



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACIÓN DE UN EXTRACTO DE HOJAS DE
PSIDIUM GUAJAVA L. Y SU EFECTO EN LOS NIVELES
DE ÓXIDO NÍTRICO EN RATAS HIPERTENSAS**

PRESENTADA POR:

M.C.T.M. JULIO CÉSAR CAMARENA TELLO

**TESIS PROPUESTA COMO CUMPLIMIENTO PARCIAL DE
LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

Director de tesis

D.C. Héctor Eduardo Martínez Flores

MAYO DE 2019, MORELIA, MICH., MÉXICO



Dedicatoria

A mis hijos esperando que les sirva de ejemplo y motivo de superación

y

A mis padres por su ejemplo de vida

Agradecimientos

A Dios por darme vida para concluir el presente proyecto.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme la oportunidad de formarme académicamente.

Un agradecimiento especial a todos los miembros de la mesa de sinodales por su destacada forma de guiarme en el presente proyecto.

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

Dr. Francisco Alfredo Saavedra Molina

Dra. María Carmen Bartolomé Camacho

Dr. José Saúl Padilla Ramírez

Dr. Rosalio Mercado Camargo

Al CONACYT por la Beca Nacional otorgada para la manutención durante el presente proyecto.

Al INIFAP-CEPAB- Sitio Experimental “Los Cañones” por facilitar la materia prima para el presente proyecto.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas UMSNH

A mis colegas, familiares y amigos.

Tabla de contenido

Tablas, ecuaciones y figuras.....	iii
Índice de abreviaturas.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
1.0 Introducción.....	1
2.0 Justificación.....	6
3.0 Hipótesis.....	6
4.0 Objetivos.....	6
4.1 Objetivo general.....	6
4.2 Objetivos particulares.....	7
5.0 Materiales y métodos.....	8
5.1 Obtención de muestras.....	8
5.2 Extracción de las fracciones.....	8
5.3 Cuantificación de polifenoles totales.....	9
5.4 Cuantificación de flavonoides totales.....	9
5.5 Capacidad de atrapamiento del radical hidroxilo.....	10
5.6 Capacidad de atrapamiento del radical ABTS.....	10
5.7 Capacidad de atrapamiento del radical DPPH.....	11
5.8 Atrapamiento radical ORAC FL.....	12
5.9 Obtención de extractos acuosos administrados.....	13
5.10 Animales.....	13
5.11 Modelo hipertenso.....	13
5.12 Tasa de crecimiento.....	14
5.13 Obtención de suero, tejidos y su homogenizado.....	14
5.14 Ensayo Súper Óxido Dismutasa SOD.....	15
5.15 Ensayo de Glutación.....	15
5.16 Ensayo catalasa.....	16
5.17 Óxido nítrico equivalente a nitratos más nitritos (NOx).....	16
5.18 Peroxidación de lípidos (TBARS).....	17
5.19 Urea.....	17

5.20 Creatinina	17
5.21 Análisis estadístico	17
6.0 Resultados	19
6. 1 Capitulo 1 Quatification of Phenolic Compounds and In Vitro Radical Scavenging Abilities with Leaft Extracts from Two Varieties of <i>Psidiun guajava</i> L.....	19
7.0 Resultados generales	33
7.1 Polifenoles totales.....	33
7.2 Flavonoides totales	34
7.3 Radical hidroxilo	35
7.4 Radical ABTS.....	36
7.5 Radical DPPH	38
7.6 Atrapamiento radical ORAC-FL.....	39
7.7 Análisis de correlación entre los compuestos fenólicos y la capacidad de atrapamiento de los radicales.	40
7.8 Tasa de crecimiento	41
7.9 Súper óxido dismutasa SOD	42
7.10 Glutación.....	45
7.11 Catalasa	49
7.12 Óxido nítrico equivalente a nitratos más nitritos (NOx)	51
7.13 Peroxidación de lípidos (TBARS).....	54
7.14 Urea.....	56
7.15 Creatinina	57
8.0 Discusión de resultados generales.....	58
9.0 Conclusiones generales.....	61
10.0 Trabajos complementarios	62
10.1 Artículo de divulgación.....	62
11.0 Bibliografía	67

Tablas, ecuaciones y figuras

Tabla 1. Polifenoles totales.	34
Tabla 2. Flavonoides totales	35
Tabla 3. Atrapamiento del radical hidroxilo	36
Tabla 4. Atrapamiento radical ABTS	37
Tabla 5. Atrapamiento radical DPPH	38
Tabla 6. Atrapamiento ORAC	39
Tabla 7. Correlación entre los ensayos.	41
Tabla 8 Tasa de crecimiento de las ratas en los diferentes tratamientos.	42
Tabla 9. Actividad de la SOD en la aorta, riñones y corazón en los diferentes tratamientos.	43
Tabla 10 Glutación total, oxidado, reducido y su índice, en tejidos de riñones y corazón de ratas en los diferentes tratamientos.	45
Tabla 11. Actividad de la catalasa, en tejido de corazón y riñones de ratas en los diferentes tratamientos.	50
Tabla 12. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en tejido de aorta, corazón, riñones y suero de ratas en los diferentes tratamientos.	52
Tabla 13. Concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido de corazón y riñones de ratas en los diferentes tratamientos.	54
Tabla 14 Concentración de urea en suero de ratas en los diferentes tratamientos.	56
Tabla 15 Concentración de creatinina en suero de ratas en los diferentes tratamientos.	57
Ecuación 1: Actividad de atrapamiento radical hidroxilo	10
Ecuación 2: Área bajo la curva	12

Ecuación 3: Tasa de crecimiento. 14

Figura 1. Tasa de crecimiento de las ratas en los diferentes tratamientos. 42

Figura 2. Actividad de la SOD en la aorta en los diferentes tratamientos. 43

Figura 3. Actividad de la SOD en los riñones en los diferentes tratamientos.
44

Figura 4. Actividad de la SOD en corazón en los diferentes tratamientos. 44

Figura 5. Glutación total en tejido de riñones de ratas, en los diferentes tratamientos.
46

Figura 6. Glutación oxidado en tejido de riñones de ratas, en los diferentes
tratamientos. 46

Figura 7. Glutación reducido en tejido de riñones de ratas, en los diferentes
tratamientos. 47

Figura 8. Índice de glutación en tejido de riñones de ratas, en los diferentes
tratamientos. 47

Figura 9. Glutación total en tejido de corazón de ratas, en los diferentes tratamientos.
48

Figura 10. Glutación oxidado en tejido de corazón de ratas, en los diferentes
tratamientos. 48

Figura 11. Glutación reducido en tejido de corazón de ratas, en los diferentes
tratamientos. 49

Figura 12. Índice de glutación en tejido de riñones de ratas, en los diferentes
tratamientos. 49

Figura 13. Actividad de la catalasa, en tejido de corazón de ratas en los diferentes
tratamientos. 50

Figura 14. Actividad de la catalasa, en tejido de riñones de ratas en los diferentes
tratamientos. 51

Figura 15. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en tejido de aorta de ratas
en los diferentes tratamientos. 52

Figura 16. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en tejido de corazón de ratas
en los diferentes tratamientos. 53

Figura 17. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en tejido de riñones de ratas en los diferentes tratamientos. 53

Figura 18. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en suero de ratas en los diferentes tratamientos. 54

Figura 19. Concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido de corazón de ratas en los diferentes tratamientos. 55

Figura 20. Concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido de riñones de ratas en los diferentes tratamientos. 55

Figura 21. Concentración de urea en suero de ratas en los diferentes tratamientos. 56

Figura 22. Concentración de creatinina en suero de ratas en los diferentes tratamientos. 57

Índice de abreviaturas

OMS	Organización mundial de la salud
ECV	Enfermedades cardiovasculares
PA	Presión arterial
ERO	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Súper óxido dismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH Total	Glutación total
GSSG	Glutación oxidado
GSH	Glutación reducido
GSH/GSSG	Índice de glutación

Resumen

La hipertensión es un problema de salud pública mundial, para su control se han establecido diferentes tratamientos farmacológicos y recomendaciones de una mejora en el estilo de vida. También se ha visto que, si se tiene el control de la presión arterial elevada, esto puede contribuir a la reducción de la morbilidad y mortalidad por accidente cerebro vascular y la enfermedad cardíaca coronaria. Se sabe que los polifenoles presentes en los alimentos contribuyen en la disminución de la presión arterial elevada. En el presente estudio se evaluó la concentración de los polifenoles en diferentes fracciones provenientes de hojas de guayabo (*P. guajava* L.) de las variedades Hidrozac y Calvillo Siglo XXI, observándose que la variedad Calvillo Siglo XXI destacó al presentar una mayor concentración, sin embargo, en las pruebas de atrapamiento de radicales la fracción acuosa de la variedad Hidrozac respecto a la fracción acuosa Calvillo Siglo XXI, tuvo un mejor desempeño en el ensayo ORAC. En el modelo *in vivo*, ambas variedades mostraron un desempeño parecido, sin embargo, en las concentraciones de las TBARS la variedad Hidrozac mostro una disminución en corazón y riñones respecto a Calvillo Siglo XXI en el tratamiento con L-Name. Ambas variedades de guayabo aumentaron la actividad de la SOD, CAT lo que se relacionó con el aumento del glutatión reducido y una disminución de las TBARS. Con lo anterior se puede concluir que la hipótesis planteada es aceptada, ya que los extractos acuosos de las dos variedades de guayabo aumentaron las concentraciones de óxido nítrico en el modelo *in vivo* con L-Name.

Palabras clave: *Psidium guajava* L; Guayabo; Hipertensión; L-Name; Índice de glutatión.

Abstract

Hypertension is a global public health problem, for its control have been established different pharmacological treatments and recommendations for an improvement in lifestyle. It has also been seen that, if one has control of high blood pressure, this can contribute to the reduction of morbidity and mortality due to stroke and coronary heart disease. It is known that polyphenols present in foods contribute to the decrease in high blood pressure. In the present study, the concentration of polyphenols in different fractions from guava leaves (*P. guajava* L.) of the varieties Hidrozac and Calvillo Siglo XXI was evaluated, observing that the Calvillo Siglo XXI variety stood out when presenting a higher concentration, however, in the radical trapping tests, the aqueous fraction of the Hidrozac variety compared to the Calvillo Siglo XXI aqueous fraction, had a better performance in the ORAC assay. In the *in vivo* model, both varieties of guava in their aqueous fraction showed a similar performance, however, in the concentrations of the TBARS, the Hidrozac variety showed a decrease in heart and kidneys compared to Calvillo Siglo XXI in the treatment with L-Name. Both varieties of guava increased the activity of SOD, CAT, which was related to the increase of reduced glutathione and a decrease in TBARS. With the above, it can be concluded that the hypothesis is accepted, since the aqueous extracts of the two guava varieties increased the concentrations of nitric oxide in the *in vivo* model with L-Name.

Keywords: *Psidium guajava*; Guayabo; Hypertension; L-Name; Glutathione index.

1.0 Introducción

A nivel mundial la región de África es la de mayor prevalencia de la hipertensión, mientras que la región de las Américas es la de menor prevalencia. Una de las causas por las cuales la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la hipertensión es un problema de salud pública mundial, es debido a que hace una previsión de la evolución de la mortalidad y considera que las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte, prediciendo un aumento del 23% para el 2030 [1].

La hipertensión en México para el 2012 tuvo una prevalencia del 31.5%, de las personas diagnosticadas hipertensas, casi la mitad desconocía que padecía esta enfermedad, además se detectó que a pesar de estar en tratamiento farmacológico las personas, no aumentó el porcentaje de población bajo control. [2]

Las personas que se consideran hipertensas es debido a que sus valores de presión arterial (PA) son $>140/90$ mm Hg. Esta condición tiene ciertas limitantes ya que los valores de la PA son diferentes durante el día y la noche. Por lo que es necesario realizar mediciones ambulatorias y muy específicas en las diferentes horas y actividades de la persona, para realizar un mejor diagnóstico [3].

Un modelo biológico que puede ser usado para el estudio de la hipertensión, es el deficiente por óxido nítrico, para lo cual se utiliza L-Name (Clorhidrato de éster metílico de Nw-nitro-L-arginina). El L-Name es un inhibidor reversible usado como un sustituto de la L-arginina. Su acción consiste en substituir en una o en ambas terminales guanidino de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) ocasionando una disminución del ON. Se utiliza en modelos agudos o de largo plazo, para investigar la restricción del ON en desordenes cardiovasculares. La administración por largo periodo a diferentes dosis de L-Name en ocasiones produce hipertrofia del ventrículo izquierdo, el cual no está relacionado con la dosis [4]. Se tiene bien establecido que el mecanismo para contrarrestar la vasoconstricción por la disminución del ON en los modelos con L-Name, es mediante el factor

hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), el cual aumenta la conductancia del potasio (K^+) con lo que se genera la propagación de la despolarización de las células del músculo liso vascular y se da la relajación. También en los modelos de hipertensión generados por deficiencia de ON por L-Name se usa el fármaco captopril como control positivo, dicho fármaco inhibe a la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) la cual está asociada con la vasoconstricción [5] [6].

La hipertensión está asociada con la disfunción endotelial causada por la inflamación de la pared arterial, los factores principales implicados en la disfunción endotelial son, las especies reactivas de oxígeno (ERO), la angiotensina II y la disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (ON). [7]

El óxido nítrico es producido por la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) durante la oxidación del sustrato del amino ácido L-arginina por L-citrulina. En células de mamífero la encontramos en tres distintas isoformas: endotelial eNOS o NOS III, neuronal nNOS o NOS I e inducible iNOS o NOS II. De las tres, principalmente, la eNOS y la nNOS están implicados en la regulación del tono vascular y la presión de la sangre. En el endotelio vascular, la eNOS convierte la L-arginina en óxido nítrico el cual se difunde por el músculo liso vascular adyacente donde son activadas una serie de G-quinasas terminando en la vasodilatación. Cuando el óxido nítrico deja de regular el tono vasomotor periférico y la presión de la sangre, contribuye a la hipertensión. [8]

Las principales enzimas antioxidantes que ayudan a reducir el estrés oxidativo son: la súper óxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). La SOD prevé la acumulación del anión súper óxido al disminuirlo en peróxido de hidrógeno. El anión superóxido forma al anión peroxinitrito al reaccionar con el ON. Las personas con ECV presentan una disminución de la actividad de la SOD. La GPx además de regular al peróxido de hidrógeno, junto con la CAT, transforman la peroxidación de los lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos en sus compuestos hidroxilados, que son menos reactivos. La GPx utiliza glutatión reducido (GSH) el cual dona un protón de hidrógeno quedando como glutatión oxidado (GSSH). La

disminución de la actividad de la GPx se asocia también con una disminución de la actividad de la SOD y la CAT en personas con obesidad [9].

Alimentos como la leche, ajo, cebolla y Té son capaces de ayudar en el control o atenuación de la hipertensión. Los compuestos principales de estos alimentos ayudan a reducir la PA, aumentando los niveles de óxido nítrico e inhibiendo a la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) [10]. Los polifenoles de los alimentos son los que principalmente son considerados en tener un efecto en la hipertensión. El mecanismo del efecto de los flavonoides en la hipertensión ha sido muy bien documentado, los cuales incrementan la biodisponibilidad del ON, al regular la activación de la óxido nítrico sintasa (ONS) y la inhibición de la NADPH oxidasa. El mejoramiento de la disfunción endotelial y un incremento de la biodisponibilidad del ON, ha sido asociado con una disminución de la PA [11] y [12].

El control de la presión arterial elevada ha contribuido a la reducción de la morbilidad y mortalidad por accidente cerebro vascular y la enfermedad cardíaca coronaria. Los estudios epidemiológicos han demostrado el efecto protector en las enfermedades cardiovasculares, por parte de los fitoquímicos encontrados en las frutas. La mayoría de las evidencias hacen énfasis en el rol de la vitamina E, vitamina C y β -carotenos. No obstante, la presencia de compuestos fenólicos antioxidantes podría también estar jugando un papel importante en la prevención de riesgo cardiovascular. Uno de los recursos naturales importantes que pueden ser objeto de estudio para la prevención de enfermedades crónico-degenerativas es el árbol de guayabo (*Psidium guajava* L.) y sus diferentes componentes como el fruto y las hojas [13].

El guayabo es un pequeño árbol de la familia de la Myrtaceae. Y es conocido en diferentes países alrededor del mundo. Actualmente distribuido en América tropical y subtropical, el Caribe, Asia, África y las Islas del Pacífico [14]. Los primeros cinco productores de fruta de guayaba en el mundo son India, China, Tailandia, Pakistán y México respectivamente [15] y [16].

Esta especie es ampliamente utilizada como alimento y en la medicina popular en todo el mundo [13]. Antioxidante es un efecto que se ha encontrado que tienen los diferentes extractos obtenidos de varias partes del árbol de guayabo [17]. Los extractos de ramas y hojas tienen propiedades antioxidantes relativamente más altas que las frutas y semillas [18].

Las propiedades antioxidantes de los extractos de las hojas de guayabo se deben al hecho de que contienen compuestos fenólicos [19]. El agua y los disolventes orgánicos, como el cloroformo, el hexano, el acetato de etilo, la acetona, el metanol y el etanol, son los disolventes más comúnmente utilizados para extraer los compuestos fenólicos de las hojas. La naturaleza de la muestra así como la polaridad del disolvente son dos de los principales factores que rigen la solubilidad de los compuestos fenólicos [20] y [21].

Los principales compuestos fenólicos reportados en extractos de hojas de guayabo son, ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido cafeico, epicatequina, rutin, quercetina, kaempferol y luteolina [22]. Estos compuestos fenólicos en extractos de hojas de guayabo, pueden variar dependiendo de la variedad de guayabo, la forma de secar las hojas, la técnica de extracción y la madurez de la hoja [23], [24] y [25].

El consumo de antioxidantes disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas (especies de oxígeno y nitrógeno) en el cuerpo humano. La capacidad antioxidante de los extractos puede ser medida por ensayos *in vitro*, que pueden clasificarse en dos tipos: ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la transferencia de electrones (ET). La capacidad de la absorbancia del radical del oxígeno del análisis (ORAC) es del tipo HAT, mientras que DPPH, fenoles totales por Folin-Ciocalteu, ABTS y radical del oxhidrilo son del tipo ET [26] y [27].

En el presente estudio se utilizaron hojas de dos variedades de árboles de guayabo, Calvillo Siglo XXI e Hidrozac. Estas variedades se registraron en México por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) en 2009 [28]. Una diferencia entre estas dos variedades es que Hidrozac produce fruta

de pulpa rosada mientras que Calvillo Siglo XXI produce fruta de pulpa amarilla. También se ha reportado que hay diferencia significativa en capacidad antioxidante entre las pulpas de ambas frutas [29].

2.0 Justificación

Existe un incremento de personas con padecimientos crónico-degenerativos a nivel mundial, tales como la hipertensión que se relaciona con problemas cardiovasculares, siendo una de las primeras causas de muerte en nuestro país. Por lo cual se busca contar con recursos naturales de bajo costo, que estén disponibles para toda la población, como es el caso de plantas endémicas del país. México es quinto lugar a nivel mundial en la producción de fruta de guayaba, mientras que Michoacán es el número uno a nivel nacional. Existe información que avala el poder antioxidante de los extractos de las hojas de guayabo, el cual es benéfico en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, falta realizar investigaciones de las propiedades anti-hipertensivas de los extractos acuosos de las hojas de guayabo. Por lo que en el presente estudio se plantea conocer los efectos anti-hipertensivos de los extractos acuosos de las hojas de guayabo en ratas hipertensas para que los extractos acuosos de las hojas de guayabo puedan ser una alternativa viable en la prevención de esta enfermedad.

3.0 Hipótesis

Los extractos acuosos de las hojas de *Psidium guajava* L. serán capaces de incrementar las concentraciones de óxido nítrico, en un modelo *in vivo* hipertenso mediante la admisión de L-Name.

4.0 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de un extracto polifenólico de hojas de guayabo en los niveles de óxido nítrico en ratas hipertensas.

4.2 Objetivos particulares

- ▶ Extracción de compuestos fenólicos con diferentes solventes.
- ▶ Evaluar el poder antioxidante in vitro de las diferente fracciones.
- ▶ Evaluar la concentración de óxido nítrico en corazón, riñones, aorta y en suero de los diferentes tratamientos con las ratas.
- ▶ Evaluar el estado redox de los tejidos de corazón, riñones, aorta y en suero de los diferentes tratamientos con las ratas.

