



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN VARIEDADES Y SELECCIONES DE

***Psidium guajava* L.**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

PRESENTA

MÓNICA NAYELI ANGEL ISLAS

ASESOR

DC. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

COASESOR

DC. CONSUELO DE JESÚS CORTÉS PENAGOS

SINODALES

PRESIDENTE: DC. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

VOCAL 1: MC. ALBERTO FLORES GARCÍA

VOCAL 2: MC. LUZ ELENA AREVALO LEÓN

MORELIA MICHOACÁN, MAYO 2013.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y en el laboratorio de Biotecnología MC Víctor Manuel Rodríguez Alcocer de la Facultad de Químico Farmacobiología ambos pertenecientes a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del DC. Mauro Manuel Martínez Pacheco en coordinación con la DC. Consuelo de Jesús Cortés Penagos.

La razón más importante para realizar un trabajo en la vida es el placer de trabajar, el placer de su resultado y el conocimiento del valor del resultado...

Albert Einstein.

RESUMEN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) árbol frutal que pertenece a la familia de las Myrtaceas crece simétricamente en forma de domo alcanzando hasta 10 metros de altura; sus hojas son simples, opuestas ovaladas con nervaduras prominentes de color amarillo; el fruto es esférico de tamaño variable. Además del alto valor nutritivo de la guayaba, esta es empleada en la actualidad como planta medicinal, atribuyendo sus propiedades curativas a sus fitoconstituyentes. Estos metabolitos son principalmente: fenoles, flavonoides, carotenoides, terpenoides y triterpenos, por lo que los extractos de esta planta, especialmente de hojas y frutos poseen actividades farmacológicas útiles.

Extractos y aceites esenciales de plantas se han mostrado eficaces en el control del crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Se han sugerido usos prácticos de estas actividades antimicrobianas por lo que es necesario realizar un estudio sobre los posibles efectos que tienen estos metabolitos en algunos patógenos.

El estudio es realizado en frutos y hojas de tres variedades: Calvillo siglo XXI, HidroZac y Merita y dos selecciones: Selección 12 y Selección 56, los cuales se encuentran en carácter de adaptación en la región de Zitácuaro, Michoacán; estos son provenientes del municipio de Calvillo, Aguascalientes. En la materia prima se realiza una extracción con solventes de diferente orden de polaridad hexano, diclorometano y metanol, los extractos obtenidos son evaluados mediante la técnica de microdifusión en agar ante cinco cepas bacterianas, cinco cepas de *Candidas spp.* aisladas de infecciones oculares y dos fitopatógenos filamentosos. Los resultados son analizados con el programa STADISTIC 7. Los extractos con mayor actividad antimicrobiana se analizan mediante técnicas diversas para poder así identificar los posibles compuestos que tiene el efecto bactericida ante los microorganismos estudiados.

Palabras clave: ***Psidium guajava* L., variedad, selección, actividad antimicrobiana.**

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	I
Índice general	II
Índice de figuras	IV
Índice de cuadros	IV
1. INTRODUCCIÓN-----	1
2. ANTECEDENTES-----	3
2.1. Clasificación taxonómica-----	3
2.2. Descripción botánica-----	4
2.3. Importancia económica-----	5
2.4. Propiedades nutrimentales-----	6
2.5. Etnofarmacología-----	7
2.6. Composición fitoquímica-----	8
2.7. Variedades y Selecciones de <i>P. guajava</i> L.-----	8
3. JUSTIFICACIÓN-----	10
4. HIPÓTESIS-----	11
5. OBJETIVO GENERAL-----	11
5.1. Objetivos específicos-----	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS-----	12
6.1. Materiales-----	12
6.1.1. Material Biológico-----	12
6.1.2. Extractos de <i>Psidium guajava</i> L.-----	13

6.2. Métodos	13
6.2.1. Recolección de muestra	13
6.2.1.1. Hojas	14
6.2.1.2. Fruto	14
6.2.2. Difusión en agar	14
6.2.3. Procesamiento de datos	15
6.2.4. Identificación de compuestos	15
7. RESULTADOS	16
7.1. Rendimiento de extractos	16
7.2. Caracterización antimicrobiana de extractos de hojas en variedades y selecciones de <i>P. guajava</i> L.	17
7.3. Identificación de compuestos	18
9. CONCLUSIÓN	19
10. BIBLIOGRAFÍA	20

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1. Árbol de guayaba -----	3
2.2. Descripción botánica -----	5
6.1 .Ubicación del huerto de <i>P. guajava</i> L. -----	13
6.2. Distribución de discos impregnados con extracto -----	14
7.1. Efecto de los extractos de hoja de <i>P. guajava</i> L. sobre el crecimiento de diferentes microorganismos a una concentración de 0.375mg/μl -----	17

ÍNDICE DE CUADROS

2.1. Clasificación taxonómica de <i>P. guajava</i> L. -----	3
2.2. Composición nutrimental de la guayaba -----	6
2.3. Variedades de <i>P. guajava</i> L. -----	9
6.1. Cepas empleadas para comprobar actividad antimicrobiana de <i>P. guajava</i> L. -----	12
6.2. Extractos de <i>P. guajava</i> L. evaluados -----	13
6.3. Contenido de los discos de papel filtro -----	14
7.1. Rendimiento de los extractos de <i>P. guajava</i> L. -----	16

INTRODUCCIÓN.

