








Catequina y epicatequina en hojas de guayabo Criolla Roja

Catechin and epicatechin in leaves of Criolla Roja guava

Catequina e epicatequina em folhas de goiaba Crioula
Vermelha

Evelyn del Carmen Pérez-Pérez¹, Vanesa Virginia Castillo
Pirela², José Gerardo Ortega³ Luis Enrique Sandoval
Sánchez⁴, Deisy Teresa Medina Lozano⁵, Maribel del Carmen
Ramírez Villalobos⁶ y Gretty Rosario Ettiene Rojas^{5*}

Universidad del Zulia ¹Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía. Correo electrónico: evelyncpp@gmail.com, . ²Facultad Experimental de Ciencias. Correo electrónico: missvane_18@hotmail.com, . ³Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias. Correo electrónico: jgof1970@gmail.com, . ⁴Instituto de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía Correo electrónico: lsandoval@fa.luz.edu.ve, . ⁵Departamento de Química, Facultad de Agronomía. Correo electrónico: (DM) dmedinav@yahoo.com, ; (GE) gettiene@fa.luz.edu.ve, . ⁶Departamento de Botánica, Facultad de Agronomía. Correo electrónico: mcramire@fa.luz.edu.ve, .

Resumen

Los flavonoides como la catequina y la epicatequina, son metabolitos secundarios producidos por las plantas y responsables de su crecimiento e interacción con otros organismos vivos. Con el objeto de determinar catequina y epicatequina en hojas de guayabo Criolla Roja (*Psidium guajava* L.), empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se seleccionaron 20 individuos de una misma población de la colección de guayabos promisorios del banco de germoplasma del CESID Frutícola y Apícola-CORPOZULIA. Las muestras de hojas (0,125 g) se sometieron a hidrólisis ácida (HCl, 1,2 M: metanol 50:50 % v/v). La separación se realizó por HPLC con detección UV, empleando como fase estacionaria una columna 100RP-18 (250 x 4 mm x 5 µm) y como fase móvil ácido trifluoroacético 0,1 %/acetónitrilo 87:13 % v/v, a un flujo de 1 mL.min⁻¹ y una

Recibido el 04-05-2019 • Aceptado el 29-05-2020.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: gettiene@fa.luz.edu.ve

longitud de onda de 280 nm. La variación del contenido de flavonoides, derivada del efecto del tipo de planta, fue mayor para catequina. La planta G-15 presentó el mayor contenido de catequina ($3799,731 \pm 241,829$ mg.100 g⁻¹ de muestra) y epicatequina ($1259,467 \pm 16,292$ mg.100 g⁻¹ de muestra), la L-3 menor catequina ($46,3190 \pm 3,8300$ mg.100g⁻¹ de muestra) y la I-2 menor epicatequina ($7,3110 \pm 1,8400$ mg.100 g⁻¹ de muestra). La planta G-15 fue diferente ($P < 0,05$) del resto. Esta información permitirá establecer una línea base sobre la producción de estos metabolitos secundarios bajo las condiciones agroecológicas del municipio Mara, estado Zulia.

Palabras clave: fitoquímicos, flavonoides, HPLC, antioxidantes, (*Psidium guajava* L.

Abstract

Flavonoids as catechin and epicatechin, are secondary metabolites produced by plants and responsible for its growth and interaction with other living organisms. For the purpose of determining catechin and epicatechin in leaves of Criolla Roja guava (*Psidium guajava* L.), using high-performance liquid chromatography, we selected 20 individuals of the same population of guava of the collection of promising cups of the CESID Frutícola y Apícola-CORPOZULIA Germoplasm Bank. The leaf sample (0.125 g) was submitted to acid hydrolysis HCl (1.2 M): methanol (50:50 % v/v). The separation was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection, using as stationary phase a column 100RP-18 (250 x 4 mm x 5 μm) and as a mobile phase trifluoroacetic acid 0.1 %/acetonitrile 87:13 % v/v, to a flow of 1 mL.min⁻¹ and a wavelength of 280 nm. The variation of the flavonoid content, derived from the effect of the plant type, was greater for catechin. The plant G-15 presented the highest content of catechin ($3799,731 \pm 241,829$ mg.100 g⁻¹ sample) and epicatechin ($1259,467 \pm 16,292$ mg.100 g⁻¹ sample). The plant L-3 presented the less value for catechin (46.3190 ± 3.8300 mg.100 g⁻¹ sample). The plant I-2 presented the lowest value of epicatechin (7.3110 ± 1.8400 mg.100 g⁻¹ sample). The plant G-15 is significantly different ($P < 0.05$) to the rest of the plants evaluated. This information will allow to establish a baseline on the production of these secondary metabolites under agroecological conditions of the Mara municipality, Zulia state.

Keywords: phytochemical, flavonoids, HPLC, antioxidants, *Psidium guajava* L.

Resumo

Os flavonóides, como a catequina e a epicatequina, são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e responsáveis pelo seu crescimento e interação com outros organismos vivos. Para determinar a catequina e a epicatequina em folhas de goiaba crioula vermelha (*Psidium guajava* L.), por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foram selecionados 20 indivíduos da mesma população da

coleção de goiabas promissoras do banco de genes da CESID Frutícola e Apícola-CORPOZULIA. As amostras de folhas (0,125 g) foram submetidas a hidrólise ácida (HCl, 1,2 M: metanol 50:50 % v/v). A separação foi realizada por HPLC com detecção UV, utilizando uma coluna 100RP-18 (250 x 4 mm x 5 µm) como fase estacionária e 0,1 % de ácido trifluoroacético / 87: 13% v/v de acetonitrila como fase móvel, a fluxo de 1 mL.min⁻¹ e comprimento de onda de 280 nm. A variação no teor de flavonóides, derivada do efeito do tipo de planta, foi maior para a catequina. A planta G-15 apresentou o maior conteúdo de catequina (3.799.731 ± 241.829 mg.amostra 100 g⁻¹) e epicatequina (1.259.467 ± 16.292 mg.amostra 100 g⁻¹), L-3 menor catequina (46,3190 ± 3,8300 mg.amostra 100 g⁻¹) e epicatequina menor I-2 (7,3110 ± 1,8400 mg.amostra 100 g⁻¹). A planta G-15 foi diferente (P<0,05) das demais. Esta informação permitirá estabelecer uma linha de base sobre a produção desses metabólitos secundários sob as condições agroecológicas do município de Mara, estado de Zulia.

