



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE LOS FLAVONOIDES AVICULARINA Y
GUAJEVERINA A PARTIR DE LA INFUSIÓN DE LAS HOJAS DE
Psidium guajava L.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTAN

KARLA ESPERANZA BARRIENTOS REYES

DIANA JAZMÍN FLORES CUAHUTLE



México, D. F.

2016



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. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
SECRETARIO: Dr. José Fausto Rivero Cruz
1ER. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2DO. SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111, Edificio E. Facultad de Química UNAM

Asesor:

José Fausto Rivero Cruz.

Sustentantes:

BARRIENTOS REYES KARLA ESPERANZA

FLORES CUAHUTLE DIANA JAZMÍN



AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación académica que nos proporcionó.

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

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y al M. en C. José Manuel Méndez Stivalet por la revisión y aportaciones a este trabajo.

A los profesores de la Facultad de Química que permitieron por medio de sus enseñanzas que concluyéramos esta hermosa carrera.



Contenido

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 HISTORIA DE LA GUAYABA.	2
CAPÍTULO II	4
2. ANTECEDENTES	4
2.1 <i>Psidium guajava</i> L.....	4
2.1.1 DESCRIPCIÓN	4
2.1.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA	4
2.1.3 USO TRADICIONAL	4
2.1.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	5
2.1.5 HÁBITAT.....	6
2.1.6 NOMBRES COMUNES	6
2.1.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA	7
2.1.7.1. HOJAS.....	7
2.1.7.2. RAMAS	7
2.1.7.3 FRUTOS	8
2.1.7.4 PIEL DEL FRUTO	8
2.2 CONSTITUYENTES AISLADOS DE <i>Psidium guajava</i> L.	9
2.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS HOJAS DE <i>Psidium guajava</i> L.	18
2.3.1 USO ETNOBOTÁNICO	18
2.3.2 EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y ANALGÉSICO	19
2.3.3 EFECTO HIPOGLUCEMIANTE	19
2.3.4 EFECTO GENOTÓXICO Y MUTAGÉNICO	19
2.3.5 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	19
2.3.6 ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA	20
2.3.7 ACTIVIDAD ANTIDIARREICA	20
2.3.8 EFECTO SEDANTE	20
2.3.9 OTROS EFECTOS REPORTADOS.....	20
CAPÍTULO III	22
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	22
CAPÍTULO IV	26
PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES	26
4.1.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS.....	26
4.1.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES ESPECTRÓSCOPICAS.....	26
4.1.3. ESTUDIO QUÍMICO DE LAS HOJAS DE <i>Psidium guajava</i> L.	26
4.1.3.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	26
4.1.3.2 PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN DE LAS HOJAS DE <i>Psidium guajava</i> L.	26



4.1.3.3 FRACCIONAMIENTO PRIMARIO	27
4.1.3.4 FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO	27
4.1.3.5 FRACCIONAMIENTO Terciario.....	28
4.1.3.6 FRACCIONAMIENTO CUATERNARIO	29
DIAGRAMA 1. FRACCIONAMIENTO DE LA INFUSIÓN DE LAS HOJAS DE <i>Psidium guajava</i> L.	30
<u>CAPÍTULO V</u>	31
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1. ELECCIÓN DE <i>Psidium guajava</i> L.	31
5.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA GUAJEVERINA Y AVICULARINA	31
5.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AVICULARINA A PARTIR DE LA FRACCIÓN C	34
5.4. IDENTIFICACIÓN DEL FLAVONOIDE GUAJEVERINA A PARTIR DE LA FRACCIÓN AA2P	36
<u>CAPÍTULO VI</u>	38
6. CONCLUSIONES.....	38
<u>CAPÍTULO VII</u>	39
7. PERSPECTIVAS	39
<u>CAPÍTULO VIII</u>	40
8. BIBLIOGRAFÍA.....	40
8.1 REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	44



Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Cm	Centímetro
dL	Decilitro
DP-IV	Enzima dipeptidil peptidasa IV
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido semejante al glucagón tipo 1
L	Litro
Mg	Miligramo
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
UV	Ultravioleta

Lista de tablas

Tabla	Nombre	Página
1	Constituyentes aislados de <i>Psidium guajava</i> L.	16
2	Fracciones primarias	34
3	Fracciones secundarias	35
4	Resumen del fraccionamiento terciario	35
5	Resumen del fraccionamiento cuaternario	36



Lista de figuras

Figura	Nombre	Página
1	<i>Psidium guajava</i> L	11
2	Producción de guayaba en México (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA 2006)	13
3	Hojas de <i>Psidium guajava</i> L	14
4	CCF de las particiones de AcOEt, 2-Butanol y acetona revelada con $AlCl_3$	34
5	Estructura del flavonoide avicularina aislado de las hojas de guayaba.	41
6	Placa cromatográfica visualizada bajo luz UV a una longitud de onda de 302 nm y placa cromatográfica revelada con $AlCl_3$ obtenidos para la avicularina.	42
7	Estructura del flavonoide guaijaverina aislado de las hojas de guayaba	43
8	CCF visualizada bajo luz UV a una longitud de onda de 302 nm y placa cromatográfica revelada con $AlCl_3$ obtenidos para guaijaverina	44



CAPÍTULO I

1. Introducción

El hombre ha utilizado productos derivados de la naturaleza desde tiempos inmemorables, no solo para satisfacer su hambre, sino también con la finalidad de sanar enfermedades, cicatrizar sus heridas etc., por lo que la medicina tradicional ha sido parte importante de la cultura de los pueblos. Durante siglos fue el único sistema utilizado en la restauración de la salud de las generaciones pasadas, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para curar enfermedades. La ciencia moderna ha permitido el estudio exhaustivo de algunas de las especies empleadas en la medicina tradicional.

En lo que respecta al uso de plantas con fines curativos, México posee una amplia diversidad en el empleo de plantas medicinales entre sus variadas prácticas curativas tradicionales o populares. Aproximadamente 62 diferentes grupos étnicos viven en México actualmente, cada uno con su propia cultura, dialecto y repertorio de hierbas medicinales (Lozoya et al., 1994).

En México, se estima que existen alrededor de 30,000 especies de plantas y se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas con un potencial terapéutico benéfico, sin embargo sólo el 1% de estas plantas medicinales han sido estudiadas a fondo considerando estas propiedades medicinales potenciales.

El estudio de la flora medicinal autóctona de México adquirió renovado interés entre los grupos nacionales de investigación biomédica durante la segunda mitad del siglo XX. A la histórica tradición popular de usar remedios basados en plantas medicinales para aliviar los padecimientos más comunes se unió la convocatoria que hizo la OMS en los años 70 a los gobiernos de los países en vías de industrialización, de promover y desarrollar las Medicinas Indígenas Tradicionales y sus recursos curativos, como parte de una estrategia que les permitirá alcanzar mejores niveles de sanidad pública.



Las plantas medicinales son un elemento importante de los sistemas médicos indígenas en México (Lara et al., 1996). El uso popular de la guayaba se ha documentado en los grupos indígenas mexicanos como: mayas, náhuatl y zapotecos. *Psidium guajava* L. se considera una especie nativa de México (Gutierrez et al., 2008). Su uso medicinal ha sido reportado en sistemas indígenas medicinales en América principalmente.

1.1 Historia de la guayaba.

En México, las hojas de *Psidium guajava* L. se usan con fines medicinales desde épocas muy remotas, su presencia es constante en todas las fuentes históricas sobre la herbolaria indígena a lo largo de quinientos años. Entre los antiguos mexicanos esta planta recibió el nombre náhuatl de *xalxócotl* haciendo referencia al fruto que es “de cascara dura (*xócotl*) y arenoso (*xalli*)” dado su abundante contenido en pequeñas semillas, que parecen arenilla. El nombre “guayaba” es de origen caribeño y aunque no se conoce su etimología, es la que prevaleció para referirse al fruto, que es muy conocido por su aroma y agradable sabor acidulado. Actualmente, la planta se distribuye en toda la franja tropical del mundo teniendo uso medicinal en lugares tan apartados geográficamente como China, India, Filipinas y África Central; en México y en otros países iberoamericanos, el principal uso medicinal que se hace de sus hojas es como remedio tradicional antidiarreico, así como para aliviar otros padecimientos gastrointestinales (Rivera et al., 2003).

De acuerdo con los libros antiguos de herbolaria mexicana, entre los siglos XVI al XVIII, a la infusión elaborada con las hojas del guayabo se le atribuyen principalmente, propiedades antidiarreicas, pero también se usó para curar úlceras e infecciones de la piel mediante emplastos y lavados. No obstante su difundida utilidad medicinal no se incorporó como remedio formal de la medicina, sino que prevaleció como recurso popular típico de la sociedad rural novohispana (Rivera et al., 2003). En el siglo XIX se continuó el uso de las hojas del guayabo como remedio herbolario para aliviar trastornos gastrointestinales, pero su estudio no se abordó sino hasta el siglo XX en que se



realizaron las primeras investigaciones científicas, tanto en México como en otros países (Rivera et al., 2003).

La referencia más antigua se encuentra en la obra de Martín de la Cruz del siglo XVI donde se menciona como antidisentérica y antitérmica. Francisco Hernández, señala que "las hojas son ácidas, astringentes y muy olorosas; curan la sarna y suelen emplearse en lavatorios. El cocimiento de la corteza alivia las piernas hinchadas y cura las úlceras fistulosas". El Códice Florentino relata su uso para "estancar las cámaras (diarreas) y para curar gran número de enfermedades particularmente las de los ojos". Nicolás Monardes, en el mismo siglo comenta en su obra que "es una planta que laxa el vientre, cura las piernas hinchadas, así como para el vaso opilado". Casi a finales del siglo XVII, Gregorio López repite la información de Monardes diciendo, "es usada para piernas hinchadas, el bazo opilado, para las encías descarnadas y dientes" (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Ricardo Ossado en el Libro del Judío a mediados siglo XVIII informa que es usada para la hinchazón de los pies, cura las diarreas en los niños y sirve para baños a las mujeres paridas. A mediados del siglo XIX, Francisco Flores la refiere para los tumores de las piernas y cuando una úlcera se hace fístula. A finales del mismo siglo, Eleuterio González menciona que "es una planta muy astringente, las hojas son nervinas, antiespasmódicas, vulnerarias y para diarreas crónicas" (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En el siglo XX, Paul Stanley la refiere para la diarrea, para la comezón, como astringente, se aplica a las úlceras y tomada internamente sirve para dolores o molestias estomacales. Maximino Martínez, la consigna como antidiarreica, antiespasmódica, antiinflamatoria, antiparasitaria, astringente, aumenta el calor del estómago, eupéptica, llagas, resolutivo y vulnerario. Narciso Souza, indica que como astringente es usado en las diarreas; en emplastos en las úlceras y en micosis. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México informa su uso como antiparasitario (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).



CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

2.1 *Psidium guajava* L.

2.1.1 Descripción

Es un árbol perenne de 5 a 10 m de altura, de tronco grisáceo-café con la corteza lisa, escamosa de color rojizo polidérmica. Las ramas son cuadrangulares de color pardo-verdoso con hojas de forma desde elíptica a oblonga, de 4 a 12 cm de longitud y de 3 a 5 cm de ancho; son opuestas con el pecíolo corto y sus márgenes son enteros de color verde-grisáceo por el haz y verde claro por el envés en donde se observa su prominente venación con 12 a 16 nervios laterales de cada lado. Posee pedúnculos axilares, pubescentes con 1 a 3 flores pubescentes. Las flores forman cimas o son solitarias, con pétalos de 2 a 3 cm de longitud, de color blanco en número de 5, perfumadas, de cáliz verdoso, numerosos estambres en forma de filamentos blancos y con anteras amarillas. El fruto es globuloso, de color amarillo, cremoso, con numerosas semillas duras y pequeñas, de color rosado-amarillento. El fruto alcanza un diámetro de 4 hasta 10 cm (Rivera et al., 2003).

2.1.2 Clasificación botánica

Nombre científico: *Psidium guajava* L.

Género: *Psidium*

Especie: *guajava*

Descriptor: Linneo (L.)

Familia: Mirtaceae



Figura 1. *Psidium guajava* L.
(Foto: Flores Cuahutle Diana J., 2016).

2.1.3 Uso tradicional

La guayaba es una especie vegetal de gran relevancia a nivel mundial. Se cree que es nativa de México, es una de las 50 especies más conocida y consumida a nivel mundial. Se usa en el tratamiento de más de 40 padecimientos que afectan la salud de los



mexicanos en diferentes áreas del país (Marquina et al., 2008). Se utiliza en diversas partes del mundo con fines terapéuticos, principalmente por sus propiedades antiespasmódica y antimicrobiana en el tratamiento de la diarrea y disentería, así como agente hipoglicémico (INI, 1994; Gutierrez et al., 2008). Estudios farmacológicos han descrito actividad antioxidante, hepatoprotectivas, antimicrobianas, antiespasmódicas, antígenotóxicas, antitusivas, antidiabéticas y antiinflamatorias, por lo que sugieren un amplio rango de aplicaciones clínicas para el tratamiento infantil de diarrea, diabetes, enteritis rotaviral, hipertensión, caries, heridas, dolor, disminución de la fiebre (Gutierrez et al., 2008).

Comúnmente las raíces, cortezas, hojas y frutos inmaduros, se utilizan en el tratamiento de gastroenteritis, diarrea y disentería. Las hojas se aplican sobre las heridas para atenuar el dolor reumático y masticadas alivian el dolor de dientes, ya que poseen un débil efecto sedante (Gutierrez et al., 2008). La infusión de hojas se utiliza para reducir los niveles de azúcar en diabéticos. En enfermedades con fiebre alta y continua se recomienda beber el té de guayaba (INI, 1994).

Debido a su tendencia comercial y utilidad terapéutica, grupos de investigación han estudiado su anatomía, morfología, composición química, efecto farmacéutico y se han realizado estudios biotecnológicos y de biología molecular. Los análisis realizados de la anatomía y morfológica, describen las características macro y microscópicas de la hoja de guayaba con la finalidad de obtener un parámetro de control de calidad que permita identificar al fármaco vegetal para ser utilizado con fines terapéuticos (Rivera et al., 2003).

2.1.4 Distribución geográfica

La guayaba se encuentra ampliamente distribuida en el Centro y Sur de América, Europa, África y Asia con base en la evidencia arqueológica. Crece en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, se adapta a diferentes condiciones climáticas, pero prefiere los climas secos (Rivera et al., 2003). México es el segundo país productor de guayaba, solo por detrás de la India y se encuentra entre los



principales exportadores mundiales. Los estados que producen mayor cantidad de este fruto son Aguascalientes, Michoacán, Zacatecas, Jalisco, Querétaro, Guanajuato, Guerrero, Nayarit, Colima y Tabasco (**Figura 2**) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA.

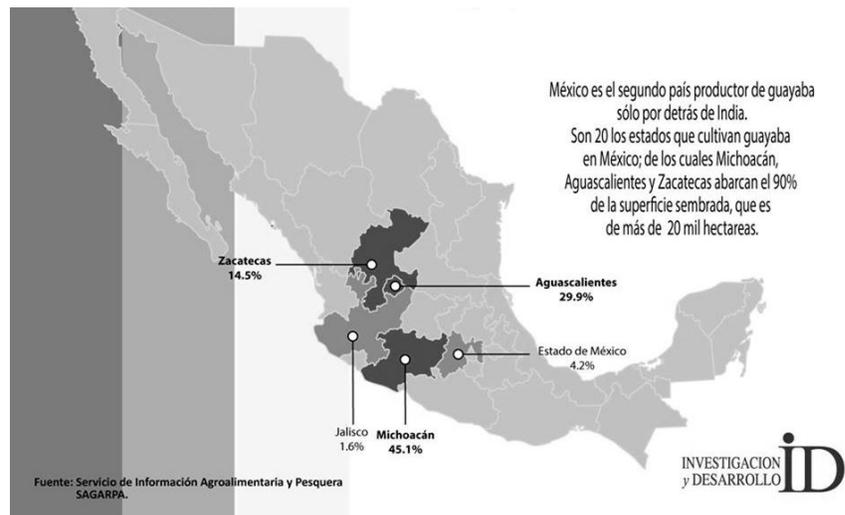


Figura 2. Producción de guayaba en México (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA, 2008).

2.1.5 Hábitat

El árbol puede encontrarse silvestre o cultivado en tipos de vegetación que van desde áreas cultivadas pasando por bosques de encino, bosques de pino-encino, hasta la selva alta perennifolia. Los suelos donde se desarrolla esta especie son principalmente poco drenados y calizos en altitudes que van de 850 a 1700 m (Rivera et al., 2003).

2.1.6 Nombres comunes

La guayaba es conocida con diferentes nombres, según el lugar geográfico en donde se encuentre, por ejemplo: Asihuit (México, totonaca), banziro (Brasil, portugués), bui (México, zapoteca), dijamboe (Brasil), enandi (México, purhé), guava (Belice, inglés), guayaba (Colombia, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, español), guaibasin (México, maya), pata (México, tzotzil), pehui



(México, zapoteca), pichi (Guatemala, México; maya) pox (México, mixe), vayevavxite (México, huichol), xalxócotl (México, náhuatl) (Rivera et al., 2003).

2.1.7 Composición química

2.1.7.1. Hojas

Las hojas de la guayaba (**Figura 3**) están compuestas principalmente por compuestos volátiles, tales como el α -pineno, β -pineno, limoneno, mentol, alcohol isopropílico, 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, guajaverina), triterpenos (ácido asiático, ácido oleanólico, uvaol, ácido goreisico, guajavólido), triterpenos glicosilados y esteroides (β -sitosterol) (Arima et al., 2002)



Figura 3. Hojas de *Psidium guajava* L.
(Foto: Barrientos Reyes Karla E., 2016)

2.1.7.2. Ramas

Contienen calcio (0.30-1.00%), magnesio (0.06 hasta 0.30%), fósforo (0.10 hasta 0.38%), potasio (0.21-0.39%), y sodio (0.03 hasta 0.20%). La concentración de fluoruro varía de 0.02 ppm a 0.11 ppm, de cobre (0.02 a 0.14 ppm), hierro (2.86 a 5.14 ppm), zinc (0.31 a 0.57 ppm), manganeso (0.00 a 0.26 ppm) y plomo (0.11 ppm) (Okwu et al., 2003).



2.1.7.3 Frutos

Las guayabas se caracterizan por su bajo contenido de carbohidratos (13.2%), grasas (0.53%), proteínas (0.88%) y por un alto contenido de agua (84.9%). El valor alimenticio por cada 100 gramos es: calorías (36-50 kcal), humedad (77-86 g), fibra (2.8-5.5 g), calcio (9.1-17 mg), fósforo (17.83 mg), hierro (0.30-0.04 mg), niacina (0.6-1.068 mg), ácido ascórbico (100 mg), vitamina B3 (40 I.U); el manganeso se encuentra presente también en la planta en combinación con los ácidos: fosfórico, oxálico y málico. (Gutiérrez et al., 2008).

Durante cuatro etapas diferentes de maduración han sido estudiados los frutos de guayaba observando los cambios en su composición química y sus actividades enzimáticas. Los resultados obtenidos muestran un decremento en el contenido de clorofila y un incremento en el contenido de carotenoides durante la maduración. El contenido de almidón disminuye y se observa un incremento concomitante de azúcares solubles en alcohol. Es importante mencionar que los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina también disminuyen durante la maduración (Jain et al., 2003).

2.1.7.4 Piel del fruto

La piel del fruto presenta como principal constituyente ácido ascórbico. El proceso de enlatado o alguno en el que se utilice calor, destruye aproximadamente 50% de ácido ascórbico (Gutierrez et al., 2008).



2.2 Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L.

Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L.

