



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La universidad católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Actividad Antiinflamatoria en Subproductos de Guayaba

“Psidium guajava L.”

Trabajo de Fin de Titulación

AUTORA: Piedra Sánchez, Yadira Nathaly

DIRECTORA: Guamán Balcázar, María del Cisne Ing, Q.

LOJA - ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Ingeniera

María Del Cisne Guamán Balcázar

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: Actividad Antiinflamatoria en Subproductos de Guayaba "*Psidium guajava* L.", realizado por el profesional en formación: Yadira Nathaly Piedra Sánchez: cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes

Loja, 26 noviembre del 2013.

f) _____

María del Cisne Guamán Balcázar

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Yadira Nathaly Piedra Sánchez declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art.67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice:” Forman parte del patrimonio de la universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la universidad”

Yadira Nathaly Piedra Sánchez

CI:

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por ser quien conduce mi vida y me da la fuerza y coraje que necesito para lograr mis metas, así como también a mi intercesora la Virgen María por iluminarme y ayudarme a no desfallecer.

A mi querida madre Flor, mi amiga, mi confidente, porque nunca ha soltado mi mano, por enseñarme con su ejemplo a ser valiente, perseverante, a perseguir mis sueños y luchar con coraje para conseguirlos, por sus palabras de consuelo, por su abrazo protector y su amor incondicional.

A mi querido padre Hugo, quien me ha enseñado que la paciencia y el amor son claves para la felicidad, que con su sencillez, bondad y trabajo ha sabido guiar a sus hijas y ser un ejemplo a seguir, sobre todo gracias por la abnegación, sacrificio y amor que me ha brindado.

A mi hermana Roció, mi gran amiga, mi cómplice, por estar siempre presente acompañándome y guiándome, por protegerme y ser el cimiento de mi vida.

A mi esposo Paul, por ser mi compañero en cada paso para alcanzar mis sueños, por brindarme su apoyo y comprensión para lograr mis metas. Siendo la persona que impulsa mi vida.

A mis amigas, por su cariño, sus locuras y por ser parte indispensable de mi vida.

NATHALY PIEDRA.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios por ser la luz que guía mi camino, a mis padres Hugo y Flor que junto a mi hermana Rocío supieron apoyarme, guiarme e inspirarme, a mi esposo Paúl por su comprensión y cariño para poder culminar el presente trabajo investigativo.

A la ingeniera María del Cisne Guamán por sus acertadas enseñanzas, consejos y críticas que fueron indispensables en la realización de esta tesis. De igual forma a todos los ingenieros que laboran en el Departamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos por sus sabios y oportunos consejos.

Finalmente, a la Universidad Técnica Particular de Loja, por su apoyo académico y espiritual que me brindaron durante toda mi carrera universitaria.

NATHALY PIEDRA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SECIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
NOMECLATURA	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
PROPÓSITO DEL PROYECTO	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. GUAYABA	3
2.1.1. Composición física y química de la guayaba	4
2.1.2. Importancia del cultivo y producción de guayaba	4
2.1.3. Subproductos de guayaba	5
2.2. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	6
2.3. INFLAMACIÓN	7
2.4. COMPUESTOS ANTIINFLAMATORIOS	8
2.5. ENZIMA: LIPOXIGENASA	9
3. MATERIALES Y METODOS	10
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	10

3.2.	REACTIVOS	10
3.3.	EQUIPOS	10
3.4.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	10
3.5.	PURIFICACIÓN	11
3.6.	FENOLES TOTALES	11
3.7.	CARBOHIDRATOS	11
3.8.	CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA	12
3.9.	METODO ESTADISTICO	13
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1.	FENOLES TOTALES	14
4.2.	CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA	17
5.	CONCLUSIONES	21
6.	RECOMENDACIONES	22
7.	BIBLIOGRFIA	23
8.	ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ficha botánica de la guayaba	4
Tabla 2. Fenoles totales en muestras purificadas y no purificadas.	16
Tabla 3. Inhibición de lipoxigenasa e IC ₅₀ en extractos de guayaba.	19
Tabla 4. Inhibición de la lipoxigenasa en quercetina.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de guayaba.	3
Figura 2. Inflamación.	7
Figura 3. Mecanismos iniciales de la inflamación	9
Figura 4. Pocillos para muestras del kit de lipoxigenasa	13
Figura 5. Comparación de fenoles totales de los extractos de guayaba	15
Figura 6. Textura del extracto de guayaba antes y después de la purificación.	16
Figura 7. Comparación de la capacidad antiinflamatoria determinados en relación a estudios anteriores en diferentes productos.	19

NOMENCLATURA

Extracto purificado: muestra libre de azúcares

Extracto no purificado: muestra con presencia de azúcares

MeOH: metanol

EtOH: etanol

HCl: ácido clorhídrico

IC₅₀: concentración inhibitoria media

5-HPETE: ácido 5-hidroxiperoxieicosatetraenoico

mg GAE/100 g: miligramos equivalentes de ácido gálico sobre 100 gramos de muestra

MS: muestra seca

MF: muestra fresca

mL: mililitro

mm: milímetros

msnm: metros sobre el nivel del mar

μl: microlitro

g: gramo

mg: miligramo

N: normal

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

KOH: hidróxido de potasio

HP: hidroperóxidos

IA: actividad inicial

PM: peso molecular

CV: coeficiente de variación

RESUMEN:

En la presente investigación se evaluó la capacidad antiinflamatoria por inhibición de la lipoxigenasa de los subproductos de guayaba (*Psidium guajava* L.) (pulpa, corteza, semilla), provenientes de la empresa Agroficial de la ciudad de Guayaquil. Los subproductos se deshidrataron a 60 °C, por 36 horas hasta una humedad de 4.5%, a un tamaño de partícula entre 125 – 250 µm; el extracto hidrofílico se lo obtuvo por maceración dinámica (1000 rpm), a una temperatura de 70 °C por 6 horas, utilizando como solvente etanol 57%, pH=2, ajustado con HCl concentrado. El extracto obtenido fue purificado utilizando una columna Sep Pack C18 con el fin de separar los carbohidratos. En total se obtuvieron dos extractos antes y después de la purificación, a los cuales se les determinó, fenoles totales, capacidad antiinflamatoria y carbohidratos. De los extractos obtenidos se determinó que el extracto no purificado tuvo un mayor valor de fenoles totales (2178,16 mg GAE /100 g muestra) que el extracto purificado (1034,21 mg GAE /100 g muestra). En cuanto a la capacidad antiinflamatoria se determinó la actividad de la lipoxigenasa en los extractos no purificados se obtuvo IC₅₀ en una concentración de 121,96 mg de extracto/L, y en el extracto purificado se obtuvo IC₅₀ en concentración de 121,11 mg de extracto/L

Palabras Claves: Fenoles totales, capacidad antiinflamatoria, carbohidratos, IC₅₀, lipoxigenasa, purificado, no purificado.

ABSTRACT

In this study it was evaluated the antiinflammatory capacity by inhibition of lipoxigenase products of guava (*Psidium guajava* L.) (pulp, rind, seeds), from the company Agrofricial city of Guayaquil. The byproducts were dehydrated at 60 ° C, for 36 hours to a moisture content of 4.5% to a particle size between 125 - 250 microns, it hydrophilic extract obtained by dynamic maceration (1000 rpm) at a temperature of 70 ° C for 6 hours, using 57% ethanol as solvent, pH = 2, adjusted with concentrated HCl. The extract obtained was purified using a Sep Pack C18 column in order to separate the carbohydrates. In total two extracts were obtained before and after purification, to which they are determined, total phenols, antiinflammatory ability and carbohydrates. Of the extracts was determined that the unpurified extract had a higher value of total phenols (2178.16 mg GAE / 100 g sample) that the purified extract (1034.21 mg GAE / 100 g sample). regarding the inflammatory capacity was determined lipoxigenase activity in extracts obtained unpurified IC₅₀ at a concentration of 121.96 mg of extract/L and the purified extract obtained by concentration IC₅₀ 121.11 mg of extract/L.

Keywords: Guava, C18 column, carbohidrates, total phenols, antiinflammatory capacity, IC₅₀, lipoxigenase

Propósito del Proyecto:

General:

Valorar el potencial antiinflamatorio de los subproductos de guayaba.

Específico:

- Determinar cantidad de fenoles totales
- Determinar capacidad antiinflamatoria

REVISIÓN DE LITERATURA

1. INTRODUCCIÓN

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un fruto exótico, nativo de América, pertenece a la familia Mirtácea, actualmente se encuentra muy difundida en todo el mundo (López, 2008), su producción mundial en el 2010 fue de alrededor de 1.2 millones de toneladas (Tzec, 2010), la cual se utiliza para la elaboración de jaleas, mermeladas, y jugos. La industria de alimentos genera volúmenes de subproductos que oscilan entre el 25-40% del volumen original y ascienden hasta 1.050 millones de toneladas anuales (Reddy, 2011), gran parte de ellos se desechan sin tratamiento posterior, convirtiéndolos en contaminantes ambientales, pues al contener alta cantidad de agua son fácilmente atacados por los microorganismos (Mirzaei et al., 2008).

Un estudio realizado por Marquina et al. (2008) demostró que la pulpa y la cáscara de esta fruta tienen un alto contenido de fibra dietética (48.55%; 49.42%) y polifenoles extraíbles como los flavonoides, isoflavonas, antocianidinas, ácidos benzoicos (Arranz, 2010) (2.62%; 7.79%), los mismos que pueden ser usados como una fuente de fibra y compuestos fenólicos con propiedades beneficiosas (Berardini et al., 2005). Los subproductos de guayaba desde la antigüedad se han utilizado para tratar dolencias en especial sus hojas para tratar males estomacales, la corteza como antiinflamatorio y la pulpa ya que es fuente de ácido ascórbico (Dweck, 1987). Según un estudio realizado por Marquina, (2008) demostró que la semilla y la piel de guayaba tienen mayor capacidad antioxidante y polifenoles totales que la pulpa; la mayoría de las pieles de frutas pueden exhibir una actividad antioxidante de 2 a 27 veces mayor que la pulpa.

Una dieta que incluya la guayaba aumenta la defensa antioxidante del organismo evitando el daño oxidativo (Kuskoski et al., 2005), ya que estos están asociados con la disminución de lipoproteínas además de contener vitamina C y E, carotenoides y compuestos fenólicos. Se ha demostrado que la guayaba ("*Psidium guajava* L.") tiene efecto antiinflamatorio y se lo relaciona con la cantidad de flavonoides como la quercetina que a su vez se lo involucra con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Los metabolitos del ácido araquidónico, tanto de la vía de la ciclooxigenasa como de la lipooxigenasa, tienen una definida e importante participación en las diversas etapas del proceso inflamatorio (Pérez, 1998). Araujo et al. (2002) reporta una inhibición de la hialuronidasa con respecto a la actividad antiinflamatoria del 17.0 % para la fresa y 35.9 % en mora.

Dentro de la línea de investigación, Aplicación de Tecnologías emergentes y tradicionales en procesos agroindustriales, el presente tema pretende ampliar el conocimiento de la capacidad antiinflamatoria de los subproductos de guayaba y su relación con los compuestos fenólicos que los subproductos de la fruta presentan.

2. DESARROLLO DE LOS CAPITULOS

2.1. Guayaba

La guayaba, Figura 1, es una fruta tropical, de forma ovalada, su pulpa es carnososa con semillas, pH de 4.1- 5.4, densidad promedio de 1.88 g/cm³. El fruto contiene vitamina C, vitamina A, hierro, calcio, fósforo, flavonoides, guajavarin y quercetina (Dweck, 1987). En la mayoría de países exportadores de esta fruta se cultiva diferentes variedades de guayaba, las cuales en estado maduro presentan: “Regional Roja” corteza amarilla y pulpa rosada, “Regional Blanca” corteza amarilla y pulpa amarilla, “Pera” corteza amarilla y pulpa roja y “Manzana” corteza verde y pulpa blanca (Rojas et al., 2009).


Figura 1: Fruto de guayaba



Por su gran producción la guayaba (*Psidium guajava* L.) está clasificada como uno de los frutos más cotizados y requeridos en la mayor parte del mundo. El tiempo de producción desde la floración hasta la cosecha va de 100-150 días, tiene sabor dulce y textura crujiente antes de su completa madurez (Tzec, 2010). Su ficha botánica se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Ficha botánica.

