

# CINÉTICA DE ACUMULACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE FLAVONOIDES EN GUAYABA (*Psidium guajava* L.)

## KINETICS OF ACCUMULATION AND DISTRIBUTION OF FLAVONOIDS IN GUAVA (*Psidium guajava* L.)

Dolores Vargas-Alvarez<sup>1</sup>, Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>, Víctor A. González-Hernández<sup>1</sup>,  
E. Mark Engleman<sup>2</sup> y Ángel Martínez-Garza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fisiología Vegetal. <sup>2</sup>Botánica. <sup>3</sup>Estadística y Cálculo. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados.  
56230. Montecillo, Estado de México. (msoto@colpos.mx) (vadolores16@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

La finalidad de este trabajo fue identificar tres flavonoles (miricetina, quercetina y kaempferol) y dos flavonas (luteolina y apigenina) en corteza, hoja inmadura, hoja madura, hoja senescente, botón floral, flor y fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.). El botón floral presentó la mayor concentración de quercetina (2036 mg kg<sup>-1</sup>), seguido por la hoja madura con (1236 mg kg<sup>-1</sup>). El fruto presentó los cinco compuestos evaluados pero en menor concentración. De este estudio se derivó la evaluación del desarrollo de fruto y de hoja para identificar la etapa fenológica de mayor concentración de flavonoides. Entre los tres estadio de fruto, el primer estadio de botón presentó la mayor concentración (mg kg<sup>-1</sup>) de miricetina (255.8) quercetina (3604.7), luteolina (229.1), kaempferol (229.1) y apigenina (251.6). Las hojas maduras presentaron mayor concentración en julio: miricetina (208.44) quercetina (2883.08), luteolina (51.22) y kaempferol (97.25) (Tukey, p ≤ 0.05).

**Palabra clave:** *Psidium guajava*, corteza, flavonoides, fruto, hoja, yema floral.

### INTRODUCCIÓN

En varias especies los flavonoides varían sustancialmente entre genotipos, cambios estacionales, edades y daños de la hoja y sitios de ubicación (Kause *et al.*, 1999; Keinanen *et al.*, 1999; Laitinen *et al.*, 2000). Las hojas jóvenes son la fuente principal de compuestos fenólicos, porque los sintetizan como defensa contra predadores herbívoros que las prefieren por su mayor calidad nutricional respecto a las hojas maduras. Sin embargo, eso no siempre ocurre porque no todos los metabolitos tienen el mismo comportamiento durante el desarrollo foliar (Loponen *et al.*, 1997; Estiarte *et al.*, 1999). Por ejemplo, los flavonoles aumentan conforme avanza el desarrollo de la hoja (Cates, 1987). Probablemente las hojas maduras sean más importantes para las plantas porque proveen

### ABSTRACT

The objective of this work was to identify three flavonols (myricetin, quercetin, and kaempferol) and two flavones (luteolin and apigenin) in bark, immature, mature and senescent leaves, floral buds, flowers and fruits of guava (*Psidium guajava* L.). Floral bud had the highest concentration of quercetin (2036 mg kg<sup>-1</sup>), followed by mature leaf (1236 mg kg<sup>-1</sup>). The five compounds were found in fruit in lower concentrations. The evaluation of fruit and leaf to identify phenological stage with higher flavonoids concentration, was derived from this study. Of the three stages of fruit, the first stage of bud had the highest concentrations of myricetin (255.8 mg kg<sup>-1</sup>), quercetin (3604.7 mg kg<sup>-1</sup>), luteolin (229.1 mg kg<sup>-1</sup>), kaempferol (229.1 mg kg<sup>-1</sup>) and apigenin (251.6 mg kg<sup>-1</sup>). In mature leaves, the greatest concentrations were found in July: myricetin (208.44 mg kg<sup>-1</sup>), quercetin (2883.08 mg kg<sup>-1</sup>), luteolin (51.22 mg kg<sup>-1</sup>) and kaempferol (97.25 mg kg<sup>-1</sup>).

**Key words:** *Psidium guajava*, bark, flavonoids, fruit, leaf, floral bud.

### INTRODUCTION

In several species, flavonoids vary substantially among genotypes, seasons changes, ages and damaged leaves, and location sites (Kause *et al.*, 1999; Keinanen *et al.*, 1999; Laitinen *et al.*, 2000). Young leaves, preferred for their higher nutritional quality compared with mature leaves, are the main source of phenolic compounds because they are synthesized as defense against herbivorous predators. However, this does not always occur because not all of the metabolites show the same response during leaf development (Loponen *et al.*, 1997; Estiarte *et al.*, 1999). For example, flavonols increase as leaf development advances (Cates, 1987). It is likely that mature leaves are more important for plants since they provide carbohydrates to the reproductive structures and to the root and stem apices (Krischik and Denno, 1983). Also, flavonoids are not determined by herbivorous pressure during natural selection (Matisiki, 1996).

