

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA GUAYABA (*Psidium guajava* L.)

Miriam Palomino Pacheco¹, Emilio Guija Poma¹, Nancy Lozano Reyes^{2*}

RESUMEN

Se ha evaluado las propiedades antioxidantes de la variedad amarilla de la guayaba (*Psidium guajava* L.) utilizando un sistema generador de radicales hidroxilo constituido por ascorbato/Cu-II; asimismo, se ha estudiado el efecto que ejercería la presencia en el mencionado sistema de antioxidantes como: EDTA, tioúrea y manitol. La guayaba amarilla en presencia de ascorbato/Cu-II disminuye en forma discreta la generación de radicales hidroxilo, efecto que decrece cuando se adiciona a los medios de ensayo tioúrea, manitol o EDTA. El efecto inhibitorio que ejerce la guayaba sobre los radicales hidroxilo generados por el sistema ascorbato/Cu-II, depende de la concentración de la guayaba.

Palabras clave: Radicales libres, radical hidroxilo, antioxidantes, guayaba.

ANTIOXIDANTS PROPERTIES OF GUAVA (*Psidium guajava* L.)

ABSTRACT

The antioxidant properties of the yellow guava variety (*Psidium guajava* L.) have been evaluated using a system that generates hydroxyl radicals constituted by ascorbate/Cu-II. The effect that the presence of antioxidants such as EDTA, thiourea, manitol would have in the mentioned system, have also been studied. The yellow guava in presence of ascorbate/Cu-II decreases in a discrete way the production of hydroxyl radicals, effect that diminish when thiourea, manitol or EDTA is added to the system. The inhibitory effect that the guava has over the generated hydroxyl radicals by the ascorbate/Cu-II system, depends on the guava concentration.

Key words: Free radicals, hydroxyl radicals, antioxidants, guava.

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres o más propiamente “especies reactivas de oxígeno” (ROS), son átomos o moléculas que tienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo; este paramagnetismo les confiere una alta reactividad química y la capacidad de sustraer electrones de otras moléculas tornando a éstas en radicales libres, generando así una reacción en cadena. Estos compuestos se generan durante el metabolismo normal en el ser humano, especialmente en la cadena respiratoria, y comprende al anión superóxido y al radical hidroxilo, entre otros^{1,2}.

Los ROS tienen la propiedad de producir daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ADN, y han sido implicados en la patogenicidad de diversas enfermedades como: cataratas, diabetes mellitus, cáncer, artritis reumatoide, infarto al miocardio, etc. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado la existencia de una correlación inversa entre la ingesta de

¹ Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición - Facultad de Medicina
Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

^{2*} Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

frutas y verduras y cáncer gastrointestinal, enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, asma, cáncer de pulmón, Parkinson, Alzheimer; enfermedades asociadas al efecto de los radicales libres que se generan en nuestro organismo a través de reacciones metabólicas, factores ambientales, contaminación, radiaciones ionizantes, drogas, alcohol, etc.^{3,4}.

El ser humano dispone de un sistema antioxidante constituido por enzimas como: catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y un sistema antioxidante no enzimático que actúan impidiendo la acción nociva de los ROS como: ácido úrico, vitamina C, vitamina A, glutatión, vitamina E, etc. Estos sistemas no son lo suficientemente eficientes para evitar el efecto dañino que ejercen los ROS, por cuyo motivo, es necesario ingerir alimentos que contengan sustancias con efectos antioxidantes⁵.

Las frutas constituyen una excelente fuente de compuestos antioxidantes, como: ácido ascórbico, carotenoides, tocoferoles, flavonoides y polifenoles^{6,7}; tal sucede con la guayaba, una fruta que es muy consumida por pobladores del sur del país, la que posee una elevada concentración de vitaminas A y C, polifenoles y otros componentes que podrían ejercer un eficiente efecto antioxidante. En el presente trabajo se evalúan las propiedades antioxidantes de la variedad amarilla de la guayaba (*Psidium guajava* L.) utilizando el sistema generador de radicales hidroxilo ascorbato/Cu-II; asimismo, se ha estudiado el efecto que ejercería en los mencionados sistemas la presencia de antioxidantes como: EDTA, tiourea y manitol.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Materiales

El ácido ascórbico, manitol, tiourea, etilendiamino tetraacético (EDTA), fosfato de potasio y ácido tricloroacético se adquirieron de la Merck Darmstad; la desoxirribosa y el ácido tiobarbitúrico se compraron a la Sigma Chemical Company.