Nombre científico: <i>Psidium Guajava</i> L.
Nombres Comunes: Guayabo, guayaba, goiaba, guava
Reino: Plantael
Clase: Magnoliophyta
Subclase: Magnoliophyta
Orden: Myrtales
Familia: Myrtaceae
Género: <i>Psidium</i>
Especie: <i>guajava</i>



Fuente: López B, (2008).

2.1.1. Composición física y química de la guayaba:

La composición química de la guayaba varía significativamente con la variedad, el estado de madurez y la estación climática. La guayaba ecotipo de pulpa rosada, presenta un contenido en 100 g de fruta entera correspondiente a: humedad 76.84 g, cenizas 0.70 g, vitamina C 177.77 mg, acidez titulable 0.76 mg de ácido cítrico, pH 3.95, taninos 3.87 mg, sólidos solubles 10.07° Brix, azúcares totales 4.37 g, azúcares reductores 3.86 mg (Torres, 2010).

2.1.2. Importancia del cultivo y producción de guayaba

El cultivo de guayaba permanece en constante producción durante todo el año, por tal motivo tiene un amplio mercado, (Calderón et al, 2009), tiene un periodo de vida muy corto; se cosecha con un color verde amarillento y se ablanda alrededor de los ocho días (Tzec et al., 2010). Se la consume como fruta fresca o procesada (Marquina et al., 2008) en cuanto al procesamiento se lo utiliza para la producción de dulces, jaleas, almíbares y refrescos (Calderón et al., 2009).

La guayaba puede producirse en alturas por debajo de los 800 msnm, la temperatura óptima que requiere esta fruta es de 16 y 34° C, y humedad entre 36 y 96% (Calderón A. et al., 2009).

La guayaba procede de Centroamérica, pero es cultivada en todos los países tropicales. Los países productores son: Brasil, Colombia, Perú, Ecuador, India, Sudáfrica, Estados Unidos,

México, Filipinas, Venezuela, Hawái, Costa Rica, Cuba, Puerto Rico. Lo que importa el mercado europeo tiene como origen: Sudáfrica y Brasil principalmente.

La producción mundial de guayaba es de alrededor de 1.2 millones de toneladas, la India y Pakistán aportan el 50%, México produce el 25% y el resto lo aportan otros países como los anteriormente mencionados.

La pulpa y clarificados de esta planta se han convertido por algunos años en un rubro importante para las exportaciones ecuatorianas (Vacas, 2008). No se exporta la guayaba como fruta fresca, pero si la pulpa a diferentes países, Estados Unidos es el principal consumidor con un volumen de 2000 toneladas métricas hasta agosto del 2007 (López, 2008)

La producción a nivel nacional según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) ESPAC en el 2004 fue de 1.604 toneladas métricas. Siendo la provincia que tienen mayor producción de guayaba Pastaza (34%), siguiéndole la provincia de Pichincha (14%) y en menor proporción Esmeraldas (11%) a pesar que es un fruto que produce la mayor parte del territorio ecuatorial (López, B 2008). En la península de Santa Elena producen guayaba de manera tecnificada. Pero si son silvestres se las encuentra en cualquier parte del campo, especialmente en Baños, hacia el Oriente de la provincia de Tungurahua (Mosquera, 2006).

2.1.3. Subproducto de guayaba

Ramírez A, (2009) realizó estudios en las semillas de guayaba enfocándose a su aprovechamiento en la obtención de productos a partir de éstas; encontrando compuestos citotóxicos, proponiendo que la harina de la molienda de la semilla de guayaba se utilice en la preparación de galletas sustituyendo parte de la harina de trigo. Bourgeois, citado por Ramírez A. (2009) estudiaron el aceite de la semilla y proponen que puede tener utilidad en la elaboración de jabones, productos de baño y productos de belleza, también indican que la fibra de la semilla de guayaba es una fuente de fibra dietaria (88-92%) con actividad antioxidante (224 mmol trolox/100 g de semillas). Otros estudios han reportado una caracterización bioquímica de las proteínas de la semilla y sus características funcionales, además el perfil de ácidos grasos de la semilla de guayaba indican que es una buena fuente de ácido linoléico, ya que es el ácido graso que se encuentra en mayor cantidad (80.5%) en la semilla (Ramírez. 2009). Los subproductos de guayaba desde la antigüedad han tenido un valor importante en la medicina cuántica ya que sus hojas tallos y raíces se los utiliza como antiinflamatorios por su alto contenido de flavonoides, fenoles y citotoxinas (Dutta et al, 2010), siendo además antioxidantes y analgésicos. Las harinas obtenidas de la

cáscara de guayaba son una importante fuente de fibra dietética (65.64 ± 0.48 g/100 g de base seca) con altos contenidos de compuestos polifenólicos y carotenoides (Marquina et al, 2008). Los subproductos agroindustriales que se descartan durante la producción de puré de guayaba rosada comprenden alrededor del 25% de la fruta (Kong, 2011).

2.2. Importancia de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal, con acción antioxidante siendo extraíbles generalmente con disolventes acuoso-orgánicos (Arranz, S. 2010). Son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Se encuentran en alimentos como verduras y frutas, así como de algunas bebidas (té, café, vino, cerveza etc.) que proceden de alimentos vegetales. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres (Kuskoski et al., 2005).

El consumo de frutas y verduras disminuye el riesgo de incidencias y mortalidad de cáncer, y a menores índices de mortalidad por enfermedad coronaria, según estudios previos. Se los ha considerado a los polifenoles como compuestos con capacidad para captar radicales libres, además que previenen enfermedades como: cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas. Con actividades antiinflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (Kuskoski et al., 2005).

Los fenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, se presentan más de 8.000 compuestos distintos en diferentes estructuras químicas y actividad. A los fenoles se los considera también como anti nutrientes, por su efecto adverso a los taninos, que son uno de sus componentes mayoritarios sobre la digestibilidad de la proteína (Martínez et al., 2000), se ha demostrado múltiples efectos positivos de los fenoles debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (Martínez, 2002).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional. Los alimentos que contengan compuestos fenólicos no necesitan aditivos antioxidantes, ya que estos intervienen como antioxidantes naturales convirtiendo los alimentos en funcionales y saludables (Martínez, 2000).

Vargas (2006), estudio la presencia de fenoles en la guayaba indicando que se ha encontrado quercetina, leucocianidina, miricetina, apigenina (579.5 mg/kg peso seco), luteolina, kaempferol; compuestos encontrados en las hojas. La pulpa tiene gran cantidad de quercetina libre y conjugada, la yema florar presenta cantidades elevadas de fenoles. La quercetina y la miricetina constituyen los compuestos más importantes de la guayaba por

sus altas concentraciones, según Vargas, (2006) la mayor concentración de mircetina se encuentra en la corteza 253 mg/kg de peso seco, mientras que el fruto de guayaba presenta 3604.7 mg/kg de quercetina.

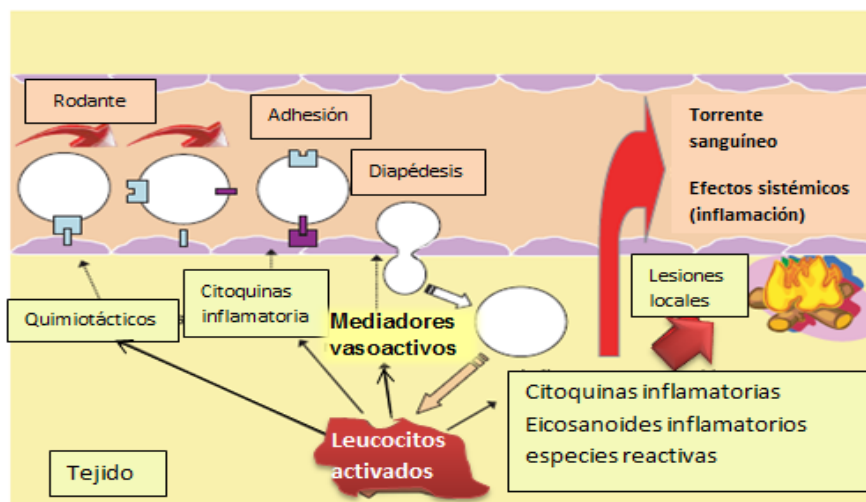
El contenido de fenoles totales en fracción comestible de guayaba (pulpa) varía de acuerdo a la variedad, siendo más alta en guayaba regional roja con un 50.84 μmol TROLOX/g de fracción comestible (Rojas, 2008).

2.3. Inflamación

La inflamación es un mecanismo fisiopatológico básico, la magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial pues una respuesta inflamatoria insuficiente resulta en inmunodeficiencia, lo cual puede conducir desde una infección hasta cáncer.

El proceso inflamatorio involucra eventos que pueden ser provocados por estímulos o agresiones del medio. Los mecanismos patogénicos de la inflamación dependen de la relación entre diferentes agentes químicos, citoquinas y factores de crecimiento, liberados por las células del foco inflamatorio o presentes en el plasma y activadas posteriormente, y de la expresión de moléculas de membrana (Herrera et al., 2011). La respuesta a la inflamación está generalmente acompañada por: tumefacción, rubor, calor, dolor espontáneo a la palpación y desorden de la función tisular (Gómez, 2011). (Figura 2)

Figura 2: Inflamación



Fuente: Calder P, (2009).

FIGURA 2: La migración de leucocitos desde los capilares hacia el tejido circundante, este es promovido por la liberación de quimioatrayentes desde el sitio de la inflamación y por la regulación positiva de moléculas de adhesión en el endotelio.

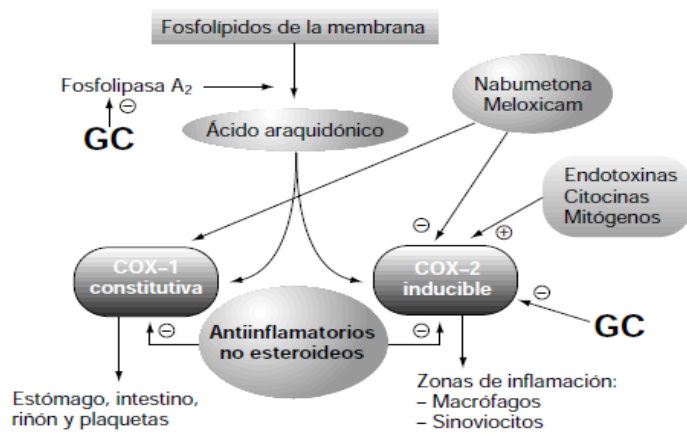
La inflamación inicia cuando en el tejido, los leucocitos se mueven hacia el sitio de la inflamación. Luego se da la liberación de mediadores de leucocitos en el sitio de la inflamación, estos pueden incluir mediadores lipídicos, mediadores peptídicos, especies reactivas de oxígeno, derivados de aminoácidos y las enzimas dependiendo del tipo de célula implicada, la naturaleza del estímulo inflamatorio, su localización anatómica y la etapa durante la respuesta inflamatoria, la cual se presenta en tres fases en las que intervienen mecanismos diferentes: *a)* fase aguda, es la fase inicial caracterizada por la vasodilatación local y el aumento de la permeabilidad capilar; *b)* fase subaguda, se produce una infiltración leucocitaria y de células fagocíticas, y *c)* fase crónica, en la cual existen signos de degeneración y fibrosis en los tejidos afectados (Herrera et al., 2011).

2.4. Compuestos antiinflamatorios.

Componentes de la dieta como, ácidos grasos de cadena larga, vitaminas, antioxidantes, flavonoides de plantas, prebióticos y probióticos pueden prevenir la inflamación, y pueden tener un papel en su terapia, produciendo mediadores a través de efectos sobre la señalización celular y la expresión génica, la reducción de la producción de oxidantes perjudiciales y la promoción de la función de barrera intestinal y las respuestas antiinflamatorias (Calder, 2009).

Los antiinflamatorios no esteroides (AINES) utilizados para disminuir la inflamación son más eficaces frente a inflamaciones agudas que crónicas, dependiendo del tipo de proceso inflamatorio, y de la participación y la actuación de algunos eucosanoides, además, por mecanismos de acción independientes de la inhibición de las ciclooxigenasas. Al inhibir la síntesis de prostaglandinas (PG) y tromboxanos, los AINES reducen su actividad sensibilizadora de las terminaciones sensitivas, así como la actividad vasodilatadora y quimiotáctica interfiriendo de esta forma en uno de los mecanismos iniciales de la inflamación (Herrera et al., 2011).

