéreo, alcohólico y acuoso resultantes se les realizó el tamizaje fitoquímico siguiendo los procedimientos establecidos por Miranda y Cuéllar para los ensayos para lípidos, alcaloides, coumarinas, quinonas, triterpenos y esteroides, resinas, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos y taninos, aminoácidos, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, antocianidinas, mucílagos y principios amargos.⁽⁵⁵⁾

2.3 Determinación de índices farmacognósticos

2.3.1 Determinación del contenido de humedad

Se determinó el contenido de humedad empleando el método gravimétrico siguiendo el mismo procedimiento descrito en el epígrafe 2.2.2.

2.3.2 Determinación de cenizas

2.3.2.1 Determinación de cenizas totales

En un crisol de porcelana, previamente tarado, se pesó 1g de la muestra pulverizada y tamizada. Se calentó suavemente la muestra de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incineró en un horno mufla (marca Nabertherm, de procedencia Alemana) a una temperatura de 750°C, durante siete horas. Se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó. Se repitió el proceso a partir de la incineración, hasta obtener masa constante. Para obtener masa constante el tiempo de

calentamiento y pesada se hizo a intervalos de 30 minutos.⁽⁶²⁾ Se realizaron un total de 12 réplicas para cada método de secado.

La cantidad de cenizas totales (Ct) en base anhidra se calculó por las fórmulas siguientes:

$$C_1 = \frac{M_2 - M_*}{M_1 - M} * 100 \quad C_t = \frac{C_1 * 100}{100 - H}$$

Donde:

C₁: Cenizas totales en base hidratada.

M: Masa del crisol vacío (g).

M₁: Masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M₂: Masa del crisol con la ceniza (g).

H: % de humedad.

2.3.2.2 Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas obtenidas anteriormente, se le añadieron de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapó y se hirvió suavemente a la llama del mechero durante 5 minutos. La solución se filtró a través de papel de filtro libre de cenizas, con cenizas determinadas o declaradas. El filtro con el residuo se transfirió al crisol inicial, se carbonizó en un mechero y luego se incineró en un horno mufla a 750°C durante dos horas. Posteriormente se colocó en una desecadora y cuando alcanzó la temperatura ambiente se pesó. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar peso constante.⁽⁶²⁾ Se realizó un total de seis réplicas.

La cantidad de cenizas solubles en agua (Ca) en base anhidra se calculó por la fórmula siguiente:

$$C_a = \frac{M^2 - M^4}{M^1 - M} * 100$$

Donde:

Ca: % cenizas solubles en agua en base hidratada.

M: Masa del crisol vacío (g).

M¹: Masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M²: Masa del crisol con las cenizas totales (g).

M⁴: Masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

100: Factor matemático para el cálculo.

2.3.2.3 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

A las cenizas totales se le añadieron de 15 a 20 mL de ácido clorhídrico 10%. El crisol se tapó y se hirvió suavemente durante 5 minutos. La solución se filtró a través de un papel de filtro libre de cenizas, con cenizas determinadas o declaradas, se lavó el residuo con agua caliente hasta que al añadirle al filtrado acidulado con ácido nítrico, 1 ó 2 gotas de solución de nitrato de plata 0.1 mol/L, no mostrara presencia de cloruros. El filtro con el residuo, se transfirió al crisol inicial, se carbonizó en el mechero y luego se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750°C durante dos horas. Posteriormente se colocó en una desecadora y cuando alcanzó la temperatura ambiente se pesó. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar masa constante.⁽⁶²⁾ Se realizaron un total de seis réplicas.

La cantidad de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (Ct) en base anhidra se calculó por la fórmula siguiente:

$$C_1 = \frac{M^2 - M}{M^1 - M} * 100$$

Donde:

C₁: % cenizas insolubles en ácido clorhídrico base hidratada.

M: Masa del crisol vacío (g).

M₁: Masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M₂: Masa del crisol con la ceniza (g).

100: Factor matemático para los cálculos.

2.3.3 Determinación de extractivos solubles.

Los extractivos solubles se determinaron para los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico. De la muestra previamente pulverizada y tamizada se pesaron 5 g, se transfirieron a un balón con tapa de 250 mL, se le añadieron 100 mL de agua, etanol o mezcla hidroalcohólica al 50% según corresponda. Se agitaron durante 6 h en una zaranda y se dejaron en reposo hasta el día siguiente, se agitaron durante 30 min, se dejaron reposar 30 min y se filtraron. Se tomó una alícuota de 20 mL, se transfirió a una cápsula de porcelana, se evaporó sobre baño de agua, se desecó a 105°C en una estufa por 3 h, se enfrió y se pesó la cápsula.⁽⁶²⁾ Se realizaron un total de tres réplicas.

Las sustancias solubles se calcularon por la siguiente fórmula:

$$Ss = \frac{R * 500 * 100}{M(100 - H)}$$

Donde:

Ss: Sustancias solubles.

R: Residuo.

M: Masa pesada (g).

100: Factor matemático para los cálculos.

500: Factor matemático para los cálculos.

2.4 Determinación del Índice de Polifenoles Totales (IPT)

La determinación del IPT se realizó para los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico. Se diluyó 1 mL de los extractos obtenidos en 50 mL de agua destilada. Se realizó la lectura de la absorbancia a 280 nm utilizando el espectrofotómetro (marca Thermo SCINTIFIC, modelo G10S UV-VIS, de procedencia china), como blanco se empleó agua destilada. Se realizaron un total de tres réplicas.

En el cálculo del índice se aplica la siguiente ecuación:

$$IPT = A_{280} \times 50$$

Donde:

IPT: índice de polifenoles totales.

A₂₈₀: absorbancia a 280 nm.

2.5 Determinación cuantitativa de los compuestos fenólicos totales

Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos en los extractos de *P. claraense* empleando la reacción de Folin-Ciocalteu, según el método de (Pekal y Pyrzynska 2014) con algunas variaciones, utilizando ácido gálico como compuesto fenólico de referencia.⁽⁶³⁾ Se realizaron un total de seis réplicas.

Preparación de la curva de calibración de ácido gálico: Para la curva de calibración se preparó una solución madre pesándose 10 mg de ácido gálico, estos se disolvieron en agua destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para la obtención de una disolución madre de concentración 1 mg/mL.

Se pipetearon alícuotas de 68, 136, 272, 408 y 544 μL de la disolución madre de ácido gálico. De cada una de ellas se tomaron 0,5 mL, se adicionó 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 0,3 mL de etanol y 1,1 mL de agua destilada y se encubó durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó 1 mL de Na_2CO_3 7% y 0,4 mL de agua destilada. La mezcla se homogenizó y transcurridos 30 minutos en la oscuridad se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (marca Ray-LEIGH, UV-1601) utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento sin la muestra.

Preparación de las muestras de extractos de *P. claraense*:

Extracto acuoso: a 50 μL del extracto acuoso (a concentración de 1mg/mL) se le añadieron 0,3 mL de etanol, 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,55 mL de agua. Se encubó durante 5 minutos y posteriormente se le añadió 0,4 mL de agua y 1mL de Na_2CO_3 7%. La mezcla se homogenizó y transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro, utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento pero sin la muestra.

Extracto etanólico: a 50 μL del extracto etanólico (a concentración de 1mg/mL) se le añadieron 0,25 mL de etanol, 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,6 mL de agua. Se encubó durante 5 minutos y posteriormente se le añadió 0,4 mL de agua y 1mL de Na_2CO_3 7%. La mezcla se homogenizó y transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro, utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento pero sin la muestra.

Extracto hidroalcohólico: a 50 μL del extracto hidroalcohólico (a concentración de 1mg/mL) se le añadieron 275 μL de etanol, 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1575 μL de agua. Se encubó durante 5 minutos y posteriormente se le añadió 0,4 mL de agua y 1mL de Na_2CO_3 7%. La mezcla se homogenizó y transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro, utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento pero sin la muestra.

La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración del ácido gálico y se

expresó como miligramos de contenido fenólico equivalentes a ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ES).

2.6 Determinación cuantitativa del contenido de flavonoides totales

Se determinó el contenido total de flavonoides en los extractos de *P. claraense*, según la literatura descrita por (Pękal y Pyrzyńska, 2014) con algunas variaciones, utilizando quercetina como compuesto de referencia.⁽⁶³⁾ Se realizaron un total de tres réplicas.

Preparación de la curva patrón de quercetina: Para la curva de calibración se preparó una solución madre pesándose 0,5 mg de quercetina, estos se disolvieron en etanol y se enrasó a un volumen de 10 mL para la obtención de una disolución madre de concentración 0,05 mg/mL.

Se pipetearon las alícuotas correspondientes de la disolución madre de quercetina para la obtención de concentraciones de 2,4,6,8 y 10 µg/mL. De cada una de ellas se tomaron 2,5 mL y se le añadió 1,25 mL de AlCl₃ y 1,25 mL de agua. El AlCl₃ fue preparado en etanol. La mezcla se homogenizó y transcurridos 10 minutos se midió la absorbancia a 420 nm contra un blanco de solución hidroalcohólica.

Preparación de las muestras de extractos: A 2,5 mL de extracto se le añadieron 1,25 mL de agua y 1,25 mL de AlCl₃. La mezcla se homogenizó y transcurridos 10 minutos se midió la absorbancia a 420 nm contra un blanco de solución hidroalcohólica. No se realizó prueba control para excluir en los cálculos la contribución a la absorbancia de los extractos en ausencia de AlCl₃ ya que este queda estandarizado en la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg de quercetina equivalente por gramo de extracto seco (mgQE/gES).

2.7. Caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico

Para el análisis de los parámetros físico-químicos fueron consideradas las propiedades organolépticas (olor y color), el análisis del pH, sólidos totales, índice de refracción, análisis capilar y densidad relativa.

2.7.1 Determinación del olor

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1cm de anchura por 10cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se dejó evaporar y se determinó su olor.⁽⁶⁴⁾

2.7.2 Determinación del color

Se tomó un tubo para ensayos bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.⁽⁶⁴⁾

2.7.3 Determinación del pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro (Hanna Instruments) en la muestra y se realizó la lectura.⁽⁶⁴⁾ Se realizó un total de tres réplicas.