Mestra biológica

El material biológico utilizado fue el fruto de *Psidium guajava* L. ecotipo amarilla colectada en el departamento de Moquegua, y trasladado al Laboratorio de Bioquímica Clínica y Nutricional del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina (UNMSM), donde se almacenó en una congeladora a una temperatura de -8° C, y de donde se obtuvieron las muestras al azar para realizar los diferentes experimentos, las cuales se descongelaron y fueron homogenizadas con agua bidestilada en una proporción de 1:4; el homogenizado obtenido se centrifugó a 1 500 rpm durante 30 minutos, a cuyo término se separó el sobrenadante, el que se utilizó para los diferentes experimentos.

Degradación de la desoxirribosa

Para evaluar el efecto antioxidante de la guayaba se utilizó la técnica de degradación de la desoxirribosa, que al reaccionar con el radical hidroxilo se transforma en malondialdehído, compuesto que reacciona con el ácido tiobarbitúrico. El medio de reacción estuvo constituido por tampón fosfato 50 mM pH 7,4, sulfato de cobre 0,05 mM, ascorbato 2 mM, desoxirribosa 2,8 mM y 0,025 g, de guayaba. Se incubó en baño maría a 37° C durante 20 minutos a cuyo término se le adicionó ácido tricloroacético al 10% y ácido tiobarbitúrico al 1%. Finalmente se sometió a ebullición durante 15 minutos, se enfriaron y se leyeron a 532 nm en un espectrofotómetro Pye Unicam; paralelamente se prepararon los blancos correspondientes. Todos los reactivos se prepararon el mismo día en que se realizaron los experimentos utilizando agua bidestilada⁸.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las frutas y verduras son alimentos ricos en una gran diversidad de compuestos fenólicos, como los flavonoides, cuya ingesta en los países occidentales está comprendida entre 20 mg. y 1,0 g. Estas sustancias exhiben propiedades antioxidantes y prooxidantes, habiéndose descrito que poseen diversos efectos biológicos, como: antialérgicas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, anticancerígenas, entre otras. Estudios de índole experimental muestran que el consumo de frutas y verduras está relacionado a una menor incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles y envejecimiento. La vitamina C es uno de los compuestos que está presente en muchos frutos, especialmente en la guayaba, fruta que tiene una elevada concentración de esta vitamina. El ascorbato pone en evidencia su efecto antioxidante al actuar como economizante de la vitamina E a nivel celular, pero en presencia de metales de transición genera radicales hidroxilo⁹.

Son diversos los métodos utilizados para medir la capacidad antioxidante de una muestra biológica; en el presente trabajo se ha utilizado el sistema generador de radicales libres constituido por ascorbato/Cu-II, que a pH 7,4 forma radicales hidroxilo. Con el propósito de observar la capacidad antioxidante de la guayaba amarilla se ha utilizado el sistema antes citado, habiéndose realizado su detección con la desoxirribosa que en presencia de ácido tricloroacético y ácido tiobarbitúrico forma un compuesto que absorbe a 532 nm. En la figura 1 se puede apreciar que la generación de estas especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en función del tiempo, disminuye en presencia de la fruta motivo del presente estudio; la diferencia de las densidades ópticas entre el control y el medio en que está presente la guayaba amarilla constituye el efecto antioxidante que ejerce la guayaba frente al sistema generador de radicales hidroxilo.

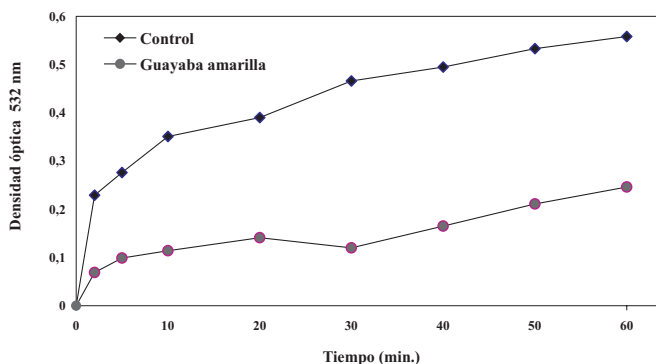


Figura 1. Generación de radicales hidroxilo en función del tiempo, por el sistema ascorbato/Cu-II en presencia de guayaba amarilla.

