

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC-Tunja)

Grupo Asociado de Investigación Participativa para el Desarrollo Comunitario (GIPA)

Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales

Lic. Adriana María Neira González,¹ Dra. Martha Beatriz Ramírez González² y Lic. Nidia Lizbeth Sánchez Pinto³

Resumen

Se comprobaron las potencialidades antibacteriales del extracto etanólico y de sus fracciones éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y acuosa obtenidos de la cáscara y pulpa de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a la bacteria Gram positiva *Streptococcus mutans* ATCC 31089 y a una cepa de la misma bacteria aislada de paciente. El *S. mutans* está reconocido como el principal agente causal de las caries dentales. Se comprobó, por técnicas de coloración y cromatografía en capa delgada, el contenido de metabolitos secundarios en los extractos etanólicos crudos y en sus respectivas fracciones. Los ensayos antibacteriales se realizaron por la técnica de perforación en gel empleando la escala de 0,5 de McFarland a 10^8 ufc/mL. Se utilizó agar base sangre y se aplicaron 50 μ L de los extractos etanólicos de la cáscara y la pulpa de *P. guineense* diluidos en DMSO a concentraciones de 400 y 0,4 μ g/ μ L. Según los mayores porcentajes de inhibición obtenidos de estos extractos, se tomaron las fracciones en concentraciones entre 25 y 100 μ g/ μ L y para la cepa *S. mutans* aislada de paciente, concentraciones de 400 y 200 μ g/ μ L. Los extractos etanólicos crudos mostraron actividad frente a estas bacterias; las fracciones de mayor actividad fueron las nombradas M1FA (fracción acetato de choba fruto cáscara verde seca) y M3FA (fracción acetato de choba fruto pulpa verde seca). La actividad antimicrobiana de la especie *P. guineense* pudiera ser atribuida a los metabolitos secundarios, taninos, flavonoides, terpenos y aldehídos, presentes en el fruto de esta especie.

Palabras clave: *Psidium guineense* Sw, fracciones, *Streptococcus mutans*, actividad antibacterial.

La especie *Psidium guineense* Sw (choba) es un arbolito de 2 a 2,5 m altura, nativo y de amplia dispersión en América Tropical. Pertenece a la familia Mirtaceae, es propia de pastizales y matorrales y prospera en terrenos áridos. La corteza es de color pardo y se descascara. Los frutos son globosos, a veces ovoides, aromáticos, pedunculados, de 1,5 cm de largo; inmaduros son de color verde claro y sabor ácido, maduros son amarillo verdoso, la pulpa de color crema y dulce, de numerosas semillas de

aproximadamente 0,3 cm, color crema, ovoides, pequeñas, de testa dura.



Fig. Fruto de *Psidium guineense* Sw.
Según Herbario Nacional Colombiano: No. COL. 495197.

Psidium guineense se diferencia de *Psidium guajava* por ser más pequeña. Se usa como planta medicinal en el interior de Brasil, en una decocción de las raíces para tratar enfermedades urinarias, diarrea y disentería. En Costa Rica se dice que reduce venas varicosas y úlceras en las piernas. Una decocción de la hoja se toma para eliminar fríos y bronquitis.^{1,2}

La especie se propaga como un arbusto y se reportan cultivos en la zona de Bocoyá, la región de bajo Ricaurte–Raquira y municipios aledaños. Sus nombres vulgares en diferentes lugares de Colombia son: “Arrayan”, en Buesaco (Nariño), “Choba”, en Villa de Leiva (Boyacá).³

Dentro de las infecciones más frecuentes de origen bacteriano que ataca a la especie humana, se encuentra la carie dental y el microorganismo responsable es el *Streptococcus mutans*. En Colombia, un estudio de morbilidad oral, realizado por el Ministerio de Salud Nacional, informó un valor de incidencia de caries de 88 % para la población colombiana [Colombia. Ministerio de Salud. III Estudio Nacional de Salud Bucal (ENSAB III); 1999]. La Secretaria de Salud de Boyacá en 1988 reportó que las infecciones de tejidos dentarios ocupaban el primer lugar de insalubridad y el segundo, las infecciones intestinales. Se han planteado muchas formas de combatir la carie dental, entre otros, el uso de productos sintéticos.⁴ Algunos investigadores estudian las potencialidades de extractos obtenidos de plantas para combatir las caries dentales.⁵

Los *Streptococcus* son bacterias que presentan forma de coco, crecen en cadenas o en parejas, no tienen movimiento, no forman esporas y generalmente reaccionan positivamente a la coloración de Gram. El *S. mutans* ha sido el más aislado en lesiones cariosas en humanos, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción. Su nombre lo recibe de su tendencia a cambiar de forma, puede encontrarse como coco o, de forma más alargada, como bacilo; tiene un diámetro de 0,5 a 0,75 μ , anaerobio facultativo, alfa hemolítico, heterofermentativo en especial ácido láctico, presenta una cubierta externa llamada glicocalix.⁶ *Li* y *Caufield* afirman que el *S. mutans* es considerado el mayor

agente etiológico de la carie dental en humanos.^{7,8}

En este estudio se identificaron algunos metabolitos secundarios en *P. guineense* como flavonoides, terpenoides, taninos y se evaluó su actividad antimicrobiana frente a *S. mutans*.

Métodos

El desarrollo de este trabajo de investigación, se llevó a cabo en los laboratorios de Química (Facultad de Ciencias), Fitopatología (Facultad de Agronomía) de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y en la Universidad Nacional de Colombia, en el laboratorio del grupo de investigación en productos naturales, del Departamento de Química.