El guayabo (*Psidium guajava* Linn) es un árbol frutal que pertenece a la familia de las Myrtaceas y se considera la especie más valiosa dentro de su género **(Chirinos y Pérez, 1994)**.

Es una especie nativa de América, aunque el lugar exacto de su origen provoca controversias, la mayoría de historiadores e investigadores coinciden en que este tuvo origen en las áreas cálidas ubicadas entre México y Perú **(Mata y Rodríguez, 2000)**.

En la actualidad el guayabo es cultivado en las regiones ubicadas entre los 25 y 30 grados de latitud norte y sur, en donde prevalecen temperaturas entre los 18 y 30 °C. Los principales países productores de guayaba en el mundo son: India, Brasil, Cuba, Jamaica, Costa Rica, Australia, Pakistán y México **(SIAP-SAGARPA, 2005)**.

La guayaba estaca entre las demás frutas por su gran contenido en vitamina C, además contiene: β -carotenos, tiamina, riboflavina, niacina, fósforo, calcio, hierro y fibra. Desde la antigüedad se ha conocido, de manera empírica, los beneficios tanto nutricionales como medicinales del guayabo. Los aztecas consideraban uno de los remedios más eficaces para curar la disentería, una pócima elaborada con hojas del árbol Xalxócotl en náhuatl o árbol del “fruto arenoso”, llamado así en referencia a sus frutos que contenían abundantes semillas pequeñas y duras, fruto que en la actualidad se le conoce como el nombre de guayaba **(SAGARPA, 2011)**.

Un estudio de la literatura muestra que *P. guajava* L. es conocido principalmente por sus propiedades antiespasmódicas y antimicrobianas en el tratamiento de la diarrea y disentería, también, se ha utilizado ampliamente como un agente hipoglucemiante. Muchos estudios farmacológicos han demostrado la capacidad de esta planta para exhibir efecto antioxidante, de hepatoprotección, antialérgico, antimicrobiano, antígenotóxico, antiplasmodial, citotóxico, antiespasmódico, cardioactivo y antiinflamatorio. Investigaciones recientes han identificado fito-constituyentes de *P. guajava* L. los cuales han demostrado responsables de las actividades biológicas reportadas, estos constituyentes son en su mayoría fenoles, flavonoides, carotenos, terpenos y triterpenos. Los extractos de esta planta, especialmente las de hojas y frutos poseen actividades farmacológicas útiles **(Pérez Gutiérrez et al., 2008)**.



La importancia económica y social que ha obtenido este cultivo ha llevado a que en la actualidad se generen programas de investigación y desarrollo del cultivo en México, Colombia, Brasil, Venezuela, Hawai, Florida y África del sur (**Fundación de Desarrollo Agropecuario, INC., 2012**).

En México el INIFAP, una institución de excelencia científica y tecnológica con liderazgo y reconocimiento nacional e internacional por su capacidad de respuesta a las demandas de conocimiento e innovaciones tecnológicas en beneficio agrícola, pecuario y de la sociedad en general (**INIFAP, 2010**), logró la caracterización molecular de cinco variedades de guayaba las cuales se encuentran en el del banco de germoplasma del Instituto de Aguascalientes, con la finalidad de contar con material que puedan ser usado como cepas parentales para la realización de cruza, buscando la mejora genética del cultivo, la cual se llevaría al campo, como plantas con alto valor productivo y calidad, encaminados a incrementar la competitividad y la rentabilidad del cultivo de la guayaba. Entregando al Catálogo Nacional de Variedades Vegetales, material vegetativo y caracterización de variedades con propiedades para el consumo fresco y de la industria (**Verastegui Chávez et al., 2009**).

La producción de diversos metabolitos de las plantas en respuesta a diferentes factores, tienen variaciones entre genotipos, cambios estacionales, edades, así como por su sitio de ubicación. Por lo que es de gran importancia realizar un estudio en la variación de la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana entre las nuevas especies así como en algunas selecciones.



2. ANTECEDENTES.

2.1. Clasificación taxonómica.

Se clasifica a la guayaba en a la familia de las Myrtales (**Mata y Rodríguez, 2000**). El nombre genérico de la guayaba "*Psidium*" (figura 2.1) proviene del griego *psidion* que significa granada, por su aparente semejanza entre los frutos. En tanto al nombre específico de "*guajava*" es una palabra indígena que se origina de la voz haitiana *gyayaba* la cual fue tomada por los españoles y luego, con modificaciones, pasó a otros idiomas (**Perales de la Cruz et al., 2005**) (cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Clasificación taxonómica de *P. guajava* L. (**Mata y Rodríguez, 2000**).



Clasificación Taxonómica
Reino: <i>Plantae</i>
División: <i>Magnoliophyta</i>
Clase: <i>Magnoliopsida</i>
Subclase: <i>Rosidae</i>
Orden: Myrtales
Familia: <i>Myrtaceae</i>
Subfamilia: <i>Myrtoideae</i>
Tribu: <i>Myrteae</i>
Género: <i>Psidium</i>
Especie: <i>P. guajava</i>

Figura 2.1. Árbol de guayaba.

2.2. Descripción botánica.

Este árbol (para fines prácticos lo llamaremos; guayabo) mide de 3 a 10 metros de altura, su tallo es corto y torcido. La corteza, tanto del tronco como de las ramas son de diversos colores: verde cremoso, café verdoso, café ligero, y café rojizo oscuro, en forma de capas de corcho que se desprenden en escamas (figura 2.2). Las raíces de este árbol son profundas y se extienden lateralmente formando una red, estas raíces pueden brotar y formar nuevas plantas (**Fundación de Desarrollo Agropecuario, INC., 2012**).