2.7.4 Determinación del índice de refracción

Se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio sin cantos agudos, se ajustó el refractómetro (Atago) seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas.⁽⁶⁴⁾

2.7.5 Determinación de la densidad relativa

Se determinó la densidad relativa a las tres muestras de ensayo con un densitómetro (Density Specific Gravity Meter, DA-130N, Kyoto). Se realizaron un total de tres mediciones.

2.7.6 Análisis capilar

Se vertieron 20 mL de la muestra de ensayo en un vaso para precipitado de 100 mL de aproximadamente 5 cm de diámetro y 70 cm de altura y se introdujo en la cámara protectora.

Se colocó una banda de papel de filtro (Whatman # 1) de 4 cm de ancho por 15 cm de longitud verticalmente de manera que su borde superior estuviese fijado a una varilla metálica que permitiera la suspensión de la tira de papel y su extremo inferior sumergido dentro de la muestra de ensayo pero sin tocar el fondo ni las paredes del recipiente.

Se cerró la cámara y se dejaron transcurrir dos horas; finalizado este tiempo se retiró el papel y se dejó secar. Una vez seco se procedió a su inspección visual y caracterización.⁽⁶⁴⁾

Para el análisis e interpretación de la imagen se tuvieron en cuenta los aspectos siguientes: color, altura, descripción de las diferentes partes, cambios de coloración con vapores de amoníaco y examen bajo la luz ultravioleta.

2.7.7 Determinación de sólidos totales

De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirieron 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en baño de agua y se evaporó hasta que el residuo estuvo aparentemente seco; posteriormente se pasó a una estufa a una temperatura de 105°C durante tres horas.

Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el proceso anterior las veces necesarias, hasta obtener masa constante.⁽⁶⁴⁾ Se realizaron un total de tres réplicas.

Los sólidos totales (St) se calcularon mediante la fórmula siguiente:

$$St = \frac{Pr - P}{V} * 100$$

Donde:

Pr: Masa de la cápsula más el residuo (g).

P: Masa de la cápsula vacía (g).

V: Volumen de la porción de ensayo (mL).

100: Factor matemático para los cálculos.

2.7.8 Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico

Se realizó el tamizaje fitoquímico siguiendo la misma metodología descrita en el epígrafe 2.2.3.

2.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media aritmética \pm desviación estándar ($X \pm SD$). Los gráficos se construyeron en el tabulador electrónico profesional Microsoft Windows Excel 2013. Los datos procedentes de la estandarización de secado, extractivos solubles, IPT y cuantificación de fenoles y flavonoides fueron procesados en el software IBM: SPSS Statistics, versión 23 del 2015, mediante un análisis de varianza utilizando un test paramétrico de ANOVA One-Way. Se estableció un nivel de significación de $p < 0.05$ para considerar significativos los resultados en todas las pruebas aplicadas.

Resultados y Discusión



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Recolección y descripción del material vegetal

La recolección se realizó en horas tempranas de la mañana, y se ejecutó de forma manual, como se recomienda para plantas silvestres, siguiendo las buenas prácticas para este proceso establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), de esta manera se garantizó la calidad del material vegetal. Se procuró tomar las hojas y dejar ramas suficientes que garantizaran el normal desarrollo de la planta y un uso sostenible de este recurso.

El material vegetal se colectó en buen estado vegetativo y exento de materias extrañas. Las hojas recolectadas se lavaron cuidadosamente con agua potable garantizando la limpieza del mismo.

Posteriormente se procedió a la determinación de las características macromorfológicas de las hojas y se compararon con las reportadas por la literatura, los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características macromorfológicas de las hojas de *P. claraense* y las reportadas por la literatura (León, 1953).⁽⁵²⁾

Parámetros	Casilda, Trinidad	León, 1953
Textura	Suave	---
Color	Verde intenso en el haz y un poco más claro en el envés	---
Olor	Intenso a guayaba	---
Disposición en el tallo	Alternas	---
Recorrido de las venas	Palminervias	---
Pecíolo	Cortamente pecioladas	Pecíolo estrecho
Contorno o forma	Elípticas	Ovalelípticas
Forma del ápice	Cuspidado	Brevemente acuminadas en el ápice obtusito
Forma de la base	Aguda	Aguda
Borde del limbo	Entero	---
Presencia de pelos	No	No
Dimensiones de las hojas	Largo: 5,22 ± 0,56 cm Ancho: 2,31 ± 0,29 cm	Largo:--- Ancho: 2-2,7cm

Los resultados del estudio macromorfológico realizado a las hojas concuerdan en términos generales con la descripción reflejada en la literatura,⁽⁵²⁾ aunque

hay ciertas diferencias en cuanto a terminologías. No obstante, debido a la escasa literatura de referencia hay características que no pudieron ser comparadas, estableciéndose por primera vez para la especie.

3.2 Estandarización del secado

El proceso de secado es indispensable en los estudios farmacognósticos puesto que, un contenido de agua excesivo, puede provocar la activación de enzimas y crear condiciones favorables para la proliferación de microorganismos e insectos.⁽⁵⁵⁾

Aunque se conoce que el secado artificial es el más recomendado en todos los casos, resulta conveniente estudiar otros métodos de secado natural que permitan, de ser posible, proponer una alternativa que se tenga en cuenta en aquellos lugares donde no existan condiciones para aplicar un secado artificial, debido al gasto energético que supone.⁽⁶⁵⁾

La planta objeto de estudio fue sometida a tres métodos de secado: al sol, a la sombra y en la estufa a 40°C. Para cada caso se realizaron tres réplicas, las cuales fueron promediadas para obtener el gráfico que mejor describe este proceso, el cual se muestra en el gráfico 1.

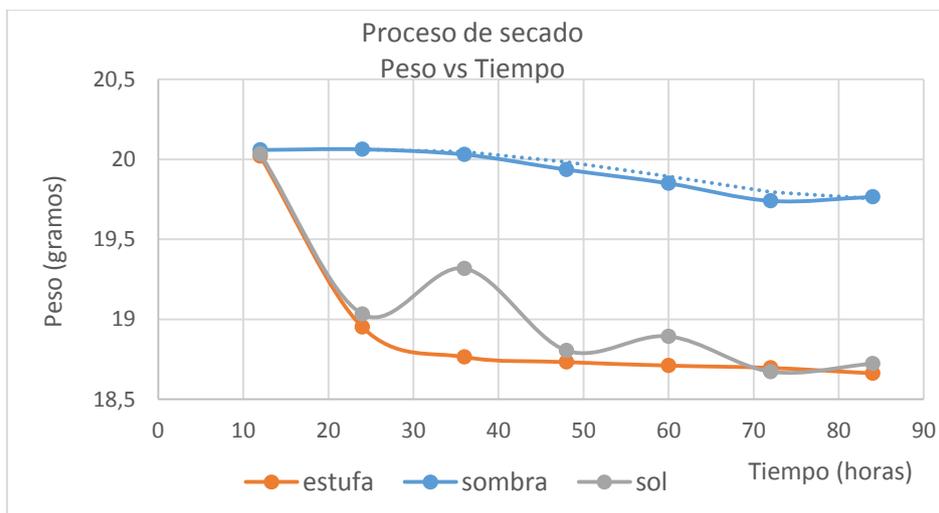


Gráfico 1. Estandarización del secado.

Igualmente se determinó la pérdida en peso, los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Pérdida en peso durante la estandarización del secado.

Métodos de secado	Pérdida en peso (%) $\bar{x} \pm SD$
sol	6,54 \pm 0,32 ^a
sombra	1,46 \pm 0,03 ^b
estufa	6,78 \pm 0,06 ^a

Leyenda: \bar{x} : media; SD: desviación estándar. Letras iguales representan que no hay diferencias estadísticamente significativas y letras diferentes que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($p < 0,05$).

En cuanto al tiempo de secado las hojas que se secaron en la estufa mostraron peso constante al cabo de las 48 horas aproximadamente, mientras que el secado al sol y a la sombra tomó más tiempo; 72 horas (3 días). La mayor pérdida en peso se mostró en el secado al sol y a la estufa con 6,54% y 6,78% aproximadamente, valores bastantes cercanos, mientras que las hojas secadas a la sombra solo perdieron un 1,46% de su peso.

Comparando el secado al sol y a la sombra se puede decir que el secado al sol muestra mejores resultados en cuanto a la pérdida en peso, mostrando diferencias estadísticamente significativas, debido fundamentalmente a la incidencia de las radiaciones solares, aunque mostró variaciones en el secado, debido principalmente a los cambios de temperatura y humedad ambiental, razón por la cual la planta podría captar agua y aumentar su peso. En el caso del secado en la estufa este es más rápido y homogéneo, ya que las hojas se encuentran sometidas a un proceso de secado con temperatura y ventilación constantes.

Las diferencias encontradas entre métodos se atribuyen a que las técnicas de secado natural (sol y sombra) son susceptibles a la influencia de diversos factores entre los que se pueden citar los niveles de radiación solar, temperatura y humedad ambiental. El secado en estufa, al ser un método artificial, existe control de la temperatura y la ventilación, no influyendo por tanto factores ambientales en el proceso.⁽⁶⁵⁾

En la literatura se refiere a estudios similares para especies del mismo género como *P. guajava*, mostrando el método de secado en la estufa los mejores resultados, coincidiendo con el presente estudio.⁽⁶⁶⁾

3.2.1 Características organolépticas

Una vez seco el material vegetal este se molinó en un molino de cuchillas (IKA Werke) a 3000 rpm utilizando un tamiz de 3 mm. El polvo mostró un color verde seco sin variaciones en relación al método de secado empleado, tal como se muestra en la figura 3.

