



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

# **INFORME TÉCNICO**

## **DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

### **INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**PRESENTA**  
**Raúl Antonio Maqueda Alfaro**

## **NOMBRE DEL PROYECTO**

**Evaluación de los metabolitos secundarios de las hojas de nanchi (*Byrsonima crassifolia*) y dos variedades de guayaba (*Psidium guajava*)**

**PERIODO DE REALIZACIÓN**  
**AGOSTO-DICIEMBRE 2012**

# Contenido

Página

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tablas.....	ii
1. Introducción.....	1
2. Justificación.....	8
3. Objetivos .....	10
3.1 Objetivo General .....	10
3.2 Objetivos específicos .....	10
4. Caracterización del área.....	11
4.1 Políticas y normas.....	11
4.2 Objetivos de la institución .....	11
4.3 Servicios que presta la institución .....	11
4.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica .....	12
4.5 Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica .....	13
5. Problemas a resolver .....	15
6. Alcances y Limitaciones .....	17
6.1 Alcances .....	17
6.2 Limitaciones .....	17
7. Fundamento Teórico .....	18
8. Metodología.....	25
8.1 Obtención de los extractos de las hojas de las dos variedades de <i>Psidium guajava</i> y <i>Byrsonima crassifolia</i> .....	25

8.1.1 Tratamiento de la muestra .....	25
8.1.2 Extracto metanólico .....	26
8.2 Análisis de los extractos de <i>Byrsonima crassifolia</i> , <i>Psidium g.</i> y <i>Psidium g. Regional blanca</i> por Cromatografía en Capa Fina (CCF) .....	27
8.2.1 Compuestos polifenólicos .....	27
8.2.1.1. Flavonoides .....	27
8.2.2Cumarinas .....	28
8.2.3Saponinas.....	28
8.3 Cuantificación de polifenoles de los extractos de <i>Byrsonima crassifolia</i> , <i>P. guajava.</i> y <i>P. guajava</i> var. <i>Regional blanca</i> .....	28
8.3.1 Fenoles totales.....	28
8.3.2 Flavonoides totales .....	29
8.4. Medición de la actividad antiradical de los extractos de <i>Byrsonima crassifolia</i> , <i>P. guajava.</i> y <i>P. guajava</i> var. <i>Regional blanca</i> .....	29
9. Resultados y discusión.....	31
9.1 Identificación de flavonoides por CCF.....	31
9.2 Identificación de cumarinas por CCF .....	36
9.3 Identificación de saponinas por CCF .....	37
9.4 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.....	37
9.5 Determinación de la actividad antiradical.....	38
10. Conclusiones.....	41
11. Bibliografía .....	42
12. Anexos .....	45
Anexo A: Curva patrón de Fenoles totales (Folin-Ciocalteu). .....	45
Anexo B: Curva patrón de Flavonoides totales (Método de AlCl <sub>3</sub> ).....	45

## Lista de Figuras

Página

Figura 1. Árbol de nanchi ( <i>B. crassifolia</i> ). Hojas, fruto y flores. ....	1
Figura 2. Compuestos identificados en la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> .....	2
Figura 3. Fruto y hojas del guayabo ( <i>Psidium guajava</i> L.).....	4
Figura 4. Flavonoides de la hoja de guayabo.....	6
Figura 5. Producción de flavonoides a partir de cumaril CoA y malonil CoA (Shahidi, y Naczki, 2004). ....	18
Figura 6. Quelación de radicales libres por la acción de antirradicales y antioxidantes. ....	23
Figura 7. Sistema S3 para flavonoides. Análisis de los extractos metanólicos de hoja de <i>Byrsonima crassifolia</i> (EMB), <i>Psidium guajava</i> (EMP1) y <i>Psidium guajava</i> var. Regional blanca (EMP2). N: Naringenina, Q: quercetina y R: rutina. ....	34
Figura 8. Análisis por CCF de cumarinas en extractos metanólicos de hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (EMB), <i>Psidium guajava</i> (EMP1) y <i>Psidium guajava</i> var. Regional blanca (EMP2).....	36
Figura 9. Análisis por CCF de saponinas en extractos metanólicos de hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (EMB), <i>Psidium guajava</i> (EMP1) y <i>Psidium guajava</i> var. Regional blanca (EMP2).....	37
Figura 10. Gráficas de inhibición del DPPH (Actividad antirradical) a diferentes concentraciones.....	39

## Lista de Tablas

Página

Tabla 1 . Sistemas usados para la identificación de flavonoides en TLC .....	27
Tabla 2. R <sub>f</sub> de la cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos de hoja de <i>Byrsonima c.</i> , <i>Psidium g.</i> y <i>Psidium g. var. Regional blanca.</i> .....	35
Tabla 3 . Resultados de la cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales de los tres extractos. ....	38
Tabla 4 . Valores de IC <sub>50</sub> obtenidos en el análisis de la actividad antiradical de los extractos. ....	40

## 1. Introducción

El nanche o nanchi (*Byrsonima crassifolia* L.) es un recurso frutícola de Mesoamérica con amplia distribución, pero poco estudiado. Las hojas generalmente son alargadas (Figura 1), decusadas, simples y elípticas, de dimensiones variables, con margen entero, ápice agudo o redondeado y base aguda. Su consistencia es coriácea y el envés está cubierto por tricomas grisáceos o rojizos (Cordero y Boshier, 2003). Los pecíolos varían de 5 a 25 mm de largo, con yemas de 3 a 7 mm, agudos y cubiertos por dos estípulas ferruginosas. Poseen una estípula intrapeciolar ovada, de 2 a 5 mm de largo, pubescente y persistente (Martínez *et al.*, 2010).



**Figura 1. Árbol de nanche (*B. crassifolia*). Hojas, fruto y flores.**

El uso de plantas medicinales es una práctica antigua en las poblaciones humanas, sin embargo, hay pocos estudios científicos de estas plantas y los riesgos de su consumo no son aún completamente dilucidados. A pesar del uso popular de especies de *Byrsonima* como plantas medicinales, aun no hay información acerca de su química o sus efectos genotóxicos (Sannomiya, 2007).

Dentro de los compuestos identificados hasta ahora y que están relacionados con su posible actividad frente a diversos padecimientos tenemos a:  $\beta$ -amirina, betulina, ácido betulínico, ácido oleanólico, quercetina, epicatequina y ácido gálico. (Figura 2).

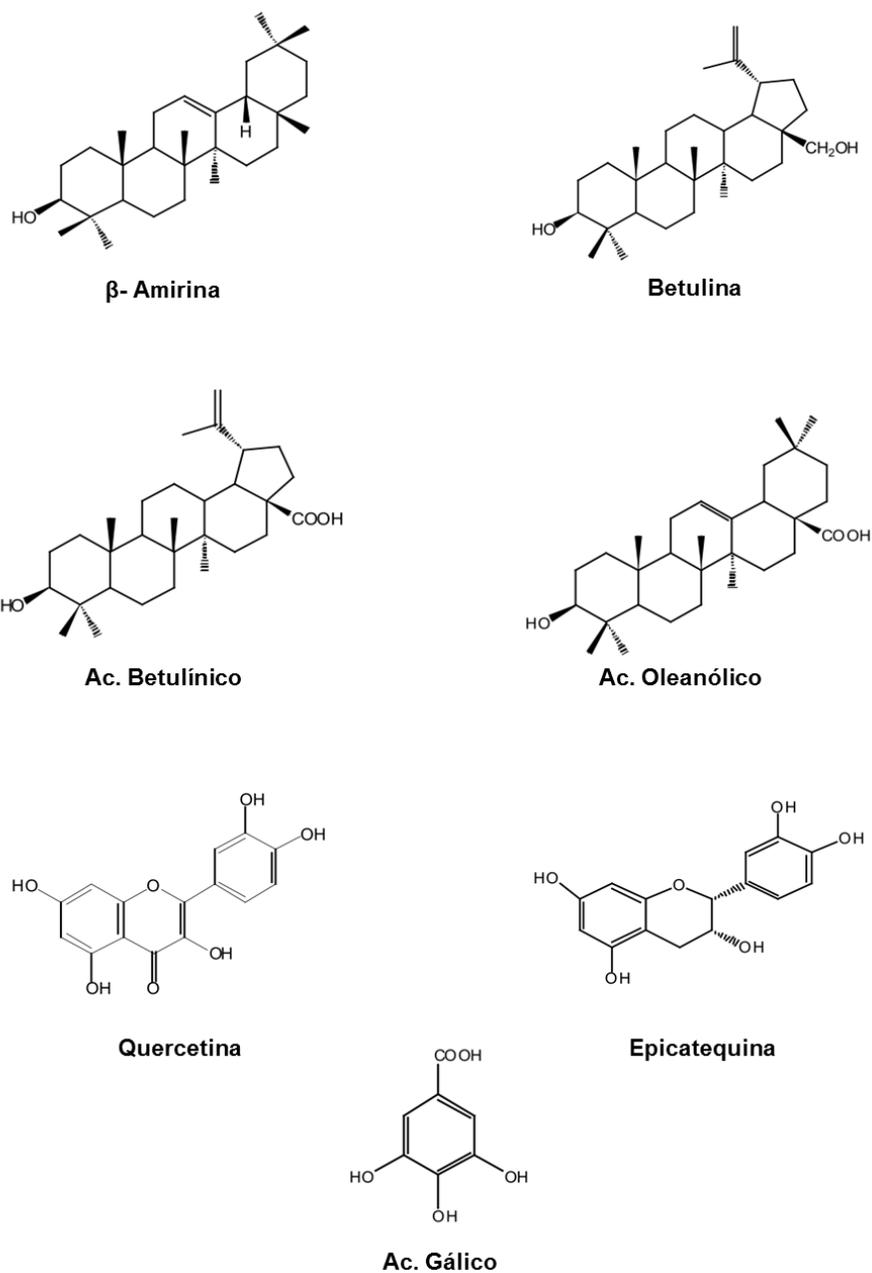


Figura 2. Compuestos identificados en la corteza de *Byrsonima crassifolia*.

Las plantas del género *Byrsonima* gozan de un número de usos etno-medicinales. Las hojas son aplicadas contra la fiebre, en úlceras, como diurético, como anti asmáticos y en infecciones cutáneas (Silva et al., 2001; Aguiar et al., 2005).