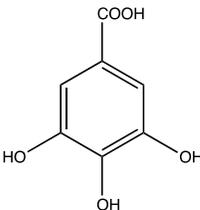
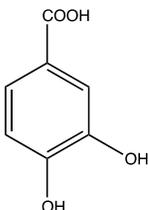
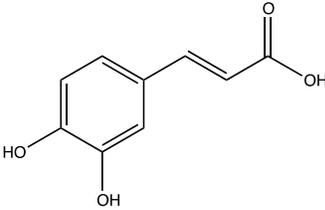
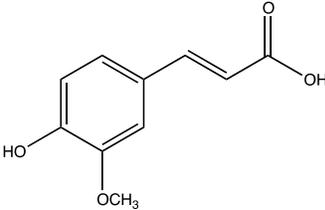
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Ácido gálico		Hoja y raíces	(Okuda et al., 1987)
Ácido protocatequico		Hoja y fruto	(Okuda et al., 1987)
Ácido cafeico		Hoja	(Liang et al., 2005)
Ácido ferúlico		Hoja	(Zhu et al., 2013)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L. (continuación)

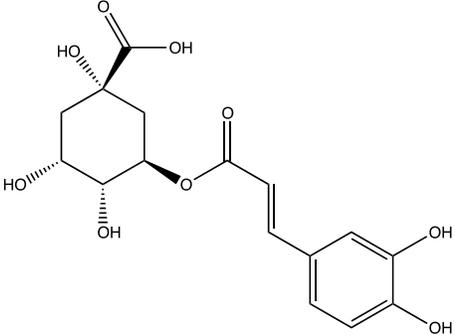
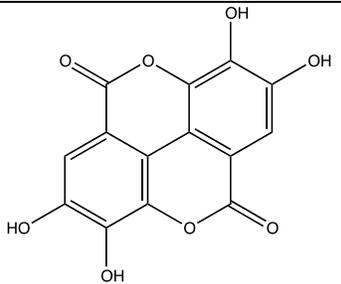
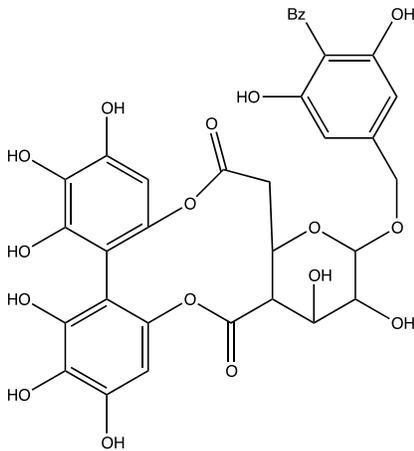
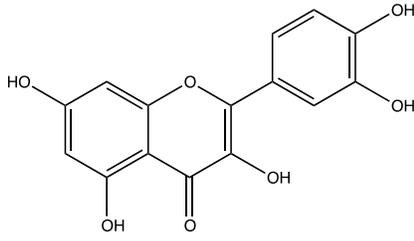
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Ácido clorogénico		Hoja	(Liang et al., 2005)
Ácido elálgico		Hoja, raíces y corteza	(Trivedi and Misra, 1984)
Guavina B		Hoja y fruto	(Okuda et al., 1987)
Flavonoides aislados de <i>Psidium guajava</i> L.			
Quercetina		Hoja de las flores y fruto	(Liang et al., 2005)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L. (continuación)

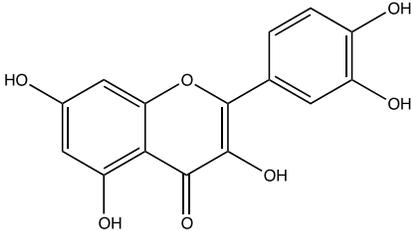
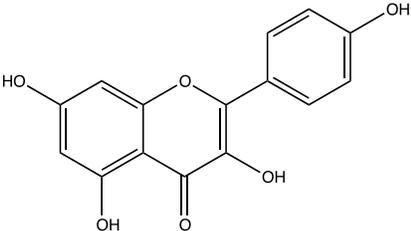
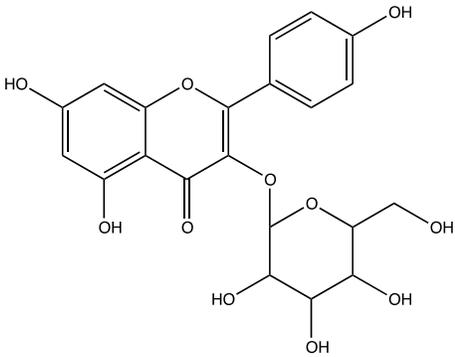
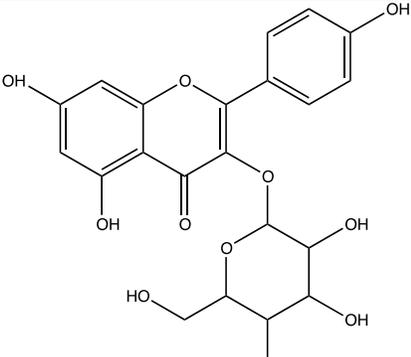
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Leucocianidina		Hoja, flores y frutos.	(Liang et al., 2005)
Kaempferol		Hoja de las flores y fruto	(Liang et al., 2005)
Quercetina-3-β-galactósido		Hoja y fruto	(Liang et al., 2005)
Kaempferol-3-glucósido		Hoja de la flor y fruto	(Liang et al., 2005)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L. (continuación)

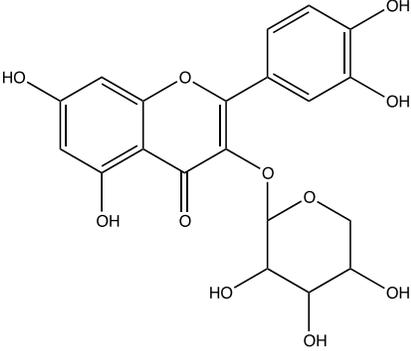
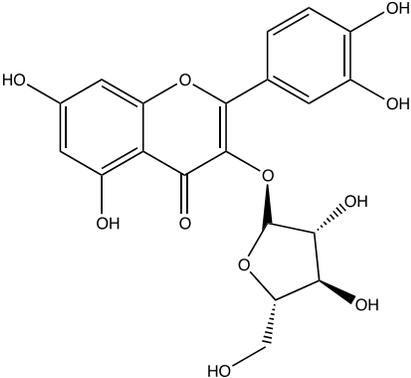
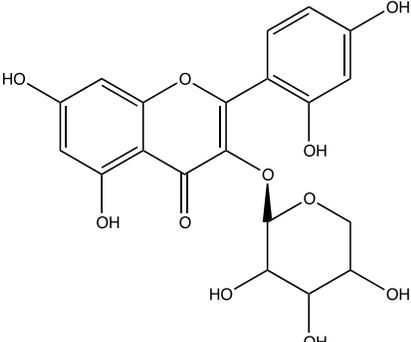
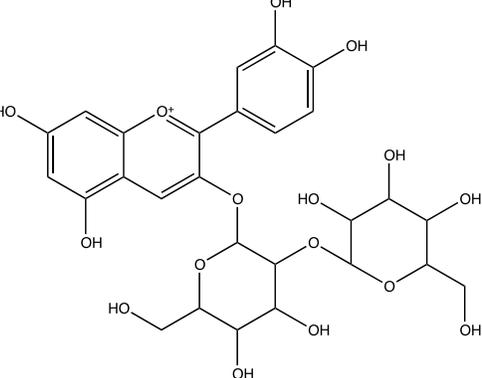
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Guajaverina		Hoja y fruto	(Prabu et al., 2006)
Avicularina		Hojas y fruto	(Arima and Danno, 2002b)
Morin-3-O- α -L-arabinopiranosido		Hoja y fruto	(Arima and Danno, 2002a)
Mecocianina		Hoja y fruto	(Liang et al., 2005)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L. (continuación)

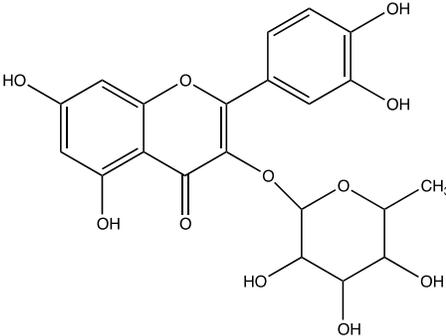
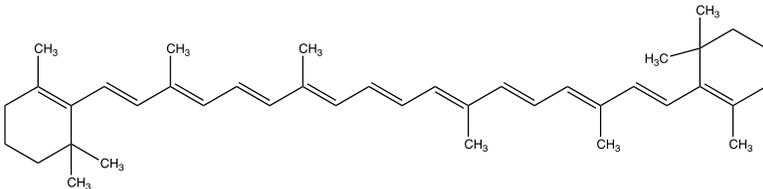
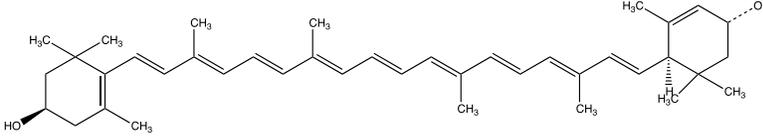
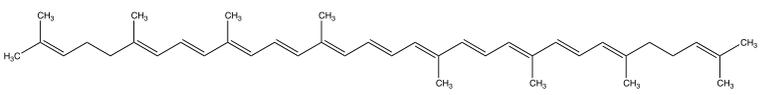
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Carotenoides aislados de <i>Psidium guajava</i> L.			
Quercitrina		Hojas y frutos	(Liang et al., 2005)
β -Caroteno		Hojas y fruto	(Mercadante et al., 1999)
Luteína		Hojas y fruto	(Mercadante et al., 1999)
Licopeno		Hojas y fruto	(Mercadante et al., 1999)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L. (continuación)