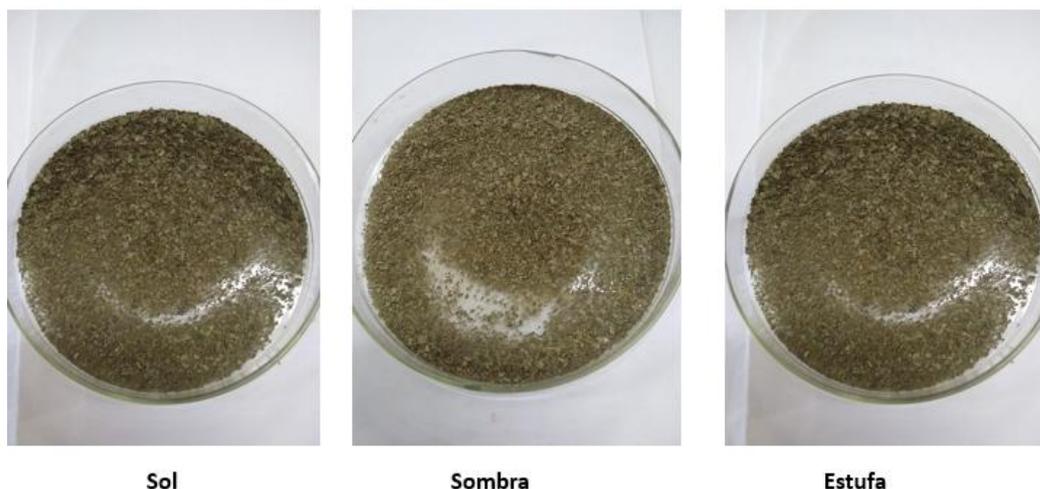


Figura 3. Material vegetal molinado procedente de las hojas de *P. claraense* Urb.

Las tres muestras conservaron un olor aromático intenso similar a la menta. Estas características no presentaron diferencias apreciables en ninguno de los métodos.

3.2.2 Determinación del contenido de humedad residual

La determinación de humedad residual en el material vegetal es uno de los índices numéricos que ayudan a complementar la calidad del método de secado evaluado. Un exceso de agua en la droga puede provocar la proliferación de microorganismos e insectos, seguido de la hidrólisis de principios activos, específicamente de los metabolitos glicosilados, y por consiguiente el deterioro de la droga.⁽⁶⁵⁾

El contenido de humedad se determinó según el método gravimétrico, realizándose tres réplicas para cada uno de los métodos de secado. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Determinación de humedad para cada uno de los métodos de secado.

Método de secado	Humedad (%) $\bar{x} \pm SD$
Sombra	8,29 \pm 0,88 ^a
Sol	7,05 \pm 0,44 ^a
Estufa	5,67 \pm 0,68 ^b

Leyenda: \bar{x} : media; SD: desviación estándar. Letras iguales representan que no hay diferencias estadísticamente significativas y letras diferentes que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($p < 0,05$).

Las farmacopeas establecen un contenido de humedad entre un 8-14%,⁽⁵⁵⁾ mientras que otros autores refieren un límite óptimo menor del 10 %.⁽⁶⁷⁾ En este caso la droga correspondiente a los tres métodos se encuentran por debajo de los límites establecidos, presentando el método de secado en la estufa el menor valor, esto se explica debido a que el secado en estufa es mucho más homogéneo y la humedad y temperatura se mantienen constantes, además se minimiza la influencia de factores ambientales como las radiaciones solares, las variaciones de temperatura y la humedad ambiental.⁽⁶⁵⁾

Al no existir un material de referencia para este estudio se compara con *P. guajava*, al cual se le realizó una estandarización de secado empleando también los métodos de secado al sol, a la sombra y en estufa. Como parámetro indicativo de un buen proceso de secado se determinó la humedad residual mostrando valores de 13,0%, 13,7% y 7,5% para los métodos de secado al sol, a la sombra y en estufa respectivamente, mostrando este último los mejores resultados.⁽⁶⁶⁾

El secado al sol y a la sombra están sometidos a la variación de los factores ambientales antes mencionados por lo que su contenido de humedad se espera que sea mayor; no obstante, los valores obtenidos para estos dos métodos, al cumplir los límites establecidos, pueden emplearse para el secado de la planta como otra alternativa más económica en cuanto a gasto energético pero menos rentable en función del tiempo.

3.2.3 Tamizaje fitoquímico

Uno de los aspectos considerados de interés en el estudio de una droga es conocer de forma preliminar su composición química general por medio del tamizaje fitoquímico.

Para su realización se obtuvieron los extractos etéreo, alcohólico y acuoso. El método de extracción que se empleó fue el método de extracción por maceración ya que es muy sencillo de realizar, no se ven afectados los metabolitos por la acción del calor y además no es determinante el grado de trituración de la droga.⁽⁵⁵⁾

Se realizaron extracciones sucesivas para cada uno de los métodos de secado con solventes de diferente polaridad: éter, etanol y agua, presentando el extracto etéreo un color verde oscuro, el extracto etanólico color verde amarillo y el extracto acuoso un color pardo rojizo. Los resultados del tamizaje fitoquímico se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultado del tamizaje fitoquímico.

Metabolito	Ensayo	Extracto etéreo			Extracto alcohólico			Extracto acuoso		
		So	S	E	So	S	E	So	S	E
Alcaloides	Dragendorff	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácidos grasos	Sudán III	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Coumarinas	Baljet	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Triterpenos y esteroides	Liebermann-Burchard	NP	NP	NP	+	+	+	NP	NP	NP
Flavonoides	Shinoda	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Resinas	Resinas	NP	NP	NP	-	-	-	-	-	-
Saponinas	Espuma	NP	NP	NP	-	-	-	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	NP	NP	NP	-	-	-	-	-	-
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	NP	NP	NP	+	+	+	+	+	+
Aminoácidos libres	Ninhidrina	NP	NP	NP	-	-	-	-	-	-
Azúcares reductores	Fehling	NP	NP	NP	++	++	++	++	++	++
Quinonas	Borntrager	NP	NP	NP	++	++	++	++	++	++
Antocianidinas		NP	NP	NP	+	+	+	NP	NP	NP

Leyenda: (+): indica presencia del fitocompuesto, (-): indica ausencia del fitocompuesto, NP: no procede, So: sombra, S: sol y E: estufa.

La realización de este tamizaje fitoquímico no mostró diferencias para los diferentes métodos de secado utilizados, revelando la presencia de varios compuestos como flavonoides, taninos, azúcares reductores, coumarinas, quinonas, antocianidinas, triterpenos y esteroides y ácidos grasos, coincidiendo con los reportados en un estudio anterior que se realizó con esta planta.⁽⁸⁾

El ensayo para alcaloides mostró diferencias en cuanto a sus resultados con lo reportado por Marrero en el 2017⁽⁸⁾ dando evidencias de su presencia en los tres extractos evaluados para cada uno de los métodos. Es importante destacar que si bien este tipo de metabolito no había sido identificado para *P. claraense*,⁽⁸⁾ sin embargo sí se ha referido su presencia en otras especies del mismo género como *P. guajava* L.⁽⁶⁸⁾ y *Psidium cattleianum* Sabine⁽⁶⁹⁾ y resulta de gran interés por sus propiedades como posible depresor del Sistema Nervioso Central,⁽⁵⁵⁾ entre otras acciones.

Además muchas plantas que contienen alcaloides son usadas como analgésicas,⁽⁷⁰⁾ y antiinflamatorias⁽⁷¹⁾ y los alcaloides cuaternarios y sus derivados han demostrado tener actividad antimalárica.⁽⁷⁰⁾ Vinblastina y vincristina son alcaloides ampliamente utilizados en el tratamiento de la leucemia infantil y el linfoma de Hodgkin.⁽⁷²⁾ Los alcaloides también han demostrado ser de utilidad en el tratamiento de los síntomas y progresión de ciertas enfermedades como el Alzheimer.⁽⁷³⁾

Los resultados contradictorios para este metabolito sugieren que deberá profundizarse en investigaciones futuras en el estudio de este compuesto en las muestras de la especie que crecen en la región, debido a que existen otros factores que pueden variar la composición de metabolitos como los nutrientes, la disponibilidad hídrica, la altitud y el ataque de patógenos.⁽⁷⁴⁾

Después de analizar los parámetros evaluados para la estandarización del secado de las hojas de *P. claraense* se puede llegar a la conclusión de que el método de secado en estufa es el más adecuado para secar el material vegetal. Aunque los tres métodos mostraron no diferir en la composición química de las hojas y los valores de humedad se encuentran dentro del rango establecido por la literatura, el método de secado en estufa conserva las características organolépticas de la droga, muestra el menor valor de humedad residual, además de una mayor pérdida en peso, un secado más homogéneo y en menor tiempo.

No obstante, se propone como alternativa el método de secado al sol en aquellos lugares donde no sea posible realizar el secado artificial en estufa,

debido a que no se muestran alteraciones aparentes en la composición química de los metabolitos ni en las características organolépticas de la droga, la pérdida en peso no presenta diferencias estadísticamente significativas a la de la estufa y su valor de humedad se encuentra dentro de los límites establecidos por la literatura.⁽⁵⁵⁾

3.3 Determinación de índices farmacognósticos

Dentro del estudio farmacognóstico de una droga se encuentra la determinación de un conjunto de parámetros físico-químicos, los cuales son indispensables para garantizar su calidad y pureza, lo que se traduce en el valor intrínseco de la misma.

3.3.1 Determinación de humedad residual y cenizas

La determinación del contenido de humedad y cenizas se llevó a cabo para el material vegetal secado en la estufa. Se realizaron un total de 6 réplicas para cenizas totales y para cenizas solubles en agua, cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10% y humedad residual 3 réplicas en cada caso. En la tabla 5 se muestran los resultados.

Tabla 5. Determinación de humedad residual y cenizas.

Parámetros	Resultados (%) $x \pm SD$
Humedad residual	5,67 \pm 0,68
Cenizas totales	4,41 \pm 0,18
Cenizas solubles en agua	0,69 \pm 0,16
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10%	0,78 \pm 0,48

Leyenda: x: media; SD: desviación estándar.

El valor de humedad residual, como ya se había explicado en 3.2.2. se encuentra dentro del límite establecido por las farmacopeas,⁽⁵⁵⁾ lo cual indica la calidad del método de secado evaluado.

Las cenizas son indicativas de la calidad del material con que se trabaja y constituye una base para juzgar su pureza e identidad, brindando información relativa a la posible adulteración con materias inorgánicas o cuerpos extraños que posea.⁽⁵⁵⁾

Algunas literaturas plantean un índice de cenizas totales hasta el 5%,⁽⁵⁵⁾ mientras otras establecen un límite de hasta 14%.⁽⁷⁵⁾ Para plantas de la familia *Myrtaceae* como el eucalipto y la guayaba se plantea un máximo de cenizas de un 6 y un 10% según la Farmacopea Británica⁽⁷⁶⁾ y el Formulario Nacional de fitofármacos y apifármacos⁽⁶⁾ respectivamente.