Palavras-chave: fitoquímicos, flavonóides, HPLC, antioxidantes, *Psidium guajava* L.

Introducción

Las plantas responden a variaciones ambientales, como las causadas por la época del año, las plagas y enfermedades y la fertilización, mediante la producción de metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica, tal como los compuestos fenólicos (Mailoa *et al.*, 2013). Estos compuestos activos son conocidos como metabolitos secundarios porque no juegan un papel importante en el metabolismo principal, sin embargo, proporcionan un efecto beneficioso para las plantas (Bianchi y Canuel, 2011).

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 carbohidratos que ya contienen el grupo hidroxilo

Introduction

Plants respond to environmental variations, such as those caused by season, pests, diseases, and fertilization, by producing secondary metabolites that regulate metabolic activity, such as phenolic compounds (Mailoa *et al.*, 2013). These active compounds are known as secondary metabolites because they do not play an important role in the main metabolism, however, they provide a beneficial effect for plants (Bianchi and Canuel, 2011).

In plants, the synthesis of phenolic compounds uses the products of primary metabolism, among other compounds, as their precursors. Phenolic biosynthesis proceeds by building the aromatic ring from carbohydrates that already contain the required hydroxyl group (Bianchi and Canuel, 2011; Lutz *et al.*, 2015). Carbohydrates are normally used

requerido (Bianchi y Canuel, 2011; Lutz *et al.*, 2015). 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 (Escalona, 2011).

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 (Escalona, 2011). Con relación a esto, se han reportado diferencias en guayabo para el contenido de antioxidantes en las hojas según el estado fenológico, siendo la hoja joven la que presentó mayor contenido de fenoles y flavonoides totales en comparación con la hoja recientemente madura (Pérez *et al.*, 2014).

Las hojas jóvenes son la fuente principal de compuestos fenólicos, ya que 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 y por otro lado no existen evidencias claras de esta propiedad (Lutz *et al.*, 2015).

Los vegetales han sido evaluados, en un gran número, con el fin de determinar una serie de sustancias biológicamente activas. Entre éstos el género *Psidium* y sobre todo en *Psidium guajava* L., la mayor atención se ha centrado en indagar la relación de

in the formation of the fruit and the vegetative growth of plants, so that young leaves are, after fruits, the most important organs of the plant to use nutrients and carbohydrates for their development (Escalona, 2011).

Phenolic compounds are synthesized in the leaves and are then transported to other tissues and organs; therefore, the total amount of these compounds in the leaves is greater than in other plant organs and tissues (Escalona, 2011). In relation to this, differences have been reported in guava for the content of antioxidants in the leaves according to the phenological state, with the young leaf presenting the highest content of phenols and total flavonoids compared to the recently mature leaf (Pérez *et al.*, 2014).

Young leaves are the main source of phenolic compounds, since they are synthesized as a defense against herbivorous predators that prefer them for their higher nutritional quality compared to mature leaves. However, this does not always happen because not all metabolites have the same behavior during leaf development and, on the other hand, there is no clear evidence of this property (Lutz *et al.*, 2015).

Vegetables have been evaluated, in large numbers, in order to determine a series of biologically active substances. Among these, the genus *Psidium* and especially in *Psidium guajava* L., the greatest attention has been focused on investigating the relationship of its chemical composition with medicinal properties, reporting that it has a high production of secondary

su composición química con propiedades medicinales, reportándose que posee una alta producción de metabolitos secundarios algunos de actividad biológica útil atribuida principalmente a compuestos fenólicos, carotenoides, terpenoides y triterpenos (Pérez *et al.*, 2008).

En *P. guajava* y *P. littorale*, Lapčák *et al.* (2005) identificaron una gama de isoflavones debido a su importancia para la salud humana. Los resultados determinaron la presencia de agliconas y glicósidos y concluyeron que la ruta metabólica de estos compuestos está presente en la mencionada familia de plantas. Por otra parte, destacan estudios realizados por Rivero *et al.* (2013) para determinar los principales flavonoides presentes en especies de *Psidium* reportadas para Venezuela, con la finalidad de esclarecer las relaciones taxonómicas dentro de la misma, cuyos resultados determinaron la formación de 5 grupos donde las especies de *Psidium* y *Calycolpus moritzianus* se distribuyeron dependiendo de la presencia y concentración principalmente de kaempferol, miricetina y luteonina.

Considerando lo planteado y dada la escasa información fitoquímica disponible para este género (Rivero *et al.*, 2013), es de gran importancia la determinación de las catequinas presentes en hojas de *Psidium*, una de las seis clases de flavonoides, siendo sus representantes principales la catequina y la epicatequina. Esta información permitirá establecer una línea base sobre la producción de estos metabolitos secundarios bajo las condiciones agroecológicas del municipio Mara, estado Zulia.

La separación y la cuantificación de catequinas en muestras vegetales

metabolites, some of useful biological activity attributed mainly to phenolic compounds, carotenoids, terpenoids and triterpenes (Pérez *et al.*, 2008).

