



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LOS FRUTOS
DE GUAYABA UTILIZANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
(SPME) Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Alfonso Espinosa Rosas



MÉXICO, D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE **Dra. MARIA ISABEL AGULIAR LAURENTS**

VOCAL **M. en C. LUCIA CORNEJO BARRERA**

SECRETARIO **Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**

1er. SUPLENTE **M. en C. GEORGINA ARTEMISA DURANTE LISCI**

2° SUPLENTE **Dr. ABRAHAM MADARIAGA MAZÓN**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 111 DEL CONJUNTO E FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

ASESOR DEL TEMA: Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

SUSTENTANTE: ALFONSO ESPINOSA ROSAS

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica y profesional que me proporcionó.

Al personal técnico de la USAI de la Facultad de Química; a la Q. Georgina A Durante Lisci, a la M. en C. Margarita Guzmán Villanueva por el registro y análisis de los espectros utilizados en este proyecto.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su apoyo y enseñanza brindados para la realización del presente trabajo.

A los miembros del jurado designado por la revisión de esta tesis.

Este trabajo se realizó mediante el financiamiento económico otorgado a través del programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) IN205709.

A mis padres; Eduardo Espinosa Sánchez y María Eugenia Rosas Torres por su enseñanza y apoyo incondicional.

Contenido	Página.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE DIAGRAMAS	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades y antecedentes de <i>Psidium guajava</i>.....	3
2.1.1 Usos tradicionales y medicinales de <i>Psidium guajava</i>.....	4
2.1.2 Estudios fitoquímicos previos.....	5
2.1.2.1 Estudios fitoquímicos en hojas.....	5
2.1.2.2. Estudios fitoquímicos en frutos.....	5
2.1.3 Metabolismo de la fruta durante la maduración.....	11
2.1.4 La respiración.....	12
2.1.5 Índices de cosecha de <i>Psidium guajava</i>.....	12
2.1.6 Índices de calidad de <i>Psidium guajava</i>.....	13
2.1.7 Condiciones optimas de crecimiento de <i>Psidium guajava</i>.....	13
2.1.8 Fisiopatías de <i>Psidium guajava</i>	14
2.2 Microextracción en fase sólida (SPME).....	14
2.2.1 Variables que influyen en el sistema de extracción.....	16
2.2.2 Aplicaciones de SPME.....	16
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	18

IV. PARTE EXPERIMENTAL	19
4.1 Procedimientos generales	19
4.1.1 Material vegetal	19
4.1.2 Análisis cromatográficos	19
4.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	19
4.2 Estudio fitoquímico de <i>Psidium guajava</i>	20
4.2.1 Microextracción en Fase sólida	20
4.2.2. Obtención del aceite esencial	23
4.2.3. Preparación del extracto de la piel de <i>Psidium guajava</i>	24
4.2.3.1. Fraccionamiento primario del extracto	25
4.3. Ensayo biológico	26
4.3.1. Microorganismo de Prueba	26
4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI):	26
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	28
5.1 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de los frutos de guayaba <i>S. mutans</i>	28
5.1.1 Evaluación del potencial antibacteriano del aceite esencial preparado a partir de los frutos de guayabo	30
5.2 Identificación de los componentes del aceite esencial de los frutos de guayaba	31
5.2.1 Evaluación del potencial antibacteriano de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de los frutos del guayabo	34
5.3 Resultados obtenidos de la microextracción en fase sólida (SPME) realizada en los frutos de guayaba	36
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES	42
VII. PERSPECTIVAS.....	44
VIII. BIBLIOGRAFÍA	45

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de Etilo
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía de capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
G	Gramo
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamiento
Kg	Kilogramo
L	Litro
µg	Microgramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
Nm	Nanómetro
Ppm	Partes por millón
%	Por ciento
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
Rpm	Revoluciones por minuto
SPME	Microextracción en fase sólida
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
1	Actividades biológicas encontradas para hojas y frutos de <i>Psidium guajava</i> .	5
2	Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo.	7
3	Tasa de respiración de <i>psidium guajava</i> .	13
4	Características del cromatógrafo de gases utilizado.	20
5	Características del espectrómetro de masas utilizado.	21
6	Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución del blanco.	22
7	Condiciones utilizadas para realizar la microextracción en fase sólida.	22
8	Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución las muestras.	23
9	Cantidad obtenidas del extracto.	24
10	Cantidad obtenida de la partición del extracto.	25
11	Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de las fracciones sobre la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> .	28
12	Actividad antimicrobiana (CMI) de la avicularina (1), y del gluconato clorhexidina (CHX) sobre la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> .	30
13	Compuestos encontrados en el aceite esencial de los frutos de la guayaba.	32
14	CMI de los compuestos probados en el ensayo biológico.	35
15	Compuestos volátiles determinados en los frutos de la guayaba mediante la técnica de SPME.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	Árbol y frutos de <i>Psidium guajava</i> .	3
2	Distribución geográfica de <i>Psidium guajava</i> .	3
3	Microextracción en fase sólida por el método de espacio de cabeza (headspace).	15
4	Compuesto aislados de la infusión de la piel de <i>P. guajava</i> .	29
5	Cromatograma de gases obtenido del aceite esencial de los frutos de la guayaba.	31
6	Cromatograma de gases de los frutos de <i>Psidium guajava</i> obtenido utilizando la técnica de SPME.	37

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama	Contenido	Pág.
1	Obtención del aceite esencial de los frutos del guayabo.	23
2	Fraccionamiento primario del extracto con acetato de etilo-butanol.	24

I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional mexicana está basada en conocimientos y raíces indígenas y rurales de nuestro país, las cuales tienen su inicio en la época prehispánica y se han ido acumulando a través de su historia.

La herbolaria o uso de las plantas ha sido fundamental en la base de la medicina tradicional, aproximadamente existen 30 000 especies de plantas de las cuales 3 000 tienen usos medicinales según documentó el Instituto Nacional Indigenista en 1997.

Hoy en día el uso de la herbolaria como medicamento no ha disminuido, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender sus padecimientos y enfermedades. Datos de la OMS revelan que la principal causa de muerte a nivel mundial es provocada por enfermedades infecciosas. Uno de los problemas que nos afecta a nivel mundial son las enfermedades orales como la periodontitis y las caries, el cual es un problema que perjudica a países industrializados y con mayor frecuencia a países en vías de desarrollo, y a pesar de los avances en servicios de salud, el acceso a estos es en cierta forma desigual y restringido, lo que nos indica que este tipo de enfermedades orales afecta principalmente a los grupos de la población menos favorecidos.

Los problemas mencionados anteriormente hacen fundamental buscar nuevas alternativas para el tratamiento de estas enfermedades. La ciencia moderna ha permitido el estudio exhaustivo de algunas especies de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana, sin embargo aún hay mucho campo de estudio. En lo que respecta a las propiedades antimicrobianas ya se han descrito un gran número de especies con estas propiedades, principalmente contra bacterias. En este sentido las plantas medicinales son la mejor alternativa para el tratamiento de enfermedades orales.

Psidium guajava o guayaba es un fruto tropical originario de América con una gran aplicación en la medicina tradicional mexicana, ya que se usa desde la era prehispánica en nuestro país. El consumo y aprovechamiento de este fruto no se limita solo como alimento, a pesar de ser funcional para el organismo por su gran valor nutrimental y alto contenido de vitaminas y minerales, también se sabe que se usa al menos para el tratamiento de 40 enfermedades y padecimientos. Entre sus usos destacan: combatir las caries, diarrea, diabetes, hipertensión, dolor,

reducción de la fiebre. Todo esto gracias a sus propiedades anti microbianas (Pérez *et al.*, 2007). Por lo antes mencionado, *Psidium guajava* representa una buena alternativa para el control de infecciones ocasionadas por bacterias patógenas en la cavidad oral.

Para el estudio y análisis de la actividad y potencial antimicrobiano de la guayaba y sus compuestos es necesario realizar estudios fitoquímicos, estos generalmente son realizados con técnicas fotoquímicas convencionales de fraccionamiento con disolventes y en cromatografía en columna y capa fina. Por otra parte existen técnicas de análisis cromatográficos recientes, como es el caso, de la micro extracción en fase sólida (SPME). Esta técnica de análisis cromatográfico consiste en una extracción e identificación cualitativa y cuantitativa de compuestos químicos (Peñalver *et al.*, 2002), la SPME representa un avance y una gran alternativa para el estudio de la composición química de los volátiles presentes en los frutos de la guayaba con posible actividad antibacteriana. En este contexto se planteó el presente proyecto que plantea la investigación fitoquímica de los frutos de *Psidium guajava* como una posible fuente de antimicrobianos contra las bacterias patógenas responsables de las enfermedades de la cavidad oral.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades y antecedentes de *Psidium guajava*.

Psidium guajava es un género de unas cien especies de arbustos tropicales y árboles pequeños en la familia Myrtaceae, nativas del Caribe, América Central, América del Norte y el norte de Sudamérica. Las hojas son contrarias, simples, elípticas a ovaladas, de 5 a 15 centímetros de largo. Las flores son blancas, con cinco pétalos y numerosos estambres. La fruta es comestible, redonda o en forma de pera, entre 3 a 10 cm de diámetro (Pérez *et al.*, 2007).



Figura 1. Árbol y frutos de *Psidium guajava*.

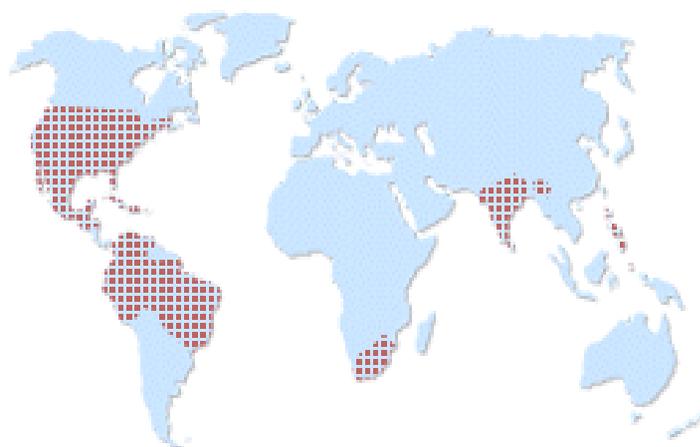


Figura 2. Distribución geográfica de *Psidium guajava*.

2.1.1 Usos tradicionales y medicinales de *Psidium guajava*.

Psidium guajava es considerada como una fruta nativa de México y ha sido utilizada desde la era prehispánica como alimento y remedio medicinal como anti-diarréico, anti inflamatorio, se utiliza tradicionalmente para combatir las caries y reducir fiebre. Diversos estudios farmacológicos han demostrado y descrito su actividad antioxidante, hepatoprotectoras, antialérgicas, antimicrobianas, antígeno tóxicas, antiplasmódicas, cardioactivas, antidiabéticas y antiinflamatorias. Lo cual nos deja con una amplia gama de aplicaciones clínicas para el control y tratamiento de: diarrea, diabetes, hipertensión, caries, dolor, reducción de la fiebre (Pérez *et al.*, 2007 y Nwinyi *et al.*, 2008).

En México la guayaba es utilizada en el tratamiento de 40 enfermedades o padecimientos. De esta planta se utiliza las cortezas del tallo, hojas y frutos, preparadas en infusiones o enjuagues bucales, su decocción también resulta útil en caso de estomatitis (inflamación de la mucosa bucal) y de faringitis (Pérez *et al.*, 2007).