La investigación química de otras especies de *Byrsonima* resultó en el aislamiento de esteroides, triterpenos, flavonoides, pro-anticianidinas, ácidos galoil-quínicos y sulfonoglicolípidos (Bejar et al., 1995; Rastrelli et al., 1997; Mendes et al., 1999; Sannomiya et al., 2004; Sannomiya et al., 2005a,b). Bonzani da Silva (1970) y Bonzani da Silva (1970b) describieron el aislamiento de ácido gálico, pirogalol, piro-catequina y amirina de las raíces de *Byrsonima intermedia*.

La clasificación taxonómica de *B. crassifolia* es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Malpigiaceae

Género: *Byrsonima*

Especie: *B. crassifolia*

Por otro lado, el guayabo o árbol de la guayaba (*Psidium guajava* L., familia Myrtaceae es originario de Mesoamérica. En México, las hojas de este árbol se usan con fines medicinales desde épocas muy remotas; su presencia es constante en todas las fuentes históricas sobre herbolaria indígena a lo largo de, al menos, quinientos años. Entre los antiguos mexicanos esta planta recibió el nombre náhuatl de xalxócotl haciendo referencia al fruto que es “de cáscara dura y ácida (xócotl) y arenoso (xalli)” dado su abundante contenido en pequeñas semillas, que parecen arenilla (Rivera *et al*, 2003)

Sus hojas son opuestas, de color verde y forma alargada (Figura 3), presentan una longitud que oscila de 8 a 18cm y de 8 a 12 cm de ancho; por el envés posee una nervadura central pronunciada y de ella se desprenden otras laterales de menor tamaño. Se ha extendido por todo el mundo con plantaciones bien organizadas y variedades mejoradas, para hacerlas más resistentes al ataque de microorganismos.



**Figura 3. Fruto y hojas del guayabo (*Psidium guajava* L.)**

La clasificación taxonómica de *Psidium guajava* es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Psidium*

Especie: *P. guajava*

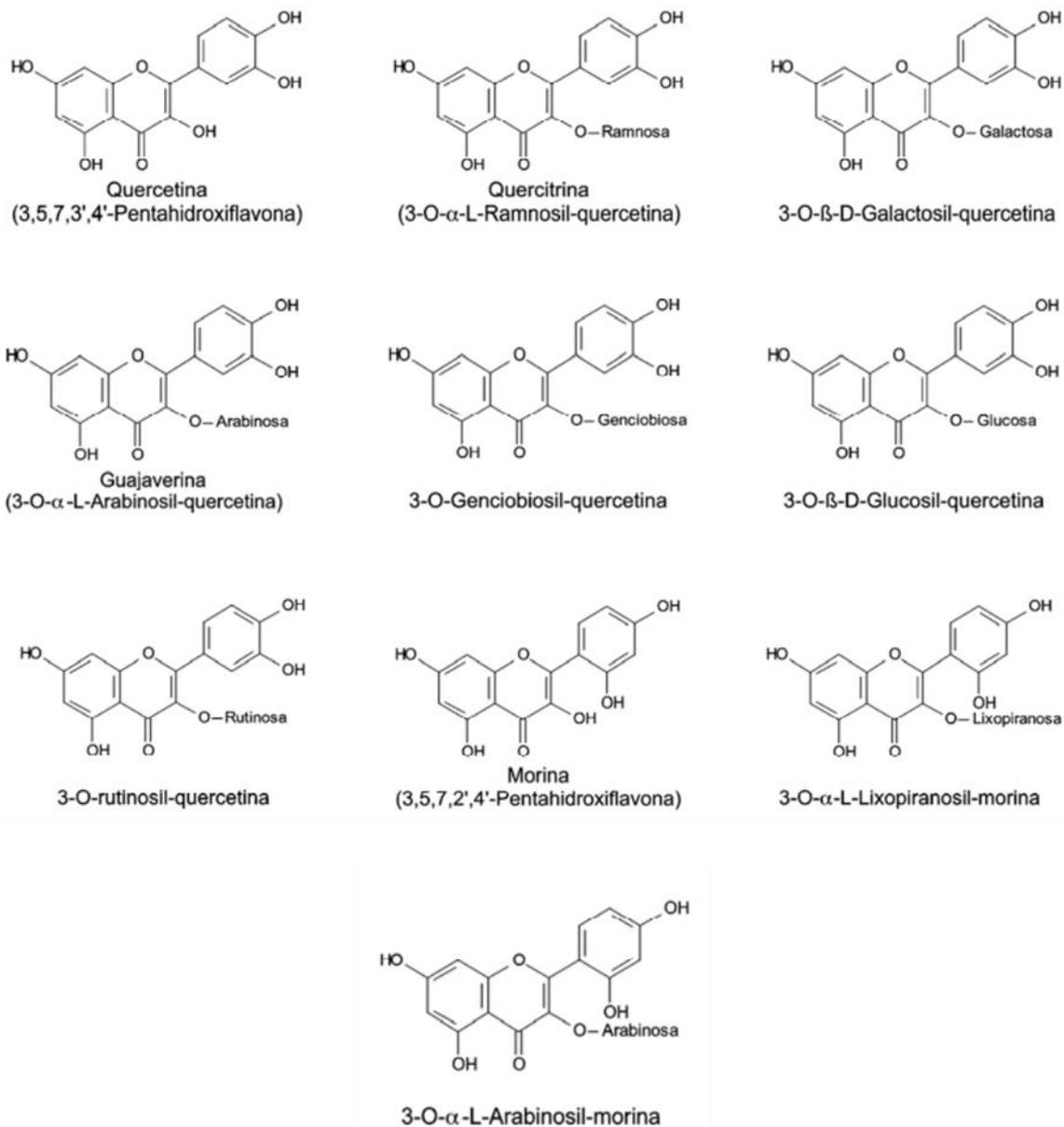
*Psidium guajava* o guayaba es usada ampliamente en un gran número de aplicaciones en la medicina tradicional (Elekwa et al.2009; Gutiérrez et al. 2008). Desde los años 50', el guayabo –principalmente las hojas- ha sido sujeto de diversas investigaciones en cuanto a su identidad química o de sus constituyentes,

de sus propiedades farmacológicas y su historia en la medicina tradicional (Kaljee et al. 2004). De investigaciones medicas preliminares en modelos de laboratorio, los extractos de las hojas de guayaba o de la corteza están implicadas en mecanismos terapéuticos contra cáncer, infecciones bacterianas, inflamación y dolor (Mahattanatawee et al. 2006). La decocción de las hojas y tallo han sido usadas como remedios para enfermedades diarreicas (Tona et al. 1999), el alivio de la tos, el dolor de garganta y encías inflamadas (Nwinyi et al. 2008). Las hojas y/o tallos de guayaba son usadas también en tratamientos tradicionales contra la diabetes (Mukhtar et al. 2006).

De los compuestos hasta ahora identificados y que están estrechamente relacionados con sus propiedades y actividades medicinales se encuentra la guajaverina, quercetina, avicularina, morina-3-O- $\alpha$ -L-lixopiranosil y morina-3-O- $\alpha$ -L-arabopiranosil (Figura 4).

Es sorprendente la cantidad de estudios científicos que se han realizado sobre las propiedades de la hoja del guayabo. Una planta originaria de América cuya utilidad curativa ha sido reconocida durante distintas épocas en diversos países y que, formando parte de los recursos herbolarios de las llamadas medicinas tradicionales, emerge como un candidato importante para el desarrollo de fitofármacos para el tratamiento de las disfunciones más comunes del aparato gastrointestinal.

La combinación de efectos que producen sus flavonoides empieza a ser entendida dentro de la nueva interpretación que el conocimiento científico va construyendo (Lozoya, 2003).



**Figura 4. Flavonoides de la hoja de guayabo.**

Así, en la actualidad, la necesidad de nuevos tratamientos o alternativas a las existentes va en aumento. La utilización de la naturaleza, de una manera racional, puede darnos dichos tratamientos, nuevos compuestos, que identificados y aislados puedan servir contra muchas enfermedades que aquejan al ser humano en la actualidad. Entre estas alternativas y con múltiples atribuciones medicinales

el aumento del interés de identificar los componentes presentes en *Byrsonima crassifolia* y *Psidium guajava*, además también de incluir una variedad como lo es *P. guajava* var. Regional blanca y comparar las concentraciones de compuestos de interés como lo son flavonoides, saponinas, cumarinas y la actividad antioxidante y antiradical entre cada extracto.

## 2. Justificación

La posibilidad de utilizar medios naturales como remedio a muchos casos de enfermedades, ha sido utilizada desde la antigüedad. Las plantas medicinales fueron durante mucho tiempo (y en muchas etnias, pueblos y regiones lejos de la urbanización lo sigue siendo) la fuente directa de cura para ciertos problemas de salud (dolores, amibiasis, gastritis; por mencionar algunas).

Los compuestos que poseen todas las plantas son muy variados. Entre ellos se encuentran compuestos polifenólicos que son excelentes antioxidantes e incluso inhibidores de crecimiento de algunos microorganismos patógenos para el humano (Asaolu, 2009; Figueirinha *et al.*, 2008; Kudi, 1999; Ojo, 2010).

La importancia en el uso de estas alternativas medicinales recae en la gran cantidad de problemas que conlleva la ingesta de químicos que son usados en la medicina occidental (medicina moderna), además, de que los agentes patógenos de diversas enfermedades se han vuelto cada vez más resistentes a los compuestos activos. Es por eso, que se empieza una búsqueda de “nuevos” compuestos, que a la vez siempre han estado ahí pero de los cuales se ha desconocido por mucho tiempo el por qué sus propiedades; y que pueden encontrarse precisamente en las plantas medicinales como ya se ha mencionado.

Los compuestos fenólicos son antioxidantes naturales y podrían jugar un rol preventivo en el desarrollo de cáncer y enfermedades cardíacas. Un número de actividades biológicas y farmacológicas han sido reportadas para estos compuestos que incluyen: captación de radicales libres (antiradical), la apoptosis de células cancerígenas, actividad antiherpética y actividad anti-VIH. (Onayade *et al.*, 1996).

Entre las plantas utilizadas desde tiempos antiguos hallamos al nache o nanchi (*Byrsonima crassifolia*) y a la guayaba (*Psidium guajava*).