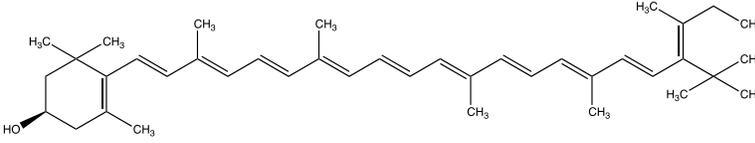
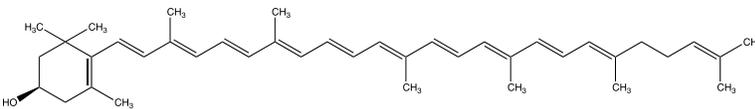
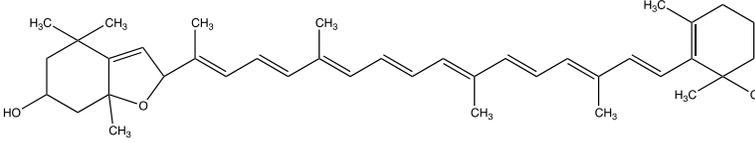
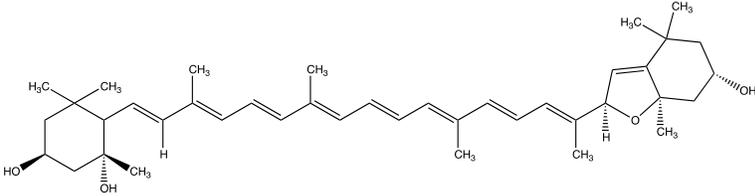
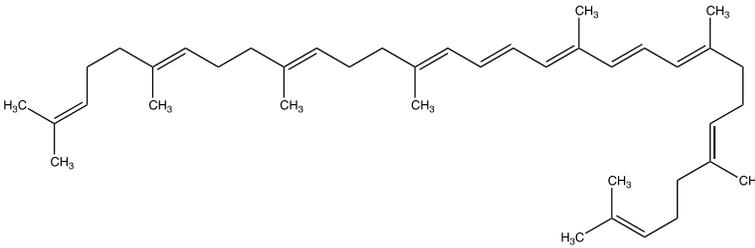
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
β-criptoxantina		Hojas y fruto	(Mercadante et al., 1999)
Rubixantina		Hojas y fruto	(Mercadante et al., 1999)
Criptoflavina		Hojas y fruto	(Mercadante et al., 1999)
Neocromo		Hojas y fruto	(Mercadante et al., 1999)
Fitoflueno		Hojas y fruto	(Mercadante et al., 1999)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L. (continuación)

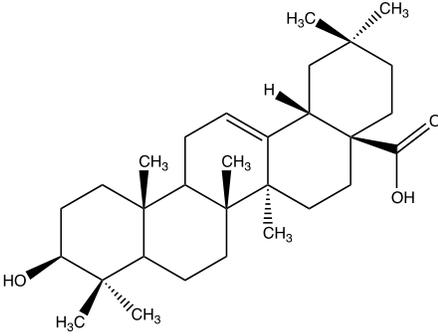
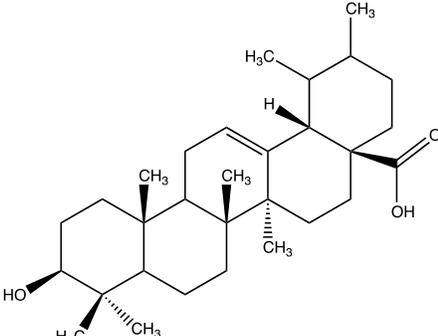
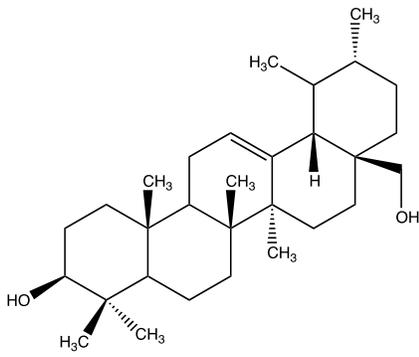
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Triterpenos aislados de <i>Psidium guajava</i> L.			
Ácido oleanólico		Hojas y fruto	(Begum et al., 2002)
Ácido ursólico		Hojas y fruto	(Begum et al., 2002)
Uvaol		Hojas y fruto	(Begum et al., 2004)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L.(continuación)

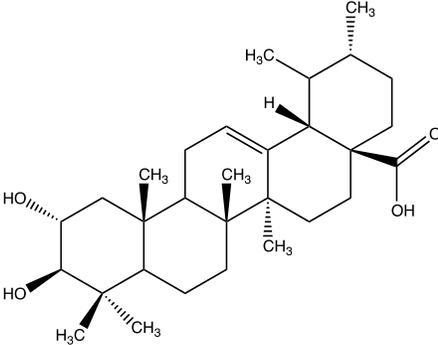
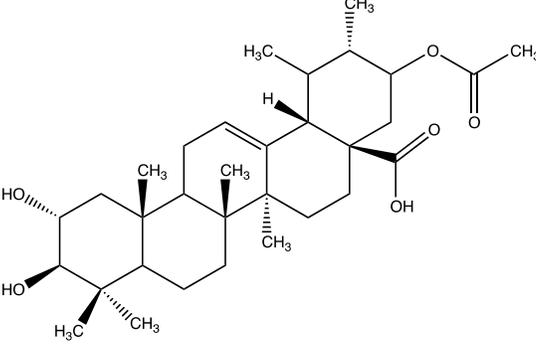
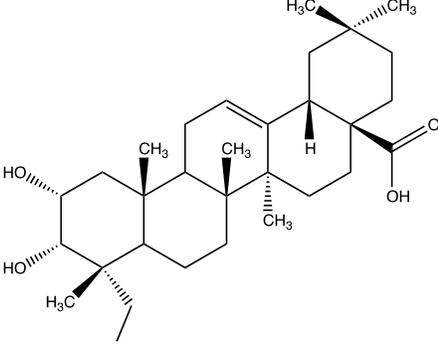
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Ácido -2- α -hidroxiursólico	 <p>The structure shows a pentacyclic ursane skeleton. It features a carboxylic acid group at C-13, a hydroxyl group at C-13, and another hydroxyl group at C-14. Methyl groups are attached at C-2, C-19, C-20, C-21, C-22, and C-23. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	Hojas y fruto	(Begum et al., 2002)
Ácido guavanoico	 <p>The structure is similar to ursolic acid but includes an acetate ester group at C-15. It has hydroxyl groups at C-13 and C-14, and methyl groups at C-2, C-19, C-20, C-21, C-22, and C-23.</p>	Hojas y fruto	(Begum et al., 2004)
Ácido arjunólico	 <p>The structure is similar to ursolic acid but has a hydroxymethyl group at C-2 instead of a methyl group. It has hydroxyl groups at C-13 and C-14, and methyl groups at C-19, C-20, C-21, C-22, and C-23.</p>	Semillas	(Salib and Michael, 2004)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L. (continuación)

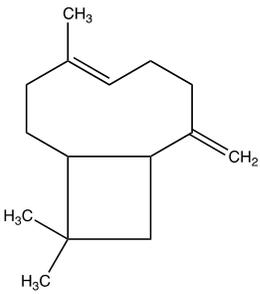
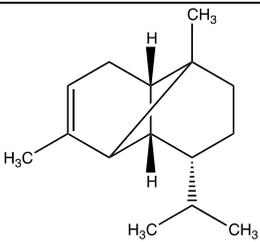
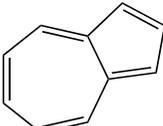
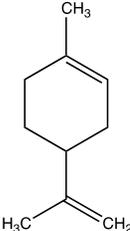
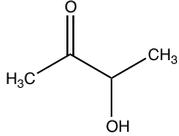
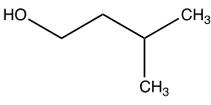
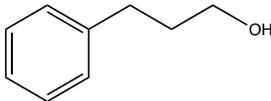
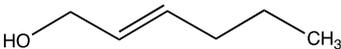
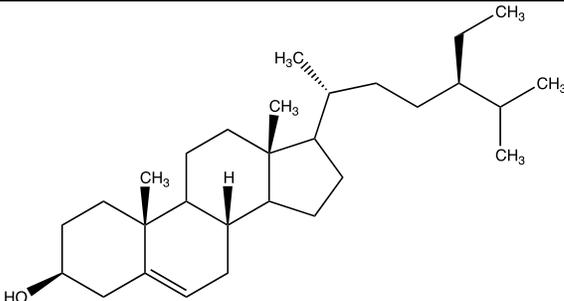
Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
Constituyentes del aceite esencial de <i>Psidium guajava</i> L.			
β -cariofileno		Fruto	(Li et al., 1999)
Copaeno		Fruto	(Li et al., 1999)
Azuleno		Hojas	(Li et al., 1999)
Limoneno		Hojas	(Li et al., 1999)
3-hidroxi-2-butanona		Fruto	(Kenneth et al., 1970)
3-metil-1-butanol		Fruto	(Kenneth et al., 1970)



Tabla 1. Constituyentes aislados de *Psidium guajava* L. (Continuación)

Nombre	Estructura	Localización en la planta	Referencia
3-fenilpropanol		Fruto	(Kenneth et al., 1970)
2- (E) - 1-hexanol		Fruto	(Jordan et al., 2003)
Esterol aislado de <i>Psidium guajava</i>			
β -Sitosterol		Hojas y fruto	(Begum et al., 2002)

2.3 Actividad biológica de las hojas de *Psidium guajava* L.

La infusión de las hojas de guayaba se utiliza tradicionalmente para tratamientos gastrointestinales como la diarrea (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.3.1 Uso etnobotánico

El uso etnobotánico de esta planta es amplio (Roig, 1988). Por su astringencia, las hojas se utilizan en enfermedades de la piel, en diarreas y para otras dolencias de estómago. Se ha utilizado como hemostática y antiséptica. Otros reportes indican acción antimicrobiana, cicatrizante, hipoglucémica y espasmolítica (Rodríguez et al., 2013). Se reporta también actividad antioxidante, hepatoprotectora, antialérgica, genotóxica citotóxica, cardiotónica, antiinflamatoria y otras (Gutiérrez et al., 2008).



2.3.2 Efecto antiinflamatorio y analgésico

El extracto acuoso de las hojas, en dosis de 50-800 mg/kg, vía intraperitoneal, produce un efecto antiinflamatorio en ratas *Wistar* y analgésico en ratones *Balb/c*, ambos efectos son dosis dependiente (Ojewole, 2006). Se reporta actividad antiinflamatoria, en el modelo de inflamación aguda inducido por carragenina en ratas *Wistar* (Dutta y Das, 2010).

2.3.3 Efecto hipoglucemiante

El extracto acuoso de las hojas en dosis de 50-800 mg/kg, vía oral en ratas y ratones, tiene efecto hipoglucemiante e hipotensor y el extracto etanólico produce efecto antihiperoglucemiante, frente a un modelo de diabetes tipo-2 en ratas *Sprague Dawley* (Ojewole, 2005).

2.3.4 Efecto genotóxico y mutagénico

Se ha evaluado en varios modelos la actividad genotóxica de extractos de las hojas de guayaba. No se observó actividad genotóxica (Betancourt et al., 2000). Se estudió el efecto mutagénico en dos modelos experimentales diferentes, en ambos el efecto mutagénico estuvo ausente. Estos resultados avalan la inocuidad de esta planta, ampliamente utilizada en la medicina tradicional (Martínez et al., 2001).