Flavonoids are found in different plants, and they are present mainly in the leaves in guava (Seshadri and

Recibido: Septiembre, 2004. Aprobado: Agosto, 2005.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 40: 109-115. 2006.

carbohidratos a las estructuras reproductoras y a los ápices de raíz y tallos (Krischik y Denno, 1983). Además, los flavonoides no están determinados por la presión de herbivoría durante la selección natural (Matsiki, 1996).

Las diferentes fuentes de flavonoides son de origen vegetal y se encuentran principalmente en las hojas en guayaba (Seshadri y Vasishta, 1965; Lozoya *et al.*, 1994; Meian y Mohamed 2001), eucalipto (Conde *et al.*, 1997) y cebolla (Bilky *et al.*, 1984). En fruto, por su escasa concentración, los flavonoides han sido poco estudiados y menos aún durante su desarrollo. Los flavonoides están presentes también en partes anatómicas como corteza (Ross, 1999), yemas florales (Harborne, 1984) y hojas (Seshadri y Vasishta, 1965; Dass y Praskash, 1981; Lozoya *et al.*, 1994),

Se ha estudiado ampliamente las aplicaciones medicinales de la guayaba e ingredientes activos como los flavonoides (Seshadri y Vasishta, 1965; Dass y Praskash, 1981; Lozoya *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 2000), los carotenoides (Mercadante *et al.*, 1999), la vitamina C (El Bulk *et al.*, 1997), los terpenoides (Begum *et al.*, 2002), compuestos volátiles y aromáticos (Jordan *et al.*, 2003) y fibras (Gorinstein *et al.*, 1999; Jimenez-Escrig *et al.*, 2001). Dichos compuestos son importantes en la dieta humana debido a su actividad antioxidante (Burda y Oleszek, 2001), antidiarreica (Gutiérrez *et al.*, 2000), espasmolítica (Lozoya *et al.*, 1994), antimicrobiana (Jaiarj *et al.*, 1999), entre otras.

Los manejos en las explotaciones comerciales de este cultivo sugieren la posibilidad de aprovechar los residuos de poda y del raleo de frutos. Por ejemplo, los residuos son hasta 70% del árbol, y estos se amontonan a la orilla de las huertas y posteriormente son quemados. La abundancia del material biológico y la presencia de flavonoides a los que se atribuye actividad biológica han sido poco investigados. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue cuantificar flavonoides en los diferentes órganos del guayabo en diferentes fases fenológicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en dos fases: la primera para comparar los contenidos de flavonoides en órganos, y la segunda para identificar la época del año con mayor concentración de ellos, considerando las etapas fenológicas. En la Fase 1 se realizó el estudio preliminar de flavonoides. Las muestras vegetales se recolectaron el 15 de agosto de 2000, en Calvillo, Aguascalientes, en una huerta de guayaba de 40 años de edad. Los órganos muestreados fueron corteza, botones, hojas, flores y frutos. En la Fase 2 se consideró a los frutos y las hojas como los órganos más representativos y relevantes del guayabo y se muestrearon en diferentes estados fenológicos. Las recolecciones de hojas y frutos se hicieron en Coatepec Harinas, Estado de México, de una huerta defoliada con urea a 13%, el 7 de diciembre de 2000 y

Vasishta, 1965; Lozoya *et al.*, 1994; Meian and Mohamed, 2001), in eucalyptus (Conde *et al.*, 1997) and in onion (Bilky *et al.*, 1984). In fruit, because of its low concentration, flavonoids have been studied little and even less during development. Flavonoids are also present in anatomical parts such as bark (Ross, 1999), floral buds (Harborne, 1984), and leaves (Seshadri and Vasishta, 1965; Dass and Praskash, 1981; Lozoya *et al.*, 1994).

Medicinal applications of guava and its active ingredients have been widely studied: flavonoids (Seshadri and Vasishta, 1965; Dass and Praskash, 1981; Lozoya *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 2000b), carotenes (Mercadante *et al.*, 1999), vitamin C (El Bulk *et al.*, 1997), terpenoids (Begum *et al.*, 2002), volatile and aromatic compounds (Jordan *et al.*, 2003) and fibers (Gorinstein *et al.*, 1999; Jiménez-Escrig *et al.*, 2001). Said compounds are important in human diet because of their activity as antioxidant (Burda and Oleszek, 2001), antidiarrhetic (Gutiérrez *et al.*, 2000), spasmolytic (Lozoya *et al.*, 1994), antimicrobiotic (Jaiarj *et al.*, 1999), among others.

Management practices of commercial plantations of this crop suggest the possibility of using residues from pruning and fruit thinning. For example, these residues can amount to up to 70% of the tree; they are piled on the edge of orchards and later burned. The abundance of the biological material and the presence of the flavonoids, which are attributed with biological activity, have been little studied. Therefore, the objective of this work was to quantify flavonoids in different organs of the guava tree in different phenological phases.

## MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in two phases: in the first flavonoid contents of the organs were compared, and in the second the time of year with the highest concentrations was identified, considering phenological stages. In Phase 1 a preliminary study of flavonoids was conducted. Plant samples were collected on August 15, 2000, in Calvillo, Aguascalientes, from a 40-year-old guava orchard. The sampled organs were bark, buds, leaves, flowers and fruits. In Phase 2 fruits and leaves were considered the most representative and relevant organs of the guava and these were sampled during different phenological stages. The leaves and fruits were collected in Coatepec de Harinas, State of México, from an orchard that was defoliated with 13% urea on December 7, 2000, and later irrigated in January to promote budding for harvest in November. Irrigation was done by microsprinklers with 40 L h<sup>-1</sup> per tree every other day.

The collected material was dried in a forced-air oven (Precision 17 GCA Corp.) at 60 °C for 72 h and later weighed on an electric balance (Explorer 0.01 g, Ohaus Corp., USA). The experimental unit was one tree from which one branch was taken, and only 0.25 g of the dry sample was processed with three replications.

luego regada en enero para promover la brotación y finalizado en noviembre; el riego fue por micro aspersión con 40 L h<sup>-1</sup> por árbol, cada tercer día.

El material recolectado se secó en estufa con aire forzado (Precisión 17 GCA Corp.) a 60° por 72 h y luego se pesó en una balanza eléctrica (Explorer 0.01 g, Ohaus Corp., EE. UU.). La unidad experimental fue un árbol del cual se tomó una rama y de la muestra seca sólo se procesó 0.25 g; hubo tres repeticiones.

Para el análisis, a cada muestra seca de 0.25 g se adicionaron 25 mL de HCl 1.2 M en metanol acuoso a 50%. Posteriormente se hidrolizó durante 2 h a 98 °C en reflujo. Mientras tanto, se hizo la curva de calibración con estándares de miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol y apigenina, para optimizar el equipo en la lectura de muestras. Para la preparación de las muestras se tomaron alícuotas de 500 µL de la mezcla hidrolizada, se filtraron con filtros de 0.45 µm, después se tomaron muestras de 50 µL y se aforaron a 250 µL con agua destilada ajustada a pH 2.5 con ácido trifluoroacético. Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con un cromatógrafo Agilent Technologies provisto con detector de arreglo de diodos, columna hypersil ODS de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula. Los estándares externos fueron calibrados a una longitud de onda de 365 nm, con un flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup>, con un gradiente isocrático 35:65 metanol-agua; se usó agua acidulada a pH 2.5 con ácido trifluoroacético. Una vez estandarizada la técnica, la determinación se prosiguió con las inyecciones de las muestras.

Para confirmar la presencia de flavonoides se analizaron los extractos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), con base en el método de Crozier *et al.* (1997), en particular para tres flavonoles (miricetina, quercetina y kaempferol) y dos flavonas (luteolina y apigenina).

Las muestras se tomaron por triplicado, para luego comparar las medias con la prueba de Tukey (SAS, 1989).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fase 1, la miricetina y quercetina se encuentran en todos los órganos del árbol del guayabo. La mayor concentración de miricetina se encontró en la corteza (253 mg kg<sup>-1</sup>), lo que coincide con Ross (1999), seguida de la hoja madura (59% respecto a la corteza). La hoja senescente contiene 40% respecto a hoja madura, mientras que en la hoja joven no se detectó miricetina. El fruto maduro contiene 67% respecto a la hoja madura, concentración similar a la de botones y flores.

El botón floral mostró la mayor concentración de quercetina (2036 mg kg<sup>-1</sup>), concentración que se redujo en 52% al pasar a flor, y en 94% al pasar a fruto maduro. En fruto, Misra y Seshadri (1967) detectaron flavonoides en varios estados fenológicos, tales como quercetina y leucocianidina mediante cromatografía de papel. Miesan y Mohamed (2001) encontraron miricetina (549.5 mg kg<sup>-1</sup> peso seco) y apigenina (579.5 mg kg<sup>-1</sup> peso seco). Sin embargo, en el presente estudio se encontró

For the analysis, 25 mL of 1.2 M HCl in 50% aqueous methanol were added to each 0.25 g dry sample. Later, this was hydrolyzed for 2 h at 98° in reflux. At the same time, a calibration curve was constructed with quercetin, myricetin, luteolin, kaempferol and apigenin standards to optimize the equipment for readings of the samples. For the preparation of the samples, 500 µL aliquots were taken from the hydrolyzed mixture, they were filtered with 0.45 µm filters, then 50 µL samples were taken and gauged to 250 µL using distilled water adjusted to the pH 2.5 with trifluoroacetic acid. Samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent Technologies chromatograph with a diode array detector, ODS hypersil column 125 mm long, 4 mm internal diameter and 5 µm particle size. The external standards were calibrated to a 365 nm wavelength, with a flow of 1.5 mL min<sup>-1</sup> and an isocratic gradient of 35:65 methanol-water; water acidulated at pH 2.5 with trifluoroacetic acid was used. Once the technique was standardized, determination continued with the injections of the samples.