5.0 Materiales y métodos

Evaluación antioxidante in vitro de las diferentes fracciones de las hojas de las dos variedades de guayabo.

5.1 Obtención de muestras

Las hojas se colectaron en el sitio experimental “Los cañones” del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) ubicado en el Municipio de Huanusco, Zacatecas México. Las colectas se realizaron el 4 de septiembre del 2015 y el 24 de agosto del 2016, las coordenadas del sitio de colecta fueron Longitud 21° 44.7' N y 102° 58.0' W. a 1508 msnm. Se seleccionaron dos variedades, las cuales ya cuentan con el registro en el catálogo de variedades vegetales del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semilla “SNICS”: **Calvillo Siglo XXI No. GUA-005-160709** la cual produce frutos de pulpa amarilla e **Hidrozac No. GUA-002-160709** y está produce fruta de pulpa rosada. Las hojas colectadas se secaron a la sombra y la molienda se realizó con un molino pulverizador de la marca PULVEX modelo Pulvex 200, utilizando una malla de salida de 0.8 mm. El material molido se guardó en bolsas plásticas en la oscuridad a temperatura ambiente, hasta su uso para obtener los extractos.

5.2 Extracción de las fracciones

Las extracciones se realizaron por maceración 10:1 (v:w), renovando el solvente y repitiendo la maceración (24 h X 2). Con las muestras colectadas en el 2015 se realizó la extracción con solventes de polaridad creciente: cloroformo (cloroformo 2015), acetona (acetona 2015) y agua (agua 2015), mientras con las muestras colectadas en el 2016, también por maceración se realizó la extracción utilizando como solvente únicamente agua (agua 2016). El cloroformo y la acetona se recuperaron en un roto-vapor (BM200, Yamato Scientific America Inc. Santa Clara CA U.S.A.) a una temperatura del Baño María de 35 °C y vacío. La eliminación del

agua en el extracto acuoso se realizó mediante aspersión (Nano Spray Dryer B-90, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil Switzerland) a una temperatura de 105 °C inlet, 38 °C outlet, aspersión del 90% y una caperuza de pulverización de 7 µm. Los extractos obtenidos de cada solvente se almacenaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente en la oscuridad hasta su uso.

5.3 Cuantificación de polifenoles totales

Los polifenoles totales se cuantificaron utilizando la metodología de Singleton *et al.* [30] y Taga *et al.* [31], con algunas modificaciones. Para ello se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico a diferentes concentraciones (0-4 µg). Los extractos se disolvieron en MeOH 80%, a una concentración de 100 µg/ml, se tomaron 100 µL del extracto y se adicionaron 100 µL del reactivo Folin & Ciocalteu (1N) se agitó. Después de 3 min en reposo, se agregaron 2 mL de Na₂CO₃ al 2% m/v y se agitó. Posteriormente, se procedió a incubar por 30 min en un lugar oscuro y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Los resultados se expresan como miligramos equivalentes a ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g). La cuantificación fue respecto al estándar. Las determinaciones se realizaron por triplicado. [32]

5.4 Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides se realizó mediante la metodología de Dewanto *et al.* [33], con algunas modificaciones. Para ello se realizó una curva de calibración utilizando quercetina a diferentes concentraciones (0-30 µg). Los extractos se disolvieron en MeOH 80%, en una concentración de 100 µg/ml. Se colocaron 250 µL de extracto o del standard, se añadieron 1250 µL de H₂O, posteriormente se adicionaron 75 µL NaNO₂ al 5% m/v, después de 6 min se adicionaron 150 µL AlCl₃ 10% m/v, transcurridos 5 min se adicionaron 500 µL de NaOH 1M y 275 µL de H₂O. Posteriormente, se procedió a medir la absorbancia. a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham,

MA, USA). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes a quercetina por gramo de extracto (mg EQ/g). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.5 Capacidad de atrapamiento del radical hidroxilo

La capacidad para atrapar radicales hidroxilo de los extractos obtenidos con el cloroformo, acetona y agua, fue determinada utilizando la metodología de Smirnoff y Cumbes [34] y Zhang *et al.* [35] con algunas modificaciones. Se prepararon los reactivos FeSO₄, C₇H₆O₃ y el H₂O₂ con agua destilada. Las concentraciones de los reactivos fueron, para el FeSO₄ de 8 Mm, para el C₇H₆O₃ de 3mM y para el H₂O₂ de un 2%. Los extractos obtenidos con el cloroformo, acetona y agua se disolvieron en DMSO a concentraciones de 500-3000 µg/mL. El volumen total de la mezcla reacción fue de 2 mL. Se mezclaron 667 µL de extracto, 200 µL de FeSO₄, 167 µL de H₂O₂ y 667 µL de C₇H₆O₃, está mezcla se agito y se incubo por 30 minutos a 37 °C, posteriormente se adicionaron 299 µL de H₂O destilada se agito y se midió la absorbancia (A1) a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). La actividad de atrapamiento del radical hidroxilo (1) se calculó mediante la ecuación 1 utilizada por Fu *et al.* [36]:

$$HO \% = \frac{A0 - (A1 - A2)}{A0} \times 100\%$$

Ecuación 1: Actividad de atrapamiento radical hidroxilo

Donde A0 es la absorbancia del grupo control (la solución muestra se remplazó con solvente de dilución), A2 la absorbancia de la muestra blanco (H₂O y solución muestra).

5.6 Capacidad de atrapamiento del radical ABTS

La capacidad de atrapamiento del radicla ABTS se calculó según lo descrito por Re *et al.* [37] y Tachakittirungron *et al.* [38], se generó una curva de calibración con trolox, los resultados se expresaron como TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant

Capacity) Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox. El ABTS se disolvió con agua a una concentración de 7 mM, esta solución, se mezcló con una solución de persulfato de potasio 2.45 mM también diluido en agua. La mezcla se dejó reposar por 15 h en obscuridad a temperatura ambiente para generar así la solución del radical (ABTS^{•+}). Para las pruebas se preparó una fracción de la solución del radical (ABTS^{•+}) adicionándole MetOH hasta tener una absorbancia de 0.7 ± 0.2 a una longitud de onda de 750 nm; dicha solución es estable por dos días aproximadamente. Una vez obtenida la absorbancia en la solución del radical (ABTS^{•+}) se utilizó para la prueba, se mezclaron 180 µL de esta solución con 20 µL de extracto, se mezcló y después de 5 min se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Los extractos obtenidos con el cloroformo, acetona y agua se re-suspendieron en MetOH a una concentración de 1mg/mL.

5.7 Capacidad de atrapamiento del radical DPPH

La técnica se realizó en base a lo descrito por Brand-Williams *et al.* [39] con algunas modificaciones. Los reactivos utilizados, así como todos los extractos se diluyeron en metanol. La concentración del DPPH fue de 6×10^{-5} M, el ácido ascórbico se preparó en concentraciones de 50-200 µg/mL, los extractos de cloroformo y agua se prepararon en concentraciones de 100-1000 µg/mL y los extractos de acetona se prepararon a concentraciones de 50-250 µg/mL. Para la prueba se utilizaron 100 µL de extracto o ácido ascórbico y se mezclaron con 1900 µL de solución DPPH, se dejó reposar en la obscuridad por 15 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Se utilizó al ácido ascórbico como control, y se cuantificó la concentración inhibitoria media en µg/mL (IC 50).

5.8 Atrapamiento radical ORAC FL

Para esta prueba se realizó en base a lo descrito por Dávalos *et al.* [40] y Ou *et al.* [41] con algunas modificaciones. Se preparó una solución buffer fosfato 75 mM (pH 7.4) con la cual se diluyó la fluoresceína 70 nM, el AAPH 12 mM y el Trolox (2-8 µM). Los extractos se diluyeron con MetOH 80% a una concentración de 10 µg/mL. La prueba se realizó en microplaca de 96 pozos, el volumen final de la reacción fue de 200 µL. Se mezclaron 120 µL de fluoresceína y 20 µL de muestra o trolox, esta mezcla se incubó por 30 min 37 °C. Posteriormente, se adicionaron inmediatamente 60 µL de AAPH, se midió la fluorescencia cada minuto agitándose automáticamente antes de cada lectura, durante 120 min. El blanco se preparó sustituyendo al antioxidante por solución buffer fosfato.

El área bajo la curva de la fluorescencia se calculó con la ecuación 2:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} f_i/f_0$$

Ecuación 2: Área bajo la curva

Donde f_0 es la fluorescencia inicial leída al minuto 0 y f_i la fluorescencia leída al tiempo i .

La AUC neta correspondiente a las muestras se calculó restando el AUC del blanco. Ecuaciones de regresión entre AUC neta y la concentración del antioxidante fueron calculadas para todas las muestras. Se realizó la curva de calibración con Trolox. Los resultados se expresan como micro molar equivalentes a trolox por cada microgramo de extracto seco (µM ET/µg ES). Las mediciones de fluorescencia se realizaron a una temperatura de 37 °C y una onda de excitación de 485 nm y onda de emisión de 520 nm con un fluorómetro VarioskanFlash (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA).

Evaluación del efecto del extracto acuoso de hojas de guayabo en la concentración de óxido nítrico y estado redox de los tejidos de ratas hipertensas con L-Name.

5.9 Obtención de extractos acuosos administrados

Para estos extractos se utilizaron hojas colectadas en el 2016 de las dos variedades de guayabo, los extractos se obtuvieron por maceración con agua 10:1 (v:w), renovando el solvente y repitiendo la maceración (24 h X 2). La eliminación del agua se realizó mediante aspersion (Nano Spray Dryer B-90, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil Switzerland) a una temperatura de 105 °C inlet, 38 °C outlet, aspersion del 90% y una caperuza de pulverización de 7 µm. Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente en la oscuridad hasta su uso.

5.10 Animales

Para el estudio se adquirieron ratas Wistar macho del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM CDMX de 10-12 semanas y de un peso de 228-256 g, se depositaron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, bajo condiciones estándar de laboratorio (ciclos de 12:12 h luz/oscuridad), manteniendo libre acceso al alimento comercial y al agua. Las ratas tuvieron una semana de adaptación antes de iniciar los tratamientos. Las ratas se dividieron al azar en siete grupos de seis ratas cada uno. El tratamiento duró 4 semanas. Cada grupo inicio con dos o tres días de diferencia. El desfase de los grupos se consideró para evitar empalme al finalizar el periodo de estudio.

5.11 Modelo hipertenso

El modelo hipertenso duró 4 semanas y se basó en los trabajos de Nyadjeu *et al.* [42] y Bernátová *et al.* [43]. Al **primer grupo** se le administró agua purificada en dosis de 0.2 mL /día, al **segundo grupo** se le administro L-Name por una semana en una dosis de 75 mg/kg día y tres semanas una dosis de 50 mg/kg día, al **tercer**

grupo se le administró extracto acuoso de la variedad Hidrozac 200 mg/kg día en la primera semana en la segunda y tercer semana 100 mg/Kg día y en la cuarta semana nuevamente 200 mg/Kg día , al **cuarto grupo** se le administró extracto acuoso de la variedad Calvillo Siglo XXI 200 mg/kg día, en la primera semana en la segunda y tercer semana 100 mg/Kg día y en la cuarta semana nuevamente 200 mg/Kg día, al **quinto grupo** la primera semana se le administró L-Name 75 mg/Kg día y las tres semanas restantes L-Name 50 mg/Kg día + Hidrozac 200 mg/Kg día, al **sexto grupo** la primera semana se le administró L-Name 75 mg/Kg día y las tres semanas restantes L-Name 50 mg/Kg día + Calvillo Siglo XXI 200 mg/Kg día, y al **séptimo grupo** la primera semana se le administró L-Name 75 mg/Kg día y las tres semanas restantes L-Name 50 mg/Kg día + Captopril 100 mg/Kg día. Todos los tratamientos fueron administrados vía oral mediante cánula.

5.12 Tasa de crecimiento

Diariamente se registró el peso corporal de cada rata. La tasa de crecimiento de cada tratamiento se calculó tomando en cuenta el peso al iniciar y finalizar cada tratamiento mediante la Ecuación 3.

$$\% \Delta = \frac{Pf - Pi}{Pi} * 100$$

Donde: Pf = peso final y Pi = peso inicial

Ecuación 3: Tasa de crecimiento.

5.13 Obtención de suero, tejidos y su homogenizado

Después de cuatro semanas de tratamiento las ratas se sacrificaron por decapitación y se obtuvo el suero, se extrajeron los riñones, la aorta y el corazón. El suero y los órganos se conservaron en un súper congelador a -65 °C hasta su homogenización. Los órganos se homogenizaron en una solución buffer de fosfatos salino pH 7.4 conteniendo NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM y EDTA 2.5 mM. La aorta y los riñones se homogenizaron en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem y el corazón mediante un homogenizador

rotatorio de la marca BIOBASE. Una vez homogenizados los tejidos se separaron en diferentes tubos y se congelaron en un súper congelador a – 65 °C hasta su uso en los ensayos.

5.14 Ensayo Súper Óxido Dismutasa SOD

La actividad de la Súper Óxido Dismutasa SOD se determinó mediante el kit 19160 Sigma Aldrich, con el cual se calculó la actividad de la SOD mediante la tasa de inhibición. La absorbancia se midió en un lector multi placa Multiskan Go, de la marca Thermo Scientific a una longitud de onda de 450 nm.

5.15 Ensayo de Glutación

Para cuantificar el glutatión total GSH total se basó en lo descrito por Rahman *et al.* [44], se mezclaron 20 µL de tejido homogenizado con 100 µL de una solución de 0.6 % de ácido sulfosalísílico, 0.1 % Triton-X100 en 0.1 M de buffer de fosfato-5 mM EDTA, pH 7.5, se sónico tres veces por 3 seg. cada sonicación, se congeló y descongeló dos veces para después centrifugar a 8000 x g por 10 min. Para la cuantificación del glutatión oxidado GSSG [45] los mismos pasos que en el glutatión total sólo que después de centrifugar se adicionaron 2 µL de Vynilpiridina 1:10 con 0.1 M de buffer de fosfato-5 mM EDTA, pH 7.5 y se dejaron reposar por 1 h. Una vez hecho esto, se tomaron 20 µL del sobrenadante tanto del glutatión total como del glutatión oxidado adicionando a cada uno por separado 120 µL de una solución DTNB/GR 1:1 dejando reposar 30 seg y adicionando 60 µL de β-NADPH se agito por 30 seg. y se realizaron las lecturas de la absorbancia en un lector multi placa Multiskan Go, de la marca Thermo Scientific a una longitud de onda de 412 nm cada minuto desde el minuto 0 al 5. El glutatión reducido GSH se calculó restando el GSSG del GSH total. Se calculó el contenido de proteína mediante la reacción de Biuret [32].

5.16 Ensayo catalasa

Para el ensayo de la actividad de la catalasa fue de acuerdo a lo descrito por Jeulin *et al.* [46] De los tejidos homogenizados se utilizó el volumen calculando el equivalente a 1 mg/mL de proteína mediante la reacción de Biurette [32], se agregaron 660 μ L de peróxido de hidrógeno 18.18 mM, y se completó el volumen final de 2 mL con una solución de buffer de fosfatos pH 7.4 conteniendo K_2HPO_4 1M, KH_2PO_4 1M y EDTA 5 mM, la conversión del peróxido de hidrogeno a oxígeno se midió con un electrodo de oxígeno tipo Clark en la cámara de agitación del Sistema de Monitoreo de Oxígeno Biológico de la marca YSI modelo 5300^a durante 3 min y se determinaron las Unidades de Catalasa mediante una curva de calibración de 0-50 U con Catalasa Sigma Aldrich.

5.17 Óxido nítrico equivalente a nitratos más nitritos (NOx)

Para la determinación de la concentración de nitritos, se realizó mediante el reactivo de Griess y lo descrito por Ghashemi *et al.* [47] y Mehrazin *et al.* [48]. Previo a la medición de NOx, en los tejidos homogenizados y el suero, se mezclaron con MetOH (1:1) y se realizó una centrifugación por 1 min. a 10000 x g y se recuperó el sobrenadante. Se colocaron en una cubeta de vidrio 200 μ L de sobrenadante de las muestras, 200 μ L de Cloruro de Vanadio (III) 8mg/mL para convertir los nitratos a nitritos y por último se colocaron 200 μ L de reactivo de Griess, se mezclaron y se dejaron encubando a 37 °C por 30 min. seguido se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Modelo 2550 Marca Shimadzu a una longitud de onda de 540 nm, se realizó una curva de calibración con nitrito de sodio $NaNO_2$ en concentraciones de 1-63 μ mol/L. Se calculó el contenido de proteína mediante la reacción de Biuret [32].

5.18 Peroxidación de lípidos (TBARS)

La concentración de los lípidos peroxidados se cuantificó mediante las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme a lo descrito por Buege y Aust [49]. Para la prueba se preparó un Blanco con 990 μ L buffer de fosfato monobásico 50 mM pH 7.4, 10 μ L de BHT 3% y 2 mL de una solución reactiva de ácido tricloroacético TCA 15%, ácido tiobarbitúrico TBA 0.375% y HCl 0.25 M. Para los tejidos homogenizados, mediante la reacción de Biuret [32] se cuantificó 1mg/mL de proteína, agregando los mismos reactivos al igual que en el blanco solo que el buffer fue sustituido por la muestra. Se colocaron en baño María 99 °C 30 min. posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente para centrifugarlo a 7500 rpm 5 min. 20 °C. Se recupero el sobrenadante y se cuantificó su absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Modelo 2550 Marca Shimadzu a una longitud de onda de 532 nm. La concentración de TBARS se calculó con la Ley de Beerlambert dividiendo la absorbancia por 0.00156 dando la concentración en nmolas/mg proteína.

5.19 Urea

Para la cuantificación de urea en suero, se realizó por Urea/BUN cobas c 111, mediante el test cinético con ureasa y glutamato deshidrogenasa en el laboratorio EDULAB localizado en Morelia, Mich., México.

5.20 Creatinina

Para la cuantificación de la creatinina fue por Creatinina Jaffé Gen.2 cobas c 111 mediante una prueba cinética colorimétrica en el laboratorio EDULAB localizado en Morelia, Mich., México.

5.21 Análisis estadístico

Los ensayos para la cuantificación de polifenoles y su capacidad antioxidante se realizaron por triplicado. Los valores se presentan como la media $\pm$ SD (n=3). Las

diferencias significativas de los grupos se determinaron por el análisis de varianza seguido por la prueba de Tuckey HSD por grupos homogéneos usando el programa de STATISTICA (versión 7 STATISTICA Ink., Palo Alto, CA 94304) considerándose $p < 0.05$ estadísticamente significativo. Para el cálculo de la correlación se utilizó el programa Excel 2016 (Microsoft Office 365) y el programa JMP8 (SAS Institute Inc.). Mientras que para los ensayos *in vivo* se realizaron por duplicado con una $n=6$, y se utilizó el programa GraphPad Prism 6 para el análisis Kruskal Wallis.

6.0 Resultados

6. 1 Capitulo 1 Quatification of Phenolic Compounds and In Vitro Radical Scavenging Abilities with Leaft Extracts from Two Varieties of *Psidiun guajava* L.



antioxidants



Article

Quantification of Phenolic Compounds and In Vitro Radical Scavenging Abilities with Leaf Extracts from Two Varieties of *Psidium guajava* L.

Julio César Camarena-Tello ¹ , Héctor Eduardo Martínez-Flores ^{2,*}, Ma. Guadalupe Garnica-Romo ³, José Saúl Padilla-Ramírez ⁴, Alfredo Saavedra-Molina ⁵, Osvaldo Alvarez-Cortes ⁶, María Carmen Bartolomé-Camacho ² and José Octavio Rodiles-López ²

¹ Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58240, Mich., Mexico; cama.de.arena@hotmail.com

² Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58240, Mich., Mexico; carbarcam@hotmail.com (M.C.B.-C.); tavarodiles@hotmail.com (J.O.R.-L.)