En el caso del nanche se ha reportado hasta el momento actividades como antidiarréico (se toma como agua de tiempo; también se utiliza para infecciones en la matriz e inflamación en los ovarios y otros tipos de desórdenes digestivos como disentería y dolor de estómago. Son muy conocidas las propiedades del nanche para curar afecciones de la piel como sarna, salpullido y heridas, mediante el uso de la cocción hecha con éste y trozos de corteza de cedro; además ha resultado eficaz para afianzar las encías, aliviar el dolor de cintura, resfriado y para las mordeduras de víbora. Corteza, fruto (jugo): astringente. Toda la planta: antitusiva, asma, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, desinflamante, disentería, diarrea, antifebrifuga. Tallo, raíz (hervidos): tienen actividad sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *S. pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis* (Bejar, 1993; Cáceres 1993; Calzada, 2000; Cowan, 2003; Fausto, 2009)

Mientras tanto de la guayaba en la medicina tradicional, se usan los extractos de raíz, corteza y hojas para tratar la gastroenteritis, vómitos, diarrea, disentería, llagas, úlceras, tos, dolor de garganta, encías inflamadas, entre otros tantos padecimientos (Morton, 1987).

Por ello el interés en ellas, así como la identificación de los compuestos polifenólicos en los extractos metanólicos de estas, como posibles responsables de las características medicinales de la planta.

En sí, el reino vegetal podría proporcionar una fuente útil de nuevos medicamentos, productos farmacéuticos y compuestos bioactivos que pueden ser utilizados no sólo para el tratamiento de enfermedades humanas, sino también para la mejora en la salud y producción animal, con seguridad alimentaria y calidad, al mismo tiempo preservando el medio ambiente (Makkar *et al*, 2009).

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Evaluar los metabolitos secundarios de las hojas de nance (*Byrsonima crassifolia*) y de 2 variedades de guayaba (*Psidium guajava* y *Psidium guajava* var. Regional blanca).

### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar compuestos polifenólicos en los extractos metanólicos de *Byrsonima crassifolia*, *Psidium guajava* y *Psidium guajava* var. Regional blanca.
- Cuantificar los compuestos polifenólicos (Fenoles totales, flavonoides totales, flavonoles y flavanonas de los extractos de *Byrsonima crassifolia*, *Psidium guajava* y *Psidium guajava* var. Regional blanca.
- Analizar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Byrsonima crassifolia*, *Psidium guajava* y *Psidium guajava* var. Regional blanca.
- Analizar la actividad antiradical de los extractos metanólicos de *Byrsonima crassifolia*, *Psidium guajava* y *Psidium guajava* var. Regional blanca.

## **4. Caracterización del área**

Este proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, el cual se encuentra ubicado en la carretera Panamericana Km.1080.

### **4.1 Políticas y normas**

Ser una oferta educativa tecnológica suficiente a nivel superior y postgrado, en las modalidades escolarizadas y abiertas, con perfiles profesionales acorde a los retos de todas las regiones del país.

Compartir con la población en general los beneficios de conocimiento, la cultura científica y tecnológica; en particular, proporcionar al público, con la finalidad de coadyuvar al modelo de desarrollo que el país reclama, para alcanzar el bienestar social que demandamos los mexicanos.

### **4.2 Objetivos de la institución**

Promover el desarrollo integral y armónico del educando con los demás, consigo mismo y con su entorno, mediante una formación intelectual que lo capacite en el manejo de los métodos y los lenguajes sustentados, en los principios de identidad nacional, justicia, democracia, cultura, que le permiten una mente y cuerpo sanos.

### **4.3 Servicios que presta la institución**

- Atender la demanda de educación superior y postgrado con alta calidad nacional e internacional en las áreas industriales, agropecuarias y de servicios, en todas las regiones del país, como la forma de auspiciar el desarrollo regional. Se imparten 8 carreras a nivel Licenciatura, las cuales son: Ingeniería Bioquímica, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Industrial, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Química, Ingeniería en

Gestión Empresarial e Ingeniería en Sistemas Computacionales. Además se oferta el posgrado con la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Mecatrónica.

- Hacer de cada uno de los institutos Tecnológicos un instrumento de desarrollo mediante una estrecha y permanente retroalimentación con la comunidad, en especial entre los sectores productivos de bienes y servicios, sociales, públicos y privados.
- Promover y convocar a los sectores productivos y educativos de cada localidad para generar y otorgar apoyos materiales y financieros adicionales, requeridos en la operación de los planteles.
- Compartir con la comunidad la cultura científica tecnológica y humanista, así como la recreación y el deporte, mediante los diversos foros y medios con que se cuenta el sistema.
- Oferta de perfiles profesionales que integran las necesidades específicas regionales, para que el egresado contribuya de manera satisfactoria al desarrollo de cada comunidad, en especial a la planta educativa.
- Actualizar de manera permanente al personal docente y administrativo, para favorecer el desarrollo armónico entre toda la comunidad tecnológica.

#### **4.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica**

Este departamento se encarga de planear, coordinar, controlar y evaluar las actividades de docencia, investigación y vinculación en las áreas correspondientes a la Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico, de conformidad con las normas y lineamientos establecidos por la Secretaría de Educación Pública, además de elaborar el programa educativo anual y el anteproyecto de presupuesto del departamento y presentarlo a las Subdirección Académica para lo conducente.

También se encarga de aplicar la estructura orgánica autorizada para el departamento de procedimientos establecidos.

#### **4.5 Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica**

Las funciones del departamento son múltiples por lo que tiene que coordinarse con otros departamentos:

- ✓ Coordinar con las divisiones de estudios profesionales y postgrado e investigación, la aplicación de programas de estudios y con el departamento de desarrollo académico, los materiales y apoyos didácticos a las asignaturas de las correspondientes a las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparten en Instituto Tecnológico y controlar el desarrollo.
- ✓ Coordinar con la división de estudios profesionales y postgrado e investigación, con el departamento de desarrollo académico, la formulación y aplicación de técnicas e instrumento para la evaluación del aprendizaje de las asignaturas correspondientes en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Coordinar los proyectos de investigación educativa, científica y tecnológica en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se llevan a cabo en el Instituto Tecnológico con el sector productivo de bienes y servicios de la región, así como controlar su desarrollo.
- ✓ Proponer a la Subdirección Académica el desarrollo de recursos y eventos que propicie la superación y actualización profesional del personal docente de las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica, en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Apoyar a la División de Estudios Profesionales en el proceso de titulación de los alumnos del Instituto.
- ✓ Superar y evaluar el funcionamiento del departamento con las demás áreas y con base a los resultados, proponer las medidas que mejoren su operación.

- ✓ Coordinar las actividades del departamento con las demás áreas de la Subdirección Académica.
- ✓ Presentar reportes periódicos de las actividades desarrolladas a la Subdirección Académica.

En el área de Ingeniería Bioquímica se cuenta con laboratorios, los cuales son utilizados para realizar las actividades experimentales correspondientes a las distintas materias impartidas en la institución, así como para la realización de proyectos de investigación que se llevan a cabo dentro del área.

El presente proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Investigación ya que cuentan con los servicios y materiales necesarios para la realización de dicho trabajo.

## 5. Problemas a resolver

La identificación de compuestos fenólicos está sujeta a muchas variables que pueden llegar a afectar su correcta cuantificación e identificación. La metodología empleada para la identificación de dichos compuestos (cromatografía en capa fina) sólo nos da pauta, para que guiados por ciertas coloraciones características de algún compuesto fenólico, se sepa que pueda (con cierta certeza) estar en la muestra analizada.

Los problemas no sólo vienen a la hora de analizar la muestra a investigar, sino de la extracción misma. Autores como Martínez (2010) mencionan que la cantidad de compuestos fenólicos extraídos en las muestras, no sólo dependen de factores como la temperatura a la que la extracción se lleva a cabo, sino que el mismo tiempo que la muestra vegetal está en contacto con el solvente, puede inferir al final de la investigación. No se incluyen detalles, pero la autora cita que en anteriores investigaciones para optimizar la extracción de dichos compuestos, el tiempo de extracción debe estar entre los 50-60 minutos, tiempos mayores pueden provocar oxidaciones en los compuestos.

Por el ello, el tiempo que se decidió tomar para la obtención de los extractos no superará las 3 horas. Debido a que la luz puede afectar a los mismos compuestos, todo el procedimiento se llevará a cabo con protección para esta.

Posteriormente a la extracción, el problema a resolver será la identificación de compuestos fenólicos mediante CCF. Su posterior cuantificación mediante técnicas espectrofotométricas y el análisis de la actividad antioxidante y antiradical de cada una. Los problemas a resolver en orden son los que se mencionan a continuación

- Obtención de los extractos metanólicos de *Byrsonima crassifolia*, *Psidium guajava* y *Psidium guajava* var. *Regional blanca*.

- Identificar compuestos polifenólicos (flavonoides, saponinas y cumarinas) por CCF
- Cuantificar fenoles totales y flavonoides de cada muestra.
- Análisis de la actividad antioxidante y antiradical.

## 6. Alcances y Limitaciones

### 6.1 Alcances

Con el trabajo de laboratorio realizado se logró identificar la presencia de compuestos polifenólicos en los extractos metanólicos de hojas de *Byrsonima c.*, *Psidium g.* y *Psidium g. var. Regional blanca* a través de la técnica de cromatografía en capa fina.

Mediante los métodos de análisis espectrofotométricos se cuantificaron los fenoles totales y el porcentaje de estos que pertenecen flavonoides. Este análisis se hizo a los tres extractos.

Además se logró determinar la actividad antirradical de los extractos, los cuales se compararon con compuestos que son conocidos por presentar esta capacidad (estándares).

### 6.2 Limitaciones

Dentro de las limitaciones que se presentaron para desarrollar el proyecto se encuentran la disponibilidad de algunos instrumentos; ya que no sólo fue usado para realizar este trabajo, sino que es de uso común para todos los integrantes del laboratorio lo cual afectó para el tiempo de realización de este.

Otra limitante encontrada fue la falta de algunos reactivos como en el caso de las cromatografías en capa fina donde hicieron falta estándares con la cual comparar los resultados de nuestros extractos.

## 7. Fundamento Teórico

Los compuestos polifenólicos constituyen una clase de metabolitos secundarios biosintetizados por el reino vegetal y entonces encontrados en alimentos derivados de fuentes vegetales (Wood, 2001). Se trata de un amplio grupo de compuestos, producto del metabolismo secundario en la plantas (Figura 5), poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante.

