



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

"ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Psidium guajava* L. "

**PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA

NATALY CRUZ TORRES

ASESOR

MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

DOCTOR EN CIENCIAS

Morelia, Michoacán, Diciembre 2012



*Para triunfar en la vida, no es importante llegar a ser el primero.
Para triunfar simplemente hay que llegar, levantándose cada vez
que se cae en el camino.*

Anónimo

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología celular del Instituto de Investigaciones de Químico Biológicas y en el laboratorio de Biotecnología del “M.C Víctor Manuel Rodríguez Alcocer” de la Facultad de Químico Farmacobiología ambos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C Mauro Manuel Martínez Pacheco y la D.C. Consuelo de Jesús Cortes Penagos.

DEDICATORIA

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer por su amistad, apoyo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Sin importar donde estén o si alguna vez llegan a leer esta dedicatoria quiere darle las gracias por formar parte de mi vida.

A Dios por dame salud para terminar este proyecto y hacer realidad este sueño logrando mis objetivos.

A mi madre Rosa

Por su apoyo en todo momento, por sus consejos y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien pero sobre todo por su amor.

A mi padre Juan

Por el ejemplo de perseverancia y constancia de salir adelante.

Gracias a los dos por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, dándome su amor en todo momento. Este trabajo que me llevo un año hacerlo es para ustedes, devolviéndoles lo que ustedes me dieron primero.

A mis hermanos

Juan Pablo y Rosa Haydeè por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mi sobrino

Pablo Antonio por su apoyo, aunque aún es pequeño le agradezco los grandes momentos que me hace pasar llenos de diversión. Te quiero corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular al Instituto de Investigaciones Químico- Biológicas y al laboratorio de biotecnología de la facultad de químico Farmacobiología por darme la oportunidad de realizar este proyecto para la culminación de mis estudios y parte de mi formación

D.C. Mauro Martínez Pacheco por haberme aceptado en su laboratorio y haberme formado académicamente, pero sobre todo por su apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y elaboración de esta tesis.

D.C. Consuelo de Jesús Cortes Penagos porque me dio la oportunidad de realizar una tesis y por confiar en mí, muchas gracias por todo.

M.C. Alberto García Flores por su tiempo compartido por sus enseñanzas que me ayudo con asesorías y dudas presentadas en la realización de esta tesis, en la estadística pero sobre todo de su amistad.

M.C. Edgar García Sánchez por haberme ayudado a la realización de este trabajo, por sus enseñanzas, paciencia y conocimiento que me brindo que fue de gran ayuda para mi formación profesional Ave María...

A mis sinodales: por sus correcciones y críticas que fueron de gran ayuda para la culminación de este trabajo.

Programich, Zitacuaro al Ing Pineda al Sr Arroyo por facilitarnos de su guayaba

A mis compañeros de laboratorio

Gracias chiquillos y chiquillas por hacerme pasar ratos de mucho estrés llenos de alegría y diversión así como sus enseñanzas que de cada uno de ustedes pero sobre todo por la amistad que me brindaron M.C Mariana, M.C Ma. Eugenia, M.C Jorge, Mc. Cesar, D.C David, Evelin, Angelica, Ale, yanin, clemen, Anita, Mariela, Nadia, Hugo , Luis, julio, Roberto, Dani , Alex y Raúl.

Unnies

Moni, Faty, Silvia que les puedo decir más que gracias por todo, los buenos y malos momentos que hemos pasado juntas, saben lo mucho que las quiero y que les deseo con todo mi corazón el mejor de los éxitos tanto en su vida personal como profesional. Saranghae Figthing

RESUMEN

En el presente estudio se hizo una caracterización antimicrobiana de *Psidium guajava* L. (guayaba) cultivar “Media China” producido en Zitácuaro, Mich. 100 gr de polvo de hoja, fruto y semilla se sometieron a maceraciones sucesivas con los siguientes solventes: hexano, cloruro de metileno y metanol, una vez obtenidos estos extractos se prepararon suspensiones a 3 concentraciones de 1.5, 0.75 y 0.375 mg/μl los cuales se aplicaron a aislados microbianos silvestres de origen clínico; cinco cepas bacterianas (dos Gram positivas y tres Gram negativas), cinco hongos levaduriformes: Cuatro cepas de *Candida albicans* y una cepa de *C. glabrata*, así como un hongo filamentoso *Colletotrichum acutatum* y un oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. El método utilizado en este estudio para determinar la sensibilidad fue difusión en agar en medio selectivo para cada microorganismo. Se observó que los extractos metanólicos fueron los mejores para inhibir el crecimiento en bacterias, levaduras y hongos. Los compuestos metanólicos (polares) fueron más eficientes contra los microorganismos ensayados por su alto contenido de flavonoides derivados de la quercetina. Los resultados obtenidos fundamentan la utilidad de la hoja y del fruto del guayabo como un recurso medicinal, seguro y eficaz para la posible identificación de los metabolitos secundarios responsables de este efecto.

ÍNDICE

Página

RESUMEN.....	i
ÍNDICE GENERAL.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
I INTRODUCCIÓN	1
II JUSTIFICACIÓN.....	2
III HIPÓTESIS.....	3
IV OBJETIVOS	3
5.1 Objetivo general.....	3
5.1.1 Objetivos específicos.....	3
V MATERIALES Y MÉTODOS	4
5.1 Metodología general.....	4
Figura 5.1.- Preparación de los extractos	4
Figura 5.1.1.- obtención del polvo de guayaba	4
5.2 OBTENCIÓN DE POLVO	5
5.2.1 Selección del fruto.....	5
5.2.2 Lavado	5
5.2.3 Escaldado.....	5
5.2.4 Secado	5
5.2.5 Flotación.....	5
5.2.6 Molienda	6
5.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS	7
5.3.1 Organismos utilizados	7
Figura 5.3.1.- Imágenes de colonias representativas de los hongos en medio de cultivos a) agar sabouroud b) agar papa dextrosa.	8
5.4 MATERIAL VEGETAL	9
5.4.1 Planta.....	9
5.4.2 Colecta de la planta	9

5.4.3 Procesamiento	9
5.4.4 Obtención de los extractos de <i>P.gujava</i>	9
Figura 5.4.4.- equipo para la obtención de extractos a) rotavapor BÜCHI R-114 del IIBQ-UMSNH, b) extractos de hoja	10
5.5 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	10
5.5.1 Inoculación en caldo MuellerHinton	10
5.5.2 Preparación de los extractos y de las sustancias control.....	11
5.5.3 Método difusión en agar para bacterias y levaduras.....	11
5.5.4 Método de difusión para hongos filamentosos y oomicetos.....	12
5.6 ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.....	13
5.6.1 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	14
5.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	15
VI RESULTADOS	16
6.1 Colorímetro	16
6.2 Rendimiento	16
6.3 SELECCIÓN DEL EXTRACTO CON MEJOR ACTIVIDAD MICROBICIDA	17
VII DISCUSIÓN.....	18
VIII CONCLUSIÓN.....	22
IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1.- Preparación de los extractos.....	4
Figura 5.1.1.- Obtención del polvo de guayaba.....	4
Figura 5.2.- Aparatos utilizados en la obtención del polvo.....	6
Figura 5.3.1.- Imágenes de los microorganismos a tratar vistos en microscopio óptico a 40x	7
Figura 5.3.1. Imágenes de colonias representativas de los hongos en medio de cultivos.....	8
Figura 5.4.4.- Equipo para la obtención de extractos.....	10
Figura 5.5.3.- Método de difusión para bacterias y levaduras.....	12
Figura 5.5.4.- Método de difusión para hongos filamentosos y oomicetos.....	13
Figura 5.6.1.- Equipo de RMN DE IIQB.....	15
Figura 7.1.4.1 .- Principales compuestos presentes en la hoja, fruto y semilla de <i>P.guajava</i> L.....	21