Las hojas son de color verde claro u oscuro, ovaladas, entrecruzadas que miden de 3 a 6.5 cm de ancho y de 5 a 15 cm de largo presentan de 10 a 25 pares de nervaduras laterales prominentes de color amarillo verdoso que se unen arriba y se arquean hacia abajo cerca del margen, tienen pubescencia fina en el revés, especialmente cuando son jóvenes (figura 2.2). Su pecíolo es corto; la base, obtusa, redondeada; el ápice recortado, puntiagudo y su borde liso (**Mata y Rodríguez, 2000**).

Las flores son axilares, pediceladas, de color blanco, cubiertas por pubescencia se encuentran de dos a tres flores en brotes jóvenes o bien solitarias, presenta de cuatro a cinco pétalos en forma ovalada, midiendo de 1.5 a 2 cm de largo, los estambres son numerosos y están insertados en hileras alrededor del disco midiendo de 1 a 1.5 cm de largo, los filamentos son blancos y las anteras ovoides o elipsoidales de color amarillo claro (**Perales de la Cruz et al., 2005**) (Figura 2.2).

El fruto del guayabo (para fines prácticos lo llamaremos; guayaba) es una baya esférica, globosa, elipsoidal o periforme, su tamaño varía de 5 a 12 cm de largo y 5 a 7 cm de ancho con un peso entre 30 y 225 g, dependiendo de la variedad y las condiciones del cultivo (**Mata y Rodríguez, 2000**). Su cáscara es cerosa; en algunas variedades de piel lisa, otras rugosa y de un color verde amarillento dependiendo del grado de maduración. Bajo la cáscara se encuentra una primera capa de pulpa, consistente y un gran número de semillas duras. El color del endocarpio es variable: blanco, blanco amarillento, rosado, amarillo, naranja, salmón (figura 2.2).





Figura 2.2. Descripción botánica. **a)** Flores blancas, con cinco pétalos y numerosos estambres, **b)** corteza del árbol de colores: verde cremoso, café verdoso, café ligero y café rojizo oscuro, los cuales forman capas de corcho que se desprenden en escamas, **c)** fruto de color amarillo redondo u ovoide de hasta 12 cm de largo contiene muchas semillas duras y un aroma característico, **d)** árbol que alcanza altura hasta de 10 metros y crece en forma de domo, **e)** hojas opuestas, simples, elípticas ovaladas, de 5 a 15 centímetros de largo, presentando prominentes nervaduras en color amarillo.

2.3. Importancia económica.

La guayaba se comercializa en mercados y supermercados nacionales con excelentes precios, ya sea como fruta fresca (**Díaz Bazán et al., 2005; Murillo, 2011**) o transformada en pulpa concentrada, dulces, ates, jaleas, mermeladas, en almíbar, refrescos, néctares, polvos para aguas.

El sector frutícola ha demostrado ser una opción rentable, con mercados accesibles y en expansión sostenida. Dicho sector permite aprovechar las ventajas competitivas que nuestro país posee, tales como: clima, suelos adecuados y ubicación geográfica (**Díaz Bazán et al., 2005**).

La guayaba se encuentra entre las 20 frutas más importantes que se producen en nuestro país, tan sólo en la parte productiva se generan más de cuatro millones de jornales de alto impacto para las regiones productoras. En 2008, los datos del Sistema de Información

Agroalimentaria y Pesquera (**SIAP-SAGARPA, 2010**) muestran que la guayaba se cultivó en una superficie total de 21 mil 902 hectáreas, de las cuales se obtuvo un volumen de 285 mil 434 toneladas. El 96% de la producción nacional se concentró en Michoacán, Aguascalientes, México y Zacatecas. En ese año, esta actividad generó una derrama económica por mil 161 millones de pesos.

2.4. Propiedades nutrimentales.

La guayaba es denominada como la “la fruta reina” por ser la más completa en nutrientes, (**Ramírez y Pacheco, 2011**) una fruta rica en proteína, grasa, fibra, potasio y sobre todo en vitamina C. El contenido en 100 g de porción comestible de guayaba se describe en el cuadro 2.2. Al evaluar la guayaba contra las frutas más populares en cuanto a su consumo, podemos establecer que la guayaba es la fruta más rica en cuanto a contenido nutricional, ya que resulta la mejor evaluada, por arriba de la naranja, el plátano, el mango, la manzana y el limón (**Fruticultores de Calvillo, 2012**).

Cuadro 2.2. Composición nutrimental de la guayaba (**SAGARPA, 2010**).