³ Facultad de Ingeniería Civil, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58240, Mich., Mexico; ggarnica@umich.mx

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Norte-Centro, Campo Experimental Pabellón, Pabellón de Arteaga 20660, Aguascalientes, Mexico; padilla.saul@inifap.gob.mx

⁵ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mich., Mexico; saavedra@umich.mx

⁶ Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia, Morelia 58120, Mich., Mexico; oalvarezc@tecmmor.mx

* Correspondence: hmartinez@umich.mx; Tel.: +52-443-314-2152 (ext. 206)

Received: 6 January 2018; Accepted: 22 February 2018; Published: 27 February 2018

Abstract: Guava leaf (*Psidium guajava* L.) extracts are used in both traditional medicine and the pharmaceutical industry. The antioxidant compounds in *P. guajava* leaves can have positive effects including anti-inflammatory, anti-hyperglycemic, hepatoprotective, analgesic, anti-cancer effects, as well as protecting against cardiovascular diseases. In the present study, phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity were measured in extracts obtained with polar and non-polar solvents from leaves of two varieties of guava, Calvillo Siglo XXI and Hidrozac. The quantity of total phenolics and total flavonoids were expressed as equivalents of gallic acid and quercetin, respectively. Hydroxyl radical, **2,2^o-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)** (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and Oxygen Radical Absorbance Capacity using fluorescein (ORAC-FL) in vitro tests were used to assess the radical scavenging abilities of the extracts. The total phenolics were higher in the aqueous fraction of the variety Calvillo Siglo XXI, while in the Hidrozac variety total phenolics were higher in the acetone and chloroform fractions. Total flavonoids were higher in all fractions in the variety Calvillo Siglo XXI. Total phenolics showed a highly positive correlation for ORAC-FL, and a moderately positive correlation with hydroxyl radicals. Finally, total flavonoids showed a slightly positive correlation for ORAC-FL and hydroxyl radicals. Both varieties of guava leaf extract showed excellent antioxidant properties.

Keywords: *Psidium guajava*; ORAC; DPPH; ABTS; total polyphenols; total flavonoids; nano spray-dryer.

Introduction

Psidium guajava L. is a small tree that belongs to the Myrtaceae family. Guava is the common name used for species of *P. guajava*. The guava tree is distributed in tropical and subtropical regions of America, the Caribbean, Asia, Africa, and the Pacific islands [1]. The primary producers of guava fruit are India, China, Thailand, Pakistan, and Mexico [2,3]. Currently, most of the commercialized orchards of guava fruits in Mexico present a great phenotypic, genetic, and morphological diversity due to propagation methods. This variability affects the productive potential of the guava crop, as well as the uniformity and quality of the harvested fruit. To improve the productivity of the guava crop in Mexico, the germplasms of different varieties has been selected and evaluated, which will be registered and commercially released as clonal varieties [4–7].

Different parts of guava trees are widely used as food and in folk medicine around the world [8]. Díaz-De-Cerio [9] reported that several studies have shown that guava leaves present anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. In Mexico, a phytodrug QG-5[®] is being produced from leaves of *Psidium guajava folia*, variety [10]. The activities present in extracts of guava leaves are mainly due to phenolic compounds.

Water and organic solvents such as chloroform, hexane, ethyl acetate, acetone, methanol, and ethanol are the most commonly used solvents for extracting phenolic compounds from leaves of different species of trees or plants. The nature of the sample as well as the polarity of the solvents are two of the main factors that influence the solubility of phenolic compounds [11–14].

Seo et al. [15] described that water, followed by ethanol and finally methanol, are the best solvents used to obtain extracts with high antioxidant capacity, in leaves of *Psidium guajava*. A study conducted by Nantitanon et al. [16] found that the extraction of phenolic compounds with greater antioxidant activity were obtained using the ultrasound process, followed by maceration with agitation, maceration without agitation, and finally soxhlet extraction. In other studies, the antioxidant properties related to phenolic compounds also were documented in extracts of branches, leaves, fruits, and seeds of guava trees [17,18].

According to reports, in the aforementioned studies, different solvents can be used for the extraction of phenolic compounds from guava leaves, but there is a possibility that these extracts present a risk to consumers. With respect to the toxicity of guava leaf extracts, Chen et al. [19] documented that ethanol and acetone extracts at concentrations greater than 100 µg/mL and 50 µg/mL, respectively, may present cytotoxicity, while aqueous extracts at concentrations lower than 500 µg/mL do not represent cytotoxicity.

The main phenolic compounds reported in guava leaves extracts are gallic acid, catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, rutin, quercetin, kaempferol, and luteolin [20]. The phenolic compounds in guava leaf extracts may vary depending on the variety, the way to dry the leaves, extraction technique, and the maturity of the leaves [16,21,22].

Consumption of antioxidants significantly decreases the adverse effects of some reactive oxygen and nitrogen species in the human body. The antioxidant capacity of the extracts can be measured by in vitro assays, which can be classified as either assays based on hydrogen atom transfer (HAT) or assays based on electron transfer (ET). The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) is classified as HAT type assay, while 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), total phenols, **2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)** (ABTS), and hydroxyl radicals are classified as electron transfer (ET)-type assays [23,24].

Total phenols, DPPH, hydroxyl radicals, and ABTS are the main assays that are carried out with the extracts of leaves from different varieties of *Psidium guajava*. Siwarungson et al. [22] used three varieties of *Psidium guajava* grown in Thailand, measuring total phenols, DPPH, and hydroxyl radicals. Jeong et al. [21] measured total phenolic compounds, ABTS, and DPPH in three varieties of *Psidium guajava* cultivated in Korea. These assays are used due to the versatility of the samples that can be analyzed from cell lines to nutrition lines, since it shows a premise of the structure and its relationship in the antioxidant activity of the compounds contained in the samples [25,26].

The objective of the present work was to quantify total polyphenols, total flavonoids, and the in vitro radical scavenging abilities of extracts obtained from Calvillo Siglo XXI and Hidrozac variety guava leaves. Currently, in Mexico these varieties do not have information regarding their content of total polyphenols, total flavonoids, and their antioxidant activity of their leaves. The only study that counts in Mexico of the variety Hidrozac and Calvillo is with its antioxidant activity of its fruit [27].

These varieties were registered in Mexico by the INIFAP (National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México) in 2009 [4]. A difference between these two varieties is that Hidrozac produces pink pulp fruit while Calvillo Siglo XXI produces yellow pulp fruit. In the present work, it was found that there were significant

differences in the amount of phenolic compounds and the radical scavenging abilities of Calvillo Siglo XXI and Hidrozac varieties. The correlation between total polyphenols and the radical scavenging abilities of the hydroxyl radicals and the ORAC test was positive.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Samples

The guava leaves were collected at the experimental site “Los cañones” of the INIFAP (National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research), which is located in the municipality of Huanusco, Zacatecas, Mexico. Samples were collected 4 September 2015 and 24 August 2016. The coordinates of the collection site are longitude 21° 44.7' N and 102° 58.0' W to 1508 masl. Two varieties were selected, which are registered in the catalogue of vegetal varieties from 2009. Calvillo Siglo XXI no. GUA-005-160709 which produces yellow pulp fruits and Hidrozac no. GUA-002-160709 which produces pink pulp fruit. The collected leaves were dried in the shade and milled with a knife mill (PULVEX model 200, PULVEX SA. CV., Mexico City, Mexico) using a 0.8 mm diameter mesh. The ground material was stored in plastic bags in the dark at 22 °C prior to extraction.

2.2. Methods

2.2.1. Extractions

In all cases, regardless of the solvent used, the guava leaves were macerated under discontinuous stirring, with double extraction period (24 h × 2) at a solvent: sample ratio 10:1 (v/w). The samples collected in 2015 were subjected to extractions with solvents of different polarities: chloroform, acetone and water. For the extracts of the leaves collected in 2016, the samples were macerated only with water. The use of chloroform and acetone, and water, was to know the performance of the extracts before different solvents, and to know their composition in terms of total phenolic compounds and total flavonoids, as well as their antioxidant capacity. However, for the study of the leaves collected in 2016, it was decided to work only with water as a solvent, since it is the extract that would not present a possible toxicological effect, having the prospect of testing it on living organisms. In this way, we can have comparisons between the extracts obtained from the leaf collected both in 2015 and in 2016 using water as a solvent. Chloroform and acetone were recovered in a rotary evaporator (BM200, Yamato Scientific America Inc., Santa Clara, CA, USA) at 35 °C in a water bath, and the residual material was dried at 40 °C. The aqueous extract was dried using a nano spray dryer (B-90, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) using the following conditions: inlet temperature 105 °C, outlet temperature 38 °C, 90% sprinkler, and a 7 µm spray cap. Briefly, the liquid sample was fed to the spray head and droplets were generated by a piezoelectric driven actuator in a stainless steel membrane with holes of 7.0 µm inside the spray cap. The droplets were dried and the particles collected by electrostatic charging to deflect them to the collecting electrode. Nanometric particles were then collected. The dried extracts obtained for each solvent were stored in glass jars in the dark until use.

2.2.2. Total Phenolics

The total phenolic compounds were quantified using the methodology of Singleton et al. [28] and Taga et al. [29] with some modifications. 100 µg/mL of extracts was dissolved in 80% MeOH. Then, 100 µL of the solution was added to 100 µL of Folin–Ciocalteu reagent (1 N). This mix was stirred. After 3 min at rest, 2 mL of 2% *m/v* Na₂CO₃ was added and stirred and incubated in the dark for 30 min. Absorbance was then measured at 750 nm in a spectrophotometer UV–vis (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). The results were expressed as milligrams equivalent of gallic acid per gram of extract (mg GAE/g). Determinations were carried out in triplicate. A calibration curve was constructed using gallic acid at 0–4 µg.

2.2.3. Total Flavonoids

Quantification of flavonoids was carried out using the methodology of Dewanto et al. [30] with some modifications. 100 µg per mL of extracts were dissolved in 80% MeOH. After, 250 µL of the solution were added to 1.250 µL of H₂O, and 75 µL of NaNO₂ at 5% *m/v*. After 6 min 150 µL of 10% *m/v* AlCl₃ was added. After another 5 min 500 µL of 1 M NaOH and 275 µL of H₂O were added. Subsequently, absorbance was measured at 510 nm in a UV–vis spectrophotometer (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Results were expressed as milligrams equivalent of quercetin per gram of extract (mg QE/g) and determinations were made in triplicate. A calibration curve was constructed using quercetin at 0–30 µg.

2.2.4. Hydroxyl Radicals

The ability to scavenge hydroxyl radicals was determined using the methodology of Smirnoff and Cumbes [31] and Zhang et al. [32], with some modifications. 8 mM FeSO₄, 3 Mm C₇H₆O₃, and 2% H₂O₂ were prepared with distilled water. The extracts were dissolved in **dimethyl sulfoxide** (DMSO) at a concentration of 500–3000 µg/mL. The reaction mixture consisted of 667 µL of extract, 200 µL of FeSO₄, 167 µL of H₂O₂, and 667 µL of C₇H₆O₃. The mixture was placed in a water bath for 30 min at 37 °C, before 299 µL of distilled water was added and the absorbance was measured (A1) at a wavelength of 510 nm on a UV–vis spectrophotometer (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). The ability to scavenge hydroxyl radicals was calculated using the following formula (1) used by Fu et al. [33]

$$\text{HO \%} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

where A₀ is the absorbance of the control group (the sample solution was replaced with dilution solvent) and A₂ the absorbance of the blank (H₂O and sample solution). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated.

2.2.5. ABTS

The ABTS was measured according to the methodology of Re et al. [34] and Tachakittirungrod et al. [35] with some modifications. A calibration curve was generated with Trolox and results were expressed as TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity). ABTS was dissolved in distilled water at a concentration of 7 mM and mixed with a 2.45 mM solution of potassium persulfate in water. The mixture was left to stand for 15 h in the dark to generate the radical solution (ABTS•⁺). For the tests, a fraction of the radical solution (ABTS•⁺) was prepared by adding MeOH until an absorbance of 0.7

± 0.2 at a wavelength of 750 nm was reached. 180 μL of the radical solution ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) was then mixed with 20 μL of extracts. After 5 min, absorbance was measured at a wavelength of 750 nm in a UV–vis spectrophotometer (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). The extracts were dissolved in MeOH at a concentration of 1 mg/mL.

2.2.6. DPPH

The assay was based on the method described by Brand-Williams [36], with some modifications. The reagents used as well as all the extracts were diluted with MeOH. The concentration of DPPH was 6×10^{-5} M and ascorbic acid was prepared at concentrations of 50–200 $\mu\text{g/mL}$. The extracts were prepared at concentrations of 50–1000 $\mu\text{g/mL}$. For the test, 100 μL of extract or ascorbic acid were mixed with 1900 μL of DPPH solution and held in the dark for 15 min. Absorbance was measured at a wavelength of 515 nm in a UV–vis spectrophotometer (LAMBDA 365, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Ascorbic acid was used as a control and was quantified at the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}).

2.2.7. Oxygen Radical Absorbance Capacity Using Fluorescein (ORAC-FL)

The ORAC-FL test was conducted using the method described by Dávalos et al. [37] and Ou et al. [38] with some modifications. A 75 mM phosphate buffer solution (PH 7.4) was prepared. This buffer was used to prepare 70 nM fluorescein, 12 nM 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), and 2–8 μM Trolox. The extracts were diluted with 80% MeOH at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. The test was performed in a 96 well microplate. 120 μL of fluorescein was mixed with 20 μL of sample or trolox and incubated for 30 min at 37 °C. Subsequently, 60 μL of AAPH was added immediately. The fluorescence was measured every minute for 120 min, stirring automatically before each reading. A blank was prepared by replacing the antioxidant with phosphate buffer solution.

The area under the curve of fluorescence was calculated with Equation (2),

$$\text{AUC} = 1 + \sum_{i=1}^{i=120} f_i/f_0 \quad (2)$$

where f_0 is the initial fluorescence read at time 0 and f_i is the fluorescence read at the time i . The net area under the curve (AUC) of samples was calculated by subtracting the AUC from the blank. Regression equations between net AUC and antioxidant concentration were calculated for all samples. A calibration curve was prepared with Trolox. The results were expressed as micromolar equivalents of Trolox for each microgram of extract ($\mu\text{M TE}/\mu\text{g}$). The measurements of fluorescence were performed at a temperature of 37 °C with an excitation wave of 485 nm and an emission wave of 520 nm in a spectral scanning multimode reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2.8. Statistical Analysis

All experiments were done in triplicate. The values were presented as the average $\pm$ SD ($n = 3$). Significant differences in the groups were determined by the analysis of variance using the Tukey Test HSD (honest significant difference) by homogeneous groups, calculated with Statistica

software (version 7 Statistica Ink., Palo Alto, CA 94304, USA). $p < 0.05$ was considered statistically significant. Excel 2016 software (Microsoft Office 365, One Microsoft Way, Redmond, WA, USA) and JMP8 software (SAS, Cary, NC, USA) were used for correlation analysis.

3. Results

3.1. Total Phenolic and Total Flavonoid Compounds

Total polyphenols and total flavonoids were quantified in the aqueous, acetone, and chloroform extracts of both varieties of guava leaves.

3.1.1. Total Phenolic Compounds

Table 1 shows results of total phenolic compounds. Acetone had the greatest quantity of phenolic compounds for both varieties, followed by the aqueous fraction, and finally the chloroform fraction. Between the two varieties, the chloroform extracts were statistically equivalent. In the acetone fraction, the extracts of Hidrozac had more phenolic compounds (374.63 mg GAE/g extract), whereas in the aqueous fraction Calvillo Siglo XXI had a greater quantity (242.10 mg GAE/g extract). The total phenolic compounds in the extract of the acetone fraction for both varieties was more than double the 141 mg EAG/g measured by You et al. [18] who also extracted with acetone for one night following maceration. The phenolic compounds obtained in our aqueous extracts were greater than those quantified by Seo et al. [15] from extracts boiled for 4 h in guava leaves (140 mg gallic acid equivalent (GAE)/g).

Table 1. Total polyphenols in the aqueous, acetone, and chloroform extracts of Calvillo Siglo XXI and Hidrozac leaves. The average values ($\pm$ SD) are expressed as milligrams equivalent of gallic acid per gram of extract (mg GAE/g).

Extracts		Phenolic Compounds mg GAE/g Extract
Water 2016	Calvillo Siglo XXI	285.21 $\pm$ 35.54 ^{c,d}
	Hidrozac	256.76 $\pm$ 9.62 ^c
Water 2015	Calvillo Siglo XXI	242.10 $\pm$ 13.33 ^c
	Hidrozac	187.01 $\pm$ 9.24 ^b
Acetone 2015	Calvillo Siglo XXI	314.03 $\pm$ 8.05 ^d
	Hidrozac	374.63 $\pm$ 29.92 ^e
Chloroform 2015	Calvillo Siglo XXI	71.69 $\pm$ 3.69 ^a
	Hidrozac	100.03 $\pm$ 2.37 ^a

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.1.2. Total Flavonoids

Table 2 shows total extracted flavonoids. The extract with the greatest quantity of flavonoids, in general, was the acetone fraction, followed by the aqueous fraction, and finally the chloroform fraction. Between the two varieties, total flavonoid content in the chloroform fraction was statistically equivalent, while in the aqueous fraction and in the acetone fraction, Calvillo Siglo XXI had a greater quantity of total flavonoids. Total flavonoids in the aqueous fraction measured in our study was greater than the 50 mg QE value for aqueous extraction reported by Seo et al. [15].

Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn [39] measured flavonoid contents of fresh and dry guava leaves by drying leaves for 72 h at 70 °C, extracting with methanol, and purifying using a chromatographic column. They found that flavonoid content was higher in dry leaves and that quercetin was the most abundant flavonoid.

Table 2. Total flavonoids in the aqueous, acetone and chloroform leaf extracts of the varieties Calvillo Siglo XXI and Hidrozac. The average values ($\pm$ SD) are expressed as milligrams equivalent to quercetin per gram of extract (Mg QE/g).

Extracts	Total Flavonoids mg QE/g Extract
Water 2016 Calvillo Siglo XXI	180.77 $\pm$ 7.23 ^d
Hidrozac	152.61 $\pm$ 8.14 ^c
Water 2015 Calvillo Siglo XXI	108.54 $\pm$ 3.54 ^b
Hidrozac	77.83 $\pm$ 6.65 ^a
Acetone 2015 Calvillo Siglo XXI	239.45 $\pm$ 11.32 ^e
Hidrozac	135.88 $\pm$ 7.16 ^c
Chloroform 2015 Calvillo Siglo XXI	107.48 $\pm$ 13.30 ^b
Hidrozac	96.39 $\pm$ 4.57 ^{a,b}

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.2. Radical Scavenging Ability In Vitro

The assays for radical scavenging ability in vitro were conducted with aqueous, acetone, and chloroform leaf extracts of both guava varieties.

3.2.1. Hydroxyl Radicals

In general, the chloroform fraction had the lowest IC₅₀, followed by the aqueous fraction, and finally the acetone fraction (Table 3). Between the two varieties, chloroform or acetone showed no significant differences ($p < 0.05$), while the aqueous fraction did show significant differences ($p < 0.05$). The variety Calvillo Siglo XXI had a lower IC₅₀ in both the aqueous and chloroform fractions, while the Hidrozac variety had the lowest IC₅₀ in the acetone fraction. The IC₅₀ values measured in the present work are up to 20 times higher than those values reported by Kim et al. [40] for aqueous extracts obtained by maceration for 24 h (110 μ g/mL). A half maximal effective concentration (EC₅₀) of 5470–6700 for 50 μ g/mL extracts was reported by Ademiluyi et al. [41], who used a mixture of MeOH and HCl for extraction of four different varieties of macerated guava.

Table 3. Hydroxyl radical scavenging ability in aqueous, acetone, and chloroform extracts of the leaves of Calvillo Siglo XXI and Calvillo. The average values ($\pm$ SD) are expressed as half maximal inhibitory concentrations in micrograms per milliliter (IC₅₀ μ g/mL).

Extracts	Hydroxyl Radical Scavenging IC ₅₀ μ g mL
----------	---

Water 2016 Calvillo Siglo XXI	1607.81 ± 110.78 ^{b,c}
Hidrozac	2360.56 ± 104.80 ^d
Water 2015 Calvillo Siglo XXI	1726.51 ± 90.58 ^c
Hidrozac	2355.73 ± 60.07 ^d
Acetone 2015 Calvillo Siglo XXI	2416.04 ± 114.66 ^d
Hidrozac	2173.37 ± 108.42 ^d
Chloroform 2015 Calvillo Siglo XXI	1103.42 ± 28.62 ^a
Hidrozac	1355.08 ± 134.28 ^b

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.2.2. ABTS

The results of ABTS radical scavenging tests are described in Table 4. The results were expressed as the antioxidant capacity equivalent to a millimolar of trolox per milligram of extract (TEAC mM/mg). In general, the extracts with the greatest TEAC were obtained from acetone fractions, followed by the chloroform fractions, and finally the aqueous fractions. Between the two varieties, only the aqueous fraction showed significant differences ($p < 0.05$). In the study carried out by Díaz-De-Cerio et al. [42] with aqueous extracts of guava leaves obtained by sonication for 10 min and infusion at 3.5 and 7 min, TEAC values ranged from 0.18 to 1.13. The values from that study are two to four times lower than the aqueous fraction values measured in the present work.

