

## Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.)

### Determination of total phenols and flavonoids in guava leaves (*Psidium guajava* L.)

E. Pérez-Pérez<sup>1</sup>, G. Ettiene<sup>3</sup>, M. Marín<sup>2</sup>, A. Casassa-Padron<sup>4</sup>, N. Silva<sup>3</sup>, J. Raga<sup>3</sup>, C. González<sup>1</sup>, L. Sandoval<sup>5</sup> y D. Medina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola (CESID-Frutícola y Apícola) de CORPOZULIA, Km 27 de la vía hacia San Rafael de El Mojan, Mara, Zu 4044. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas-Zulia. <sup>3</sup>Departamento de Química. <sup>4</sup>Departamento Fitosanitario. <sup>5</sup>Instituto de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Maracaibo, Zu 4005. Venezuela.

### Resumen

Las plantas responden a variaciones ambientales, como las causadas por la época del año, la fertilización y los daños ocasionados por plagas y enfermedades, lo cual influye en la producción de metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica, tal como los fitoquímicos fenólicos (FF). Igualmente la producción de FF se ve afectada por el estado fenológico de la planta. Con el objetivo de determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales en plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.), se muestrearon hojas jóvenes y recientemente maduras de la parte media de los cuatro cuadrantes de la copa de seis plantas ubicadas en la parcela experimental del Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola (CESID-Frutícola y Apícola) de CORPOZULIA (10°49'46,6'LN; 71°46'29,2'LO). La extracción de los FF se realizó con ultrasonido empleando 0,5g de muestra seca y una mezcla metanol:agua (80:20% v/v). Para la cuantificación por espectrofotometría de absorción UV-VIS, se utilizó como estándar ácido gálico para fenoles totales y catequina para flavonoides totales. Los resultados mostraron mayor contenido de fenoles (9.071,46 mg AG.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) y flavonoides (2.845,21 mg catequina.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) en hojas jóvenes en comparación con las recientemente maduras [(fenoles (4.663,57 mg AG.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) y flavonoides (1.705,83 mg catequina.100 g<sup>-1</sup> muestra seca)], destacándose la hoja joven como el mejor estado fenológico de la hoja para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales en plantas de guayabo.

**Palabras clave:** antioxidantes, metabolitos secundarios, guayaba.

Recibido el 15-01-2013 ● Aceptado el 14-01-2014

Autor de correspondencia e-mail: evelyncpp@gmail.com

## Abstract

Plants respond to environmental changes, such as those caused by the time of year, fertilization, and damage caused by pest and diseases, which influence the production of secondary metabolites that regulate the metabolic activity, such as phenolic phytochemicals (FF). FF production also is affected by plant growth stage. In order to determine the content of total phenols and flavonoids, young and recently mature leaves were sampled from the middle in the four quadrants of the canopy of guava plants (*Psidium guajava* L.) located in the experimental lot of the Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola (CESID-Frutícola y Apícola) of CORPOZULIA (10° 49'46, 6"LN, 71° 46 '29.2"LO). The FF, were extracted by ultrasound assisted extraction using 0.5 g of dry sample and a mixture of methanol: water (80:20% v/v). For the quantification of UV-VIS absorption spectrophotometer, gallic acid and catechin were used as standards for total phenols and total flavonoids, respectively. The results showed major content of phenols (9071.46 mg AG.100 g<sup>-1</sup> dry sample) and flavonoids (2845.21 mg catechin.100 g<sup>-1</sup> dry sample) in young leaves as compared with recently mature ones [(phenols (4663.57 mg AG.100 g<sup>-1</sup> dry sample) and flavonoids (1705.83 mg catechin.100 g<sup>-1</sup> dry sample)], highlighting the young leaf phenological stage as the best leaf for the quantification of total phenols and flavonoids in plants of guava tree.

**Keywords:** antioxidant, secondary metabolites, guava.

## Introducción

Los polifenoles constituyen un grupo de compuestos que desempeñan una importante función en prácticamente todas las interacciones que una planta establece con su entorno (Haslam, 1988, 1989). Los fenoles son una amplia familia que posee más de 4.500 miembros. Dentro del grupo de los fenoles están los ácidos fenólicos y la amplia familia de los flavonoides entre otros.

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores (Formica y Regelson, 1995). Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y la diferenciación de las plantas (Hertog *et al.*, 1996).

## Introduction

Polyphenols constitute a group of compounds that have an important role in almost all the interactions that a plant establishes with its environment (Haslam, 1988, 1989). Phenols are part of a big family with more than 4.500 members. Among the phenol groups are the phenolic acids and the wide family of the flavonoids, among others.

The flavonoids are located in the fruits, vegetables, seeds and flowers (Formica and Regelson, 1995). These have an important role in the vegetal biology, thus, these respond to the light and control the auxin levels that regulate the growth and the differentiation of plants (Hertog *et al.*, 1996).

Las plantas responden a variaciones ambientales, como los ocasionados por la época del año, la fertilización y los daños causados por plagas y enfermedades, lo cual influye en la producción de metabolitos secundarios (Strack, 1997). Una característica fundamental del metabolismo secundario es que los productos secundarios no se encuentran uniformemente en toda la planta y son con frecuencia limitados a órganos particulares y a determinadas células y tejidos dentro de ese órgano (Bevan *et al.*, 1989; Van der Meer *et al.*, 1990).