Nutrimento	
Energía (kJ/Kcal)	228/54
Humedad (g)	78.90
Cenizas (g)	0.60
Extracto etéreo (g)	0.42
Proteína bruta (g)	1.21
Hidratos de carbono (g)	13.03
Fibra bruta (g)	5.84
Calcio (mg)	13.00
Fósforo (mg)	29.00
Hierro (mg)	1.02
β-Carotenos (mg)	0.15
Tiamina (mg)	0.04
Rivoflavina (mg)	0.06
Niacina (mg)	1.40
Ac. Ascórbico (mg)	76.10



2.5. Etnofarmacología.

Existen referencias antiguas sobre los beneficios del guayabo. Una de ellas se encuentra en la obra de Martín de la Cruz del siglo XVI donde se menciona como anti disentérica. Francisco Hernández, señala que "las hojas son ácidas, astringentes y muy olorosas; curan la sarna y suelen emplearse en lavatorios. El fruto es caliente y seco, para muchos es alimento y aseguran que ayuda a la digestión y calienta el estómago debilitado por el frío". El Códice Florentino, relata su uso para "estancar las cámaras (diarreas), para curar gran número de enfermedades particularmente las de los ojos". Nicolás de 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". **(Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009)**

Se ha mencionado también que los aztecas consideraban como uno de los más eficaces remedios para curar la disentería, una pócima elaborada con hojas del árbol xalxócotl o árbol del "fruto arenoso", llamado así en náhuatl, porque hacía referencia a sus frutos, que contienen abundantes semillas pequeñas y duras, a estos frutos se les conoce hoy con el nombre de guayabas (*Psidium guajava* L.) **(SAGARPA, 2011)**.

La guayaba, como planta medicinal, tiene gran importancia en la actualidad, ya que sigue siendo empleada en el tratamiento de más de 40 padecimientos que afectan la salud de los mexicanos en diferentes áreas del país. Se ha encontrado que es utilizada con frecuencia en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, principalmente la diarrea. El tratamiento más usual consiste en hacer una cocción o infusión con las hojas del guayabo y administrarla por vía oral tres veces al día o como agua de uso **(Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009)**.

Todos los pueblos del mundo han usado las plantas medicinales para atender sus problemas de salud desde tiempos ancestrales y en la gran mayoría de estos, se siguen haciendo uso de ellas. Estudios etnofarmacológicos recientes muestran que *P. guajava* L. es utilizada en varios países del mundo para el tratamiento de un gran número de enfermedades. **(Pérez Gutiérrez et al., 2008)**.



Investigaciones actuales comprueban las propiedades curativas de *P. guajava* L. En cuanto a las propiedades antimicrobianas (**Jaiarj Prarane et al., 1999**), reportan una inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de β -estreptococos por extractos de agua, metanol y cloroformo de hojas secas de guayabo mediante el método de difusión en disco.

Los beneficios y propiedades de los órganos de *P. guajava* radican en sus metabolitos los cuales se producen en respuesta a diferentes factores bióticos y abióticos (**Sampietro, 2010**) los cuales han sido estudiados y aislados con la finalidad de identificar la propiedad específica de cada uno de ellos.

2.6. Composición fitoquímica.

Estudios realizados han aportado información sobre los fito-constituyentes de *P. guajava* L. Se ha identificado metabolitos con buen rendimiento, de los cuales algunos de ellos han demostrado poseer actividades biológicas útiles. Estos metabolitos son principalmente: fenoles, flavonoides, carotenoides y terpenoides en general, por lo que los extractos de esta planta, especialmente las de hojas y frutos poseen actividades farmacológicas útiles (**Pérez Gutiérrez et al., 2008**).

2.7. Variedades y Selecciones de *P. guajava* L.

La importancia económica y social que ha obtenido este cultivo ha llevado a que en la actualidad se generen programas de investigación y desarrollo del cultivo en el país. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) a través de los Campos Experimentales de Pabellón y de Los Cañones, inició trabajos de selección de germoplasmas sobresalientes en la zona guayabera Calvillo-Cañones, desde principios de la década de los 80, siendo hasta 1989 cuando se estableció una huerta en el Campo Experimental “los Cañones” con material genético colectado (**González Gaona et al., 2002**).

Los investigadores del INIFAP, lograron la caracterización molecular de nuevas variedades de guayaba las cuales se encuentran en el del banco de germoplasma del Instituto de Aguascalientes, con la finalidad de contar con material que puedan ser usado como cepas parentales para la realización de cruza, buscando la mejora genética del cultivo, la cual se llevaría al campo, como plantas con alto valor productivo y calidad, encaminados a incrementar la competitividad y la rentabilidad del cultivo de la guayaba (**Verastegui Chávez et al., 2009**).

Las nuevas variedades y selecciones son sometidas a un examen técnico, en el cual se dictamina si cumplen con los requisitos de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE) (**CNVV, 2011**) obteniendo así un número de registro en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales los cuales se muestran en el cuadro 2.3.

Cuadro 2.3. Variedades de *P. guajava* L. registradas por el INIFAP (**CNVV, 2011**).

Variedad	Núm. de registro provisional	Núm. de registro definitivo	Solicitante/mantenedor
Calvillo Siglo XXI	2252 - GUA - 001 - 290609/C	GUA - 005 - 160709	INIFAP
HidroZac	2254 - GUA - 003 - 290609/C	GUA - 002 - 160709	INIFAP
Merita	2256 - GUA - 005 - 290609/C	GUA - 004 - 160709	INIFAP
Selección 12	***	***	***
Selección 56	***	***	***

(***)Selección: variedad aun no registrada.

La producción de diversos metabolitos de las plantas en respuesta a diferentes factores, tienen variaciones entre genotipos, cambios estacionales, edades, así como por su sitio de ubicación (**Sampietro, 2010**). Por lo que es de gran importancia realizar un estudio en la variación de la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana entre las nuevas especies así como en algunas selecciones.