Table 4. ABTS radical scavenging ability in the aqueous, acetone, and chloroform extracts of the leaves of Calvillo Siglo XXI and Hidrozac. The average values ($\pm$ SD) are expressed as antioxidant capacity equivalent to a millimolar of trolox per milligram of extract (TEAC mM/mg).

Extracts	ABTS Radical Scavenging TEAC mM/mg
Water 2016 Calvillo Siglo XXI	2.64 ± 0.09 ^b
Hidrozac	3.34 ± 0.02 ^c
Water 2015 Calvillo Siglo XXI	2.37 ± 0.15 ^a
Hidrozac	4.10 ± 0.03 ^d
Acetone 2015 Calvillo Siglo XXI	5.28 ± 0.01 ^f
Hidrozac	5.24 ± 0.04 ^f
Chloroform 2015 Calvillo Siglo XXI	4.99 ± 0.02 ^e
Hidrozac	5.13 ± 0.02 ^{e,f}

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$); TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity). ABTS: **2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)**.

3.2.3. Radical DPPH

Table 5 shows the results of DPPH radical scavenging ability. The extracts with lower IC₅₀ values were those obtained using acetone as a solvent. All the extracts in both varieties were significantly different ($p < 0.05$). The IC₅₀ of the extracts of the acetone fraction obtained in this work was almost three times higher than IC₅₀ values measured by You et al. [18] (34 µg/mL). The IC₅₀ value of the aqueous fraction in the present work were also more than six times higher than the IC₅₀ value measured from the aqueous fraction of guava leaves macerated for 24 h by Kim et al. [40] (120 µg/mL). IC₅₀ values ranging from 730 to 910 µg/mL for extracts of four varieties of guava leaves macerated for 24 h using a mixture of MeOH/HCl have also been reported by Ademiluyi et al. [41], which are within the range measured in the present work.

Table 5. DPPH radical scavenging ability in the aqueous, acetone, and chloroform extracts of the leaves of Calvillo Siglo XXI and Hidrozac. The average values (±SD) are expressed as half maximal inhibitory concentration in micrograms per milliliter (IC₅₀ µg/mL).

Extracts	DPP Radical Scavenging IC ₅₀ µg mL
Water 2016 Calvillo Siglo XXI	269.78 ± 12.89 ^d
Hidrozac	421.77 ± 13.17 ^f
Water 2015 Calvillo Siglo XXI	671.44 ± 16.36 ^h
Hidrozac	811.25 ± 7.74 ⁱ
Acetone 2015 Calvillo Siglo XXI	141.64 ± 1.66 ^c
Hidrozac	105.03 ± 1.70 ^b
Chloroform 2015 Calvillo Siglo XXI	385.15 ± 10.11 ^e
Hidrozac	608.32 ± 11.81 ^g
Ascorbic acid	78.60 ± 2.21 ^a

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). DPP: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical.

3.2.4. ORAC-FL

The results of peroxy scavenging ability were expressed as micromoles of trolox equivalents per microgram of extract (µM TE/µg) and are shown in Table 6. The extract with the greatest TE was the 2015 aqueous fraction of Calvillo Siglo XXI, with a value of 7.5 µM TE/µg. In general, the Calvillo Siglo XXI variety had larger values in water and acetone fractions than Hidrozac. In the chloroform fraction, no significant differences were observed ($p < 0.05$) for both varieties. It is worth mentioning that this is the first study reporting the use of ORAC to measure antioxidant capacity in extracts of guava leaves, obtaining interesting and complementary results to the measurement of antioxidant activity. This test can be recommended to study antioxidant capacity for both guava leaves and other extracts from different plant sources.

Table 6. Peroxyl radical scavenging ability in aqueous, acetone, and chloroform extracts of the leaves of Calvillo Siglo XXI and Hidrozac. The average values ($\pm$ SD) are expressed as micromoles trolox equivalents per microgram of extract (μ M TE/ μ g).

Extracts	Peroxyl Radical Scavenging μ g TE/ μ g
Water 2016 Calvillo Siglo XXI	4.9 $\pm$ 0.75 ^{b,c}
Hidrozac	4.6 $\pm$ 0.80 ^{b,c}
Water 2015 Calvillo Siglo XXI	7.5 $\pm$ 0.73 ^d
Hidrozac	4.5 $\pm$ 0.87 ^b
Acetone 2015 Calvillo Siglo XXI	5.5 $\pm$ 0.65 ^c
Hidrozac	5.0 $\pm$ 0.25 ^{b,c}
Chloroform 2015 Calvillo Siglo XXI	2.1 $\pm$ 0.19 ^a
Hidrozac	2.1 $\pm$ 0.09 ^a

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.3. Correlation Analysis between Phenolic and Flavonoids Compounds and Radical Scavenging Ability

We observed a correlation between total phenolic compounds, total flavonoid compounds, ABTS, DPPH, radical hydroxyl, and ORAC test (Table 7). Comparing the correlation between the total flavonoids and the rest of the assays, the largest positive correlation was found with total phenolic compounds (0.61), followed by the hydroxyl radical test (0.38), and the ORAC value (0.31). The total flavonoids showed a strong negative correlation with the DPPH assay (-0.76). When total phenolic compounds were correlated with the rest of the assays, the greatest positive correlation was found against the ORAC assay (0.71), followed by the hydroxyl radical assay (0.69). Total phenolic compounds presented a strongly negative correlation with the DPPH assay (-0.59) and a weakly negative correlation with the ABTS assay (-0.15). Total phenolic compounds, ORAC value, and the hydroxyl radical (OH) assay had the highest positive correlations. This indicates that these assays are the most useful to measure antioxidant capacity in vitro from different extracts from leaves of *P. guajava* L. Chen et al. [43] reports a positive correlation between total polyphenols and other assays such as ABTS using guava leaf extracts. The negative correlation between the DPPH assay and total phenolics and total flavonoids found in this work also was reported by Ademiluyi et al. [41]. In addition, they reported a positive correlation between total phenolics and the ABTS assay, contrary to the data obtained in our research.

Table 7. Correlations between phenolic and flavonoid compounds and antioxidant properties of guava extracts.

	T.F.	T.P.	ABTS	DPPH	ORAC	OH
T.F.	1					

T.P.	0.61	1				
ABTS	0.06	-0.15	1			
DPPH	-0.76	-0.59	-0.35	1		
ORAC	0.31	0.71	-0.58	-0.04	1	
OH	0.38	0.69	0.01	-0.14	0.52	1

T.F. = Total flavonoids. T.P. = Total phenolics. OH = Hydroxyl radical. DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity.

4. Conclusions

Significant differences in guava leaf extracts phenolic compound content and radical scavenging abilities were found between the varieties Calvillo Siglo XXI and Hidrozac. The phenolic and flavonoids contents as well as the ability to scavenging radicals were similar in both varieties, regardless of collection year. Extracts from guava leaves can donate electrons and hydrogen atoms, based on the results of the assays. Total polyphenol, hydroxyl radical, and ORAC assays are recommended for comparing differences between varieties. The novelty of this work is that there are no reports of tests with extracts of guava leaves from the varieties Hidrozac and Calvillo Siglo XXI. In addition, no work has been reported using the ORAC-FL trial with any variety of guava leaves. The results of this study will be complemented by a quantitative analysis of the phenolic compounds present in the different extracts by chromatographic methods. In addition, an in vivo test will be performed with rats in which aqueous extracts will be administered to evaluate their possible antihypertensive effect.

Acknowledgments: This work was supported by the Coordinación de la Investigación Científica Project 26.1 2016–2017 “Caracterización de un extracto de hojas de *Psidium guajava* L. y su efecto en los niveles de óxido nítrico y angiotensina ii en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)”. The team gratefully acknowledges the support of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) in the form of scholarship received for PhD studies. This research was partially supported with a nano spray-dryer acquired through project no. 253736 “Equipamiento para el fortalecimiento del grupo de investigación en caracterización de propiedades de los alimentos con impacto en los Programas Institucionales de Maestría y Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo—UMSNH”, approved for author Héctor Eduardo Martínez-Flores in the program “Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2015” of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México CONACYT. This project was also partially supported with a UV–vis spectrophotometer acquired through “Redes Temáticas de Colaboración Académica, Tercer año aprobado en la convocatoria 2011 (Marzo 2015), PRODEP”, Red Materiales Nanoestructurados, Proyecto “Investigación y Desarrollo de Conductores Transparentes”.

Author Contributions: Hector E. Martinez-Flores conceived and designed the experiments; Julio C. Camarena-Tello and Osvaldo Alvarez-Cortes performed the experiments; José S. Padilla-Ramírez contributed with the samples of the two varieties of *Psidium guajava* and discuss the data obtained during the experiments. Ma. G. Garnica-Romo contribute with the UV–vis equipment, reagents, materials, and analysis tools; Alfredo Saavedra-Molina, M. Carmen Bartolome-Camacho, and José O. Rodiles-López analyzed some of the results obtained in the experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lim, T.K. *Psidium guajava*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*; Springer Netherlands: New Delhi, India, 2012; Volume 3, pp. 684–727, ISBN 9789400725348.

2. SAGARPA. Aumenta 8.2 por ciento producción de guayaba en México en el último trienio.
Available online: http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_0006-3.aspx (accessed on 23 June 2017).
3. Pariona, A. Top Guava Producing Countries In The World—WorldAtlas.com. Available online: <http://www.worldatlas.com/articles/top-guava-producing-countries-in-the-world.html> (accessed on 11 October 2017).
4. Padilla Ramírez, J.S.; González-Gaona, E.; Perales de la Cruz, M.Á. Nuevas Variedades de Guayaba (*Psidium guajava*). Available online: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3454> (accessed on 14 June 2015).
5. Padilla-Ramírez, J.S.; González-Gaona, E.; Esquivel-Villagrana, F.; Mercado-Silva, E.; Hernández-Delgado, S.; Mayek-Pérez, N. Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región calvillo-cañones, México characterization. *Rev. Fitotécnica* **2002**, *25*, 393–399.
6. Martínez de Lara, J.; Barrientos-Lara, M.C.; Reyes de Anda, A.C.; Hernández-Delgado, S.; Padilla-Ramírez, J.S.; Mayek-Pérez, N. Diversidad fenotípica y genética en huertas de guayabo de calvillo, aguascalientes. *Rev. Fitoténica Mex.* **2004**, *27*, 243–249.
7. Tapia Pérez, D.; Porfirio Legaria, J.P. Variabilidad genética en cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fitoténica Mex.* **2007**, *30*, 391–401.
8. Pérez Gutierrez, R.M.; Mitchell, S.; Vargas Solis, R. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethno-Pharmacol.* **2008**, *117*, 1–27. [CrossRef] [PubMed]
9. Díaz-De-Cerio, E.; Verardo, V.; Gómez-Caravaca, A.M.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Exploratory characterization of phenolic compounds with demonstrated anti-diabetic activity in guava leaves at different Oxidation States. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 699. [CrossRef] [PubMed]
10. Lozoya, X.; Reyes-Morales, H.; Chávez-Soto, M.A.; Martínez-García, M.D.C.; Soto-González, Y.; Doubova, S.V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *83*, 19–24. [CrossRef]
11. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352. [CrossRef] [PubMed]
12. Brahmi, F.; Mechri, B.; Dabbou, S.; Dhibi, M.; Hammami, M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *38*, 146–152. [CrossRef]
13. DellaGreca, M.; Fiorentino, A.; Izzo, A.; Napoli, F.; Purcaro, R.; Zarrelli, A. Phytotoxicity of secondary metabolites from *Aptenia cordifolia*. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 118–128. [CrossRef] [PubMed]
14. Fiorentino, A.; DellaGreca, M.; D'Abrosca, B.; Oriano, P.; Golino, A.; Izzo, A.; Zarrelli, A.; Monaco, P. Lignans, neolignans and sesquignans from *Cestrum parqui* l'Her. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 392–396. [CrossRef]
15. Seo, J.; Lee, S.; Elam, M.L.; Johnson, S.A.; Kang, J.; Arjmandi, B.H. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. *Food Sci. Nutr.* **2014**, *2*, 174–180. [CrossRef] [PubMed]
16. Nantitanon, W.; Yotsawimonwat, S.; Okonogi, S. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 1095–1103. [CrossRef]
17. Barbalho, S.M.; Farinazzi-Machado, F.M.V.; Goulart, R.D.A.; Saad Brunnati, C.A.; Machado, A.M.; Ottoboni, B.; Teixeira, N. *Psidium guajava* (Guava): A Plant of Multipurpose Medicinal Applications. *Med. Aromat. Plants* **2012**, *1*, 1–6. [CrossRef]
18. You, D.-H.; Park, J.-W.; Yuk, H.-G.; Lee, S.-C. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of different parts of guava (*Psidium guajava* L.). *Food Sci. Biotechnol.* **2011**, *20*, 1095–1100. [CrossRef]
19. Chen, H.-H. Hepatoprotective Effect of Guava (*Psidium guajava* L.) Leaf Extracts on Ethanol-Induced Injury on Clone 9 Rat Liver Cells. *Food Nutr. Sci.* **2011**, *2*, 983–988. [CrossRef]

20. Morais-Braga, M.F.B.; Carneiro, J.N.P.; Machado, A.J.T.; Sales, D.L.; dos Santos, A.T.L.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L.; Menezes, I.R.A.; Souza, D.S.L.; Costa, J.G.M.; et al. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *24*, 302–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jeong, C.H.; Bae, Y.I.; Park, S.J.; Lee, S.K.; Hur, S.J. Antioxidant activities of aqueous extracts from three cultivars of guava leaf. *Food Sci. Biotechnol.* **2012**, *21*, 1557–1563. [[CrossRef](#)]
22. Siwarungson, N.; Ali, I.; Damsud, T. Comparative analysis of antioxidant and antimelanogenesis properties of three local guava (*Psidium guajava* L.) varieties of Thailand, via different extraction solvents. *J. Food Meas. Charact.* **2013**, *7*, 207–214. [[CrossRef](#)]
23. Prior, R.L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 797–810. [[CrossRef](#)]
24. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841–1856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Barontini, M.; Bernini, R.; Carastro, I.; Gentili, P.; Romani, A. Synthesis and DPPH radical scavenging activity of novel compounds obtained from tyrosol and cinnamic acid derivatives. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 809–816. [[CrossRef](#)]
26. Bernini, R.; Barontini, M.; Cis, V.; Carastro, I.; Tofani, D.; Chiodo, R.A.; Lupattelli, P.; Incerpi, S. Synthesis and Evaluation of the Antioxidant Activity of Lipophilic Phenethyl Trifluoroacetate Esters by In Vitro ABTS, DPPH, and in Cell-Culture DCF Assays. *Molecules* **2018**, *23*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Cortes-Penagos, C.J.; Cazares-Romero, A.; Flores-Alvarez, L.J.; Yahuaca-Juarez, B.; Padilla-Ramirez, J.S. Actividad antioxidante en cinco variedades de *Psidium guajava* L. *AGRO Product.* **2016**, *9*, 41–46.
28. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178.
29. Taga, M.S.; Miller, E.E.; Pratt, D.E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 928–931. [[CrossRef](#)]
30. Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K.K.; Liu, R.H. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3010–3014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Smirnoff, N.; Cumbes, Q. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1057–1060. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, D.; Wu, H.; Xia, Z.; Wang, C.; Cai, J.; Huang, Z.; Du, L.; Sun, P.; Xie, J. Partial characterization, antioxidant and antitumor activities of three sulfated polysaccharides purified from *Bullacta exarata*. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 784–792. [[CrossRef](#)]
33. Fu, Z.F.; Tu, Z.C.; Zhang, L.; Wang, H.; Wen, Q.H.; Huang, T. Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Biosci.* **2016**, *15*, 11–18. [[CrossRef](#)]
34. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Evans, C.R. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
35. Tachakittirungrod, S.; Ikegami, F.; Okonogi, S. Antioxidant active principles isolated from *Psidium guajava* grown in Thailand. *Sci. Pharm.* **2007**, *75*, 179–193. [[CrossRef](#)]
36. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
37. Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ou, B.; Hampsch-woodill, M.; Prior, R.L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Rattanachaiakunsopon, P.; Phumkhachorn, P. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4*, 393–396.

40. Kim, S.Y.; Kim, E.A.; Kim, Y.S.; Yu, S.K.; Choi, C.; Lee, J.S.; Kim, Y.T.; Nah, J.W.; Jeon, Y.J. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* leaves against oxidative stresses. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 804–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ademiluyi, A.O.; Oboh, G.; Ogunsuyi, O.B.; Oloruntoba, F.M. A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. *Comp. Clin. Path.* **2016**, *25*, 363–374. [[CrossRef](#)]
42. Díaz-De-Cerio, E.; Verardo, V.; Gómez-Caravaca, A.M.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Determination of polar compounds in guava leaves infusions and ultrasound aqueous extract by HPLC-ESI-MS. *J. Chem.* **2015**, *2015*. [[CrossRef](#)]
43. Chen, H.Y.; Yen, G.C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chem.* **2007**, *101*, 686–694. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license

7.0 Resultados generales

Polifenoles totales, flavonoides totales, y la actividad antioxidante *in vitro*, de los extractos de las hojas de las dos variedades de guayabo, en la fracción acuosa, acetona y cloroformo.

7.1 Polifenoles totales

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los polifenoles totales. Los extractos con mayor cantidad de polifenoles, en ambas variedades, fue la fracción acetona, seguida por la fracción acuosa y por último la fracción cloroformo. Entre las dos variedades, los extractos de la fracción cloroformo fueron estadísticamente iguales. En la fracción acetona, los extractos de Hidrozac fueron los que presentaron mayor cantidad, mientras que en la fracción acuosa Calvillo Siglo XXI fue la variedad de mayor cantidad. Los polifenoles totales en el extracto de la fracción acetona en el presente estudio supera por encima del doble a los cuantificados 141 mg EAG/g por You *et al.* [18] quienes también obtuvieron el extracto con acetona por maceración por una noche, siendo hojas de la misma especie pero diferente variedad. Por otro, lado en los extractos de la fracción acuosa se cuantificaron contenidos mayores a los cuantificados 140 mg EAG/g por Seo *et al.* [50] quienes obtuvieron los extractos hirviendo por 4 h, las hojas también de la misma especie pero diferente variedad.

Tabla 1. Polifenoles totales.

Variedad	Extracto			
	Agua 2016	Agua 2015	Acetona 2015	Cloroformo 2015
Calvillo Siglo XXI	285.21 ± 35.54 ^{cd}	242.10 ± 13.33 ^c	314.03 ± 8.05 ^d	71.69 ± 3.69 ^a
Hidrozac	256.76 ± 9.62 ^c	187.01 ± 9.24 ^b	374.63 ± 29.92 ^e	100.03 ± 2.37 ^a

¹Las letras diferentes indican las diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores promedio ($\pm$ SD) expresados en miligramos equivalentes a ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g).

7.2 Flavonoides totales

En la Tabla 2 se presentan los resultados de los flavonoides totales. Los extractos con mayor cantidad de flavonoides fueron la fracción acetona, seguida por la fracción acuosa y por último la fracción cloroformo. Entre las dos variedades, en la fracción cloroformo fueron estadísticamente iguales, mientras que en la fracción acuosa y en la acetona, la variedad Calvillo Siglo XXI fue en la que se cuantificaron mayores cantidades de flavonoides. Los resultados obtenidos en la fracción acuosa en el presente trabajo superan hasta por el triple a los 50 mg EQ/g obtenidos en la fracción acuosa por Seo *et al.* [50]. En la literatura encontrada de esta prueba de flavonoides en esta especie (*Psidium guajava*), los extractos fueron obtenidos principalmente con solventes como: agua, o ésta mezclada con un alcohol, además de variar en general toda la metodología de la técnica comparada con la realizada en el presente trabajo. Tona *et al.* [51] reportan la presencia de flavonoides mediante TLC (cromatografía de capa fina) en extractos crudos de hojas de guayabo. Por otra parte Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn [52] cuantifican concentraciones de flavonoides en hojas frescas y hojas seca de guayabo, las hojas se secaron en un horno por 72 h a 70 °C, la extracción la realizan con metanol y aislaron los flavonoides mediante una columna cromatográfica, encontrando que la mayor

cantidad de flavonoides fue en las hojas secas, siendo la quercetina el flavonoide de mayor cantidad.