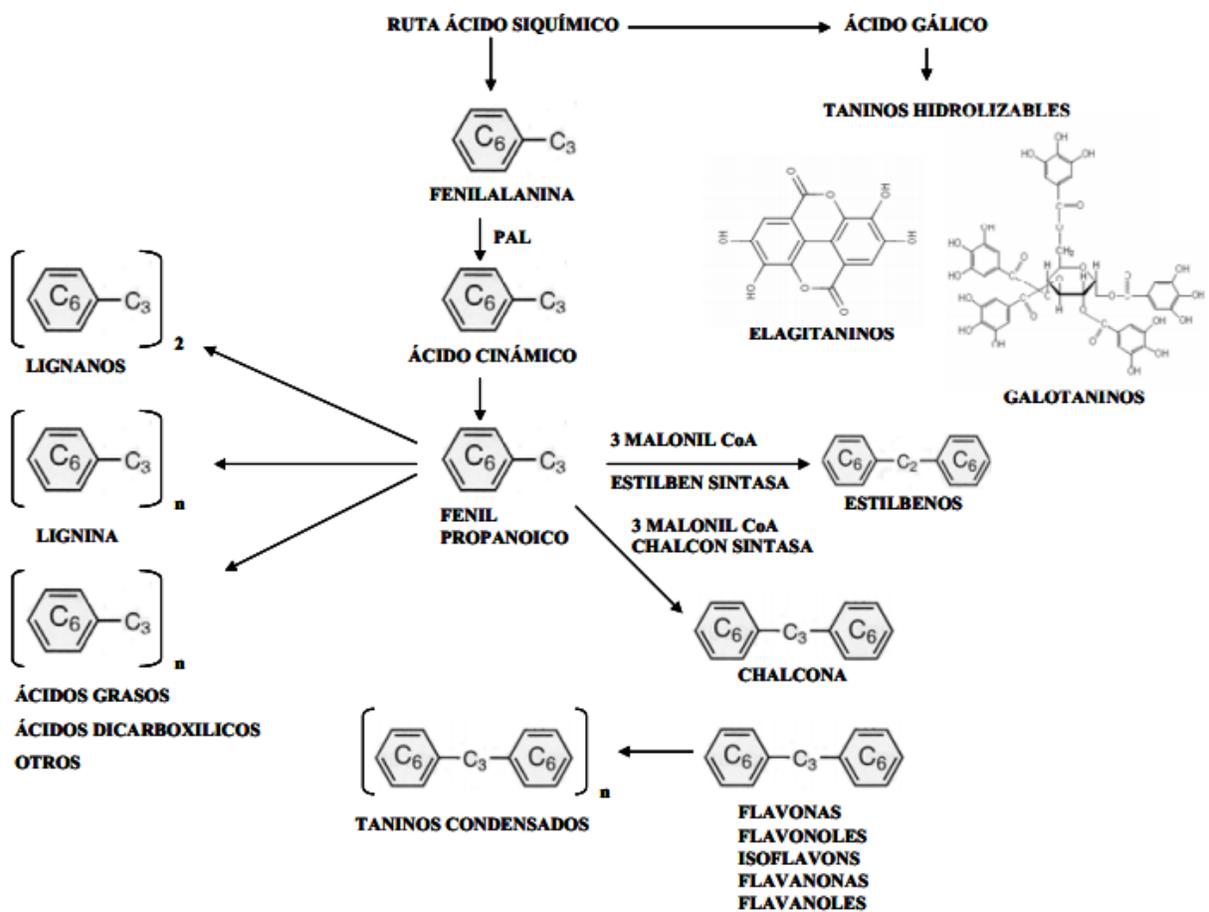


Figura 5. Producción de flavonoides a partir de cumaril CoA y malonil CoA (Shahidi, y Nacz, 2004).

Los polifenoles comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con por lo menos un grupo hidroxilo. Entre ellos podemos mencionar a los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y xantonas, a los ácidos fenólicos y a los fenoles simples, a los ácidos hidroxicinámicos, a los fenilpropenos, a las ligninas, etc. Los mismos actúan generalmente como capturadores y estabilizadores de radicales libres, pudiendo producir quelación de metales aquéllos que poseen en su estructura grupos carboxílicos (Decker, 1995).

También han sido reportados trabajos que atribuyen su acción antioxidante a la inhibición de enzimas prooxidantes como la lipoxigenasa (Decker, 1995).

Entre los compuestos polifenólicos extraíbles, podemos encontrar los flavonoides (principalmente flavanoles, flavonoles, flavanonas y antocianidinas), por ser el grupo de polifenoles presente de manera más extensa en los alimentos vegetales (Martínez 2010). Estos protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc., contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Muñoz y Gutiérrez (2008) señalan que los antioxidantes naturales, en especial los flavonoides han mostrado un amplio rango de efectos biológicos incluyendo algunas funciones como: antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria y antialérgica.

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya, consumidos en la dieta cotidiana, así también, en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

El mecanismo metabólico de los fitoquímicos está poco entendido, se ha propuesto que una ingesta adecuada de estos compuestos pueden prevenir estrés oxidativo y desórdenes metabólicos derivados (Beecher, 1999). Entre los compuestos bioactivos, los polifenoles han mostrado beneficios potenciales para la salud, principalmente relacionados a su capacidad antioxidante. Los polifenoles son los fitoquímicos más abundantes en nuestra dieta, y la frutas son los principales contribuyentes de estas (Hertog, 1996).

Diversas especies de *Byrsonima* son reportadas por ser ricas en ácidos galoilquínicos así como también en flavonoides, esteroides, sulfonoglicolípidos, ésteres aromáticos, proantocianinas y catequinas (Sannomiya, 2007).

La actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos de raíces y tallos de *Byrsonima crassifolia* ha sido descrita por Martinez-Vasquez et al. (1999) mientras Berger et al. (1998) reportaron la actividad tripanocida de esta especie.

Heinrich (2003) probó la actividad antiespasmódica de esta planta en una fracción rica en flavonoides. Otra especie, *Byrsonima verbascifolia*, demostró que posee actividad antiviral (López et al., 2001).

Por el lado de *Psidium guajava*, sus hoja son ricas en flavonoides, en particular, quercetina. Muchas de las acciones terapéuticas de ésta son atribuidas a estos flavonoides.

Los flavonoides, como se mencionó anteriormente, tienen diversos efectos biológicos. La quercetina contribuye en el efecto antidiarréico de la guayaba; esta es capaz de relajar el músculo liso intestinal e inhibir las contracciones intestinales. Además, otros flavonoides y triterpenos en hojas de guayaba muestran actividad antiespasmódica (Kritikar, 2000).

La cuantificación de fenoles totales en extractos vegetales se realiza principalmente empleando un método espectrofotométrico, basándose en un

reacción colorimétrica de oxido reducción. El método empleado es el de Folin-Ciocalteu, que se fundamenta en su carácter reductor, y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra seca (Singleton *et al.*, 1999 y Kuskoski *et al.*, 2005).

La cuantificación de flavonoles en los extractos, se lleva a cabo por espectrofotometría. El principio del método colorimétrico del cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) descrito por Chang *et al.* (2002), es la formación de complejos ácidos con los grupos “cetos” de C-4 y con los grupos hidroxilo de C-3 ó C-5 de las flavonas y flavonoles. Además, el  $\text{AlCl}_3$  forma complejos ácidos con los grupos orto-dihidroxil en los anillos A ó B de los flavonoides. Chang *et al.* (2002) menciona que los compuestos formados con los grupos orto-hidroxil (rutina, quercetina y mirceno) muestran una máxima absorción en la longitud de onda de 415-440 nm. Eligiendo la  $\lambda_{\text{max}}$  de 415 nm como la longitud de onda para la cuantificación.

La determinación de taninos se puede llevar a cabo con relación a un estándar como ácido tánico, ácido gálico, catequina, entre otros, utilizando método espectrofotométricos y gravimétricos. El método descrito por Makkar *et al.* (2009) relaciona ambos. El método gravimétrico se fundamenta en la formación de complejos entre los taninos y el reactivo PVPP (Polivinilpolipirrolidona) con el que es tratado la muestra a analizar; los taninos se unen al PVV (complejo) que se separan por centrifugación para luego ser analizadas espectrofotométricamente. La diferencia entre las lecturas de absorbancia antes y después de que se trata con PVPP da un valor muy próximo a los valores que han sido reportados en análisis de hojas de árboles y en investigaciones.

Por definición, un radical libre es una molécula con un electrón no apareado en su última órbita. El término radical libre se utiliza para describir una molécula radical

relativamente estable que puede existir independiente. La definición de radical no implica que la molécula dada sea altamente reactiva, se conocen radicales libres de varias reactividades.

Por ejemplo, cuando la reacción no es catalizada por enzimas, el radical superóxido ( $O_2^\bullet$ ) reacciona con un número limitado de biomoléculas. Sin embargo, la adición de electrones y un protón produce el radical hidroxilo (HO), que es una de las moléculas más reactivas conocidas en la biología, capaz de reaccionar con casi cualquier tipo de biomolécula; lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, fenoles y azúcares (Scandalios, 2005).

Los radicales libres se forman cuando una molécula con un par de electrones no apareados en la órbita externa recibe o pierde un electrón. El radical libre más común en la atmósfera es la molécula de oxígeno, la cual tiene dos electrones no apareados en la última órbita, por lo que forma una molécula birradical. La distribución particular de electrones hace del oxígeno un excelente aceptor de electrones. Cada molécula de oxígeno diatómico puede aceptar cuatro electrones y cuatro protones, produciendo dos moléculas de agua. En un sistema biológico ideal, la reducción de oxígeno a agua sucede secuencialmente. Si la molécula de oxígeno sólo recibe uno, dos o tres electrones, se forman las especies reactivas de oxígeno. El término especies reactivas de oxígeno se utiliza para incorporar a la molécula de peróxido de hidrógeno, la cual no es un radical libre, según la definición, pero sus propiedades químicas son similares a las del superóxido, y fácilmente puede formar los radicales hidroxilo que son muy reactivos (Lamb & Dixon, 1997).

Por otro lado, en los últimos veinte años se ha incrementado la evidencia que demuestra que las ROS pueden ser las causantes de distintos padecimientos incluyendo las enfermedades coronarias, el cáncer y el envejecimiento. La reacción del radical hidroxilo con lípidos insaturados es la cascada más familiar de daño inducido por radicales, aunque existen muchos ejemplos de daños a proteínas o al ADN. Por ejemplo, la reacción de radicales con proteínas puede

llevar a la oxidación de cadenas laterales reactivas de aminoácidos, al entrecruzamiento de proteínas, a la desnaturalización, e incluso dañar a las proteínas cercanas. La oxidación de ADN conlleva a la ruptura de cadenas y a la liberación de bases oxidadas.