Las hojas pueden ser utilizadas en heridas, para disminuir el dolor, o pueden ser masticadas para atenuar el dolor de muelas o dientes, esto por sus propiedades como sedante. Las infusiones también sirven para reducir niveles de glucosa en personas que padecen diabetes, la decocción de hojas y corteza es usada para tratar padecimientos en la piel como acné, pérdida de cabello, irritación, salpullido y sarna (Pérez *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Actividades biológicas encontradas para hojas y frutos de *Psidium guajava*.

Actividad biológica	Referencia.
---------------------	-------------

Acné	Qadan <i>et al.</i> , 2005
Antidiarréico	Heinrich <i>et al.</i> , 1998
Antimalárico	Ponce <i>et al.</i> , 1994
Antinociceptivos	Shaheen <i>et al.</i> , 2000
Antigenotóxicos y antimutagénicos	Bartolomé <i>et al.</i> , 2006
Antioxidante	Quian y Nihorimbere <i>et al.</i> , 2004
Antitusivo	Jaiarj <i>et al.</i> , 1999
Cardiovasculares	Ojewole <i>et al.</i> , 2005
Hepatoprotectivo	Roy <i>et al.</i> , 2006
Anti hiperglicémico	Hsieh <i>et al.</i> , 2007

2.1.2 Estudios fitoquímicos previos.

2.1.2.1 Estudios fitoquímicos en hojas

Las hojas de la guayaba están compuestas principalmente por compuestos volátiles, tales como el α -pineno, β -pineno, limoneno, mentol, alcohol isopropílico, β -cariofileno, β -bisaboleno, cineol, óxido de cariofileno, β -copaeno, cardineno, curcumeno, nerolidiol y aromandreno (Zakaria y Mohd, 1994; Li *et al.*, 1999). Así mismo de extractos obtenidos de las hojas de guayaba se han logrado aislar y caracterizar metabolitos de tipo flavonoide (avicularina, guaijaverina, quercetin-3-*O*- α -*L*-lixopiranosido y quercetin-3-*O*- α -*L*-arabinopiranosido, guaijaberina y quercetina), triterpenos (ácido asiático, ácido oleanólico, uvaol, ácido goreisico, guajavólido), triterpenos glicosilados y esteroides (β -sitosterol) (Arima y Danno *et al.*, 2002), también se han logrado obtener aceites fijos (6%), resinas (3.15%), taninos (8.5%), grasas, celulosa, taninos, clorofila y sales minerales (Nadkarni *et al.*, 1999).

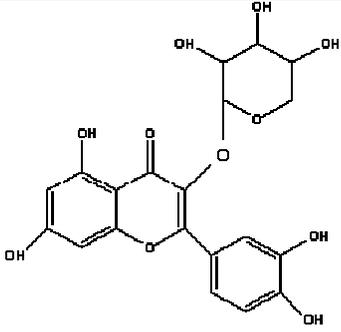
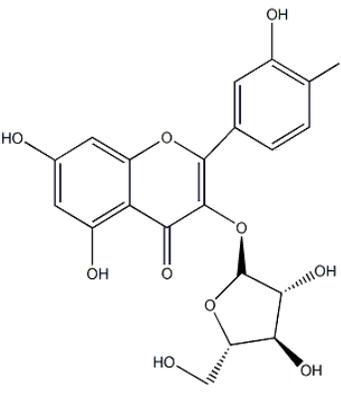
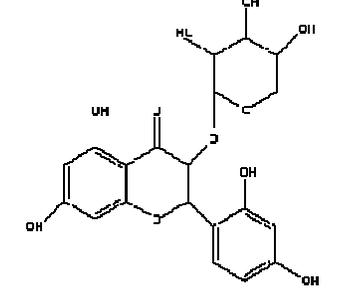
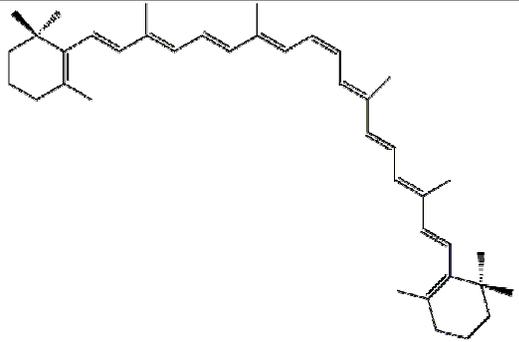
2.1.2.2. Estudios fitoquímicos en frutos

El fruto de la guayaba tiene un bajo contenido de lípidos (0.53%), carbohidratos (13.2%) y proteínas (0.88%), por el contrario tiene un alto contenido de agua (84.9%). Por cada 100 gramos de fruto se tienen: 36-50 Kcal, 77-86 g agua, 2.8-5.5 g fibra, 9.1-17 mg calcio, 17.83 mg fósforo, 0.30-0.70 mg hierro, 200-400 I.U. vitamina A, 0.046 mg tiamina, 0.03-0.04 mg riboflavina, 0.6-1.068 mg niacina, 100 mg ácido ascórbico, 40 I.U. vitamina B3, el contenido de magnesio se encuentra en el fruto en los ácidos fosfórico, oxálico y málico (Pérez *et al.*, 2007).

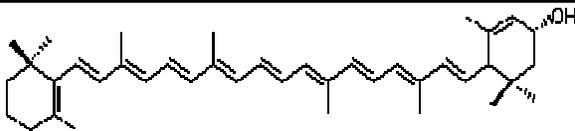
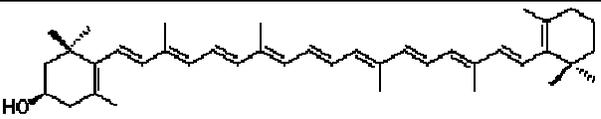
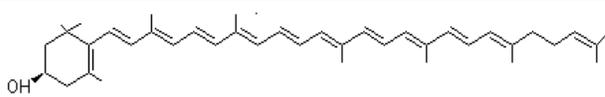
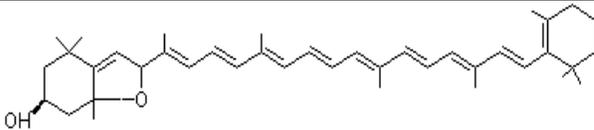
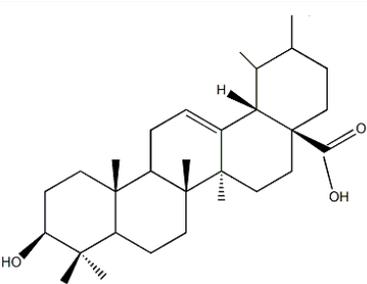
Otros compuestos presentes en la fruta son: hexanal (65.9%), γ -butirolactona (7.6%), (2*E*)-hexenal (7.4%), (2*E*)-2,4-hexadienal (2.2%), (3*Z*)-hexenal (2%), (2*Z*)-hexenal (1%), (3*Z*)-hexenil acetato (1.3%), fenol (1.6%), 3-cariofileno (24.1%), nerolidol (17.3%), 3-fenilpropil acetato (5.3%) y óxido de cariofileno (5.1%)(Pérez *et al.*, 2007).

Los estudios químicos han demostrado que las hojas contienen un aceite esencial rico en cariofileno, nerolidol, 3-bisaboleno, aromandreno y para-selinona. También se han detectado el beta-sitosterol, los triterpenoides; ácidos oleanólico, ursólico, catagólico y guayavólico; 10% de taninos derivados del ácido elágico y los flavonoides quercetina y quercetín-3-arabinósido. En la raíz se han detectado leucocianidinas, esteroides y ácido gálico (Pérez *et al.*, 2007., Akinpelu *et al.*, 2006).

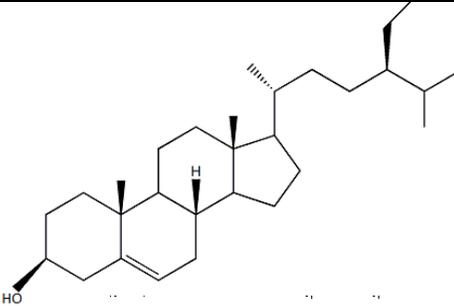
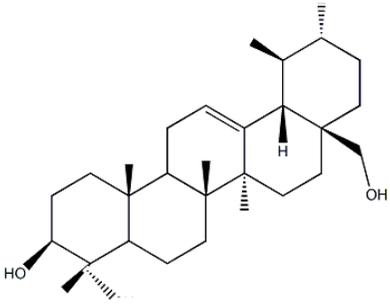
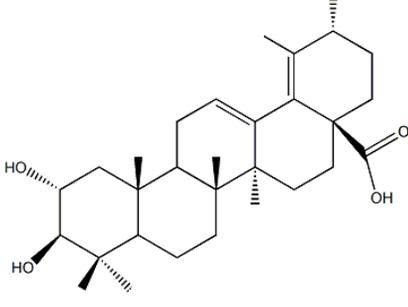
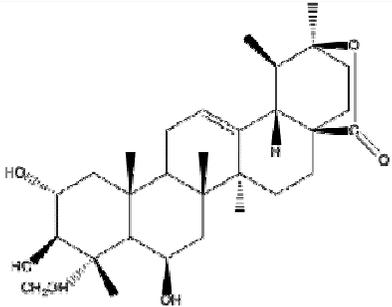
Cuadro 2. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo.

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Guaijaverina		Hojas y Fruto	Prabu <i>et al.</i> , 2006
Avicularina		Hojas	Dweck <i>et al.</i> , 2001
Morin – 3 – O L-arabinopiranosida		Hojas y Fruto	Arima & Danno <i>et al.</i> , 2002
β-caroteno		Hojas y fruto.	Merca-dante <i>et al.</i> , 1999

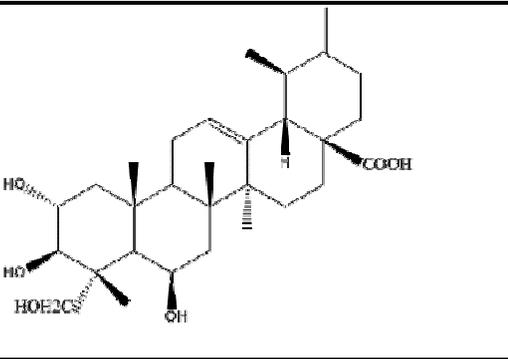
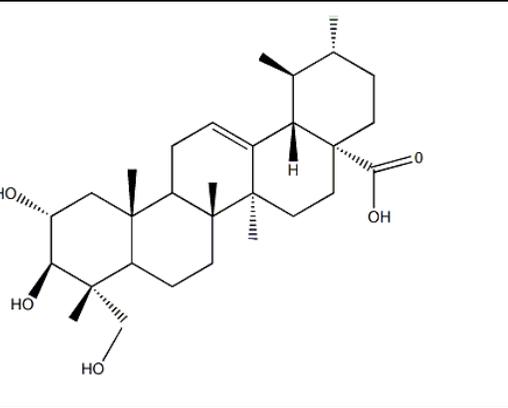
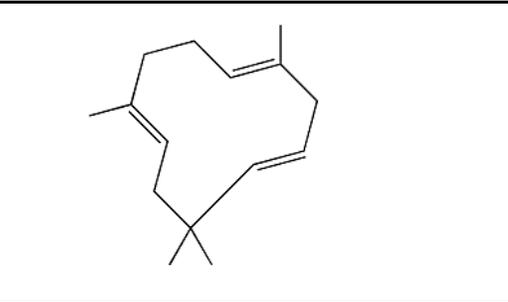
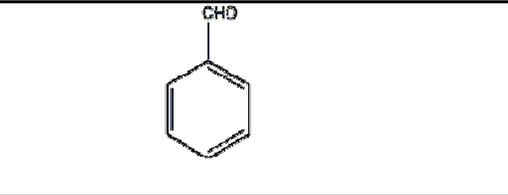
Cuadro 2. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo (continuación).