Con la finalidad de observar la naturaleza del efecto antes mencionado, se puede apreciar en la figura 2 que la disminución de la generación de ROS es dependiente de la concentración de la guayaba amarilla, la que fue utilizada en un rango de concentración comprendida entre 6,25 y 25 mg/mL. Cuando se adiciona manitol al sistema antes descrito, se puede percibir que al incrementar su concentración de 1,5 a 15 mM produce una apreciable inhibición de la generación de ROS; este efecto se observa en el gráfico de recíproca simple que se muestra en

la figura 3. El manitol es un conocido compuesto que tiene la propiedad de captar radicales hidroxilo, de tal manera, que su presencia en el medio de ensayo confirma la formación de ROS.

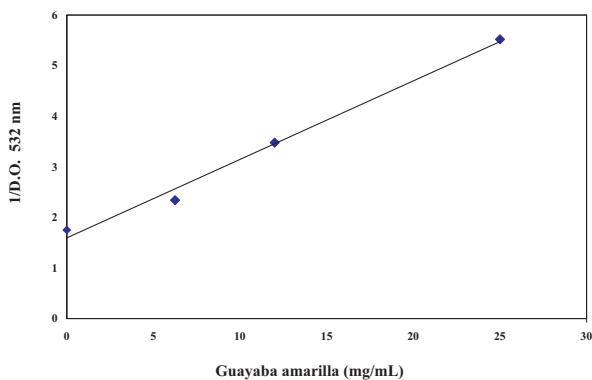


Figura 2: Efecto de la guayaba amarilla sobre la formación de radicales hidroxilo generados por el sistema ascorbato/Cu-II

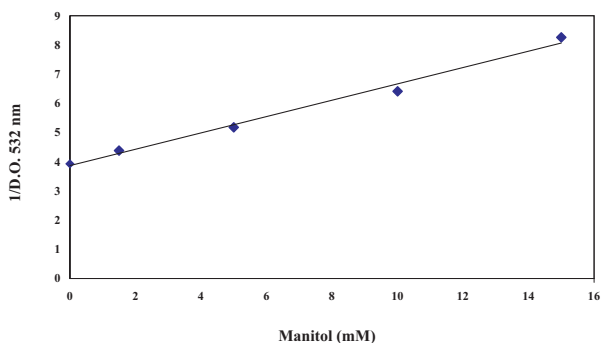


Figura 3: Efecto del manitol sobre la formación de radicales hidroxilo generados por el sistema ascorbato/Cu-II, en presencia de guayaba amarilla

La tiourea es un compuesto sintético de manifiesta propiedad antioxidante; cuando se utiliza en un medio constituido por ascorbato/Cu-II y guayaba amarilla en concentraciones comprendidas entre 0,13 y 0,39 mM, ocasiona una notable disminución de la generación de radicales libres. En la figura 4 se observa que cuando la concentración de tiourea es de 0,13 mM se produce una considerable inhibición y a partir de esta concentración se aprecia una inflexión de la recta en el sentido de una disminución del efecto inhibitorio, efecto que se torna evidente cuando las concentraciones de tiourea corresponden a 0,26 y 0,39 mM.

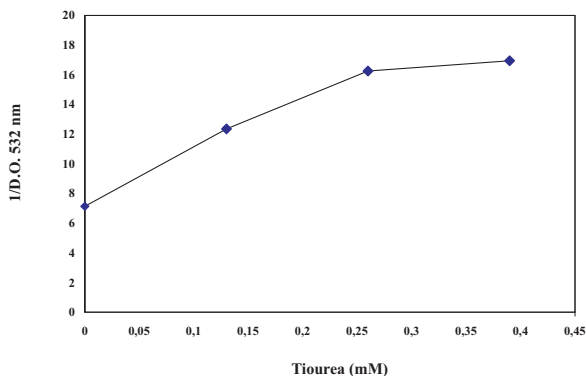


Figura 4: Efecto de la tiourea sobre la formación de radicales hidroxilo generados por el sistema ascorbato/Cu-II, en presencia de guayaba amarilla.

La presencia de la guayaba amarilla inhibió la descomposición de la desoxirribosa por acción de radicales libres generados por el sistema ascorbato/Cu-II, hecho que evidencia la presencia de compuestos con capacidad antioxidante en la guayaba. La inhibición ejercida por el manitol al sistema anterior corrobora el hecho de que se están generando radicales libres; asimismo, la presencia de tiourea en el medio antes citado produce un efecto similar, apreciándose además, que cuando la concentración de tiourea es mayor a 0,13 mM muestra un comportamiento que podría interpretarse admitiendo que está reaccionando con alguno de los componentes del sistema, además de ejercer su acción antioxidante. Se ha observado que el manitol, la tiourea y el EDTA inhibieron la ruptura del puente disulfuro del 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoato) por acción de radicales libres¹⁰.