To confirm the presence of flavonoids, the extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), using a method based on Crozier *et al.* (1997), in particular for three flavonols (myricetin, quercetin, and kaempferol) and two flavones (luteolina and apigenin).

The samples were taken in triplicate to later compare means using the Tukey test (SAS, 1989)

## RESULTS AND DISCUSSION

In Phase 1, myricetin and quercetin were found in all of the guava tree organs. The highest concentration of myricetin was found in the bark (253 mg kg<sup>-1</sup>), coinciding with Ross (1999), followed by mature leaves (59% that found in bark). The senescent leaf contained 40% that found in mature leaf, while in the young leaf myricetin was not detected. Mature fruit contained 67% that found in the mature leaf, similar to the concentration in buds and flowers.

**Cuadro 1. Concentración (mg kg<sup>-1</sup> de peso seco) de miricetina (M), quercetina (Q), luteolina (L), kaempferol (K), apigenina (A), en partes anatómicas del árbol de guayabo.**

**Table 1. Myricetin (M), quercetin (Q), luteolin (L), kaempferol (K), and apigenin (A) concentrations (mg kg<sup>-1</sup> dry weight) by anatomical parts of the guava tree.**

Órgano	M	Q	L	K	A
Corteza	253 <sup>a</sup>	156 <sup>f</sup>	nd	nd	nd
Hoja joven	nd	620 <sup>d</sup>	nd	50 <sup>cb</sup>	nd
Hoja madura	150 <sup>b</sup>	1236 <sup>b</sup>	47 <sup>b</sup>	6 <sup>f</sup>	2 <sup>c</sup>
Hoja senescente	60 <sup>d</sup>	566 <sup>c</sup>	nd	35 <sup>cd</sup>	nd
Botón floral	105 <sup>c</sup>	2036 <sup>a</sup>	112 <sup>a</sup>	180 <sup>a</sup>	153 <sup>ab</sup>
Flor	95 <sup>cd</sup>	986 <sup>c</sup>	12 <sup>d</sup>	87 <sup>b</sup>	53 <sup>b</sup>
Fruto	100 <sup>cd</sup>	126 <sup>f</sup>	20 <sup>c</sup>	40 <sup>c</sup>	160 <sup>a</sup>

nd = no detectado. Medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05).

quercetina en mayor concentración, además de luteolina y kaempferol. Los resultados pueden variar debido al material genético y condiciones ambientales de donde provienen las muestras.

Lo anterior sugiere que la síntesis o importación sólo ocurre en la etapa de botón, ya que se reduce al crecer y desarrollar el órgano floral. La hoja madura presentó 60% de quercetina respecto al botón, que es el doble de la concentración de quercetina en hojas jóvenes o senescentes. Es decir, para extracción comercial conviene aprovechar los botones y las hojas maduras. Las concentraciones de quercetina, luteolina, kaempferol y apigenina fueron mayores en botón floral, pero las concentraciones de los tres últimos fueron muy inferiores a las de quercetina, lo que indica que los flavonoides están relacionados con el desarrollo del tubo polínico (Harborne *et al.*, 1996).

En la Fase 2 el crecimiento en diámetro de los botones florales hasta fruto maduro presentó, a lo largo de nueve meses, una cinética doble sigmoidal (Vargas, 2004).

Miricetina, quercetina y luteolina variaron en concentración con la etapa fenológica, ya que los botones florales más tiernos (botón uno) mostraron mayores concentraciones, para luego decrecer con el desarrollo floral. La concentración volvió a aumentar en la etapa de fruto cerillo (1.1 cm diámetro), a un nivel similar al del botón uno y después decreció hasta niveles muy bajos (Cuadro 2). Los flavonoides se han detectado en pétalos (Markham *et al.*, 2000), y la mayor concentración en floración (Lemberkovic *et al.*, 1996).

Kaempferol y apigenina también mostraron mayor concentración en botón tierno (botón uno), y después no se detectó su presencia en varias etapas, sobre todo de apigenina. Ambos compuestos estuvieron presentes en fruto maduro con 45% y 62%, respectivamente, en relación con el botón uno. La mayor acumulación de flavonoides en el primer estadio de desarrollo del botón

The floral bud had the highest concentration of quercetin (2036 mg kg<sup>-1</sup>); this concentration decreased by 52% when transformed into flower and by 94% in ripe fruit. In fruit, Misra and Seshadri (1967) detected flavonoids such as quercetin and leucocyanidin in several phenological stages using paper chromatography. Mian and Mohamed (2001) found myricetin (549.5 mg kg<sup>-1</sup> dry weight) and apigenin (579.5 mg kg<sup>-1</sup> dry weight). However, in our study quercetin was found in higher concentrations, and luteolin and kaempferol were found as well. The results may vary due to the genetic material and the environmental conditions in which the samples were taken.