Consecuentemente el papel de los antioxidantes, los cuales suprimen dicho daño oxidativo, ha recibido gran atención (Helaine & Hagerman, 2006) (Figura 6).

Los antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan *antioxidantes primarios* o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres (captación del oxígeno, unión a metales pesados, etc.), en cuyo caso se conocen como *antioxidantes secundarios*. Los antioxidantes primarios incluyen compuestos fenólicos tales como el  $\alpha$ -tocoferol; mientras que los antioxidantes secundarios, normalmente, solo poseen actividad antioxidante en presencia de un segundo componente minoritario como es el caso del ácido cítrico y el ácido ascórbico (Gordon, 2001).

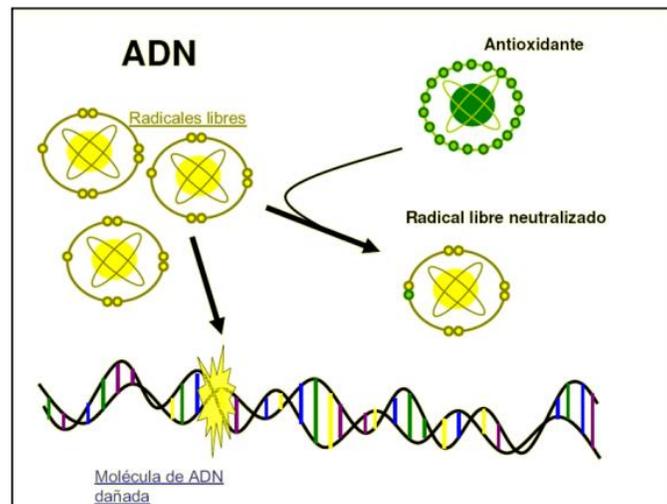
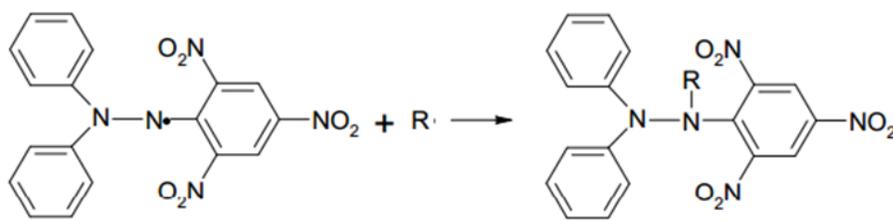
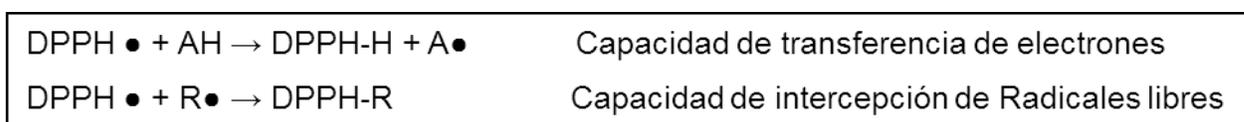


Figura 6. Quelación de radicales libres por la acción de antiradicales y antioxidantes.

Para la medición de la capacidad antirradical se utilizan, diferentes métodos entre los cuales el más empleado es el emplea el “nombre completo de compuesto” (DPPH). Este método permite medir la capacidad de transferencia de protones y electrones del compuesto polifenólico. El catión radical estable DPPH• es un cromóforo que absorbe a 515 nm, donde la decoloración del DPPH• es ocasionada por el proceso de reducción promovida por el compuesto antioxidante (Figura 6).

Aunque el mecanismo de transferencia de electrones del método DPPH es similar al método ABTS, el método DPPH es un método de muy baja sensibilidad debido a que el potencial de reducción del DPPH• es mucho mayor que el del ABTS (Brand et al.1995).



$\lambda = 515 \text{ nm}$

Violeta

Incoloro

**Figura 7. Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico (AH) sobre radical DPPH. Mecanismos de transferencia de electrones e intercepción de radicales libres (Brand et al.1995).**

## 8. Metodología

### 8.1 Obtención de los extractos de las hojas de las dos variedades de *Psidium guajava* y *Byrsonima crassifolia*

#### 8.1.1 Tratamiento de la muestra

Se trabajó con hojas en estado fresco de árboles situados en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (*Psidium guajava* y *Byrsonima crassifolia*) y de una plantación localizada en el fraccionamiento Atenas (*Psidium guajava* *Regional blanca*) en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Los lotes de hojas fueron cuidadosamente seleccionados, descartando partes maltratadas y secas.



Figura 8. Fotografía representativa de las hojas utilizadas como muestras, *Psidium guajava* (superior derecha), *Psidium guajava* var. *Regional blanca*(superior izquierda) y *ByrsonimaCrassifolia* (inferior central).

Las hojas seleccionadas fueron lavadas con jabón líquido bajo el chorro de agua y se eliminó el exceso de agua con papel absorbente. Las 3 diferentes muestras se liofilizaron por 24 horas a  $-44^{\circ}\text{C}$  y una presión de 0.1 mBar cubriendo los contenedores para evitar el contacto con la luz.

Las muestras liofilizadas fueron trituradas en una licuadora común para obtener un polvo fino de cada uno y luego se cubrieron de la luz.

### **8.1.2 Extracto metanólico**

Se pesaron 20 g de muestra liofilizada de cada tipo de hoja, *Byrsonima crassifolia*, *Psidium guajava L.* y *Psidium guajava L. var. Regional blanca* en una balanza analítica. En procesos separados, se colocó cada una en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se le adicionaron 200 mL de metanol absoluto (10 mL por 1 g de muestra vegetal). Se cubrieron cada una de las muestras para evitar el contacto con la luz. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a sonicación por 2 horas. Después del sonicado, se filtró utilizando vacío, por un papel filtro Whatman no. 5. La pasta recuperada del papel filtro de cada una de las muestras fue resuspendida con 200 mL de metanol absoluto y se sonicó por 20 min más. Se repitió el proceso de filtrado ahora solo recuperando el líquido y desechando la pasta que quedó en el papel. El filtrado se recuperó en tubos *Falcon* que fueron cubiertos con papel aluminio. Posteriormente, ambos filtrados fueron centrifugados a 1000 rpm durante 10 min, después de esto se decantaron los tubos obteniéndose el sobrenadante en recipientes para cada muestra. Con ayuda de matraz bola de 125 mL, previamente pesado ( $P_1$ ), cada una de las muestras fueron llevadas a sequedad con presión reducida usando un rotavapor a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ . Después de ser evaporado el solvente, se obtuvo el nuevo peso del matraz ( $P_2$ ). De manera correspondiente, posterior al pesado, se diluyó con metanol absoluto a un volumen de 10 mL. El producto obtenido se recuperó en frascos de 20 mL, almacenándose en refrigeración y cubiertos con aluminio para su posterior análisis.

## 8.2 Análisis de los extractos de *Byrsonima crassifolia*, *Psidium g.* y *Psidium g. Regional blanca* por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

### 8.2.1 Compuestos polifenólicos

#### 8.2.1.1. Flavonoides

La identificación de flavonoides se llevó a cabo utilizando placas de gel de sílice F<sub>254</sub> de 10 cm x 10 cm, marca Sigma-Aldrich. Se emplearon como estándares quercetina, rutina y naringenina grado analítico, marca Sigma-Aldrich, a una concentración de 0.1, 1 y 2 mg·mL<sup>-1</sup> respectivamente; se aplicaron 5 µL de cada estándar y 10 µL de los extractos.

Los extractos y los estándares se aplicaron en las placas de gel de sílice a 1 cm de la orilla en la parte inferior y a 1 cm entre ellas. Las placas ya cargadas se desarrollaron utilizando diferentes sistemas de solventes (Tabla 1) dejando llegar el frente de la elución hasta 1 cm antes del límite superior de la placa.

Tabla 1. Sistemas usados para la identificación de flavonoides en TLC

Sistema de solventes	Componentes	Relación vol. de solventes
S1	Hexano-ETOAc-HOAc	31:14:5
S2	ETOAc-HOAc- Ac. fórmico-H <sub>2</sub> O	100:10:11:26
S3	ETOAc-MeOH-H <sub>2</sub> O	40:10:50

ETOAc: Acetato de etilo; HOAc: Ácido acético; MeOH: Metanol.

Los cromatofolios fueron revelados utilizando una solución de 2-amino-etil-difenil-borinato al 1% p/v (1g del reactivo 2-aminoetildifenil-borinato en 100 mL de etanol). Después del asperjado y que las placas estuvieran secas se prosiguió con la visualización en luz UV (365nm).

### **8.2.2Cumarinas**

La identificación de cumarinas se llevó a cabo utilizando placas de gel de sílice F<sub>254</sub> de 10 cm x 10 cm, marca Sigma-Aldrich. Se aplicaron 10 µL de cada uno de los extractos metanólicos preparados en el punto 8.1.2.

Se desarrolló la placa con el sistema de solventes Cloroformo: MeOH (60:40) y se reveló con una solución metanólica de KOH al 10% y dejando secar por 5 min a una temperatura de ~100°C.

### **8.2.3Saponinas**

La identificación de saponinas se llevó a cabo utilizando placas de gel de sílice F<sub>254</sub> de 10 cm x 10 cm, marca Sigma-Aldrich. Se aplicaron 10 µL de cada uno de los extractos.

Se desarrolló la placa con el sistema de solventes Butanol: Ac. Acético: Agua (40:10:50) y como reactivos reveladores, una solución al 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en metanol y luego de secar, con una de vainillina al 1% en metanol.

Después de ser asperjada y secar, la placa se calentó en un horno a temperatura aproximada de 110°C, hasta observar el desarrollo de color. El desarrollo de color verde-azul, indica la presencia de saponinas.

## **8.3 Cuantificación de polifenoles de los extractos de *Byrsonima crassifolia*, *P. guajava*. y *P. guajava* var. *Regional blanca***

### **8.3.1 Fenoles totales**

A 0.05 mL de muestra se le adicionó 2.1 mL de agua destilada y 0.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, después de mezclar por un minuto, se añadió 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio al 20% y 2.1 mL de agua destilada. La

mezcla se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Después se midió la absorbancia a 765 nm. La concentración obtenida de fenoles totales se expresó en términos de equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Se comparó las muestras con una curva de calibración. Se utilizó como solución patrón ácido gálico a diferentes concentraciones: 0, 100, 300, 500, 700, 800 y 900 ppm (Singleton *et al.*, 1999).