Figura 3: Mecanismos iniciales de la inflamación



Fuente: Herrera, A, (2011)

Figura 3: Representación esquemática de la acción de los AINES, glucocorticoides (GC) e inductores de la expresión sobre la COX-1 (lipoxigenasa) y COX-2 (ciclooxigenasa).

2.5. Enzima: Lipoxigenasa

El ácido araquidónico es metabolizado por dos vías diferentes: la de la ciclooxigenasa, que genera las prostaglandinas y tromboxanos y la de la 5-lipoxigenasa, que genera los leucotrienos (Xaubet et al., 2011).

La 5-lipoxigenasa constituye una de las enzimas más importantes de este grupo, pues a partir de ellas se sintetizan los leucotrienos. Cuando se incrementan las cantidades de Ca⁺⁺ intracelular, la 5-lipoxigenasa se une con la proteína que la activa y dicha unión activa la enzima que aumenta la síntesis de 5-HPETE cuya función es inhibir la inflamación y luego se une a los leucotrienos (Pérez, 1998).

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Material biológico

Los subproductos de guayaba variedad guayaba roja fueron provenientes de la empresa Agroficial, de la ciudad de Guayaquil, se deshidrataron a 60 °C, debido a que es la temperatura óptima y en la que los antioxidantes de ésta fruta sufren la menor degradación (Barajas et al., 2011), por 36 horas hasta una humedad de 4.5%, seguidamente se trituraron licuándolos (evitando el calentamiento de las muestras) por 3 segundos y tamizaron a un tamaño de partícula entre 125 y 250 μm .

3.2. Reactivos:

Ácido acético, fenol, etanol, carbonato de sodio, metanol, ácido gálico (MERCK), Folín Ciocalteu, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico (SIGMA), glucosa (Mallinckrodt), kit de ensayo de cribado de inhibidores de lipoxigenasa (CAYMAN CHEMICAL).

3.3. Equipos.

Tamices Analysensieb DIN 4188, balanza analítica Ohaus, centrifuga Dinac, espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer, espectrofotómetro SUNRISE, estufa Memmert, liofilizador Labconco, pH-metro Metler Toledo, rotaevaporador Buchi, agitador Big Bill digital, columna C18 Sep-Pak, bomba al vacío Gast, cámara de vacío de vidrio Bakerbond.

3.4. Obtención del extracto.

Los extractos se prepararon pesando 1 g de muestra y adicionándole 50 mL de solvente ETOH al 57%, ajustado a un pH 2 (Kong et al. 2011) con HCl 37% en un frasco de vidrio con tapa (Boeco) protegido de la luz, (González, 2010) e inmediatamente se llevó sobre un agitador magnético montado dentro de una estufa de convección forzada, considerando la temperatura apropiada de trabajo según estudios previos realizados en el Departamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos de 70 °C por un tiempo de 6 horas. La extracción ácida se realizó fijando la velocidad de rotación del magneto en 1100 rpm (Hamid et al. 2010). Culminado el tiempo de extracción se separaron las fases líquida y sólida mediante centrifugación a 1000 rpm por 30 min. El extracto líquido se almacenó a 4 °C hasta poder concentrarlo en un rota evaporador a 45° C por 30 minutos aproximadamente, posteriormente se liofilizó hasta deshidratar completamente la muestra y se almacenó en viales ámbar a -20 °C hasta su análisis.

3.5. Purificación

Se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Ramírez et al. (2004) de: 150 mg de extracto de guayaba seco fue suspendido en 40 mL de ácido acético diluido (2.5%v/v) seguidamente se purificó en cartuchos 5 g C18Sep-Pak, siempre procurando que la velocidad del eluido sea aproximadamente de 19 gotas/min de la siguiente forma: los cartuchos se acondicionaron agregando 20 mL de metanol eluyéndolo hasta quedar un nivel mínimo sobre el empaque y luego se equilibró con 40 mL de ácido acético al 2.5% (v/v) eluyendo hasta un nivel mínimo sobre el empaque. En seguida se procedió a eluir la muestra por la columna, una vez adicionada la muestra y para eliminar los azúcares del cartucho se lavó la columna con 80 mL de ácido acético (2.5% v/v), esta fracción al igual que la anterior se almacenó (fracción azúcares) para un análisis posterior. Seguidamente los polifenoles se recuperaron de la fase estacionaria con 50 mL de etanol. El eluido recogido de polifenoles se evaporó en el rotaevaporador a 45 °C por 30 min aproximadamente y se liofilizó hasta eliminar todo el solvente. Finalmente el extracto purificado se almacenó en viales ámbar a -20°C hasta su análisis. Se determinó de esta fracción, fenoles totales, carbohidratos, capacidad antiinflamatoria. Las extracciones se realizaron por triplicado.

3.6. Fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Thaipong, (2006) con algunas modificaciones. En el cual se preparó una curva de calibración con ácido gálico 50 mg / 25 mL de metanol, tomando alícuotas de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL de ácido gálico /10 mL de MeOH. El extracto de guayaba de las fracciones purificado y no purificado con una concentración de 1000 ppm se mezcló con 2400 uL de agua y 150 µL de Folin Ciocalteu al 0.25 N. La mezcla se agitó por 2 minutos y se dejó reaccionar por 3 minutos. Seguidamente se adicionó 300 µL de una solución de carbonato de sodio 1 N, se agitó y se permitieron 2 horas en reacción a temperatura ambiente y en la obscuridad. Se midió la absorbancia a 725 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (EGA)/g muestra.

3.7. Carbohidratos

La concentración de carbohidratos en los extractos se determinó por el método Fenol- ácido sulfúrico, descrito por Dubois et al. (2002). Se realizó una curva de calibración con glucosa 50 mg / 250 mL agua tomando alícuotas de 0.4, 1, 2, 4, 6, 8 mL de glucosa y aforándolos con 10 mL de agua destilada, la fracción de carbohidratos luego de ser rotavaporada a

70 °C por 4 horas con 20 mL de agua desionizada para la completa evaporación del solvente y evitar la corrosión del equipo de liofilización se preparó a una concentración de 1000 mg de extracto/L de metanol, además se determinó los carbohidratos en los extractos purificado y no purificado. 200 uL de la muestra se mezcla con 20 uL de fenol al 5% se adiciona 1 mL de ácido sulfúrico al 96% se deja reaccionar por 10 minutos y se lo coloca en el agitador con vibración por 30 minutos. Se lee la absorbancia a 490 nm. Los resultados se expresaron como 100 g equivalentes de glucosa / 100 g de muestra.

3.8. Capacidad antiinflamatoria.

Para determinar la capacidad antiinflamatoria se usó el ensayo de inhibición de la enzima lipoxigenasa (15-LOX) descrito por Sone et al. (2011). Se llevó a cabo utilizando un kit LISA (Cayman Chemical Co). El buffer se preparó adicionando, 10% de buffer en 90% agua HPLC, el cromógeno se preparó mezclando cantidades iguales de los agentes de desarrollo 1 y 2, tomando en cuenta el tiempo máximo de almacenamiento de 1 hora, la enzima de lipoxigenasa se preparó, mezclando 1% de enzima en 99% de buffer, una solución de sustrato se preparó mediante la mezcla de ácido 2.5% linoleico y 2.5% KOH más 95% agua HPLC considerando que el tiempo máximo de almacenamiento es de 30 minutos conservando los reactivos preparados a temperaturas bajas.

Para el ensayo de inhibición de la lipoxigenasa se realizó una muestra en blanco añadiendo 100 µL de solución buffer de ensayo a un pocillo, un pocillo de control positivo mezclando 10 µL de solución 15-LOX con 90 µL de buffer de ensayo y por último el pocillo que determinó el 100% de actividad inicial que incluyó 90 µL de la solución de 15-LOX más 10 µL del solvente usado (metanol) para disolver las muestras.

Para iniciar la reacción se adicionó 10 µL de solución de sustrato a todos los pocillos, procurando que el pipeteo sea exacto y evitando la formación de burbujas, se cubrieron de la luz y se agitó manualmente de manera circular durante 5 min, se añadió 100 µL de la mezcla de cromógenos a los pocillos para detener la catálisis enzimática y prevenir el desarrollo posterior de la reacción, luego el equipo agitó por 5 minutos los pocillos, y se midió el nivel de hidroperóxidos (HP) producido por la 15-LOX a partir del ácido araquidónico a 492 nm en un espectrofotómetro. Señalando que se decidió evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos purificados y no purificados de guayaba a concentraciones desde 80 ppm hasta 150 ppm, ya que al realizar pruebas previas con concentraciones inferiores a este valor (10, 20, 40 y 60 ppm), se obtuvieron resultados no representativos. También se determinó la capacidad antiinflamatoria de la quercetina cuyas concentraciones fueron de 0.76; 1.51; 2.27; 3.02; 3.78 mg de quercetina/L de metanol, A las lecturas de

100% de actividad inicial y de las muestras se restó la absorbancia leída en el pocillo en blanco. El efecto de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$AIL (\%) = \frac{100\% \text{ de actividad inicial (Abs.)} - \text{muestra(abs)}}{100\% \text{ de actividad inicial (Abs.)}} \times 100$$

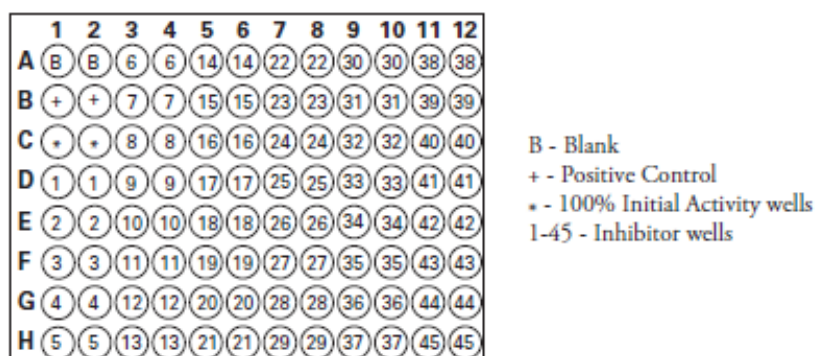
Fuente: Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay.

Dónde:

AIL: Actividad Inhibitoria de la Lipoxigenasa

Abs: Absorbancia

Figura 4.- Pocillos para muestras del kit de lipooxigenasa.



Fuente: Cayman Chemical

3.9. Método estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab, se realizó un ANOVA de una dirección para comprobar si hay una diferencia significativa del porcentaje de inhibición (<0.05) entre los extractos tanto purificados como no purificados a las mismas concentraciones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FENOLES TOTALES

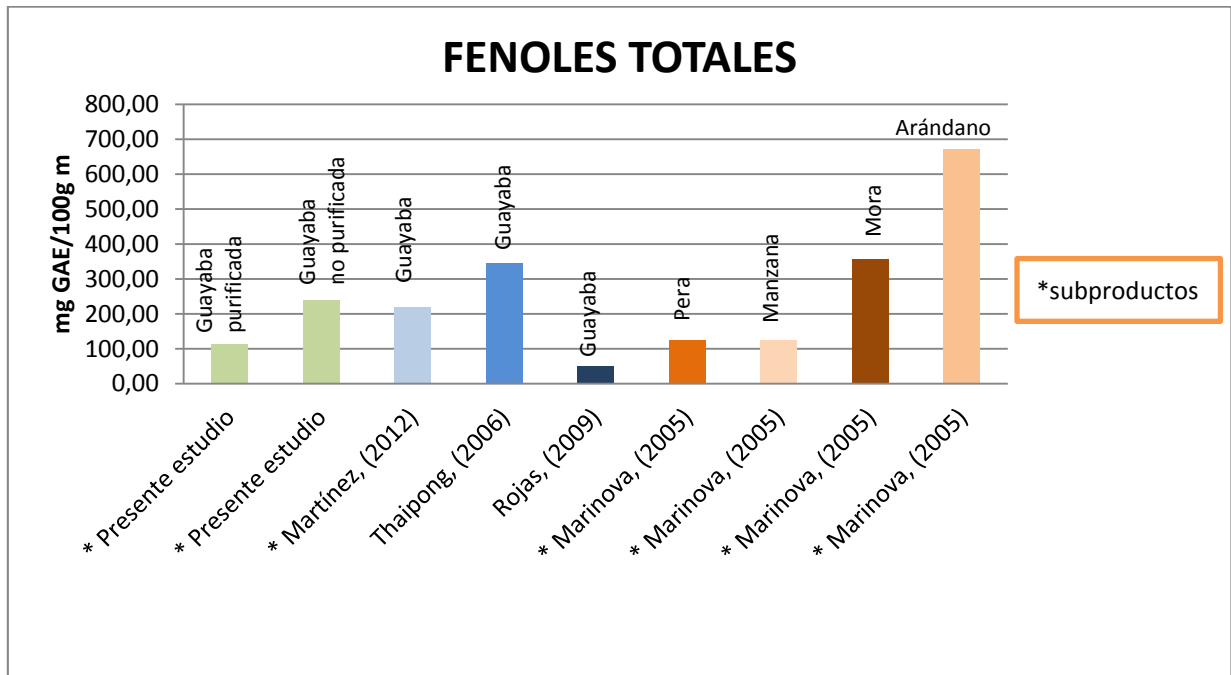
Según Prior et al. (2005), la cantidad de fenoles totales se ve afectada frente a la presencia de carbohidratos, por esta razón se determinó la cantidad de carbohidratos en los extractos: no purificados (1.41 ± 0.16 g glucosa/100 g), purificados (0.13 ± 0.01 g glucosa/100 g) y en la fracción de azúcares luego de la purificación (0.79 ± 0.04 g glucosa/100 g), cantidades menores a las reportadas en subproductos de guayaba por Martínez et al. (2012) (22.20 g glucosa/100 g). En la tabla 2 se puede observar que el porcentaje de eliminación de azúcares es superior al 90%, demostrando la eficiencia de la columna, en cuanto a la separación de azúcares.