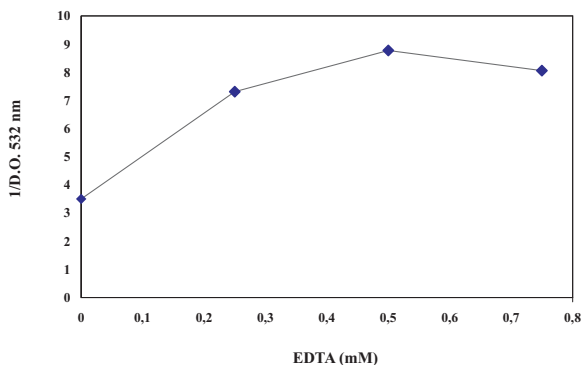


Figura 5: Efecto del EDTA sobre la formación de radicales hidroxilo generados por el sistema ascorbato/Cu-II, en presencia de guayaba amarilla

La utilización de concentraciones de EDTA entre 0,25 y 0,75 mM en un medio que contiene ascorbato/Cu-II y guayaba amarilla, produce una notable inhibición, como se puede evidenciar en la figura 5, correspondiendo la relación EDTA/Cu-II igual a 5,0; pero cuando

se incrementa la concentración de EDTA el efecto inhibitorio disminuye, fenómeno que se torna más evidente cuando se usa una concentración 0,75 mM de EDTA, es decir, cuando la relación EDTA/Cu-II es de 15. El efecto que ejerce la presencia de EDTA en un medio de reacción integrado por ascorbato/Cu-II en presencia de guayaba, podría explicarse por la propiedad complejante que tiene el EDTA sobre el Cu-II, disminuyendo de esta manera la disponibilidad de Cu-II libre para reaccionar con el ascorbato. Se ha descrito que el EDTA impidió la inactivación de la enzima acetilcolina esterasa por acción del ascorbato en presencia de cobre; este efecto lo ejerció fundamentalmente por su acción quelante¹¹.

Diversos compuestos tales como miricetina, quercetina y gopisol son poderosos inhibidores de la lipoperoxidación inducida por hierro en microsomas de hígado de rata. Sin embargo, incrementan considerablemente la generación de radicales hidroxilo a partir de H_2O_2 /Fe-III/EDTA, cuando se utiliza una concentración 100 μ M; en este mismo sistema los compuestos fenólicos antes citados, aumentaron ocho veces la formación de radicales hidroxilo. La miricetina y quercetina a la concentración de 75 μ M aceleraron el daño al ADN dependiente de bleomicina en presencia de Fe-III, probablemente por reducción del complejo bleomicina/Fe-III/ADN a la forma Fe-II^{12,13}.

La quercetina es un compuesto antioxidante de naturaleza fenólica que se encuentra ampliamente distribuida en frutas y verduras, como cebollas, brócoli y manzanas; esta sustancia tiene una eficiente acción protectora frente al daño oxidativo que ejerce el etanol en el hígado de ratones, en el que ha podido observarse que tiene la propiedad de reducir los procesos de peroxidación lipídica y prevenir o contrarrestar la disminución del glutatión y de las actividades de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa¹⁴.

También se ha descrito que la quercetina, miricetina y rutina inhiben la formación de aniones superóxido, generados por el sistema xantina/xantina oxidasa, mientras que la quercitina, cianidol no muestran efecto alguno. La lipoperoxidación de microsomas de hígado por aniones superóxido, generados por el sistema fenazina metosulfato/ azul de tetrazolio/NADH fueron inhibidos en grado diverso por los flavonoides antes mencionados, mientras que la clorpromazina y el hidroxianisol butilado no ejercieron efecto alguno¹⁵.

Se ha evidenciado que diversas fracciones obtenidas de la *Cuphea carthagenensis* tienen la propiedad de captar radicales hidroxilo generados por el sistema H_2O_2 /Fe-II; asimismo, se ha observado que este efecto antioxidante se torna extensivo para los aniones superóxido, generados por fenazina metosulfato/azul de tetrazolio/NADH y por el sistema xantina/xantina oxidasa¹⁶.