ÍNDICE DE CUADROS

Página

CUADRO 5.6.- Mezcla de disolventes utilizados en la cromatografía.....**14**

CUADRO 6.1 .- Escala de color.....**16**

CUADRO 6.2.-Rendimiento de los extractos de *P.guajava*.....**17**

I INTRODUCCIÓN

Psidium guajava L. (nombre común guayaba), es una especie vegetal nativa de algún lugar de América Latina, un árbol domesticado hace más 2,000 años (MAG, 2007) y desde la conquista del Nuevo Mundo ha sido introducido en todo el orbe por los españoles y portugueses (Conabio 1991). En Mesoamérica en lenguaje náhuatl fue conocido como Xalxócotl o *Xalxococuáhuatl* del que se han descrito variedades (Arce Rivera, 2003). El nombre genérico de *Psidium* proviene de la palabra griega “psidion” que significa granada por su semejanza a ese otro fruto (proyecto Guayaba ASERCA, 2010). La guayaba hoy en día es ampliamente distribuida en algunas zonas tropicales y subtropicales tanto en forma silvestre como comercial y es una de las 50 especies frutales más conocidas a nivel mundial. Por su importancia económica y nutrimental se continúa con el mejoramiento de esta especie, generándose nuevas variedades e híbridos con características específicas para su cultivo, procesamiento y consumo.

Aunque existe vasta información agronómica y química de *P. guajava* aún sigue siendo necesario el conocimiento agronómico, fitoquímico y nutrimental de esta especie y sus variedades e híbridos. Para establecer las mejores condiciones de cultivo en nuevas áreas de producción hortícola, selección de propiedades organolépticas del fruto para su consumo en fresco o su procesamiento industrial, para la obtención de sustancias puras y su composición de metabolitos secundarios. Esta especie se encuentra en tal situación en Michoacán, un Estado con vocación frutícola por su suelo y sus climas, donde se ha introducido el cultivo de *P. guajava*, lo que motiva a definir su comportamiento en el cultivo de este árbol económicamente importante, en la producción y procesamiento del fruto y su fitoquímica. El presente trabajo fitoquímico y de moléculas bioactivas se realizó en este contexto, en individuos de *P. guajava* cultivados en el municipio de Zitácuaro, Michoacán.

II JUSTIFICACIÓN

Debido a las propiedades que se le ha dado a este fruto *Psidium guajava* tanto agronómica, fotoquímica, nutrimental y medicinales destacando esta última en las que se ha encontrado actividad antimicrobiana. Es trascendental hacer más investigaciones de estos posibles efectos antimicrobianos pero en las zonas productoras de este fruto, principalmente en Michoacán en la región de Zitácuaro donde su cultivar es la guayaba media china, lo cual nos permitiría aumentar tanto su valor agronómico como medicinal haciéndola más rentable, utilizando distintas cepas bacterianas, hongos y levaduras y con ello poder hacer una comparación de los resultados obtenidos con los reportados por la literatura. Por sus propiedades medicinales, es posible encontrar actividad antimicrobiana en este fruto, por lo que en este trabajo utilizamos a *Psidium guajava* para establecer que posee actividad antibacteriana y fungicida.

III HIPÓTESIS

El uso de *Psidium guajava* para aliviar desordenes digestivos y otras infecciones humanas es debido a que posee componentes con actividad antimicrobiana.

IV OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Psidium guajava*.

5.1.1 Objetivos específicos

- Obtener los extractos de hoja, fruto y semilla de *P. guajava*.
- Determinar la actividad antimicrobiana los extractos.
- Seleccionar el extracto con mejor efecto antimicrobiano.
- Identificar el componente mayoritario del extracto seleccionado

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Metodología general

Figura 5.1.- Preparación de los extractos

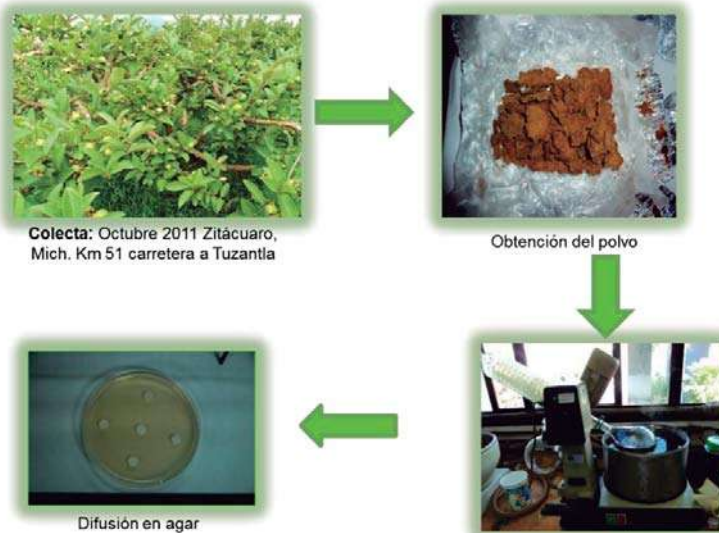


Figura 5.1.1.- obtención del polvo de guayaba



5.2 OBTENCIÓN DE POLVO

5.2.1 Selección del fruto

Las guayabas se seleccionaron en estado verde y maduro, la selección se realizó por inspección visual método visual y por la determinación de color con un colorímetro (color Flex) Fig.-6.2.

5.2.2 Lavado

El fruto se lavó con una esponja con jabón y agua después se sumergieron con 200 μ L de hipoclorito de sodio para 2 L de gua por 5 min para obtener asepsia superficial.

Para la semilla se quita la pulpa del centro y la semilla se colocó con una coladera de plástico con el objetivo de que permita el paso de la pulpa por los orificios. El proceso requiere un constante lavado para obtener semillas limpias.

5.2.3 Escaldado

Las guayabas se cortaron en rebanadas y se colocaron en una olla de peltre y se sumergieron en agua purificada caliente a 100°C por 30 seg con el fin de ablandar la fruta y reducir la carga microbiana en la capa externa de la fruta. Luego del escaldado se efectuó un enfriamiento con agua purificada fría para dar un choque térmico.

5.2.4 Secado

Una vez fríos las rebanadas del fruto se molieron con un molino manual para nixtamal y granos marca estrella hasta la obtención de puré, se colocaron en charolas de aluminio 300 gr se distribuyó uniformemente con un espesor aproximadamente de 2 mm, las charolas se colocan en una estufa (Felisa) a una temperatura de 65°C por 12 h, se almacenaron en frasco hermético para evitar humedad. Mientras que las semillas se secaron en sombra y se seleccionaron las semillas viables mediante el método de flotación.