### **8.3.2 Flavonoides totales**

A 0.5 mL de la muestra se le adicionó 1.5 mL de etanol al 95%, 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. Luego se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad, la absorbancia de la mezcla se midió a una longitud de onda de 415 nm.

La determinación de la concentración se realizó comparando con una solución patrón de quercetina. Se preparó disolviendo 10 mg de quercetina en metanol al 80% y se diluyó para obtener la curva patrón a 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se sustituyó la cantidad de cloruro de aluminio al 10% por la misma cantidad de agua destilada para el blanco (Chang *et al.*, 2002).

### **8.4. Medición de la actividad antiradical de los extractos de *Byrsonima crassifolia*, *P. guajava*. y *P. guajava* var. *Regional blanca*.**

La actividad antiradical de los extractos se determinó en términos de la habilidad de donar hidrógeno o de atrapar radicales utilizando el radical estable DPPH $\cdot$  (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) de acuerdo a la metodología empleada por Castañeda *et al.* (2008) y consideraciones de Sharma & Bhat (2009). A 0.3 mL de muestra se agregó 2.7 mL de una solución metanólica de DPPH (60.4  $\mu\text{M}$ ) y luego de 5 minutos de reacción se leyó su absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro HACH DR 5000 que se calibró con metanol. El blanco de muestra se preparó con 0.3 mL del extracto y 2.7 mL del solvente correspondiente. El experimento se llevó

a cabo en una habitación con poca iluminación y a temperatura ambiente (~25 °C). El porcentaje de inhibición del radical DPPH<sup>\*</sup> se determinó con la fórmula de Castañeda *et al.* (2008):

$$AAr(\%) = \left[ 1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_c} \right] \times 100$$

Donde:

*AAr*: actividad antirradical

*A<sub>m</sub>*: Absorbencia de la muestra

*A<sub>bm</sub>*: Absorbencia del blanco de muestra

*A<sub>c</sub>*: Absorbencia del control

La actividad antirradical se determinó en términos del valor IC<sub>50</sub> (concentración de muestra para inhibir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH<sup>\*</sup>) que presentaron los extractos y estándares. El resultado se expresó como media de tres determinaciones. Quercetina, rutina y Butilhidroxitolueno (BHT) se usaron como referencias positivas (estándares).

## 9. Resultados y discusión

Se obtuvieron en total tres extractos metanólicos de hojas; extracto metanólico de *Byrsonima crassifolia* (EMB), extracto metanólico de *Psidium guajava* (EMP1) y extracto metanólico de *Psidium guajava* var. *Regional blanca* (EMP2), los cuales fueron sometidos a diferentes análisis.

### 9.1 Identificación de flavonoides por CCF

A los tres extractos previamente obtenidos, se llevó a cabo su análisis cualitativo por medio de cromatografía en capa fina (CCF) utilizando tres diferentes sistemas de solventes (ver Tabla 1 en Materiales y Métodos) además de tres estándares (naringenina, quercetina y rutina) a las concentraciones y volúmenes previamente descritos.

Para el sistema S1 (Hexano: ETOAc: HOAc (31:14:5)) (Figura 8) se observó que hubo una separación de compuestos de interés aunque por el color en el punto de aplicación de la muestra se observa que el sistema no fue capaz de separar todos los flavonoides, ya que se observaron pocos con el color característicos de este tipo de compuestos. En la Figura 8 se marca alguno de ellos y se observa que para EMB hay dos manchas en el recorrido de la muestra y los dos están muy cercanos (Rf: 0.7 y 0.737) mostrando colores rojizos, uno más oscuro (Rf 0.737) que el otro. Cabe destacar que este mismo compuesto se encontró para los otros dos extractos (EMP1 y EMP2) obteniéndose Rf muy similares (1A).

Entre los extractos EMP1 y EMP2 se observan además compuestos con fluorescencia verdosa (1B), los cuales no pudieron ser identificados por la falta de compuestos estándar.

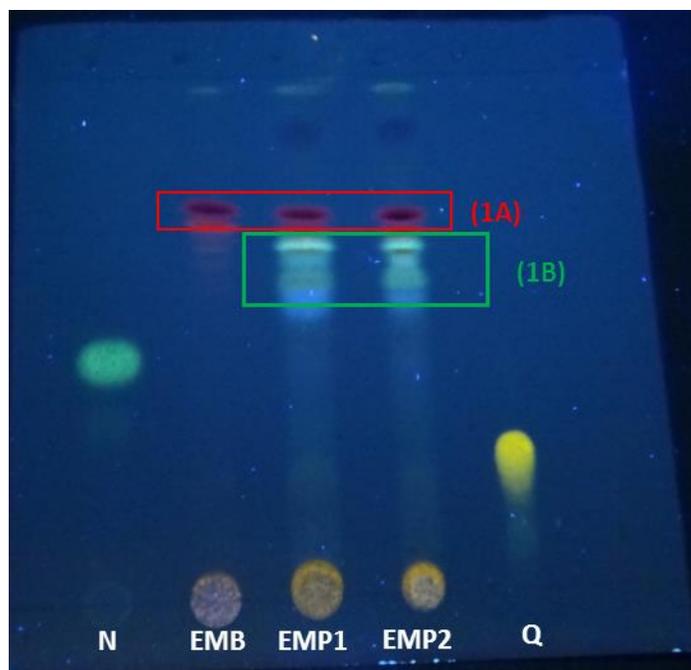
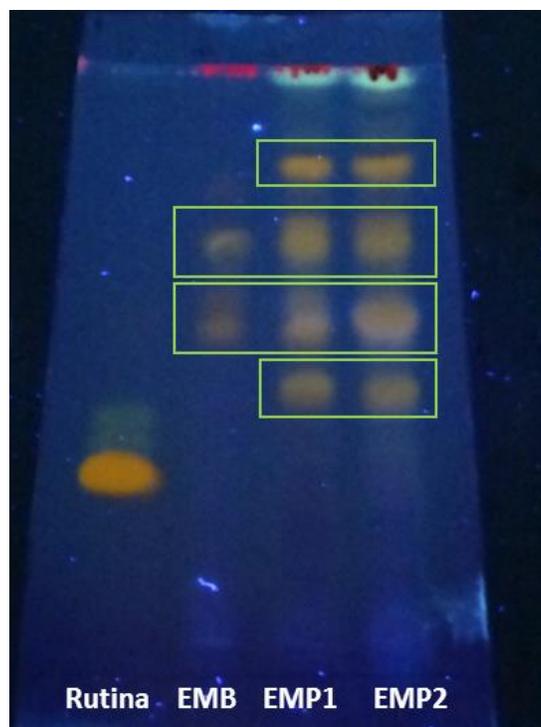


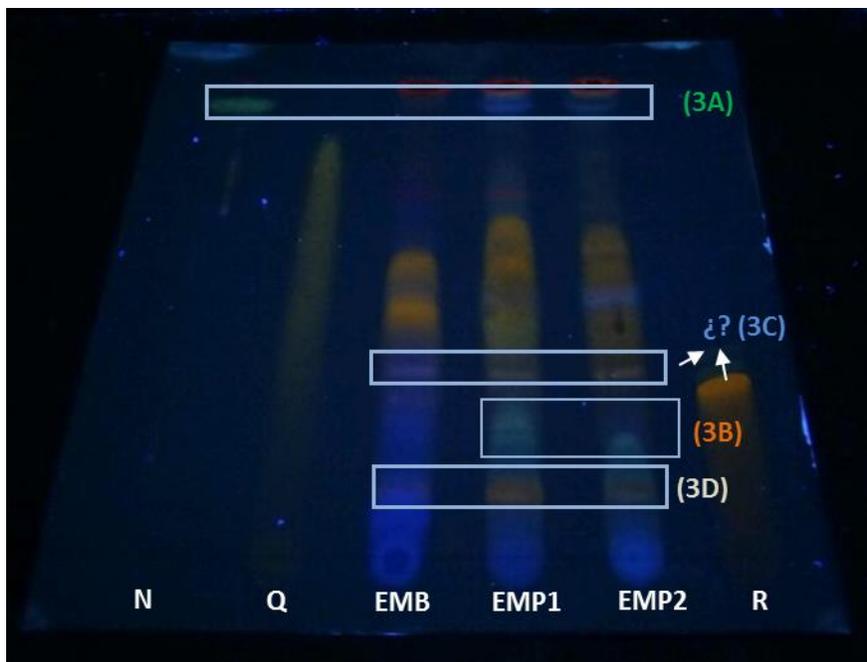
Figura 9. Análisis por CCF de los extractos metanólicos de hoja de *Byrsonima crassifolia* (EMB), *Psidium guajava* (EMP1) y *Psidium guajava* var. Regional blanca (EMP2). N: Naringenina, Q: quercetina. Sistema S1.

En el sistema S2 (ETOAc: HOAc: Ac. fórmico: H<sub>2</sub>O (100:10:11:26)) se observa una mejor separación de los compuestos flavonoides los cuales no pudieron ser identificados con el estándar aplicado para este sistema, rutina (Figura 9). Con la separación de estos compuestos se muestra que los extractos EMP1 y EMP2 contienen una gama de flavonoides mayor que el extracto EMB el cuál además de mostrar menos flavonoides también presenta menos intensidad lo cual podemos correlacionar con los resultados de la cuantificación de flavonoides totales donde el extracto EMB obtuvo una cantidad menor de este tipo de compuestos. También se observa que tanto EMP1 y EMP2 obtuvieron R<sub>f</sub>s muy similares lo cual podría estar indicando que contienen los mismos metabolitos.



**Figura 10. Sistema S2 para flavonoides. Análisis de los extractos metanólicos de hoja de *Byrsonima crassifolia* (EMB), *Psidium guajava* (EMP1) y *Psidium guajava* var. Regional blanca (EMP2).**

El sistema S3 (ETOAc: MeOH: H<sub>2</sub>O (40:10:50)) separó de igual manera diversos compuestos, de los cuales, uno de ellos tuvo un R<sub>f</sub> semejante al estándar naringenina en los tres extractos (3A). La pigmentación amarilla se observó en los tres extractos pero además se observaron también franjas de color azul y para el caso de EMP1 y EMP2 se revelaron franjas de color verdoso (3B). Nuevamente se observaron más franjas con coloración amarillenta en los extractos de hojas de las dos variedades de *P. guajava*. (EMP1 y EMP2). El R<sub>f</sub> de las manchas señaladas como 3C, es similar al estándar quercetina, sin embargo, la diferencia de color sugiere que probablemente no se traten de los mismos compuestos. Y por último, hubo un compuesto no identificado que estuvo presente en los tres extractos, este presentó un color amarillo difuminado para los tres casos (3D).