In *P. guajava* and *P. littorale*, Lapčák *et al.* (2005) identified a range of isoflavones due to their importance for human health. The results determined the presence of aglycones and glycosides and concluded that the metabolic pathway of these compounds is present in the aforementioned plant family. On the other hand, studies carried out by Rivero *et al.* (2013) to determine the main flavonoids present in *Psidium* species reported for Venezuela, in order to clarify the taxonomic relationships within it, whose results determined the formation of 5 groups where the *Psidium* and *Calycolpus moritzianus* species were distributed depending on the presence and concentration mainly of kaempferol, myricetin and luteonin.

Considering the above and given the scarce phytochemical information available for this genus (Rivero *et al.*, 2013), the determination of the catechins present in *Psidium* leaves, one of the six classes of flavonoids, is of great importance, their main representatives being the catechin and epicatechin. This information will allow establishing a baseline on the production of these secondary metabolites under the agro-ecological conditions of the Mara municipality, state of Zulia.

The separation and quantification of catechins in plant samples has been performed using the reverse phase high resolution liquid chromatography

se ha realizado a través de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, con detección UV y de luz dispersada (ELSD) (Tsanova *et al.*, 2005), realizando las separaciones con gradiente de concentración (Goularte y Hoffmann, 2010; Hoffmann, 2008; Ameer *et al.*, 2017). Entre las ventajas de HPLC destacan su elevada selectividad, cortos tiempos de análisis para estos compuestos y menor cantidad de muestras y reactivos (Goularte y Hoffmann, 2010), mientras que para la extracción de catequinas se ha empleado extracción líquido-líquido, ebullición e hidrólisis en medio ácido (Ameer *et al.*, 2017).

La presente investigación se realizó con la finalidad de determinar el contenido de catequina y epicatequina en hojas de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.), empleando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección UV.

Materiales y métodos

Ubicación del ensayo y material vegetal. El ensayo se llevó a cabo 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, municipio Mara, estado Zulia, zona de vida clasificada como bosque muy seco tropical con una precipitación anual de 600 a 800 mm, distribuida en dos picos de abril a mayo y de octubre a noviembre, siendo éste último el más pronunciado; evaporación de 2000

(HPLC) technique, with UV detection and scattered light (ELSD) (Tsanova *et al.*, 2005), performing the separations with concentration gradient (Goularte and Hoffmann, 2010; Hoffmann, 2008; Ameer *et al.*, 2017). Among the advantages of HPLC, its high selectivity, short analysis times for these compounds and fewer samples and reagents stand out (Goularte and Hoffmann, 2010), while liquid-liquid extraction, boiling and hydrolysis have been used for the extraction of catechins. in acidic medium (Ameer *et al.*, 2017).

The present investigation was carried out in order to determine the content of catechin and epicatechin in leaves of guava plants (*Psidium guajava* L.), using high-performance liquid chromatography in reverse phase with UV detection.

Materials and methods

Location of the experiment and plant material. The trial was carried out at the Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola (CESID-Frutícola y Apícola) of CORPOZULIA (10°49'46,6" LN; 71°46'29,2" LO), located in the high plateau of Maracaibo, municipality Mara, state of Zulia, a life zone classified as a very dry tropical forest with an annual rainfall from 600 to 800 mm, distributed in two peaks from April to May and from October to November, the latter being the most pronounced; evaporation from 2000 to 2200 mm, temperature of 28 °C and relative humidity of 75 % (Ewel and Madriz, 1968). The soils are classified

a 2200 mm, temperatura de 28 °C y humedad relativa de 75 % (Ewel y Madriz, 1968). Los suelos están clasificados como Typic Haplargids, con textura franco arenosa: 78 % arena, 8 % arcilla, 14 % limo y 0,9 % de materia orgánica; 0,12 ds.m⁻¹ de conductividad eléctrica y 6,9 de pH (Coplanarh, 1975).

Material vegetal. El material vegetal se seleccionó de una población de 204 plantas de *Psidium guajava* L. establecidas en el banco de germoplasma del CESID-Frutícola y Apícola de CORPOZULIA, de las cuales se seleccionaron veinte (10 %) por su uniformidad y sanidad, identificadas como G-13, G-15, H-13, H-15, I-2, I-13, I-14, J-13, J-15, K-2, K-5, K-6, K-12, K-13, K-15, L-2, L-3, L-4, L-6 y L-12.

La copa de la planta se dividió de forma imaginaria en cuatro cuadrantes orientados por los puntos cardinales (norte, este, sur y oeste), muestreando de la parte media de cada cuadrante cuatro (4) pares de hojas jóvenes (primer y segundo par de hojas contando desde el ápice de la rama hacia el tallo), luego se unieron para su análisis en base seca (Pérez *et al.*, 2014).

Las muestras de hojas se lavaron con agua del grifo y luego con agua destilada, posteriormente, se sometieron a secado en estufa (60 °C) por un periodo de 72 h, se molieron hasta obtener un material homogéneo y se almacenaron hasta su análisis (Pérez *et al.*, 2014).

Tratamiento de la muestra. Se realizó una hidrólisis ácida siguiendo el procedimiento de Vargas *et al.*

as Typic Haplargids, with a sandy loam texture: 78 % sand, 8 % clay, 14 % silt and 0,9 % organic matter; 0,12 ds.m⁻¹ of electrical conductivity and 6,9 pH (Coplanarh, 1975).

Plant material. The plant material was selected from a population of 204 plants of *Psidium guajava* L. established in the germplasm bank of CESID-Frutícola y Apícola of CORPOZULIA, of which twenty (10 %) were selected for their uniformity and health, identified as G -13, G-15, H-13, H-15, I-2, I-13, I-14, J-13, J-15, K-2, K-5, K-6, K-12 , K-13, K-15, L-2, L-3, L-4, L-6 and L-12.

The top of the plant was imaginatively divided into four quadrants oriented by the cardinal points (north, east, south and west), sampling four (4) pairs of young leaves from the middle of each quadrant (first and second pairs of leaves counting from the apex of the branch to the stem), then joined for analysis on a dry basis (Pérez *et al.*, 2014).