5.2.5 Flotación

A un recipiente limpio y transparente se le agregó agua hasta un 50% de su capacidad, se le añadieron las semillas secas y se después de 5 minutos, con una coladera se eliminaron las semillas que se encontraban flotando en la superficie. Las semillas

“viables” las que precipitaron al fondo nuevamente son secadas a la sombra, hasta su uso posterior.

5.2.6 Molienda

El fruto deshidratado se trituró en una licuadora Oster hasta la obtención de un polvo fino, la semilla se molió en un molino manual maraca Estrella hasta la obtención de un polvo fino. Fig. 6.2.



Figura 5.2.- aparatos utilizados en la obtención del polvo a) colorímetro (Color Flex); b) Molino manual

5.3 ENSAYOS BIOLOGICOS

5.3.1 Organismos utilizados

Se trabajaron cinco cepas bacterianas aisladas del Hospital civil “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia, Mich, Méx. Las cuales fueron:

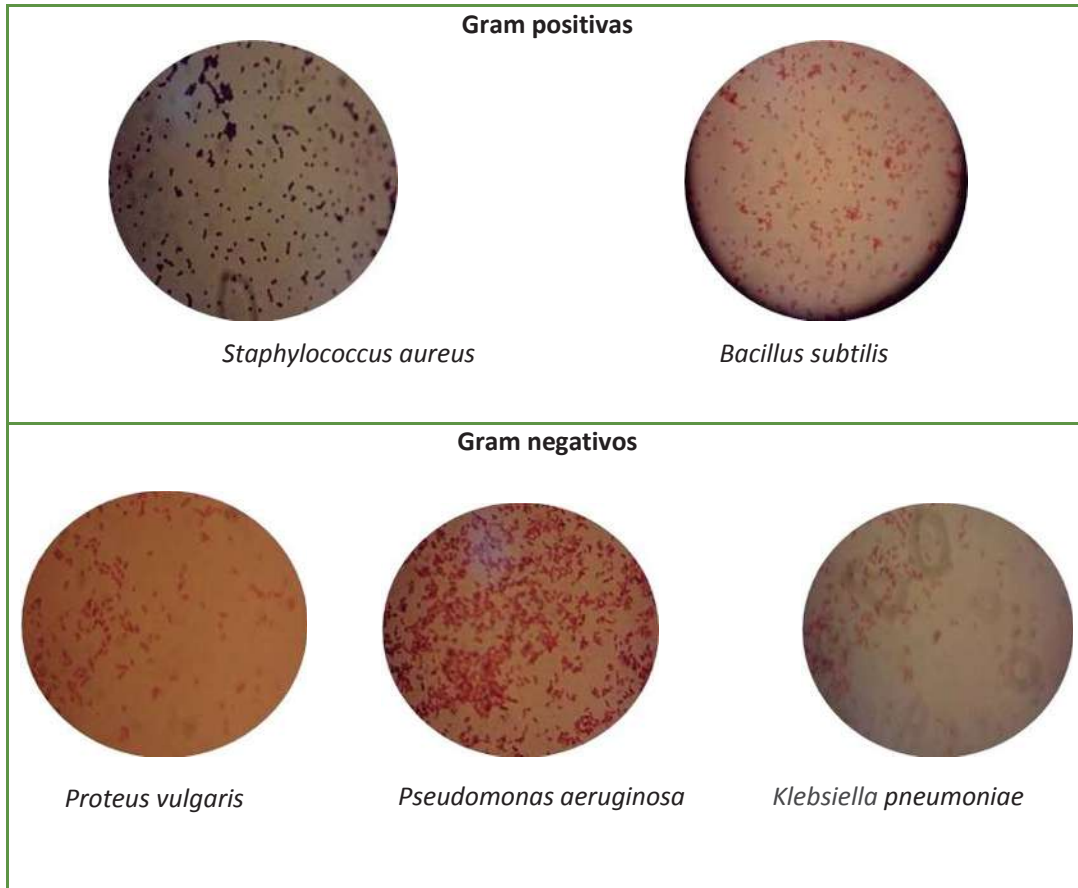


Figura 5.3.1- Imágenes de los microorganismos a tratar vistos en microscopio óptico a 40x.

Hongos

Levaduriformes: *Candida albicans* cepa 1, *Candida albicans* cepa2, *Candida albicans* cepa5, *Candida glabrata*10116 cepa 4, *Candida famata*8016 cepa 3. Obtenidas de la Asociación para Evitar la Ceguera en México I.A.P Hospital “DR Luis Sánchez Bulnes”. México, DF.

Filamentosos: *Colletotrichum acutatum* de plantas de aguacate infectadas

Oomicetos: *Phytophthora cinnamomi* aislados del aguacate.