No existen referentes en la literatura de este parámetro para la especie vegetal en estudio, sin embargo si lo comparamos con los límites exigidos y con los referidos para especies de la familia el valor es menor ($4,41 \pm 0,18$). Por lo general, las cenizas totales se componen de carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice.⁽⁷⁷⁾ El contenido de cenizas totales es importante e indica, en cierta medida, el cuidado que se ha tenido en la preparación de la droga.

En el caso en estudio se tuvo especial cuidado en la selección y tratamiento del material vegetal, lavando con agua potable y eliminando toda la materia extraña.

La cantidad de cenizas solubles en agua y las insolubles en ácido clorhídrico al 10%, son también parámetros que ayudan a evaluar la pureza de la droga. Al analizar los resultados se pudo evidenciar que las cenizas solubles en agua mostraron un valor de $0,69 \pm 0,16$ y las cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10% un valor de $0,78 \pm 0,48$. En ambas determinaciones los valores son pequeños y están dentro de los límites establecidos (alrededor del 2% para plantas medicinales).⁽⁷⁵⁾

3.3.2 Determinación de extractivos solubles

La determinación de sustancias extraíbles o solubles es uno de los índices numéricos más importantes para seleccionar los mejores disolventes en el proceso de extracción.⁽⁶⁵⁾ Se determinaron los extractivos solubles de los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico procedentes del método de secado en la estufa. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Extractivos solubles (%) obtenidos para los extractos de *P. claraense*.

Extractos	Resultados (%) $\bar{x} \pm SD$
Acuoso	16,57 \pm 0,87 ^a
Alcohólico	19,42 \pm 1,29 ^b
Hidroalcohólico	30,09 \pm 0,99 ^c

Leyenda: \bar{x} : media; SD: desviación estándar. Letras iguales representan que no hay diferencias estadísticamente significativas y letras diferentes que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($p < 0,05$).

En estudios anteriores⁽⁸⁾ se determinaron las sustancias solubles o extraíbles para el extracto acuoso y alcohólico mostrando este último los mejores resultados, lo cual concuerda con este estudio. El extracto hidroalcohólico mostró resultados superiores a los obtenidos previamente para los extractos acuoso y alcohólico (30,0976% \pm 0,99).

El mayor porcentaje de sustancias extraíbles encontrados en este extracto es debido a la afinidad de los constituyentes de esta droga por esta mezcla hidroalcohólica 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.⁽⁶⁷⁾

Anteriormente no se ha estudiado un extracto hidroalcohólico para esta planta pero sí para *P. guajava*, especie de referencia en el género, mostrando valores similares (30,70 %, 29,84 %, 30,30 % y 29,56 %) evaluado en cuatro regiones diferentes.⁽⁶⁶⁾ Otros estudios han evaluado el comportamiento de las sustancias solubles en varios extractos concluyendo que las mezclas hidroalcohólicas son las que presentan un mayor porcentaje de sustancias solubles.^(58, 78)

Mediante el empleo de los métodos físico-químicos de análisis descritos anteriormente puede determinarse y establecerse de manera preliminar los índices de calidad de la droga evaluada. Adicionalmente el estudio aporta elementos que permiten completar su identificación. Todos estos índices una vez estandarizados y determinadas las especificaciones de calidad pueden constituir valores de referencia para estudios posteriores con este material vegetal.

3.4 Determinación del índice de polifenoles totales.

El fundamento de esta técnica analítica se basa en la obtención del índice por la medida de la absorbancia a 280 nm (UV), porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda.⁽⁷⁹⁾ Los resultados de este índice para cada uno de los extractos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. IPT obtenidos para los extractos de *P. claraense*.

Extractos	Resultados $x \pm SD$
Acuoso	$53,0 \pm 1,02^a$
Alcohólico	$52,2 \pm 0,84^a$
Hidroalcohólico	$55,9 \pm 1,23^b$

Leyenda: x: media; SD: desviación estándar. Letras iguales representan que no hay diferencias estadísticamente significativas y letras diferentes que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($p < 0,05$).

Los valores del IPT usualmente están comprendidos entre 6 y 120, indicando que a mayor valor, mayor será la riqueza fenólica.⁽⁸⁰⁾ Los resultados obtenidos en el presente estudio indican una significativa presencia de estos metabolitos en los extractos evaluados. En un estudio realizado en el año 2017 se determinó el índice de IPT para *P. claraense* mostrando valores similares.⁽⁸⁾

El IPT calculado para el extracto hidroalcohólico mostró valores superiores a los obtenidos para los extractos alcohólico y acuoso y aunque no resulte una medida exacta del contenido de fenoles puede inferir que este extracto presente una mayor concentración de estos metabolitos.

Aunque este parámetro resulta solo una medida preliminar del posible contenido fenólico presente en extractos naturales dado su sencillez y rapidez en la realización, puede emplearse tanto para el control de la calidad de extractos naturales como en el tamizaje de plantas con compuestos fenólicos.⁽⁷⁹⁾

3.5 Determinación del contenido de compuestos fenólicos

El ensayo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales, es una técnica que ha llegado a ser la más utilizada para determinar de manera cuantitativa a los polifenoles. Este método consiste básicamente en generar

color a través de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu en un medio alcalino a una determinada muestra.⁽³²⁾

El contenido total de compuestos fenólicos se calculó empleando la curva de calibración del ácido gálico como patrón, la cual se muestra en el gráfico 2.

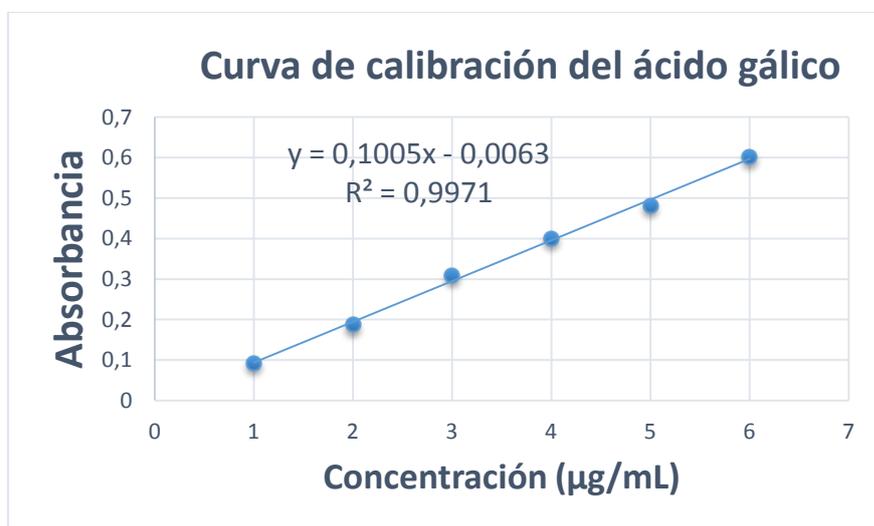


Gráfico 2. Curva de calibración del ácido gálico.

El contenido total de compuestos fenólicos para los extractos de *P. claraense* se muestra en la tabla 8. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto seco (mgEAG/gES).

Tabla 8. Cuantificación del contenido de fenoles totales (mgEAG/gES).

Extractos	Resultados (mgEAG/gES) $\bar{x} \pm SD$.
Alcohólico	55,89 \pm 2,33 ^a
Acuoso	63,61 \pm 7,41 ^a
Hidroalcohólico	102,64 \pm 1,69 ^b

Leyenda: \bar{x} : media; SD: desviación estándar. Letras iguales representan que no hay diferencias estadísticamente significativas y letras diferentes que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($p < 0,05$).

En estudios anteriores⁽⁸⁾ se determinó el contenido de fenoles para el extracto etanólico de *P. claraense* mostrando valores muy inferiores a los obtenidos en el presente estudio (10,19 \pm 0,36 mgEAG/gES). Estas diferencias pueden deberse a que las plantas responden a variaciones ambientales, como las causadas por la época del año, la fertilización y los daños ocasionados por plagas y enfermedades, lo cual influye en la producción de metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica. Igualmente la producción de

estos compuestos se ve afectada por el estado fenológico de la planta, siendo la hoja joven el estado fenológico ideal para la cuantificación de estos metabolitos.⁽⁴⁴⁾

Otros factores que pueden influir son el proceso de floración, lo cual demanda una alta disponibilidad de estos metabolitos para apoyar dicho proceso y la humedad, la cual depende fundamentalmente del régimen de precipitaciones. El agua es la encargada de transportar los principios solubles que se encuentran en el suelo e interviene en la síntesis de metabolitos primarios que son el punto de partida en la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre ellos, los compuestos fenólicos.⁽⁶⁵⁾

La cuantificación de compuestos fenólicos arrojó mayores resultados para el extracto hidroalcohólico ($102,64 \pm 1,69$ mgEAG/gES), sin referencias para el caso del *P. claraense*, pero sí para *P. guajava* L., al cual se le cuantificó el contenido de fenoles mostrando valores de $90,7146$ mgEAG/gES,⁽⁴⁴⁾ inferiores a los hallados en este estudio.

En la literatura existen varios estudios donde señalan que regularmente los extractos orgánicos polares tienen de 3 a 4 veces más fenoles totales que los extractos acuosos.^(81, 82) La cantidad de fenoles totales, flavonoides y taninos tienen una relación directa con el poder reductor y actividad antirradical de los extractos.⁽⁸³⁾ Consecuentemente, se puede establecer que la actividad antioxidante sugerida para la especie pudiera ser más marcada en el extracto hidroalcohólico.

En estudios anteriores⁽⁸⁴⁾ se cuantificó el contenido de fenoles para especies de la familia *Myrtaceae* como *Psidium cattleianum* Sabine y *Eugenia pyriformis* Cambess mostrando valores inferiores a los encontrados en este estudio: $37,13 \pm 3,35$ (mgEAG/gES) y $34,82 \pm 0,74$ (mgEAG/gES) respectivamente.

3.6 Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se calculó empleando la curva de calibración de quercetina como patrón, la cual se muestra en el gráfico 3.