Tabla 2. Cantidad de fenoles totales en muestra purificada y no purificada obtenidos mediante el método de Folín-Ciocalteu.

MUESTRA	FENOLES (mg AGA/100 g)		% ELIMINACIÓN DE AZÚCARES	% EXTRACCIÓN RENDIMIENTO
	BASE SECA	BASE FRESCA		
PURIFICADA	1034.2 ± 78.4	112.2	90	2
NO PURIFICADA	2178.1 ± 216.3	237.8	—	30

El contenido de fenoles totales de los extractos hidrofílicos de subproductos de guayaba se determinó con el método de Folin-Ciocalteu, y los resultados obtenidos se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de extracto. De acuerdo a los datos que se presentan en la tabla 2, el extracto no purificado (muestra con presencia de azúcares) mostró mayor concentración de fenoles totales que el extracto purificado (muestra libre de azúcares) esta diferencia se puede dar por el rendimiento obtenido del extracto, según Michalkiewicz A, (2008), los cartuchos muestran una eficiencia de 16-90% de la columna sep pak C18, lo cual se podría explicar ya que al pasar los extractos por la columna los fenoles pudieron adherirse a la fracción de carbohidratos o haberse quedado en la columna. Según Robles F, (2011) las columnas suelen presentar un comportamiento anormal, unas veces fácilmente detectable durante el proceso por un comportamiento extraño de difusión de la muestra en la columna y otras veces, menos evidente, puesto que se manifiesta en una baja absorbancia del extracto recuperado.

Figura 5. Comparación de fenoles totales de los extractos de guayaba determinados en relación con estudios anteriores.



Fuente: Martínez et al. (2012); Thaipong et al. (2006); Rojas et al. (2009); Marinova et al. (2005).

La concentración de fenoles totales presentada en los extractos no purificados resultaron ser mayores a la reportada por Martínez et al. 2012; en subproductos de guayaba de la variedad “pera rosada” (220mg GAE/100 g BF) mientras que Thaipong, (2006) encontró valores mayores en algunas variedades de guayaba en extractos hidrofílicos (270.6 – 344.9 mg GAE/100 g BF) así como Rojas D, (2009) obtuvo por hidrólisis en guayaba 232.9 ± 122.2 a 357.7 ± 34.8 mg ácido gálico/100 g BS, para guayaba “Pera” y “Regional Roja”, respectivamente. Mientras que en subproductos de frutas Sultana et al; 2008 reporta cantidades menores como en: cáscaras de banano (1100 ± 300 mg GAE/100g, BS), cáscara de trigo (300 ± 200 mg GAE/100g, BS), salvado de trigo (400 ± 210 mg GAE/100g, BS), mazorca de maíz (1500 ± 400 mg GAE/100g, BS), salvado de arroz (400 ± 200 mg GAE/100g, BS), cáscara de arroz (200 ± 100 mg GAE/100g, BS) y cáscara de cítricos (2400 ± 300 mg GAE/100g, BS), y cantidades mayores en cáscaras de granada (36400 ± 700 mg GAE/100g, BS), cáscaras de manzana (3900 ± 600 mg GAE/100g, BS).

Martínez et al; 2012, reportan cantidades menores en: mucílago de cacao (56700 ± 110 mg GAE/100 g BS), cáscara del grano de cacao (55900 ± 220 mg GAE/100 g base fresca BS) y vaina de cacao (16750 ± 70 mg GAE/100 g BS) (Figura 5). Considerando dichos autores a estos subproductos como grandes fuentes de fenoles.

Estas diferencias se pueden dar por las modificaciones del método para determinación de fenoles (Folin- Ciocalteu) o por el método de extracción, ya que en los estudios mencionados se utiliza diferentes solventes, con excepción de Martínez, (2012) que utiliza en un extracto no hidrofílico etanol para la extracción del extracto. Mientras que en otras frutas, el arándano (Marinova et al; 2005) presenta mayor cantidad de fenoles en comparación con la mora, manzana, pera y guayaba.

Figura 6. Textura del extracto antes y después de la purificación



En cuanto a la textura, figura 6, el extracto no purificado se presenta en forma acaramelada y de color oscuro, mientras que al extracto purificado se lo observa con una textura más uniforme y de color claro. Lo que lo hace al extracto purificado más óptimo para ser usado como ingrediente adicional para el desarrollo de alimentos, por su facilidad de ser mezclado.

4.2 CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA

Tabla 3. Inhibición de lipoxigenasa en los extractos de guayaba, utilizando el kit LISA lipoxigenasa, IC₅₀ de los extractos no purificados y purificados.

CONCENTRACIÓN		MUESTRA NO PURIFICADA % DE INHIBICIÓN	IC ₅₀ MUESTRA NO PURIFICADA (mg de extracto/L)	MUESTRA PURIFICADA % DE INHIBICIÓN	IC ₅₀ MUESTRA PURIFICADA (mg de extracto/L)
mg de extracto/L de metanol	mg de extracto/kg de metanol				
80	101.04	25.45 ± 2.64 ^a	121.96	30.26 ± 2.63 ^a	121.11
90	113.67	27.21 ± 1.18 ^a		33.33 ± 2.74 ^b	
100	126.29	34.75 ± 3.58 ^a		39.91 ± 1.52 ^a	
110	138.92	35.37 ± 2.3 ^a		43.86 ± 1.52 ^b	
120	151.55	46.26 ± 5.14 ^a		47.81 ± 3.31 ^a	
130	164.18	65.31 ± 2.04 ^a		67.54 ± 0.76 ^a	
140	176.81	78.23 ± 2.36 ^a		80.70 ± 0.76 ^a	
150	189.44	85.71 ± 4.08 ^a		87.72 ± 2.01 ^a	

- Letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los porcentajes de inhibición de los extractos.

De acuerdo a la tabla 3 el porcentaje de inhibición de los extractos purificados mostró ser estadísticamente mayor ($p < 0.05$) al presentado por los extractos no purificados, excepto en las concentraciones de 90 y 110 mg de extracto/L metanol. Mientras mayor es la concentración mayor es el porcentaje de inhibición por lo tanto es directamente proporcional a su concentración (Tabla 3). Tanaka A, (2008) describe una fuerte relación de la lipoxigenasa (15-LOX) con la disminución de la inflamación. Se ha demostrado que la guayaba presenta capacidad antiinflamatoria tanto en los frutos como hojas y subproductos. Dweck, (1987), reporta que en un estudio previo se utilizó 300 mg/kg de extracto etanólico de fruta de guayaba vía oral, y como estándar 300 mg/kg de ácido acetilsalicílico (aspirina) para evaluar la inhibición de la actividad antiinflamatoria en un edema inducido por carreagenina en la pata trasera de un ratón, obteniéndose un porcentaje de inhibición de 58.27%. En cuanto a las hojas de guayaba Olajide O.A. (1999) determinó en un ensayo *in vivo* los efectos farmacológicos concluyendo que a una dosis de 200 mg de extracto/kg edema inducido por carreagenina en la pata trasera de un ratón, el extracto exhibe el efecto analgésico equivalente a 150 mg/kg de ácido acetilsalicílico.

El IC₅₀ de los extractos es la concentración del inhibidor a la que se produce una inhibición de la actividad enzimática del 50%. Los valores de IC₅₀ se reportan como media ± desviación estándar (Bentebibel A, 2009). En el presente estudio los extractos purificados presentaron IC₅₀ a una concentración de 121.11 mg de extracto/L de metanol y los no purificados a 121.96 mg de extracto/L de metanol.

Tabla 4. Inhibición de la lipoxigenasa en quercetina

Concentración (mg quercetina/L de metanol)	% de inhibición
0.76	33.91
1.51	38.82
2.27	51.72
3.02	67.82
3.78	90.7

Con el propósito de constatar el ensayo se determinó el porcentaje de inhibición (Tabla 4) de la quercetina a concentraciones de 0.76; 1.51; 2.27; 3.02 y 3.78 mg quercetina/ L de metanol ya que un estudio previo realizado por Kang, (1997), sobre los efectos inhibitorios de la quercetina consideró dichas concentraciones como óptimas obteniendo un IC₅₀ a una concentración de aproximadamente 2.33 mg de extracto/L de metanol. En el presente estudio el IC₅₀ de la quercetina se dio a una concentración de 2.19 mg de quercetina/L de metanol. Habiendo corroborado dicho ensayo, ya que en comparación de los extractos de guayaba esta presenta a menor concentración mayor efecto de inhibición.

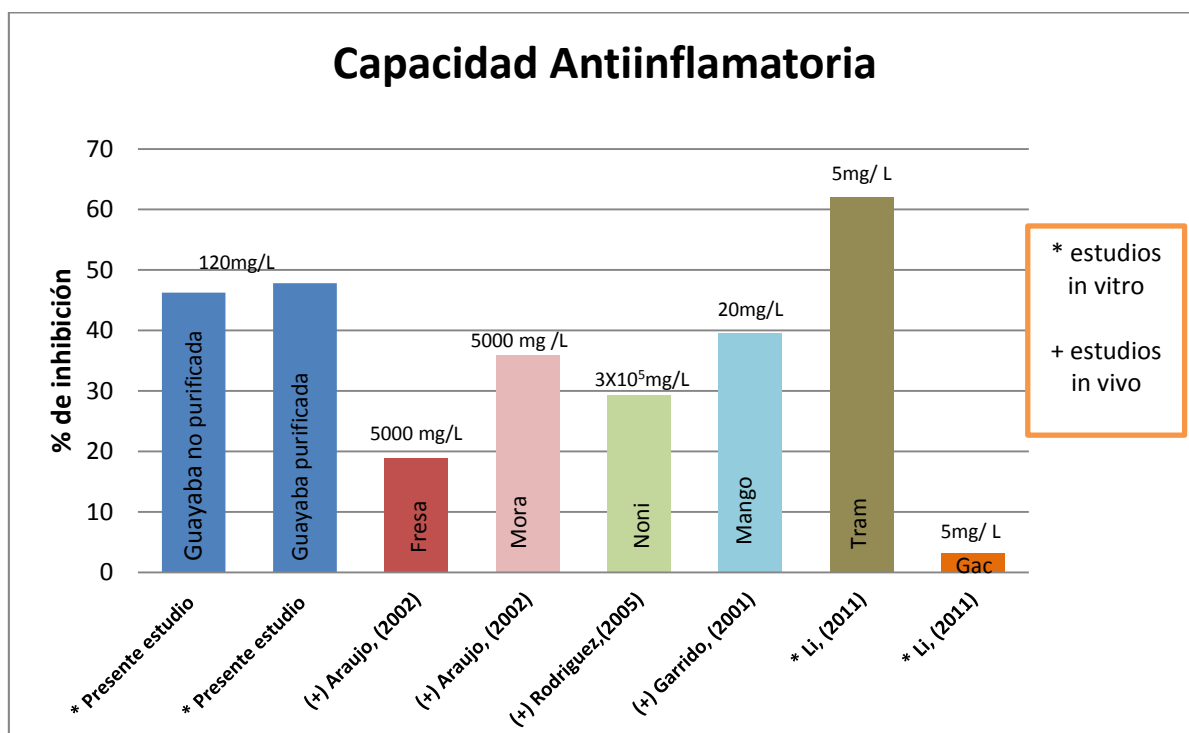
Según estudios entre los compuestos fenólicos con actividad antiinflamatoria más importantes en la guayaba se encuentran la quercetina, leucocianidina, miricetina, apigenina, luteolina, kaempferol, (Vargas D. 2006). La cantidad de fenoles totales en los extractos es proporcional a la actividad antiinflamatoria que estos presentan, esto se debe a que estos están íntimamente relacionados, lo que sugiere que los compuestos fenólicos contribuyen con sus capacidades antiinflamatorias (Geronikaki, 2006).