Tabla 2. Flavonoides totales

Variedad	Extracto			
	Agua 2016	Agua 2015	Acetona 2015	Cloroformo 2015
Calvillo Siglo XXI	180.77 ± 7.23 ^d	108.54 ± 3.54 ^b	239.45 ± 11.32 ^e	107.48 ± 13.30 ^b
Hidrozac	152.61 ± 8.14 ^c	77.83 ± 6.65 ^a	135.88 ± 7.16 ^c	96.39 ± 4.57 ^{ab}

¹Las letras indican las diferencias significativas. Los valores promedio (±SD) expresados en miligramos equivalentes a quercetina por gramo de extracto (mg EQ/g)

7.3 Radical hidroxilo

En la Tabla 3 se presentan los resultados del atrapamiento del radical hidroxilo. Los extractos con menor concentración inhibitoria media (CI50) en el atrapamiento del radical hidroxilo fueron primeramente los de la fracción cloroformo, seguido por los de la fracción acuosa y por último los de la fracción acetona. Al comparar entre las dos variedades por fracción, los extractos cloroformo y acetona no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), mientras que en la fracción acuosa si existió diferencia significativa ($p < 0.05$). La variedad Calvillo Siglo XXI presentó una menor CI50 en los extractos de las fracciones acuosa y cloroformo, mientras que la variedad Hidrozac únicamente tuvo la menor CI50 en los extractos de la fracción acetona. Se reportan resultados de CI50 del radical hidroxilo con extractos de hojas de la misma especie, pero de diferente variedad y una metodología diferente a la realizada en el presente trabajo. Las CI50 obtenidas en el presente trabajo son hasta 20 veces más que las que reportan Kim *et al.* [53] de 110 µg/mL (CI50) en donde los extractos utilizados son acuosos obtenidos por maceración 24 h. Por otro

lado Ademiluyi *et al.* [54] reportaron valores de concentración efectiva media (CE50) del radical hidroxilo de extractos de hojas de cuatro diferentes variedades, siendo el rango de los valores reportados de 5,470 a 6,700 CE 50 µg/mL, los extractos los obtuvieron por maceración utilizando una mezcla de MetOH/HCl. Con los resultados obtenidos no se tuvo una correlación significativa entre el contenido de compuestos fenólicos y el atrapamiento del radical hidroxilo. Esto se considera debido a que los extractos de la fracción cloroformo fue la más baja de fenoles totales y flavonoides y ahora presentaron un CI 50 menor.

Tabla 3. Atrapamiento del radical hidroxilo

Variedad	Extracto			
	Agua 2016	Agua 2015	Acetona 2015	Cloroformo 2015
Calvillo Siglo XXI	1607.81 ± 110.78 ^{bc}	1726.51 ± 90.58 ^c	2416.04 ± 114.66 ^d	1103.42 ± 28.62 ^a
Hidrozac	2360.56 ± 104.80 ^d	2355.73 ± 60.07 ^d	2173.37 ± 108.42 ^d	1355.08 ± 134.28 ^{ab}

¹Las letras diferentes indican las diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores promedio ($\pm$ SD) expresados en concentración inhibitoria media en microgramos por mililitro (CI 50 µg/mL).

7.4 Radical ABTS

En la Tabla 4 se presentan los resultados del atrapamiento del radical ABTS expresados en capacidad antioxidante equivalentes a milimolar de trolox por miligramo de extracto (TEAC mM/mg). Los extractos acuosos fueron los que presentaron menor TEAC comparado con los extractos acetona y cloroformo. Al comparar por variedad, se tuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellas, en la fracción de los extractos acuosos mientras que los extractos de las fracciones acetona y cloroformo no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$). En los

resultados de Tachakittirungrod *et al.* [55] se presenta una tendencia contraria a la aquí encontrada respecto a la polaridad del solvente, reportando que la mayor TEAC fue en el extracto metanol, seguido por el butanol, acetato de etilo y por último el hexano, siendo los valores 3.785, 2.901, 2.647 y 1.061 (mM/mg) respectivamente. Por otro lado en el estudio que realizaron Diaz-De-Ceiro *et al.* [56] con extractos acuosos de hojas de guayabo obtenidos por sonicación por 10 min e infusión a 3,5 y 7 min, reportaron valores de TEAC de 1.13, 0.16, 0.22 y 0.18 mM TE/mg, respectivamente, los valores obtenidos con los extractos por sonicación comparados con los obtenidos en el presente trabajo con el extracto acuoso, están por debajo de dos hasta cuatro veces.

Tabla 4. Atrapamiento radical ABTS

Variedad	Extracto			
	Agua 2016	Agua 2015	Acetona 2015	Cloroformo 2015
Calvillo Siglo XXI	2.64 ± 0.09^b	2.37 ± 0.15^a	5.28 ± 0.01^f	4.99 ± 0.02^e
Hidrozac	3.34 ± 0.02^c	4.10 ± 0.03^d	5.24 ± 0.04^f	5.13 ± 0.02^{ef}

¹Las letras diferentes indican las diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores promedio ($\pm$ SD) expresados en capacidad antioxidante equivalentes a milimolar de trolox por miligramo de extracto (TEAC mM/mg).

7.5 Radical DPPH

En la Tabla 5 se presentan los resultados del atrapamiento del radical DPPH expresados como concentración inhibitoria media (CI50), se utilizó ácido ascórbico como control. Los extractos acetona 2015 fueron los que presentaron menor CI50, seguido por los extractos agua 2016, cloroformo 2015 y por último agua 2015, esta tendencia se observó en ambas variedades. Todos los extractos en ambas variedades fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). Aquí se puede ver claramente como el extracto agua 2016, que es de un material más reciente, presentó mejor atrapamiento que el extracto agua 2015 de material menos reciente. Al comparar únicamente los extractos de la fracción acetona, la CI50 de 34 $\mu\text{g/mL}$ reportada por You *et al.* [18], está por debajo casi tres veces con los obtenidos en el presente estudio. Las CI50 reportadas en la presente investigación, están por encima hasta 8 veces más que las CI50 de 120 $\mu\text{g/mL}$ de Kim *et al.* [53] de extractos acuosos obtenidos por maceración 24 h. Por otro lado Ademiluyi *et al.* [54] sus CI50 de sus extractos obtenidos por maceración 24 h utilizando una mezcla de MetOH/HCl de hojas de cuatro diferentes variedades, fueron de los 730 a los 910 $\mu\text{g/mL}$, su mejor CI50 730 $\mu\text{g/mL}$ fue con los extractos de las hojas de la variedad Pink guava, que bien podría compararse con el extracto Agua 2015 de la variedad Hidrozac donde su CI50 fue de 811 $\mu\text{g/mL}$, en ambas variedades al parecer presentan frutos rosados.

Tabla 5. Atrapamiento radical DPPH

Variedad	Extracto				Control
	Agua 2016	Agua 2015	Acetona 2015	Cloroformo 2015	Ácido ascórbico
Calvillo Siglo XXI	269.78 $\pm$ 12.89 ^d	671.44 $\pm$ 16.36 ^h	141.64 $\pm$ 1.66 ^c	385.15 $\pm$ 10.11 ^e	
Hidrozac	421.77 $\pm$ 13.17 ^f	811.25 $\pm$ 7.74 ⁱ	105.03 $\pm$ 1.70 ^b	608.32 $\pm$ 11.81 ^g	

					78.60 ± 2.21 ^a
--	--	--	--	--	------------------------------

¹Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores promedio ($\pm$ SD) fueron expresados en concentración inhibitoria media en microgramos por mililitro (CI 50 $\mu\text{g/mL}$)

7.6 Atrapamiento radical ORAC-FL

En la Tabla 6 se presentan los resultados de ORAC expresados en micro moles equivalentes a trolox por microgramo de extracto ($\mu\text{M ET}/\mu\text{g}$). Por fracciones la de mayor equivalencia fue encontrada en los extractos de la fracción acetona, seguido por la acuosa y por último la fracción cloroformo. En la variedad Calvillo siglo XXI los extractos Agua 2015 fueron lo de mayor $\mu\text{M ET}/\mu\text{g}$, seguido por los extractos de acetona 205 y Agua 2016 los cuales son estadísticamente iguales y el extracto cloroformo fue en el que se obtuvo el menor $\mu\text{M ET}/\mu\text{g}$. Por su parte la variedad Hidrozac presentó su mayor cantidad en la fracción acetona siendo está estadísticamente igual a las fracciones acuosas, la menor cantidad de $\mu\text{M ET}/\mu\text{g}$ fue en el extracto de la fracción cloroformo. Entre variedades por tipo de extracto, la diferencia significativa ($p < 0.05$) fue en el extracto de la fracción agua 2015 mientras que en el resto de los extractos fueron estadísticamente iguales entre las dos variedades. En el trabajo de Rodriguez *et al.* [57] los extractos de las hojas los obtuvieron mediante CO_2 supercrítico reportando valores de 700 $\mu\text{M ET}/\mu\text{g}$ muy por encima de los obtenidos en el presente estudio en cualquiera de las diferentes fracciones. En la fruta de guayaba es en donde se ha realizado este ensayo de ORAC principalmente. Rojas-Garbanzo *et al.* [58] reportan valores que aumentaron de 10 a 16 $\mu\text{M ET}/100\text{g}$ según el estado de madurez de la fruta.

Tabla 6. Atrapamiento ORAC

Variedad	Extracto

	Agua 2016	Agua 2015	Acetona 2015	Cloroformo 2015
Calvillo Siglo XXI	4.9 ± 0.75 ^{bc}	7.5 ± 0.73 ^d	5.5 ± 0.65 ^c	2.1 ± 0.19 ^a
Hidrozac	4.6 ± 0.80 ^{bc}	4.5 ± 0.87 ^b	5.0 ± 0.25 ^{bc}	2.1 ± 0.09 ^a

¹Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores promedio ($\pm$ SD) fueron expresados en micro moles equivalentes a trolox por microgramo de extracto (μ M ET/ μ g).

7.7 Análisis de correlación entre los compuestos fenólicos y la capacidad de atrapamiento de los radicales.

En la Tabla 7 se presenta el coeficiente de correlación entre los diferentes ensayos. Al comparar la correlación entre los flavonoides totales y el resto de los ensayos, la mayor correlación positiva se encontró contra los polifenoles totales, seguida por el radical hidroxilo, luego ORAC y por último el ABTS. Los flavonoides totales presentaron una correlación negativa alta contra el ensayo DPPH. Ahora al comparar la correlación entre los polifenoles totales y el resto de los ensayos, la mayor correlación positiva fue contra el ensayo ORAC, seguido por el ensayo radical hidroxilo, y por último contra los flavonoides. Los polifenoles totales presentaron una correlación negativa alta contra el ensayo DPPH y negativa baja contra ABTS. El ensayo de los polifenoles totales, ORAC y OH fueron los que presentaron la correlación positiva más alta, lo que nos estaría indicando que estos ensayos son los más recomendables realizar para conocer la capacidad antioxidante *in vitro* de diferentes extractos de hojas de *Psidium guajava* L. Chen y Yen [59] reportaron una correlación positiva de los polifenoles totales contra otros ensayos como ABTS utilizando extractos de hojas de guayabo. La correlación negativa entre el ensayo DPPH contra los polifenoles totales y flavonoides totales que se encontró en el

presente trabajo también lo reportan Ademiluyi *et al.* [54] además de reportar una correlación positiva entre los polifenoles totales y el ensayo ABTS.

Tabla 7. Correlación entre los ensayos.

	Ensayos					
	F.T.	P.T.	ABTS	DPPH	ORAC	OH
F.T.	1					
P.T.	0.61	1				
ABTS	0.06	-0.15	1			
DPPH	-0.76	-0.59	-0.35	1		
ORAC	0.31	0.71	-0.58	-0.04	1	
OH	0.38	0.69	0.01	-0.14	0.52	1

F.T= Flavonoides totales. P.T.= Polifenoles totales. OH= Radical hoidroxilo.

7.8 Tasa de crecimiento

En la Figura 1 y Tabla 8, se muestran los resultados de la tasa de crecimiento, los tratamientos con L-Name Hidrozac, L-Name Calvillo y L-Name Captopril fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) al control, así como al resto de los tratamientos.

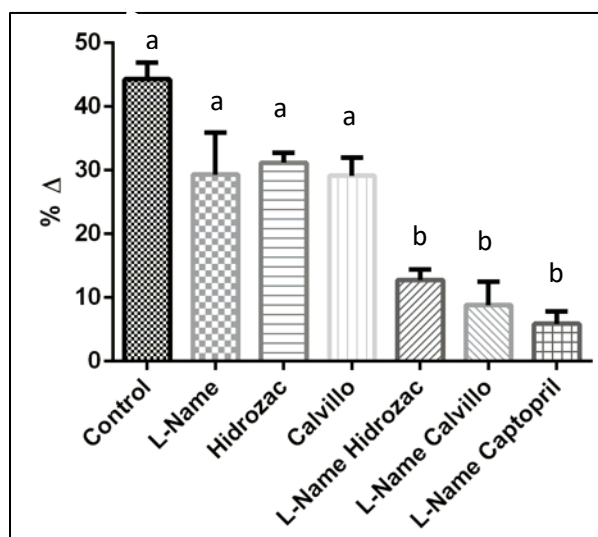


Figura 1. Tasa de crecimiento de las ratas en los diferentes tratamientos. Los valores promedio ($\pm$ EEM) expresados en porcentaje.

Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis.

Tabla 8 Tasa de crecimiento de las ratas en los diferentes tratamientos. Los valores promedio ($\pm$ EEM) en porcentaje.

Control	L-Name	Hidrozac	Calvillo	L-Name Hidrozac	L-Name Calvillo	L-Name Captopril
44.33 $\pm$ 2.6 ^a	29.31 $\pm$ 6.6 ^a	31.17 $\pm$ 1.6 ^a	29.13 $\pm$ 2.9 ^a	12.75 $\pm$ 1.6 ^b	8.80 $\pm$ 3.7 ^b	5.88 $\pm$ 2.0 ^b

Valores promedio ($\pm$ error estándar de la media). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

7.9 Súper óxido dismutasa SOD

La súper óxido dismutasa (SOD) tiene mayor actividad en los tejidos de corazón (ver Figura 4 y Tabla 9), mientras que la actividad en riñones (ver Figura 3 y Tabla 9) y aorta (ver Figura 2 y Tabla 9) fue muy similar y aún menor porcentaje que la actividad en el corazón. La actividad de la SOD aumentó en los tratamientos respecto al control en los tejidos de los riñones y de la aorta, mientras que su actividad en los tejidos de corazón fue irregular. La actividad de la SOD disminuyó en el tratamiento de L-Name respecto al control en el corazón. Los extractos acuosos de ambas variedades de guayabo restablecieron la actividad de la SOD en los tratamientos con L-Name en el corazón respecto al control.

Tabla 9. Actividad de la SOD en la aorta, riñones y corazón en los diferentes tratamientos, expresando la actividad de la SOD en porciento de inhibición por mg de proteína.

Control	L-Name	Hidrozac	Calvillo	L-Name Hidrozac	L-Name Calvillo	L-Name Captopril
Aorta						
9.62 ± 1.0 ^a	16.07 ± 2.1 ^a	20.80 ± 5.1 ^a	16.62 ± 4.0 ^a	21.37 ± 7.6 ^a	21.58 ± 6.8 ^a	10.35 ± 1.5 ^a
Riñones						
8.58 ± 0.4 ^b	11.68 ± 1.0 ^b	12.68 ± 1.0 ^b	14.85 ± 1.4 ^a	15.27 ± 1.4 ^a	8.9 ± 1.1 ^b	13.05 ± 1.0 ^b
Corazón						
35.00 ± 5.3 ^{a,b}	22.17 ± 5.1 ^b	54.83 ± 5.9 ^a	22.5 ± 4.2 ^b	46.67 ± 6.2 ^{a,b}	44.33 ± 7.3 ^{a,b}	32.33 ± 2.9 ^{a,b}

Valores promedio (± error estándar de la media). Letras diferentes en los renglones indican diferencias significativas (p < 0.05), análisis Kruskal Wallis

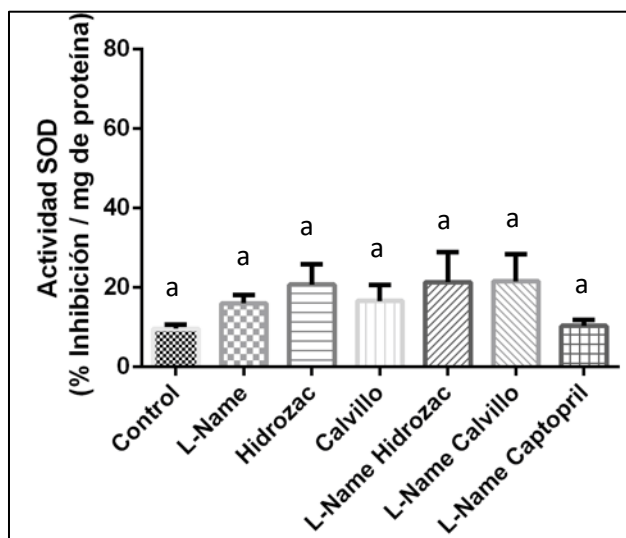


Figura 2. Actividad de la SOD en la aorta en los diferentes tratamientos, expresando la actividad de la SOD en porciento de inhibición por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05), análisis Kruskal Wallis

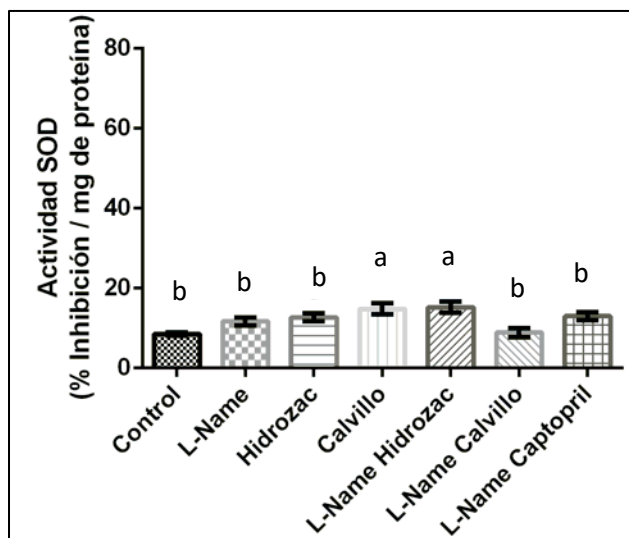


Figura 3. Actividad de la SOD en los riñones en los diferentes tratamientos, expresando la actividad de la SOD en porcentaje de inhibición por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

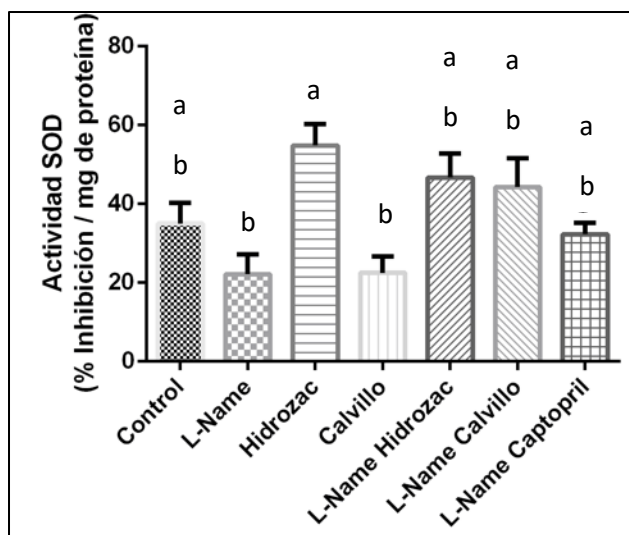


Figura 4. Actividad de la SOD en corazón en los diferentes tratamientos, expresando la actividad de la SOD en porcentaje de inhibición por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

7.10 Glutación

El glutación total (GSH total), glutación oxidado (GSSG), glutación reducido (GSH) y el índice de glutación (GSH/GSSG) (ver Tabla 10 y Figuras 5-12) no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en corazón y riñón en los diferentes tratamientos respecto al control. La concentración de GSH total en corazón fue hasta tres veces más que en el riñón, además de que existe una ligera tendencia a disminuir la concentración del glutación GSSG en los tratamientos L-Name con los extractos acuosos de las variedades Hidrozac y Calvillo Siglo XXI respecto al control. El GSSG fue mayor que el GSH en el corazón en todos los tratamientos, mientras que en los riñones fue inverso en todos los tratamientos. El glutación reducido (GSH) en el corazón fue menor significativamente en el tratamiento L-Name respecto a los demás tratamientos, mientras que el índice del glutación (GSH/GSSG) fue menor en corazón y riñón en el tratamiento de L-Name respecto a los demás tratamientos

Tabla 10 Glutación total, oxidado, reducido y su índice, en tejidos de riñones y corazón de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína.