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Luteína		Hojas y fruto	Merca-dante <i>et al.</i> , 1999
Licopeno		Hojas y fruto.	Merca-dante <i>et al.</i> , 1999
β- Criptoxan-tina		Hojas y fruto.	Merca-dante <i>et al.</i> , 1999
Rubixantina		Hojas y fruto.	Merca-dante <i>et al.</i> , 1999
Criptoflavina		Hojas y fruto.	Merca-dante <i>et al.</i> , 1999
Ácido Ursólico		Hojas	Dweck <i>et al.</i> , 2001

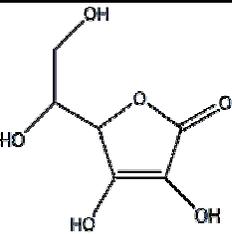
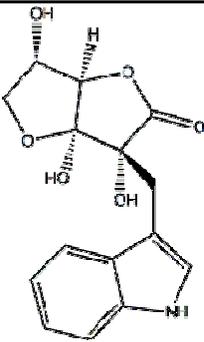
Cuadro 2. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo (continuación).

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
β-sitosterol		Hojas	Dweck <i>et al.</i> , 2001
Uvaol		Hojas y fruto	Pérez <i>et al.</i> , 2008
Ácido Goreisico		Hojas y fruto	Pérez <i>et al.</i> , 2008
Guajavólida		Hojas	Begum <i>et al.</i> , 2004

Cuadro 2. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo (continuación).

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Ácido guavenólico		Hojas	Begum <i>et al.</i> , 2004
Ácido asiático		Hojas y fruto	Begum <i>et al.</i> , 2004
Humuleno		Hojas	Dweck <i>et al.</i> , 2001
Benzaldehído		Fruto	Jordan <i>et al.</i> , 2003
1-Butanol		Fruto	Jordan <i>et al.</i> , 2003

Cuadro 2. Constituyentes identificados en hojas y fruto del guayabo (continuación).

Compuesto	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Ácido ascórbico		Fruto	Dweck <i>et al.</i> , 2001
Ascorbigeno		Fruto y hojas	Radha <i>et al.</i> , 1996

2.1.3 Metabolismo de la fruta durante la maduración.

La maduración en las frutas está ligada a cambios físicos y químicos, los cuales generan metabolitos, que dan como resultado el ablandamiento del fruto, sus aromas, colores, astringencia, etc. Al recolectar las frutas, estas quedan separadas de su fuente de nutrientes, pero a pesar de esto aun respiran y continúan su actividad metabólica, obteniendo energía de la oxidación de sustratos como azúcares, ácidos orgánicos entre otros.

Durante la maduración de la guayaba se hidrolizan diversos compuestos gracias a las enzimas hidrolíticas, tal es el caso de la clorofila, almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina, al mismo tiempo se sintetizan compuestos como carotenoides, flavonoides, antocianinas y se observa un aumento en azúcares solubles en alcohol.

Durante la maduración se sintetizan metabolitos secundarios que cumplen con funciones fisiológicas y de funcionalidad en las plantas y frutos. Por ejemplo, los flavonoides y antocianinas funcionan como agentes de protección contra el daño por luz UV, también son usados por las plantas como pigmentos. Los compuestos fenólicos actúan contra el estrés oxidativo de la planta y frutos (Simoes *et al.*, 2008).

2.1.4 La respiración.

La intensidad respiratoria de las frutas depende de su etapa de desarrollo y ésta se mide como los miligramos (mg) o mililitros (mL) de CO₂ que desprende un kilogramo (Kg) de fruta en una hora. A lo largo del crecimiento se produce un aumento de la respiración el cual disminuye hasta el estado de maduración, donde nuevamente aumenta la respiración hasta el máximo que se conoce como pico climatérico, después comienza a disminuir nuevamente la respiración.

El etileno tiene un papel crucial en la respiración de la fruta. Lo que provoca este compuesto es un aumento en la permeabilidad de las membranas y acelera el metabolismo activando las enzimas oxidativas e hidrolíticas e inactivando los inhibidores de estas enzimas. Es necesario evitar la acumulación de esta hormona vegetal para una mejor conservación de las frutas. La tasa de respiración de la guayaba a 20° C es de 10 a 70 mL CO₂ / kg·h (Adel *et al.*, 2002).

2.1.5 Índices de cosecha de *Psidium guajava*.

En México los principales estados que cosechan y producen la guayaba son Zacatecas, Aguascalientes, Michoacán y Morelos, en todo el país se producen 300 000 toneladas anualmente lo que representa una superficie de plantación de 24 000 hectáreas (Padilla *et al.*, 2007).

Las guayabas se cosechan en madurez fisiológica, en el estado verde-maduro. O bien en estado firme-maduro a madurez media (más blandas) para un transporte de larga distancia, o en plena madurez de consumo (amarilla y blanda) para mercados locales (Adel *et al.*, 2002).

2.1.6 Índices de calidad de *Psidium guajava*.

- El color: es un buen indicador de madurez, el color de la pulpa puede ser blanco, amarillo, rosa o rojo.
- tamaño y forma: pueden ser importantes en algunos mercados por la presentación del producto.
- ausencia de defectos: insectos y pudrición
- cantidad de semillas en la pulpa: entre más baja, mejor;

(Adel *et al.*, 2002).

2.1.7 Condiciones óptimas de crecimiento de *Psidium guajava*.

- Temperatura Óptima

8-10°C para guayabas verde-maduras y parcialmente maduras (vida potencial de almacenamiento de 2-3 semanas)

5-8°C para guayabas completamente maduras (vida potencial de almacenamiento de 1 semana)

(Adel *et al.*, 2002).

- Humedad Relativa Óptima

90-95% (Adel *et al.*, 2002).

- Tasa de Respiración

Cuadro 3. Tasa de respiración de *Psidium guajava* (modificado de Adel *et al.*, 2002).

Temperatura	mL CO ₂ / kg·h
10°C	4-30
20°C	10-70

- Tasa de Producción de Etileno

La guayaba es una fruta climatérica. Las tasas de respiración y producción de etileno dependen del cultivo y del estado de madurez fisiológica. La producción de etileno a 20°C varía de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$. (Kader *et al.*, 2002).

2.1.8 Fisiopatías de *Psidium guajava*

- Daño por frío

El frío provoca que la guayaba tenga una inhibición en su madurez, pardeamiento de la pulpa y en casos severos de la piel y una tendencia a la putrefacción cuando se somete a temperaturas más altas. Las guayabas en plena madurez de consumo son menos sensibles al daño por frío, por el contrario las que se encuentran en estado verde-maduro son sensibles al frío. Las guayabas en madurez de consumo se les pueden conservar hasta por una semana a 5°C (Adel *et al.*, 2002).

- Pardeamiento externo (piel) e interno (pulpa)

Las guayabas son sensibles al daño físico durante la cosecha y en todas las operaciones de manejo desde el campo hasta el consumidor. Los síntomas incluyen abrasiones y pardeamientos de las áreas magulladas (Adel *et al.*, 2002).

- Escaldado por el sol

Este tipo de escaldamiento ocurre cuando las guayabas son expuestas directamente al sol. En algunos países se les cubre con bolsas de papel para protegerlas de la radiación solar y del ataque de insectos mientras se desarrollan en el árbol (Adel *et al.*, 2002).

2.2 Microextracción en fase sólida (SPME)

SPME por sus siglas en inglés solid-phase microextraction o micro extracción en fase sólida es una técnica de análisis cromatográfico que permite la extracción y posterior identificación cualitativa y cuantitativa de compuestos químicos por medio de un cromatógrafo de gases (CG) acoplado a un espectrómetro de masas (EM) (Peñalver *et al.*, 2002).

En el proceso de SPME se pueden identificar dos etapas:

- 1) Etapa de extracción en la que la fibra recubierta del adsorbente se pone en contacto con la muestra por un tiempo y temperatura determinadas, produciendo una migración de los compuestos o analitos de la solución a la fibra, hasta que se tenga equilibrio (Peñalver *et al.*, 2002).
- 2) Etapa de desorción y transferencia de analitos a un sistema cromatográfico de líquidos o gases. En esta etapa los solutos adsorbidos son llevados a la fase móvil, líquida o gaseosa del sistema cromatográfico para ser analizados (Peñalver *et al.*, 2002).

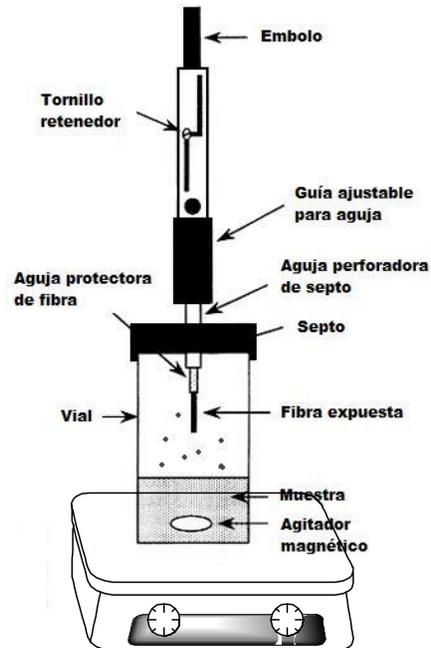


Figura 3. Microextracción en fase sólida por el método de espacio de cabeza (headspace) (modificado de Vas *et al.*, 2004).

2.2.1 Variables que influyen en el sistema de extracción

- Matriz: ésta puede ser sólida, gaseosa o líquida. Se pueden presentar dos tipos de matrices las complejas que tienen una gran cantidad de compuestos orgánicos como los fluidos biológicos. Por otra parte tenemos las matrices simples que tienen un contenido bajo de compuestos orgánicos (Vas *et al.*, 2004).
- Método de extracción: dependiendo el estado de la muestra se debe elegir el método, por ejemplo para compuestos volátiles el método recomendado es por espacio de cabeza (headspace) donde el medio entre la fibra y la muestra es el aire, para su posterior análisis por CG-EM. Los compuestos polares no volátiles se analizan por inmersión directa, para un análisis posterior por CG (Vas *et al.*, 2004).
- Tiempo: al variar el tiempo durante la extracción la concentración de los analitos adsorbidos cambiará (Vas *et al.*, 2004).
- Temperatura: esta variable nos afectará el punto de equilibrio, por lo cual es importante ajustar este factor antes de exponer a la fibra (Vas *et al.*, 2004).
- Tipo de fibra: dependiendo del material y el grosor por el cual esté recubierta la fibra tendrá distintas propiedades polares, no polares o bipolares, los adsorbentes más utilizados para recubrir fibras son: PDMS (polidimetilsiloxano), carbowax, poliacrilato, entre otros (Vas *et al.*, 2004).
- Agitación: es un factor importante para lograr el equilibrio, ésta se realiza por sonicación o con agitador magnético (Vas *et al.*, 2004).

2.2.2 Aplicaciones de SPME

- La microextracción en fase sólida por espacio de cabeza-cromatografía gaseosa es usada para el análisis del aroma de leche entera en polvo:
La SPME se usó para aislar los compuestos volátiles sulfuro de dimetilo, pentanal, hexanal y ácido butírico, los cuales contribuyen al aroma y el sabor de la leche en polvo. Estos compuestos se caracterizaron y cuantificaron por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (Irurueta *et al.*, 2005).
- Aplicaciones al análisis cromatográfico de aceites y grasas vegetales:

Se analizan las aplicaciones de la SPME en el aislamiento de ciertos lípidos, la mayor parte de esteroides, fenoles y contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. (Panagiotopoulou *et al.*, 2002).