The above suggests that the synthesis or importation only occurs in the bud stage since it decreases as the floral organ grows and develops. The mature leaf had 60% of the quercetin found in the bud, which is double that found in young or senescent leaves. That is, for commercial extraction it is recommended that buds and mature leaves be used. The concentrations of quercetin, luteolin, kaempferol and apigenin were higher in the flower bud, but the concentrations of the latter three were much lower than those of quercetin, indicating that the flavonoids are related to the development of the pollen tube (Harborne *et al.*, 1996).

In Phase 2 the growth in the diameter of the flower buds to ripe fruit exhibited double sigmoidal kinetics (Vargas, 2004) over nine months.

Myricetin, quercetin and luteolin varied in concentration with phenological stage since the youngest flower buds (bud one) had higher concentrations, which decreased with flower development. Concentration increased again in the match head stage of the fruit (diameter 1.1 cm) to a level similar to bud one and later decreased to very low levels (Table 2). Flavonoids have been detected in petals (Markham *et al.*, 2000), and the highest concentration during flowering (Lemberkovic *et al.*, 1996).

**Cuadro 2. Concentraciones (mg kg<sup>-1</sup> peso seco) de miricetina (M), quercetina (Q), luteolina (L), kaempferol (K) y apigenina (A) en órganos reproductores del guayabo durante su desarrollo fenológico.**

**Table 2. Myricetin (M), quercetin (Q), luteolin (L), kaempferol (K), and apigenin (A) concentrations (mg kg<sup>-1</sup> dry weight) in reproductive organs of the guava tree during its phenological development.**

Desarrollo de fruto	Periodo (días)	M	Q	L	K	A
Botón 1	30	255.8 <sup>b</sup>	3604.7 <sup>a</sup>	261.2 <sup>a</sup>	229.1 <sup>a</sup>	251.6 <sup>a</sup>
Botón 2	60	228.1 <sup>c</sup>	3074.2 <sup>b</sup>	22.1 <sup>b</sup>	91.2 <sup>d</sup>	nd
Botón 3	90	164.8 <sup>d</sup>	2249.5 <sup>d</sup>	112.1 <sup>c</sup>	183.3 <sup>b</sup>	152.9 <sup>b</sup>
Amarre	120	123.1 <sup>e</sup>	1070.7 <sup>e</sup>	33.7 <sup>e</sup>	nd	nd
Fase cerillo	150	275.8 <sup>a</sup>	2636.4 <sup>c</sup>	132.5 <sup>c</sup>	nd	nd
Fase canica	180	121.7 <sup>e</sup>	172.8 <sup>f</sup>	15.7 <sup>f</sup>	101.6 <sup>d</sup>	nd
Fase huevo	210	114.6 <sup>c</sup>	108.7 <sup>g</sup>	nd	149.8 <sup>c</sup>	nd
Fase sazón	240	88.8 <sup>f</sup>	86.6 <sup>g</sup>	nd	93.4 <sup>d</sup>	nd
Fase maduro	270	164.4 <sup>d</sup>	152.0 <sup>f</sup>	69.3 <sup>d</sup>	103.9 <sup>d</sup>	156.5 <sup>b</sup>

nd = no detectado. Medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

floral, puede ser considerada como defensa contra la herbivoría (Chávez y Escudero, 1999). Además, su cubierta de tricomas y sépalos también pueden tener una función protectora para los órganos reproductores en desarrollo (Feucht *et al.*, 1996). Aunque la concentración de flavonoides se reduce posteriormente en el desarrollo floral, su presencia aún puede ser importante como mecanismo de defensa (Loponen *et al.*, 1997).

Después de la etapa de fruto tamaño cerillo (1 mm diámetro), la concentración de quercetina disminuyó, tal vez debido a la competencia por los esqueletos de carbono entre la síntesis de flavonoides y la síntesis de compuestos involucrados en la división celular en el fruto. En el fruto maduro se detectó la presencia de flavonoles y flavonas, en menor proporción que en hojas (El Bulk *et al.*, 1997). Hasta ahora el fruto se ha considerado importante en la dieta humana por la vitamina C, que funciona como un antioxidante natural y por el contenido de carotenoides (Mercadante *et al.*, 1999) y fibra (Gorinstein *et al.*, 1999).

La mayor concentración foliar de los cinco flavonoides se detectó en julio. Tomando ese mes como base, los contenidos de miricetina inmediatamente inferiores ocurrieron en junio, septiembre y enero (86, 84 y 81% del contenido de julio). Para quercetina se obtuvo 72, 68 y 73% (base julio) en abril, septiembre y enero; 49 y 60% en marzo y abril para luteolina, y 67 y 92% en septiembre y enero para kaempferol. Chavez *et al.* (1993) reportaron que la máxima concentración de flavonoides en hojas ocurre en verano, lo que coincide con los resultados de este trabajo.