	Control	L-Name	Hidrozac	Calvillo	L-Name Hidrozac	L-Name Calvillo	L-Name Captopril
Riñones							
GSH Total	17.20 $\pm$ 0.8 ^a	19.83 $\pm$ 1.6 ^a	18.02 $\pm$ 1.0 ^a	20.92 $\pm$ 2.0 ^a	18.25 $\pm$ 1.0 ^a	18.02 $\pm$ 0.8 ^a	19.58 $\pm$ 0.6 ^a
GSSG	1.63 $\pm$ 0.6 ^a	3.93 $\pm$ 1.3 ^a	2.93 $\pm$ 0.9 ^a	2.55 $\pm$ 0.9 ^a	3.57 $\pm$ 1.6 ^a	1.82 $\pm$ 0.4 ^a	4.72 $\pm$ 2.0 ^a
GSH	15.6 $\pm$ 0.8 ^a	15.90 $\pm$ 1.2 ^a	15.10 $\pm$ 1.5 ^a	18.37 $\pm$ 1.4 ^a	14.68 $\pm$ 1.0 ^a	16.22 $\pm$ 1.1 ^a	14.85 $\pm$ 1.5 ^a
GSH/GSSG	17.70 $\pm$ 3.3	6.22 $\pm$ 0.4	9.76 $\pm$ 2.5	21.66 $\pm$ 9.4	16.32 $\pm$ 6.8	13.26 $\pm$ 3.4	10.32 $\pm$ 3.0
Corazón							
GSH Total	77.35 $\pm$ 28 ^a	58.66 $\pm$ 13 ^a	67.22 $\pm$ 18 ^a	90.52 $\pm$ 26 ^a	51.20 $\pm$ 7.7 ^a	51.87 $\pm$ 10 ^a	32.12 $\pm$ 3.9 ^a
GSSG	47.43 $\pm$ 20 ^a	53.38 $\pm$ 11 ^a	45.27 $\pm$ 11 ^a	51.9 $\pm$ 17 ^a	44.5 $\pm$ 8.4 ^a	35.05 $\pm$ 8 ^a	30 $\pm$ 3.5 ^a
GSH	29.90 $\pm$ 7.7 ^a	5.28 $\pm$ 2.1 ^a	21.92 $\pm$ 17 ^a	38.52 $\pm$ 20 ^a	6.7 $\pm$ 4.7 ^a	16.77 $\pm$ 9.3 ^a	2.12 $\pm$ 0.7 ^a
GSH/GSSG	0.94 $\pm$ 0.2	0.08 $\pm$ 0.02	0.84 $\pm$ 0.8	1.21 $\pm$ 0.9	0.25 $\pm$ 0.2	0.64 $\pm$ 0.4	0.07 $\pm$ 0.02

Valores promedio ($\pm$ error estándar de la media). Letras diferentes en los renglones indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

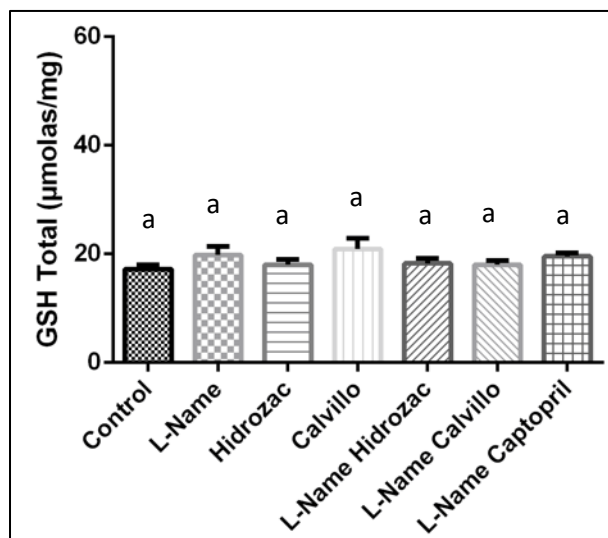


Figura 5. Glutación total en tejido de riñones de ratas, en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

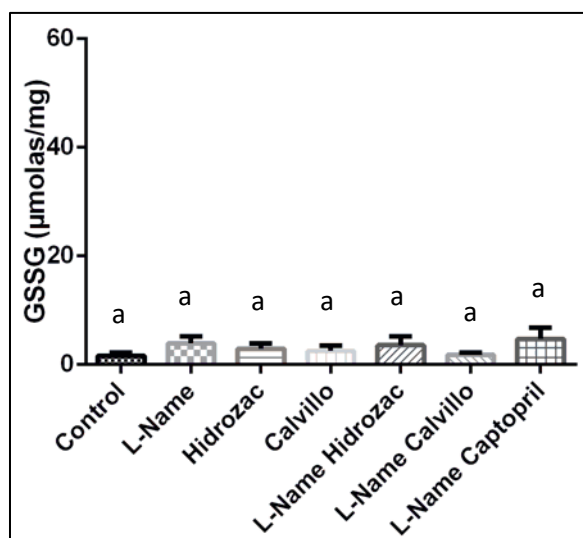


Figura 6. Glutación oxidado en tejido de riñones de ratas, en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

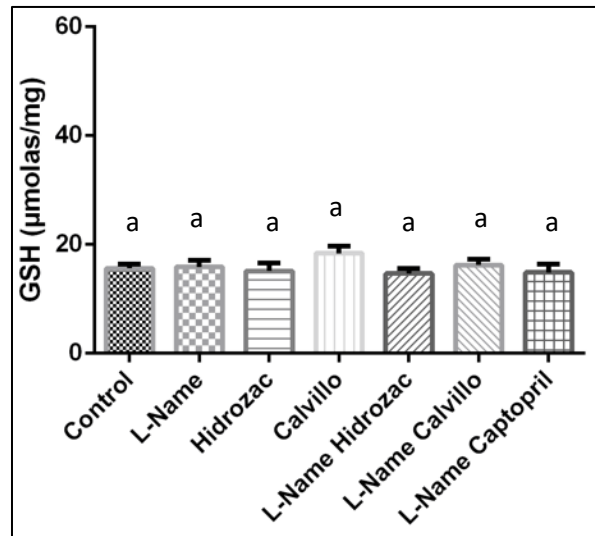


Figura 7. Glutación reducido en tejido de riñones de ratas, en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína
 Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

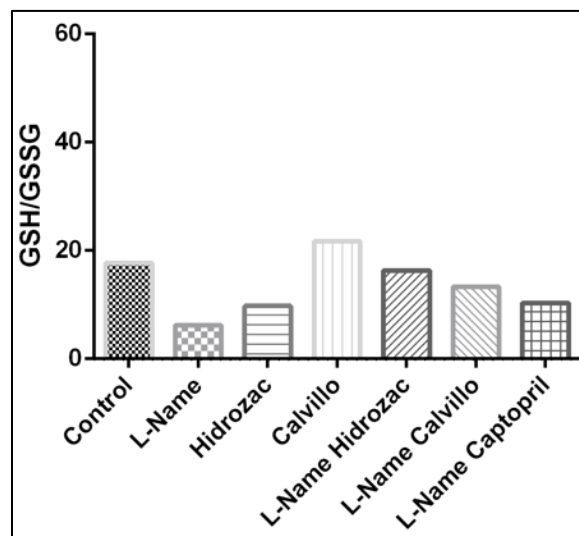


Figura 8. Índice de glutación en tejido de riñones de ratas, en los diferentes tratamientos, expresado como una magnitud adimensional.

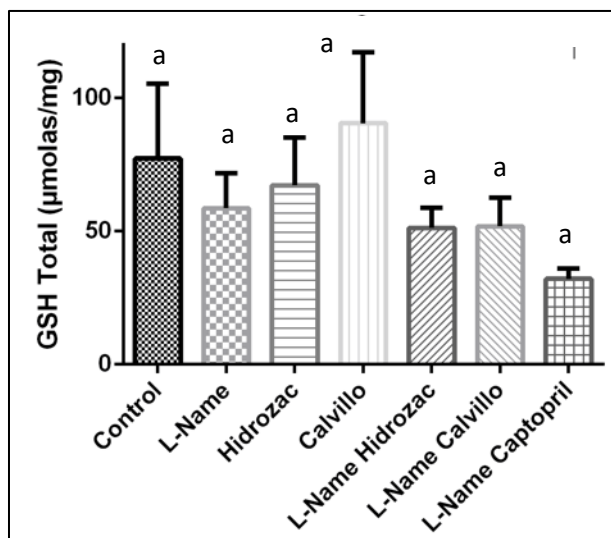


Figura 9. Glutación total en tejido de corazón de ratas, en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

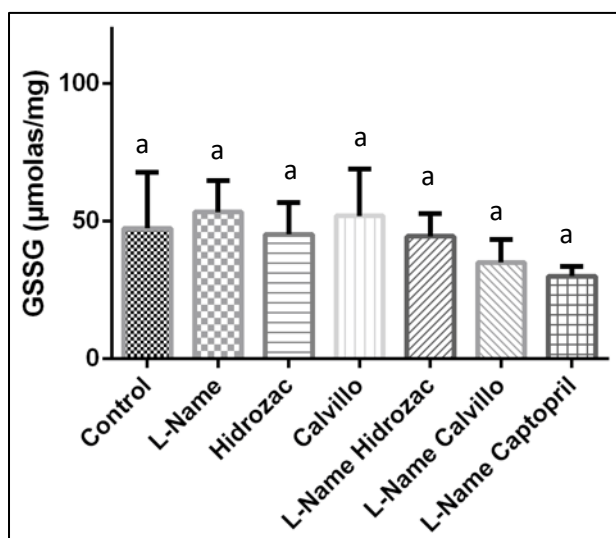


Figura 10. Glutación oxidado en tejido de corazón de ratas, en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

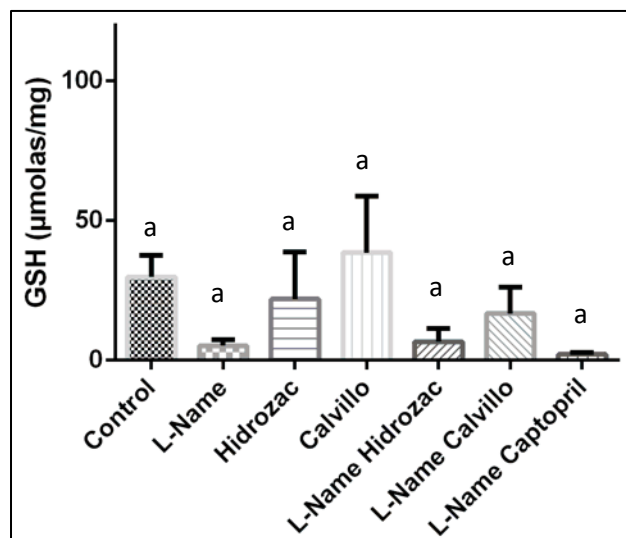


Figura 11. Glutación reducido en tejido de corazón de ratas, en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína
 Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

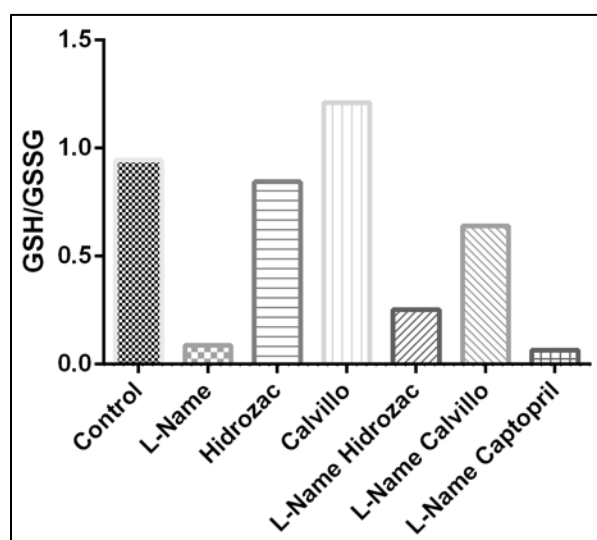


Figura 12. Índice de glutación en tejido de riñones de ratas, en los diferentes tratamientos, expresado como una magnitud adimensional.

7.11 Catalasa

La mayor concentración de catalasa fue en los riñones respecto al corazón (ver Tablas 11 y Figuras 13 y 14), sin embargo, no se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control en todos los tratamientos en ambos órganos.

Tabla 11. Actividad de la catalasa, en tejido de corazón y riñones de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en unidades de catalasa por mg de proteína.

Control	L-Name	Hidrozac	Calvillo	L-Name Hidrozac	L-Name Calvillo	L-Name Captopril
Corazón						
5.89 ± 1.0 ^a	5.82 ± 1.2 ^a	6.12 ± 1.1 ^a	6.32 ± 1.1 ^a	9.61 ± 2.4 ^a	7.66 ± 0.8 ^a	9.13 ± 1.5 ^a
Riñones						
39.80 ± 2.3 ^a	37.14 ± 4.0 ^a	45.83 ± 4.4 ^a	34.71 ± 3.4 ^a	41.88 ± 3.6 ^a	42.11 ± 3.3 ^a	40.43 ± 4.3 ^a

Valores promedio (± error estándar de la media). Letras diferentes en los renglones indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

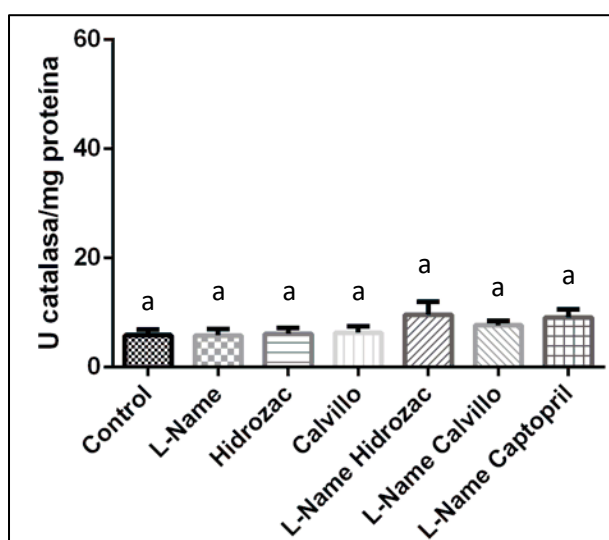


Figura 13. Actividad de la catalasa, en tejido de corazón de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en unidades de catalasa por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

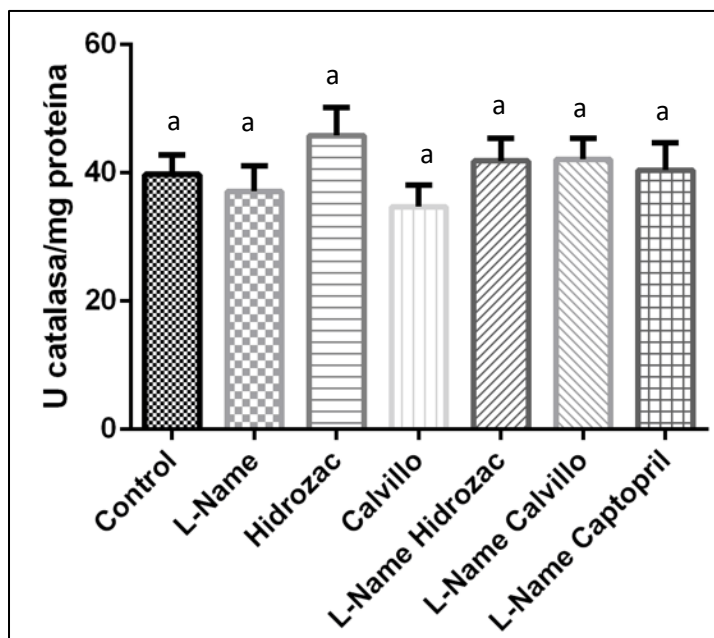


Figura 14. Actividad de la catalasa, en tejido de riñones de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en unidades de catalasa por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

7.12 Óxido nítrico equivalente a nitratos más nitritos (NOx)

Las concentraciones de óxido nítrico en forma de nitratos y nitritos (NOx) en todos los tratamientos no presentaron diferencias significativas en los tejidos de riñones, corazón y aorta respecto al control; las variaciones más marcadas, aunque sin presentar diferencias significativas ($p < 0.05$) fue en el suero (ver Tablas 12 y Figuras. 15-18). Tanto la variedad Hidrozac así como la Calvillo Siglo XXI mostraron una tendencia a aumentar las concentraciones de NOx en el suero en los diferentes tratamientos respecto al control, destacando la variedad Calvillo Siglo XXI ya que mantuvo los niveles de NOx por encima del tratamiento de L-Name.

Tabla 12. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en tejido de aorta, corazón, riñones y suero de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μ molas por mg de proteína.

Control	L-Name	Hidrozac	Calvillo	L-Name Hidrozac	L-Name Calvillo	L-Name Captopril
Aorta						
3.74 ± 0.8^a	2.97 ± 0.4^a	3.11 ± 0.3^a	4.23 ± 0.6^a	3.92 ± 0.6^a	2.71 ± 0.2^a	3.14 ± 0.3^a
Corazón						
3.23 ± 0.5^a	2.78 ± 0.4^a	2.99 ± 0.4^a	2.33 ± 0.2^a	4.02 ± 0.6^a	3.54 ± 0.8^a	4.06 ± 0.7^a
Riñones						
3.67 ± 0.5^a	3.61 ± 0.3^a	4.34 ± 0.2^a	4.36 ± 0.5^a	3.78 ± 0.4^a	4.51 ± 0.2^a	4.48 ± 0.6^a
Suero						
19.99 ± 4.8^a	36.33 ± 10^a	50.74 ± 16^a	50.99 ± 15^a	32.20 ± 9.1^a	51.90 ± 8.8^a	40.49 ± 6.3^a

Valores promedio ($\pm$ error estándar de la media). Letras diferentes en los renglones indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

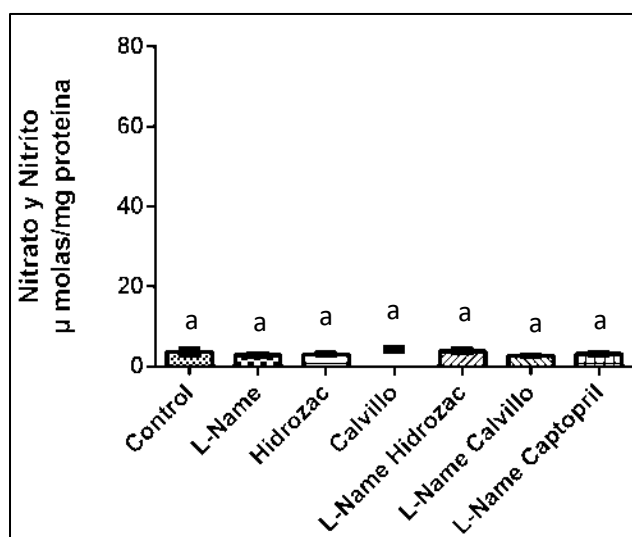


Figura 15. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en tejido de aorta de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μ molas por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

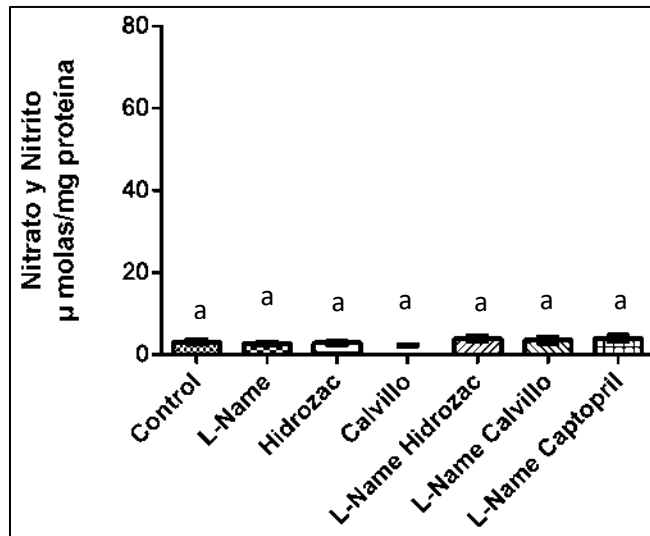


Figura 16. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en tejido de corazón de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μ molas por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