- Estimación de la relación genética de cultivos de aguacate por los componentes volátiles de las hojas:

Los componentes volátiles de las muestras de hojas fueron analizados por un dispositivo de microextracción en fase sólida usando headspace. Estragol y cariofileno son los componentes más abundantes y pueden ser indicadores en la clasificación de raza. Los resultados cualitativos y cuantitativos del análisis de GC-MS fueron analizados para estimar la variación de las razas de cultivos individuales de aguacate (Wu *et al.*, 2007).

- SPME aplicado al análisis por cromatografía de gases (GC) de bebidas de malta con sabores de frutas:

El procedimiento representa una alternativa adicional a los métodos de extracción con solvente y de purga y trampa para el monitoreo de componentes volátiles. Más de 40 componentes fueron identificados por espectroscopía de masas (MS) y monitoreados por GC para evaluar 143 productos con sabores de frambuesa, cereza, manzana y albaricoque (Constant *et al.*, 2000).

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Es común que en poblaciones no privilegiadas de países desarrollados y en desarrollo se tengan problemas por una alimentación desordenada principalmente con una elevada ingesta en hidratos de carbono y una deficiencia en la higiene oral. Por estas razones las enfermedades de la cavidad oral como periodontitis y caries dentales representan un problema a nivel mundial, por esto resulta evidente la necesidad de estudiar de manera amplia nuevos remedios contra estos padecimientos, ya que el mal uso de antibióticos ya sea por interrupción del tratamiento o automedicación inapropiada ha provocado el incremento en la resistencia de las bacterias patógenas contra estos medicamentos. La flora de la cavidad oral está constituida por bacterias, hongos y levaduras, siendo las bacterias las que se encuentran en mayor proporción, de este grupo se han identificado 350 especies, éstas pueden pertenecer a la flora nativa de la boca o ser patógenas y ocasionar los padecimientos ya mencionados.

La búsqueda de nuevos productos contra estos padecimientos nos lleva a la medicina tradicional y a la amplia biodiversidad de productos naturales que existen en México.

El fruto de la Guayaba (*Psidium guajava*), es utilizado en la medicina tradicional mexicana como remedio anti-diarreico, anti inflamatorio, para reducir fiebre, y también para combatir las caries y problemas periodontales por su actividad antimicrobiana. Por lo ya mencionado el objetivo principal del proyecto es el aislamiento de compuestos presentes en la guayaba que actúen como antimicrobianos de bacterias patógenas de la cavidad oral.

Objetivos particulares:

- 1) Aislar los compuestos bioactivos de los frutos de la guayaba por medio de técnicas fotoquímicas convencionales.
- 2) Evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos, utilizando el método de microdilución en placa utilizando como especie de prueba *Sterptococcus mutans*.
- 3) Determinar compuestos volátiles presentes en los frutos de la guayaba por micro extracción en fase sólida.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos generales.

4.1.1 Material vegetal

Los frutos de *Psidium guajava* se obtuvieron de una plantación de guayaba en el pueblo de Amatlán, Municipio de Tepoztlán, en el Estado de Morelos. El material vegetal fue identificado por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología y una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y se analizó en plena madurez de consumo (amarilla y blanda).

4.1.2 Análisis cromatográficos.

La cromatografía por adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de columna de Sephadex (3x25). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítica se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60F₂₅₄ Merck®, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM] de 0.25 mm de espesor. Las placas fueron reveladas con tricloruro de aluminio seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) hasta la visualización completa.

4.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de de Química de la UNAM

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H 400 MHz) y de carbono 13 (RMN¹³C, 100 MHz) se generaron en el equipo Varian modelo VNMRS, utilizando CDCl₃ como disolvente y tetrametilsilano como referencia para los desplazamientos químicos expresados en ppm, los espectros de masa por impacto electrónico de 70 eV se obtuvieron con el equipo LECO

modelo Pegasus 4D con analizador másico TOF (tiempo de vuelo), con inducción en cromatógrafo de gases (CG-EM) marca Agilent modelo 6890N con una columna capilar DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón) de 10 m de longitud y 0.18 mm de diámetro interno con un espesor de película de 0.18 mm.

4.2 Estudio fitoquímico de *Psidium guajava*

4.2.1 Microextracción en Fase sólida

La microextracción en fase sólida se realizó en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación USAI bajo la supervisión de la M. en C. Georgina Duarte Lisci. El primer paso para realizar este procedimiento es limpiar la fibra (Supelco Fase adsorbente 50/30µm DVB/ Carboxen/ PDMS) en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Cuadro 4. Características del cromatógrafo de gases utilizado.

Cromatógrafo de gases	
Marca	Agilent
Modelo	6890N
Columna capilar	
Fase:	DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón)
Dimensiones	
Longitud	30 m
D.I.	0.25 mm
Espesor de película	0.18 µm
Inserto	Injection Sleeve, 0,77 mm
Septo	Supelco (Thermogreen TM LB-2) 11 mm.

Cuadro 5. Características del espectrómetro de masas utilizado.

Espectrómetro de masas	
Marca	LECO
Modelo	Pegaus 4D
Analizador másico	TOF (Tiempo de vuelo)

La fibra se limpia durante 30 minutos y posteriormente se obtiene el espectro de masas (blanco) para asegurar que la fibra se encuentre libre de impurezas.

Una vez realizado el blanco se procede a realizar la microextracción de las muestras para lo cual se colocaron dos viales, sobre una parrilla de agitación y calentamiento, los viales contenían 10 mg de cloruro de sodio y 2 mL de agua. Uno de los viales contenía una muestra de frutos previamente fragmentadas y el segundo únicamente contenía agua y un termómetro para monitorear la temperatura.

Una vez que se alcanzó la temperatura de 50°C se insertó la aguja que contiene la fibra en el septo del tapón del vial y una vez adentro, se deslizó para exponer la fibra recubierta de la fase estacionaria, la cual adsorbe los compuestos volátiles durante el tiempo estipulado. Posteriormente la fibra se insertó en el inyector del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas y se calentó la fibra para desadsorber los componentes volátiles. Los componentes se separaron utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N y los picos resultantes se analizaron en un espectrómetro de masas LECO Pegaus 4D TOF. Las condiciones para cada uno de los análisis se muestran en los cuadros 6, 7,8.

Cuadro 6. Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución del blanco.

Condiciones cromatográficas:	
Temperatura del inyector.	300 °C
Temperatura inicial de la columna.	150°C durante 0.2 min
Tasa de aumento de temperatura:	50°C/min
Temperatura final	300°C durante 5 min
Detector	Detector de ionizador de flama
Gas acarreador:	Helio
Modo	Splitless
Barrido de masas	50 – 500 uma

Cuadro 7. Condiciones utilizadas para realizar la microextracción en fase sólida.

Muestra	Cantidad	Temperatura	Agitación (rpm)	Tiempo
Fruto de Guayabo	100 mg	50 -65°C	360	1 hora

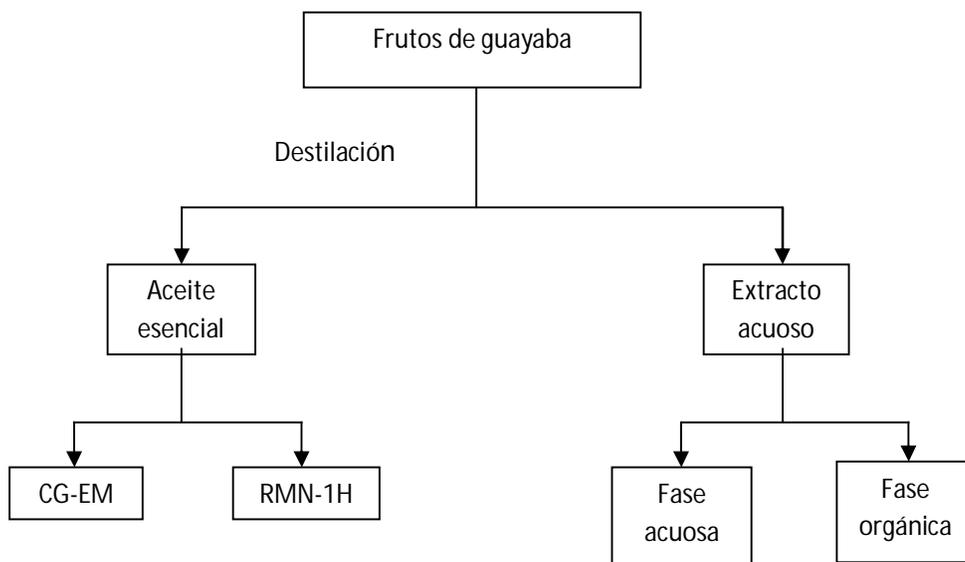
Cuadro 8. Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución las muestras.

Condiciones cromatográficas:	
Temperatura del inyector:	300°C
Temperatura inicial de la columna:	50°C
Tasa de aumento de temperatura:	20°C/ min
Temperatura final:	300°C durante 5 min
Detector :	Detector de ionizador de flama
Gas acarreador:	Helio
Modo:	Splitless
Barrido de masas	50 – 500 uma

4.2.2. Obtención del aceite esencial.

A 2 kg de fruto de guayaba se le agregaron 2 L de agua y se sometieron a una destilación durante 6 horas y se obtuvieron 230 mg de aceite esencial. En este caso se utilizó la técnica de hidrodestilación. Los constituyentes presentes en la esencia se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Cada espectro de masas resultante se comparó con la biblioteca del instrumento y la biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology a través de la página <http://webbook.nist.gov/chemistry/>).

Diagrama 1. Obtención del aceite esencial de los frutos del guayabo.



4.2.3. Preparación del extracto de la piel de *Psidium guajava*.

Se realizó una extracción por maceración de la piel del guayabo con metanol (4L) durante una semana para un posterior filtrado, se evaporó a presión reducida el disolvente del extracto obteniéndose la siguiente cantidad:

Cuadro 9. Cantidad obtenida del extracto.

Nombre:	Cantidad obtenida
Extracto metanólico de la piel de guayaba	397 g

200 g del extracto resultante se sometieron a un fraccionamiento por partición con 3 porciones, cada una de 500 mL utilizando una mezcla de acetato de etilo-butanol (1:1), a partir de la fase orgánica, se realizó el fraccionamiento primario por columna. La cantidad obtenida se menciona a continuación.

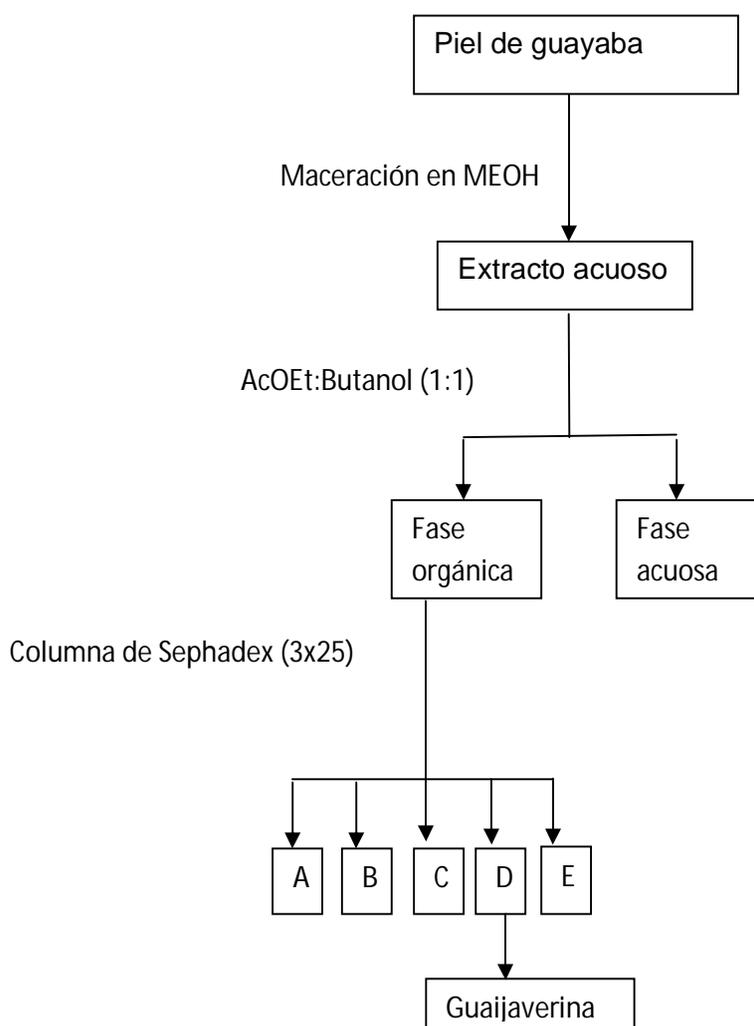
Cuadro 10. Cantidad obtenida de la partición del extracto.