Las concentraciones más altas de miricetina y quercetina en hojas maduras (julio) fueron 75 y 80% respecto a las máximas registradas en fruto cerillo y botón floral (Cuadro 3). Los flavonoides varían por la época de año, incidencia de luz y características edáficas (Chavez *et al.*, 1993; Chavez *et al.*, 1997). La suspensión del riego en noviembre, al terminar la cosecha, provocó la senescencia de hojas y la disminución de quercetina. Al reanudar el riego, en enero, se incrementó el contenido foliar de flavonoides (Cuadro 3). En varias especies, la época de mayor acumulación foliar de flavonoides ocurre en julio, durante el verano, como lo informan Chávez y Escudero (1999), lo que indica que ésta es la mejor estación para cosechar hojas destinadas a la extracción de estos metabolitos secundarios, en especial quercetina.

La biosíntesis de los flavonoles está secuenciada, siendo la quercetina el producto final de los flavonoles y flavononas, antes de formar taninos (Winkel-Shirley, 2001). Esto implica que las hojas de enero pueden ser una fuente rica en quercetina, que se podría aprovechar mediante poda y defoliación. Las altas concentraciones de flavonoides libres encontradas coinciden con los resultados de Lozoya *et al.* (1994). Según Seshadri y

Kaempferol and apigenin also had higher concentrations in the young bud (bud one), and later, they were not detected in several stages, in particular apigenin. Both compounds were present in mature fruit with 45% and 52%, respectively, of those concentrations in bud one. The greatest accumulation of flavonoids in the first stage of development of the flower bud can be considered a defense against herbivorous predators (Chavez and Escudero, 1999). In addition, the covering of tricomes and sepals may also have a protective function for developing reproductive organs (Feucht *et al.*, 1996). Although the concentration of flavonoids decreases later in flower development, their presence may still be important as a defense mechanism (Loponen *et al.*, 1997).

After the stage of match head fruit (1.1 cm in diameter), the concentration of quercetin decreased, perhaps due to the competition for the carbon skeletons between flavonoid synthesis and the synthesis of compounds involved in cell division in the fruit. In ripe fruit flavonols and flavones were detected in a lower proportion than in the leaves (El Bulk *et al.*, 1997). Up to now, the fruit has been considered important in human diet for its vitamin C, which functions as a natural antioxidant, and for its carotene content (Mercadante *et al.*, 1999) and fiber (Gorinstein *et al.*, 1999).

The highest concentration in leaves of the five flavonoids was detected in July. Using this month as the base, in descending order myricetin contents followed in June, September and January (86, 84 and 81% the content in July). For quercetin 72, 68 and 73% (base July) in April, September and January; 49 and 60% in March and April for luteolin, and 67 and 92% for kaempferol in September and January. Chavez *et al.* (1993) reported that the maximum concentration of flavonoids in leaves occurs in summer, coinciding with the results of our study.

The highest concentrations of myricetin and quercetin in mature leaves (July) were 75 and 80% relative to the maximum recorded in match-head fruit and flower bud (Table 3). Flavonoids vary with the seasons of the year, incidence of light and edaphic characteristics (Chavez *et al.*, 1993; Chavez *et al.*, 1997). Suspension of irrigation in November, after harvest, caused leaf senescence and reduction of quercetin. When irrigation was renewed in January, leaf flavonoid content increased (Table 3). In several species, the period of greatest flavonoid accumulation in leaves occurs in July, during the summer, as reported by Chavez and Escudero (1999), indicating that this is the best season for harvesting leaves with the purpose of extracting secondary metabolites, especially quercetin.

Biosynthesis of the flavonols is sequenced, and quercetin is the end product of flavonols and flavones, before tannin formation (Winkel-Shirley, 2001). This implies that the January leaves can be a rich source of

**Cuadro 3. Cinética de acumulación (mg kg<sup>-1</sup> peso seco) de flavonoides en hojas maduras de guayaba.**  
**Table 3. Kinetics of flavonoid accumulation (mg kg<sup>-1</sup> dry weight) in mature guava leaves.**

Mes	Periodo (días)	M	Q	L	K
Marzo	30	50.97 <sup>h</sup>	759.04 <sup>h</sup>	51.22 <sup>ab</sup>	35.067 <sup>e</sup>
Abril	60	113.47 <sup>cd</sup>	2065.54 <sup>b</sup>	63.08 <sup>ab</sup>	50.62 <sup>cd</sup>
Mayo	90	104.11 <sup>ef</sup>	1422.94 <sup>f</sup>	10.83 <sup>b</sup>	49.92 <sup>cd</sup>
Junio	120	179.51 <sup>b</sup>	1792.69 <sup>de</sup>	23.66 <sup>b</sup>	58.76 <sup>bc</sup>
Julio	150	208.44 <sup>a</sup>	2883.08 <sup>a</sup>	105.24 <sup>a</sup>	97.253 <sup>a</sup>
Agosto	180	77.92 <sup>h</sup>	1279.12 <sup>f</sup>	3.10 <sup>b</sup>	42.85 <sup>de</sup>
Septiembre	210	175.46 <sup>b</sup>	1974.72 <sup>bc</sup>	26.12 <sup>b</sup>	65.43 <sup>b</sup>
Octubre	240	118.32 <sup>d</sup>	1420 <sup>f</sup>	19.73 <sup>b</sup>	48.81 <sup>cd</sup>
Noviembre	270	139.31 <sup>c</sup>	1662.31 <sup>e</sup>	21.78 <sup>b</sup>	51.47 <sup>cd</sup>
Diciembre	300	103.41 <sup>ef</sup>	1228.99 <sup>g</sup>	7.54 <sup>b</sup>	37.27 <sup>e</sup>
Enero	330	169.05 <sup>b</sup>	2105.04 <sup>b</sup>	9.0 <sup>b</sup>	89.86 <sup>a</sup>
Febrero	360	97.13 <sup>f</sup>	1893.3 <sup>bc</sup>	15.72 <sup>b</sup>	53.405 <sup>cd</sup>