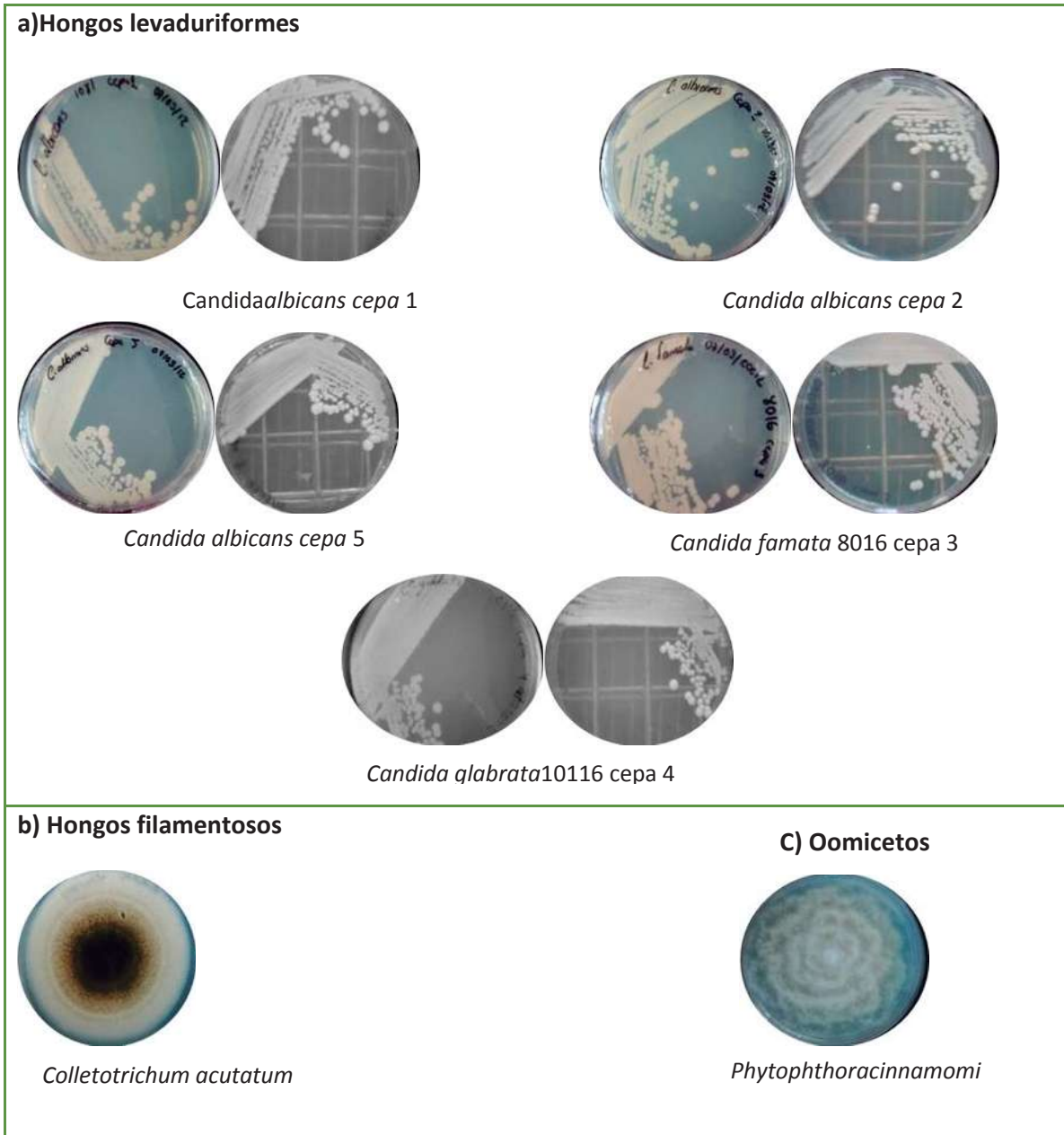


Figura 5.3.1.- Imágenes de colonias representativas de los hongos en medio de cultivos
a) agar sabouroud b) agar papa dextrosa.

5.4 MATERIAL VEGETAL

5.4.1 Planta

Psidium guajava (Media China); hoja y fruto verde y maduro

5.4.2 Colecta de la planta

En el presente trabajo se utilizó hoja y fruto de *P. guajava* (media china), en octubre 2010 la colecta fue realizada en el municipio de Zitácuaro, Mich carretera 51 rumbo a Tuzantla (19° 40.186' N y 100° 38.3105' O), 2500 m de altitud sobre el nivel del mar y un clima semicálido subhúmedo con lluvias. Los extractos se obtuvieron de 115 gr de hoja y 100 gr de fruto y semilla. Una vez colectada la hoja fue secada a la sombra por 7 días.

5.4.3 Procesamiento

Una vez recolectadas las muestras, las hojas fueron secadas a la sombra por 7 días, los frutos se dividieron en verde y madura, las cuales se separaron en completa, cascara y semilla.

5.4.4 Obtención de los extractos de *P.gujava*

Las hojas y el polvo de los frutos se pesaron 115 g y 100 g, respectivamente. Las hojas secas se redujeron de tamaño y se colocaron en frascos de vidrio por separado y se sometió al siguiente procedimiento de extracción.

Los solventes utilizados para la elaboración de los extractos fueron hexano (n-hexano), alcohol metílico (metanol 99.99%) y cloruro de metileno (dicloro metano), todos de grado industrial. Los extractos se obtuvieron con un equipo de rotavapor (BÜCHI R-114). La suspensión se filtró en papel filtro Whatman No 4.

Se adicionó hexano a los frascos que contienen las diferentes muestras, se dejaron macerar por tres días a temperatura ambiente protegidos de la luz, se filtraron y concentraron en un rotavapor a 55 °C. El proceso anterior se realizó tres veces con la

finalidad de agotar componentes no polares, se dejó evaporar el hexano y al resto vegetal se adicionó cloruro de metileno, se dejaron macerar por tres días a temperatura ambiente y protegidos de la luz, se filtraron y concentraron en unrotavapor a 35 °C, este proceso se hizo tres veces hasta agotar componentes de

polaridad intermedia, una vez obtenidos los extractos cloruro metilénicos, se dejó evaporar el disolvente sobrante y entonces al resto vegetal se adicionó alcohol metílico, se maceraron nuevamente por tres días a temperatura ambiente hasta agotar componentes polares y después se filtraron con papel filtro y concentrar en un rotavapor a 65 °C, el procediendo se realizó tres veces para agotar componentes polares.(cuadro)



Figura 5.4.4.- equipo para la obtención de extractos **a)** rotavapor BÜCHI R-114 del IIBQ-UMSNH, **b)** extractos de hoja

5.5 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó Agar MuellerHinton (MH) de la marca BD Bioxon para bacterias, hongos levaduriformes, Agar Sabouraud (AS) y Agar Papa Dextrosa (PDA) para hongos filamentosos y oomicetos, se adiciono 20 ml de agar en cajas de Petri (100 x 55mm), como lo indica el manual de procedimientos de la Clinical and LaboratoryStandarsInstitute (CLSI, 2005), el agar se dejó solidificar incubándolas para prueba de esterilidad 16 h a 37°C.

Para la preparación de caldo MuellerHinton BBL adiciono 5ml en tubos de ensayo estériles.

5.5.1 Inoculación en caldo MuellerHinton

Cada una de las cepas bacterianas fue sembrada en placas de agar MH y utilizadas entre 16 y 20 h de crecimiento con la finalidad de trabajar con células jóvenes como lo marca el manual de procedimientos para la manipulación de microorganismos del CLSI 2005.

Se tomó una colonia aislada de las cepas y se colocó en un tubo de caldo MH el cual se incubó a 37°C hasta obtener una turbidez de 0.5 según la escala de Mc Farland, para asegurarnos que tenemos 1×10^8 ufc/ml.

5.5.2 Preparación de los extractos y de las sustancias control

Cada uno de los extractos se disolvieron en etanol al 96 % (1g/1ml). El control positivo fue cefotaxima con una concentración de (0.125 mg/ μ l) y control negativo etanol (0.8 mg/ μ l). De cada uno se agregó un volumen de 6 μ l, teniendo así:

Extracto (1mg/ μ l), cefotaxima (0.125 μ g/ μ l) y etanol (0.8 mg/ μ l)

5.5.3 Método difusión en agar para bacterias y levaduras

De las cepas sembradas en caldo MH, una vez crecidas y con una turbidez de 0.5, con ayuda de un hisopo estéril se inocularon en cajas de agar MH en forma de césped, a la que se le colocaron 5 discos de papel filtro, a tres de ellos se le adicionaron los extractos a tres diferentes concentraciones, en otro disco se adicionó cefotaxima (control positivo) y por último etanol al 96% (control negativo). Las placas se incubaron a 37°C y se reportaron los halos de inhibición a las 8 y 16 h.