2.3.5 Actividad antibacteriana

Se aislaron flavonoides de la hoja de guayaba con actividad antimicrobiana a *Salmonella enteritidis* y *Bacillus cereus* (Arima y Danno, 2002a). Se realizó un estudio de comparación de los extractos acuosos, etanólicos y con acetona de las hojas, frente a veinte cepas de bacterias de interés clínico, el extracto acuoso mostró actividad en el 35% de los casos, el etanólico en un 65% y con acetona en el 100% de los casos (Rattanachaiakunsopon y Phumkhachorn, 2010).



2.3.6 Actividad hepatoprotectora

En 2011 se reportó efecto hepatoprotector de los extractos acuosos de las hojas de guayaba, frente a un modelo de intoxicación con CCl_4 , en dosis de 200mg/kg, en ratas *Sprague Dawley* (Adeyemi y Akanji, 2011).

2.3.7 Actividad antidiarreica

Se señala que la sustancia activa del extracto de hojas es la quercetina. Se ha verificado el efecto espasmolítico que produce. Se ha reportado un efecto dosis dependiente en el rango de 50 a 400 mg/kg (oral) con una disminución de la motilidad intestinal y retardo en el vaciado gástrico (Ojewole et al., 2008). El extracto acuoso de las hojas, disminuye la producción de toxinas lábiles de *E. coli* y del cólera (Birdi, 2010). Un ensayo clínico realizado concluyó que la tintura al 20% de hoja de *Psidium guajava* L. tiene efecto antidiarreico importante; en otro, que evaluó el polvo de las hojas secas, también se comprobó este efecto (Lozoya Legorreta et al., 2006).

2.3.8 Efecto sedante

En 1988 Lutterodt y Maleque reportaron que al administrar intraperitonealmente extracto metanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. a ratones de laboratorio, disminuía la actividad motora de éstos, lo que llevó a estos autores a calificar tal efecto como sedante. En 1996 en México se estudió el extracto hexánico, por ser rico en compuestos grasos no solubles en agua, del cual aislaron dos sesquiterpenos con propiedades depresoras del sistema nervioso central (Meckes et al., 1996).

2.3.9 Otros efectos reportados

En un estudio se identificó un efecto inotrópico negativo (relajación del músculo cardiaco) producido por un extracto acuoso-etanólico de la hoja de guayaba en un modelo *in vitro* del atrio izquierdo de cobayo estimulado eléctricamente para su contracción (Conde et al., 2003). Con respecto a los estudios biotecnológicos de *Psidium guajava* L. se han empleado técnicas biotecnológicas para la micropropagación y cultivo



de plántulas provenientes de callos generados a partir de tejido frutal (Madhavi et al., 1992).

El extracto acuoso de las hojas en dosis de 400 mg/dL, tiene efecto estabilizador de la membrana eritrocítica *in vitro*. Se reporta además, que mejora los niveles de triglicéridos y colesterol en modelos de ratones en tejido hepático, mejorando el balance del perfil lipídico (Deguchi y Miyazaki, 2010).



CAPÍTULO III

3. Justificación y objetivos

En la actualidad alrededor del 80% de la población mundial depende del uso de plantas medicinales como una opción terapéutica en varios padecimientos. El considerable incremento en el interés público por el uso de plantas medicinales, en la década pasada, ha estimulado la investigación científica para determinar su verdadero potencial como agentes medicinales modernos en los sistemas de salud. Organizaciones nacionales e internacionales como la Farmacopea Herbolaria Americana (AHP), la Farmacopea Europea (EP), la Cooperativa Científica Europea en Fitoterapia (ESCOP), la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP) y la Organización Mundial de la Salud (WHO), se encuentran desarrollando especificaciones para asegurar que las preparaciones herbolarias estén sujetas a revisiones científicas exhaustivas.

Para asegurar su identidad, pureza, calidad, consistencia y reproducibilidad se requiere de una caracterización completa de la droga cruda y del producto herbolario y medicinal. Sin este grado de conocimiento, los hallazgos encontrados en cualquier estudio clínico no podrían ser reproducibles. Análisis microscópicos, macroscópicos, métodos químicos y moleculares así como descripción botánica de la planta son las metodologías que se aplican a los materiales vegetales. Cada metodología de ensayo tiene sus ventajas y desventajas, y su aplicación dependerá del aspecto de calidad a evaluar y del tipo de vegetal. Un aspecto clave en la selección del ensayo apropiado es la selectividad del método.

Asegurar la calidad de los productos vegetales es un proceso difícil ya que la presencia de un marcador o un grupo de marcadores depende de las condiciones de la cosecha, del crecimiento y de la aplicación de las buenas prácticas de manufactura (GMP) en la elaboración del producto final, entre otras consideraciones. Los criterios de calidad para estos productos generalmente se encuentran publicados en monografías farmacopeicas.



De manera general los criterios se dividen en ensayos de identidad, pureza y valoración cuantitativa de constituyentes químicos.

En contraste con la medicina alopática, muchos países regulan las plantas medicinales como “medicina tradicional” aplicando los criterios de aprobación menos estrictos. Esta aprobación se basa en el record histórico de seguridad y eficacia de la especie en las prácticas médicas populares. Económicamente hablando, los costos de aprobación de un medicamento herbolario son menores que los de los medicamentos convencionales. Desde una perspectiva técnica los medicamentos alopáticos son preparaciones con fármacos cuya composición, farmacocinética, farmacología, dosis, seguridad, calidad y eficacia se encuentran bien caracterizados. Por el contrario, para los productos herbolarios esta información es poco conocida o no existe. Aún más cuando múltiples especies de plantas son empleadas en un mismo preparado, la variabilidad inherente de las drogas crudas solo puede controlarse parcialmente durante el proceso de manufactura.

Caracterizar físicamente a una planta es uno de los medios más eficientes para determinar su identidad y calidad relativa. Si esta determinación se acopla a una técnica de caracterización química, las dos metodologías, permiten la identificación completa de una planta. Sin embargo esta estrategia es inapropiada para evaluar material que ha sido extraído o pulverizado; en este caso, únicamente puede documentarse un análisis organoléptico que no sería concluyente para análisis de calidad. Para fines comerciales, además de la identificación del género especie y subespecie, el personal debe conocer aspectos como la época de colecta, la edad de la planta o procesos particulares inherentes a cada especie. La falta de una identificación botánica apropiada propicia adulteraciones con especies que pueden ser tóxicas. Parte importante después de la cosecha es el manejo pos-cosecha, este proceso puede incluir lavado, secado y almacenamiento. El almacenamiento es el punto más crítico para asegurar la calidad de la planta, evitando el deterioro y la contaminación.



La valoración química es una de las técnicas más importantes para determinar la concentración en límites estrechos, de un grupo particular de constituyentes; también es de utilidad para establecer la identidad de la especie y para detectar adulterantes. Actualmente las técnicas analíticas permiten diferenciar con base en la identificación de un conjunto de compuestos, especies estrechamente relacionadas y partes de una misma planta. El análisis químico es especialmente útil cuando se conocen los compuestos activos o cuando se pretende estandarizar un preparado herbolario a un compuesto en particular con propósitos de control de calidad. Dicho análisis también puede aplicarse para determinar el tiempo óptimo de cosecha, el tiempo de secado, las condiciones del proceso de extracción, la estabilidad y la consistencia lote a lote de un producto.

Cabe destacar que el análisis químico aislado sin la adecuada caracterización botánica carece de valor para determinar la identidad inequívoca de una planta. Especies estrechamente relacionadas o diferentes partes de una planta comparten similitud en los perfiles químicos. Aún más, los perfiles químicos pueden alterarse adicionando compuestos puros que incrementen el rendimiento de un constituyente o un grupo particular de metabolitos.

Las técnicas espectrofotométricas y cromatográficas representan los métodos primarios de análisis para identificar y cuantificar sustancias específicas en matrices herbolarias. La desventaja de emplear métodos espectrofotométricos reside en su falta de especificidad ya que se emplea con frecuencia en el análisis de grupos de constituyentes como los proantocianidinas o hipericinas.

Los métodos de análisis cuantitativos son de particular interés para cuantificar compuestos marcadores (activos o analíticos). La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y la cromatografía de gases (GC) son poderosas herramientas de análisis para determinar concentraciones exactas de compuestos y asegurar la consistencia de un producto.



En la actualidad existen numerosas presentaciones que contienen el extracto de guayaba sin embargo, no existen estándares comerciales que contengan avicularina y guaijaverina para realizar análisis de calidad, por tal razón se decidió aislar estos flavonoides.

El objetivo primordial del presente trabajo consiste aislar y purificar los flavonoides avicularina y guaijaverina a partir de la infusión de las hojas de guayaba. Para el cumplimiento del objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos:

- ✓ Obtener el material vegetal y autentificarlo.
- ✓ Preparar una infusión mediante un proceso de maceración empleando agua como disolvente de extracción.
- ✓ Fraccionar la infusión del material vegetal mediante métodos de partición y cromatográficos (CC, CCF).
- ✓ Aislar y purificar los flavonoides avicularina y guaijaverina de la infusión de las hojas de *Psidium guajava* L. utilizando métodos cromatográficos.
- ✓ Caracterizar los compuestos aislados mediante métodos espectroscópicos.



CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

4.1.1 Análisis cromatográficos

Se realizaron análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítico de acuerdo a las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas CCF de diversas dimensiones, las cuales están recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz UV a λ (254 nm, 302 nm y 365 nm). Se eluyeron con una fase móvil de AcOEt- MeOH- H₂O (100:13.5:10). Se realizó este procedimiento en cada etapa requerida.

4.1.2 Determinación de las constantes espectroscópicas.

La determinación de las constantes espectroscópicas, se realizaron en el laboratorio 111 del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

4.1.3. Estudio químico de las hojas de *Psidium guajava* L.

4.1.3.1 Obtención del material vegetal

Las hojas de guayaba fueron compradas en el Mercado de Sonora México D.F., e identificadas por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM en 2015.

4.1.3.2 Preparación de la infusión de las hojas de *Psidium guajava* L.

Se molieron 3.0 kilogramos de hojas frescas de guayaba para realizar una infusión con 4.0 litros de agua, se dejó macerar durante 20 horas, posteriormente se filtró.