Los fitoquímicos fenólicos (FF) son metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica, siendo estos esenciales para el desarrollo (crecimiento y reproducción) de las plantas. La importancia de los fenoles radica en que producen soporte mecánico a las plantas, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros y tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación ultravioleta (Strack, 1997); además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, debido a su actividad antioxidante (Cartaya y Reynaldo, 2001; Kuskoski *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos en especies vegetales pueden variar, dentro de un mismo individuo, en respuesta a factores genéticos, ontogénicos, bióticos y abióticos, presentando diferentes concentraciones en los diversos órganos de la planta. En lo que respecta a las hojas, la regulación de la síntesis de compuestos fenólicos es una parte importante del desarrollo de dicho órgano. Por otro lado, el destino de los carbohidratos formados

The plants respond to environmental variations, such as the caused by the season of the year, the fertilization and the damages caused by pests and diseases, which influence the production of secondary metabolites (Strack, 1997). A main characteristic of the secondary metabolite is that the secondary products are not uniformly found on the plant, and are frequently limited to particular organs and to specific cells and tissues inside this organ (Bevan *et al.*, 1989; Van der Meer *et al.*, 1990).

The phenolic phytochemicals (FF) are secondary metabolites that regulate the metabolic activity, being essential for the development (growing and reproduction) of the plants. The importance of the phenols relies on that these produce mechanical support to the plants, contribute to the coloring of the flowers and fruits, protect against pathogens and herbivorous and have a great efficiency protecting the tissues against the UV radiation (Strack, 1997); also, these compounds have properties related to the human health, due to its antioxidant activity (Cartaya and Reynaldo, 2001; Kuskoski *et al.*, 2005).

The phenolic compounds in vegetal species might vary among the same individual, in response to genetic, ontogenetic, biotic and abiotic factors, presenting different concentrations in the different organs of the plant. Regarding the leaves, the synthesis regulation of the phenolic compounds is an important part of the development of this organ. On the other side, the carbohydrates formed during the photosynthesis, some of which will

durante la fotosíntesis, parte de los cuales se emplearán en la conformación estructural de la planta (metabolismo primario) y otros en el metabolismo secundario, tendrán una gran influencia en la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos producidos (Matsuki, 1996). El objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales en hojas fenológicamente jóvenes y recientemente maduras de plantas de guayabo.

## Materiales y métodos

### Ubicación del ensayo

El ensayo se realizó en el Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola (CESID-Frutícola y Apícola) de CORPOZULIA (10°49'46,6"LN; 71°46'29,2"LO) ubicado en la altiplanicie de Maracaibo, específicamente, en el Municipio Mara, estado Zulia. Esta zona presenta condiciones de bosque muy seco tropical (Ewel y Madriz, 1976) con precipitación anual de 600 a 800 mm distribuidos en dos picos bien definidos de Abril a Mayo y de Octubre a Noviembre, siendo éste último el más pronunciado. Presenta una evaporación de 2.000 a 2.200 mm, una temperatura media anual de 28°C y una humedad relativa de 75%. Los suelos están clasificados como Typic Haplargids, con textura franco arenosa; 78,00% arena; 8,00% arcilla; 14,0 % de limo y 0,90% de materia orgánica; 0,12 ds m<sup>-1</sup> de conductividad eléctrica y 6,9 de pH (COPLANARH, 1975).

### Material vegetal

Se seleccionaron seis individuos (3%) de una misma población de plantas de *Psidium guajava* (designadas como planta: 1, 2, 3, 4, 5 y 6) de la

be employed in the structural formation of the plant (primary metabolism) and other secondary metabolisms, will have a great importance on the quantity and quality of the phenolic compounds produced (Matsuki, 1996). The objective of this research was to determine the content of phenols and total flavonoids in phenolic young leaves and recently mature guava plants.

## Materials and methods

### Location of the essay

The essay was carried out at the Socialist Center of Research and Fruit Development (CESID-Frutícola y Apícola) of Corpozulia (10°49'46.6"NL; 71°46'29.2"WL) located on the Maracaibo's plain, specifically in Mara parish, Zulia state. This area presents very dry tropical forest conditions (Ewel and Madriz, 1976) with annual rainfall from 600 to 800 mm, distributed into two well defined peaks from April to May and October to November, being the latter the most pronounced. It presents evaporation from 2.000 to 2.200 mm, mean annual temperature of 28°C and a relative humidity of 75%. The soils are classified as Typic Haplargids, with loamy sandy texture; 78.99% sand; 8.00% clay; 14.0% loam and 0.90% of organic matter; 0.12 ds m<sup>-1</sup> of electric conductivity and 6.9 of pH (COPLANARH, 1975).

### Vegetal matter

Six individuals were chosen (3%) from the same population of *Psidium guajava* plants (designed as plant: 1, 2, 3, 4, 5 and 6) of the promissory collection of 14-year-old canopies,

colección de copas promisorias de 14 años de edad, establecidas en el banco de germoplasma del CESID-Frutícola y Apícola de CORPOZULIA, las cuales fueron propagadas sexualmente, regadas por microaspersión con una frecuencia interdiaria y fertilizadas con fórmula química completa con una frecuencia trimestral, a razón de 300g por planta. El criterio para la selección de los individuos consistió en garantizar la cantidad de material vegetal requerido en los análisis de laboratorio para la determinación de fenoles y flavonoides totales.

La copa de cada planta se dividió de forma imaginaria en cuatro cuadrantes (norte, este, sur y oeste), muestreando seis pares de hojas jóvenes y recientemente maduras en la parte media de la copa de cada planta, para un total de veinticuatro pares por cada condición fenológica. Las muestras seleccionadas se sometieron a secado en estufa a 60 °C por un periodo de 72 horas, se molieron y procesaron hasta obtener un material homogéneo.

### Reactivos y estándares

Los reactivos empleados fueron  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (99,9% de pureza, Merck®),  $\text{NaOH}$  (99% de pureza Reidel- De Haën®),  $\text{NaNO}_2$  (Fisher Scientific Company®), Folin & Ciocalteu (Merck®) y  $\text{AlCl}_3$  anhidro (97% de pureza, Merck®).