Haciendo una comparación entre la concentración obtenida del IC₅₀ de la quercetina (2.19mg de quercetina/L de metanol) y de los extractos purificado (121.11 mg de extracto/L de metanol) y no purificado (121.96mg de extracto/L de metanol) podemos observar que la quercetina muestra el 50% de inhibición a una concentración bastante pequeña en comparación con el extracto de guayaba, reafirmando lo mencionado por Vargas D. (2006) en la que resalta que la quercetina y la miricetina constituyen los compuestos mayoritarios en la guayaba, considerando a la quercetina como un importante compuesto con capacidad antiinflamatoria.

Estudios en frutas muestran una relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antiinflamatoria en fracciones a partir de extractos no purificados de fresa que presentaron

un porcentaje de inhibición del 17 - 18.9% y en fracciones metanólicas de mora del 35.9-41.5% (Araujo et al, 2002).

Figura 7. Comparación de capacidad antiinflamatoria determinados en relación a estudios anteriores en diferentes productos.



Fuente: Araujo et al. (2002); Rodríguez et al.(2005); Garrido et al.(2001); Li et al.(2011).

Mediante el método de inhibición de la lipoxigenasa se determinó que los extractos hidrofílicos de subproductos de guayaba si presentan capacidad antiinflamatoria, obteniendo valores en los extractos no purificados entre 25.45 y 85.71% y en los extractos purificados entre 30.26 a 87.72%, en concentraciones desde 80 a 150 mg de extracto/L de metanol. Los cuales mostraron ser mayores a los reportados en estudios previos, destacando que se los ha determinado con ensayos diferentes para frutas como: pulpa de noni (*Morinda citrifolia*) 29.28% a una concentración de 20 mL de solución/kg edema inducido por carreagenina en la pata trasera de un ratón, en un estudio *in vivo* sobre edema inducido por carreagenina en ratas (Rodriguez, 2005); extracto acuoso de mango (*Mangifera indica*) 39.5% en ratas a una concentración de 20 mg/kg sobre edema inducido por carreagenina (Garrido, 2001).

Estudios *in vivo* en fruto de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) muestran un porcentaje de inhibición del 2.5% (Erdmann, 2013), y en pulpa de pera del 35.96% a una concentración de

2 g de solución /kg edema inducido por carreagenina en la pata trasera de un ratón (Li, 2011), destacando que en estos estudios no se presenta la concentración de solución utilizada.

Se ha determinado la capacidad antiinflamatoria de extractos metanólicos obtenidos en plantas de Vietnam utilizando el mismo método *in vitro* del presente estudio determinan un porcentaje de inhibición de 62.0% en planta Tram (punzón) a una concentración de 0.5 mg de extracto/L de solución, 3.2% en Gac (portero) a una concentración de 0.05 mg de extracto/L de solución, este ensayo también indica que la capacidad antiinflamatoria de estas plantas pueden estar relacionada a la gran cantidad de compuestos fenólicos que estas presentan puesto que en el caso de la especie Tram a mayor concentración de extracto mayor es el porcentaje de inhibición (0.05mg de extracto/L una inhibición de 5%, a 0.5mg de extracto/L inhibición de 60% y a 5mg de extracto/L inhibición de 70% aproximadamente).

Los resultados obtenidos en este trabajo investigativo sugieren que los subproductos de guayaba pueden servir potencialmente como fuentes naturales de compuestos fenólicos en la dieta, presentando un efecto antiinflamatorio.

CONCLUSIONES

- La cantidad de fenoles totales en extractos purificados fue de 1034.21 mg GAE/100 g, y los extractos no purificados presentaron 2178.16 mg GAE/100 g.
- El 50% de inhibición de enzima lipoxigenasa en los extractos purificados se determinó a una concentración de 121.96 mg de extracto/L de metanol, mientras que en los extractos no purificados fue a 121.11 mg de extracto/ L de metanol.
- La columna C-18 es un método eficaz para eliminar azúcares de los extractos hidrofílicos de subproductos de guayaba, ya que los extractos que han sido purificados muestran un rendimiento de eliminación 90.74%.

RECOMENDACIONES

- Diluir completamente la muestra con el solvente antes de pasarlos en la columna C18, para que el tiempo de eluido y el rendimiento sean proporcionales en todas las muestras.
- Procurar que una vez preparados los reactivos para determinar la capacidad antiinflamatoria estén protegidos de la luz y se los utilice lo más breve posible para evitar su degradación tomando en cuenta los tiempo de utilización que marca el kit.
- Realizar pruebas de selección de formas farmacéuticas para utilizar los subproductos de guayaba como medicina contra la inflamación.
- Realizar experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* de extractos hidrofílicos de guayaba para controlar la inflamación, con la finalidad de seleccionar la apropiada forma farmacéutica de dicho extracto.
- Considerar al extracto purificado de guayaba como ingrediente adicional por su textura uniforme y sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo, L., Buitrago, D., Marquina, M., Morales, N., Méndez, G., Pernía, T., Sosa M. (2002). Comparación de la actividad antiinflamatoria de los polifenoles presentes en las frutas; Mora (*Rubus fruticosus* B.), Fresa (*Fragaria vesca* L.) y Grapefruit (*Citrus paradisi* M). *Revista de la Facultad de Farmacia* 44(2),64–69.
- Arranz, S. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. (Tesis doctoral) Universidad Complutense de Madrid, 1-96.
- Barajas, J., Arias, Z., & Hincapié, G. (2011). Evaluación del secado por convección de la guayaba (*Psidium guajava* L.) variedad manzana. *Revista Investigaciones Aplicadas | ISSN 2011 - 0413 | Medellín - Colombia*, 5, 12.
- Bentebibel, A. (2009). Estudio de los mecanismos de inhibición de la actividad carnitina palmitoiltransferasa 1. (Tesis doctoral inédita). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Barcelona.
- Berardini, N; Knodler, M; Schieber, A., Carle R. (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technology* 6(4), 442-452.
- Calder, P., Albers, R., Antoine, J., & Al., E. (2009). Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *The British journal of nutrition*, 101 Suppl, S1–45. doi: 10.1017/S0007114509377867.
- Calderon Ramos, A. D., Lazo, M., & Job, E. (2009). Producción de frutos de guayaba (*Psidium Guajava* L.) variedad Taiwán 1, utilizando diferentes programas de fertilización de npk (Tesis doctoral). Universidad de El Salvador).
- DuBois, M; Gilles, KA; Hamilton, JK et al. 2002. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Dutta, S., & Das, S. (2010). A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* Linn. on experimental animal models. *Pharmacognosy research*, 2(5), 313–7. doi:10.4103/0974-8490.72331.

- Dweck, A.C (1987). A review of Guava (*Psidium guajava* L.). Disponible en www.dweckdata.com/Published_papers/Psidium_guajava.pdf
- Erdmann, G., Hammb, L., Baggiob, C., Wernerb, M., Iacomina, M., & Cordeiro, L. (2013). Structure of a galactoarabinoglucuronoxylan from tamarillo (*Solanum betaceum*), a tropical exotic fruit, and its biological activity. *Food Chemistry*, 1 November 2013,, Volume 141(1), 510–516.
- Garrido, G., González, D., Delporte, C., Backhouse, N., Quintero, G., Núñez-Sellés, A. J. and Morales, M. A. (2001), Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phyther. Res.*, 15: 18–21. doi: 10.1002/1099-1573(200102)15:1<18::AID-PTR676>3.0.CO;2-R
- Geronikaki,A., Gavalas A. Antioxidants and Inflammatory Disease: Synthetic and Natural Antioxidants with Anti-Inflammatory Activity. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, Volume 9, Number 6, July 2006 , pp. 425-442(18)
- Gómez, H., González, K., & Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, 10(núm.3.), 182–217.
- González, M y González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods* 2(12), 1842-1866.
- Hamid, K; Abdullah, A; Jusoh, K et al. (2010). Antioxidant Activity of Pink-Flesh Guava (*Psidium guajava* L.): Effect of Extraction Techniques and Solvents. *Food Analytical Methods* 4(1), 100-107.
- Herrera, A., García, D., Herrera, P., & Pérez, J. (2011). Enfermedades Sistémicas y del Aparato Locomotor. Universidad de valencia (pp. 1–241).España:PUV
- INEC, (2004-2010).Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC), Disponible en:http://www.inec.gob.ec/estadisticas/index.php?option=com_remository&Itemid=&func=start_down&id=1529&lang=es&TB_iframe=true&height=250&width=800. Consulta: Junio, 2013.

- Kang, T., & Liang, M. (1997). Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochemical pharmacology*, 54(9), 1013–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374422>
- Kong, K. W., & Ismail, A. (2011). Lycopene content and lipophilic antioxidant capacity of by-products from *Psidium guajava* fruits produced during puree production industry. *Food and Bioproducts Processing*, 89(1), 53–61. doi:10.1016/j.fbp.2010.02.004
- Kuskoski, M; Asuero, A; Troncoso, A et al. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 25(4), 726-32.
- Li, X; Gao, WY.; Huang, L et al. 2011. Antioxidant and Antiinflammation Capacities of Some Pear Cultivars. *Journal of food science* 76(7): 985-990.
- Lopez, B. (2008). Caracterización de las variedades de la guayaba (*Psidium Guajava*) cultivadas en el Ecuador. (Memoria de ingeniería en alimentos inédita).Departamento de Ciencias de los Alimentos. Universidad Equinoccial.
- Marinova, D; Ribarova, F y Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40(3) 255-260
- Marquina, V; Araujo, L; Ruíz, J. (2008). Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 58(1), 98-102.
- Martinez, I; Periago, M; y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN [online]*.vol.50, n.1, pp. 5-18
- Martínez, R; Torres, P; Meneses, M et al. 2012b. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry* 135:1520–1526.
- Martínez, S; González, J; Culebras, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17(6), 271–278.
- Mirzaei-Aghsaghali A y Maheri-Sis, N. (2008). Nutritive Value of Some Agro-Industrial By-products for Ruminants - A Review. *World Journal of Zoology*, 3, 40-46.