4.1.3.3 Fraccionamiento primario

El agua recuperada de la infusión se sometió a un proceso de partición con AcOEt, 2-Butanol y acetona. Las cantidades obtenidas se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Fracciones primarias

Partición	Peso (gramos)
Partición con AcOEt (F-I)	11.7 g
Partición con 2-Butanol (F-II)	9.7 g
Partición con acetona (F-III)	9.3 g

4.1.3.4 Fraccionamiento secundario

Se seleccionó la partición de AcOEt (F-I) debido a que se observó presencia de fenoles al realizarse la cromatoplaqa correspondiente y revelarse con AlCl_3 (**Figura 4**).



Figura 4. CCF de las particiones de AcOEt (1), 2-Butanol (2) y acetona (3) revelada con AlCl_3



A la partición mencionada se le adicionó 40.0 mL de MeOH y 20.0 mL de CH₂Cl₂. Después se separó el sobrenadante (**F-Is**) (7.5 g) del precipitado (**F-Ip**) (4.2 g). El sobrenadante obtenido dio una reacción positiva en presencia de Reactivo de Folin-Ciocalteu. Posteriormente el sobrenadante (F-Is) se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando una columna de Sephadex LH-20, utilizando como eluyente metanol. Este proceso generó 14 fracciones (F1-F14) de 50 mL cada una. Se juntaron en base a su similitud cromatográfica las fracciones F6-F7 y las fracciones F8-F9 obteniéndose así 2 conjuntos de fracciones secundarias (A y B). En la **Tabla 3** se muestran los pesos obtenidos para cada una de las fracciones secundarias.

Tabla 3. Fracciones secundarias

Fracción	Peso (g)
A	520.5 mg
B	483.6 mg

4.1.3.5 Fraccionamiento terciario

La fracción A fue sometida a un fraccionamiento en columna de Sephadex LH-20, utilizando MeOH como eluyente. De este proceso se obtuvieron 13 fracciones (A1-A13), las cuales se reunieron en base a su similitud cromatográfica, formándose 4 grupos de fracciones (AA1-AA4) como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resumen del fraccionamiento terciario

Eluyente	Fracciones reunidas	Clave
MeOH	A1-A6	AA1
	A7	AA2
	A8-A10	AA3
	A11-A13	AA4



A la fracción AA2 se le adicionó metanol y se separó el precipitado (**AA2p**) del sobrenadante (AA2s).

La fracción B fue sometida a un fraccionamiento utilizando una columna abierta de gel de sílice Kieselgel 60 Merck con tamaño de partícula (0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM) y como fase móvil se utilizó AcOEt:MeOH en gradiente de polaridad, de donde se obtuvieron 6 fracciones (B1-B6). De acuerdo a su similitud cromatográfica se juntaron las fracciones (B2, B4, B5 y B6), a la nueva fracción se le denominó **Fracción C**.

4.1.3.6 Fraccionamiento cuaternario

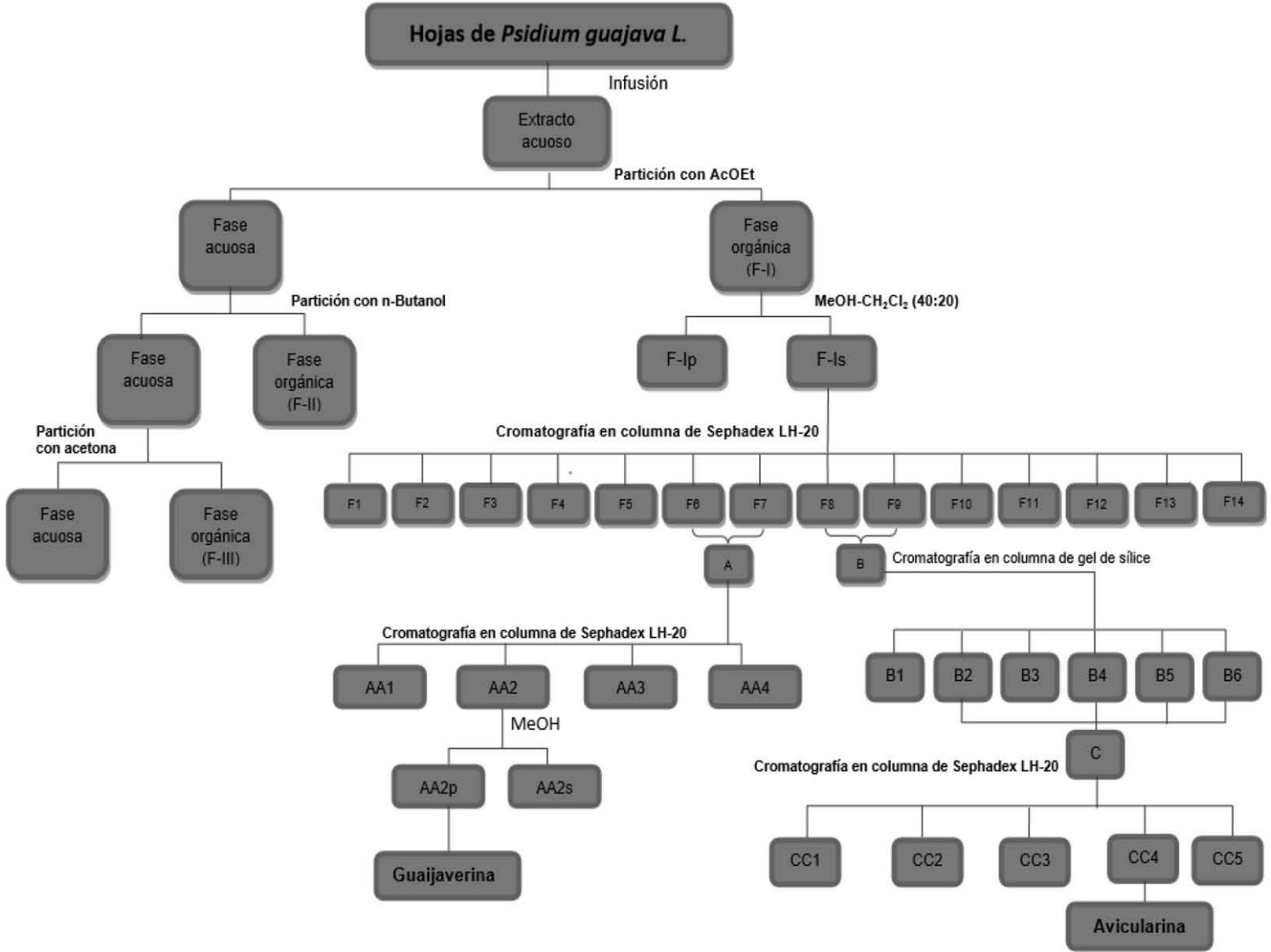
Se realizó el fraccionamiento de la fracción C utilizando una columna de Sephadex LH-20, obteniéndose 34 fracciones (C1-C34), las cuales se juntaron en base a su similitud cromatográfica, formándose 5 grupos de fracciones (CC1-CC5) como se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Resumen del fraccionamiento cuaternario

Eluente	Fracciones reunidas	Clave
MeOH	C1-C10	CC1
	C11-C20	CC2
	C20-C30	CC3
	C31	CC4
	C32-C34	CC5



Diagrama 1. Fraccionamiento de la infusión de las hojas de *Psidium guajava* L.





CAPÍTULO V

5. Resultados y discusión

5.1. Elección de *Psidium guajava L.*

Como se mencionó anteriormente los extractos de guayaba se utilizan ampliamente en la medicina tradicional, para el tratamiento de numerosas enfermedades como el tratamiento de diarrea, diabetes, enteritis rotaviral, hipertensión, caries, heridas, dolor y disminución de la fiebre (Gutierrez et al., 2008).

El uso de diferentes presentaciones elaboradas a partir de las hojas de *P. guajava L.* en la medicina popular han demostrado su utilidad medicinal. Con base en estos antecedentes se eligieron las hojas de la guayaba como postulante para aislar los flavonoides avicularina y guaijaverina.

5.2. Actividad biológica de la guaijaverina y avicularina

Se han realizado varios estudios acerca de las propiedades de las hojas de *Psidium guajava L.*, algunos de ellos discuten sobre la utilidad en la medicina popular, pues se han empleado para prevenir y tratar la diabetes durante muchos años en China (Wang y Liu, 2005). Se ha informado de que el extracto de hojas de guayaba posee actividad de inhibición contra la α -glucosidasa (Mukhtar et al., 2006) y podría mejorar el estado de hipercoagulabilidad en la diabetes (Hsieh et al., 2007). Sin embargo, los estudios sobre los efectos antidiabéticos de hojas de guayaba se centra principalmente en la actividad del extracto; los componentes activos del extracto no se aislaron, y los polifenoles, flavonoides, triterpenos pentacíclicos y otros compuestos en las hojas de guayaba eran solamente especulaciones para dar cuenta de los efectos hipoglucémicos observadas del extracto (Ojewole, 2005)

Se han realizado investigaciones que demostraron la actividad inhibitoria de los extractos de n-BuOH, EtOAc, y de los flavonoides avicularina y guaijaverina en contra de



la α -glucosidasa, α -amilasa. Los resultados de esta investigación mostraron que los extractos de n-BuOH y AcOEt tuvieron una alta actividad inhibidora contra de la α -glucosidasa y α -amilasa del intestino de rata. Los porcentajes inhibitorios del extracto de AcOEt contra la α -glucosidasa fueron $46,3 \pm 8,3\%$ (sacarasa) y $40,6 \pm 4,5\%$ (maltasa) y contra la α -amilasa, la inhibición fue $43,9 \pm 8,7\%$. Los porcentajes inhibitorios del extracto de n-BuOH contra α -glucosidasa fueron $63,5 \pm 5,6\%$ (sacarasa) y $47,7 \pm 3,7\%$ (maltasa); contra la α -amilasa la inhibición fue de $54,4 \pm 6,6\%$ (Peng et al., 2003; Cushnie et al., 2006). Mientras que la avicularina y guaijaverina obtuvieron los siguientes porcentajes inhibitorios, 39.0 ± 2.6 y 36.4 ± 2.5 respectivamente (la concentración de todas las muestras de prueba fue de 1,5 mg / ml) (Tadera et al., 2006).