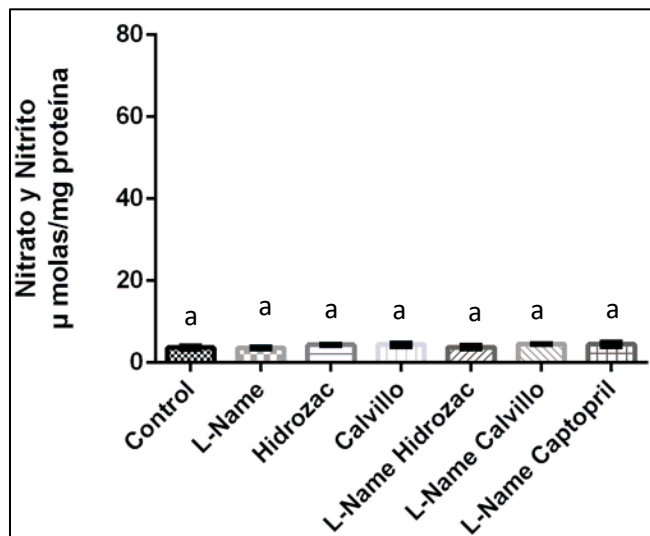


Figura 17. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en tejido de riñones de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μ molas por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

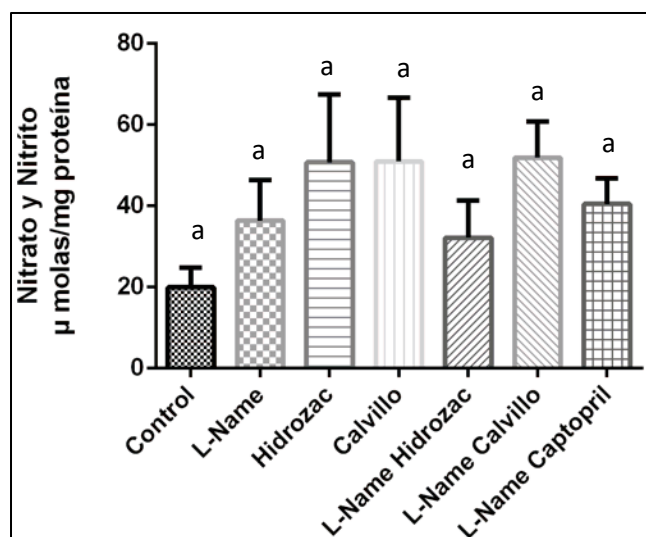


Figura 18. Concentración de nitratos más nitritos (NOx) en suero de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

7.13 Peroxidación de lípidos (TBARS)

En general la concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron muy similares en corazón y riñones (ver Tabla 13 y Figuras 19 y 20). Las TBARS aumentaron en los tratamientos con L-Name respecto al control, siendo muy similar la concentración de las TBARS en los tratamientos de L-Name más extracto. Los tratamientos con Hidrozac y Calvillo Siglo XXI lograron disminuir las TBARS en el corazón respecto al control y los demás tratamientos.

Tabla 13. Concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido de corazón y riñones de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μmol por mg de proteína.

Control	L-Name	Hidrozac	Calvillo	L-Name Hidrozac	L-Name Calvillo	L-Name Captopril
Corazón						
95.67 ± 15 ^a	115.2 ± 24 ^a	65.33 ± 16 ^a	48.33 ± 5.6 ^a	108.8 ± 25 ^a	125.8 ± 39 ^a	71.33 ± 16 ^a
Riñones						
131.2 ± 19 ^a	148.1 ± 11 ^a	108 ± 19.5 ^a	164.8 ± 26 ^a	148.9 ± 18 ^a	153.7 ± 20 ^a	150.4 ± 23 ^a

Valores promedio (± error estándar de la media). Letras diferentes en los renglones indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

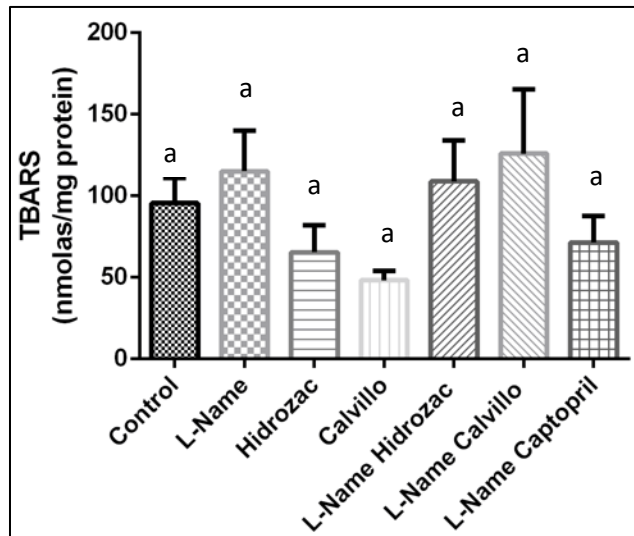


Figura 19. Concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido de corazón de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μ mol por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

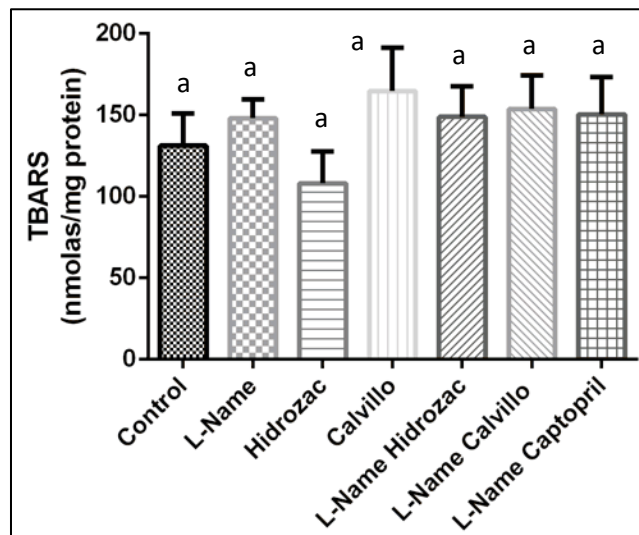


Figura 20. Concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido de riñones de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en μ mol por mg de proteína.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

7.14 Urea

La concentración de urea en suero (ver Tabla 14 y Figura 21) fue significativamente diferente ($p < 0.05$) únicamente en el tratamiento L-Name Captopril respecto al control, los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control.

Tabla 14 Concentración de urea en suero de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en mg por decilitro.

Control	L-Name	Hidrozac	Calvillo	L-Name Hidrozac	L-Name Calvillo	L-Name Captopril
53.24 ± 3.1 ^a	36.70 ± 3.8 ^a	38.41 ± 2.4 ^a	38.61 ± 2.1 ^a	37.39 ± 1.6 ^a	42.66 ± 1.1 ^a	33.49 ± 1.4 ^b

Valores promedio ($\pm$ error estándar de la media). Letras diferentes en los renglones indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

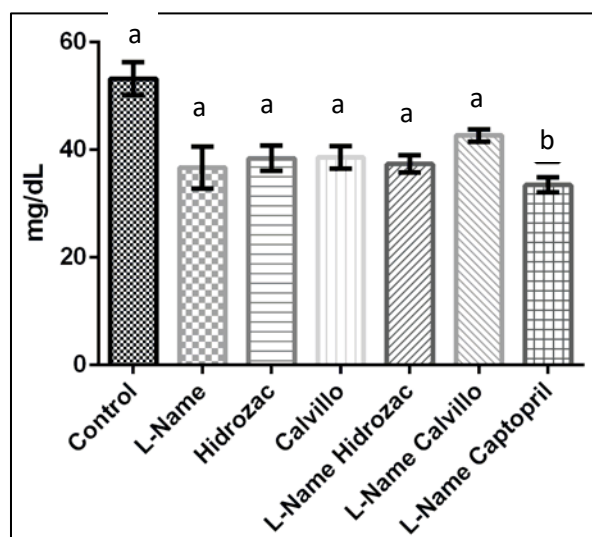


Figura 21. Concentración de urea en suero de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en mg por decilitro.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

7.15 Creatinina

La concentración de creatinina (ver Tabla 15 y Figura 22) no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y los tratamientos.

Tabla 15 Concentración de creatinina en suero de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en mg por decilitro.

Control	L-Name	Hidrozac	Calvillo	L-Name Hidrozac	L-Name Calvillo	L-Name Captopril
0.37 ± 0.03^a	0.30 ± 0.06^a	0.33 ± 0.03^a	0.30 ± 0.01^a	0.37 ± 0.03^a	0.37 ± 0.03^a	0.36 ± 0.03^a

Valores promedio ($\pm$ error estándar de la media). Letras diferentes en los renglones indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

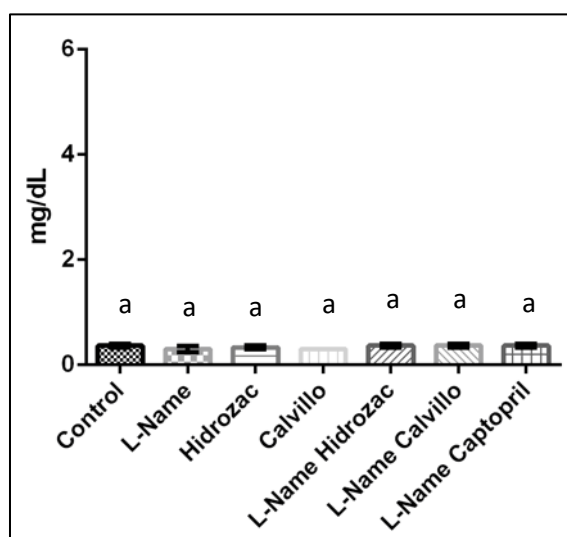


Figura 22. Concentración de creatinina en suero de ratas en los diferentes tratamientos, expresado en mg por decilitro.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), análisis Kruskal Wallis

8.0 Discusión de resultados generales

La pregunta de investigación formulada en el presente trabajo sobre los extractos acuosos en el aumento de las concentraciones de ON, se acepta, ya que los tratamientos donde se utilizaron los extractos acuosos de las variedades Calvillo Siglo XXI e Hidrozac, aumentaron las concentraciones de ON en los diferentes tejidos y suero, respecto al resto de los tratamientos donde no se administraron los extractos acuosos de las dos variedades de guayabo (ver Tabla 12 y Figuras 15-18).

Algo novedoso en el presente trabajo, fue el uso de la fracción cloroformo de las hojas de guayabo en los ensayos de capacidad antioxidante. La fracción cloroformo de ambas variedades de guayabo tuvieron una menor concentración inhibitoria media (CI50) para el atrapamiento del radical hidroxilo, respecto a la fracción acetona y agua (ver Tabla 3). Debido a esto, la fracción cloroformo podría ser utilizada en un modelo biológico donde se tuviera que evaluar la per-oxidación de lípidos, debido a que el extracto cloroformo fue significativamente diferente a las demás fracciones para el atrapamiento del radical hidroxilo, dicho radical puede extraer un electrón del ácido graso poliinsaturado (LH) para dar lugar a un radical lipídico centrado en el carbono (L^*) [60].

El ensayo del radical hidroxilo y ORAC mostraron una correlación alta positiva con los polifenoles totales (ver Tabla 7), esta correlación nos estaría indicando que posiblemente los polifenoles totales equivalentes a ácido gálico serían las principales estructuras de los polifenoles que están actuando en el atrapamiento de los radicales hidroxilo y especies reactivas de oxígeno. (ERO), ya sea debido a su estructura o bien debido a la concentración administrada [61]

Se utilizó únicamente la fracción acuosa para el modelo hipertenso con L-Name, debido a que la fracción acuosa de las hojas de guayabo es la de menor citotoxicidad a concentraciones menores a 500 mg/mL [62]. Si se considerara el peso promedio de las ratas utilizadas en el presente estudio al inicio de los tratamientos el cual fue de 242 g (ver materiales y métodos), y la dosis de 200 mg/kg

y el volumen utilizado de 0.200 mL, en promedio cada rata recibió una concentración de 242 mg/mL de extracto acuoso diario, casi la mitad de la concentración máxima citotóxica.

El tratamiento con L-Name fue el de menor índice de glutatión GSH/GSSG (ver Tabla 10 y Figura 8), el cual es un biomarcador del daño por estrés oxidativo en los tejidos en las enfermedades cardio vasculares (ECV) [60] [63]. Este daño por estrés oxidativo en las ECV [9], se correlaciona con la actividad de la súper óxido dismutasa (SOD) y el glutatión [64] y [43].

La disminución de la actividad de la SOD principalmente fue en el corazón con el tratamiento con L-Name y con la variedad Calvillo, lo que probablemente estaría influyendo en el incremento de la concentración del glutatión oxidado (GSSG) en el corazón en estos mismos tratamientos (ver Tabla 9 y 10 y Figura 4 y 10). A mayor concentración de GSSG se redujo la concentración del GSH y disminuyó el GSH/GSSG en todos los casos. Tanto la variedad Hidrozac como la Calvillo Siglo XXI fueron capaces de mantener el GSH/GSSG igual que el control pudiéndose considerar que pueden proteger al corazón y riñón por el daño por estrés oxidativo en un modelo hipertenso deficiente de óxido nítrico como el que se genera con el L-Name.

Las concentraciones de catalasa (ver Tabla 11 y Figura 13 y 14) no se vieron afectados en ninguno de los tratamientos respecto al control, aunque las concentraciones de las TBARS en corazón y riñones (ver Tabla 13 y Figura 19 y 20) no fueron menores en los tratamientos de L-Name, los tratamientos con los extractos de ambas variedades Hidrozac y Calvillo Siglo XXI mostraron una disminución de las TBARS en el corazón, destacando la variedad Hidrozac al disminuir también las TBARS en los riñones.

Las concentraciones de NOx en los tejidos de los riñones, corazón y aorta se mantuvieron en sus concentraciones basales, el incremento de la concentración fue en el suero (ver Tabla 12 y Figuras 15-18), esto muy probablemente debido a que se incrementa la actividad de la óxido nítrico sintasa ONS en las células endoteliales

por el estímulo de los polifenoles presentes en los extractos acuosos de las hojas de guayabo. Con lo que se puede considerar que las variaciones de NOx, en el modelo inducido con L-Name, se establecieron a nivel del sistema vascular principalmente.

Al considerar el desempeño por variedad de guayabo, la variedad Calvillo Siglo XXI aumentó la actividad de la SOD en el corazón y aorta, sin embargo, la variedad Hidrozac aumentó la actividad de la SOD en mayor porcentaje, en corazón, aorta y riñón. Esta mayor actividad de la SOD en los tratamientos con los extractos de la variedad Hidrozac, al parecer, logran disminuir las TBARS en corazón y riñones mejor que la variedad Calvillo Siglo XXI [65]. Por lo que se podría considerar que la restauración de la actividad de la SOD y la disminución de las TBARS en corazón y riñones, bien puede deberse a las características de los polifenoles presentes en los extractos y no tanto por la cantidad [66]. Esta disminución de las TBARS por parte de la variedad Hidrozac, coincide con los resultados en el ensayo de ORAC donde la variedad Hidrozac fue la de mejor desempeño respecto a la variedad Calvillo Siglo XXI, considerando el ensayo de ORAC como un buen indicador de desempeño antioxidante de los extractos al ser utilizados en un modelo biológico [26].

9.0 Conclusiones generales

Las dos variedades de guayabo Hidrozac y Calvillo Siglo XXI, aumentaron los niveles de óxido nítrico en los tratamientos donde fueron utilizados respecto a los demás tratamientos. Debido a esto fue aceptada la hipótesis planteada en el presente trabajo. Aunque el tratamiento L-Name también aumentó las concentraciones de ON respecto al control, no necesariamente significó que existiera una menor cantidad de TBARS en corazón y riñones, por el contrario, todo parece indicar que el desacoplamiento de la ONS hecho en el tratamiento por el L-Name aumentó la concentración del anión super óxido, reflejándose en un menor índice de glutatión GSH/GSSG en este tratamiento respecto a los demás tratamientos. Por lo que se destaca el desempeño que tuvieron las variedades Hidrozac y Calvillo Siglo XXI al aumentar la actividad de la NOS, SOD, CAT, reflejándose en una disminución de las TBARS, urea y creatinina.

Entre la variedad Calvillo Siglo XXI e Hidrozac se encontró que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en los diferentes extractos de las hojas, en la cantidad de compuestos fenólicos, así como su capacidad de atrapamiento de radicales. Obtener extractos de variedades registradas y establecidas, puede garantizar un control de las características de los extractos, aunque es importante considerar que puedan existir variaciones menores cuando las muestras se colecten en diferente ciclo de crecimiento del guayabo. Los solventes utilizados fueron capaces de extraer compuestos fenólicos, así como todas las fracciones presentaron capacidad de atrapamiento de los diferentes radicales. Los diferentes extractos de las hojas de guayabo presentaron capacidad para ceder electrones y átomos de hidrógeno según las características de los ensayos. De acuerdo con los resultados obtenidos, las mediciones de polifenoles totales, radicales hidroxilo y ORAC fueron los ensayos más apropiados para comparar diferencias entre variedades. En general los extractos acuosos son los más seguros para la ingesta, por lo que esta fracción sería la más recomendada para verificar el desempeño de ambas variedades en más ensayos *in vivo*.

ARTÍCULO

Lluvia en zonas urbanas

Julio César Camarena Tello y Héctor Eduardo Martínez Flores



Nubes cargadas de agua sobre la ciudad de México. Foto: Julio César Camarena Tello

¿De dónde proviene la lluvia? ¿Cómo interactúa el agua de lluvia y la zona urbana? ¿Qué se está haciendo con el agua de lluvia de la zona urbana? ¿En qué podría ayudar el agua de lluvia a la zona urbana?

Son algunas preguntas formuladas para tratar de entender y explicar, cómo el agua de las lluvias en las zonas urbanas puede proporcionar ciertos beneficios, si se le generara un óptimo manejo, almacenamiento y uso adecuado.

¿De dónde proviene la lluvia?

La lluvia es resultado de la condensación de las microscópicas gotas de agua en la atmósfera, las cuales se forman de la evaporación del agua de los océanos, ríos y lagos. La mayor cantidad de vapor de agua para las lluvias la aportan los océanos, ésta llega a la zona urbana, por medio de las corrientes de aire que mueve las nubes.



M.C. Julio César Camarena Tello es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción en Biotecnología Alimentaria.

D.C. Héctor Eduardo Martínez Flores es Profesor Investigador, ambos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Aproximadamente el 22 % del total de agua evaporada en los océanos, llega tierra adentro. El agua de lluvia, el agua de los lagos, depósitos y ríos, conforman el 2% del total de agua fresca disponible, el 98% restante de agua fresca disponible se encuentra en los mantos acuíferos. Es importante saber que, de toda el agua en el planeta, solamente el 0.5% es agua fresca disponible.

¿Cómo interactúa el agua de lluvia y la zona urbana?

El agua de lluvia tiende a precipitar algunos materiales suspendidos en el aire de la zona urbana, debido a esto se considera que el agua de lluvia es de mala ca-

| **U.M.S.N.H.**

Año 7 /Enero - Febrero/ No. 37



Azoteas en la ciudad de Morelia, sin diseño de captación de agua de lluvia. Foto: Julio César Camarena Tello

lidad para el consumo humano, sin embargo, para otras actividades del hogar como lavar el carro, regar el jardín, lavar ropa y para el retrete, bien puede ser utilizada. De forma global, la urbanización genera efectos adversos a los recursos acuíferos, esto debido a que el reabastecimiento de los mantos acuíferos es cada vez menor.

El escurrimiento superficial del agua de lluvia es otro de los problemas que comúnmente se presentan en las zonas urbanas, llegándose a agravar, cuando éste sobrepasa la capacidad del diseño del alcantarillado.

¿Qué se está haciendo con el agua de lluvia de la zona urbana?