Los estándares empleados fueron: ácido gálico (98% de pureza HPLC, Fulka®) y (+)-catequina (98% de pureza, Sigma®).

Los solventes empleados en el desarrollo del trabajo fueron: metanol (99,80% de pureza, grado HPLC, Merck) y agua destilada.

established at the germplasm bank of CESID-Frutícola y Apícola of CORPOZULIA, which were sexually propagated, irrigated by micro-aspersion every other day, and fertilized with a complete chemical formula quarterly at a reason of 300g per plant. The criteria used for selecting the individuals consisted on guaranteeing the quantity of the vegetal material required on the laboratory analysis for determining the phenols and total flavonoids.

The canopy of each plant was divided into four quadrants (north, east, south and west), sampling six pairs of young and recently mature leaves in the middle of the canopy of each plant, for a total of twenty four pairs by each phenolic condition. The selected samples were let dried in a stove at 60°C for 72 hours, grinded and processed until obtaining a homogeneous material.

### Reactive and standards

The reactive employed were  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (99.9% of pureness, Merck®),  $\text{NaOH}$  (99% of pureness Reidel- De Haën®),  $\text{NaNO}_2$  (Fisher Scientific Company®), Folin & Ciocalteu (Merck®) and  $\text{AlCl}_3$  anhydrous (97% of pureness, Merck®).

The standards employed were: galic acid (98% of pureness HPLC, Fulka®) and (+)-catechin (98% of pureness, Sigma®).

The solvents applied for developing the research were: methanol (99.80% of pureness, HPLC, Merck) and distilled water.

### Extraction of phenols and flavonoids

The obtaining of the phenolic extracts was based on the ultrasound

## Extracción de fenoles y flavonoides

La obtención de los extractos fenólicos se basó en el método de extracción ultrasónica desarrollado por Kim *et al.* (2003), con algunas modificaciones. Una porción (0,5 g) del material vegetal seco y pulverizado se colocó en un matraz de 25 mL y se adicionó 10 mL de la solución extractora (metanol: agua 80:20% v/v), posteriormente, se realizó la extracción ultrasónica (35 KHz) por 20 min y se procedió a filtrar por gravedad, a través de lana de vidrio, lavando el material filtrante con 5 mL de metanol. El procedimiento de extracción se repitió y los extractos se recolectaron en un balón volumétrico de 50 mL, el cual, se enrasó con la solución extractora. El extracto fenólico obtenido se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1 y se conservó en frasco ámbar, para la determinación de fenoles totales (FeT) y flavonoides totales (FIT).

## Determinación de Fenoles Totales (FeT)

La determinación de FeT se basó en el método reportado por Kim *et al.* (2003), empleando el método descrito por Singleton y Rossi (1965), con algunas modificaciones. Para ello, una alícuota (200  $\mu$ L) del extracto fenólico fue transferido a un balón volumétrico de 25 mL que contenía 9 mL de H<sub>2</sub>O. Seguidamente, 1 mL del reactivo Folin & Ciocalteu fue adicionado a la mezcla y agitado. Después de 5 min, se agregaron 10 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7% m/v y se aforó con H<sub>2</sub>O, agitando vigorosamente. Posteriormente, se procedió a incubar por 90 min en un lugar oscuro y se midió la absorbancia (Spectronic 20 Genesys®, USA) a una

extracción method developed by Kim *et al.* (2003) with some modifications. A portion (0.5 g) of the dry and powder material was put on a 25 mL flask, and 10 mL of an extracting solution was added (methanol: water 80:20% v/v), subsequently, the ultrasound extraction was performed (35 KHz) for 20 min, and was filtered by gravity, using glass wool and washing the filtering material with 5 mL of methanol.

The extraction procedure repeated and the extracts were collected in a volumetric jar of 50 mL, and were made up with an extracting solution. The phenolic extract obtained was filtered using the filter paper Whatman No. 1 and was preserved in amber jar, for determining the total phenols (FeT) and total flavonoids (FIT).

## Determination of Total Phenols (FeT)

The determination of FeT was based on the method reported by Kim *et al.* (2003), employing the method described by Singleton and Rossi (1965), with some modifications. An aliquot (200  $\mu$ L) of the phenolic extract was transferred to a volumetric balloon of 25 mL which had 9 mL of H<sub>2</sub>O. Subsequently, 1 mL of the Folin & Ciocalteu reactive was added to the mix. 5 minutes later, 10 mL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> at 7% m/v was added and gauged with H<sub>2</sub>O, agitating it vigorously. Later, it was proceeded to incubate for 90 min in a dark place and the absorbance was measured (Spectronic 20 Genesys®, USA) at a wave longitude of 750 nm.

The final absorbance of each sample was compared to a standard curve of galic acid (0-20 mg.L<sup>-1</sup>)

longitud de onda de 750 nm. La absorbancia final de cada muestra fue comparada con una curva estándar de ácido gálico (0-20 mg.L<sup>-1</sup>) preparados en H<sub>2</sub>Od. La curva se construyó siguiendo el mismo procedimiento descrito para la muestra pero sustituyéndola por 1 mL de cada patrón de ácido gálico (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 500 mg.L<sup>-1</sup>), y utilizando H<sub>2</sub>Od como blanco. El contenido de fenoles totales del material vegetal se expresó en mg equivalente de ácido gálico (GAE).100g<sup>-1</sup> de muestra seca. La precisión analítica se evaluó mediante las desviaciones estándares relativas (DER) obtenidas para un total de tres repeticiones por muestra.