3. JUSTIFICACIÓN.

Extractos y aceites esenciales de plantas se han mostrado eficaces en el control del crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Por otro lado, los microorganismos que causan perjuicios a la salud humana se están mostrando resistentes a la mayoría de los antimicrobianos conocidos, lo que ha incentivado aún más la búsqueda de antibióticos de origen natural. *P. guajava* L. ha sido empleada desde la antigüedad como tratamiento en diversos padecimientos, este conocimiento empírico ha llevado a que en la actualidad se realicen diversas investigaciones, logrando así la identificación de metabolitos secundarios los cuales son los que le dan a esta planta sus propiedades curativas. Algunos de estos metabolitos secundarios atribuyen a la planta y a sus frutos propiedades antimicrobianas, las cuales varían en relación a la variedad y selección de la que se esté hablando, por lo que es de gran importancia valorar la actividad antimicrobiana de nuevas especies de guayaba así como de identificar los compuestos que proporcionan esta propiedad.

4. HIPÓTESIS.

En las variedades y selecciones de *Psidium guajava* L. se mantiene la actividad antimicrobiana debido a que sus metabolitos secundarios no cambian significativamente.

5. OBJETIVO GENERAL.

Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos tanto de hoja como de fruto de variedades y selecciones de *Psidium guajava* L.

5.1. Objetivos específicos.

- 🍃 Obtener extractos de hojas y frutos de *P. guajava* L.
- 🍃 Evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos mediante ensayos biológicos con diversos microorganismos.
- 🍃 Identificar los compuestos responsables de ejercer actividad antimicrobiana.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Materiales.

6.1.1. Material Biológico.

La evaluación antimicrobiana de los extractos de *Psidium guajava* L. se realizó con cinco cepas bacterianas: dos gram positivas y tres gram negativa. Todas las cepas forman parte de la flora normal del cuerpo pero que en personas inmunocomprometidas pueden causar padecimientos graves. Dos cepas de fitopatógenos filamentosos responsables de enfermedades en plantas así como en los frutos los cuales forman parte de la recopilación de microorganismos del Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de investigaciones Químico Biológicas de Universidad Michoacana. Además, cinco cepas de *Candida* spp procedentes de infecciones oculares en la Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes” (cuadro 6.1).









Cuadro 6.1. Cepas empleadas para comprobar la actividad antimicrobiana de *P. guajava* L.

Cepas Bacterianas	Cepas de <i>Candida</i> ssp	Cepas miceliales
<i>Staphylococcus aureus</i> (cepa 10 ATCC)	<i>C. albicans</i> (cepa 1)	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
<i>Bacillus subtilis</i> (cepa 7)	<i>C. albicans</i> (10120)	<i>Colletotrichum acutatum</i>
<i>Pseudomonas auruginosas</i> (cepa 4 ATCC)	<i>C. albicans</i> (cepa 5)	-----
<i>Proteus vulgaris</i> (cepa 13)	<i>C. glabrata</i> (cepa 4)	-----
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (cepa 5)	<i>C. famata</i> (8016)	-----


6.1.2. Extractos de *Psidium guajava* L.

Los extractos evaluados provienen de hojas y de frutos. Los extractos de hojas son hexánicos, de dicloro metano y metanólicos correspondientes a tres variedades y dos selecciones. En frutos los extractos son únicamente metanólicos, correspondientes a dos variedades y una selección (cuadro 6.2).

Cuadro 6.2. Extractos de *P. guajava* L. evaluados.

Nombre	Número	Hoja	Fruto
Calvillo Siglo XXI	11		---
HidroZac	54		
Merita	126		
Selección 12	12		---
Selección 56	56		

(---) No se obtuvo extracto por falta de muestra.

() Muestra de extractos estudiados.

6.2. Métodos.

6.2.1. Recolección de muestra.

El material de estudio fue recolectado de huertos ubicados a las afueras de la ciudad de Zitácuaro Michoacán, sobre la carretera Federal número 51 (figura 6.1) El día 23 de octubre del año 2011. Los árboles de los cuales se obtuvo la muestra pertenecen a un huerto experimental ya que estas variedades y selecciones se encuentran en adaptación. El INIFAP, caracterizo estas variedades y las traslado a la ciudad de Zitácuaro mediante la técnica de acodo. Los árboles estudiados tiene una edad de 3 años y en promedio miden 1.5 m de altura.

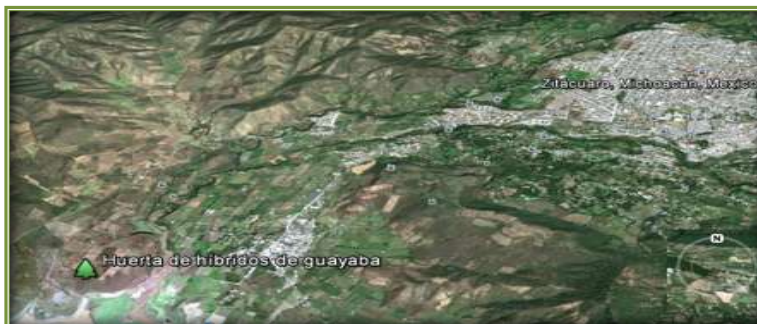


Figura 6.1. Ubicación del huerto de *P. guajava* L. localizados en las afueras de la ciudad de Zitácuaro Michoacán, latitud 19°25'23.99" N longitud 100°22'29.93" Oeste.

6.2.1.1. Hojas.

Se recolectaron hojas de *P. guajava* L. en Zitácuaro Michoacán cuando la planta tenía frutos. Fueron seleccionados los brotes más jóvenes de la planta en las que no se observaran daños por enfermedad, insectos o daños físicos u ocasionados por agroquímicos ya que estos factores inducen variabilidad en la cantidad de metabolitos sintetizados como lo indica **Vargas Álvarez et al., 2006**.