Nombre:	Cantidad obtenida
Partición con acetato de etilo-butanol (1:1)	176 g

4.2.3.1. Fraccionamiento primario del extracto.

El producto de la partición (fase orgánica) del extracto metanólico de la piel del guayabo se sometió a un proceso de fraccionamiento cromatográfico en una columna 3 x 25 de Sephadex LH-20, utilizando como fase móvil, metanol. Este proceso generó 20 fracciones de 50 mL, las cuales fueron reunidas en base a su similitud cromatográfica, obteniéndose así, 5 conjuntos de fracciones (FA-FE).

Diagrama 2. Fraccionamiento primario del extracto con acetato de etilo-butanol.



4.2.3.2 Obtención y caracterización de la guajaverina.

En la fracción D se observó la formación de un precipitado amarillo que fue separado mediante filtración al vacío. El sólido fue identificado como guajaverina por comparación con una muestra auténtica aislada previamente de las hojas de *P. guajava*.

4.3. Ensayo biológico.

4.3.1. Microorganismo de Prueba

Para realizar el ensayo biológico del extracto y los compuestos aislados de la piel de *Psidium guajava* se eligió como microorganismos de prueba *Streptococcus mutans* (ATCC 700611) por ser patógeno oral causante de caries dental. Para su cultivo se utilizaron los medios de caldo infusión de cerebro-corazón (BHI).

4.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI):

La actividad antimicrobiana de los compuestos (concentración mínima inhibitoria, CMI) se determinó utilizando un ensayo de microdilución en placa estéril de 96 pozos. El cultivo fue incubado a lo largo de la noche, se centrifugó (10 000 rpm, 10 min), se lavo dos veces con buffer de fosfatos 0.05M (PBS, pH 6.8), las células se resuspendieron y se ajustó utilizando un espectrofotómetro y un estándar de McFarland. Cada pozo contenía 1×10^6 UFC/mL de *S. mutans*, el compuesto de prueba en diluciones seriadas y el medio de cultivo apropiado. Se utilizaron muestras por triplicado para cada concentración de prueba. Los controles utilizados consistieron en medio de cultivo inoculado y sin compuestos de prueba mientras que el blanco contenía únicamente medio de cultivo sin inocular. Todas las placas se incubaron a 37°C bajo condiciones atmosféricas adecuadas. El microorganismo *S. mutans* se incubó en condiciones aerobias, el crecimiento se estimó espectroscópicamente (A_{660nm}) después de 24 y 48 horas utilizando un lector de placas.

El valor de CMI para el microorganismo analizado se definió como la concentración mínima del compuesto de prueba que limita la turbidez a menos de 0.05 A_{660nm}; se utilizó gluconato de Clorhexidina (CHX) como control positivo mostrando valores de CMI de contra *S. mutans* de 3.7 µg/mL.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección de la especie *Psidium guajava* (guayaba) se realizó con base en el amplio uso de esta especie en la medicina tradicional. Uno de los usos tradicionales de la especie *P. guajava* es el tratamiento de infecciones orales, por lo que este estudio se enfocó biológicamente en esa dirección y durante la realización de los ensayos biológicos preliminares se estableció que el extracto preparado a partir los frutos de *P. guajava* inhibe el crecimiento de la bacteria *S. mutans*, agente etiológico de las caries.

5.1 Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de los frutos de guayaba *S. mutans*.

La determinación del potencial antibacteriano del extracto de la piel de *P. guajava*, se realizó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos y siguiendo la metodología descrita en la literatura (Rivero *et al.*, 2008). Los resultados de esta evaluación indicaron que el extracto preparado a partir de la piel de *P. guajava* presentaba una concentración mínima inhibitoria de 720.4 µg/mL para *S. mutans* (Cuadro 11). Se considera que un extracto vegetal es activo para *S. mutans* si la CMI es menor a 1000 µg/mL (Rivero *et al.*, 2008).

Cuadro 11. Actividad antimicrobiana (CMI) del extracto y de las fracciones sobre la bacteria *Streptococcus mutans*.

Muestra	CMI (µg/mL) ^a
	<i>Streptococcus mutans</i>
Extracto metanol	720.4
Acetato de etilo + butanol (1:1)	360.2
CHX ^b	3.7

^aLos valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento.

^bCHX: gluconato de chlorhexidina.

Se realizó el estudio fitoquímico biodirigido del extracto de la piel de *P. guajava* con la finalidad de aislar los compuestos activos responsables de la actividad antibacteriana encontrada para el extracto de la guayaba (Cuadro11). Como ensayo biológico de monitoreo se empleó el mismo que permitió detectar la actividad biológica del extracto original.

La preparación del extracto activo en gran escala se realizó utilizando metanol como disolvente (4 L). Posteriormente, el extracto resultante se sometió a un fraccionamiento por partición utilizando una mezcla de acetato de etilo-butanol (1:1). Del fraccionamiento primario se obtuvo la fracción activa F-D, la cual fue sometida a sucesivas recromatografías. Este proceso permitió aislar al flavonoide guaijaverina (**1**) como compuesto activo (Figura 4). El compuesto **1** fue caracterizado e identificado como guaijaverina por comparación con una muestra auténtica aislada previamente de las hojas de *P. guajava*.

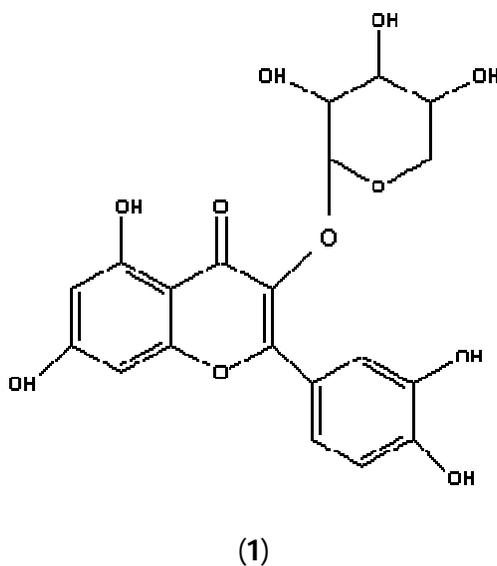


Figura 4. Compuesto aislados de la infusión de la piel de *P. guajava*.

Los resultados obtenidos de las evaluaciones de la guaijaverina aislada de la fracción activa F-D indican que sus concentraciones mínimas (CMI) son de 125.1 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans*. Al comparar la actividad antibacteriana de la guaijaverina (**1**) con la obtenida para el control positivo clorhexidina, se puede apreciar que el compuesto aislado presenta una menor actividad contra *S. mutans* con CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 12). Sin embargo, es importante destacar que la actividad encontrada para el flavonoide guaijaverina puede considerarse como muy activo de

acuerdo a las concentraciones mínimas inhibitorias que se reportan en la literatura para compuestos aislados de fuentes vegetales (Rivero *et al.*, 2008).

Cuadro 12. Actividad antimicrobiana (CMI) de la guaijaverina (1), y del gluconato clorhexidina (CHX) sobre la bacteria *Streptococcus mutans*.

Muestra	CMI ($\mu\text{g/mL}$) ^a
	<i>Streptococcus mutans</i>
1	125.1
CHX ^b	3.7

^aLos valores representan el promedio de un mínimo de tres repeticiones por cada experimento.

^b CHX: gluconato de chlorhexidina.

5.1.1 Evaluación del potencial antibacteriano del aceite esencial preparado a partir de los frutos de guayabo.

El aceite esencial de los frutos de guayaba se ensayó para determinar su potencial antibacteriano contra la bacteria *S. mutans*. El efecto antibacteriano se estableció utilizando la metodología descrita previamente. Los resultados de esta determinación indicaron que el aceite esencial de los frutos de guayaba tiene una CMI de 520 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans*. El efecto obtenido por el aceite esencial es menor al obtenido para el control positivo clorhexidina.

5.2 Identificación de los componentes del aceite esencial de los frutos de guayaba.

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se realizó en primera instancia mediante un análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). Los productos fueron caracterizados mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo y NIST (National Institute of Standards and Technology).

El cromatograma de gases indicó la presencia de 84 compuestos de los cuales se logró la identificación de 79 componentes en la esencia (Cuadro 13), los cuales representan el 98% de los constituyentes presentes en la esencia.

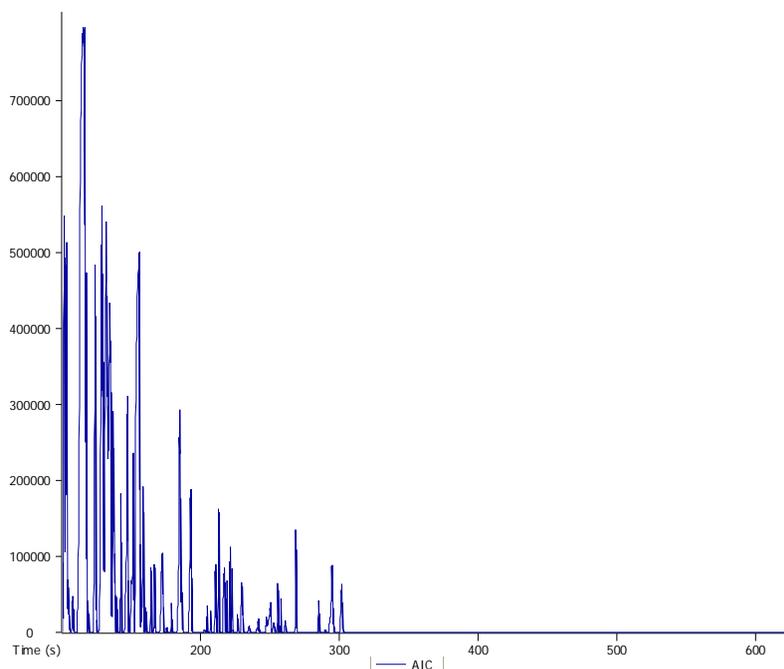


Figura 5. Cromatograma de gases obtenido del aceite esencial de los frutos de la guayaba.

Cuadro 13. Compuestos encontrados en el aceite esencial de los frutos de la guayaba.