M = miricetina; Q = quercetina; L = luteolina; K = kaempferol. Medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Vasistha (1965), la quercetina se encuentra libre y conjugada. La concentración de flavonoides en primordios de hojas (marzo) fue menor que en los demás estadios del desarrollo foliar, lo que contradice la teoría de que las hojas inmaduras poseen mayor concentración, para lograr más defensas contra la herbivoría. Un mes después la quercetina se triplicó, lo que coincide con Tomás-Barberan *et al.* (1991), quienes observaron el incremento de flavonoides con la madurez del tejido vegetal.

### CONCLUSIONES

El órgano más abundante en volumen y concentración de flavonoides fue la hoja en julio, por lo que puede ser una buena alternativa para extracción comercial. Otro órgano que sobresalió por su alta concentración de flavonoides totales fue la yema floral, en marzo. La quercetina fue el flavonoide más abundante en todos los órganos, excepto en la corteza, donde la miricetina superó a los demás. La mayor acumulación en hoja y fruto inmaduro se registró en julio.

Por su mayor abundancia y menor daño físico al cosechar, las hojas maduras son los órganos más convenientes para extracción de flavonoides en árboles de guayabo.

### LITERATURA CITADA

- Begum, S., S. Bina, and I. Syed. 2002. Triterpenoids from *Psidium guajava* leaves. *Natural Product Lett.* 16: 173-177.
- Bilky, A., L. P. Cooper, and G. M. Sapers. 1984. Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue. *J. Food Chem.* 32: 274-276.
- Burda, S., and W. Oleszek. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2774-2779.
- Cates, R. G. 1987. Influence of biological rhythms, tissue development, and physiological state of plants and insects on their interactions. *In: Insects plant. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on insect plant relationships.* Labeyrie, V., G. Fabres., D. Lachaise. (eds). Dr. W. Junk publishers, Dordrecht. pp: 175-182.

quercetin, which could be exploited at pruning and defoliation. The high concentrations of free flavonoids found coincide with the results of Lozoya *et al.* (1994). According to Seshadri and Vasistha (1965), quercetin is found free and conjugated. The concentration of flavonoids in leaf primordials (March) was lower than in the rest of the leaf development stages. This is contrary to the theory that immature leaves contain higher concentration, as greater defense against herbivores. One month later quercetin tripled, coinciding with Tomás-Barberan *et al.* (1991), who observed an increase in flavonoids as plant tissue matured.

### CONCLUSIONS

The organ that has the greatest abundance and highest concentration of flavonoids was the leaf in July, and therefore, this can be a good option for commercial extraction. Another organ that is outstanding for its high concentration of total flavonoids was the flower bud in March. Quercetin was the most abundant flavonoid in all of the organs, except in the bark where myricetin surpassed the others. The highest accumulation in immature leaf and fruit was recorded in July.

Because of their abundance and because they are less easily damaged at harvest, mature leaves are the most recommendable organs for the extraction of flavonoids in guava trees.

—End of the English version—



- Conde, E., E. Cadahía, and M. C. Garcia-Vallejo. 1997. Low molecular weight polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globules* and *E. rudis*. *Phytochem. Anal.* 8: 186-193.
- Crozier, A., E. Jensen, E.J. Lean, Morag, S. McDonald. 1997. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 761: 315-321.