En la gran mayoría de las zonas urbanas, el agua de lluvia va directamente a mezclarse con las aguas residuales en el alcantarillado, probablemente parte de esto tenga que ver, con que son pocas las viviendas y

zonas urbanas diseñadas para la captación, almacenamiento y manejo del agua de lluvia. Por otro lado, en algunas ciudades de países como Londres, Grecia y Eslovaquia, diseñan modelos de aprovechamiento al agua de lluvia.

Una propuesta ecológica, es el de diseñar jardines de lluvia, los cuales, tienen una semejanza a un jardín regular, sólo que con características específicas que favorecen la filtración y el almacenamiento temporal, además de oxidar y reducir la contaminación que el agua de lluvia contiene.

¿En qué podría ayudar el agua de lluvia a la zona urbana?

Se pronóstica que para el 2030, la demanda de agua potable en todo el mundo será superada en un 40%, se ha calculado que, si se captara y usara

el agua de lluvia en nuestros hogares, podríamos tener un ahorro hasta del 50% del agua potable que usamos, con este ahorro bien podría repercutir contrarrestando tal vez un poco el desabasto del agua potable en las zonas urbanas. La conservación del agua potable en la zona urbana depende del cambio del comportamiento de los usuarios.

Al final de cuentas, el ahorro y los beneficios que se podrían obtener si se aplicarán técnicas de manejo al agua de lluvia, podrían variar dependiendo de las características de la zona urbana y la vivienda.

Beneficios del manejo del agua de lluvia

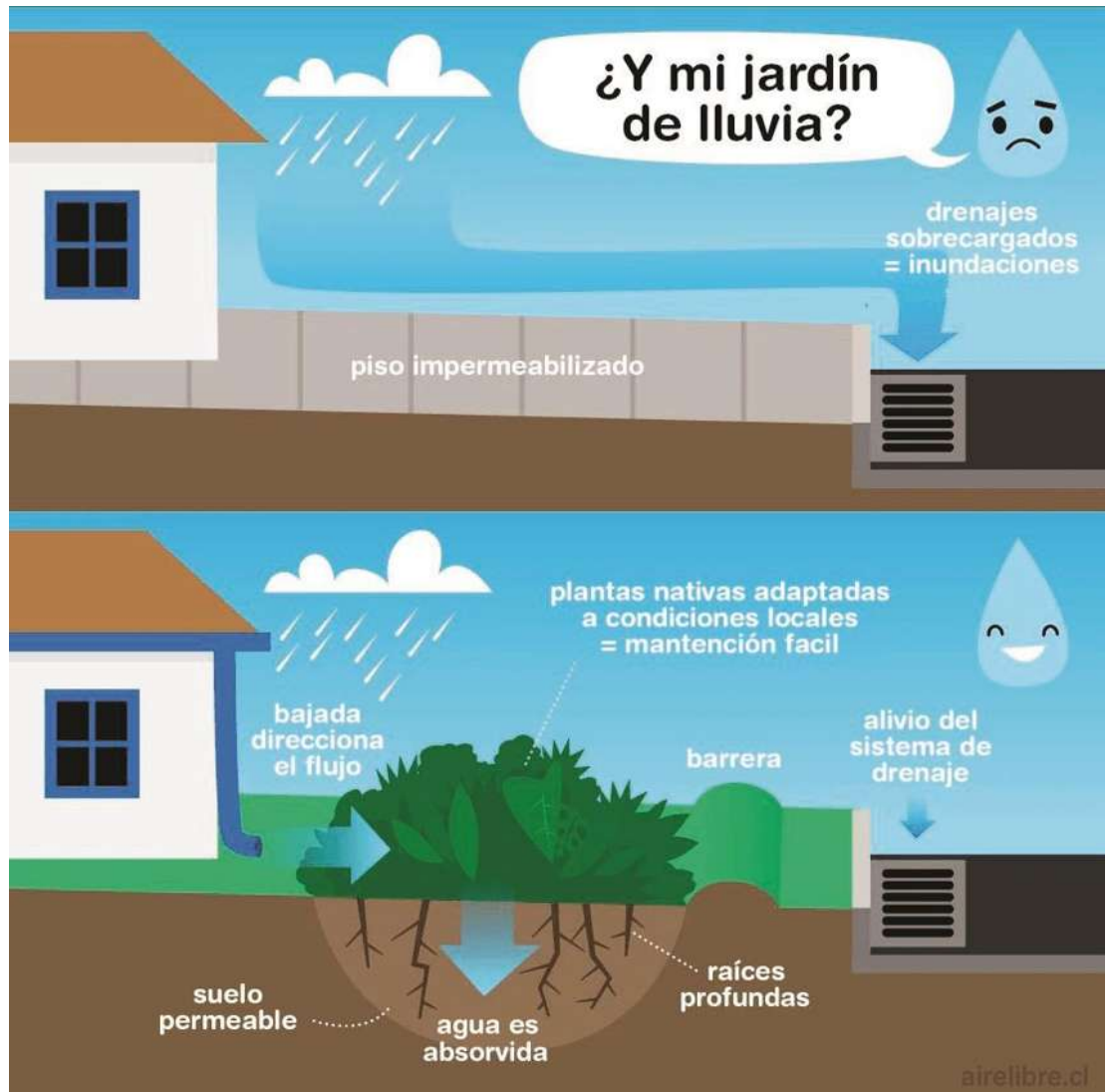
Una vez aclaradas las dudas planteadas, nos encontramos en la referencia de que el manejo del agua de lluvia en algunas zonas urbanas resulte que no sea lo primordial, no obstante, si se llevara a cabo un manejo del agua pluvial en las zonas urbanas, podría haber beneficios como conservar mayor volumen de líquido en los sistemas de agua potable municipales, menor escurrimiento superficial, menos desbordamientos, además de ayudar a conservar algunos estilos de vida que actualmente tenemos.

En la mayoría de los casos se observa una tendencia al crecimiento población, generándose a su vez, más contacto con agua de lluvia.

Dato importante

Se considera que el agua en el planeta permanece constante, lo que cambia, son las características de ésta; por ejemplo, el volumen de agua fresca disponible cada día es menor, debido al gran volumen de agua contaminada que se genera.

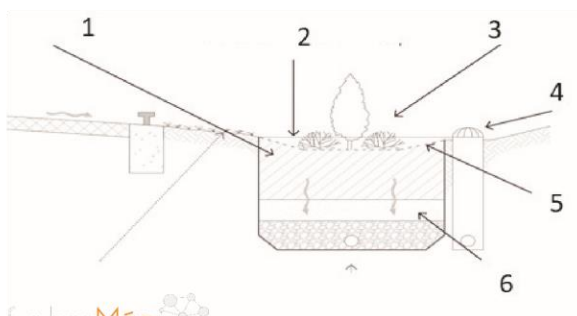
A ello se sumaría la reflexión de la importancia de aprovechar los momentos de lluvia, pues también preocupa la época de sequías, debido a que en algunos casos las precipitaciones llegan a disminuirse.



Água, Sua Linda y Árvore, Ser tecnológico. Versión Español: Diego Weissel

Jardín de lluvia

- * Remueve contaminantes, por el tipo de suelo y planta del cual está hecho, evitando que lleguen éstos a los mantos acuíferos, ríos y mares.
- * Frena el escurrimiento superficial.*
- Mejora el aspecto



SaberMás

Seis componentes del Jardín de Lluvia

- 1) Arena franco-arenosa o marga
- 2) Zona de estanque
- 3) Plantas (Preferentemente nativas)
- 4) Sistema de desbordamiento
- 5) Acolchado o mantillo/guijarro/capa de roca
- 6) Capa de arena

*Perló-Cohen M.. 2009. La derrota de las aguas. Nexos, 31(382):34. <https://nexos.com.mx/?p=3863>

*Ruiz-Cuello T. et al. 2015. Dimensionamiento de un sistema hidráulico en casa-habitación para el uso de agua residual. Rev. Cubana de Química, 27(3):315-324. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212015000300010

*Sistemas de ciudad | Isla Urbana (2017). <http://islaurbana.org/sistemas-de-ciudad/>

18

SaberMás

11.0 Bibliografía

1. OMS *Información general sobre la hipertension en el mundo*; 2013;
2. Campos, I.; Hernández-Barrera, L.; Rojas-Martínez, R.; Pedroza-Tobías, A.; Medina-García, C.; Barquera, S. Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, contro y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Publica Mex.* **2013**, 55, 144–150.
3. Franklin, S. S.; O'Brien, E.; Thijs, L.; Asayama, K.; Staessen, J. a. Masked Hypertension: A Phenomenon of Measurement. *Hypertension* **2014**, 65, 16–20, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04522.
4. Kopincová, J.; Púzszerová, A.; Bernátova, I. L-NAME in the cardiovascular system-nitric oxide synthase activator? *Farmacol. Reports* **2012**, 64, 511–520.
5. Zicha, J.; Dobesová, Z.; Kunes, J. Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens. Res.* **2006**, 29, 1021–1027, doi:10.1291/hypres.29.1021.
6. Ozkor, M. A.; Quyyumi, A. A. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Vascular Function. *Cardiol. Res. Pract.* **2011**, 2011, 1–12, doi:10.4061/2011/156146.
7. Konukoglu, D.; Uzun, H. Endothelial dysfunction and hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, 956, 511–540, doi:10.1007/5584_2016_90.
8. Thomas, G. D.; Zhang, W.; Victor, R. G. Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension. *JAMA* **2001**, 285, 2055–2057, doi:10.1001/jama.285.16.2055.
9. Avelar, T. M. T.; Storch, A. S.; Castro, L. A.; Azevedo, G. V. M. M.; Ferraz, L.; Lopes, P. F. Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved? *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **2015**, 51, 231–239, doi:10.5935/1676-2444.20150039.

10. Chen, Z. Y.; Peng, C.; Jiao, R.; Wong, Y. M.; Yang, N.; Huang, Y. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4485–4499, doi:10.1021/jf900803r.
11. Galleano, M.; Calabro, V.; Prince, P. D.; Litterio, M. C.; Piotrkowski, B.; Vazquez-Prieto, M. A.; Miatello, R. M.; Oteiza, P. I.; Fraga, C. G. Flavonoids and metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1259*, 87–94, doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06511.x.
12. Hügel, H. M.; Jackson, N.; May, B.; Zhang, A. L.; Xue, C. C. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 220–231, doi:10.1016/j.phymed.2015.12.012.
13. Pérez Gutierrez, R. M.; Mitchell, S.; Vargas Solis, R. Psidium guajava : A review of its traditional uses , phytochemistry and pharmacology. *J. Ethno-Pharmacology* **2008**, *117*, 1–27, doi:10.1016/j.jep.2008.01.025.
14. Lim, T. K. Psidium guajava. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*; Springer Netherlands, 2012; Vol. 3, pp. 684–727 ISBN 9789400725348.
15. SAGARPA Aumenta 8.2 por ciento producción de guayaba en México en el último trienio Available online: http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_0006-3.aspx.
16. Pariona, A. Top Guava Producing Countries In The World - WorldAtlas.com Available online: <http://www.worldatlas.com/articles/top-guava-producing-countries-in-the-world.html> (accessed on Oct 11, 2017).
17. Barbalho, S. M.; Farinazzi-Machado, F. M. V; Goulart, R. D. A.; Saad Brunnati, C. A.; Machado, A. M.; Ottoboni, B.; Teixeira, N. Psidium Guajava (Guava): A Plant of Multipurpose Medicinal Applications. *Med. Aromat. Plants* **2012**, *1*, 1–6, doi:10.4172/2167-0412.1000104.
18. You, D.-H.; Park, J.-W.; Yuk, H.-G.; Lee, S.-C. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of different parts of guava (*Psidium guajava* L.). *Food Sci.*

Biotechnol. **2011**, *20*, 1095–1100, doi:10.1007/s10068-011-0148-9.

19. Seo, J.; Lee, S.; Elam, M. L.; Johnson, S. a.; Kang, J.; Arjmandi, B. H. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. *Food Sci. Nutr.* **2014**, *2*, 174–180, doi:10.1002/fsn3.91.
20. Dai, J.; Mumper, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352, doi:10.3390/molecules15107313.
21. Brahmi, F.; Mechri, B.; Dabbou, S.; Dhibi, M.; Hammami, M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *38*, 146–152, doi:10.1016/j.indcrop.2012.01.023.
22. Morais-Braga, M. F. B.; Carneiro, J. N. P.; Machado, A. J. T.; Sales, D. L.; dos Santos, A. T. L.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Menezes, I. R. A.; Souza, D. S. L.; Costa, J. G. M.; Coutinho, H. D. M. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *24*, 302–313, doi:10.1016/j.sjbs.2015.09.028.
23. Jeong, C. H.; Bae, Y. Il; Park, S. J.; Lee, S. K.; Hur, S. J. Antioxidant activities of aqueous extracts from three cultivars of guava leaf. *Food Sci. Biotechnol.* **2012**, *21*, 1557–1563, doi:10.1007/s10068-012-0207-x.
24. Siwarungson, N.; Ali, I.; Damsud, T. Comparative analysis of antioxidant and antimelanogenesis properties of three local guava (*Psidium guajava* L.) varieties of Thailand, via different extraction solvents. *J. Food Meas. Charact.* **2013**, *7*, 207–214, doi:10.1007/s11694-013-9157-0.
25. Nantitanon, W.; Yotsawimonwat, S.; Okonogi, S. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT - Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 1095–1103, doi:10.1016/j.lwt.2010.02.015.

26. Prior, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 797–810, doi:10.1016/j.jff.2014.12.018.
27. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841–1856, doi:10.1021/jf030723c.
28. Padilla Ramírez, J. S.; González-Gaona, E.; Perales de la Cruz, M. Á. Nuevas Variedades de Guayaba (*Psidium guajava*) Available online: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3454>.
29. Cortes-Penagos, C. J.; Cazares-Romero, A.; Flores-Alvarez, L. J.; Yahuaca-Juarez, B.; Padilla-Ramirez, J. S. Actividad antioxidante en cinco variedades de *Psidium guajava* L. *AGRO Product.* **2016**, *9*, 41–46.
30. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178.
31. Taga, M. S.; Miller, E. E.; Pratt, D. E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 928–931, doi:10.1007/BF02542169.
32. Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* **1949**, *177*, 751–766.
33. Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K. K.; Liu, R. H. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3010–3014, doi:10.1021/jf0115589.
34. Smirnoff, N.; Cumbes, Q. HYDROXYL RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF COMPATIBLE SOLUTES. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1057–1060.
35. Zhang, D.; Wu, H.; Xia, Z.; Wang, C.; Cai, J.; Huang, Z.; Du, L.; Sun, P.; Xie,

- J. Partial characterization, antioxidant and antitumor activities of three sulfated polysaccharides purified from *Bullacta exarata*. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 784–792, doi:10.1016/j.jff.2012.05.006.
36. Fu, Z. F.; Tu, Z. C.; Zhang, L.; Wang, H.; Wen, Q. H.; Huang, T. Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Biosci.* **2016**, *15*, 11–18, doi:10.1016/j.fbio.2016.04.004.
 37. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Evans, C. R. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
 38. Tachakittirungrod, S.; Ikegami, F.; Okonogi, S. Antioxidant active principles isolated from *Psidium guajava* grown in Thailand. *Sci. Pharm.* **2007**, *75*, 179–193, doi:10.3797/scipharm.2007.75.179.
 39. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
 40. Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54, doi:10.1021/jf0305231.
 41. Ou, B.; Hampsch-woodill, M.; Prior, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent. **2001**, *49*, 4619–4626, doi:10.1021/jf010586o.
 42. Nyadjeu, P.; Nguenefack-Mbuyo, E. P.; Atsamo, A. D.; Nguenefack, T. B.; Dongmo, A. B.; Kamanyi, A. Acute and chronic antihypertensive effects of *Cinnamomum zeylanicum* stem bark methanol extract in L-NAME-induced hypertensive rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 27, doi:10.1186/1472-6882-13-27.

43. Bernátová, I.; Pecháňová, O.; Šimko, F. Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. *Exp Physiol* **1999**, *84*, 1095–1105, doi:10.1111/j.1469-445X.1999.01890.x.
44. Rahman, I.; Kode, A.; Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 3159–3165, doi:10.1038/nprot.2006.378.
45. Griffith, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **1980**, *106*, 207–212, doi:10.1016/0003-2697(80)90139-6.
46. Jeulin, C.; Soufir, J. C.; Weber, P.; Laval-Martin, D.; Calvayrac, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* **1989**, *24*, 185–196, doi:10.1002/mrd.1120240206.
47. Ghasemi, A.; Hedayati, M.; Biabani, H. Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess Assay. *J. Med. Sci. Res.* **2007**, *1*, 29–32, doi:10.1108/eb058300.
48. Mehrazin, F.; Ghasemi, A.; Zahediasl, S. Nitrate / L-arginine Therapy and Nitric Oxide Levels in the Stomach and Liver of Rats. *Zahedam J Res Med Sci.* **2015**, *17*, 4–8, doi:10.17795/zjrms-1056.
49. Buege, J. A.; Aust, S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **1978**, *52*, 302–310.
50. Seo, J.; Lee, S.; Elam, M. L.; Johnson, S. A.; Kang, J.; Arjmandi, B. H. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L .) for high antioxidant efficacy. *Food Sci. Nutr.* **2014**, *2*, 174–180, doi:10.1002/fsn3.91.
51. Tona, L.; Kambu, K.; Ngimbi, N.; Cimanga, K.; Vlietinck, A. J. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 57–65, doi:10.1016/S0378-8741(98)00015-4.
52. Rattanachaikunsopon, P.; Phumkhachorn, P. Contents and antibacterial

activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *J. Med. Plants Res.* **2010**, 4, 393–396.

53. Kim, S. Y.; Kim, E. A.; Kim, Y. S.; Yu, S. K.; Choi, C.; Lee, J. S.; Kim, Y. T.; Nah, J. W.; Jeon, Y. J. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* leaves against oxidative stresses. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 91, 804–811, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.111.
54. Ademiluyi, A. O.; Oboh, G.; Ogunsuyi, O. B.; Oloruntoba, F. M. A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. *Comp. Clin. Path.* **2016**, 25, 363–374, doi:10.1007/s00580-015-2192-y.
55. Tachakittirungrod, S.; Okonogi, S.; Chowwanapoonpohn, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chem.* **2007**, 103, 381–388, doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.034.
56. Díaz-De-Cerio, E.; Verardo, V.; Gómez-Caravaca, A. M.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Determination of polar compounds in guava leaves infusions and ultrasound aqueous extract by HPLC-ESI-MS. *J. Chem.* **2015**, 2015, doi:10.1155/2015/250919.
57. Rodriguez, E. A.; Árias, A. J.; Martínez, J. R.; Stashenko, E. E. Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* obtenidos con CO₂ supercrítico. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Fis. y Nat.* **2012**, 36, p305.
58. Rojas-Garbanzo, C.; Gleichenhagen, M.; Heller, A.; Esquivel, P.; Schulze-Kaysers, N.; Schieber, A. Carotenoid Profile, Antioxidant Capacity, and Chromoplasts of Pink Guava (*Psidium guajava* L. Cv. 'Criolla') during Fruit Ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 3737–3747, doi:10.1021/acs.jafc.6b04560.
59. Chen, H. Y.; Yen, G. C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chem.*

2007, *101*, 686–694, doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.047.

60. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84, doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
61. Csepregi, K.; Neugart, S.; Schreiner, M.; Hideg, É. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules* **2016**, *21*, 1–18, doi:10.3390/molecules21020208.
62. Chen, H.-H.; Wu, P.-H.; Lo, D.; Pan, Y.-C.; Wu, M.-C. Hepatoprotective Effect of Guava (*Psidium guajava* L.) Leaf Extracts on Ethanol-Induced Injury on Clone 9 Rat Liver Cells. *Food Nutr. Sci.* **2011**, *02*, 983–988, doi:10.4236/fns.2011.29133.
63. Tarpey, M. M.; Wink, D. a; Grisham, M. B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2004**, *286*, R431–R444, doi:10.1152/ajpregu.00361.2003.
64. Sainz, J.; Wangenstein, R.; Gómez, I. R.; Moreno, J. M.; Chamorro, V.; Osuna, A.; Bueno, P.; Vargas, F. Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am. J. Hypertens.* **2005**, *18*, 871–877, doi:10.1016/j.amjhyper.2004.12.022.
65. Abd El Motteleb, D. M.; Elshazly, S. M. Renoprotective effect of sitagliptin against hypertensive nephropathy induced by chronic administration of L-NAME in rats: Role of GLP-1 and GLP-1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *720*, 158–165, doi:10.1016/j.ejphar.2013.10.033.
66. Brewer, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 221–247, doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.