#### **Determinación de Flavonoides Totales (FIT)**

El contenido de FIT se determinó de acuerdo al método colorimétrico descrito por Zhishen *et al.* (1999), con algunas modificaciones. Una alícuota (200  $\mu$ L) del extracto fenólico se transfirió a un balón volumétrico de 10 mL que contenía 4 mL de H<sub>2</sub>Od. A tiempo cero, se agregó 0,3 mL de una solución de NaNO<sub>2</sub> al 5% m/v. Después de 5 min, se añadió 0,3 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10% m/v. A los 6 min, se agregó 2 mL de NaOH 1 M, se diluyó llevando el volumen a 10 mL con H<sub>2</sub>Od. Inmediatamente, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 510 nm. La absorbancia de la muestra fue comparada con una curva estándar de catequina (0-25 mg.L<sup>-1</sup>) preparada en H<sub>2</sub>Od. La curva se construyó siguiendo el mismo procedimiento utilizado para evaluar la muestra pero sustituyéndola por 1 mL de cada patrón de catequina (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 mg.L<sup>-1</sup>), empleando H<sub>2</sub>Od como

prepared in H<sub>2</sub>Od. The curve was built following the same procedure described for the sample but replacing it for 1 mL of each pattern of galic acid (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 500 mg.L<sup>-1</sup>), and using H<sub>2</sub>Od as the witness. The content of total phenols of the vegetal material was expressed in mg equal to galic acid (GAE).100g<sup>-1</sup> of dry matter. The analytical accuracy was evaluated with the relative standard deviations (RSD) obtained for a total of three replications per sample.

#### **Determination of Total Flavonoids (TFI)**

The TFI content was determined according to the colorimetric method described by Zhishen *et al.* (1999), with some modifications. An aliquot (200  $\mu$ L) of the phenolic extract was transferred to a 10 mL volumetric balloon with 4 mL of H<sub>2</sub>Od. In zero time 0.3 mL of a NaNO<sub>2</sub> solution at 5% m/v was added. Once passed 5 min 0.3 mL of AlCl<sub>3</sub> at 10% m/v were added. Within 6 min, 2 mL of NaOH 1 M were added, diluting it with a volume at 10 mL with H<sub>2</sub>Od. The absorbance was measured immediately, at a wave longitude of 510 nm. The absorbance of the sample was compared with a standard catechin curve (0-25 mg.L<sup>-1</sup>) prepared in H<sub>2</sub>Od. The curve was built following the same procedure using to evaluate the sample, but replacing it by 1 mL of each catechin pattern (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 mg.L<sup>-1</sup>), using H<sub>2</sub>Od as witness. The content of total flavonoids of the vegetal material was expressed in mg equal to catechin (CE).100g<sup>-1</sup> of dry matter. The analytical accuracy was evaluated using the relative standard deviations

blanco. El contenido de flavonoides totales del material vegetal fue expresado en mg equivalente de catequina (CE).100g<sup>-1</sup> de muestra seca. La precisión analítica se evaluó a través de las desviaciones estándares relativas (DER) para un total de tres repeticiones por muestra.

### Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño experimental totalmente al azar con arreglo en parcelas divididas considerando el efecto de la planta como parcela principal y el estado fenológico de la hoja como la parcela secundaria. Se conformaron doce tratamientos definidos por la planta (seis plantas) y los dos estados fenológicos de las hojas (joven y recientemente madura) con tres repeticiones por tratamiento. En el procesamiento de los datos se utilizaron estadísticas descriptivas, análisis de varianza con pruebas de separación de medias por mínimos cuadrados, ajustadas por Tukey haciendo uso del programa estadístico SAS para Windows (SAS (r) 9.0, 2000-2003).

## Resultados y discusión

El contenido medio de fenoles y flavonoides totales en los seis individuos analizados de la misma población de *Psidium guajava* se muestra en el cuadro 1. Se observaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,01$ ) en el contenido medio de fenoles y flavonoides totales entre los estados fenológicos de las hojas. Las hojas de guayabo fenológicamente jóvenes presentaron mayor contenido de fenoles totales (9.071,46 mg AG.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) y flavonoides totales (2.845,21 mg catequina.100 g<sup>-1</sup> muestra seca), en

(RSD) for a total of three replications per sample.

### Statistical analysis

A randomized split plot design was used considering the effect of the plant as main plot, and the phenolic phase of the leave as secondary plot. Twelve defined treatments were defined per plant (six plants), and two phenolic phases of leaves (young and recently mature) with three replications per treatment. For processing the data were used descriptive statistics, variance analysis with mean division tests by squared meter, adjusted by Tukey and using the statistic software for Windows (SAS (r) 9.0, 2000-2003).

## Results and discussion

The phenol and total flavonoids content in the six individuals analyzed of the same population of *Psidium guajava* is shown on table 1. Statistical significant differences ( $P < 0.01$ ) were observed in the phenol and total flavonoid content among the phenol and total flavonoid content among the phenolic phases of the leaves. The phenolic young guava leaves presented higher content of total phenols (9.071,46 mg AG.100 g<sup>-1</sup> dry sample) and total flavonoids (2.845,21 mg catechin.100 g<sup>-1</sup> dry sample) compared to the recently mature leaves (4.663,57 mg AG.100 g<sup>-1</sup> dry sample and 1.705,83 mg catechin.100 g<sup>-1</sup> dry sample, respectively).