The leaf samples were washed with tap water and then with distilled water, afterwards they were dried in an oven (60 °C) for a period of 72 h, they were ground until obtaining a homogeneous material and they were stored until their analysis (Pérez *et al.*, 2014).

Sample treatment. Acid hydrolysis was performed following the procedure of Vargas *et al.* (2006), for which 0,125 g of each guava leaf sample were taken in triplicate and 12,5 mL of the extracting solution (1,2M HCl in 50 % v/v methanol) were added. Hydrolysis was carried out for two hours at 98 °C. At the end of the hydrolysis time, the

(2006), para lo cual se tomaron 0,125 g de cada muestra de hojas de guayabo por triplicado y se adicionaron 12,5 mL de la solución extractora (HCl 1,2 M en metanol al 50 % v/v). La hidrólisis se realizó por dos horas a 98 °C. Concluido el tiempo de hidrólisis, los extractos obtenidos se filtraron por gravedad con papel de filtro (Double Rings 102 9,0 cm) y se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar hasta su análisis.

Separación cromatográfica. La separación de catequina y epicatequina se realizó por HPLC (SHIMADZU SCL-10A) en fase reversa en el modo isocrático, empleando una columna C₁₈ LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm x 5 µm). La fase móvil estuvo conformada por ácido trifluoroacético (0,1 % v/v)/acetonitrilo (87:13 % v/v), se inyectó 20 µL de muestra, a un flujo de 1 mL.min⁻¹ y la detección se realizó por UV (SHIMADZU SPD-10A) a una longitud de onda de 280 nm. La fase móvil se desgasificó con un ultrasonido Ultrasonic LC 130 H (marca Elma). Antes del análisis, los extractos se filtraron en acetato de celulosa (Dismic-25CS, Cellulose Acetate 0,45 µm). Para la cuantificación, se construyeron curvas de calibración por estándar externo empleando estándares puros de catequina ((+/-) - Catechin hydrate 96 % de pureza, Sigma) y epicatequina ((-) - epicatechin, 90 % de pureza, Sigma), a concentraciones entre 2 y 20 mg.L⁻¹.

Análisis estadístico. El análisis estadístico consistió en la determinación de los parámetros muestrales media, desviación

extracts obtained were gravity-filtered with filter paper (Double Rings 102 9,0 cm) and stored in amber glass jars until analysis.

Chromatographic separation. Catechin and epicatechin were separated by reverse phase HPLC (SHIMADZU SCL-10A) in the isocratic mode, using a C₁₈ LiChrospher 100 RP-18 column (250 x 4 mm x 5 µm). The mobile phase consisted of trifluoroacetic acid (0,1% v/v)/acetonitrile (87,13 % v/v), 20 µL of sample was injected, at a flow of 1 mL.min⁻¹ and the detection was performed by UV (SHIMADZU SPD-10A) at a wavelength of 280 nm. The mobile phase was degassed with a Ultrasonic LC 130 H ultrasound (Elma brand). Before analysis, the extracts were filtered on cellulose acetate (Dismic-25CS, Cellulose Acetate 0,45 µm). For quantification, external standard calibration curves were constructed using pure catechin ((+/-) - Catechin hydrate 96 % purity, Sigma) and epicatechin ((-) - epicatechin, 90 % purity, Sigma) standards, at concentrations between 2 and 20 mg.L⁻¹.

Statistical analysis. The statistical analysis consisted of determining the sample parameters mean, standard deviation, and minimum and maximum values of the catechin and epicatechin contents in the guava leaf samples (*Psidium guajava* L.), linear correlation analysis and analysis of variance using a linear additive model adjusted to a completely randomized experimental design, in order to determine significant variations in flavonoid concentrations in the

estándar y valores mínimos y máximos de los contenidos de catequina y epicatequina en las muestras de hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.), análisis de correlación lineal y análisis de varianza mediante un modelo aditivo lineal ajustado a un diseño experimental totalmente al azar, con el objeto de determinar variaciones significativas de las concentraciones de los flavonoides en las muestras de hojas de guayabo, producto de las diferencias entre las plantas consideradas en la investigación. Los datos obtenidos se procesaron con el programa estadístico SAS (SAS, 2003).

Resultados y discusión

Separación cromatográfica. La catequina presentó menor retención que la epicatequina (figura 1), por ser el compuesto de mayor polaridad, comportamiento característico de este tipo de compuestos cuando se emplea cromatografía líquida en fase reversa, la fase estacionaria octadecilsilano, es de menor polaridad que la fase móvil; así, la fase estacionaria retendrá con mayor fuerza los analitos menos polares, permitiendo que el orden de su elución sea del más polar al menos polar.

En cuanto a la fase móvil, para las catequinas, se ha empleado mezclas de agua y modificadores orgánicos como acetonitrilo, metanol, ácido trifluoroacético, entre otros, (Cala y Vásquez, 2008). Estos solventes pueden ser utilizados cada uno por separado o como mezclas, dando la opción de utilizar una fase móvil

guava leaf samples, as a result of the differences between the plants considered in the investigation. The data obtained was processed with the SAS statistical program (SAS, 2003).

Results and discussion

Chromatographic separation. Catechin had less retention than epicatechin (figure 1), as it is the compound with the highest polarity, characteristic behavior of this type of compound when liquid chromatography is used in reverse phase, the stationary octadecylsilane phase is of lower polarity than the mobile phase; thus, the stationary phase will retain the less polar analytes with greater force, allowing the order of their elution to be from the most polar to the least polar.

As for the mobile phase, for catechins, mixtures of water and organic modifiers such as acetonitrile, methanol, trifluoroacetic acid, among others, have been used (Cala and Vásquez, 2008). These solvents can each be used separately or as mixtures, giving the option of using a mobile phase of constant composition (isocratic elution) or variable, in order to obtain a mobile phase with different degrees of polarity (gradient elution), during the time that the analytes pass through the column.