Nombre	Area %	R.T. (s)
α -Pino	0.81756	101.347
α -Mirreno	2.0399	103.447
3-Hexen-1-ol, acetato	1.5408	107.947
Eucaliptol	2.0614	117.647
2-metil-, octil ester, 2-ácido Propeonico	0.84935	118.447
Dihidromirreno	0.41889	124.047
5-metil-(4E) -Undecaeno	0.41889	124.447
1-metil-4-(1-metiletilideno)-, Ciclohexeno	0.12345	127.447
2-etilidieno-6-metil-, 3,5-Heptadienal	0.48063	128.447
3,5(2H,4H)-diene, 6-benzoiltio-1,2,4-Triazin	0.51121	130.747
3,7-dimetil- (1E),3,6-Octatrieno	3.1737	131.547
Nonanal	3.1737	131.847
metil ester, acido Octanoico	0.44315	135.747
1,2-dimetil-3-metileno-, cis- Ciclopentano	1.8298	136.347
3,4-dimetil-2,4,6-Octatrieno	2.5004	137.347
exo-Fenol	0.4116	137.747
4-Acetil-1-metilciclohexeno	0.78062	139.247
Bencil isopentil éter	0.47385	143.147
1,7,7-trimetil- (1S)-Biciclo[2.2.1]heptan-2-eno	0.30163	143.747
Etil ester, ácido Benzoico	0.30621	148.347
6-metil-Biciclo[3.3.0]oct-2-en-7-eno	0.33223	148.747
Borneol	0.3832	150.247
4-metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol	0.52689	151.347
1-(2-metilfenil)-Etano	0.48787	152.847
<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	4.6367	156.047
Isobornil formato	0.87382	173.447
(Z)-fenilmetil ester, 9-ácido Octadecenoico	2.6868	179.247
3,5,6,8a-tetrahidro-2,5,5,8 α -tetrametil-trans-2H-1-Benzopirano	2.6868	179.547
4-Hexen-1-ol, 5-metil-2-(1-metiletenil)-, acetate	1.2341	188.847
1-Metoxi-3-fenilpropano	4.7315	192.447
1,1'-(1-etenil-1,3-propanodiol)-bis-Benceno	1.6916	193.047
1-metil-5-metileno-8-(1-metiletil)- [S-(1E, 6E)]-Ciclodecadieno	1.2163	193.447
2-Acetoximesitileno	5.7978	202.847
Copaeno	8.206	203.547

Cuadro 13. Compuestos encontrados en el aceite esencial de los frutos de la guayaba (continuación)

Nombre	Area %	R.T. (s)
α -Cariofileno	3.658	204.947
α -Neocloveno	1.8499	207.647
3-fenil-, acetato de, (2E)-Propen-1-ol	0.55417	210.247
1 α ,2,3,4,4 α ,5,6,7b-octahidro-1,1,4,7-tetrametil-, [1 α R-(1 α ,4 α ,4 α ,7b α)]-1H-Cicloprop[e]azuleno	1.1672	211.447
Cedreno	1.4138	212.847
[5.2.2.0(1,6)]undec-2-eno,6S-2,3,8,8-Tetrametiltriciclo	2.5042	213.947
α -isobutil-2,4,6-trimetil-,Bencil alcohol	0.90887	217.647
ϵ -Cariofileno	1.244	219.347
1-metil-4-(5-metil-1-metileno-4-hexenil)- (S),Ciclohexeno	1.4122	220.547
4-etenil-4-metil-3-(1-metiletetil)-1-(1-metiletetil)- (3R-trans)-Ciclohexeno	0.18211	221.647
1,2,3,5,6,8 α -hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletetil)- (1S-cis)-Naftaleno	2.0613	222.947
biciclo[3.3.1]nonan-3-ano oxime,7-Metileno	1.6861	223.547
2-Fenil-2,4-octadienol	0.21553	223.747
1-(5,6,7,8-tetrahidro-2,8,8-trimetil-4H-ciclohepta[b]furan-5-il)-Etanona	0.91498	226.847
9-Metoxicalameneno	0.59468	227.647
Oxido de Cariofileno	0.56711	229.947
2-Fenil-hex-5-en-3-ol	0.30551	230.247
3,7,11-trimetil- (1E),6,10-Dodecatrien-3-ol	0.50319	232.647
1,3,4-Trimetiladamantano	0.11755	240.447
2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro- α , α ,4 α ,8-tetrametil- [2R-(2 α ,4 α ,8 α)]-2-Naftalenometanol	0.56977	242.347
Epicedrol	0.11204	243.847
1-(4-metoxifenil)-4-metil-1-Penten-3-eno	0.0090426	246.247
1-(2,4-Dimetilfenil)-3-(tetrahidrofuril-2)propano	0.99232	256.747
4-Etoxi-2,5-dimetoxi-1-(2-propenil)benceno	0.10883	258.647
α -Bisabolol	1.085	259.647

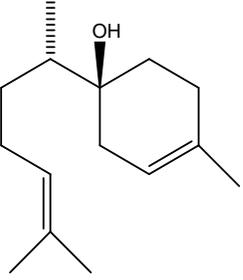
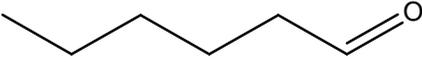
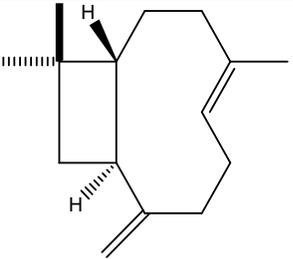
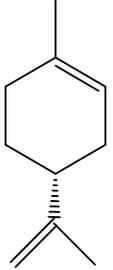
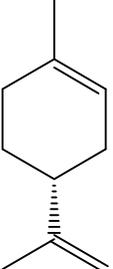
Cuadro 13. Compuestos encontrados en el aceite esencial de los frutos de la guayaba (continuación)

Nombre	Area %	R.T. (s)
3,7,11-trimetil- acetato de, (2E, 6E) ,10-Dodecatrien-1-ol	0.54437	261.147
Apiol	0.13489	262.547
3,7,11-trimetil-(2E, 6E),10-Dodecatrienal	0.29	263.447
(R) <i>m</i> -Ment-1(7)-eno	1.5026	267.347
ester isobornil , ácido Ciclopropanocarboxílico	0.32945	268.647
Benzoato de Bencilo	0.88623	270.247
2-Dodecilciclobutanona	1.608	271.847
3,5-Dihidroxibenzaldeido	0.7423	272.347
butil 2-metilpropil ester, ácido 1,2-Bencenodicarboxilico	0.13528	281.647
2,3,5,6-Tetrametil-para-fenilenodiamina	1.064	284.647
1,7-dimetil-4-(1-metiletil)-,Spiro[4.5]dec-6-en-8-eno	1.7868	286.647
ácido <i>n</i> -Hexadecanoico	1.8497	299.147
Acetato de 3-fenil-1-propanol	0.23259	302.647
Eicosano	0.19214	343.347
10-Heneicoseno	0.59468	366.547
Hexadecano	0.72147	369.447
7-hexil-Eicosano	1.0154	398.547
11-deciltetracosano	0.303	438.947

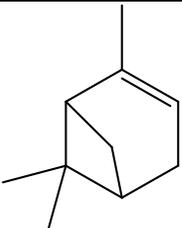
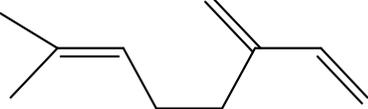
5.2.1 Evaluación del potencial antibacteriano de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de los frutos del guayabo.

El potencial antibacteriano de los compuestos *S*-limoneno, *R*-limoneno, bisabolol, hexanal, β -cariofileno, α -pineno, mirceno y nonanal presentes en el aceite esencial del guayabo se determinó utilizando la metodología descrita para el aceite esencial. En general, todos los productos presentan un efecto antibacteriano moderado. En el Cuadro 5 se resume la actividad antibacteriana encontrada para el aceite esencial de los frutos de guayaba y los compuestos obtenidos a partir de fuentes comerciales.

Cuadro 14. CMI de los compuestos probados en el ensayo biológico.

Nombre	Estructura	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Bisabolol		1020
Hexanal		250
β -Cariofileno		1200
S-Limoneno		1012
R-Limoneno		1100

Cuadro 14. CMI de los compuestos probados en el ensayo biológico (continuación).

Nombre	Estructura	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
α -Pinoeno		510
Mirceno		1000
Nonanal		258

5.3 Resultados obtenidos de la microextracción en fase sólida (SPME) realizada en los frutos de guayaba.

Para realizar la identificación de los compuestos presentes en los frutos de guayaba utilizando la técnica de microextracción en fase sólida se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) acoplado a un espectrómetro de masas (EM). Los productos fueron caracterizados mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo y NIST (National Institute of Standards and Technology). El cromatograma de gases indicó la presencia de 173 componentes de los cuales se logró la identificación de 148 componentes mayoritarios (Cuadro 15), los cuales representan el 80% de los constituyentes presentes.

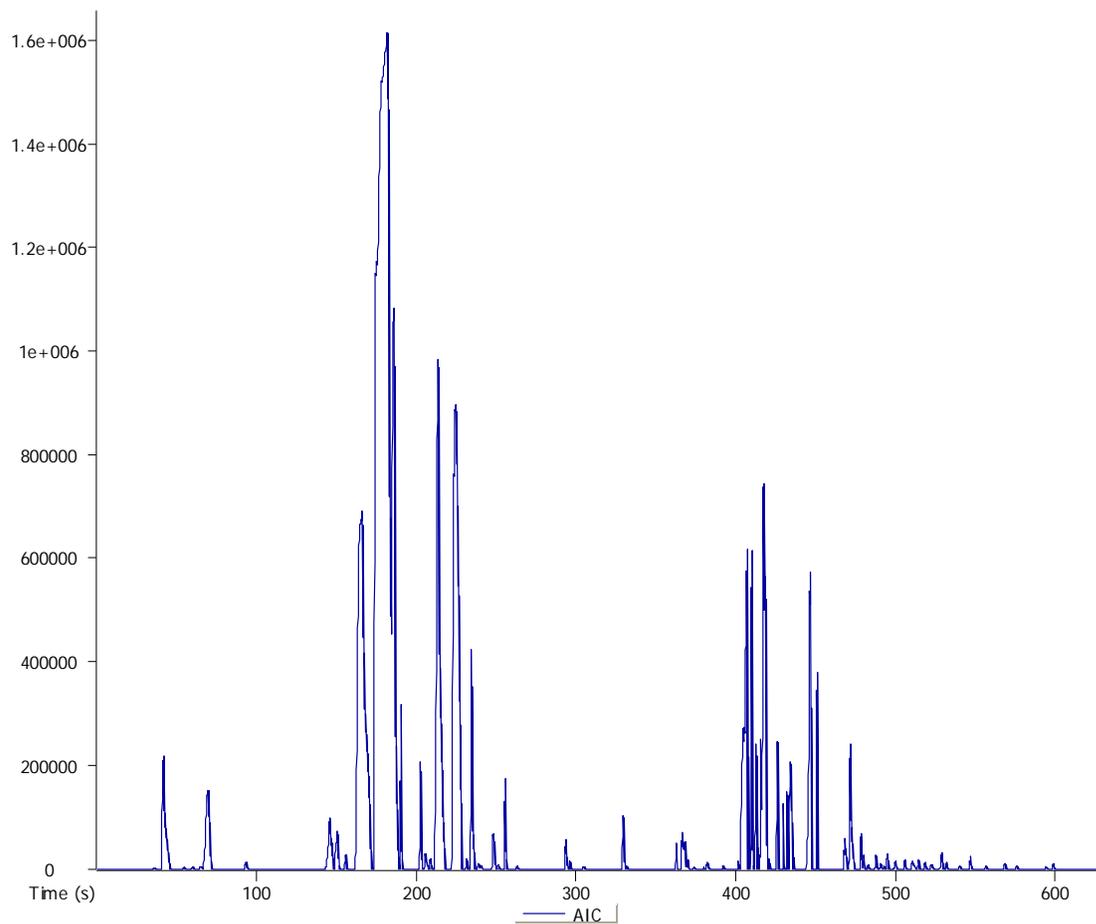


Figura 6. Cromatograma de gases de los frutos de *Psidium guajava* obtenido utilizando la técnica de SPME.