The results obtained agree to those reported by Laitinen *et al.* (2000), who found variations among the types and quantities of flavonoids in different phenolic phases of the



**Cuadro 1. Contenido promedio de fenoles (mg ácido gálico.100g<sup>-1</sup> muestra seca) y flavonoides (mg catequina.100g muestra seca) totales en hojas fenológicamente jóvenes y recientemente maduras de guayabo (*Psidium guajava* L.).**

**Table 1. Average content of phenols (mg galic acid.100g<sup>-1</sup> dry sample) and total flavonoids (mg catechin.100g dry sample) in phenolic young and recently mature leaves of guava (*Psidium guajava* L.).**

Estado fenológico de la hoja	Ácido gálico (mg ácido gálico.100 g <sup>-1</sup> muestra seca)	Catequina (mg catequina.100 g <sup>-1</sup> muestra seca)
Joven	9.071,46 <sup>a</sup> ± 3.252,72	2.845,21 <sup>a</sup> ± 808,56
Recientemente madura	4.663,57 <sup>b</sup> ± 1.150,81	1.705,83 <sup>b</sup> ± 429,46

Media. Prueba de separación de medias mínimas cuadráticas (LSMEANS) (P<0,0001). Medias con la misma letra no difieren estadísticamente.

comparación con las hojas recientemente maduras (4.663,57 mg AG.100 g<sup>-1</sup> muestra seca y 1.705,83 mg catequina.100 g<sup>-1</sup> muestra seca, respectivamente).

Los resultados obtenidos concuerdan con el reporte de Laitinen *et al.* (2000), quienes encontraron variaciones entre tipos y cantidades de flavonoides en diferentes estados fenológicos de la planta de *Betula pendula*. También concuerdan con los publicados por Ricco *et al.* (2011), quienes señalaron que la concentración de fenoles y flavonoides totales en las hojas jóvenes de cedrón (*Aloysia citrodora*) fue mayor aproximadamente un 89% (1,9 veces) y 21,5% respectivamente que el contenido presente en las hojas adultas.

Resultados similares fueron encontrados en otras especies vegetales (Waterman y McKey, 1989; Riipi *et al.*, 2002; Del Baño *et al.*, 2003; Rugna *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008), donde las hojas jóvenes presentaron igualmente una mayor concentración de polifenoles respecto de las hojas adultas.

Con relación a este comportamiento Strack (1997) y Lavola (1998), reportaron que la inducción de la síntesis fenólica por la luz ultravioleta y las diversas actividades fisiológicas mediadas por polifenoles, producen un aumento de la concentración de los compuestos fenólicos totales durante la formación del brote y la etapa de desarrollo temprano de las hojas. Posteriormente, durante el crecimiento tardío de la hoja, el aumento en materia seca daría lugar a un efecto de dilución que disminuiría las concentraciones de los compuestos fenólicos (Jones y Hartley, 1999).

*Betula pendula* plant. These results also agree to the reported by Ricco *et al.* (2011) who mention that the concentration of phenols and total flavonoids in the young leaves of *Aloysia citrodora*, was higher in approximately 89% (1.9 times) and 21.5% respectively, than in the content present in the adult leaves. Similar results were found on other vegetal species (Waterman and McKey, 1989; Riipi *et al.*, 2002; Del Baño *et al.*, 2003; Rugna *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008), where the young leaves also presented a higher concentration of polyphenols regarding the adult leaves.

In relation to this behavior, Strack (1997) and Lavola (1998) reported that the induction of the phenolic synthesis by the ultraviolet light and the diverse physiologic activities mediated by the polyphenols, produce an increment of the concentration of total phenolic compounds during the formation of the bud and the early development phase of leaves. During a late growth of the leave, the increment in dry matter would give place to a dilution effect that would reduce the concentrations of the phenolic compounds (Jones and Hartley, 1999).

According to Rodrigues Salgado *et al.* (2008), the carbohydrates are normally employed in the formation of the fruit and the vegetative grow of the plants, in a way that the young leaves are -after the fruits- the most important organs of the plant in using the nutrients and carbohydrates for their development.

In the plants, the synthesis of phenolic compounds uses the products of the primary metabolism among,

De acuerdo con Rodrigues Salgado *et al.* (2008), los carbohidratos son empleados normalmente en la formación del fruto y el crecimiento vegetativo de las plantas, de manera que las hojas jóvenes son, después de los frutos, los órganos más importantes de la planta en utilizar los nutrientes y los carbohidratos para su desarrollo.

En las plantas, la síntesis de compuestos fenólicos utiliza los productos del metabolismo primario, entre otros compuestos, como sus precursores. La biosíntesis fenólica procede por la construcción del anillo aromático a partir de precursores de hidratos de carbono que ya contienen el grupo hidroxilo requerido. Son considerados productos del metabolismo secundario de las especies vegetales que se producen en células especialmente diferenciadas (Bianchi y Canuel, 2011). De acuerdo con Oziyigit (2008), los compuestos fenólicos son sintetizados en las hojas y luego son transportados a otros tejidos y órganos. Por lo tanto, la cantidad total de estos compuestos en las hojas son mayores que en otros órganos y tejidos de las plantas.

Los compuestos fenólicos vegetales aumentan la rigidez de las paredes celulares de la planta actuando como puentes moleculares entre los componentes de la pared celular (Fry, 1986); son precursores de la lignina, que es un polímero fenólico principal en las plantas, y se producen por acción de las peroxidases mediante la polimerización de estos compuestos fenólicos en caso de lesiones, de estrés o para protegerse del medio ambiente (Lewis y Yamamoto, 1990; Kefeli *et al.*, 2003; Asami *et al.*, 2003; Ewané, 2012).

such as their precursors. The phenolic biosynthesis proceeds by the construction of the aromatic ring after the precursors of carbon hydrates which constitute the required hydroxyl group. Products of the secondary metabolism are known as the vegetal species produced in the well differentiated cells (Bianchi and Canuel, 2011). According to Oziyigit (2008), the phenolic compounds are synthesized in the leaves and are later transported to other tissues and organs. Therefore, the total quantities of these compounds in the leaves are higher than in other organs and tissues of the plants.