In reverse phase liquid chromatography, the retention mechanism is governed by the hydrophobic character of the

de composición constante (elución isocrática) o variable, con el fin de obtener una fase móvil con diferentes grados de polaridad (elución en gradiente), durante el tiempo en el que los analitos pasan por la columna.

analyte, that is, the magnitude of the interaction will be greater with increasing number of apolar groups. Although hydrophobic interactions govern retention, it is necessary to take into account the

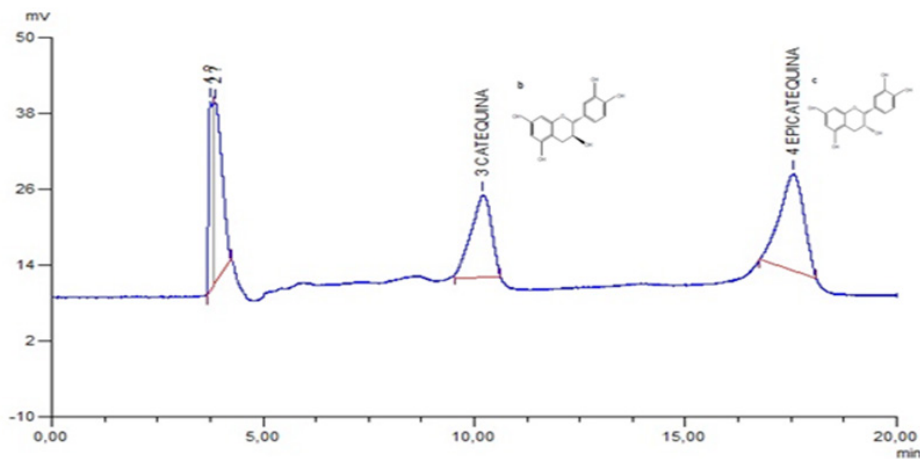


Figura 1. Cromatograma HPLC-UV en fase reversa a 280 nm de los flavonoides catequina y epicatequina, empleando como fase móvil ácido trifluoroacético 0,1% v/v acetonitrilo 87:13% v/v a un flujo de 1 mL.min⁻¹.

Figure 1. Reverse phase HPLC-UV chromatogram at 280 nm of the catechin and epicatechin flavonoids, using as mobile phase trifluoroacetic acid 0,1% v/v acetonitrile 87:13% v/v at a flow of 1 mL.min⁻¹.

En cromatografía líquida en fase reversa, el mecanismo de retención se rige por el carácter hidrofóbico del analito, es decir, la magnitud de la interacción será mayor al aumentar el número de grupos apolares. Aunque las interacciones hidrofóbicas gobiernen la retención, es necesario tener en cuenta los grupos funcionales polares del compuesto, debido a que, en cierto grado, éstos favorecen la interacción con la fase móvil constituida por solventes polares, y el

compound's polar functional groups, since, to a certain degree, they favor interaction with the mobile phase consisting of polar solvents, and the retention time decreases (Cala and Vásquez, 2008).

In this case (\pm)-catechin and (-)-epicatechin are epimers (stereoisomer of another compound that has a different configuration in only one of its stereogenic centers) from each other, for which the polarity of the molecule will be

tiempo de retención disminuye (Cala y Vásquez, 2008).

En este caso la (\pm)-catequina y la (-)-epicatequina son epímeros (estereoisómero de otro compuesto que tiene una configuración diferente en uno solo de sus centros estereogénicos) entre sí, para los cuales la polaridad de la molécula estará afectada por la disposición espacial del grupo hidroxilo sobre el carbono C-3 del anillo benzopirano o anillo C (Cala y Vásquez, 2008).

Una explicación, de este fenómeno, se encuentra en la disposición diecuatorial, esto es, una configuración cis- de los grupos 2-fenilo- y 3-hidroxilo- en el anillo del benzopirano en la (-)-epicatequina, que ocasiona una considerable disminución de su polaridad, en comparación con su epímero, la (\pm)-catequina, que posee una configuración trans- de los grupos 2-fenilo y 3-hidroxilo, cuando ambos se encuentran del mismo lado del plano del anillo dihidrobenzopiránico en la (-)-epicatequina; interacción que no es significativa en la estereoquímica trans- de la (\pm)-catequina. En consecuencia, ello se refleja, como se mencionó anteriormente, en una marcada diferencia entre los tiempos de retención para estos dos epímeros (Cala y Vásquez, 2008).

Determinación de catequina y epicatequina en muestras de hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las plantas para el contenido de los flavonoides catequina y epicatequina, siendo la G-15 la que presentó los mayores valores y fue

affected by the spatial arrangement of the hydroxyl group on the C-3 carbon of the benzopyran ring or C ring (Cala and Vásquez, 2008).

An explanation of this phenomenon is found in the diecuatorial arrangement, that is, a cis-configuration of the 2-phenyl- and 3-hydroxyl- groups in the benzopyran ring in the (-)-epicatechin, which causes considerable decrease in its polarity, compared to its epimer, (\pm)-catechin, which has a trans-configuration of the 2-phenyl and 3-hydroxyl groups, when both are on the same side of the plane of the dihydrobenzopyran ring in (-)-epicatechin; interaction that is not significant in the trans- (\pm)-catechin stereochemistry. Consequently, this is reflected, as previously mentioned, in a marked difference between the retention times for these two epimers (Cala and Vásquez, 2008).

Determination of catechin and epicatechin in leaves samples of guava (*Psidium guajava* L.). The analysis of variance showed significant differences ($P < 0,05$) between the plants for the content of the catechin and epicatechin flavonoids, with the G-15 presenting the highest values and being different from the rest (table 1). The G-15 plant registered 4,65 times more catechin than the H-13 and 82,03 times that the L-3, which obtained the least amount. The catechin content in G-13, H-15, I-2, I-14, K-5, K-6, K-12, K-13, K-15, L-2, L-4 and L -6 was statistically equal to that of L-3.