El efecto antioxidante del perejil (*Petroselinum sativum*) ha sido puesto en evidencia utilizando sistemas generadores de radicales hidroxilo, como el ascorbato/Cu-II y ascorbato/Fe-III, habiéndose descrito que actúa con mayor eficiencia sobre el primero de ellos. Análogamente, la producción de radicales hidroxilo por el sistema H_2O_2 /Fe-II fue inhibida por el perejil con una eficiencia similar al mostrado frente al sistema ascorbato/Cu-II¹⁷.

La Asociación Americana del Corazón (American Heart Association) teniendo en consideración los estudios epidemiológicos que asocian la alta ingesta de alimentos ricos en antioxidantes con una disminuida mortalidad por enfermedades como: cáncer, catarata, aterosclerosis, entre otras¹⁸, recomienda el consumo de una dieta balanceada que incorpore principalmente frutas y verduras ricas en antioxidantes. En tal sentido, es necesario tener la precaución de no ingerir frutas o verduras con elevado contenido de vitamina C y metales de transición como hierro o cobre, ya que esta asociación conforme se ha mostrado, genera radicales libres que podrían afectar los tejidos con los que se pongan en contacto.

CONCLUSIONES

- La variedad amarilla de *Psidium guajava* L. disminuyó la formación de radicales hidroxilo generados por el sistema ascorbato/Cu II, efecto que es dependiente de la concentración de la fruta.
- El manitol, la tiourea, y el EDTA inhibieron la generación de radicales hidroxilo formados por el sistema ascorbato/Cu-II/*Psidium guajava* L. variedad amarilla, en grado diverso.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración recibida por el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en cuyos laboratorios se realizó el presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Cascales M. Estrés oxidativo. Envejecimiento y enfermedad. 1999. Instituto de España. Madrid.
2. Kehrer JP, Smith C. Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in the ethiology of human diseases. En "Natural antioxidants in human health and diseases" (Frei B ed.), 1994, p. 25-62. Academic Press, New York.
3. Montero M, Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *Anal. Fac. Med. Lima*. 1996;57(4):278-281
4. Guija E, Troncoso L. Radicales Libres y Envejecimiento. *Bol. Soc. Quím. Perú*. 2000; LXVI:33-50.
5. Cheeseman, K.H.Y. y Slater, T.F. (1993) Free radicals in medicine. Churchill Livingstone. London.
6. Guo, C.J. y Yang, J.J. Progress in the study of antioxidant capacity of fruits and vegetables. *China Public Health*. 2001;17:87-88.
7. Dragland, S., Senoo, K., Wake, K., Holte, K. y Blomhoff, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J. Nutr*. 2003;133:1286-1290.
8. Gutteridge J. Ferrous salt promoted damage to deoxyribose and benzoate. *Biochem J*. 1987;243:709-711.
9. Lotito, S.B. y Frei, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence or epiphenomenon? *Free Radic. Biol. Med*. 2006;41:1727-1746.
10. Inoue H, Hirobe M. Disulfide cleavage and insulin denaturation by active oxygen in the copper(II)/ascorbic acid system. *Chem. Pharm. Bull*. 1986;34(3):1075-1079.
11. Shinar E, Navok T, Chevion M. The analogous mechanisms of enzymatic inactivation induced by ascorbate and superoxide in the presence of copper. *J. Biol. Chem*. 1983;258(24):14778-14783.
12. Yamamoto N. Inhibitory effect of quercetin metabolites and derivatives on copper ion-induced Lipid Oxidation in human low-density lipoprotein. *Arch. Biochem Biophys* 1999;372(2):347-354.
13. Laughton M, Halliwell B, Evans P, Robin J, Hoult S. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem. Pharm*. 1989;38(17):2859-2865.
14. Heredia M, Fernández B, Benedi J, Villar A. Efecto antioxidante de la quercetina en la hepatotoxicidad etanólica. *Anal. Real Acad. Farm*. 1999;65:559-572.
- 15.- Robak J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharm* 1988; 37(5):837-841.
16. Schuldt EZ. Investigacoes de atividade farmacológica de *Cuphea carthagenensis* Jacq Mcbride (sete sangrias) – Determinacao da capacidade antioxidante. Anais da Jornada Catarinense de Plantas Mediciniais – 2001. Santa Catarina-Brasil.
17. Troncoso L, Guija E. Propiedades antioxidantes del perejil (*Petroselinum sativum*) *Bol. Soc. Quím. Perú*. 2005;71(2):99-106.
- 18.- American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistical Update 2003. American Heart Association, Dallas, TX.