The vegetal phenolic compounds increase the rigidity of the cellular walls of the plant, acting as molecular messengers among the components of the cellular wall (Fry, 1986); are also precursors of lignin, which is a main phenolic polymer in the plants, and are produced by the action of the peroxidases by the polymerization of these phenolic compounds in case of lesions, stress or to protect themselves against the environment (Lewis and Yamamoto, 1990; Kefeli *et al.*, 2003; Asami *et al.*, 2003; Ewané, 2012).

Because of the latter, the results obtained in the current research might be explained by the morphology of young leaves, which are more sensitive to external factors due to low lignifications that increase with the age of the tissue. During the period prior the foliar maturation, leaves show a higher vulnerability to biotic and abiotic factors that might require the translocation of photo-assimilates for the secondary metabolisms of young leaves. Previous researches

Por lo anteriormente expuesto, los resultados obtenidos en la presente investigación pueden ser explicados por la morfología de las hojas jóvenes, que son más susceptibles a factores externos debido a su baja lignificación, que aumenta con la edad del tejido. Durante el período previo a la maduración foliar, las hojas muestran una mayor vulnerabilidad a factores bióticos y abióticos que pueden requerir la translocación de fotoasimilados para el metabolismo secundario de hojas jóvenes. Estudios previos de Mondolot *et al.* (2006) en *Coffea canephora*, señalan que este comportamiento ya se ha observado en las hojas de café, que cuando jóvenes tienen claramente una mayor concentración de ácidos clorogénicos (CGA) en relación con hojas maduras (46,9% versus 25,8% del total CGA, respectivamente).

El contenido medio de fenoles totales en las hojas de los seis árboles de guayabo de la misma población de *P. guajava* analizados, se muestran en el cuadro 2. El análisis de varianza detectó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ) para la interacción planta y estado fenológico, observándose diferencia estadística significativa ( $P < 0,01$ ) entre las plantas 1 y 2 para el contenido de fenoles totales en la hoja joven, siendo la hoja joven de la planta 2 la que presentó el mayor contenido de fenoles (14.022,55 mg AG.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) que la hoja joven de la planta 1 (11.987,38 mg.kg<sup>-1</sup>). Para el resto de las plantas (3, 4, 5 y 6) no se observaron diferencias entre ellas. Sin embargo, entre éstas, la planta 5 presentó el mayor contenido de fenoles totales (8.524,18 mg AG.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) para la hoja joven y la planta

carried out by Mondolot *et al.* (2006) in *Coffea canephora*, mention that this behavior has been observed in coffee leaves, which when are young have a higher concentration of chlorogenic acids (CGA) in relation to mature leaves (46.9% versus 25.8% of the total CGA, respectively).

The content of total phenols in the leaves of six guava trees of the same *P. guajava* population analyzed is shown on table 2. The variance analysis detected statistical significant differences ( $P < 0.01$ ) for the interaction of the plant and the phenolic phase, observing a significant statistical difference ( $P < 0.01$ ) among plants 1 and 2, for the content of total phenols in the young leaves, being the young leave of the plant 2 the one which presented the highest phenol content (14.022,55 mg AG.100 g<sup>-1</sup> dry sample) than the young leave of the plant 1 (11.987,38 mg.kg<sup>-1</sup>). For the rest of the plants (3, 4, 5 and 6) none differences were observed among them. However, between these, plant 5 presented the highest content of total phenols (8.524,18 mg AG.100 g<sup>-1</sup> dry sample) for the young leave, and plant 3 the lowest content of total phenols (3.282,00 mg AG.100 g<sup>-1</sup> dry sample) for the recently mature leave.

In relation to the average content of total flavonoids among the six analyzed individuals (table 3) of *P. guajava*, the variance analysis detected significant statistical differences ( $P < 0.01$ ) for the interaction of the plant and the phenolic phase, obtaining the highest content of total flavonoids in the plants 1, 2 and 3 for the young leaves, without observing statistical significant differences ( $P < 0.01$ ) among

**Cuadro 2. Contenido de fenoles (mg ácido gálico.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) totales en hojas en estado fenológico joven y recientemente maduras de plantas de guayabo (*P. guajava*).**

**Table 2. Content of total phenols (mg galic acid.100 g<sup>-1</sup> dry sample) in leaves with young phenolic phase and recently mature guava leaves (*P. guajava*).**

Estado fenológico de la hoja	Planta					
	1	2	3	4	5	6
Joven	11.987,38 <sup>b</sup> ±896,39	14.022,55 <sup>a</sup> ±1.584,64	6.620,20 <sup>cd</sup> ±396,38	6.706,23 <sup>cd</sup> ±114,136	8.524,18 <sup>c</sup> ±561,60	5.751,14 <sup>de</sup> ±98,92
Recientemente madura	3.432,56 <sup>f</sup> ±68,54	5.792,56 <sup>de</sup> ±195,27	3.282,00 <sup>f</sup> ±344,11	5.579,80 <sup>de</sup> ±495,29	4.137,38 <sup>g</sup> ±459,33	5.757,08 <sup>de</sup> ±351,19

Medias con, al menos, una letra igual no difieren estadísticamente (P<0,01).

3 el menor contenido de fenoles totales (3.282,00 mg AG.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) para la hoja recientemente madura.

En relación al contenido promedio de flavonoides totales entre los seis individuos analizados (cuadro 3) de *P. guajava*, el análisis de varianza detectó diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,01$ ) para la interacción planta y estado fenológico, obteniéndose el mayor contenido de flavonoides totales en las plantas 1, 2 y 3 para la hoja joven, sin observarse diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,01$ ) entre éstas plantas, siendo la planta 2 la que presentó el mayor contenido de flavonoides totales (3.743,45 mg catequina.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) en la hoja joven y la planta 1 el menor contenido de flavonoides totales (3.450,62 mg catequina.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) igualmente en la hoja joven. Sin embargo, entre éstas y el resto de las plantas (4, 5 y 6) se observaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,01$ ), siendo el contenido de flavonoides totales menor para las plantas 4, 5 y 6.