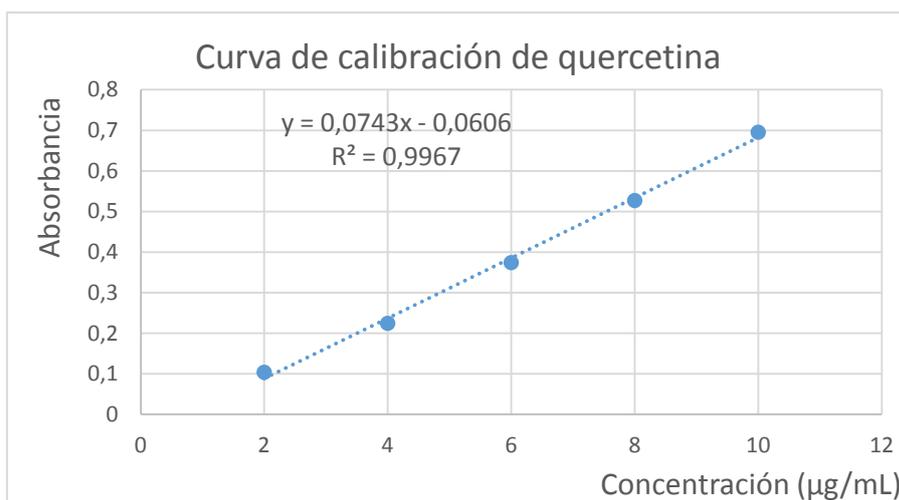


Gráfico 3. Curva de calibración de quercetina.

El contenido total de flavonoides para los extractos de *P. claraense* se muestran en la tabla 9. Los resultados se expresaron como miligramos de quercetina equivalentes por gramos de extracto seco (mgQE/gES).

Tabla 9. Cuantificación del contenido de flavonoides totales (mgQE/gES).

Extractos	Resultados (mgQE/gES) $\bar{x} \pm SD$
Alcohólico	5,55 \pm 0,11 ^a
Acuoso	3,34 \pm 0,16 ^b
Hidroalcohólico	7,04 \pm 0,19 ^c

Leyenda: \bar{x} : media; SD: desviación estándar. Letras iguales representan que no hay diferencias estadísticamente significativas y letras diferentes que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($p < 0,05$).

El contenido de flavonoides totales no ha sido cuantificado anteriormente para la especie, por lo que no existen referencias en la literatura sobre este parámetro. Los resultados muestran que el contenido de flavonoides totales es superior en el extracto hidroalcohólico, en correspondencia con el resultado hallado en la cuantificación de fenoles. En este caso el contenido de flavonoides mostrado por dicho extracto resultó inferior a los descritos para el *P. guajava* (17,05 mgQE/gES)⁽⁴⁴⁾ pero superiores al encontrado en especies de la misma familia como *Eugenia claraense* (3,21 mgEQ/gES).⁽⁵⁸⁾

La confirmación cuantitativa de la presencia de estos metabolitos reviste una gran importancia para la planta en estudio ya que un gran número de autores relacionan la presencia de estos, en múltiples especies de plantas medicinales,

con propiedades farmacológicas, entre las cuales se destaca la actividad antioxidante.^(83, 85)

Una vez analizados los extractos empleados en el estudio se llegó a la conclusión de que el extracto hidroalcohólico presenta los mejores resultados en cuanto a extractivos solubles, índice de polifenoles totales y cuantificación de fenoles y flavonoides por lo que se decidió establecer su caracterización.

3.7 Caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico

Debido a que el extracto hidroalcohólico muestra los mejores resultados se decidió realizar su caracterización físico-química con vistas a establecer sus parámetros de calidad para investigaciones futuras. Para esto se determinaron las características organolépticas como color y olor, el pH, densidad relativa, índice de refracción, sólidos totales y análisis capilar.

El extracto hidroalcohólico obtenido presenta un color pardo oscuro, con cierta opalescencia y olor característico. Los resultados de la determinación del pH, índice de refracción, sólidos totales y densidad relativa se muestran en la tabla siguiente tabla.

Tabla 10. Resultados de la caracterización físico-química del extracto hidroalcohólico.

Parámetros	Resultados $x \pm SD$
pH	5,30 \pm 0,025
Densidad relativa (g/cm ³)	0,931 \pm 0,021
Índice de refracción	1,359 \pm 0,000
Sólidos totales (%)	3,4033 \pm 0,015

Leyenda: x: media; SD: desviación estándar.

El valor de pH obtenido^(5,30) denota un carácter ácido débil, justificado por la presencia de compuestos resultantes de la extracción que aportan estas características, o bien debido a la combinación de las características ácidas y básicas de los diferentes grupos de familias químicas presentes en el medio, todas identificadas en el tamizaje fitoquímico.

Entre los compuestos identificados que aportan características ácidas se encuentran los flavonoides, fenoles y taninos.⁽⁷⁸⁾ Este valor de pH obtenido puede ser óptimo para el desarrollo de futuras formulaciones para la piel ya que se encuentra dentro del rango reportado por Achman, Herbert y Kaing (5-6).⁽⁸⁶⁾

La variable sólidos totales resulta de gran importancia a monitorear cuando de una planta se pretende extraer la mayor cantidad de metabolitos presentes en la misma.⁽⁸⁶⁾ Aunque este parámetro, al igual que el pH, densidad relativa e índice de refracción no se encuentran normados para este extracto podemos plantear que son adecuados tomando en consideración la correspondencia con resultados obtenidos para extractos de *P. guajava*, tal como se muestra en la tabla 11.⁽⁶⁶⁾

Tabla 11. Parámetros físico-químicos del extracto fluido de *Psidium guajava* L.

Parámetros	Resultados
pH	5,24
Densidad relativa (g/cm ³)	0,957
Índice de refracción	1,367
Sólidos totales (%)	5,50

Los resultados del análisis capilar del extracto hidroalcohólico muestran una imagen poco coloreada, alta (altura de más de 8 cm), con una franja poco visible, festonada. La subfranja es de color blanco y la banda y subdanda de color amarillo claro, no mostrándose diferencias entre ellas. No se observan cambios de coloración con vapores de amoníaco y al someterlo a la luz ultravioleta presenta fluorescencia violácea para la subfranja y fluorescencia verde en la franja. Estas características pueden observarse en la figura 4.

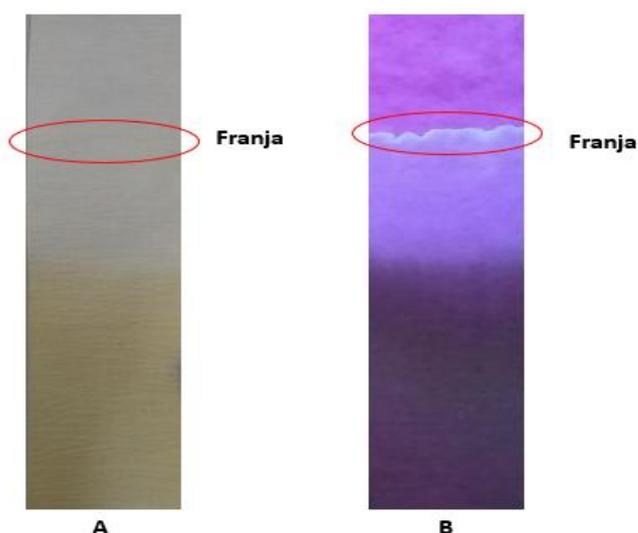


Figura 4. Resultados del análisis capilar.
A: sin luz UV; B: con luz UV

Los resultados obtenidos en las determinaciones antes explicadas no pueden ser comparados, pues no existen reportes de estudios similares para la especie en estudio, de ahí que estos constituyan la base científica para el fundamento de investigaciones futuras sobre el tema y la especie.

3.7.1 Tamizaje fitoquímico

Los resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto hidroalcohólico se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Resultado del tamizaje fitoquímico para el extracto hidroalcohólico.

Metabolito	Ensayo	Resultado
Alcaloides	Dragendorff	+
Ácidos grasos	Sudán III	-
Coumarinas	Baljet	++
Triterpenos y esteroides	Liebermann- Burchard	+
Flavonoides	Shinoda	+
Resinas	Resinas	-
Saponinas	Espuma	+
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	-
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+
Aminoácidos libres	Ninhidrina	-
Azúcares reductores	Fehling	++
Quinonas	Borntrager	++
Antocianidinas		+

Leyenda: (+): indica presencia del fitocompuesto y (-): indica ausencia del fitocompuesto.

Los resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto hidroalcohólico mostró semejanzas en comparación con el acuoso y el alcohólico en cuanto a los ensayos de alcaloides, flavonoides, taninos, azúcares reductores, coumarinas, quinonas, antocianidinas, triterpenos y esteroides.

Con respecto al potencial biológico atribuido a las clases de metabolitos encontradas en el presente estudio, se sabe que el uso de plantas medicinales que contienen flavonoides es amplio y, aunque algunos estudios han demostrado que ciertos flavonoides pueden tener efecto mutagénico, en general, se consideran beneficiosos, siendo utilizados por sus propiedades antitumorales, antivirales, antihemorrágicas, hormonales, antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes.⁽⁸⁷⁾

Los taninos presentan propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica.⁽⁵⁵⁾ Por vía interna se emplean como antidiarreicos, favoreciéndose esta actividad por cierto efecto antiséptico, ya que precipitan los enzimas extracelulares secretados por los microorganismos causantes de las infecciones, lo que hace que sean de utilidad en diarreas infecciosas.⁽⁵⁵⁾ Las plantas ricas en taninos son conocidas por sus propiedades antihemorrágicas, antiinflamatorias, y por su uso para la hipertensión, el reumatismo, la gastritis, las úlceras y los trastornos renales; mientras que las que poseen triterpenos tienen gran utilidad como antihiperalgésicos, antiinflamatorios y antimicrobianos.⁽⁸⁷⁾

Los azúcares reductores igualmente son de gran importancia puesto que mono y disacáridos, como la glucosa, actúan como combustibles biológicos, aportando energía inmediata a las células; es la responsable de mantener la actividad de los músculos, la temperatura corporal, la presión arterial, el correcto funcionamiento del intestino y la actividad de las neuronas. Los glúcidos aparte de tener la función de aportar energía inmediata a las células, también le proporcionan energía de reserva.⁽⁵⁵⁾

Por otra parte las drogas vegetales que contienen quinonas presentan acciones antimicrobianas⁽⁸⁸⁾ y hepatoprotectoras.⁽⁸⁹⁾ Estos metabolitos también han demostrado ser útiles en el tratamiento de la nefropatía diabética⁽⁹⁰⁾ y el asma

bronquial.⁽⁹¹⁾ Se ha demostrado que las quinonas tienen efecto cardioprotector por activación de los canales de K^+ dependientes de ATP e inhibición de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.⁽⁹²⁾ También se ha encontrado que inducen la apoptosis en células cancerígenas, prometiendo ser compuestos líderes en el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer.⁽⁹³⁾