Para los hongos levaduriformes, las levaduras utilizadas fueron resembradas en Agar Dextrosa Sabouraud de la casa comercial BIOXON e incubadas a 37 °C durante 24 h, con la finalidad de obtener cultivos jóvenes. El control positivo utilizado fue fluconazol (0.002 mg/ μ l), se adicionó un volumen de 12 μ l y un control negativo etanol (0.8 mg/ μ l). Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h y el crecimiento fue monitoreado a los 24, 48 y 72 h, Figura 6.5.3

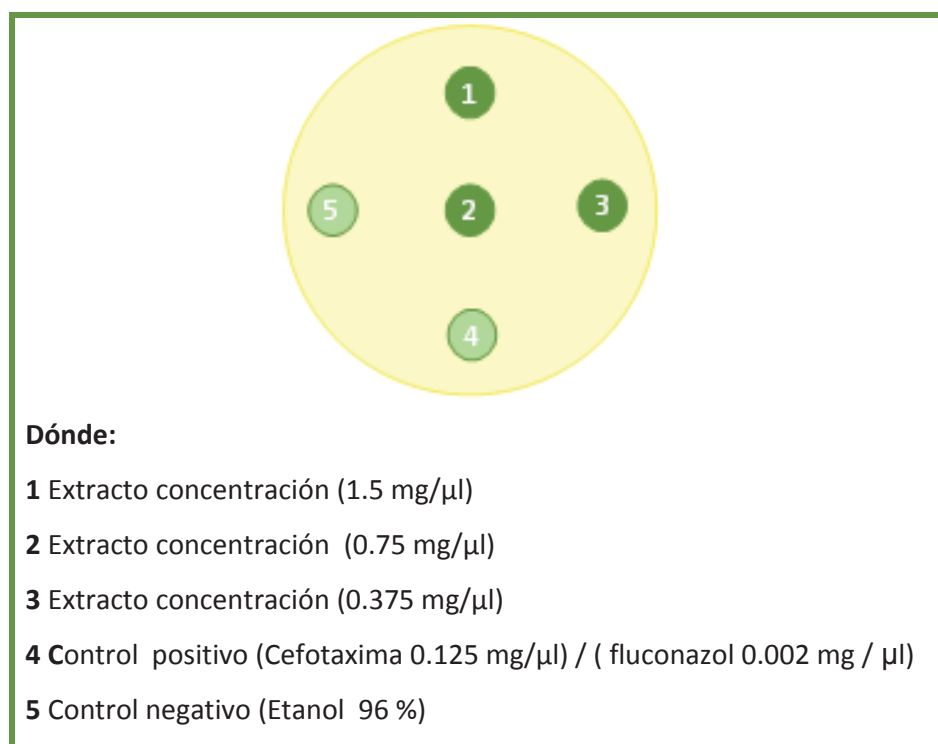


Figura 5.5.3.- Método de difusión para bacterias y levaduras.

5.5.4 Método de difusión para hongos filamentosos y oomicetos

Los hongos fueron resembrados en PDA se crecieron por 7 días protegidos de la luz. Con una cuadrícula se cortaron cuadros del patógeno de 5 mm³, después a las cajas se les adiciono 5 discos de papel filtro por placa, a tres de ellos se le adicionaron los extractos a las tres diferentes concentraciones, en otro disco se adiciono tiabendazol [2-(tiazol-4-il) benzimidazol] (0.001 mg/μl), para el caso de los hongos filamentosos. Mientras que para los oomicetos se utilizó el ácido-(R)-2{(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino} metil éster propiónico (Mefenoxam 0.001 mg/μl) como control positivo y por ultimo etanol al 96%(0.8 mg/ μl) control negativo, de todos ellos se agregaron 6 μl en cada disco, los cuadros de los patógenos se colocaron encima del disco. Las placas se incubaron protegidas de la luz y se reportó en índice de crecimiento al segundo, tercer y cuarto día.

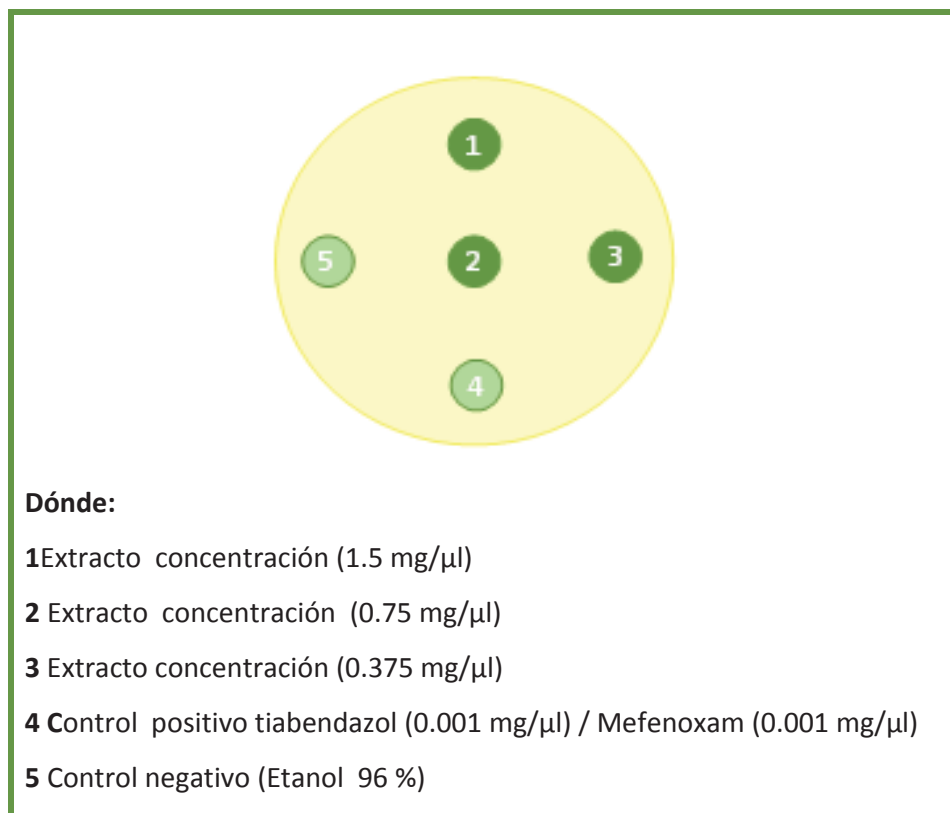


Figura 5.5.4.- Método de difusión para hongos filamentosos y oomicetos

5.6 ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Una vez identificado el extracto con mayor efecto antimicrobiano y con el fin de separar los compuestos, se llevó a cabo una separación por cromatografía en columna, a la columna de virio se le adicionaron 15 gr de gel de sílice (70-230 SIGMA-ALDRICH) humedecida con hexano realizado ese proceso se adicionó el gel enseguida y luego se adicionaron 500 mg de extracto disuelto con un poco de hexano, sobre la muestra se colocó algodón con la finalidad de que la mezcla de disolventes utilizado no llegue directamente a la muestra. Como fase móvil se utilizó mezclas de hexano y acetato de etilo en polaridad ascendente. Cuadro.- 6.6

Se obtuvieron 100 fracciones de 10 ml cada una y se analizaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN) con la finalidad de conocer los compuestos presentes en la muestra. Se recromatografio la fracción 68 y 69 la cual presentaba una coloración

amarilla obscuro, y se analizaron en espectrofotometría de resonancia magnética nuclear.

Cuadro 5.6.- Mezclas de disolventes utilizados en la cromatografía

Volumen total (ml)	Hexano	Cloruro de metileno	Acetato de etilo
150	150	0	0
100	80	20	0
100	70	30	0
100	50	50	0
100	30	70	0
100	10	90	0
100	0	100	0
100	0	80	20
100	0	60	40
100	0	40	60
100	0	20	80
100	0	0	100
100	0	0	80
100	0	0	60
200	0	0	40
200	0	0	20
200	0	0	0

5.6.1 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C fueron obtenidos en un equipo Varian Mercury plus 400, los espectros de Hidrógeno (^1H) se obtuvieron a 400 MHz en ocho repeticiones, la ventana espectral fue de 6,000 Hz, el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado (CDCl_3) y el disolvente de referencia interna fue tetrametilsilano (TMS).