Laitinen *et al.* (2005), señalaron que los metabolitos secundarios en las plantas están determinados por factores genéticos y ambientales y con frecuencia ha sido reportada una gran variación intraespecífica. Así mismo, Matsuki (1996), reportó que la concentración de compuestos fenólicos en especies vegetales puede variar, dentro de un mismo individuo, en respuesta a factores genéticos, ontogénicos, bióticos y abióticos. Por otro lado, el destino de los carbohidratos formados durante la fotosíntesis, tendrán una gran influencia en la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos producidos. Sin embargo, Castellano y

these plants, being plant 2 the one that presented the highest content of total flavonoids (3.743,45 mg catechin.100 g<sup>-1</sup> dry sample) in the young leave, and plant 1 lower content of total flavonoids (3.450,62 mg catechin.100 g<sup>-1</sup> dry sample) as well as in the young leave. However, among these and in the rest of the plants (4, 5 and 6), statistical significant differences were observed ( $P < 0.01$ ), being the content of total flavonoids lower for plants 4, 5 and 6.

Laitinen *et al.* (2005) said that the secondary metabolites in the plants are determined by genetic and environmental factors and a great intra-specific variation has been frequently reported. Likewise, Matsuki (1996), reported that the concentration of phenolic compounds in vegetal species might vary inside an individual in response to genetic, ontogenic, biotic and abiotic factors.

On the other side, the destination of the carbohydrates formed during the photosynthesis will have an important influence on the quantity and quality of the phenolic compounds produced. However, Castellano and Espinoza-García (1997), indicated that on the members of a population, can be observed different metabolic profiles product of the structural variety inside the same secondary metabolic group, which is part of the adaptation strategy of the plant to the environment.

On the other hand, Vargas-Álvarez *et al.* (2005), related the increment of the concentration of phenols with the handle that is regularly produced in the trees of any crop, with the aim of improving and increasing the quality and productivity, most of the times

**Cuadro 3. Contenido de flavonoides (mg catequina.100 g<sup>-1</sup> muestra seca) totales en hojas en estado fenológico joven y recientemente maduras de plantas de guayabo (*P. guajava*).**

**Table 3. Content of total flavonoids (mg catechin.100 g<sup>-1</sup> dry sample) in leaves with young phenolic phase and recently mature guava plants (*P. guajava*).**

Estado fenológico de la hoja	Planta					
	1	2	3	4	5	6
Joven	3.450,62 <sup>ab</sup> ± 0,00	3.743,45 <sup>a</sup> ± 182,60	3.519,40 <sup>a</sup> ± 107,94	2.158,26 <sup>cd</sup> ± 54,46	2.559,86 <sup>b</sup> ± 168,36	1.639,68 <sup>ef</sup> ± 170,11
Recientemente madura	1.486,90 <sup>f</sup> ± 47,39	2.381,96 <sup>bc</sup> ± 112,86	1.511,44 <sup>fg</sup> ± 110,12	1.821,76 <sup>e</sup> ± 51,57	1.097,34 <sup>g</sup> ± 76,94	1.870,78 <sup>de</sup> ± 184,63

Medias con, al menos, una letra igual no difieren estadísticamente (P<0,01).

Espinoza-García (1997), señalan que dentro de los miembros de una población pueden observarse perfiles metabólicos diferentes producto de la variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios, lo cual es parte de la estrategia de adaptación de la planta al medio ambiente.

Por otra parte Vargas-Álvarez *et al.* (2005), relacionaron el incremento de la concentración de los fenoles, con el manejo que regularmente se da a los árboles de cualquier cultivo con el objeto de mejorar e incrementar tanto calidad y productividad, la mayoría de las veces inherente a la estructura física del árbol. Entre estos manejos destacan la poda, la sequía y la defoliación los cuales causan daño físico y fisiológico y por consiguiente incremento en la concentración de fenoles. Por ello, el manejo agronómico de las plantas puede afectar el metabolismo secundario que promueve la síntesis de flavonoides (Chaves *et al.*, 1993; 1997).

## Conclusiones

La hoja joven es el mejor estado fenológico de la planta de guayabo para la obtención de un mayor contenido de fenoles y flavonoides totales.

## Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a CORPOZULIA y al FONACIT (No. S1-2000000795; F-2001001117) por el apoyo con el financiamiento para la realización de esta investigación.

inherent to the physical structure of the tree. Among these handles are highlighted the prune, drought and defoliation, which cause physical and physiological damage, therefore, and increment in the concentration of phenols. Thus, the agronomic handle of the plants might affect the secondary metabolisms that promote the synthesis of the flavonoids (Chaves *et al.*, 1993; 1997).