**Figura 7. Sistema S3 para flavonoides. Análisis de los extractos metanólicos de hoja de *Byrsonima crassifolia* (EMB), *Psidium guajava* (EMP1) y *Psidium guajava* var. Regional blanca (EMP2). N: Naringenina, Q: quercetina y R: rutina.**

A continuación se muestra una tabla donde se detallan los Rf y el color obtenido para cada uno de los extractos dependiendo del sistema de solventes utilizado.

Tabla 2. R<sub>f</sub> de la cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos de hoja de *Byrsonima c.*, *Psidium g.* y *Psidium g. var. Regional blanca*.

Sistema de solventes	Estándares		Extractos			
	R <sub>f</sub>		R <sub>f</sub>		Color	
S <sub>1</sub>	Quercetina Naringenina	0.250 0.437	Amarillo canario Amarillo tenue	EMB	0.700	Verde opaco
					0.737	Rojo oscuro
				EMP1	0.250	Amarillo tenue
					0.587	Amarillo
					0.637	Celeste suave
					0.687	Verde- azul tenue
					0.700	Verde-azul
					0.714	Rojo oscuro
				EMP2	0.250	Amarillo tenue
					0.587	Amarillo
					0.637	Celeste suave
					0.687	Verde- azul tenue
					0.700	Verde-azul
					0.714	Rojo oscuro
S <sub>2</sub>	Rutina	0.287	Amarillo opaco	EMB	0.519	Amarillo Opaco
					0.562	Amarillo Opaco
					0.650	Amarillo Opaco
					0.750	Amarillo Opaco
				EMP1	0.425	Amarillo Opaco
					0.512	Amarillo Opaco
					0.562	Amarillo Opaco
					0.675	Amarillo Opaco
					0.800	Amarillo Opaco
					0.862	Amarillo Opaco
				EMP2	0.400	Amarillo Opaco
					0.537	Amarillo Opaco
					0.675	Amarillo Opaco
					0.800	Amarillo Opaco
0.862	Amarillo Opaco					
S <sub>3</sub>	Naringenina Rutina	0,937 0.294	Verdoso Amarillo opaco	EMB	0.112	Amarillo tenue
					0.325	Amarillo difuminado
					0.437	Amarillo opaco
					0.550	Amarillo opaco
				EMP1	0.112	Amarillo opaco
					0.212	Verde-azul
					0.325	Amarillo difuminado
					0.400	Amarillo verdoso
					0.544	Amarillo opaco
					0.625	Amarillo opaco
				0.725	Rojo Tenue	
				EMP2	0.112	Amarillo opaco
					0.175	Verde azul
					0.325	Amarillo difuminado
0.400	Amarillo opaco					
0.487	Celeste difuminado					
0.550	Amarillo opaco					
0.600	Amarillo opaco					

S1: (Hexano: ETOAc: HOAc (31:14:5)), S2: (ETOAc: HOAc: Ac. fórmico: H2O (100:10:11:26)), S3: (ETOAc: MeOH: H2O (40:10:50)). Extractos: *Byrsonima crassifolia* (EMB), *Psidium guajava* (EMP1) y *Psidium guajava* var. *Regional blanca* (EMP2).

## 9.2 Identificación de cumarinas por CCF

A continuación se muestra el resultado obtenido luego de la elución de los extractos en el sistema de solventes para cumarinas (Figura 11).

Se observan manchas azules lo cual podría sugerirnos la presencia de cumarinas en los extractos. En el caso de EMB se distingue una sola franja azul en toda la placa mientras que en EMP1 y EMP2 se observan diversas manchas durante el recorrido del eluyente.

No se pudieron identificar los compuestos debido a la falta de estándares de comparación.

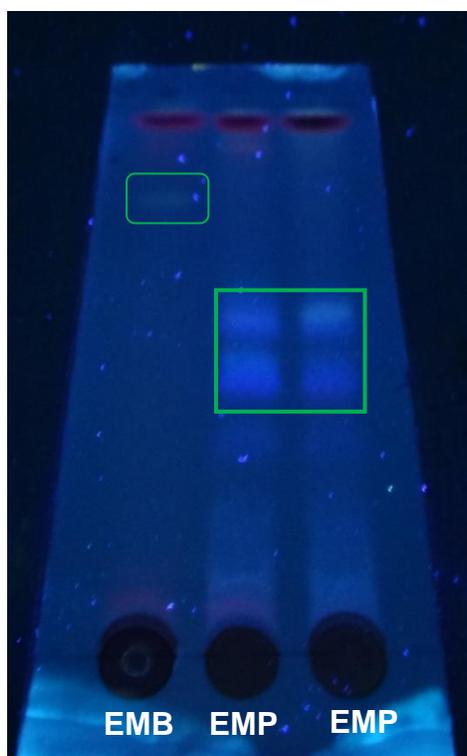


Figura 8. Análisis por CCF de cumarinas en extractos metanólicos de hojas de de *Byrsonima crassifolia* (EMB), *Psidium guajava* (EMP1) y *Psidium guajava* var. Regional blanca (EMP2).

### 9.3 Identificación de saponinas por CCF

Caso contrario a flavonoides y cumarinas, no se encontraron saponinas en los extractos pero eso no descarta la posibilidad que estos los contengan. Hay que adecuar el método de revelado y el estándar de muestra a utilizar para poder comparar los resultados. La placa se muestra a continuación (Figura 12).

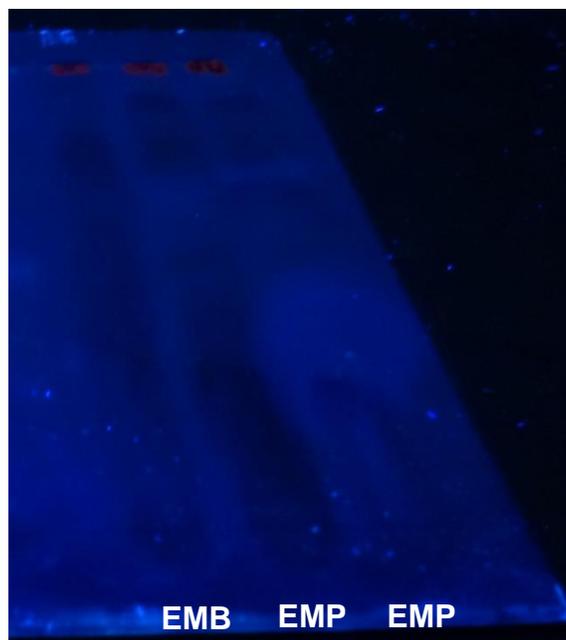


Figura 9. Análisis por CCF de saponinas en extractos metanólicos de hojas de *Byrsonima crassifolia* (EMB), *Psidium guajava* (EMP1) y *Psidium guajava* var. Regional blanca (EMP2).

### 9.4 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

De acuerdo a la cuantificación realizada de fenoles totales ( $R^2=0.995$ , Anexo A), se observa que el extracto de las hojas de *Psidium guajava* tiene una concentración mayor de fenoles totales seguido por el extracto de *Byrsonima crassifolia* (EMB) y por último el extracto de *Psidium guajava* var. Regional blanca

(EMP2) (Tabla 3); mientras que en la cuantificación de flavonoides totales las dos variedades de guayaba presentaron valores muy cercanos entre ellos.

Con estos resultados podemos observar que a pesar de que EMB tuvo una mayor concentración de fenoles totales, este extracto fue el que presentó una menor concentración de compuestos flavonoides. EMP1 fue quien mostró una concentración entre fenoles y flavonoides más relacionada entre sí; caso contrario con EMP2 quien tuvo una menor concentración de fenoles totales pero que sin embargo demostró tener una mayor concentración de flavonoides respecto a las demás muestras (alrededor del 20% de sus fenoles totales).

**Tabla 3. Resultados de la cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales de los tres extractos.**

Tipo de Extracto	Fenoles totales (mg <sub>AG</sub> /g <sub>ps</sub> )	Flavonoides totales (mg <sub>Q</sub> /g <sub>ps</sub> )
<b>EMB</b>	242.40± 7.12	18.77± 0.47
<b>EMP1</b>	273.54± 4.52	34.90± 1.04
<b>EMP2</b>	172.83± 1.86	36.26± 1.08

\*AG: Ácido gálico, Q: Quercetina, ps: Peso seco

## 9.5 Determinación de la actividad antiradical

Se realizaron cinéticas de inhibición del DPPH a diferentes concentraciones con los cuales se obtuvieron las siguientes gráficas que nos muestra el comportamiento para cada extracto (Figura 10).