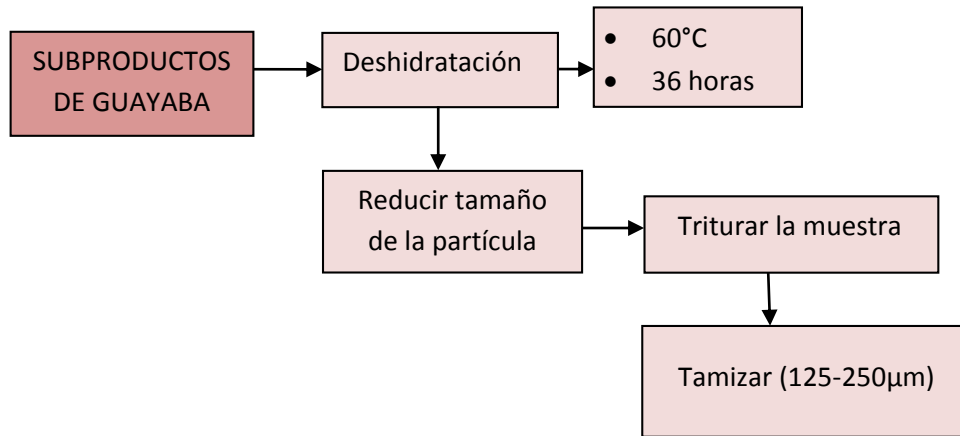
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of chromatography. A*, 1187(1-2), 18–24. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.001
- Mosquera, S. 2006. Exóticas guayabas (en línea). Disponible en: <http://www.eluniverso.com/2006/11/12/0001/219/6CC7D54AAB344AAF9062E39334D4BC1A.html>
- Olajide, O., Awe, S., & Makinde, J. (1999). Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. *Fitoterapia* 70, 25–31.
- Pérez, A., Cartoya, L., & Valencia, V. (1998). Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Revista Cubana Española*, 35(2), 56–61.
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290–302. doi:10.1021/jf0502698.
- Ramírez, A., & Delahaye, E. P. (2009). Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 293–294.
- Ramírez, M; Marnet, N; Kumar, V; Roussos, S; Guyot, S; Augur, C.(2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(5): 1344-1349.
- Reddy, L; Reddy, O & Wee, Y. (2011). Production of ethanol from mango (*Mangifera indica* L.) peel by *Saccharomyces cerevisiae* CFTRI101. *African Journal of Biotechnology* 10(20); 41383-4189.
- Robles, F (2011). Análisis de residuos de morfina en cítricos mediante técnicas cromatográficas acopladas a detectores de espectrometría de masas (Tesis doctoral). Control alimentario y ambiental. Universitas Almeriensis.
- Rodriguez, M., Boffill, M., Lorenzo, G., Sánchez, P., López, R., Verdecía, B., & Luis, D. (2005). Evaluación preclínica del efecto antiinflamatorio del jugo de *Morinda Citrifolia* L. *REVISTA CUBANA PLANT MED* 2005;10(3-4), 10.

- Rojas, D., Narváez, E; Restrepo L. (2009). Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia. *Química Nova* 32(9), 2336-2340.
- Rojas, D; Narváez, E y Restrepo, L. (2008). Evaluación del Contenido de Vitamina C, Fenoles Totales y Actividad Antioxidante en pulpa de Guayaba (*Psidium guajava* L.) de las variedades Pera, Regional Roja Y Regional Blanca. *Red-Alfa Lagrotech*, pp. 49–60. BOGOTÁ.
- Sone, Y; Moon, JK; Mai, TT et al. 2011. Antioxidant/anti-inflammatory activities and total phenolic content of extracts obtained from plants grown in Vietnam. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(12): 2259-2264.
- Sultana, BB; Anwar, F; Rafique, M; Shadio,S.(2008). Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas y Aceites* 59(3): 205-217.
- Tanaka A, Horiuchi M, Umano K and Shibamoto T, Antioxidant and anti-inflammatory activities of water distillate and itsdichloromethane extract from licorice root (*Glycyrrhiza uralensis*) and chemical composition of dichloromethane extract. *J Sci Food Agric* 88:1158–1165 (2008).
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669–675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003.
- Torres V., (2010).Determinación del potencial nutritivo y funcional de guayaba (*Psidium Guajava* L) Cocona (*Solanum Sessiliflorum* Dunal) Camu Camu (*Myrciaria Dubia* Vaugh). (Tesis ingeniería agroindustrial). (Departamento de Ingeniería Química y Agroindustria). (Universidad Politécnica Nacional).
- Tzec, A., Villaseñor, C., Eugenio, R., Soto, M., & Peña, M. (2010). Una revisión sobre la importancia del fruto de Guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 19, 74–82.

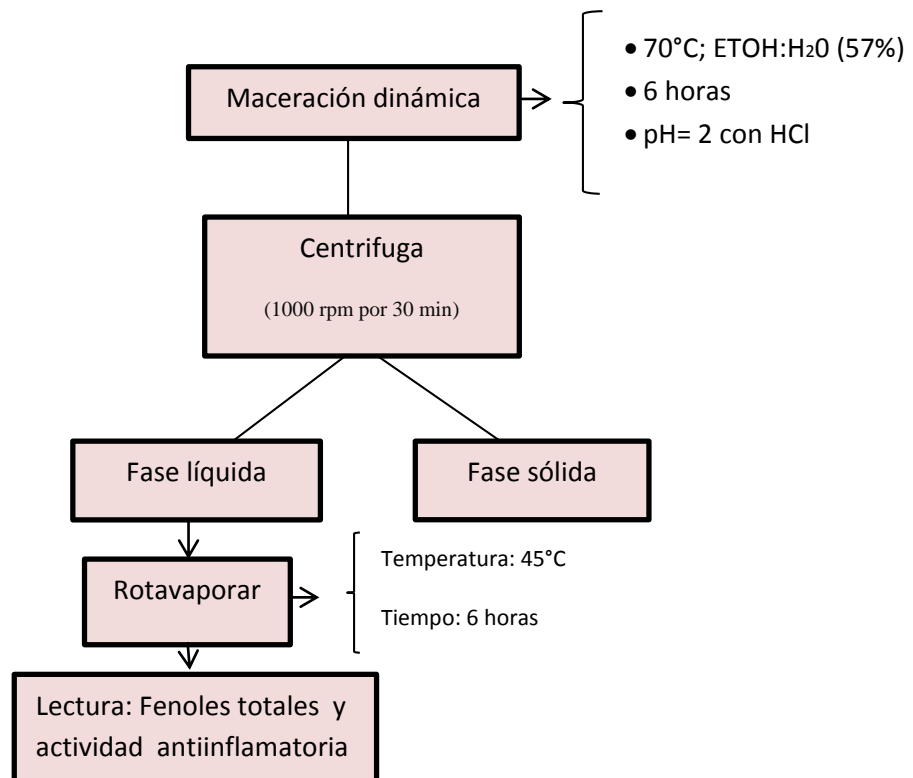
- Vacas, O., & Borja, M. (2008). Comercialización de las plantas útiles del Ecuador, Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador 1925, 56–61. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus. 56–61.
- Vargas, D., Soto, M., Gonzales, E., & Martinez, G. (2006). Cinética de Acumulación y Distribución de Flavonoides en Guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia*, 40, 109–115.
- Xaubet, A., Roca-Ferrer, Pujols, L., Agusti, C., Mullol, J., Gimferrer, J. M., & Picado, C. (2011). [Cyclooxygenase-2 levels are increased in the lung tissue and bronchial tumors of patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Archivos de bronconeumología*, 47(12), 584–9. doi:10.1016/j.arbres.2011.05.015