- Chavez, N., and J. Escudero. 1999. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. *In: Principles and Practices in Plant Ecology Allelochemical Interactions*. Inderjit, Dakshini K MM, Foy CH. Eds. Barcelona, Spain. pp: 267-285.
- Chavez, N., J. Escudero, and C. Gutiérrez-Merino. 1993. Seasonal variation of exudates of *Cistus ladanifer*. *J. Chem. Ecol.* 19: 2577.
- Chavez N., J. Escudero, and C. Gutiérrez-Merino. 1997. Role ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *J. Chem. Ecol.* 23: 2577.
- Dass, H. C., and D. Praskash. 1981. Phylogenetic affinities on *Psidium* spp. as studied by flavonoid patterns. National symposium on tropical and subtropical fruits crops. Bangalore, India. pp: 105-119.
- El Bulk, R., E. El Fadil, and H. Abdullahi. 1997. Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. *Food Chem.* 59: 395-399.
- Estiarte, M., J. Penuelas, B. A. Kimball, D. L. Hendrix, P. J. Pinter, G. W. Wall, R. L. LaMorte, and D. J. Hunsaker. 1999. Free air CO<sub>2</sub> enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. *Physiol. Plant.* 105: 423-433.
- Feucht W., P. P. S. Schmid, and E. Christ. 1996. Distribution of flavonols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *J. Plant Physiol.* 125: 1-8.
- Gorinstein, S., M. Zemser, R. Haruenkit, R. Chuthakorn, F. Grauer, O. Martin-Belloso, and S. Trakhtenberg. 1999. Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. *J. Nutr. Biochem.* 10: 367-371.
- Gutiérrez Gaiten Y. I., M. M. Miranda, R. O. Bilba, N. J. De la Paz, y R. L. Rodríguez. 2000. Suspensión oral anti-diarreica de *Psidium guajava* L. *Rev. Cubana Farm.* 34: 44-49.
- Harborne, J. B. 1984. *Phytochemical Methods*. Second edition. New York. 288 p.
- Jaiarj, P., P. Khoohaswan, Y. Wongkrajang, P. Peungvicha, P. Suriyawong, M. L. Saraya, and O. Ruangsomboon. 1999. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* 67: 203-212.
- Jimenez-Escrig, A., M. Rincon, R. Pulido, and F. Saura-Calixto. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 29: 5489-5493.
- Jordan, M. J., C. A. Margaria, P. E. Shaw, and K. L. Goodner. 2003. Volatile components and aroma active compounds in aqueous essence and fresh pink guava fruit pure (*Psidium guajava* L.) by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1421-1426.
- Kause, A., V. Ossipov, E. Haukioja, K. Lempa, S. Hanhimäki, and S. Ossipova. 1999. Multiplicity of biochemical factors determining quality of growing birch leaves. *Oecologia* 120: 102-112.
- Keinanen, M., R. Julkunen-Tiitto, P. Mutikainen, M. Walls, J. Ovaska, and E. Vapaavuori. 1999. Trade offs in phenolic metabolism of silver birch: effects of fertilization, defoliation, and genotype. *Ecology* 80: 1970-1986.
- Krischik, V. A., and R. F. Denno. 1983. Individual, population, and geographic patterns in plant defense. *In: Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems*. Denno, R. F., and M. S. McClure (eds). Academic Press, New York, NY. pp: 463-512.
- Laitenen, M. L., R. Julkunen-Tiitto, and M. Rousi. 2000. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *J. Chem. Ecol.* 26: 1609-1622.
- Lemberkovic, E., G. Petri, H. Nguyen, and I. Máthé. 1996. Relationships between essential oil and flavonoid biosynthesis in sweet basil. *Acta Hort.* 426: 641-655.
- Loponen, J., V. Ossipov, J. Koricheva, E. Haukioja, and K. Pihlaja. 1997. Low molecular mass phenolic in foliage of *Betula pubescens* Ehrh. In relation to aerial pollution. *Chemospher* 34: 687-697.
- Lozoya, X., M. Meckes, M. Abou-Zaid, J. Tortoriello, C. Nozzolillo, and J. T. Arnason. 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmyolytic principle. *Arch. Med. Res.* 25: 11-15.
- Markham, K. R., K. G. Ryan, S. K. Gould, and K. G. Rickards. 2000. Cell wall sited flavonoid in *Lisianthus* flower petals. *Phytochem.* 54: 681-687.
- Matsiki, M. 1996. Regulation of the plant phenolics synthesis from biochemistry to ecology and evolution. *Aust. J. Bot.* 44: 613-634.
- Mercadante, A. Z., A. A. Steck, and H. Pfander. 1999. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.) isolation and structure elucidation. *J. Agric. Food Chem.* 47: 145-151.
- Miean, K. H., and S. Mohamed. 2001. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3106-3112.
- Misra K., and T. R. Seshadri. 1967. Chemical components of the fruits of *Psidium guava*. *Phytochemistry* 7: 641-645.
- Ross, H. I. 1999. *Medicinal Plants of the World*. Ed. Humana Press. Totowa, NJ. pp: 263-281.
- SAS. 1989. *SAS/STAT User's guide*, Release 6<sup>th</sup> edition, Versión 6.12. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA. 501 p.
- Seshadri, R. T., and K. Vasishta. 1965. Polyphenols of the leaves of *Psidium guajava*: quercetin, guaijaverin, leucocyanidin and amritoside. *Phytochem.* 4: 989-992.
- Tomás-Barberan, F., M. M. García-Grau, and F. Tomas-Lorente. 1991. Flavonoid concentration changes in maturing broad bean pods. *J. Agric. Food Chem.* 39: 255-258.
- Vargas, A. D. 2004. Flavonoides en guayaba: distribución anatómica, morfológica y fenológica. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 90 p.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485-493.