Un uso diferente de las hojas de la guayaba es la capacidad de algunos de sus compuestos flavonoides (avicularina y guaijaverina) como inhibidores de ureasa, debido a que las ureasas bacterianas son factores de virulencia médicamente importantes, implicados en la patogénesis de varios padecimientos como la pielonefritis, coma hepático, úlcera péptica, y la formación de la infección inducida por cálculos urinarios (Krajewska et al., 2007). Además que la alta actividad de la ureasa es responsable de problemas ambientales y económicos en la agricultura, por causa de la liberación de una alta cantidad anormal de amoníaco a la atmósfera durante la fertilización de urea, aumentando el nivel de pH del suelo (Amtul et al., 2002). Estudios revelan que la avicularina y guaijaverina tienen un efecto inhibitorio en contra de la enzima ureasa del frijol de Jack y de *Lactobacillus fermentum* (Gutiérrez et al., 2008).

Por otra parte los resultados de la actividad inhibitoria en contra de la ureasa mostraron que los flavonoides avicularina y guaijaverina tienen una actividad inhibitoria 50 en contra de la ureasa del frijol de Jack a concentraciones de 140 y 120 μ M respectivamente; en cambio, los porcentajes inhibitorios en contra de la ureasa de *Lactobacillus fermentum* fue del 48% (avicularina) y 17% (guaijaverina), evaluados a una concentración de 100 μ M (Shabana et al., 2010).



Estudios fitoquímicos previos reportan que la avicularina posee actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, debido a que es un flavonoide que favorece la agregación de la bacteria al disminuir su hidrofobicidad y disminuyendo su capacidad de adhesión, sin embargo pocos estudios se han realizado para determinar el efecto de los extractos y flavonoides de *Psidium guajava* L. sobre desarrollo de las biocapas por la bacteria (Razak et al., 2006).

La guaijaverina inhibe la adhesión de los glucanos producidos por la GFTs 26.9 ± 1.04 % a una concentración de 0.5 mg/mL y llega a ser del 52.8 ± 1.16 % a 2 mg/mL. La guaijaverina demostró ser una agente antiplaquetario inhibiendo el crecimiento de *Streptococcus mutans*, por lo que se utiliza en la medicina tradicional en productos naturales como una forma alternativa en el cuidado de la salud (Prabu et al., 2006).

El glucósido guaijaverina ha mostrado inhibición de la aldosa reductasa, una enzima implicada en complicaciones crónicas de diabetes mellitus tipo II, tales como cataratas, neuropatía y retinopatía que se presentan por el incremento de la concentración intracelular del sorbitol (Eidenberger et al., 2013). Otro uso terapéutico se basa en la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DP-IV), cuyo resultado es el incremento de la concentración del péptido semejante al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP). El GLP-1 producido en las células L del intestino a partir de proglucagón, tiene un poderoso efecto secretor de la insulina. También inhibe la secreción de glucagón y en tal forma reduce la producción hepática de glucosa, la velocidad de vaciamiento gástrico y el apetito (Wajchenberg et al., 2007).



5.3. Aislamiento e identificación de avicularina a partir de la fracción C

A partir de la fracción C, precipitó un sólido amorfo color amarillo, el cual se purificó por métodos cromatográficos. Este proceso permitió la obtención del compuesto CC4 que fue identificado por comparación directa con un estándar comercial de avicularina (Sigma Aldrich al 85%). Los R_f fueron de 0.60 para el estándar de avicularina y para el compuesto CC4. En la **Figura 6** se muestra la cromatoplaqueta visualizada bajo luz UV a una longitud de onda de 302nm **(a)** y la cromatoplaqueta revelada con $AlCl_3$ **(b)**.

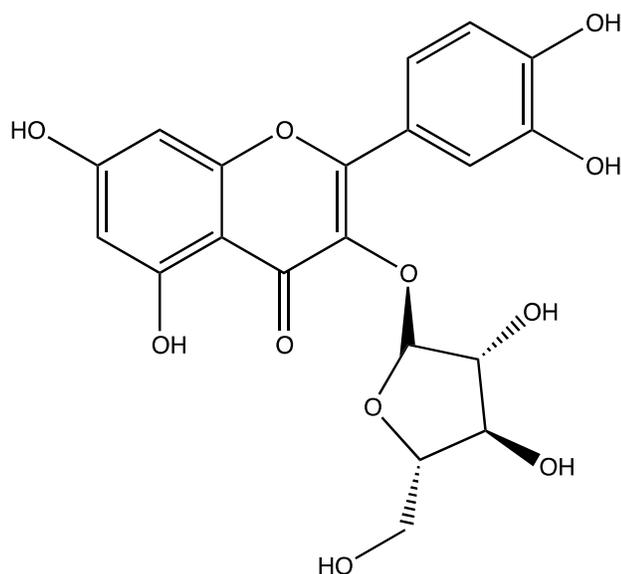


Figura 5. Estructura del flavonoide avicularina aislado de las hojas de guayaba.



a)



b)

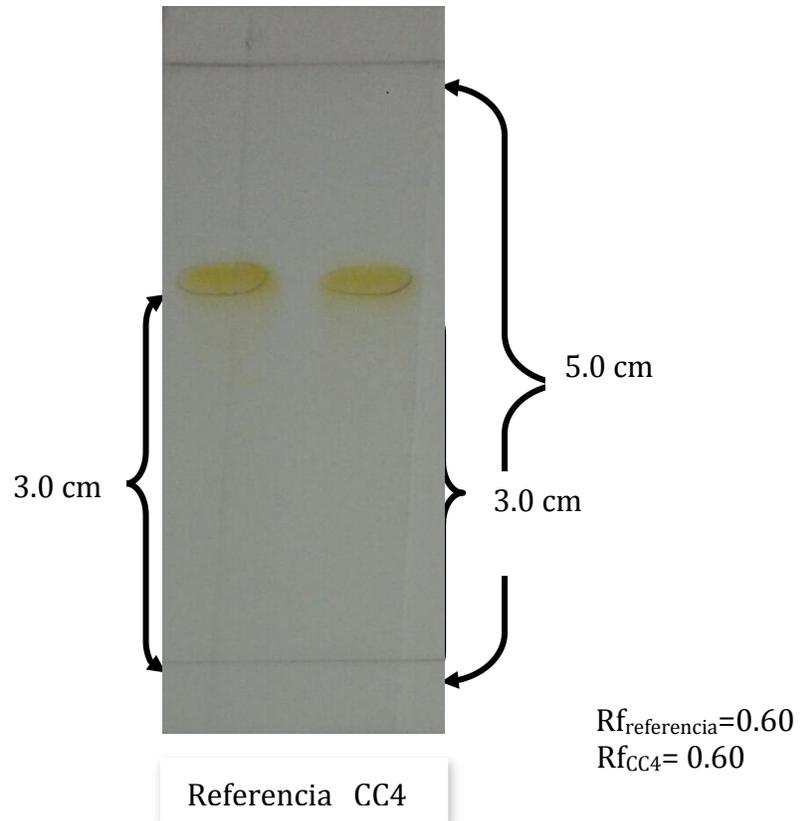


Figura 6. Placa cromatografica visualizada bajo luz UV a una longitud de onda de 302nm (a) y placa cromatografica revelada con AlCl_3 (b) obtenidos para la avicularina.



5.4. Identificación del flavonoide guaijaverina a partir de la fracción AA2p

Para la identificación del compuesto AA2p se siguió una estrategia similar a la descrita para la avicularina, utilizando una muestra de guaijaverina donada por el grupo de trabajo de la Dra. Rachel Mata Essayag. Los Rf para el estándar de guaijaverina y del compuesto A7p fueron de 0.58. En la **Figura 8** se muestra la cromatoplaqueta visualizada bajo luz UV a una longitud de onda de 302nm **(a)** y la cromatoplaqueta revelada con AlCl_3 **(b)**.

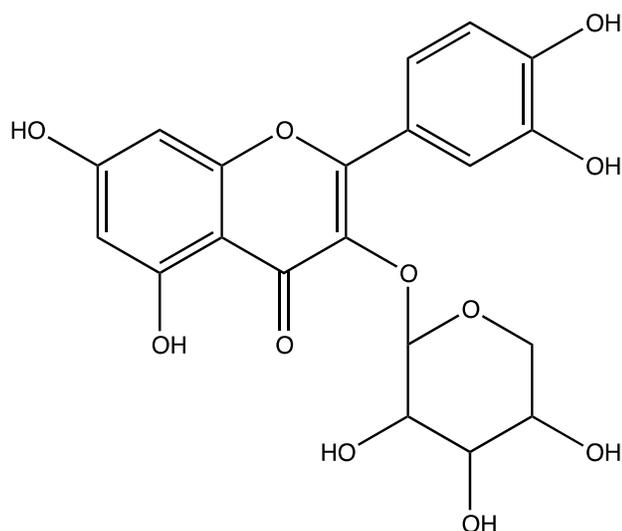
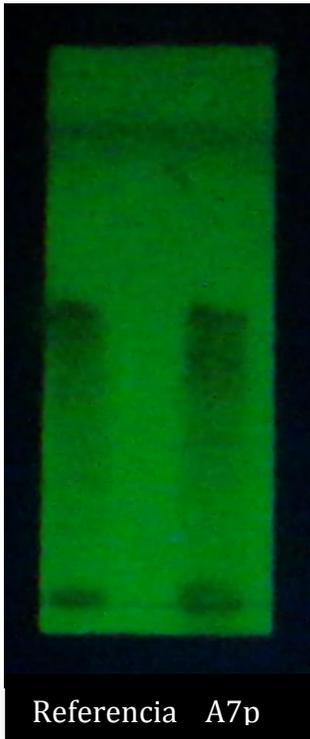


Figura 7. Estructura del flavonoide guaijaverina aislado de las hojas de guayaba.



a)



b)