Figura 5.6.1 Equipo de RMN de IIBQ

5.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de forma independiente. El programa Statistic 7.0, fue usado para calcular la significancia de los datos experimentales con la prueba de Tukey $\alpha = 0.01$. El efecto de los extractos sobre el crecimiento de bacterias y hongos levaduriformes se determinó con la medición (mm) de los halos incluyendo el disco, mientras que para hongos filamentosos y oomicetos se determinó el Índice de Crecimiento (IC) de la siguiente manera:

$$IC = Ct / Cc$$

Dónde:

Ct = Crecimiento del hongo filamentosos u oomiceto con extracto.

Cc = Crecimiento del hongo filamentosos u oomiceto con etanol.

Un IC = 1, significa que el crecimiento del hongo es igual al crecimiento del hongo en el control.

IC > 1, significa que el crecimiento del hongo es mayor en el control por lo que no es efectivo.

IC < 1, el crecimiento del hongo es menor y se considera efectivo.

VI RESULTADOS

6.1 Colorímetro

La escala de color del fruto se midió en el colorímetro (color Flex) obteniendo los siguientes resultados:

Los datos se expresan como: **L** = 0 (color oscuro) a 100 (color blanco)

Cuadro 6.1. Escala de color. **a** = - 80 - 0 (color verde); 0 – 100 (color rojo); **b** = 100 a 0 (color azul); 0-70 (color amarillo)

ID	L	a	b
1	40.46	- 6.69	17.58
2	40.82	- 7.51	16.41
3	39.95	- 6.58	16.93
4	38.04	- 7.49	15.30
5	36.97	- 6.17	14.45
6	36.53	-7.23	15.11
7	40.06	- 7.79	17.66
8	42.84	- 7.57	17.77
9	37.30	- 7.14	15.70
10	39.45	-7.76	16.22

6.2 Rendimiento

Se obtuvieron un total de 21 extractos de *Psidium guajava*, con porcentajes de rendimiento de 0.22 del extracto de hoja a 3.00 del extracto de semilla verde con el disolvente hexano, 0.41 del extracto de hoja a 1.44 de semilla verde del extracto cloruro de metileno y de 0.38 del extracto de semilla madura a 13.69 del extracto de cascara verde con el disolvente de metanol, en general los extractos que presentaron mayor rendimiento fueron los metanólicos, seguidos de los cloruro de metileno y por último los hexánicos, Cuadro 6.2.

Cuadro 6.2 Rendimiento de los extractos de *P. guajava*

Muestras <i>P. guajava</i>	Extractos					
	Hexano		Cloruro de metileno		Metanol	
	Extracto total (g)	Rendimiento (%)	Extracto total (g)	Rendimiento (%)	Extracto total (g)	Rendimiento (%)
Hoja	0.22	0.1933	0.47	0.41	7.07	6.19
Completa madura	–	–	–	–	11.00	11.00
cáscara madura	–	–	–	–	7.93	8.91
Semilla madura	2.53	2.60	1.04	1.05	0.38	0.48
Completa verde	–	–	–	–	13.20	13.20
Cáscara verde	–	–	–	–	11.88	13.69
Semilla verde	3.00	3.00	1.44	1.44	0.38	0.51

6.3 SELECCIÓN DEL EXTRACTO CON MEJOR ACTIVIDAD MICROBICIDA

Se observó que los extractos metanólicos de hoja de *Psidium guajava* fueron los mejores para inhibir el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos presentando un efecto bactericida en todas las cepas bacterianas analizadas principalmente en las Gram negativas. Así como un efecto fungicida en las candidas, los extractos hexánicos y cloruro de metileno no presentaron ningún efecto.

VII DISCUSIÓN

Al analizar los resultados obtenidos por el método de difusión en agar, se corroboró que esta metodología es la correcta para evaluar de manera cualitativa y rápida la posible actividad antimicrobiana de diversos extractos naturales como lo señalaron Fisher y Philips (2006). Al evaluar los resultados obtenidos debemos tener en cuenta parámetros para que los resultados obtenidos sean comparables con la literatura son: concentración el inóculo bacteriano, medio de cultivo, incubación y concentración. Asimismo, se debe considerar la solubilidad ya que la no presencia de halos o halos muy pequeños de inhibición puede darse a la insolubilidad de algunos compuestos.

En lo referente a los resultados de la actividad inhibitoria de los extractos metanólicos mediante el método de difusión sobre bacterias podemos señalar que el extracto de hoja, fruto completo y semilla de los dos estados de maduración presentaron los mayores valores de inhibición frente a bacterias Gram negativas concretamente *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, mientras que los valores más bajos de inhibición se obtuvieron en *P. vulgaris* y *B. subtilis*. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado sobre el efecto inhibitorio de extractos de hoja de *P. guajava* contra diversas bacterias por el método de difusión en disco (Qa'danet *al.* 2005) en el que ensayaron distintas especies de *Staphylococcus* encontraron que las zonas de inhibición fueron de 11.3-15.7 mm para *S. aureus*, obteniendo nosotros un halo de inhibición de 6.2 mm. Por otro lado, Martínez *et. al* (1997) encontraron que el extracto metanólico al 40% de *P. guajava* presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*. Colliereet *al.*, (1949) también observaron que el extracto acuoso inhibió el crecimiento de *S. aureus*.

Los extractos acuosos y alcohólicos de *P. guajava* inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *B. cereus*, *Proteus spp*, *Shigella spp* y *E. coli*, utilizando el método de difusión (Chah *et al.*, 2006).

La actividad antibacteriana de los extractos metanólicos se debe a los componentes activos que posee y entre los que destacan: grupos de flavonoides derivados de la

quercetina y morina, ácido guavanoico, ácido guavacumarico, ácido 2 α -hidroxiosilico, β -sitosterol-3-O- β -D-glucoparanosido (Begum *et al.*, 2002), entre otros y que la mezcla de quercetina, quercitrina y morina poseen una potente actividad inhibitoria del crecimiento de los cultivos de *Salmonella* y *Bacillus* (Arima *et al.* 2002). Estos hallazgos explican, al menos en parte, el uso de la hoja de guayabo en forma de infusión para curar úlceras y otras afecciones leves de la piel mediante la aplicación tópica o lavados. Además sugiere que la capacidad antimicrobiana del extracto cuando es rico en flavonoides influye positivamente en su uso como antidiarreico, en vista del papel infeccioso que los mencionados microorganismos generan. Se sabe poco sobre la actividad de extractos de *Psidium guajava* sobre *Klebsiella pneumoniae*.

En el caso del fruto se han realizado investigaciones del aceite esencial extraído de los frutos de guayaba el cual presenta el (21.4 %) de 3-cariofileno, nerolidol (17.3 %), 3-fenilpropil acetato (5.3%) y óxido de cariofileno (5.1 %) (Paniandy *et al.*, 2000). La presencia de estos componentes puede explicar la actividad antimicrobiana del fruto. La baja actividad del fruto maduro pudiera deberse como lo cita (Jainet *al.* 2003) en el que la actividad de la α -amilasa se encuentra disminuida significativamente en esta etapa de maduración del fruto, la clorofila, la celulosa y la hemicelulosa y el contenido de carotenoides también se encuentra disminuida, presentando solo un aumento de la lignina (Jainet *al.*, 2003).