Regarding epicatechin, G-15 also showed the highest content

diferente al resto (cuadro 1). La planta G-15 registró 4,65 veces más catequina que la H-13 y 82,03 veces que la L-3, la cual obtuvo la menor cantidad. El contenido de catequina en G-13, H-15, I-2, I-14, K-5, K-6, K-12, K-13, K-15, L-2, L-4 y L-6 fue estadísticamente igual al de L-3.

that differed from the rest ($P<0,05$), this plant was followed by I-13 with 131,73 mg.100 g⁻¹ of dry sample. While I-2 presented the lowest content, statistically equal to G-13, I-2, J-13, J-15, K-2, K-5, K-6, K-13, K-15, L-2, L-3 and L-4.

Cuadro 1. Contenido de catequina y epicatequina (mg.100 g⁻¹ de muestra seca) en hojas de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) del banco de germoplasma del CESID-Frutícola y Apícola de CORPOZULIA, municipio Mara, estado Zulia.

Table 1. Catechin and epicatechin content (mg.100 g⁻¹ of dry sample) in leaves of guava plants (*Psidium guajava* L.) from the germplasm bank of CESID-Frutícola y Apícola of CORPOZULIA, Mara municipality, state of Zulia.

Planta	Catequina	Epicatequina
G-13	284,602 ± 1,3226 ^{C,D,E,F,G}	81,003 ± 0,8150 ^{B,C,D}
G-15	3799,731 ± 0,8750 ^A	1259,467 ± 2,0333 ^A
H-13	815,909 ± 7,8433 ^B	ND
H-15	158,798 ± 0,7600 ^{E,F,G}	ND
I-2	167,243 ± 2,9133 ^{E,F,G}	7,311 ± 1,8400 ^D
I-13	457,776 ± 0,2550 ^C	131,734 ± 3,3100 ^B
I-14	98,347 ± 1,6200 ^{F,G}	ND
J-13	423,163 ± 1,4566 ^{C,D}	18,330 ± 2,3300 ^D
J-15	359,151 ± 1,9000 ^{C,D,E}	74,238 ± 2,005 ^{B,C,D}
K-2	346,264 ± 0,3433 ^{C,D,E,F}	22,475 ± 3,0433 ^D
K-5	222,222 ± 0,8966 ^{D,E,F,G}	28,030 ± 4,5033 ^{C,D}
K-6	186,816 ± 1,6900 ^{E,F,G}	22,701 ± 4,8450 ^D
K-12	131,816 ± 4,0750 ^{E,F,G}	ND
K-13	175,332 ± 1,3766 ^{E,F,G}	20,401 ± 3,8700 ^D
K-15	158,801 ± 1,0466 ^{E,F,G}	28,403 ± 2,4000 ^{C,D}
L-2	130,376 ± 3,2500 ^{E,F,G}	31,041 ± 4,9300 ^{C,D}
L-3	46,319 ± 3,8300 ^G	100,261 ± 0,8933 ^{B,C}
L-4	210,932 ± 2,7700 ^{E,F,G}	37,482 ± 2,2633 ^{C,D}
L-6	161,768 ± 2,5250 ^{E,F,G}	ND
L-12	343,191 ± 1,3833 ^{C,D,E,F}	ND

A, B, C, D, E, F, G, E, F, G: media ± DER, para los flavonoides catequina y epicatequina acompañados con letras distintas difieren significativamente ($P\leq 0,05$). ND: no detectado.

A, B, C, D, E, F, G, E, F, G: mean ± DER, for the catechin and epicatechin flavonoids accompanied by different letters differ significantly ($P\leq 0.05$). ND: not detected.

Con respecto a epicatequina, G-15 también mostró el mayor contenido que difirió del resto ($P < 0,05$), dicha planta estuvo seguida de I-13 con $131,73 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de muestra seca. Mientras que I-2 presentó el menor contenido, estadísticamente igual a G-13, I-2, J-13, J-15, K-2, K-5, K-6, K-13, K-15, L-2, L-3 y L-4.

Los contenidos de flavonoides, bajo la forma de catequina y epicatequina, obtenidos en la mayoría de las plantas evaluadas en la presente investigación, ha sido explicado por Pérez *et al.* (2008), al reportar que *P. guajava* es una especie que posee una alta producción de metabolitos secundarios algunos con una actividad biológica útil atribuida principalmente a compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, terpenoides y triterpenos.

Las plantas de *P. guajava* evaluadas resultaron ampliamente variables en cuanto a su composición química, en relación al contenido de catequina y epicatequina de las hojas, observándose diferencias marcadas entre individuos, señalándose al respecto, que la concentración de flavonoides varía de planta a planta, incluso en diferentes órganos de una misma planta (Dinelli *et al.*, 2006). Al respecto Escalona (2011), ha señalado que el mayor contenido en hojas puede ser explicado por la morfología de las hojas jóvenes, en cuyo estado fenológico son más susceptibles a factores externos debido a su baja lignificación, momento en el cual pueden llegar a presentar mayor vulnerabilidad a factores bióticos y abióticos, así como requerir la translocación de

The flavonoid contents, in the form of catechin and epicatechin, obtained in most of the plants evaluated in the present investigation, have been explained by Pérez *et al.* (2008), when reporting that *P. guajava* is a species that has a high production of secondary metabolites, some with useful biological activity attributed mainly to phenolic compounds, flavonoids, carotenoids, terpenoids and triterpenes.