6.2.1.2. Fruto.

La muestra fue colocada en bolsas especiales que evitan su maltrato. Posteriormente, se depositaron en cajas que fueron usadas para facilitar su transporte. Se eliminaron impurezas que pudieran provenir del campo y se clasificaron eliminando toda aquella fruta que no reunía los parámetros necesarios o que presentaba daños físicos, fisiológicos, patológicos (**NORMA DEL CODEX STAN 215-1999**).

6.2.2. Difusión en agar.

Con un hisopo estéril se tomó la muestra de los tubos que contenían las bacterias y se siembra en la superficie de un medio sólido Muller Hinton de forma de película sin dejar espacios y en un solo sentido, la caja se gira 90 ° y se repite la siembra sin dejar espacios. Se colocaron cinco discos de papel filtro previamente esterilizados (figura 6.2).

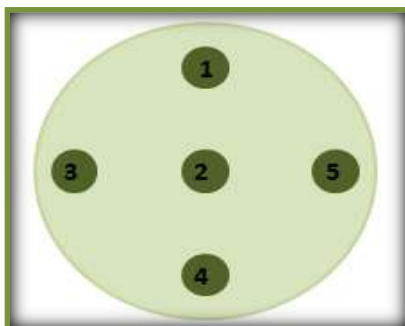


Figura 6.2. Distribución de discos impregnados con extracto.

Cuadro 6.3. Contenido de los discos de papel filtro. Cada uno de los discos de papel filtro se impregnaron con tres concentraciones diferentes del extracto, además de dos controles.

Núm. de disco	Extracto (mg/μl)
1	1.5
2	0.75
3	0.375
4	Control positivo
5	Control negativo etanol al 96%

Cada disco se impregnó con 6 μ l de extracto en tres concentraciones diferentes: 1.5, 0.75 y 0.375 mg/ μ l. Fue utilizando un control positivo; en bacterias se empleó Cefotaxima 0.125 mg/ μ L, en *Candida* spp Fluconazol 2mg/ml, tiabendazol [(2-tiazol-4-il) benzimidazol] (0.001 mg/ μ L) para filamentosos, mientras que para oomicetos acido- (R)- 2[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino] metil ester propionico (mefenoxam)(0.001 mg/ μ L); además de colocar un disco con un control negativo etanol al 96% (cuadro 6.3). Se incubaron a 37 °C para reportar los halos observados a las 8 y 16 h en el caso de bacterias, para *Candida* spp se reportó a las 24 h, mientras que en fitopatógenos filamentosos se reportó al tercero, cuarto y quinto día.

6.2.3. Procesamiento de datos.

Se realizó la medición de los halos de inhibición, en bacterias y *Candida* spp, para los fitopatógenos filamentosos se reportó el índice de crecimiento (IC) el cual se define como el cociente del crecimiento de hongo ante el extracto entre el crecimiento del control negativo. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa STADISTICA 7. Una vez realizado el análisis estadístico, se optó por realizar la identificación de compuestos de los extractos metanólico de la variedad “Calvillo siglo XXI” y Selección 12 ya que los resultados obtenidos son de gran interés.

6.2.4. Identificación de compuestos.

El concentrado fue analizado mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN 1 H), ya que cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación a la que son sometidos, emitiendo una señal única que es registrada, y graficada en un espectro. Un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra. Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos (unidades δ o ppm).

7. RESULTADOS.

7.1. Rendimiento de extractos.

La extracción de los componentes de las hojas *P. guajava* L. realizada con tres solventes de diferentes polaridades. La extracción en frutos fue realizada únicamente con metanol. Los rendimientos obtenidos son mostrados en cuadro 7.1. El rendimiento total de las muestras de hojas es de: 17.49% (variedad Calvillo Siglo XXI), 8.62% (variedad HidroZac), 13.61% (variedad Merita) ,18.47% (Selección 12) y 10.71% (Selección 56).

Cuadro 7.1. Rendimiento de los extractos de *P. guajava* L.

Variedad/Selección	Rendimiento (%)			
	Hoja			Fruto
	Hexano	Diclorometano	Metanol	Metanol
Calvillo siglo XXI	2.73	2.58	12.17	-----
HidroZac	1.82	2.13	4.66	41.36
Merita	1.59	2.72	9.29	9.90
Selección 12	1.33	11.87	5.26	-----
Selección 56	0.93	2.52	7.25	21.40

El mayor rendimiento se obtiene en muestras de hojas. La Selección 12 presenta el mayor rendimiento siendo del 18.47%, seguido por la variedad Calvillo siglo XXI con un rendimiento del 17.49%, el menor rendimiento se observa en la variedad HidroZac siendo del 8.62%. En los frutos, al contrario que en las hojas el mayor rendimiento se registra con la variedad HidroZac con 41.36%, el rendimiento menor es en la variedad Merita con un 9.90%. Los extractos de frutos presentan un mayor rendimiento en comparación con los extractos obtenidos de las hojas (cuadro 7.1)

7.2. Caracterización antimicrobiana de extractos de hojas en variedades y selecciones de *P. guajava* L.

Los extractos de las tres diferentes polaridades fueron evaluados ante tres tipos diferentes de microorganismos: bacterias (gram positivas y gram negativas), *Candida* spp y fitopatógenos filamentosos. El efecto de los extractos sobre el crecimiento de estos microorganismos, se encuentra registrado en la figura 7.1. Los extractos hexánicos y diclorometánicos no ejercen efecto en la inhibición del crecimiento en cepas bacterianas y de *Candida* spp., únicamente los extractos metanólicos exhiben efecto ante estos microorganismos. A diferencia de cepas bacterianas y de *Candida* spp los tres diferentes extractos si presentan efecto ante fitopatógenos filamentosos lo cual se registra con la disminución en su Índice de Crecimiento (IC) ante los extractos de hexano, diclorometano y metanólicos.