Anexo 1: METODOLOGÍA

1.1 Preparación de la materia prima

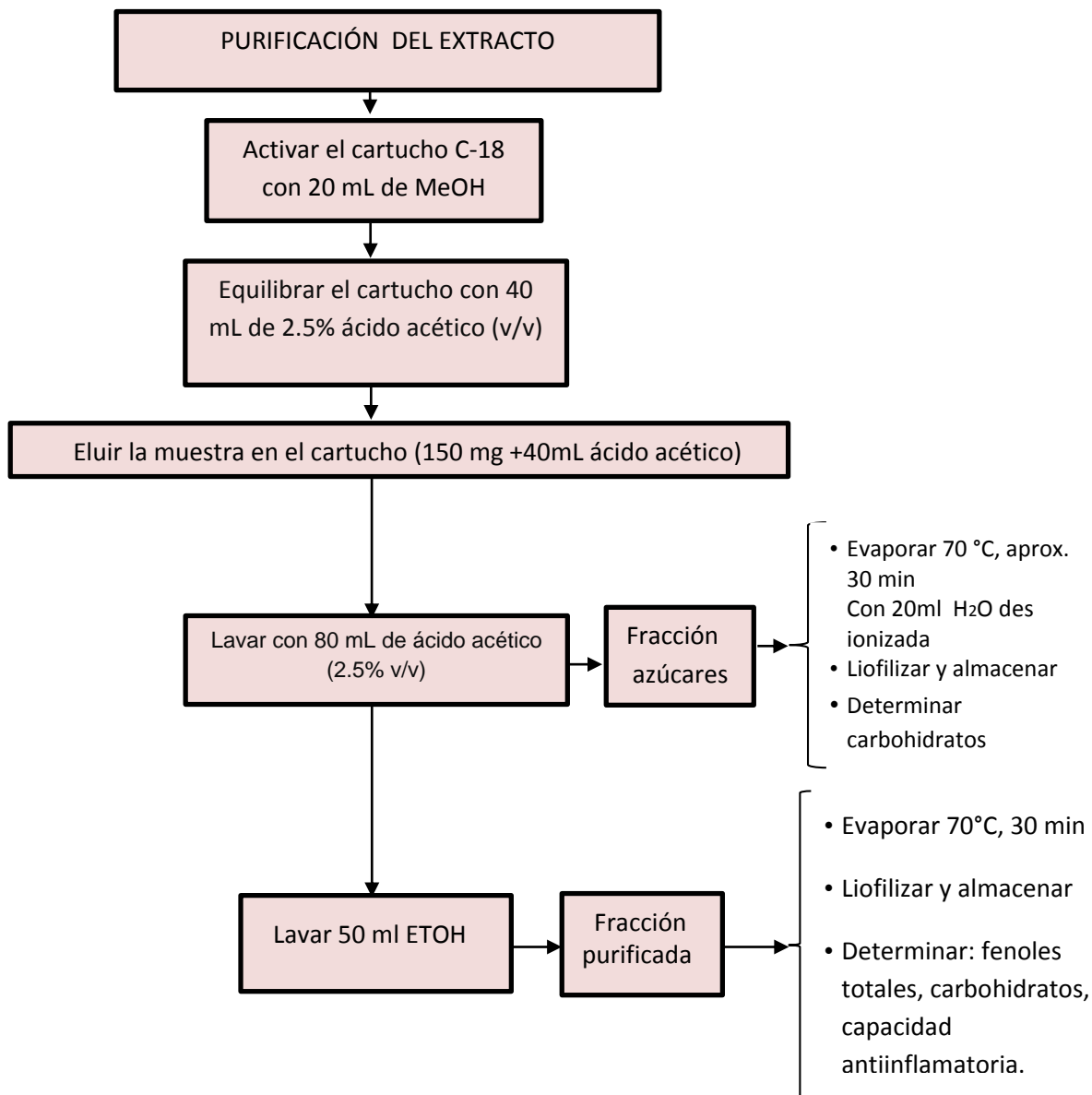


1.2 Obtención del extracto



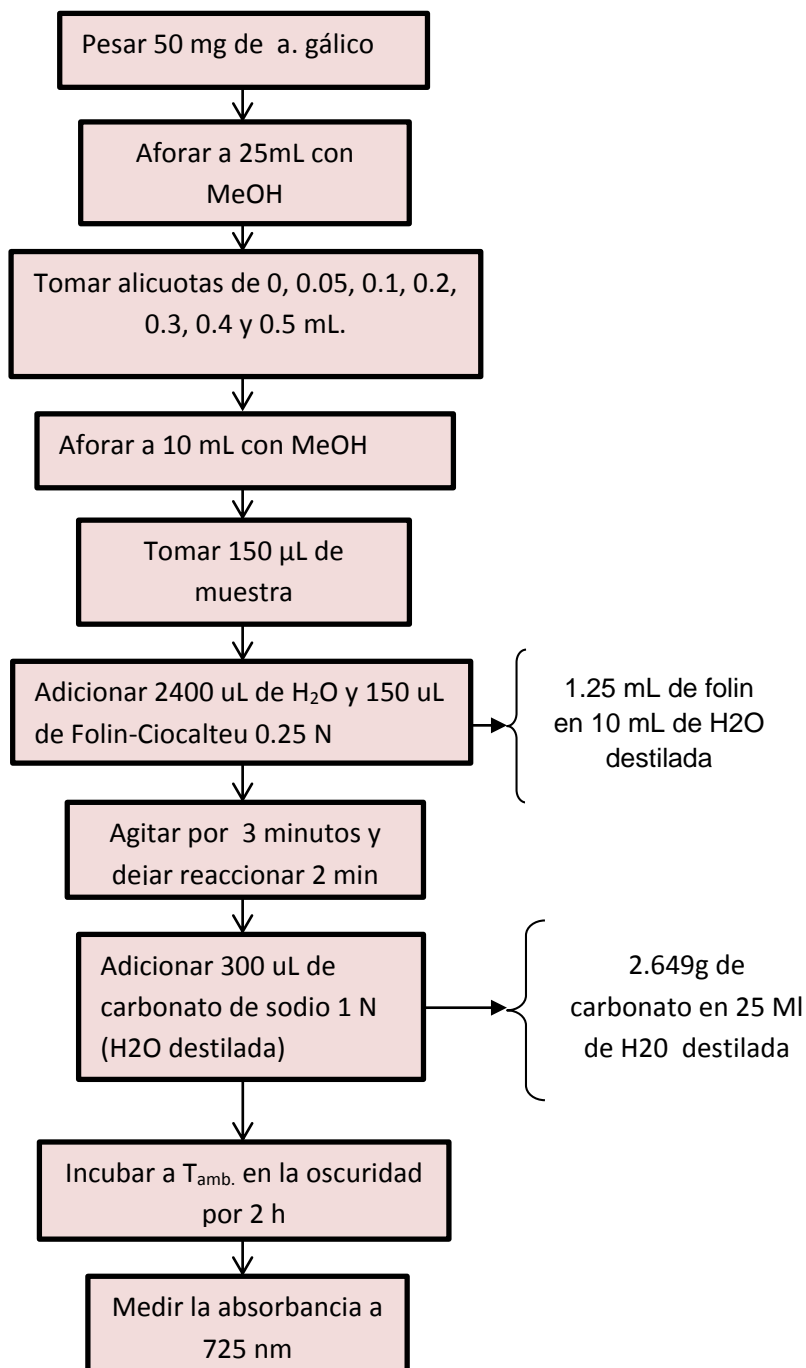
Anexo 2: PURIFICACIÓN

2.1 Eluido del extracto por los cartuchos Sep Pack C18

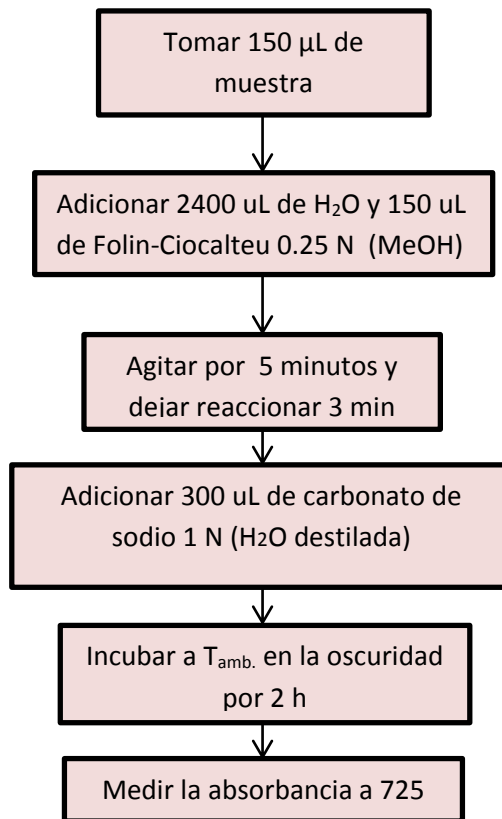


Anexo 3: MEDICIÓN DE FENOLES TOTALES

3.1 Método Folin-Ciocalteu. Preparación y lecturas de estándares

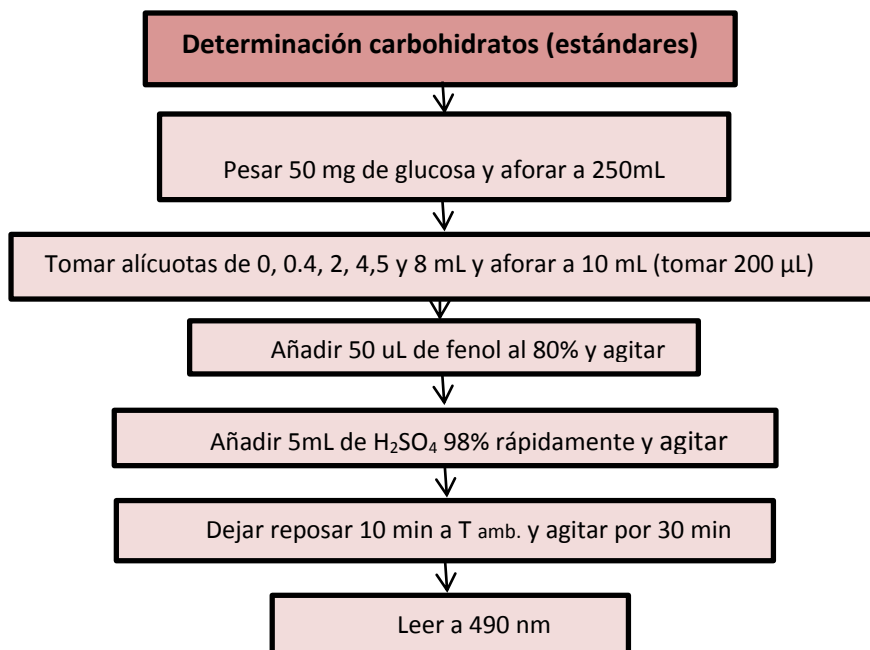


3.2 Método Folin-Ciocalteu. Preparación y lecturas de muestras

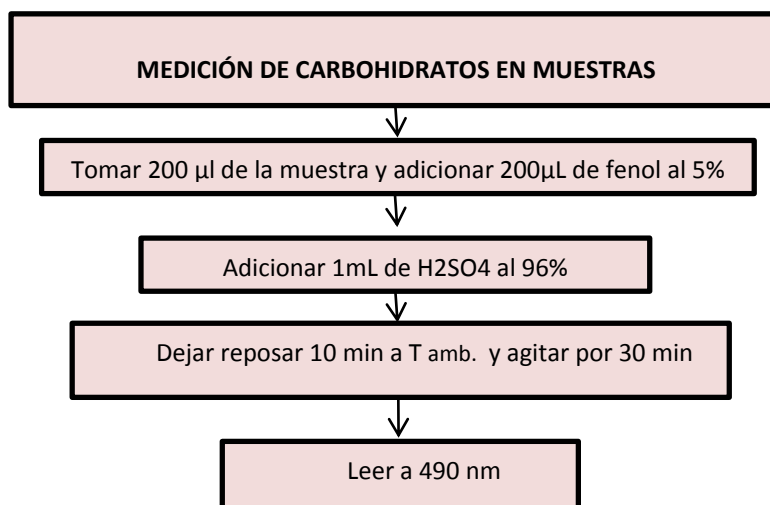


Anexo 4: DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

4.1 Preparación de estándares. Método fenol-ácido sulfúrico.



4.2 Preparación de muestras. Método fenol-ácido sulfúrico

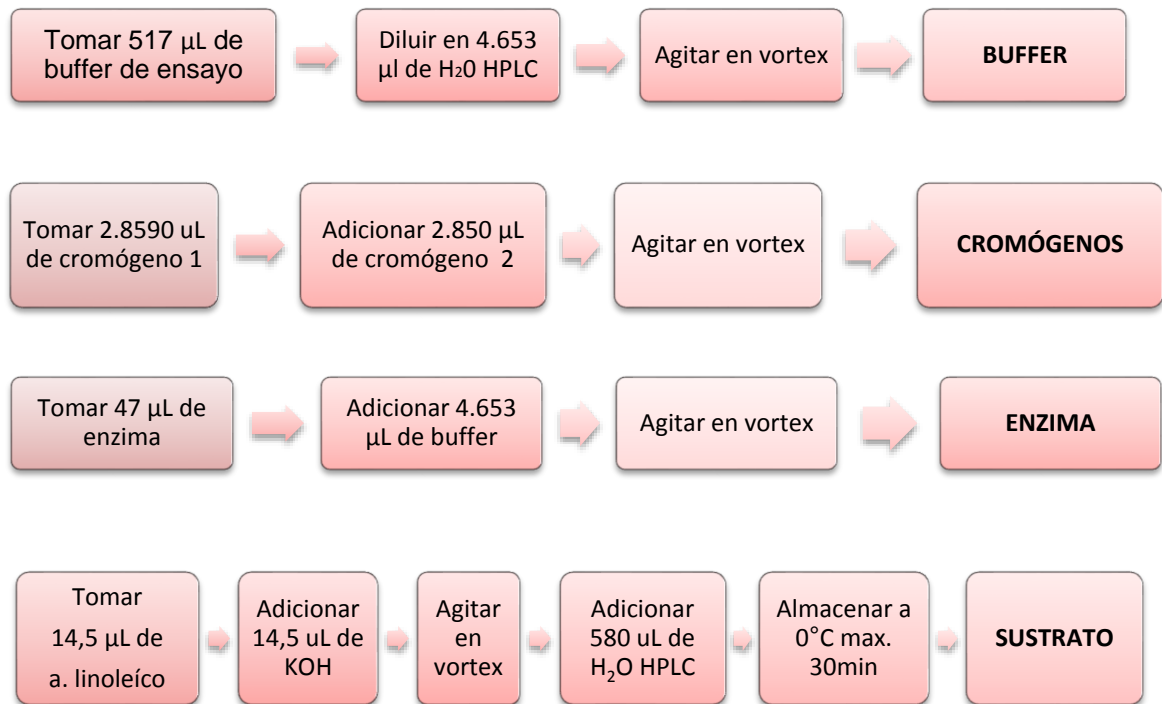


Anexo 5: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA

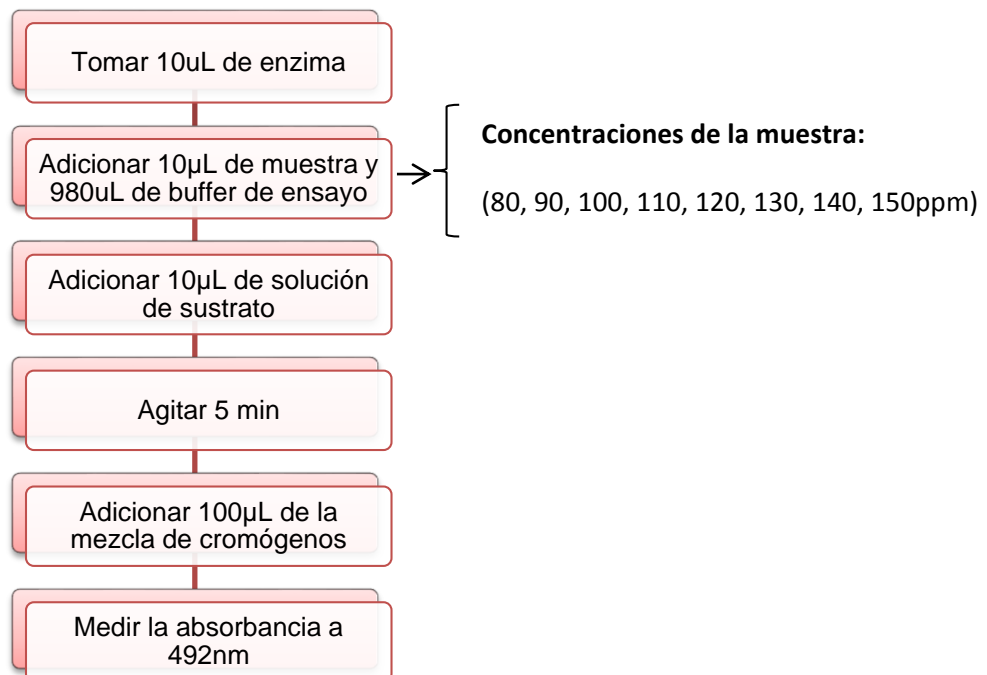
5.1 Porcentaje de reactivos para 35 muestras

BUFFER	<ul style="list-style-type: none">• 3mL buffer (10%)• 27mL H2O HPLC (90%)
LIPOXIGENASA	<ul style="list-style-type: none">• 10 µL enzima (1%)• 990µL buffer (99%)
A. LINOLÉICO	<ul style="list-style-type: none">• 25µL de A.linoléico (2.5%)• 25µL KOH (2.5%)• 950µL H2O HPLC (95%)

5.2 Preparación de las soluciones para la inhibición de la lipoxigenasa para 96 muestras



5.3 Inhibición de la lipoxigenasa

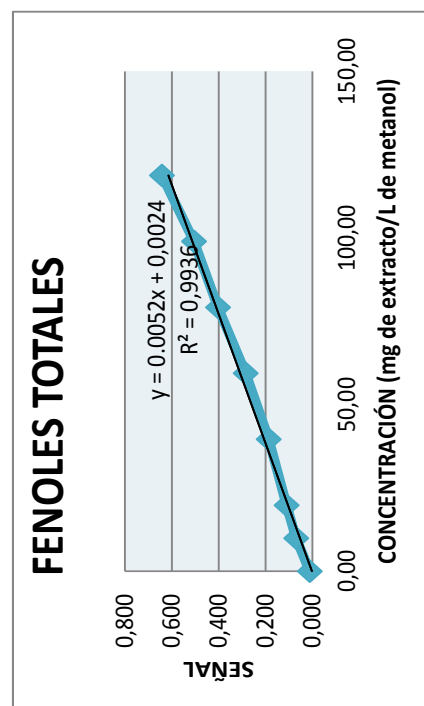


ANEXO 6: DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES.