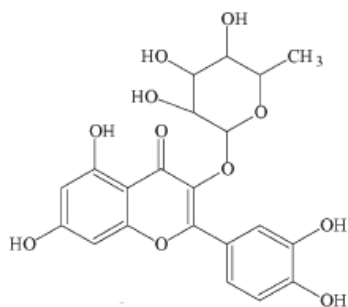
Al evaluar los resultados se observó que el extracto metanólico de hoja fue el que produjo mayor actividad antifúngica seguido en orden descendente de actividad el extracto de semilla y completa verde con halos de inhibición que van de 0.33 a 14.66 mm. Estos datos concuerdan con los reportados en la que comprobaron que los flavonoides presentes en la hoja son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Cándida albicans* (Cáceres 1993)

El análisis bioquímico preliminar reveló la presencia de flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos; los cuales podrían explicar la actividad biológica de la planta. La quercetina y aceites esenciales (Hwang *et al.*, 2004), flavonoides y saponinas tienen propiedades bactericidas y fungicidas (Arima y Danno, 2002).

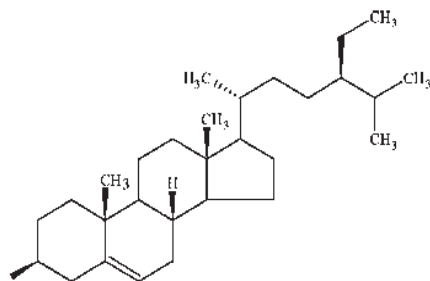
En el caso de la semilla contienen 14 % de aceite, 15 % de proteínas, 13 % de almidón (Burkill, 1997) así como compuestos fenólicos y flavonoides incluyendo la quercetina-3-O-d-(2-O-galoiol-glucosido)-4-O-vinil propionato, ácido arjunolico (Michael et al., 2002) lo cual pudiera explicar su actividad. Fig.7.1.4.1

La tintura de raíz y hoja sometida in vitro a pruebas de sensibilidad por dilución en concentraciones de 5 al 15 % se observó una mayor eficacia en los hongos *Trichophyton rubrum*, *Microsporumfulvum*, *M. gypseum* y *Candida albicans*. Lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos en la que se observó actividad fungicida en las cándidas.

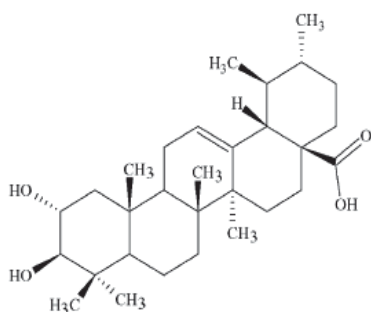
En los extractos hexánicos y metanólicos de hoja se pudo observar índices de crecimiento menores que 1 lo que nos indicó que fueron efectivos nuestros extractos contra *P.cinnamomi*. En el caso de *Colletotrichum acutatum* fue efectivo para los tres tipos de extractos hexánico, cloruro de metileno y metanol no se ha encontrado en la literatura algún efecto de estos extractos contra hongos por lo que es un hecho relevante. En el caso de los hongos presentó el extracto metanólico de hoja los índices de crecimiento más mayores.



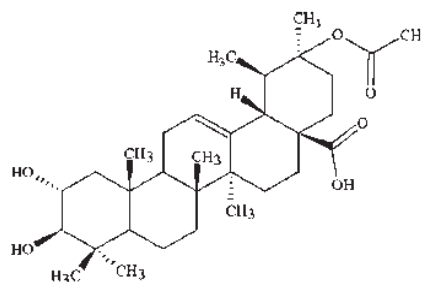
Quercitrina (hoja y fruto Liang et al.2005)



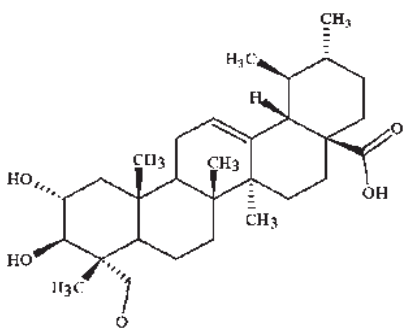
B-sitosterol (hoja y fruto Begum et al. 2002)



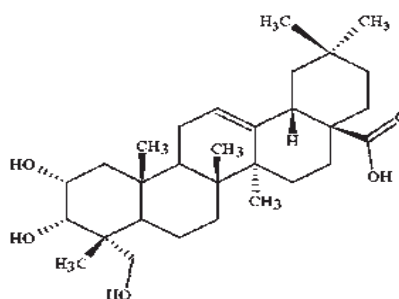
2α-hidroxiurosilico
(hoja y fruto Begum et al., 2002)



Ácido guavanoico (hoja y fruto Begum et al., 2004)



ácido guavacumarico (hoja Begum et al., 2002)



Ácido urjunolico (semilla Salibet al., 2004)

Figura 7.1.4.1 Principales compuestos presentes en la hoja, fruto y semilla de *P. guajava*

VIII CONCLUSIÓN

Los extractos metanólicos de hoja de guayaba presentaron efecto bactericida, bacteriostático y antifúngico en los microorganismos analizados, siendo la hoja la mejor parte de la planta. Los extractos hexánicos y cloruro de metileno no presentaron ninguna actividad y se comprobó que la guayaba contiene compuestos químicos con actividad antimicrobiana.

IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Neutraceuticos. Argentina. Editorial CORPUS.570-575.
- Arima H, Ashida H, Danno G. 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *BiosciBiotechnolBiochem*. **66**:1099-1014.
- Arima H, Danno G. 2002. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L) and their structural elucidation. *BiosciBiotechnolBiochem*. **66**:1727-1730
- Begum S, Hassan SI, Siddiqui BS, Shaheen F, Ghayur MN, Gilani AH, 2002. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry* 61, 399–403.
- Berdy J, Aszalo A, Bostian M, McNitt K. 1982, CRC Handbook of antibiotic compounds, Boca Ratón, CRC Press.
- Bernal H, Correa J. 1998. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Tomo XII. Editora Guadalupe Ltda. Colombia. 177-192.
- Buhner SA. 2002. Antibióticos naturales. Barcelona: Ediciones Obelisco.191-196.
- Burkill HM. 1985. The Useful Plants of West Tropical Africa, Royal Botanic Gardens, **(4) 1**: 45–50.
- Burkill HM (1997). The useful plants of tropical West Africa.4 3rd Ed .Royal Botanic Gardens Kew. 166-179
- Cáceres A, Fletes L, Aguilar L, Ramírez O, Figueroa L, Taracena AM, Samoya B. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **38**:31-38.
- Cáceres A, Samayoa B. 1989. Tamizaje de la actividad antibacteriana d plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. *Cuadernos de Investigación*, **6(89)**:138.
- Cáceres A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 89, 90, 194-197, 335, 336.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The fungi. 2º edition Academic Press. San Diego, San Francisco, New York.635-640.
- Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO. 2006. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **104**: 164-167.
- Colliere WA. The antibiotic actions of plants, specially the higher plants, results whit Indonesian plants .*Chronic of Nature* 1949; **105**:8-19.
- Dinesh MR, Iyer CPA. 2005. Significant research achievements in guava Improvement and future needs. In: *Souvenir 1st International Guava Symposium*. Lucknow, India. 7-16.