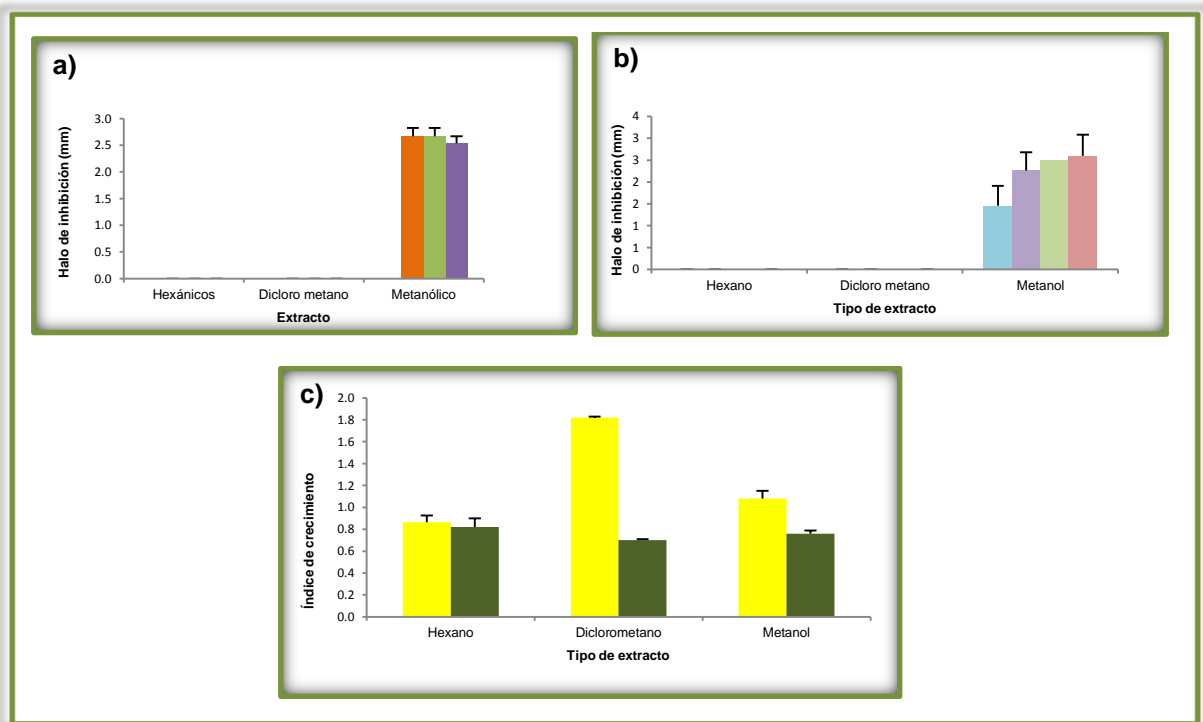


Figura 7.1. Efecto de los extractos de hoja de *P. guajava* L. sobre el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos a una concentración de 0.375 mg/ μ l. **a)** efecto sobre el crecimiento bacteriano donde; \odot = *S. aureus*, \odot = *B. subtilis*, \odot = *P. vulgaris*; **b)** Efecto sobre el crecimiento de cepas de *Candida* spp donde; \odot = *C. glabrata*, \odot = *C. albicans* cepa 2, \odot = *C. famata*, \odot = *C. albicans* cepa 5; **c)** efecto sobre el crecimiento de fitopatógenos filamentosos donde ; \odot = *P. cinnamoni*, \odot = *C. acutatum*. Los datos son promedio de tres experimentos independientes con una n de 3. Tukey ($\alpha=0.01$).

7.3. Identificación de compuestos.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las diferentes variedades y selecciones nos indican que los extractos de hojas tienen mayor efecto antimicrobiano que los extractos de fruto. En los extractos de hojas los metanólicos tienen un mayor efecto ante los tres tipos de microorganismos y dentro el análisis estadístico dentro de los extractos metanólicos indican que de manera general la variedad Calvillo Siglo XXI y la Selección 12 tienen efecto positivo ante mayor cantidad de microorganismos por los que se realizó un análisis mediante RMN H¹ para lograr así orientar la identificación de compuestos con efecto antimicrobiano en los extractos estudiados.

Los espectros obtenidos de ambos extractos nos indican que los metabolitos la variedad Calvillo Siglo XXI y la Sección 12 de *P. guajava* L., presentan metabolitos secundarios similares. Las señales características observadas en los espectros de RMN H¹ comprenden compuestos de naturaleza aromática glucosilados, probablemente flavonoides glucosilados. Es posible observar la presencia de protones alifáticos, así como de azúcares y protones aromáticos. En la figura 7.10 se observa el espectro de la variedad Calvillo Siglo XXI mientras que en la figura 7.11 el espectro de la Selección 12, en ambos las señales observadas son similares lo que nos indica que en ambos extractos metanólico los metabolitos secundarios son similares.