6.1 Curva de Estándares

w (g) Ác. Gálico	PM g/mol	R %	Aforo (mL)	Concentración (uM)
0.05	170	99	25	11647.06

Alicuota (mL)	Aforo (mL)	AG (mg/L)	AG (uM)	Absorbancia			Promedio	Ajuste	
				S1	S2	S3		Pendiente	Intersecc
0.00	10	0.00	0.00	0.012	0.012	0.011	0.012	0.005156	0.00088
0.05	10	9.90	58.24	0.070	0.069	0.070	0.070	0.110	0.002366
0.10	10	19.80	116.47	0.110	0.110	0.111	0.110	0.285	0.9979
0.20	10	39.60	232.94	0.185	0.187	0.188	0.187	0.403	0.997
0.30	10	59.40	349.41	0.284	0.285	0.285	0.285	0.505	R ²
0.40	10	79.20	465.88	0.403	0.401	0.405	0.403	0.9958	0.994
0.50	10	99.00	582.35	0.505	0.505	0.506	0.505		
0.60	10	118.80	698.82	0.642	0.643	0.643	0.643		



ANEXO 6.2. Determinación de fenoles totales en extractos purificados y no purificados

Muestra	abs	Concentración		extracto (g) diluido a 1000 ppm	mg GAE/g de extracto diluido	extracto (g)	mg GAE/ g ext.	muestra (g)	mg GAE /100g muestra	Desv estand	Prome	CV
		(mg/L)	(uM)									
M.No purif 1	0.299	57.53	338.40	0.00152	57.53	1.65910	95.443935	4.0092	2380.62294	2178.2 ±	216	9.931
M.No purif 2	0.308	59.27	348.66	0.00151	59.27 ± 1.14	1.31770	78.1039581	4.0048	1950.25377			
M.No purif 3	0.297	57.14	336.12	0.00156	57.14	1.54270	88.1493652	4.0002	2203.60742			
M. purificada 1	0.142	27.08	159.29	0.00975	27.08	1.65910	44.9282061	4.0092	1120.62771			
M. purificada 2	0.154	29.41	172.98	0.00470	29.41 ± 1.61	1.31770	38.7497049	4.0048	967.579109	1034.2 ±	78.4	7.583
M. purificada 3	0.138	26.30	154.73	0.00406	26.30	1.54270	40.5793805	4.0002	1014.42618			

Ejemplo de determinación de fenoles totales

Muestra 3 purificada

$$26.30 \frac{\text{mg GAE}}{\text{L}} * 0.00406 \text{ L} * \frac{1.54270 \text{ g extracto}}{4.0002 \text{ g muestra}} * 100 \text{ g} = 1014.42 \frac{\text{mg GAE}}{100 \text{ g muestra}}$$

Anexo 7: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA

7.1 % de inhibición de la lipoxigenasa en extractos no purificado

Muestra	w inicial muestra (g)	Extracto (g)	Peso extracto diluido (g)	Volumen dilución (mL)	Volumen 2 dilución (mL)	Volumen aforo 2 (mL)	Abs muestra	Abs blanco	Abs IA	IA	Inhibidor Abs muestra-abs blanco	% de Inhibición
M 1. no puri 80	4.01	1.66	0.00152	1.5	0.08	1	0.172	0.111	0.195	0.08400	0.06	27.38
M 1. no puri 90	4.01	1.66	0.00152	1.5	0.09	1	0.19	0.155	0.204	0.04900	0.04	28.57
M 1. no puri 100	4.01	1.66	0.00152	1.5	0.1	1	0.164	0.111	0.195	0.08400	0.05	36.90
M 1. no puri 110	4.01	1.66	0.00152	1.5	0.11	1	0.186	0.155	0.204	0.04900	0.03	36.73
M 1. no puri 120	4.01	1.66	0.00152	1.5	0.12	1	0.184	0.155	0.204	0.04900	0.03	40.82
M 1. no puri 130	4.01	1.66	0.00152	1.5	0.13	1	0.172	0.155	0.204	0.04900	0.02	65.31
M 1. no puri 140	4.01	1.66	0.00152	1.5	0.14	1	0.165	0.155	0.204	0.04900	0.01	79.59
M 1. no puri 150	4.01	1.66	0.00152	1.5	0.15	1	0.164	0.155	0.204	0.04900	0.01	81.63
M2. no puri 80	4.00	1.66	0.00151	1.5	0.08	1	0.193	0.155	0.204	0.04900	0.04	22.45
M2. no puri 90	4.00	1.66	0.00151	1.5	0.09	1	0.191	0.155	0.204	0.04900	0.04	26.53
M2. no puri 100	4.00	1.66	0.00151	1.5	0.1	1	0.186	0.155	0.204	0.04900	0.03	36.73
M2. no puri 110	4.00	1.66	0.00151	1.5	0.11	1	0.186	0.155	0.204	0.04900	0.03	36.73
M2. no puri 120	4.00	1.66	0.00151	1.5	0.12	1	0.181	0.155	0.204	0.04900	0.03	46.94
M2. no puri 130	4.00	1.66	0.00151	1.5	0.13	1	0.171	0.155	0.204	0.04900	0.02	67.35
M2. no puri 140	4.00	1.66	0.00151	1.5	0.14	1	0.165	0.155	0.204	0.04900	0.01	79.59
M2. no puri 150	4.00	1.66	0.00151	1.5	0.15	1	0.162	0.155	0.204	0.04900	0.01	85.71
M3. No puri 80	4.00	1.66	0.00156	1.5	0.08	1	0.191	0.155	0.204	0.04900	0.04	26.53
M3. No puri 90	4.00	1.66	0.00156	1.5	0.09	1	0.191	0.155	0.204	0.04900	0.04	26.53
M3. No puri 100	4.00	1.66	0.00156	1.5	0.1	1	0.189	0.155	0.204	0.04900	0.03	30.61
M3. No puri 110	4.00	1.66	0.00156	1.5	0.11	1	0.188	0.155	0.204	0.04900	0.03	32.65
M3. No puri 120	4.00	1.66	0.00156	1.5	0.12	1	0.179	0.155	0.204	0.04900	0.02	51.02
M3. No puri 130	4.00	1.66	0.00156	1.5	0.13	1	0.173	0.155	0.204	0.04900	0.02	63.27
M3. No puri 140	4.00	1.66	0.00156	1.5	0.14	1	0.167	0.155	0.204	0.04900	0.01	75.51
M3. No puri 150	4.00	1.66	0.00156	1.5	0.15	1	0.16	0.155	0.204	0.04900	0.01	89.80

7.2. Porcentaje de inhibición de la lipoxigenasa en extractos purificados

Muestra	w inicial muestra (g)	Extracto correg AC (g)	Peso extracto diluido (g)	Volumen dilución (mL)	Volumen 2 dilución (mL)	Volumen aforo (mL)	Abs muestra	Abs blanco	Abs IA	IA	Inhibidor	% de Inhibición
M 1. purifica 80	4.01	0.12	0.00975	9.75	0.08	1	0.239	0.184	0.26	0.08	0.06	27.63
M 1. purifica 90	4.01	0.12	0.00975	9.75	0.09	1	0.237	0.184	0.26	0.08	0.05	30.26
M 1. purifica 100	4.01	0.12	0.00975	9.75	0.1	1	0.229	0.184	0.26	0.08	0.05	40.79
M 1. purifica 110	4.01	0.12	0.00975	9.75	0.11	1	0.226	0.184	0.26	0.08	0.04	44.74
M 1. purifica 120	4.01	0.12	0.00975	9.75	0.12	1	0.224	0.184	0.26	0.08	0.04	47.37
M 1. purifica 130	4.01	0.12	0.00975	9.75	0.13	1	0.209	0.184	0.26	0.08	0.03	67.11
M 1. purifica 140	4.01	0.12	0.00975	9.75	0.14	1	0.199	0.184	0.26	0.08	0.02	80.26
M 1. purifica 150	4.01	0.12	0.00975	9.75	0.15	1	0.193	0.184	0.26	0.08	0.01	88.16
M2. purifica 80	4.00	0.02	0.00470	4.7	0.08	1	0.237	0.184	0.26	0.08	0.05	30.26
M2. purifica 90	4.00	0.02	0.00470	4.7	0.09	1	0.234	0.184	0.26	0.08	0.05	34.21
M2. purifica 100	4.00	0.02	0.00470	4.7	0.1	1	0.231	0.184	0.26	0.08	0.05	38.16
M2. purifica 110	4.00	0.02	0.00470	4.7	0.11	1	0.228	0.184	0.26	0.08	0.04	42.11
M2. purifica 120	4.00	0.02	0.00470	4.7	0.12	1	0.226	0.184	0.26	0.08	0.04	44.74
M2. purifica 130	4.00	0.02	0.00470	4.7	0.13	1	0.208	0.184	0.26	0.08	0.02	68.42
M2. purifica 140	4.00	0.02	0.00470	4.7	0.14	1	0.198	0.184	0.26	0.08	0.01	81.58
M2. purifica 150	4.00	0.02	0.00470	4.7	0.15	1	0.192	0.184	0.26	0.08	0.01	89.47
M3. purifica 80	4.00	0.03	0.00406	4.06	0.08	1	0.235	0.184	0.26	0.08	0.05	32.89
M3. purifica 90	4.00	0.03	0.00406	4.06	0.09	1	0.233	0.184	0.26	0.08	0.05	35.53
M3. purifica 100	4.00	0.03	0.00406	4.06	0.1	1	0.229	0.184	0.26	0.08	0.05	40.79
M3. purifica 110	4.00	0.03	0.00406	4.06	0.11	1	0.226	0.184	0.26	0.08	0.04	44.74
M3. purifica 120	4.00	0.03	0.00406	4.06	0.12	1	0.221	0.184	0.26	0.08	0.04	51.32
M3. purifica 130	4.00	0.03	0.00406	4.06	0.13	1	0.209	0.184	0.26	0.08	0.03	67.11
M3. purifica 140	4.00	0.03	0.00406	4.06	0.14	1	0.199	0.184	0.26	0.08	0.02	80.26
M3. purifica 150	4.00	0.03	0.00406	4.06	0.15	1	0.195	0.184	0.26	0.08	0.01	85.53

Concentración	Peso de la muestra	Volúmen dilución (ml)	Volúmen 2 dilución (ml)	Volúmen aforo (ml)	Abs muestra	Abs blanco	Abs IA	IA	Inhibidor	% de Inhibición
2,5	0.00306	10	0.15	10	0.221	0.145	0.26	0.11500	0.08	33.91
5	0.00306	10	0.125	10	0.197	0.145	0.23	0.08500	0.05	38.82
7,5	0.00306	10	0.1	10	0.175	0.133	0.22	0.08700	0.04	51.72
10	0.00306	10	0.05	10	0.161	0.133	0.22	0.08700	0.03	67.82
12,5	0.00306	10	0.025	10	0.142	0.134	0.22	0.08600	0.01	90.70

Ejemplo del cálculo del porcentaje de Inhibición de la lipoxigenasa

Concentración 2.5 de quercetina

IA

$$IA = abs\ IA - abs\ blanco$$

$$IA = 0.26 - 0.145 = 0.115$$

Inhibición (gr muestra):

$$Ihb = abs\ muestra - abs\ blanco$$

$$Ihb = 0.221 - 0.145 = 0.076$$

% de inhibición

$$\%IA = \left[\frac{IA - Ihb}{r_n} \right] * 100$$

$$\%IA = \left[\frac{0.115 - 0.0076}{0.115} \right] * 100 = 33.91\%$$