The *P. guajava* plants evaluated were widely variable in terms of their chemical composition, in relation to the catechin and epicatechin content of the leaves, observing marked differences between individuals, noting in this regard, that the concentration of flavonoids varies from plant to plant, even in different organs of the same plant (Dinelli *et al.*, 2006). In this regard, Escalona (2011), has pointed out that the higher content in leaves can be explained by the morphology of young leaves, in which phenological state they are more susceptible to external factors due to their low lignification, at which point they can present greater vulnerability to biotic and abiotic factors, as well as requiring the translocation of photoassimilates for the secondary metabolism of young leaves.

Furthermore, various authors have pointed out that flavonoids are produced by the plant in response to stress caused by various abiotic factors such as climate, temperature, light and ultraviolet radiation (Vargas *et al.*, 2006; Bolling *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2013; Avello *et al.*, 2013; Haytowitz *et al.*, 2013; Valenzuela,

fotoasimilados para el metabolismo secundario de las hojas jóvenes.

Por otra parte, diversos autores han señalado que los flavonoides son producidos por la planta en respuesta al estrés causado por diversos factores abióticos como el clima, la temperatura, la luz y la radiación ultravioleta (Vargas *et al.*, 2006; Bolling *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2013; Avello *et al.*, 2013; Haytowitz *et al.*, 2013; Valenzuela, 2015). Con relación a esto, Valares (2011) señala que cuando se cuantifica la cantidad de metabolitos secundarios en una planta, se está cuantificando un carácter fenotípico, y este, según Jones y Hartley (1999) tiene un control genético y un control ambiental, es decir, los niveles de compuestos del metabolismo secundario están en parte controlados genéticamente y en parte determinados por las acciones ambientales.

Entre los factores bióticos que afectan la producción de flavonoides destacan el cultivar o variedad, el medio y la temporada de cultivo, el tipo de suelo, la ubicación geográfica, las enfermedades, los insectos y otras condiciones (procesamiento, almacenamiento post-cosecha) (Vargas *et al.*, 2006; Bolling *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2013; Avello *et al.*, 2013; Haytowitz *et al.*, 2013; Bhagwat *et al.*, 2013; Valenzuela, 2015), los cuales representan entre 25 y 33% de la variabilidad observada, el estado fenológico del órgano; así como también las prácticas agrícolas y las condiciones de almacenamiento de las muestras (Haytowitz *et al.*, 2013).

(2015). In relation to this, Valares (2011) indicates that when the amount of secondary metabolites in a plant is quantified, a phenotypic character is being quantified, and this, according to Jones and Hartley (1999), has a genetic control and an environmental control, that is to say, the levels of compounds of secondary metabolism are partly genetically controlled and partly determined by environmental actions.

Among the biotic factors that affect the production of flavonoids, the cultivar or variety, the cultivation medium and season, the type of soil, the geographical location, the diseases, the insects and other conditions (processing, post-harvest storage) stand out (Vargas *et al.*, 2006; Bolling *et al.*, 2010; Alfaro *et al.*, 2013; Avello *et al.*, 2013; Haytowitz *et al.*, 2013; Bhagwat *et al.*, 2013; Valenzuela, 2015), which represent between 25 and 33% of the observed variability, the phenological state of the organ; as well as agricultural practices and the storage conditions of the samples (Haytowitz *et al.*, 2013).

For their part, Bystrická *et al.* (2010) reported that the concentration and dynamics of polyphenol synthesis in plant organs depend on plant species, type of organs and the stage of growth. Regarding the organ growth stage, Pérez *et al.* (2014), evaluated the content of total flavonoids in young and recently mature leaves using UVvis molecular absorption spectroscopy, previous extraction with methanol/water (80:20 % v/v) assisted with ultrasound, obtaining concentrations of total flavonoids of

Por su parte, Bystrická *et al.* (2010) reportaron que la concentración y la dinámica de la síntesis de polifenoles en órganos vegetales dependen de las especies vegetales, tipo de órganos y la etapa de crecimiento. Con relación a la etapa de crecimiento del órgano, Pérez *et al.* (2014), evaluaron el contenido de flavonoides totales en hojas jóvenes y recientemente maduras empleando espectroscopía de absorción molecular UVvis, previa extracción con metanol/agua (80:20 % v/v) asistida con ultrasonido, obteniendo concentraciones de flavonoides totales de 2845,21 mg de catequina.100 g⁻¹ de muestra seca en hojas jóvenes de *P. guajava*, demostrando la potencialidad de esta especie y de la hoja en la obtención de flavonoides.

En el presente estudio se obtuvieron mayores contenidos de catequina y epicatequina en comparación con estudios realizados por Cala *et al.* (2011), quienes reportaron contenidos de (±)- catequina (0,07-0,79 mg.g⁻¹ de cacao) y (-)-epicatequina (1,99-9,66 mg.g⁻¹ de cacao) en cinco variedades de cacao colombiano empleando cromatografía líquida de alta resolución y electroforesis capilar. Al igual que en los estudios realizados por Kricun (2011), quien obtuvo un contenido de catequina de 0,34% ± 0,05 y para epicatequina de 1,13% ± 0,12 en cultivares argentinos de té (*Camellias sinensis*) elaborados como té verde sencha.

Conclusiones

Los flavonoides catequina y epicatequina están presentes en altas

2845,21 mg of catechin. 100 g⁻¹ of dry sample in young leaves of *P. guajava*, demonstrating the potential of this species and of the leaf in obtaining flavonoids.

In the present study, higher catechin and epicatechin contents were obtained compared to studies carried out by Cala *et al.* (2011), who reported contents of (±)-catechin (0,07 - 0,79 mg.g⁻¹ of cocoa) and (-)-epicatechin (1,99-9,66 mg.g⁻¹ of cocoa) in five Colombian cocoa varieties using high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. As in the studies carried out by Kricun (2011), who obtained a catechin content of 0,34 % ± 0,05 and for epicatechin of 1,13 % ± 0,12 in Argentine tea cultivars (*Camellias sinensis*) made like sencha green tea.