A los compuestos coumarínicos se les atribuyen propiedades como antiarrítmicos,⁽⁹⁴⁾ además de que en otros estudios se destacan efectos de tipo anticancerígeno,⁽⁹⁵⁾ antimalárico,⁽⁹⁵⁾ antituberculoso,⁽⁹⁶⁾ antiinflamatorio⁽⁹⁷⁾ y antitrombótico.⁽⁹⁸⁾ Se ha probado que tienen actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*,⁽⁹⁵⁾ recientemente se ha descubierto que pueden ser de gran ayuda en el desarrollo de potentes agentes retrovirales.⁽⁹⁹⁾

Las antocianidinas fueron otros de los compuestos encontrados durante la realización del tamizaje y los cuales son también valiosos puesto que pueden mejorar la agudeza visual⁽¹⁰⁰⁾ y mostrar actividad antioxidante,⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾ presentan efectos cardioprotectores y disminuyen la presión arterial.⁽¹⁰¹⁾ También tienen efecto antimicrobiano debido a que impiden el crecimiento bacteriano por una serie de mecanismos como la destrucción de la pared celular y los orgánulos celulares.⁽¹⁰¹⁾

Estos metabolitos han demostrado tener efectos anticancerígenos contra el cáncer gástrico,⁽¹⁰⁴⁾ el cáncer de colon,⁽¹⁰⁵⁾ el cáncer pancreático⁽¹⁰⁶⁾ y el cáncer de mama.⁽¹⁰⁷⁾ Estudios recientes han demostrado que tienen también efectos neuroprotectores⁽¹⁰⁸⁾ y hepatoprotectores.⁽¹⁰⁹⁾ Sus efectos antidiabéticos se deben a que reducen la hiperglucemia por disminución de los niveles del factor de necrosis tumoral α , disminución del estrés oxidativo, lo cual protege las células β pancreáticas y también disminuye la producción de glucosa e incrementa la absorción de la misma.⁽¹¹⁰⁻¹¹²⁾

Cabe destacar que esta planta presenta una gran cantidad de compuestos fenólicos como taninos, flavonoides y antocianidinas los cuales son altamente efectivos como defensa antioxidante.^(83, 85) También poseen efectos vasodilatadores, antiinflamatorios, hepatoprotector y anticancerígenos.^(113, 114)

A diferencia de los otros extractos, con el hidroalcohólico se evidenció la presencia de saponinas. Esta diferencia se debe fundamentalmente a la mayor capacidad extractiva del solvente empleado, además las saponinas son compuestos polares⁽¹¹⁵⁾ para los cuales está referido en la literatura la extracción con etanol, metanol, n-butanol, o mezclas de diferentes proporciones de estos alcoholes y agua,^(116, 117) mostrando estas mezclas hidroalcohólicas los mejores resultados.⁽¹¹⁵⁾

Este metabolito ha sido identificado en otras especies de *Psidium* como *P. guajava*.⁽¹¹⁸⁾ Las saponinas pueden ser de gran relevancia ya que desde el punto de vista farmacológico, las drogas con saponósidos pueden tener diferentes acciones, las cuales se deben, sobre todo, a los saponósidos triterpénicos.⁽¹¹⁹⁾

Entre las acciones farmacológicas más destacables de las drogas con saponósidos se encuentra el efecto diurético⁽¹²⁰⁾ ya que tienen la capacidad de aumentar la circulación sanguínea a nivel renal, con lo que la filtración glomerular se ve aumentada y, por tanto, se da un efecto diurético. Además han demostrado tener actividad insecticida,⁽¹²¹⁾ antihelmíntica y expectorante.⁽¹²⁰⁾

El efecto anticancerígeno ha sido ampliamente estudiado mostrando buenos resultados contra el cáncer de pulmón,⁽¹²²⁾ el carcinoma hepatocelular,⁽¹²³⁾ la leucemia,⁽¹²⁴⁾ el mieloma múltiple⁽¹²⁵⁾ y el cáncer de ovario.⁽¹²⁶⁾ También se ha probado que tienen actividad neuroprotectora,⁽¹²⁷⁾ inmunosupresiva⁽¹²⁸⁾ y hemolítica.⁽¹²⁹⁾

La presencia de saponinas en el extracto hidroalcohólico, junto a la cuantificación de metabolitos fenólicos y la determinación de extractivos solubles, corrobora la capacidad extractiva y la potencialidad de este solvente, aspecto a tener en cuenta para investigaciones futuras con la especie vegetal.

Conclusiones



CONCLUSIONES

El desarrollo de este trabajo permitió arribar a las siguientes conclusiones:

1. Para el procesamiento del material vegetal se propone el método de secado en estufa a 40°C ya que este método resultó el más adecuado considerando los parámetros evaluados.
2. Se determinaron los parámetros farmacognósticos al material vegetal procedente de las hojas de *P. claraense*, los cuales se encuentran dentro de los límites establecidos por la literatura, garantizando la calidad del mismo.
3. El extracto hidroalcohólico mostró los mejores resultados en cuanto a composición química y cuantificación de fenoles y flavonoides con ($102,64 \pm 1,69$ mgEAG/gES y $7,03 \pm 0,19$ mgQE/gES) respectivamente.
4. Se caracterizó el extracto hidroalcohólico procedente de la droga cruda, presentando índices adecuados tomando en consideración la correspondencia con extractos de *P. guajava*.

Recomendaciones



RECOMENDACIONES

1. Realizar la determinación de los índices farmacognósticos a muestras procedentes de diferentes épocas del año con vistas a establecer las especificaciones de calidad de la droga vegetal.
2. Completar el estudio fitoquímico de la planta con el objetivo de aislar y caracterizar los compuesto presentes.
3. Evaluar las propiedades farmacológicas del extracto hidroalcohólico.

*Referencias
Bibliográficas*

A decorative border featuring a dark, silhouetted floral design, possibly a rose, running along the bottom and right edges of the page.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avello M, Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev Med Chile*. 2010;138(10):345-56.
2. González M, Ramírez D. Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba. *BLACPMA*. 2007;6(4):118-24.
3. Pérez I, Field A, Churches A, Herrera R, Eagle M, García L. Acute Toxicity and diuretic effect of the *Commelina elegans* H.B.K. *Revista Cubana de Farmacia*. 2006;40(101):1-13.
4. Escalona L, Tase A. Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo arriba, Granma. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2015;20:429-39.
5. Rodríguez Amado R, Lafourcade Prada A, Pérez Rondón L. Hojas de *Psidium guajava* L. *Revista Cubana de Farmacia*. 2013;47(1):26-34.
6. Cruz Arzola D. Formulario Nacional de fitofármacos y apifármacos. La Habana; 2017.
7. García-Lahera J, Orozco A. Estado de conservación de plantas endémicas del área de arenas cuarcíticas de Casilda, Trinidad, Sancti Spíritus (Cuba). *Bissea*. 2013;7(2):13-8.
8. Marrero Morfa, D. Estudio fitoquímico y farmacológico de cuatro especies de *Psidium*, que crecen en la región central de Cuba. [Tesis de Diploma]. Cuba: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas; 2017.
9. Guillén P, Sarmiento G. Validación de las metodologías aplicadas a los procesos de selección, lavado, secado y almacenamiento para plantas medicinales a través de aplicación de técnicas oficiales basadas en la farmacopea de la Organización Mundial de la Salud. [Tesis de Diploma]. Ecuador: Universidad de Cuenca, 2011.
10. Berazaín R, Areces F, Lazcano J, González L. Lista roja de la flora vascular cubana. *Jardín Botánico Atlántico*, 2005.
11. González-Torres I, Palmarola A, González-Oliva L, Bécquer E, Testé E, Castañeira-Colomé M, *et al.* Lista roja de la flora de Cuba. *Bissea*. 2016;10(1):1-15.
12. IV Informe Nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica. República de Cuba: 2009.

13. García-Lahera J, Orozco A. Estado de conservación de la flora y la vegetación en los ecosistemas arenoso cuarcíticos de Casilda, Sancti Spíritus, Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 2015;36:93-102.
14. Orozco Morgado A, García Lahera J. Flora y vegetación del área de arenas cuarcíticas de Casilda, Sancti Spíritus, Cuba. *Brenesia*. 2014;81(82):8-29.
15. Acosta Ramos Z. Taxonomía y conseravción del Género *Plinia* en Cuba. [Tesis de Doctorado]. España: Universidad de Alicante; 2015.
16. Urquiola Cruz A, González Oliva L, Acosta Ramos Z, Novo Carbó R. La subtribu *Myrtinae* (*Myrtaceae*) en la flora de Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 2012;32(33):5-11.
17. Silva F, Rosário A, Secco R, Zoghbi M. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (*Myrtaceae*), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil (Survey of the species known as pedra-ume-caá (*Myrtaceae*), with emphasis of those commercialized in the city of Belém, Pará, Brazil). *Biota Amazôn*. 2015;5(1):7-15.
18. Moraes Cascaes M, Skelding Pinheiro G, de Aguiar Andrade E, Bichara Zoghbi M, da Silva Santos L. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (*Myrtaceae*): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. *Internacional Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(10):2381-405.
19. Santos E, Dantas G, Santos H, Diniz M, Sampaio F. Ethnobotanical study of medicinal plants for mouth diseases in the municipality of João Pessoa, Brazil. *Braz J Pharmacogn*. 2009;19(5):321-4.
20. Van den Berg M. *Medicinal Plants in the Amazon: Contribution to Its Systematic Knowledge*. 3rd ed. Brasil, 2010.
21. Cândido C, Portella C, Laranjeira B, Silva S, Arriaga A, Santiago G, *et al*. Effects of *Myrcia ovata* Cambess. essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. *Braz J Microbiol*. 2010;41(1):621-7.
22. Quintans L, de Santana M, Guimaraes A, Viana M. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2011;21(3):497-502.