- El-Kadem H, Mohammed YS. 1958. Constituents of the leaves of *Psidium guajava*. Part II. Quercetin, avicularin and guajaverin. J. Chem. Soc. **(6)**:3320-3324.
- Fisher K, Phillips CA. 2006. The effect essential oils and their components on the survival *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. J. Appl. Microbiol. **101** **(6)**:1232-40.
- Fries BC, Casadevall A. 2001. Fungal infections in humans. Encyclopedia of life sciences. Nature Pub Group: 1-9.
- García MA, Lin H Stanley, Chang D. 2003. El cultivo de la guayaba taiwanesa. San Andrés, SV, MAG. Sp.
- Gómez-Leal A, González Ochoa A. 1969, "Micosis oculares. Introducción," *Archivos la Asociación para Evitar la Ceguera en México*, **11**(55):105-106.
- Hwang JS, Yen YP, Chang MC, Liu CY. 2004. Extraction and identification of volatile components of guava fruits and their attraction to Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*(Hendel). Plant Protection Bulletin **44**:279-302.
- Jain N, Dhawan K, Malhotra S, Siddiqui S, Singh R. 2003. Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava*L.). Compositional and Enzymatic Changes **58**:309-315.
- Krcméry V, Barnes AJ. 2002. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect, **50**:243-260.
- 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. Journal European of Mass Spectrometry **11**: 93-101.
- Lipschit M. 1995. Fears growing over bacteria resistant to antibiotics. New York Times 12 Sep. C1.
- López Austin A, García Quintana J. 1989. Fray Bernardino de Sahagún, *Historia general de las cosas de Nueva España*, introducción, paleografía, glosario y notas México, CONACULTA-Alianza editorial Mexicana 1999 **(2)**:743-744.
- López Martínez R. 2000. Las micosis en la época del SIDA. RevMed IMSS **38**: 421-423.
- Lozoya X. 1999 CONACULTA. La herbolaria en México. México,.25
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, SV); FRUTALES (Programa Nacional de Frutas de El Salvador); IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, CR). 2007. Guayaba. SV. s.p.
- Machado A. 1950, Infecciones oculares producidas por hongos. *Anales de la Sociedad Mexicana de Oftalmología*, **25**: 61-95.
- Manica I, Icuma IM, Junqueira NTV, Salvador JO, Moreira A, Malavolta EC. 2000. Fruticultura Tropical: Goiaba. Ed. Porto Alegre, RS, Cinco Continentes. 26, 30-33, 35.
- Marín-Larreal M. 2004. Investigación y producción del guayabo en Venezuela. Revista del VIII Congreso Venezolano de Fruticultura. Maracaibo Venezuela. 126-136.

- Marks GC, Smith IWI. 2004. *Phytophthora cinnamomi* Management Strategy, 6-8.
- Marquina V, Araujo L, Ruiz J, Rodriguez-Malavera A, Vit P. 2008. Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba. Archivos latinoamericanos de nutrición, órgano oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición 1(59): 98-102.
- Martínez N. 2003. Las plantas medicinales (segunda parte). Sociedad Latinoamericana de Nutrición, capítulo venezolano. *Boletín de Nutrición Infantil CANIA*, **8**:35-38.
- Martínez M J, Molina N, Boucourt E. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidiumguajava*L. (Guayaba). Rev Cubana de Plant Med**2 (1)**: 12 –14.
- Mata B.I., Rodríguez, MA. 2000. Cultivo y producción de guayaba. Ed, Trillas. México DF. 22-40, 50-51, 95-130, 160.
- Michael HN, Salib JY, Isaac MS. 2002. Acylatedflavonol glycoside from*Psidiumguajava* L. seeds.Pharmazie**57**: 859–860.
- Negi SS, Rajan S. 2005.Improvement of guava through breeding. In: Souvenir 1st International Guava Symposium. Lucknow, India.1-6.
- Olaya JA. 2009, Estudio del contenido de fenoles y su actividad antioxidante en 3 variedades de guayaba (*Psidium guajava* L) colombiana en diferentes estados de madurez. Tesis de maestría. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Paniandy JC, Chane MJ, Pieribattesti JC. 2000. Chemical composition of the essential oil and headspace solid-phase micro extraction of the guava fruit (*Psidiumguajava*L.). Journal of EssentialOilResearch**12**:153–158.
- Perales de la Cruz MÁ, Padilla Ramírez JS, Gaona González E, Phillips Reyes HR.2005. Manual para la producción integral del cultivo de la guayaba.6-13,92-94.
- Qa'dan F, Thewaini A-J, Ali DA, Afifi R, Elkhawad A, Matalka KZ. 2005. The Antimicrobial Activities of *Psidumguajava*and *Juglansregiale*leaf extracts to acne developing organisms. The American Journal of Chinese Medicine **33(2)**: 197 – 204.
- Regalado Contreras L. 1999. Papel de la enzima fosfatidatofosfatasa y los niveles de antioxidantes naturales presentes en el fruto de guayaba (*Psidiumguajava*) durante la generación de daños por frío en frutos pretratados hidrotermalmente.
- Saalwachter AR, Hedrick T, Sawyer RG. 2006. The other fungi: it's not just *Candida albicans* anymore. Surg Infect (Larchmt) **7**:143-150.
- Salib JY, Michael HN. 2004. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guaivaseeds*. Phytochemistry **65**: 2091–2093.
- Samson JA. 1991. Fruticultura tropical. Trad. B Gurza González. ed. México, D.F, Limusa. 35-39, 321-325.
- SIAP-SAGARPA. 2010. Sistema de información agropecuario. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Smith Royer M, SiwatibauSuliana. 1975. Sesquiterpene hydrocarbons of Fijian Guavas, Phytochemistry, **14**:2013-2015.

TheuwissenElke, Monsink Ronald. 2008. Water soluble dietary fiber and cardiovascular disease. *Physiology & Behavior*, **94**: 285-292.

Vieira RH, Rodríguez DP, Goncalves FA, Menezes FG, Aagao JS, Sousa OV. 2001. Microbicidal effect of medicine plants extracts (*Psidiumguajava* and *Carica papaya*) upon bacteria isolated from fish muscle and known to indice diarrhea in children. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **43**: 145-148.

W Elmer Koneman, 2006 Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas a color. Ed panamericana.

Wei L, Li Z, Chen B. 2000. Clinical estudy on treatment of infantile rotaviral enteritis with *Psidiumguajava*. **20**:893-895.

White T, Marr K, Bowden R. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* **11**: 382–402.

Wills R, Lee H, McGlasson B, Graham D. 1997.Fisiología y manipulación de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. Acribia, Zaragoza. 143-146.

World Health Organization, 2008.The World Health report. Life in the 21st century: a vision for all, 2. Measuring health. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 39–60.

Zeledon Rafael, Wan Fuh J. 1994 El cultivo de la guayaba Cañas Guanacaste, Costa Rica.3

Consultas de internet

http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/52-myrt3m.pdfAtlas de las plantas de la medina Tradicional Mexicana,

<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/r13-clsi - nccls standard 2005.pdf>