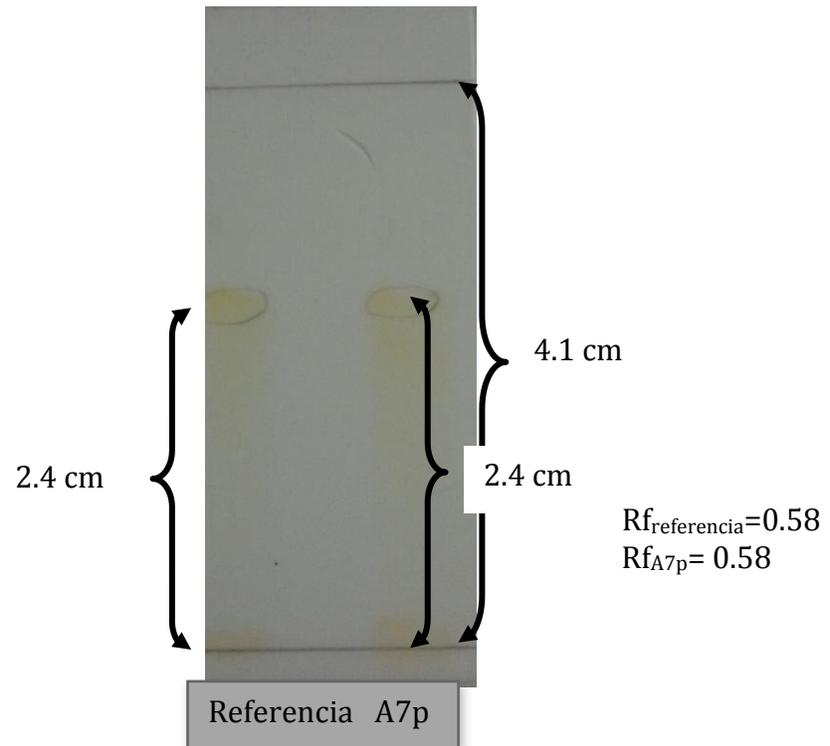


Figura 8. CCF visualizada bajo luz UV a una longitud de onda de 302nm (a) y placa cromatográfica revelada con AlCl_3 (b) obtenidos para la guaijaverina.



CAPÍTULO VI



6. Conclusiones

El estudio químico de la infusión de las hojas de *Psidium guajava* L. permitió el aislamiento e identificación de los flavonoides avicularina y guaijaverina.

La CCF con el uso de estándares previamente identificados fue clave para la identificación de tales flavonoides.

La presencia de estos compuestos explica de forma parcial las actividades biológicas descritas para las hojas de la guayaba. Entre estas actividades destacan: actividad antioxidante, hepatoprotectivas, antimicrobianas, antiespasmódicas, antígenotóxicas, antitusivas, antidiabéticas y antiinflamatorias (Jayakumari et al., 2012), por lo que sugieren un amplio rango de aplicaciones clínicas para el tratamiento infantil de diarrea, diabetes, enteritis rotaviral, hipertensión, caries, heridas, dolor, disminución de la fiebre (Gutierrez et al., 2008).

La estrategia utilizada en esta tesis que involucró sucesivas etapas cromatográficas utilizando la permeación en gel, demostró ser útil para el aislamiento de los flavonoides guaijaverina y avicularina.



CAPÍTULO VII



7. Perspectivas

- Continuar el estudio químico de las fracciones primarias y secundarias que no fueron analizadas en el presente trabajo, con la finalidad de aislar otros flavonoides de importancia.
- Determinar la clasificación biofarmacéutica del flavonoide guajaverina.
- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita cuantificar los principios activos del extracto total de las hojas de *Psidium guajava* L., así como sus compuestos minoritarios.



CAPÍTULO VIII



8. Bibliografía

Adeyemi, O.S., Akanji, M.A., 2011. Biochemical changes in the kidney and liver of rats following administration of ethanolic extract of *Psidium guajava* leaves. *Human & experimental toxicology* 30, 1266-1274.

Aguilar, A., Argueta, A., Cano, (1994). Flora medicinal indígena de México. *Instituto Nacional Indigenista, México*.

Arima, H., Danno, G.-I., 2002a. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 66, 1727-1730.

Arima, H., Danno, G.-i., 2002b. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 66, 1727-1730.

Begum, S., Hassan, S.I., Ali, S.N., Siddiqui, B.S., 2004. Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. *Nat. Prod. Res.* 18, 135-140.

Begum, S., Siddiqui, B.S., Hassan, S.I., 2002. Triterpenoids from *Psidium guajava* leaves. *Nat. Prod. Lett.* 16, 173-177.

Betancourt BJ, Ramos RA, Vizoso PA, Martínez GMJ, López BM. Ausencia de actividad genotóxica del extracto fluido de *Psidium guajava* L. (guayaba) evaluada en un sistema de ensayo en *Aspergillus nidulans*. *Rev Cub Plant Med* 2000; 5(2):38-40



Birdi T, Daswani P, Brijesh S, Tetali P, Natu A. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. *BMC Complement Altern Med* 2010; 10: 33.

Conde, G.E.A., Nascimento, V.T., Santiago, S.A.B., 2003. Inotropic effects of extracts of *Psidium guajava* L. (guava) leaves on the guinea pig atrium. *Braz J Med Biol Res* 36, 661-668.

Deguchi, Y., Miyazaki, K., 2010. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of guava leaf extract. *Nutr. Metab.* 7, No pp. given.

Dutta, S., Das, S., 2010. A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* Linn. on experimental animal models. *Pharmacognosy research* 2, 313-317.

Eidenberger, T., Selg, M., Krennhuber, K., 2013. Inhibition of dipeptidyl peptidase activity by flavonol glycosides of guava (*Psidium guajava* L.): A key to the beneficial effects of guava in type II diabetes mellitus. *Fitoterapia* 89, 74-79.

Gutierrez, R.M.P., Mitchell, S., Solis, R.V., 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 117, 1-27.

Hsieh, C.-L., Lin, Y.-C., Yen, G.-C., Chen, H.-Y., 2007. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against α -dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. *Food Chem.* 103, 528-535.

Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S., Singh, R., 2003. Biochemistry and fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): compositional and enzymatic changes. *Plant Foods Hum. Nutr. (Dordrecht, Neth.)* 58, 309-315.

Jordan, M.J., Margaria, C.A., Shaw, P.E., 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. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1421-1426.

Kitanaka, S., Matsuzaki, K., 2001. Benzophenone glycosides, sesquiterpenes, and flavonoids from *Psidium guajava* as allergy inhibitors. *OS Kogyo K. K., Japan* . p. 12 pp.

Li, J., Chen, F., Luo, J., 1999. GC-MS analysis of essential oil from the leaves of *Psidium guajava*. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials* 22, 78-80.

Liang, Q., Qian, H., Yao, W., 2005. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *Eur. J. Mass Spectrom.* 11, 93-101.

Lozoya Legorreta, X., Chavez Soto, M.A., Rivera Arce, E., 2006. Improved extracts of *Psidium guajava* comprising flavonoid glycosides for the treatment of gastrointestinal disorders. *Revista de Fitoterapia*, 3(2), 45pp.

Lozoya, X., Meckes, M., Abou-Zaid, M., Tortoriello, J., Nozzolillo, C., Arnason, J.T., 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch. Med. Res.* 25, 11-15.

Madhavi, D.L., Chand, N., Rajalakshmi, D., Patwardhan, M.V., 1992. Effects of growth hormones and maturity of the fruits on the callus culture of guava (*Psidium guajava*) fruits using response surface methodology. *J. Sci. Food Agric.* 58, 29-34.

Marquina, V., Araujo, L., Ruiz, J., Rodriguez-Malaver, A., Vit, P., 2008. Composition and antioxidant capacity of the guava (*Psidium guajava* L.) fruit, pulp and jam. *Arch Latinoam Nutr* 58, 98-102.



Martínez MJ, López M, Betancourt BJ, Barceló PH, Montes ME, Regó R. Estudio toxicológico preclínico de la *Psidium guajava* L. (guayaba). *Rev Cub Plant Med* 2001; 6(2): 56-61.

Meckes, M., Calzada, F., Tortoriello, J., Gonzalez, J.L., Martinez, M., 1996. Terpenoids isolated from *Psidium guajava* hexane extract with depressant activity on central nervous system. *Phytother. Res.* 10, 600-603.

Mercadante, A.Z., Steck, A., Pfander, H., 1999. Carotenoids from Guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and Structure Elucidation. *J. Agric. Food Chem.* 47, 145-151.

Mukhtar, H.M., Ansari, S.H., Bhat, Z.A., Naved, T., Singh, P., 2006. Antidiabetic activity of an ethanol extract obtained from the stem bark of *Psidium guajava* (Myrtaceae). *Die Pharmazie* 61, 725-727.

Ojewole, J.A.O., 2005. Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27, 689-695.

Ojewole, J.A.O., 2006. Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 28, 441-446.

Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Yazaki, K., Ikegami, Y., Shingu, T., 1987. Guavins A, C and D, complex tannins from *Psidium guajava*. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 443-446.

Prabu, G.R., Gnanamani, A., Sadulla, S., 2006. Guajaverin - a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J. Appl. Microbiol.* 101, 487-495.

Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *J. Med. Plants Res.* 4, 393-396.



Rivera, E., Chavez, M., Gattuso, M. & Lozoya, X.. (2003). La hoja del guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales. *Revista de Fitoterapia*, 3(2), pp. 101-111.

Rodríguez R., Lafourcade A. & Pérez L.. (2013). Hojas de *Psidium guajava* L.. *Revista Cubana de Farmacia*, 47(1), pp. 127-135.

Roig JT. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. Editorial Científico-Técnica, La Habana. 1988: 485-7.

Salib, J.Y., Michael, H.N., 2004. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guajava* seeds. *Phytochemistry (Elsevier)* 65, 2091-2093.

Shabana, S., Kawai, A., Kai, K., Akiyama, K., Hayashi, H., 2010. Inhibitory activity against urease of quercetin glycosides isolated from *Allium cepa* and *Psidium guajava*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 74, 878-880.

Trivedi, K.K., Misra, K., 1984. Chemical investigation of *Psidium guajava* roots. *Curr. Sci.* 53, 746-747.

Zakaria, L., Sahak, S., Zakaria, M., Salleh, B., 2009. Characterisation of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana. *Trop. Life Sci. Res.* 20, 119-125.

Zhu, Y., Liu, Y., Zhan, Y., Liu, L., Xu, Y., Xu, T., Liu, T., 2013. Preparative isolation and purification of five flavonoid glycosides and one benzophenone galloyl glycoside from *Psidium guajava* by high-speed counter-current Chromatography (HSCCC). *Molecules* 18, 15648-15661.

8.1 Referencias Electrónicas

Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM

[<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Guayaba&id=7651>]. Consultada 5 de diciembre de 2015.