23. Chavan M, Wakte P, Shinde D. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*. 2010;17(2):149-51.
24. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavor and Fragrance Journal*. 2012;27(1):13-39.
25. Mengsu H, Abel C, Sanchez A, Tholl D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist*. 2011;193(4):997-1008.
26. Matsuda H, Murakami T, Yashiro K, Yoshikawa M. Antidiabetic principles of natural medicines. IV. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from the roots of *Salacia oblonga* Wall. (*Celastraceae*): structure of a new friedelane-type triterpene, kotalagenin 16-acetate. *Chemical & Farmaceutical bolletin*. 1999;47(12):1725-9.
27. Silva P. Compostos fenólicos e terpenos de *Myrcia hiemalis* e *Myrcia myrtifolia* (*Myrtaceae*). [Tesis de doctorado]: Universidade Federal da Bahia; 2012.
28. Souza A, Santos R, Santos L, Guilhon G, Santos A, Arruda M, *et al*. Allelopathic potential of *Myrcia guianensi*. *Planta Daninha*. 2006;24(4):13-25.
29. Saldanha L, Vilegas W, Dokkedal A. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS(n) and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. *Molecules*. 2013;18(7):8402-16.
30. Ferreira E, Gris E, Rebello J, Correia J, de Oliveira L, Filho D, *et al*. The 2',4',6'-trihydroxyacetophenone isolated from *Myrcia multiflora* has antiobesity and mixed hypolipidemic effects with the reduction of lipid intestinal absorption. *Planta medica*. 2011;77(14):1569-74.
31. Franzon R, de Oliverira Campos L, Barnes Proenca C, Sousa Silva J. Aracás do Genero *Psidium*, principais espécies, ocorrência, descrição e usos. In: Ministerio da Agricultura pecuaria e Abastecimiento, editor. Brasil, 2009.
32. Dwivedi N, Patel G, Dwivedi D. Physicochemical and Phytochemical studies of *Psidium guajava* L. *Int j Res Ayurveda Pharm*. 2017;8(1):3459-68.

33. Pérez Gutiérrez R, Mitchel S, Vargas Solis R. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;117(1):1-29.
34. Velásquez E. Validación farmacológica de la actividad antiinflamatoria de las infusiones acuosas de las hojas de *Buddleja americana* L. (salvia santa), hojas de *Eupatorium semialatum* (bacché), y hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba) en ratas hembras albinas. [Tesis de Diploma]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2008.
35. Inocente-Camones M, Guija-Poma E, Zarzosa-Norabuena E, Loja Herrera B, Ponce-Pardo J. Efecto hipoglicemiante de los extractos acuoso y etanólico de *Psidium guajava* L. (Guayaba) en ratas diabéticas inducidas por aloxano. *Horizontes Médicos*. 2015;15(2):41-9.
36. Keun Oh W, Ho Lee C, Sun Lee M, Young Bae E, Bae Sohn C, Oh H, *et al*. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;96(3):411-6.
37. Morales Fernández Y. Composición química y estudios farmacológicos de las hojas de tres especies de *Mirtáceas*. [Tesis de Maestría]. Cuba: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas; 2014.
38. Arima H, Gen-ichi D. Isolation of Antimicrobial Compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) and their Structural Elucidation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014;66(8):1727-31.
39. Jiménez-Escrig A, Rincón M, Pulido R, Saura-Calixto F. Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(11):5489-94.
40. Yin Chen H, Chin Yeng G. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*. 2007;101(2):686-95.
41. Palomino Pacheco M, Guija Poma E, Lozano Reyes N. Propiedades antioxidantes de la guayaba (*Psidium guajava* L. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2009;75(2):45-61.
42. Pino Alea J. Contribución al estudio de la composición volátil de la flora de Cuba. [Tesis de Doctorado]. Cuba: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria; 2010.

43. Hidalgo Filipovich R, Gómez Ugarte M, Escalera Cruz D, Quisbert Díaz S. Beneficios de la guayaba para la salud. *Revista de Investigación e Información en Salud*. 2015;10(25):134-46.
44. Pérez E, Ettiene G, Marín M, Casassa-Padron A, Silva N, Raga J, *et al.* Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*. 2014;31(1):60-78.
45. Nyiwa Ngbolua K, Lufuluabo G, Lengbiye E, Ngiala Bongo G, Inkoto Liyongo C, Masengo Ashande C, *et al.* A review on the Phytochemistry and Pharmacology of *Psidium guajava* L. (*Myrtaceae*) and Future direction. *Discovery Phytomedicine* 2018;5(2):7-13.
46. Begum S, Hassan S, Siddiqui B, Shaheen F, Ghayur N, Gilani A. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry*. 2002;61(4):399-404.
47. Lozoya X, Meckes M, Abou Zaid M, Tortoriello J, Nozzolillo C, Arnason J. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Archives of Medical Research*. 1994;25(1):11-6.
48. Concepción O NL, Pérez A, Hernández M, Peralta N, Trujillo R. Efecto de tres antioxidante en el cultivo In Vitro de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante Y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales*. 2005;26(1):33-40.
49. Lisboa A, Reckzieguel L, Clasen F, Salvador M, Zambiasi R, Padilha W, *et al.* Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*. 2011;128(4):916-22.
50. Durães E, Naves P. Género *Psidium*: Aspectos Botânicos, Composição Química e Potencial Farmacológico. *Revista Procesos Químicos* 2015;1:45-60.
51. Fasola T, Oloyede G, Apoolosun B. Chemical Composition, Toxicity and Antioxidant Activities of Essential Oils of Stem Bark of Nigerian Species of Guava (*Psidium guajava* L.). *EXCLI Journal*. 2011;10(1):34-43.
52. León A. Flora de Cuba. Dicotiledóneas: *Maplpihiaceae a Mytraceae*. Cuba, 1953.
53. García Lahera J. *Psidium claraense*. *Bissea*. 2015;9(4):514-9.

54. García Lahera J, Orozco A. Estado de conservación de la flora y la vegetación en los ecosistemas arenoso cuarcíticos de Casilda, Sancti Spíritus, Cuba. *Revista Jardín Botánico Nacional*. 2015;36(1):93-102.
55. Miranda M, Cuéllar A. *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana 2012.
56. Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia. Taller de control de calidad de productos naturales. Argentina, 2011. Available from: www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia.
57. *Farmacopea Europea 5ed*, (2005).
58. Puerto R. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica de las hojas de *Eugenia Clarensis* (Britton & P.Wilson). [Tesis de Diploma]. Cuba: Universidad Central Martha Abreu de las Villas; 2014.
59. Tambe R, Singhal RG, Bhise K, Kulkarni M. Phytochemical screening and HPTLC fingerprinting of leaf extracts of *Psidium guajava* Linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014;3(1):52-6.
60. Verporte R. *GMP for Botanicals. Regulatory and Quality Issues on Phytomedicines*. New Dheli, 2003.
61. Muñoz F. *Plantas Medicinales y Aromáticas: Estudio, Cultivo y Procesado*. . España, 2002.
62. Normas ramales de Salud Pública # 309 (NRSP # 309). Droga cruda. Métodos de ensayo, (1992).
63. Pękal A, Pyrzyńska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(1):1776-82.
64. Norma Ramal de Salud Pública #312: "Extractos, fluidos y tinturas. Métodos de ensayo, (1992).
65. Gaitén Y. Estudio Farmacognóstico de *Phyllanthus orbicularis* HBK, especie endémica de Cuba. [Tesis Doctoral]. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana; 2011.
66. Rodríguez Rodríguez L, Gutiérrez Gaitén Y, Gutierrez R. Estudio farmacognóstico y valoración del extracto fluido obtenido de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba). *Rev Cubana Plant Med*. 1997;2(2):1-13.
67. Comas Noya F. Contribución a la estandarización del proceso de obtención a escala del laboratorio de un extracto de las hojas de *Psidium guajava* L. [Tesis de Maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2014.

68. Arya V, Thakur N. Preliminary Phytochemical Analysis of the Extracts of *Psidium* Leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2012;1(3):1-5.
69. Avalos A, Vicet L. Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas del guayabo fresa. *Rev Agricultura Tropical* 2018;4(1):17-22.
70. Bribi N. Pharmacological activity of Alkaloids: A Review. *Asian Journal of Botany*. 2018;1(1):1-6.
71. Alves de Almeida A, Meira de-Faira F, Dunder R, Bognoni L, Monteiro A, Luiz-Ferreira A. Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis: Potential Use for Inflammatory Bowel Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017;1(1):13-9.
72. Barrales-Cureño H, Reyes Reyes C, Vásquez García I, López Valdez L, Gómez De Jesús A, Cortés Ruíz J, *et al.* Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life.: IntechOpen; 2019. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/alkaloids-of-pharmacological-importance-in-catharanthus-roseus>.
73. Chaves S, Feitosa C, da Araújo L. Alkaloids Pharmacological Activities - Prospects for the Development of Phytopharmaceuticals for Neurodegenerative Diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(7):629-35.
74. Gobbo-Neto L, Lopes N. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova*. 2007;30(2):374-81.
75. World Health Organization. Quality control methods for herbal materials. Malta, 1998.
76. British Pharmacopoeia, (2013).
77. Enríquez Flores A, Prieto Vela A, De los Ríos Martínez E, Ruiz Reyes G. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “Jengibre” de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. *Rev Med Vallejana*. 2015;5(1):50-64.
78. Padró-Rodríguez L, López-González T, Nuviola-Frómata N. Caracterización preliminar de tinturas al 10 % de *Bixa orellana* L. *Rev Cub Quim*. 2017;29(1):89-96.
79. Cañibano M. Efecto del perfil fenólico sobre las características antioxidantes de vinos tintos. [Tesis de Diploma]: Universidad de Valladolid; 2012.

80. Trujillo Y, Durán D. Estudio comparativo del contenido fenólico de vinos tintos colombianos e importados. *Vitae*. 2008;15(1):17-24.
81. Canadanovic-Brunet, Djilas S, Cetkovic GS, Tumbas VT, Mandic AI, Canadanovic VM. Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. *Int J Food Sci Technol*. 2006;41(1):667-73.
82. Moreno S, Scheyer T, Romano S, Vojnov A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Res*. 2006;40(2):223-31.
83. Rahmouni N, Pinto D, Beghidja N, Benayache S, Silva A. *Scabiosa stellata* L. Phenolic Content Clarifies Its Antioxidant Activity. *Molecules*. 2018;23(1):1285-95.
84. Pereira M, Steffens R, Jablonski A, Hertz P, Rios A, Vizzotto M, *et al*. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the *Myrtaceae* Family. *Agric Food Chem* 2012;60(1):3061-7.
85. Noreen H, Semmar N, Farman M, Mc Cullagh J. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plants *Coronopus didymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017;10(8):792-801.
86. Achman L, Herbert A, Kaing J. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. La Habana: Editorial Félix Varela; 2008.
87. Faleiro JH, Caldeira R, Guimarães MN. The Chemical Featuring, Toxicity, and Antimicrobial Activity of *Psidium cattleianum* (*Myrtaceae*) Leaves. *New Journal of Sciences*. 2016;13(2):1-8.
88. Dey D, Ray R, Hazra B. Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates. *Phytother Res* 2014;28(7):1014-21.
89. Dong X, Fu J, Yin X, Cao S, Li X. Emodin: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Phytother Res*. 2016;30(8):1207-18.
90. Xu S, Lv Y, Zhao J, Wang J, Zhao X. Inhibitory effects of Shengkang injection and its main component emodin on the proliferation of high glucose- induced renal mesangial cells through cell cycle regulation and induction of apoptosis. *Mol Med Rep*. 2016;14(4):3381-8.