Cuadro 15. Compuestos volátiles determinados en los frutos de la guayaba mediante la técnica de SPME.

Nombre	R.T. (s)	Area %
4-metil, dihidro,2(3H)-Furanona	36.756	0.0015146
α -(1-aminoetil)- (<i>R</i> *, <i>R</i> *)-Bencenmetanol	41.756	0.86068
4-Pental	54.956	0.011909
Nitroacetoniitrilo	60.256	0.008867
Desconocido	65.956	0.70593
Hexanal	68.956	2.2717
2-Hexenal	93.456	1.0354
1-cloro-1-fluor-,Etano	94.256	0.27397
α -etenil- α -metil-,Bencenetanol	141.156	0.0026232
Bensaldeido	145.956	0.82953
<i>N,N'</i> -Bis(2,6-dimetil-6-nitrosohept-2-en-4-eno)	147.756	0.28778
α -Pino	149.956	0.24286
β -Pino	150.656	0.44483
6-metil-5-Hepten-2-ona,	155.956	0.66393
acetato de, (<i>Z</i>)-,3-Hexen-1-ol	165.856	4.9518
<i>L</i> -Limoneno	174.556	0.82538
3,4-dimetil-,1,5-Ciclooctadieno	176.756	1.8867
5-metil-3-(1-metiletetil), <i>trans</i> ,Ciclohexeno	178.356	5.5604
<i>D</i> -Limoneno	181.556	6.4175
1-metil-2-(1-metiletetil)-,Ciclobutanoacetoniitrilo	181.856	6.8442
Eucaliptol	183.256	0.27031
5-Metil-3-hepteno	184.356	0.0031335
3,7-dimetil, (<i>1Z</i>),3,6-Octatrieno	186.356	1.3826
4-Metil-1,5-Heptadieno	188.356	0.0026941
1-metil-4-(1-metiletetil)- 1,4-Ciclohexadieno	190.756	0.44571
(<i>2E</i>) -Octanal	191.656	0.055205
4-pentenil ester, ácido Butanoico	193.656	0.014758
4-etil-1,4-dimetil-,2-Ciclohexen-1-ol	195.256	0.015127
2,2-dihidroxi-1-fenil, Etanona	196.556	0.016229
pentil, Ciclopropano	198.556	0.027271
1-cloro-3,3-dimetil, 2-Butanona	200.756	0.20968
1,2,3,4,5-pentametil, 1,3-Ciclopentadieno	202.756	0.56787
3-isopropenil-5,5-dimetil-,Ciclopenteno	203.056	0.57925
4-etil-3-etilideno, Ciclohexeno	206.056	0.26791
Nonanal	214.056	4.3365
2,3,3-trimetil, 1,4-Pentadieno	224.456	2.6982
1,2,6,6-tetrametil, 1,3-Ciclohexadieno	225.756	3.3997
1,2,3,5-tetrametil, Benceno	226.556	1.0262
6-Propenilbiciclo[3.1.0]hexan-2-ona	226.956	0.75463

Cuadro 15. Compuestos volátiles determinados en los frutos de la guayaba mediante la técnica de SPME (continuación).

Nombre	R.T. (s)	Area %
2-(1-metiletilideno), Ciclohexanona	227.556	0.17881
trimetil(2-metil-1-propenilideno), Ciclopropano	231.956	0.025316
(2E, 6Z) -Nonadienal,	235.956	0.10464
2-Nonin-1-ol	239.156	0.090417
fenilmetil ester, ácido Acético	240.956	0.0072991
4-metil-1-(1-metiletil), 3-Ciclohexen-1-ol	248.556	0.10785
(3E) -hexenil ester, ácido Butanoico	249.056	0.046423
etil ester, ácido Octanóico	254.156	0.0089455
<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	255.956	0.41753
1,3,3-trimetil, acetato de, endo- Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	263.556	0.016807
3,4,4 α ,5,6,8 α -hexahidro-2,5,5,8 α -tetrametil-(2 α ,4 α ,8 α)-, 2H-1-Benzopirano	294.256	0.14919
(5Z) -(1-propenil)- 1,3-Benzodioxol	296.456	0.23208
3,5,6,8 α -tetrahidro-2,5,5,8 α -tetrametil- <i>trans</i> , 2H-1-Benzopirano	305.256	0.74461
α -Cubebeno	330.156	1.8114
<i>p</i> -tert-Butilpivalofenona	332.056	0.34623
6-metil-2-metileno-6-(4-metil-3-pentenil)- [1 <i>R</i> -(1 α ,5 α ,6 α)]-, Bicyclo[3.1.1]heptano	362.756	0.3291
1,2,3,4,4 α ,5,6,8 α -octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil), (1 α ,4 α ,8 α)-, Naftaleno	363.256	0.11977
1,5,9,9-tetrametil-1Z, 4Z, 7Z -Cicoundecatrieno	364.956	0.0077195
6-furfurilideno-2,2-dimetil, Ciclohexanona	365.656	0.1825
1-(1,5-dimetilhexil)-4-metil-, Benceno	381.156	0.0038489
2,4 α ,5,6,7,8,9,9a-octahidro-3,5,5-trimetil-9-metileno- (4 α S- <i>cis</i>)- 1H-Benzociclohepteno	392.656	1.362
1-(1,5-dimetilhexil)-4-metil, Benceno	402.356	0.038522
1,2,3,5,6,8 α -hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)- (1 <i>S</i> - <i>cis</i>), Naftaleno	403.456	0.12515
[<i>S</i> -(<i>R</i> *, <i>S</i> *)]- 3-(1,5-dimetil-4-hexenil)-6-metileno, Ciclohexeno	404.956	0.81961
2,4 α ,5,6,7,8-hexahidro-3,5,5,9-tetrametil- (<i>R</i>), 1H-Benzociclohepteno	405.756	0.23001
1-cloro-4-[(1-metiletilideno)ciclopropil]- (<i>R</i>), Benceno	406.156	0.53975
hexaidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)- [1 <i>S</i> -(1 α)]-Naftaleno	406.856	0.40284
1,5,9,9-tetrametil- 1Z, 4Z, 7Z-Cicoundecatrieno	407.156	1.3466
1-(1,5-dimetilhexil)-4-metil-, Benceno	407.556	1.0989
1-(5,6,7,8-tetrahidro-2,8,8-trimetil-4H-ciclohepta[b]furan-5-il), Etanona	407.856	0.12868
α -Calacoreno	408.456	0.14332
1-[3-(trifluorometil)fenil]- 2- propanona	409.256	0.058953
(3 <i>E</i> , 7 <i>E</i>)-11-trimetil-2,6,10-Dodecatrien-1-ol	409.656	0.234
1-etenil-1-metil-2-(1-metiletetil)-4-(1-metiletilideno), Ciclohexano	409.956	0.97731
3,7,11-trimetil- 1,6,10-Dodecatrien-3-ol	410.356	0.97731
Epiglobulol	412.456	0.1007
1,6-dimetil-4-(1-metiletil), Naftaleno	412.856	0.37271

Cuadro 15. Compuestos volátiles determinados en los frutos de la guayaba mediante la técnica de SPME (continuación).

Nombre	R.T. (s)	Area %
4,5,9,10-dehidro, Isolongifoleno	413.156	0.28721
1,8-Ciclopentadecadiino	413.556	0.28721
2,3-bis(acetiloxi)propil ester, (9Z, 12Z, 15Z)- ácido Octadecatrienóico	414.456	0.037608
2,2,4-trimetil-3-carboxiisopropil, isobutil ester, ácido Pentanóico	415.956	0.38288
oxido de Cariofileno	417.656	1.3058
Globulol	418.756	0.66009
6-(<i>p</i> -Tolil)-2-metil-2-heptenol	419.256	0.17327
1,6-dimetil-4-(1-metiletil),Naftaleno	419.756	0.024383
4-(1,5-dimetil-1,4-hexadienil)-1-metil-, Ciclohexeno	421.956	0.12856
7-biciclo[4.1.0]hept-7-ilideno- Bicilo[4.1.0]heptano	422.356	0.05885
2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro- $\alpha,\alpha,4\alpha,8$ -tetrametil- [2 <i>R</i> -(2 $\alpha,4\alpha,8\alpha$)]- 2-Naftalenemetanol	423.856	0.41934
<i>cis</i> Lanceol	425.256	0.32665
4-formil-2,4,7,14-tetrametil- diacetato de, Triciclo[5.4.3.0(1,7)]tetradecano-3,6-diol	425.656	0.54404
1-metoxi-2,2-dimetil-3-(2-feniletinil), Ciclopropano	426.056	0.81784
4,5,9,10-dehidro-, Isolongifoleno	426.556	1.4973
Agarospinol	427.156	0.12994
1-Hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclodecadieno	427.556	0.048278
Cubenol	429.956	0.93501
α -Cubebeno	432.956	0.19501
4,5,9,10-dehidro-, Isolongifoleno	434.256	1.7629
2,3-dimetil, Nonano	434.556	1.7629
Copaeno	434.856	1.7629
<i>cis</i> -2,4 α ,5,6,9 α -Hexahidro-3,5,5,9-tetrametil(1H)benzociclohepteno	435.256	0.53243
1,2,3,4,4 α ,7,8,8 α -octahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)- [1 <i>S</i> -(1 $\alpha,4\alpha,4\alpha,8\alpha$)], 1-Naftalenol	436.456	0.70262
1,2,3,5,6,7,8,8 α -octahidro- $\alpha,\alpha,4,7$ -tetrametil, 1-Naftalenemetanol	439.656	0.16832
1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil, 3-Ciclohexen-1-ol	446.456	3.9592
2,3-dihidro-3- α -hidroxi-2- α -metil-7-propenil- 4H,5H-Pirano(4,3-b)piran-4,5-diona	447.856	0.32756
2,6,10-trimetil, Dodecano	450.656	2.1885
α -Bisabolol	451.056	2.1885
3-(1-etoxietoxi)- 2-Metilbutano-1,4-diol	454.056	0.00060984

Cuadro 15. Compuestos volátiles determinados en los frutos de la guayaba mediante la técnica de SPME (continuación).