## Conclusions

The young leave is the best phenolic phase of the guava plant for obtaining a higher content of phenols and total flavonoids

## Acknowledgment

The authors want to express their acknowledgment to CORPOZULIA and FONACIT (No. S1-2000000795; F-2001001117) by their financial support for carrying out the research

*End of english version*

---

## Literatura citada

- Asami, D.K.; Y. Hong; D.M. Barrett y A.E. Mitchell. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51(5):1237-1241.
- Bevan, M.; D. Shufflebottom; K. Edwards; R. Jefferson y W. Schuch. 1989. Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase



- promoter in transgenic plants. *EMBO J.* 8:1899-1906.
- Bianchi, T.S. y E.A. Canuel. 2011. Metabolic Synthesis. En: *Chemical Biomarkers in Aquatic Ecosystems*. Cap 1. pp 1-18. Princeton University Press. Disponible en: [press.princeton.edu/chapters/s9501.pdf](http://press.princeton.edu/chapters/s9501.pdf). Consultada Julio 2013.
- Cartaya, O. e I. Reynaldo. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 22(2):5-14.
- Castellanos, I. y F.J. Espinoza-García. 1997. Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: a test with *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionida) and seed secondary metabolites. *Biochem. Syst. Ecol.* 25:591-602.
- Chaves, N.; J. Escudero y C. Gutiérrez-Merino. 1993. Seasonal variation of exudates of *Cistus ladanifer*. *J. Chem. Ecol.* 19:2577-2591.
- Chaves, N.; L. Escudero y C. Gutiérrez-Merino. 1997. Role ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exudate. *J. Agric. Food Chem.* 45:579-604.
- COPLANARH. 1975. Inventario Nacional de Tierras. Región Lago de Maracaibo. Atlas. MAC-CENIAP. Caracas, Venezuela.
- Del Baño, M.J.; J. Lorente; J.N. Castillo; O. Benavente-García; J.A. Del Río; A. Ortuño; K.W. Quirin y D. Gerard. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. *Antioxidant Activity. J. Agric. Food Chem.* 51:4247-4253.
- Ewané, C.A.; P. Lepoivre; L. de Lapeyre deBellaire y L. Lassois. 2012. Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(3):393-404.
- Ewel, J.J. y A. Madriz. 1976. Zonas de vidas de Venezuela. Memoria explicativa sobre el Mapa Ecológico. Edit. Sucre. Ministerio de Agricultura y Cría (MAC). Dirección de Investigación. Caracas, Venezuela. 265 p.
- Formica, J.V y W. Regelson. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33:1061-1080.
- Fry, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 165-186.
- Haslam, E. 1988. Plant polyphenols (syn. Vegetable tannins) and chemical defense. *Areappraisal. J. Chem. Ecol.* 14:1789-1805.
- Haslam, E. 1989. *Plant polyphenols: Vegetable tannins revisited*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hertog, M.G.L.; P.C.H. Hollman y B. Putte Van de Putte. 1996. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 41:1242-1246.
- Jones, C.G. y E. Hartley. 1999. A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos*. 86:27-44.
- Kefeli, V.I.; M.V. Kalevitch y B. Borsari. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol.* 2: 13-18.
- Kim, D.; S. Weon y C. Lee. 2003. Antioxidant Capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81:321-326.
- Kuskoski, E.; A. Asuero; A. Troncoso; J. Mancini-Filho y R. Fett. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas.* 25(4): 726-732.
- Laitinen, M. L.; R. Julkunen-Tiitto y M. Rousi. 2000. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *J. Chem. Ecol.* 26:1609-1622.
- Laitinen, M.L.; R. Julkunen-Tiitto; J. Tahvanainen; J. Heinonen y M. Rousi. 2005. Variation in Birch (*Betula pendula*) shoot secondary chemistry due to Genotype,

- Environment, and Ontogeny. J. Chem. Ecol. 31(4):697-717.
- Lavola, A. 1998. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. Tree Physiol. 18:53-58.
- Lewis, N. y E. Yamamoto. 1990. Lignins: Occurrence biosynthesis and biodegradation. Annu. Rev. Plant Physiol. 41: 455-496.
- Matsuki, M. 1996. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. Austral. J. Bot. 44:613-634.
- Mondolot, L.; P. La Fisca; B. Buatois; E. Talansier; A. de Kochko y C. Campa. 2006. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. Ann. Bot. 98:33-40.
- Ozyigit, I.I. 2008. Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. Afr. J. Biotechnol. 7:1145-1150.
- Ricco, R., M. Wagner y A. Gurni. 2011. Dinámica de polifenoles de "Cedrón" (*Aloysia citrodora* palau-verbenaceae) en relación al desarrollo foliar. Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromát. 10(1):67-74.
- Riipi, M.; V. Ossipov; K. Lempa; E. Haukioja; J. Koricheva; S. Ossipova y K. Pihlaja. 2002. Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics?. Oecology. 130:380-390.
- Rodrigues Salgado, P., J. Laércio Favarin, R. Aparecida Leandro y O. Fontão de Lima Filho. 2008. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. Sci. Agríc. (Piracicaba, Braz.). 65(4):354-359.
- Rugna, A., R. Ricco, A. Gurni y M. Wagner. 2008. Variaciones en el contenido de los polifenoles foliares en *Smilax campestris* Griseb. Smilacaceae según su grado de desarrollo. Lat. Am. J. Pharm. 27:247-249.
- Singleton, V. y J Rossi. 1965. Colorometric of total fenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16:144-158.
- Statistical Analysis Software (SAS) Institute, Inc. 2000-2003. SAS User's Guide: Statistic. SAS Version 9.0. Institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB (eds). Plant Biochemistry. Academic Press, London. p 387-416.
- Van der Meer, I.M., C.E. Spelt, J.N.M. Mol y A.R. Stuitje. 1990. Promoter analysis of the chalcone synthase (chsA) gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression. Plant Mol. Biol. 15:95-109.
- Vargas-Álvarez, D., M. Soto-Hernández, V. González-Hernández, E. Engleman y Á. Martínez-Garza. 2005. Variación del contenido de flavonoides en hojas de guayaba en condiciones de estrés. Revista Chapingo. Serie Horticultura. 11(1):89-92.
- Waterman, PG y D.B. McKey. 1989. Herbivory and secondary compounds in rain forest plants en "Tropical rain forest ecosystems". H. Lieth and M.J.A. Werger eds. Elsevier, Amsterdam. p. 513-536.
- Zhishen, J., T. Mengheng y W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64:555-559.