91. Wang T, Zhong X, Li Y, Jia X, Zhang S. Protective effect of emodin against airway inflammation in the ovalbumin-induced mouse model. *Chin J Int Med*. 2015;21(6):431-7.
92. Zhou H, Zhang F, Wang X, Kwon O, Kang D. Emodin accentuates atrial natriuretic peptide secretion in cardiac atria. *Eur J Pharmacol*. 2014;731(1):44-51.
93. Saibu M, Sagar S, Green I, Ameer F, Meyer M. Evaluating the Cytotoxic Effects of Novel Quinone Compounds. *Anticancer Research*. 2014;34(8):4077-86.
94. Abyshev A, Cong N, Ivkin D, Thi Hai N. Synthesis and antiarrhythmic activity of novel 1,4-dihydropyridine-coumarin hybrid molecule. *Butlerov Communications*. 2018;53(1):121-9.
95. Wei H, Ruan J, Zhang X. Coumarin–chalcone hybrids: promising agents with diverse pharmacological properties. *RSC Advances*. 2016;6(13):10846-60.
96. Keri R, Sasidhar B, Nagaraja B, Santos M. Recent progress in the drug development of coumarin derivatives as potent antituberculosis agents. *Eur J Med Chem*. 2015;100(1):257-69.
97. Khan S, Shehzad O, Cheng M, Li R, Shik Y. Pharmacological mechanism underlying anti-inflammatory properties of two structurally divergent coumarins through the inhibition of pro-inflammatory enzymes and cytokines. *Journal of Inflammation*. 2015;12(47):1324-9.
98. Stefanachi A, Leonetti F, Pisani L, Catto M, Carotti A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules*. 2018;23(2):250-68.
99. Srivastav V, Tiwari M, Zhang X, Yao X. Synthesis and Antiretroviral Activity of 6-Acetyl- coumarin Derivatives against HIV-1 Infection. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018;80(1):108-17.
100. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phytotherapeutic research*. 2016;30(1):1265-86.
101. Khoo H, Lim S, Azlan A. Evidence-Based Therapeutic Effects of Anthocyanins from Foods. *Pakistan Journal of Nutrition* 2019;18(1):1-11.
102. Sodagari H, Farzaei M, Bahramsoltani R, Abdolghaffari A, Mahmoudi M, Rezaei N. Dietary anthocyanins as a complementary medicinal approach for

management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(1):807-20.

103. Yue Q, Xu L, Xiang G, Yu X, Yao Y. Characterization of gene expression profile, phenolic composition and antioxidant capacity in red-fleshed grape berries and their wines. *J Agric Food Chem*. 2018;66(2):7190-9.

104. Wang Y, Zhang X, Xie W, Zheng Y, Cao J. The growth of SGC-7901 tumor xenografts was suppressed by Chinese bayberry anthocyanin extract through upregulating KLF6 gene expression. *Nutrients*. 2016;8(5):1324-35.

105. Venancio V, Cipriano P, Kim H, Antunes L, Talcott S, Mertens S. *Cocoplum anthocyanins* exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells. *Food Funct*. 2017;8(1):307-14.

106. Kuntz S, Kunz C, Rudloff S. Inhibition of pancreatic cancer cell migration by plasma anthocyanins isolated from healthy volunteers receiving an anthocyanin-rich berry juice. *Eur J Nutr*. 2015;56(2):203-14.

107. Luo L, Han B, Yu X, Chen X, Zhou J. Anti-metastasis activity of black rice anthocyanins against breast cancer: Analyses using an ErbB2 positive breast cancer cell line and tumoral xenograft model. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(9):6219-25.

108. Rehman S, Shah S, Ali T, Chung J, Kim M. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats. *Mol Neurobiol*. 2017;54(1):255-71.

109. Elks C, Terreborne J, Ingram D, Stephens J. Blueberries improve glucose tolerance without altering body composition in obese postmenopausal mice. *Obesity*. 2015;23(3):573-80.

110. Jeon Y, Kang S, Moon K, Lee J, Kim D, Kim W. The effect of aronia berry on type 1 diabetes in vivo and in vitro. *J Med Food*. 2018;21(6):244-53.

111. Shaik A, Killari K, Panda J. A review on anthocyanins: a promising role on phytochemistry and pharmacology. *Internacional Research Journal of Pharmacy*. 2018;9(1):1-9.

112. Yang L, Ling W, Du Z, Chen Y, Li D, Deng S. Effects of anthocyanins on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Adv Nutr*. 2017;8(1):684-93.

113. Ozcan T, Akpınar A, Yılmaz L, Delikanlı B. Phenolics in human health. *Int J Chem Eng Appl*. 2014;5(5):393-6.

114. Hassanzadeh Z, Hassanpour H. Evaluation of physicochemical characteristics and antioxidant properties of *Elaeagnus angustifolia*. *Scientia Horticulturae*. 2018;238(1):83-90.
115. Rodríguez Alvarez A. Extracción de saponinas a partir de la *Furcraea hexapetala* y estudio de sus propiedades como insecticida. [Tesis de Grado]: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas; 2016.
116. Arias Suárez J. Evaluación genotóxica de un extracto butanólico de *Agave brittoniana* T. subsp. *brachypus* en ratones balb/c. [Tesis de Grado]: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas; 2015.
117. Peña Cerda M. Determinación de la sapogenina mayoritaria obtenida de las sapogeninas de hojas de *Ugni Molinae*, Turcz. (Murtilla) y evaluación de la actividad inhibitoria sobre glicógeno fosforilasa A. [Tesis de Grado]: Universidad de Chile; 2011.
118. Más Toro D, Martínez Aguilar Y, Rodríguez Bertot R, Pupo Torres G, Rosabal Nava O, Olmo González C. Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med*. 2017;22(1):13-8.
119. Siller Juárez J. Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del *Agave Lechuguilla* Torrey (guishe) y su aplicación potencia. [Tesis de Grado]: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2012.
120. Soto Vasquez M. Estudio fitoquímico de las hojas, flores y frutos de *Solanum multifidum* Lam. y *Lycianthes lycioides* (L.) Hassl. (*Solanaceae*) procedentes del Cerro Campana, Región La Libertad-Perú. *ArnaldoA*. 2014;21(14):688-96.
121. Sobrino J, Aniurka G, Ortega I, Castellanos L. Efecto insecticida del extracto de *Furcraea hexapetala* (Jacq.) Urban sobre *Plutella xylostella* L. *Centro Agrícola*. 2016;43(6):567-73.
122. Hu X. Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of a potential anticancer triterpene saponin from seeds of *Nigella glandulifera* in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr*. 2014;967(1):156-61.
123. Liu Q, Chen W, Jiao Y, Hou J, Wu O, Liu Y, *et al*. Pulsatilla saponin A, an active molecule from *Pulsatilla chinensis*, induces cancer cell death and inhibits tumor growth in mouse xenograft models. *J Surg Res*. 2014;188(2):387-95.

124. Qiu X, Bai X, Jiang H, He P, Wang J. 0-(s)-Ginsenoside Rg3 induces apoptotic cell death in human leukemic U937 and HL-60 cells through PI3K/Akt pathways. *Anticancer Drugs*. 2014;25(1):1072-80.
125. Song Y HJ, Kang L, Gao S. Effect of 20 (S)-ginsenoside Rg3 on the proliferation inhibition and secretion of vascular endothelial growth factor of multiple myeloma cell line U266. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014;35(4):519-23.
126. Wang J, Nao J, Zhang M, He P. 20(s)-ginsenoside Rg3 promotes apoptosis in human ovarian cancer HO-8910 cells through PI3K/Akt and XIAP pathways. *Tumor Biol*. 2014;35(1):11985–94.
127. Huang L, Shi H, Gao B, Wu H, Yang L, Wu X. Decichine enhances hemostasis of activated platelets via AMPA receptors. *Thromb Res*. 2014;133(5):848–54.
128. Gupta A, Chaphalkar S. Immunosuppressive activity of crude saponins from the leaves of *Calotropis gigantea*, *Calamus roteng* and *Artocarpus integrifolia*. *International Journal of Pharma Sciences and Research* 2015;6(3):526-31.
129. Soltani M, Parivar K, Baharara J, Kerachian M, Asili J. Hemolytic and Cytotoxic Properties of Saponin Purified from *Holothuria leucospilota* Sea Cucumber. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology* 2014;3(1):43-50.

Anexos



ANEXOS.

Anexo 1. Reactivos utilizados en el estudio farmacognóstico de las hojas de *P. claraense*.

Éter etílico (UNI-CHEM)	Cinta de magnesio metálica (Analar)	Baljet B (UNI-CHEM)
Agua destilada	Nitrato de plata	Cloroformo (UNI-CHEM)
Etol absoluto (UNI-CHEM)	Ácido gálico (SIGMA-ALDRICH)	Anhidrido acético (UNI-CHEM)
Folin-Ciocalteu SIGMA-ALDRICH	Dragendorff (UNI-CHEM)	Ácido sulfúrico (UNI-CHEM)
Carbonato de sodio (Merck).	Sudán III	Shinoda
Ácido clorhídrico concentrado (UNI-CHEM)	Baljet A (UNI-CHEM)	Kedde A (UNI-CHEM)
Triloro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Analar)	Solución de ninhidrina al 2%	Kedde B (UNI-CHEM)
Fehling A (UNI-CHEM)	Hidróxido de sodio al 5% en agua (UNI-CHEM)	Fehling B (UNI-CHEM)