Conclusions

The catechin and epicatechin flavonoids are present in high concentrations in *P. guajava* plants, showing variations between them, even when the crop was agronomically managed in the same way. These results demonstrate *P. guajava* as a potential source for obtaining these phytochemicals.

Acknowledgment

The authors wish to express their gratitude to CORPOZULIA, FONACIT (No. S1-2000000795; F-2001001117) and VAC-CONDES-LUZ (CC-0333-14 and CC-0579-10) for the support with the financing for conducting this research.

concentraciones en las plantas de *P. guajava*, presentando variaciones entre las mismas, aun cuando el cultivo agronómicamente fue manejado de la misma manera. Estos resultados demuestran a *P. guajava* como una fuente potencial para la obtención de estos fitoquímicos.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a CORPOZULIA, al FONACIT (No. S1-2000000795; F-2001001117) y al VAC-CONDES-LUZ (CC-0333-14 y CC-0579-10) por el apoyo con el financiamiento para la realización de esta investigación.

Literatura citada

Alfaro, S., A. Mutis, R. Palma, A. Quiroz, I. Seguel y E. Scheuermann. 2013. Influence of genotype and harvest year on polyphenol content and antioxidant activity in murtilla (*Ugni molinae* Turcz) fruit. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 13(1):67-78.

Ameer, K., H. Muhammad y J. Ho Kwon. 2017. Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16:295-315.

Avello, M., E. Pastene, E. Bustos; M. Bittner y J. Becerra. 2013. Variation in phenolic compounds of *Ugni molinae* populations and their potential use as antioxidant supplement. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(1):44-50.

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, consultada el 20 de agosto de 2013.

End of English Version

Bolling, B., G. Dolnikowski, J. Blumberg y C.Y. Chen. 2010. Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chem.*, 122(3):819-825.

Bystrická, J., A. Vollmannová, E. Margitanová e I. Čičová. 2010. Dynamics of polyphenolics formation in different plant parts and different growth phases of selected buckwheat cultivars. *Acta Agriculturae Slovenica*, 95(3):225-229.

Cala, M. y A. Vásquez. 2008. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequina extraídas de plantas de la familia Labiaceae y determinación de su actividad antioxidante. Trabajo de Grado, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Bucaramanga, p. 25-26.

Cala, M., A. Vásquez, A. García, J. Martínez y E. Stashenko. 2011. Estudio comparativo por electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta eficiencia de catequina extraídas de cinco variedades de cacao colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fís. Nat.*, 35:136.

Coplanarh. 1975. Inventario Nacional de Tierras. Región Lago de Maracaibo, Atlas, MAC-CENIAP, Caracas, Venezuela, 42 p.

Dinelli, G., A. Bonetti, M. Minelli, I. Marotti, P. Catizone y A. Mazzanti. 2006. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chem.*, 90:105-114.

Escalona, J. 2011. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria. Trabajo de grado, Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Farmacia, 27 p.

- Ewel, J.J. y A. Madriz. 1968. Zonas de vidas de Venezuela. Memoria explicativa sobre el Mapa Ecológico, Edit. Sucre, M.A.C, Dirección de Investigación, 264 p.
- Goularte, F. y R. Hoffmann. 2010. Determination of phenolic compounds by isocratic high performance liquid chromatography method during storage of yerva-mate. *Quim. Nova*, 33(1):119-123.
- Haytowitz, D.B, S. Bhagwat y J.M. Holden. 2013. Sources of variability in the flavonoid content of foods, *Procedia Food Science*, 2:46-51.
- Hoffmann-Ribani, R. 2008. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por Cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e Análise de superfície de resposta. *Quim. Nova*, 31(6):1378-1384.
- Jones, C.G. y S.E. Hartley. 1999. A protein competition model of phenolic allocation, *Oikos*, 86:27-44.
- Kricun, P. 2011. Contenido de catequinas en cultivares argentinos de té (*Camellia sinensis*), elaborados como té verde sencha. *RIA*, 37(3):249-255.
- Lapčík, O., B. Klejdus, L. Kokoška, M. Davidová, K. Afandi, V. Kubáň y R. Hampl. 2005. Identification of isoflavones in *Acca selowiana* and two species of *Psidium*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33:983-992.
- Lutz, M., J. Hernández y C. Henríquez. 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. *Cyta Journal of Food*, 13(4):541-547.
- Mailoa, M., M. Mahendra, A. Laga y N. Djide. 2013. Tannin extract of guava leaves (*Psidium guajava* L.) variation with concentration organic solvents. *Intenational Journal of Scientific & Technology Research*, 2(9):106-110.
- Pérez, R., S. Mitchell S. y R. Vargas. 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *J. Ethnopharmacol.*, 117:1-27.
- Pérez-Pérez, E., G. Ettiene, M. Marín, A. Casassa-Padrón, N. Silva, J. Raga, C. González, L. Sandoval y D. Medina. 2014. Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 31:60-77.
- Rivero-Maldonado, G., D. Pacheco, L.M. Martín, A. Sánchez, M. Quirós, J. Ortega, C. Colmenares y B. Bracho. 2013. Flavonoides presentes en especies de *Psidium* (MYRTACEAE) de Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 30:217-241.
- Statistical Analysis Software (SAS) Institute, Inc. 2000-2003. SAS User's Guide: Statistic. SAS Version 9.0. Institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Tsanova-Savova, S., F. Ribarova y M. Gerova. 2005. (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:691-698.
- Valares, C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Trabajo de grado, Universidad Extremadura, Departamento de Biología vegetal, Ecología y Ciencias de la tierra, 216 p.
- Valenzuela Bustamante, P.D. 2015. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae* Turcz. Trabajo de grado, Universidad de Chile, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 83 p.
- Vargas Alvares, D., M. Soto Hernández, V.A. González Hernández, E.M. Engleman y A. Martínez Garza. 2006. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia*, 40(1):109-115.