Nombre	R.T. (s)	Area %
oxido de Cariofileno	454.856	0.063967
α -fenil-, acetato de Bencenemetanol	455.356	0.014457
6-(<i>p</i> -Tolil)-2-metil-2-heptenol	456.156	0.13811
4-isopropenil-1-metoximetoximetil, Ciclohexeno	457.356	0.1885
2-[[2-[[2-[(2-pentilciclopropil)metil]ciclopropil]metil]ciclopropil]metil], metil ester, ácido Ciclopropanobutanóico	457.856	0.1885
1,2-dimetil-, 1,3-Ciclopentadieno	458.456	0.012927
oxido de Ledeno	460.056	0.20081
α -Vatirenenol	461.756	0.10275
2,2-dimetil, dibutil ester, ácido Pentanodioico	464.256	0.034065
3,7,7-Trimetil-1-penta-1,3-dienil-2-oxabicyclo[3.2.0]hept-3-eno	465.656	0.091247
2-(fenilmetileno), Octanal	466.356	0.026207
8,9-dehidro, Neoisolongifoleno	466.856	0.0094552
(2 <i>S</i>)-metil-5-(1,2,2), trimetilciclopentilfenol	468.256	0.1042
Geranil vinil éter	469.456	0.032508
α -Bisabolol	471.756	0.39375
1,1,1,5,7,7,7-Heptametil-3,3-bis(trimetilsiloxi)tetrasiloxano	471.956	0.39375
3-metil-3-(4,8-dimetilnona-3,7-dienil)-4-metileno-1,3-Dioxolan-2-ona	473.456	0.035788
1,4-dimetil-7-(1-metiletil), Azuleno	476.756	0.0042735
1-Bromo-9-tiabiciclo[3.3.1]nonano 9,9-dioxido	478.056	0.016419
3-metil-3-(4-metil-3-pentenil), Oxiranometanol	478.456	0.097473
etil ester, ácido Pentadecanóico	478.756	0.097473
3-tridecil ester, ácido Metoxiacético	480.556	0.036843
Biciclo[3.3.1]non-2-en-9-ol	483.056	0.0055286
Isopropil Miristato	487.956	0.07842
(3 <i>E</i> , 7 <i>E</i>), 11-trimetil- 2,6,10-Dodecatrien-1-ol	491.156	0.013047
Eicosano	492.956	0.01295
1,3,4,6,7,8-hexaidro-4,6,6,7,8,8-hexametil-Ciclopenta[2 γ]-benzopirano	495.156	0.090457
butil 2-metilpropil ester, ácido 1,2-Bencenodicarboxílico	500.356	0.025846
1-Hexadecanol	506.256	0.033422
Eicosano	510.856	0.058668
metil ester, ácido Tridecanóico	518.756	0.077985
3-tridecil ester, ácido Metoxiacético	522.756	0.049307
dihexil ester, ácido 1,2-Bencenodicarboxílico	529.056	0.076798
ácido n-Hexadecanóico	532.256	0.026801
3-tetradecil ester, ácido Metoxiacético	540.456	0.0096611
Isopropil Palmitato	547.156	0.027015
3-Isopropoxi-1,1,1,7,7,7-hexametil-3,5,5-tris(trimetilsiloxi)tetrasiloxano	556.956	0.0038842
3-tetradecil ester, ácido Metoxiacético	568.756	0.016665
metil ester, ácido Ciclopentanoundecanóico	576.056	0.042605
2-(3-bromo-5,5,5-tricloro-2,2-dimetilpentil)- 1,3-Dioxolano	594.556	0.0089343
4,4'-(1-metiletilideno)bis-, fenol	599.156	0.013565

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Esta investigación representa una contribución al conocimiento biológico de la especie *P. guajava*, planta medicinal utilizada ampliamente en las prácticas médicas tradicionales del centro y sur de México.

Así, el estudio químico biodirigido del extracto preparado a partir de los frutos de *Psidium guajava* permitió el aislamiento y caracterización del flavonoide guaijaverina.

La guaijaverina presentó una buena actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* con concentraciones mínimas inhibitorias de 125.1 µg/mL. Este flavonoide ha demostrado actividad antioxidante *in vitro* (Prabu *et al.*, 2006), antiinflamatoria (Demirezer *et al.*, 2006) y antimicrobiana (Dweck *et al.*, 2001). La presencia de la guaijaverina puede justificar en parte el uso de la especie en el tratamiento de diversas infecciones.

La obtención del aceite esencial de los frutos de guayaba se realizó por medio de la técnica de hidrodestilación. El efecto de la actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* del aceite esencial, es menor al obtenido para el control positivo clorhexidina. Teniendo este último una CMI considerablemente menor a la del aceite esencial de los frutos de la guayaba, sin embargo se considera que el aceite esencial presente una buena actividad antibacteriana con una CMI de 520 µg/mL para *Streptococcus mutans*.

El análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) del aceite esencial obtenido a partir de los frutos de la guayaba permitió determinar como componentes mayoritarios al *S*-limoneno, *R*-limoneno, bisabolol, hexanal, β-cariofileno, α-pineno, mirceno, y nonanal. Estos últimos presentaron una actividad antibacteriana moderada contra *S. mutans* con concentraciones mínimas inhibitorias en un rango de 250 a 1200 µg/mL.

Por otra parte, la microextracción en fase sólida (SPME) representa una alternativa a la preparación de los aceites esenciales a partir de materiales vegetales. Este proceso tiene como

principales ventajas que integra el muestreo, la extracción, la concentración y la introducción de la muestra sin utilizar disolventes que puedan contaminar las muestras. Es importante destacar que los analitos en la muestra son extraídos directamente y concentrados en la fibra de extracción lo cual permite incrementar los límites de detección de las sustancias volátiles. En este caso el análisis directo de los frutos de guayaba permitió la detección e identificación de 148 compuestos y 79 en el aceite esencial preparado a partir de los frutos, ambos por SPME.

Por último, es importante destacar que aunque los productos aislados y contenidos en los frutos de la guayaba presentan una CMI considerablemente mayor que la clorhexidina, este compuesto presenta desventajas tales como el manchado de los dientes y la alteración del sentido del gusto lo cual limita su uso en el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral (Quirynen *et al.*, 2000).

VII. PERSPECTIVAS

- Continuar con estudios fitoquímicos en las fracciones que no fueron analizadas en su totalidad, para el aislamiento y caracterización de otros compuestos presentes en la guayaba.
- Realizar ensayos biológicos a los compuestos minoritarios encontrados en el fruto para conocer su posible aplicación como antibacterianos.
- Desarrollar métodos de extracción y purificación de los compuestos activos y antibacterianos con una alta eficiencia, para una posible aplicación industrial como fitomedicamentos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adel A. Kader (updated June 10, 2002) Recomendaciones para Mantener la Calidad Postcosecha, Department of Pomology, University of California, Davis, CA 95616
- Akinpelu. D.A. y Onakoya. T.M. (2006), Antimicrobial activities of medicinal plants used in folklore remedies in south-western, African Journal of Biotechnology Vol. 5 , 1078-1081
- Arima, H., y Danno, G. (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their Structural Elucidation. *Biosci, Biotechnol. Biochem*, 66, 1727-1730.
- Bartolome, A., Mandap, K., David, K.J., Sevilla, F., y Villanueva, J. (2006). SOS- red fluorescent protein (RFP) bioassay system for monitoring of antigenotoxic activity in plant extracts. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2114-2120.
- Begum, S., Hassan, S., y Siddiqui, B. (2004). Two new triterpenoids from the fresh leaves of *Psidium guajava*. *Letter Planta Med*, 68, 1149-1152
- Constant, Marc., Miller, Brewing., Collier, John(2000). Headspace Gas Chromatography Profiles of Fruit-Flavored Malt Beverages Using Solid-Phase MicroExtraction. West Highland Blvd., Milwaukee
- Demirezer, L. O., Kuruüzüm-Uz, A., Guvenlap, Z., y Süleyman, H. (2006). *Pharmaceutical Biology*, 44, 462-466.
- Dweck, A. C., 2001. A review of *Psidium guajava*. *Malayan Journal of Medical Science*, 8, 27-30.
- El Khaden, H., Mohammed, Y. S., (1958). Constituents of the leaves of *Psidium guajava*. II. Quercetin, avicularin, and guaijaverin. *Journal of the Chemical Society*.
- Heinrich, M. (1998). Plants as antidiarrhoeals in medicine and diet. En: Proceedings from a Joint Meeting of the Society for Economic Botany and the International Society London, Royal Botanic Gardens, Kew, UK, July 1-6, 1996, pp. 17-30.
- Hsieh, C. L., Yang, M. H., Chyau, C. C., Chiu, C. H., Wang, H. E., Lin, Y. C., Chiu, W. T., y Peng, R. Y., (2007). Kinetic analysis on the sensitivity of glucose or glyoxal- induced LDL glycation to the inhibitory effect of *Psidium guajava* extract in a physiomimic system. *Biosystems* 88, 92-100.

- Irurueta, M., Biolatto, A., Grigioni, G., Sancho, A.M., Chavéz, M., Páez, R., Taverna, M., Pensel. (2005). ELECTRONIC NOSE AND SPME-GAS CHROMATOGRAPHY FOR THE STUDY OF THE ODOR PROFILE OF WHOLE MILK POWDER. Argentine Chemical Society. Vol. 93, 75-80
- Jaiarj, P., Khoohaswan, P., Wongkrajang, Y., Peungvicha, P., Suriyawong, P., Saraya, M.L., y Ruangsomboon, O. (1999). Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. Leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 203-212.
- Jordan, M. J., Margaría, C. A., Shaw, P.E., y Goodner, K.L., (2003). Volatile components and aroma active compounds in aqueous essence and fresh pink guava fruit puree (*Psidium guajava* L.) by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 1421-1426.
- Mercadante, A. Z., Steck, A., y Pfander, H., (1999). Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and structure elucidation. *Journal of agricultural and Food Chemistry*.
- Nwinyi Obinna C., Chinedu Nwodo S. y Ajani Olayinka O. (2008) Evaluation of antibacterial activity of *Psidium guajava* and *Gongronema Latifolium*
- Ojewole. J. A. (2005). Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. *Methods and findings in experimental and Clinical Pharmacology* 27, 689-695.
- Padilla Ramírez José Saúl, González Gaona Ernesto, Reyes Muro Luis (2007), Producción de fruto e índices productivos en el árbol de guayabo, *Agricultura Técnica en México* vol. 33 número 002 Instituto Nacional de investigaciones forestales, Agrícola y pecuarias Texcoco, México, 192-196
- Panagiotopoulou, P. M., Tsimidou, M. (2002). Solid Phase Microextraction: Applications to the Chromatographic Analysis of Vegetable Oils and Fats. *Grasas y Aceites* Vol. 53. 84-95
- Peñalver. A. (2002) Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Química, UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI, Tarragona, España.
- Pérez, Mitchell, Vargas (2007). *Psidium Gajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 1-27

- Pistelli, L., Cammilli, A., Manunta, A., Marsili, A., y Morelli, I. (1992). Triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from *Bupleurum falcatum* subsp. *Cernuum*. *Phytochemistry*, 33, 1537-1539
- Ponce, M.M., Navarro, A.I., Martínez, G. M. N., Alvarez, G. R. (1994). *In vitro* effect against Giardia of 14 plant extracts. *Revista de Investigación Clínica*, 46, 343-347.
- Prabu, G., Gnanamani, A., y Sadulla, S. (2006) Guaijaverin- a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology*, 487-495.
- Qadan, F., Thewaini, A. J., Ali, D. A., Afifi, R., Elkhawas, A., y Matalka, K. Z. (2005). The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. *American Chinese Medical*, 33, 197-204.
- Quian, H., y Nihorimbere, V. (2004). Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Science*, 5, 676-683.
- Quirynen, M., Teughels, W., De Soete, M., van Steenberghe, D. (2000). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology* 28, 72–90.
- Radha, A., y Chandrasekaran, R. (1996). X-Ray and conformational analysis of arabianan. *Carbohydrate Research*, 298, 105-115.
- Rivero-Cruz, F., Zhu, M., Kinghorn, A. D., Wu, C. D. (2008). Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytochemistry Letters*, 151 -154.
- Roy, C.K., Kamath, J.V., y Asad, M. (2006). Hepatprotective activity of *Psidium guajava* Linn. *Indian Journal of experimental Biology* 44, 305-311
- Shaheen, H. M., Ali, B. H., Algarawi, A.A., y Bashir, A.K. (2000). Effect of *Psidium guajava* leaves on some aspects of the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research*, 14, 107- 111.
- Simoes Manuel, Richard N. Bennett and Eduardo A.S. Rosa (2008) Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilm
- Vas, G; Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful simple preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 233-254.

- Wu, H., Chou, C., Chang, L., Chen, Z.(2007) GENETIC RELATIONSHIP ESTIMATION OF TAIWAN AVOCADO CULTIVARS BY VOLATILE CONSTITUENTS OF LEAVES. Proceedings VI World Avocado Congress, Department of Horticulture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan
- Xiangjiu He y Rui Hai Liu. (2008). Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem*, 56, 9905-9910.