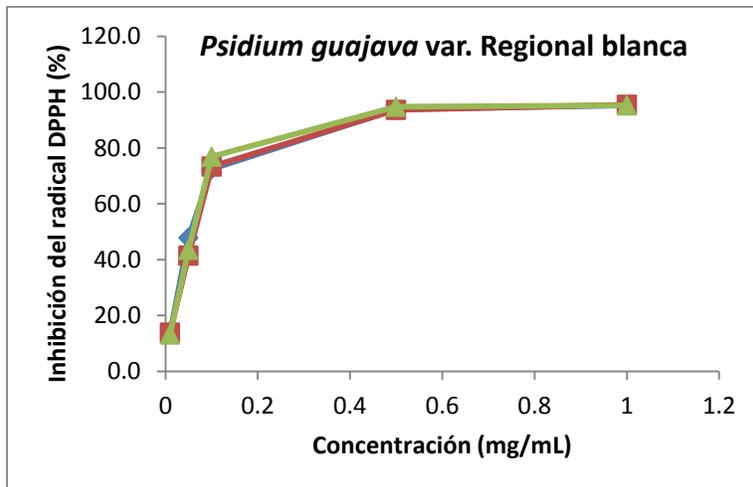
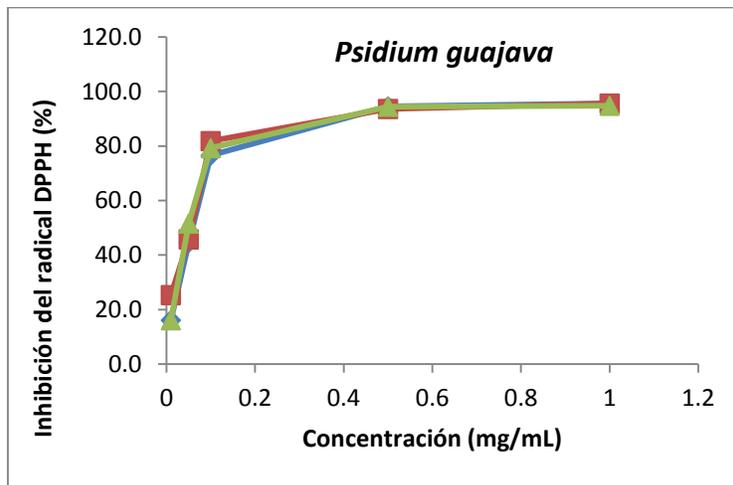
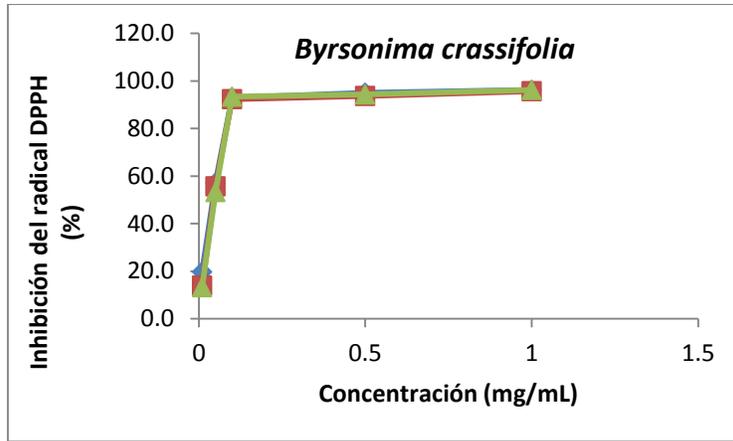


Figura 10. Gráficas de inhibición del DPPH (Actividad antiradical) a diferentes concentraciones.

Los valores arrojados por las pruebas del DPPH (Tabla 4) muestran el IC<sub>50</sub> obtenido para cada extracto y se aprecian también los valores de los tres estándares utilizados como controles positivos (Hernández, 2012).

**Tabla 4. Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en el análisis de la actividad antiradical de los extractos.**

<b>Muestra</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg·mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>Quercetina</b>	0.020 ± 0.002
<b>BHT</b>	0.511 ± 0.032
<b>Rutina</b>	0.025 ± 0.004
<b>B. crassifolia</b>	0.047 ± 0.009
<b>P. guajava</b>	0.050 ± 0.005
<b>P. guajava var. Regional blanca</b>	0.058 ± 0.005

Estándares: Quercetina, BHT y Rutina.

Los valores de IC<sub>50</sub> de los extractos son muy cercanos entre sí, donde se observa que no hay diferencia significativa entre cada uno de ellos. Es de llamar la atención que tanto los extractos como los estándares de flavonoides tuvieron una mayor actividad antiradical demostrado por su valor bajo de IC<sub>50</sub> comparado con el BHT, lo cual significa que requieren una menor concentración para alcanzar el 50% de inhibición de la concentración inicial del radical DPPH•.

## 10. Conclusiones

Con el análisis realizado se puede concluir que los extractos metanólicos de hojas de *Byrsonima crassifolia*, *Psidium guajava* y *Psidium guajava* Var. Regional Blanca tienen una alta cantidad de compuestos fenólicos y que entre estos tres las dos variedades de *P. guajava* presentaron una cantidad superior de flavonoides.

Mediante las cromatografías se intentaron identificar estos compuestos pero la falta de estándares no permitió dilucidarlos, sin embargo, se pudo estimar la cantidad de diferentes compuestos flavonoides mediante la coloración obtenida de los cromatogramas (mediante Luz UV y un revelado con compuestos específicos para estos casos) que son propios de este tipo de compuestos. El mismo caso se suscitó para la identificación de cumarinas y saponinas. Para el caso de cumarinas, la coloración nos permite concluir la posibilidad de estos compuestos en los extractos, sin embargo, no se presentó coloración en el cromatograma para saponinas donde el sistema de solventes propuesto pudo haber sido un factor de este resultado además del método de revelado del cromatograma.

El análisis de la actividad antiradical se llevó de manera exitosa mostrándose resultados que pueden ser altamente considerados por su cercanía en actividad frente a compuestos puros (estándares) y que además los tres extractos tuvieron una mejor actividad comparada con BHT, el cual es un compuesto sintético utilizado como antioxidante en alimentos.

## 11. Bibliografía

- Beecher GR (1999) Phytonutrients' role in metabolism: Effects on resistance to degenerative processes. *Nutr. Rev.* 57, S3:S6.
- Bejar E & Malone MH (1993) Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, A medicinal tree from Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 39, 141-58.
- Cáceres A, Cano O, Samayoa B & Aguilar L (1990) Plants Used in Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. Screening of 84 Plants against Enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 30, 55-73.
- Cáceres A, López B, Giron M & Logemann H (1991) Plants used in Guatemala for the treatment of Dermatophytic infeccions. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal of Ethnopharmacology* 40, 207-213.
- Cáceres A, López B, Juarez X, Del Águila J & García S (1993) Plants used in Guatemala for the treatment of Dermatophytic infeccions. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 31, 263-276.
- Calzada F (2000) Proantocianidinas del tipo A y flavonoles con actividad antiprotozoaria de *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Coniza filaginoides* (DC) Hieron (Asteraceae) (pp. 22-24). UNAM, Facultad de Química, México, D.F. Tesis de Doctorado.
- Cowan MM (2003). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology. Reviews* 12, 564–582.

- Decker EA (1995) The Role of Phenolics, Conjugated Linoleic Acid, Carnosine, and Pyrroloquinoline Quinone as Nonessential Dietary Antioxidants. *Nutrition Reviews*. 53, 49-58.
- Elekwa I, Okereke SC & Ekpo BO (2009) Preliminary phytochemical and antimicrobial investigations of the stem bark and leave of *Psidium guajava* L. *J Med Plants Res* 3, 45–48.
- Hertog MG (1996) Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 385-397.
- Kaljee LM, Thiem VD, Von Seidlein L, Genberg BL, Canh DG, Tho LH, Minh TT, Thoa LT, Clemens JD & Trach DD (2004) Healthcare use for diarrhea and dysentery in actual and hypothetical cases, Nha Trang, Viet Nam. *J Health Popul. Nutr.* 22,139–149.
- Kritikar KR & Basu BD (2000) *Indian Medicinal Plants*. Satguru pub. Delhi, 1046
- Mahattanatawee K, Manthey JA, Luzio G, Talcot ST, Goodner K & Baldwin EA (2006) Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 54, 7355–7363.
- Martínez M, González AR, Cazares L, Moreno MN & García AN (1999) Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 79-82.
- Mukhtar HM, Ansari SH, Bhat ZA, Naved T & Singh P (2006), Antidiabetic activity of an ethanol extract obtained from the stem bark of *Psidium guajava* (Myrtaceae). *Pharmazie* 61, 725–727.
- Nwinyi OC, Chinedu NS, Ajani OO (2008), Evaluation of antibacterial activity of *Psidium guajava* & *Gongronema Latifolium*. *J Med Plant Res* 2, 189–192.

Onayade OA. , Onayade AA., Sofowora A, Wound healing with plants: the African perspective, in: K. Hostettmann F. Chinyanganya & M. Maillard JL. Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of African Medicinal Plants 1, 77:120.

Rivero F (2009) Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. Rev. Latinoamer. Quím. 37, 155-156.

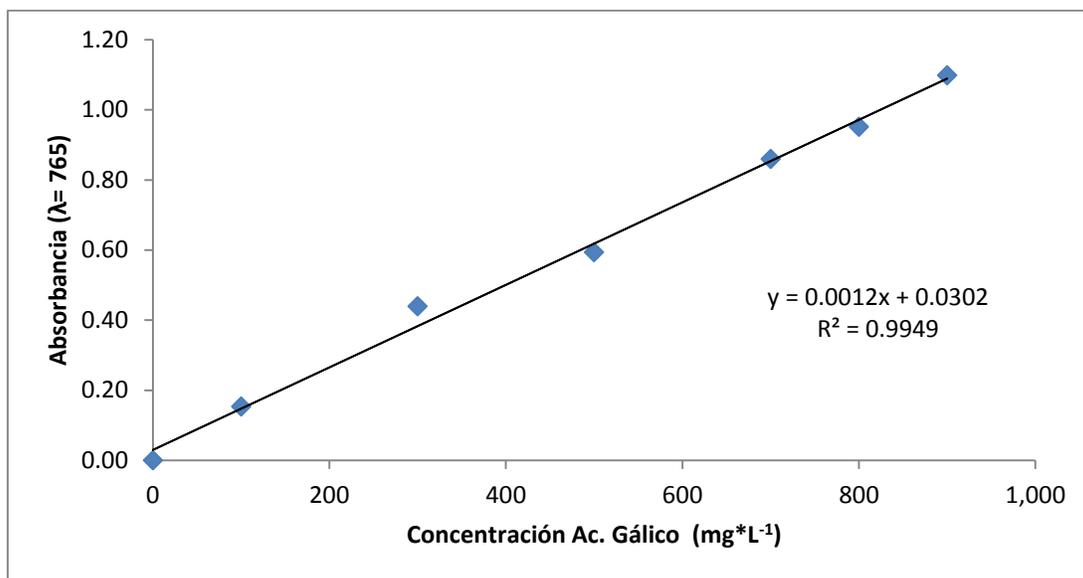
Sannomiyaa M & Cardoso RP (2007) Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Leaf extracts. Journal of Ethnopharmacology 112, 319–326.

Tona L, Kambu K, Mesia K, Cimanga K, Apers S, De Bruyne T, Pieters L, Totte J & Vlietinck AJ (1999) Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as anti-diarrheal in Kinshasa, Congo. Phytomedicine 6, 59–66.

Wood J, Senthilmohan S & Peskin A (2001) Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. Food Chemistry 77, 155-161.

## 12. Anexos

### Anexo A: Curva patrón de Fenoles totales (Folin-Ciocalteu).



### Anexo B: Curva patrón de Flavonoides totales (Método de $\text{AlCl}_3$ )