9. CONCLUSIÓN.

Los extractos de hojas así como de frutos de variedades y selecciones de *P. guajava* L.: Calvillo Siglo XXI, Merita, HidroZac, Selección 12, Selección 56, tienen efecto antimicrobiano ante cepas bacterianas, cepas de *Candida* spp y fitopatógenos filamentosos debido a la producción de metabolitos secundarios que ejercen este efecto.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- 🌿 **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.** 2009. Agosto 2012. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Psidium_guajava&id=7651.
- 🌿 **Bruce C., Campbell H., Kim H.J.** 2006. Nuts' new aflatoxin fighter: caffeic Acid. *Agricultura Research Service.* Agosto 2012. URL: <http://www.xatakaciencia.com/biologia/acido-cafeico-un-fungicida-respetuoso-con-la-naturaleza>.
- 🌿 **Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (C.N.V.V.).** 2011. pp. 3, 13,14. Julio 2012. URL:http://www.snics.sagarpa.gob.mx/somos/Documents/CNVV_2011.pdf.
- 🌿 **Chirinos F.J., Pérez S.E.** 1994. Seminario internacional de biotecnología aplicada a la micropropagación de frutales. Programa Cooperativo de Innovación Tecnológica Agropecuaria. Venezuela pp. 115.
- 🌿 **Cortés Penágos C., Maldonado Sierra N., Padilla Ramírez J.S., Cortés Martínez R.** 2010. Características fisicoquímicas de híbridos de guayaba (*P. guajava* L.) INIAFAP XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato México. URL: <http://www.biblioteca.inifap.gob.mx>.
- 🌿 **Deguchi Y., Miyazaki K.** 2010. Anti-hyperglycemic and Anti-hyperlipidemic Effects of Guava Leaf Extract. *Nutrition&Metabolims.* Vol. 7. pp. 43-75.
- 🌿 **Díaz Bazán M., Salaverria M., Escobar A.V.** 2005. Fruticultura: oportunidades de inversión en el Salvador. Editorial PROESA. pp.1, 22-24.
- 🌿 **Fruticultores de Calvillo, S.A. de C.V.** Agosto 2012. URL: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/FRUCASA__RE.pdf.
- 🌿 **Fundación de Desarrollo Agropecuario, INC.** Septiembre 2012. URL: <http://es.scribd.com/doc/54157339/GUAYABA>.
- 🌿 **González Gaona E., Padilla Ramírez S., Reyes Muro L., Perales de la Cruz M.A., Esquivel Villagrana F.** 2002. Guayaba su cultivo en México INIAFAP. Libro Técnico núm. 1. Agosto 2012. URL: http://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Aguascalientes/6aguascalientes.pdf.
- 🌿 **INIFAP.** 2010. Agosto 2012. www.inifap.gob.mx/.

- 🍌 **Jaiarj Praranee, Khoohaswan, Wongk Saraya Yuwadee, Peunguicha Pencham, Suriyawong Potajanee, Sumal Saraya M.L.** 1999. Ruangsomboon orawan. anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 67: 203-212.
- 🍌 **Mata Beltrán I., Rodríguez Mendoza A.** 2000. Cultivo y Producción del Guayabo. Editorial Trillas Segunda Edición. pp. 11, 15,17.
- 🍌 **Murillo G.O.M.** 2011. Ficha Técnica Industrialización de la Guayaba (*Psidium guajava* L.). Julio 2012. URL: http://www.tuinventas.com/attachments/article/491/Guayaba_FTP.pdf.
- 🍌 **Perales De La Cruz M.A., Padilla Ramírez J.S., González Gaona E., Reyes Philips H.** 2005. Manual para la producción integral del cultivo de guayaba. INIAFAP. pp 9, 16,17.
- 🍌 **Pérez Gutiérrez M.R., Mitchell S., Vargas Solís R.** 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethno-pharmacology*, 117: 5-24.
- 🍌 **Ramírez A., Pacheco de Delahaye E.** 2011. Composición química y compuestos bioactivos presentes en pulpas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 36:71-75.
- 🍌 **SAGARPA** 2011. Agosto 2012. URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/productodetemporada/Paginas/Guayaba.aspx>.
- 🍌 **Sampietro A.** 2010. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. Universidad Nacional de Tucumán. Agosto 2012. URL: http://www.produccionbovina.com/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/19-alelopatia.htm.
- 🍌 **SIAP-SAGARPA.** 2005. Mayo 2012. URL: <http://www.siap.gob.mx>
- 🍌 **SIAP-SAGARPA.** 2010. Abril 2012. URL: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=241.
- 🍌 **Sistema Productor de Guayaba.** 2005. Plan rector sistema nacional guayaba segunda fase: diagnóstico inicial base de referencia estructura estratégica. Septiembre 2012. URL: <http://www.amsda.com.mx/PRNacionales/Nacionales/PRNguayaba22.pdf>.
- 🍌 **Verastegui Chávez J., Gaytán Mascorro A., Reyes Juárez I., Chew Madinaveitia J.L.** 2009. Operae Fructus. Boletín informativo de INIFAP. México pp. 2.
- Yamtzec Josu A., Villaseñor Perea C.A., Romantchik Kriuchkova E., Soto Escobar M., Peña Peralta M.A.** 2010. Una revisión sobre la importancia del fruto de guayaba (*P.*

guajava L.) y sus principales características post-cosecha. *Revista de Ciencia Tecnológicas Agropecuarias*. Vol.19. pp. 74-82.