Material vegetal

Se colectaron frutos de la especie *P. guineense* frescos y sanos y hojas, en la finca “Bueyero” del Doctor *Meyid Velosa Ruiz* en el municipio de Raquira (Boyacá).

Para este estudio se analizó la cáscara y la pulpa del fruto, en estado de madurez verde y pintón,⁹ el fruto fue identificado por el Herbario Nacional Colombiano, con número de colección 495197.

Microorganismos

El ensayo de actividad antimicrobiana fue realizado con *S. mutans* ATCC 31089 donada por el Centro de Investigaciones Odontológicas (American Type Culture Colección) y con una cepa aislada de paciente (*viridans*) del cepario de la Universidad Javeriana.

Extracción y fraccionamiento

A partir de 300 g de material vegetal fruto *P. guineense* en estado seco y pulverizado, se obtuvieron los extractos etanólicos crudos M1(choba cáscara verde seca), M2 (choba cáscara pintona seca), M3 (choba pulpa verde seca), M4 (choba fruto pulpa pintona seca) y M5 (choba hojas) por técnicas de maceración en frío y percolación, con 500 mL de etanol al 96 %. Todos los extractos se concentraron en un rotoevaporador BUCHI R 205 hasta sequedad y se disolvieron, después de secos y pesados, en metanol-agua; se fraccionaron por el método de reparto con solventes orgánicos de polaridad creciente: éter de petróleo (FE), diclorometano (FD), acetato de etilo (FA) y quedó como residuo la fracción metanol (FM). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.¹⁰

Análisis fitoquímico

Pruebas de coloración

Se evaluaron los extractos crudos y las FA que mayor porcentaje de inhibición presentaron frente a las bacterias en estudio para la identificación de metabolitos secundarios por pruebas cualitativas como: *Fehling* (aldehídos), método Legal (lactosas insaturadas y cetonas), método cloruro férrico (fenoles y taninos), reacción de *Liebermann-Buchard* (triterpenoides y esteroides), método de *Shinoda* (flavonoides), método de *Dragendorff* (alcaloides), Antrona (glicósidos). Se emplearon reactivos específicos de coloración para grupos funcionales y los cálculos se realizaron comparando con patrones de referencia.

Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se montó la cámara cromatográfica y se saturó con la mezcla de solvente éter de petróleo (40-60°)-acetato de etilo a una relación 7:3 para las fracciones FE y FD y diclorometano–metanol 9,5:0,5 para FA, todas las fracciones se aplicaron con un capilar en placas cromatográficas, silica gel 60. Después de la separación de los componentes de la muestra, la placa se observó a la luz ultravioleta (UV) y se revelaron las manchas con los reactivos específicos.¹¹

Actividad antibacterial

Para la identificación de las sustancias antibacteriales se utilizó el método de perforación en gel y se emplearon controles para el medio agar chocolate, control del crecimiento, control negativo dimetilsulfoxido (DMSO) por ser el solvente empleado para las muestras (extractos), y control positivo penicilina G a una concentración de 0,12 mg/mL.

Se prepararon los precultivos en medio líquido caldo BHI, se dejaron crecer durante 2 a 6 h a 37° C y se controló la turbidez para llegar a la escala de *Mc Farland* 0,5 (10^8 ufc/mL) (*García J, Rodríguez L, Cantón R, García E, Gómez M, Martínez L*, et al. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en microbiología clínica, recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2001).

Después de haber ajustado el inóculo se realizó siembra masiva en una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones. Se utilizaron cajas de 10 cm y se adicionó 15 mL de medio de cultivo, se realizaron 2 perforaciones periféricas de 0,5 cm de diámetro en el agar solidificado donde se aplicaron 50 µL a una concentración de 400 y 0,4 µg/µL de los extractos etanólicos crudos.¹² De acuerdo a los mayores porcentajes de inhibición obtenidos de los extractos etanólicos crudos, frente a las bacterias propuestas, se tomaron las fracciones FE, FD, FA y FM a una concentración de 100, 50, 25 µg/µL.

Se evaluaron las fracciones FA de M2 y M4 frente al *S. mutans* aislado de paciente a concentraciones de 400, 200 y 0,4 mg/mL diluidos en DMSO, aplicados a 50 mL por cada reservorio. Las placas se incubaron a 37° C por 36 h para *S. mutans* a un pH de 7,0-7,2 aeróbicamente. Se realizaron 2 réplicas por tratamiento para cada microorganismo, todo el material y los reactivos utilizados fueron previamente

esterilizados. Los resultados se evaluaron mediante el diámetro en mm del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos, se comparó con el diámetro del control positivo (antibiótico).

Resultados

Extracción y fraccionamiento

Los extractos etanólicos M1, M2, M3 Y M4 presentaron consistencia semisólida, color café claro y olor característico, y M5 color verde oscuro y porcentajes de rendimiento entre 5,47 y 29,53 % (p/p); los mayores porcentajes fueron para M2 29,53 % y M5 19,79 %.

Determinación de metabolitos secundarios

Pruebas de coloración

El análisis preliminar de la identificación de los metabolitos secundarios (tabla 1) de los extractos etanólicos de choba muestra la presencia de aldehídos, fenoles, esteroides y terpenos, taninos, flavonoides, glicósidos.

Tabla 1. *Identificación de metabolitos secundarios por pruebas de coloración y precipitación*

Metabolitos	M1	M2	M3	M4	M5	M1FA	M2FA	M3FA
1. Aldehidos	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Lactonas insaturadas	-	-	-	-	-	+	+	+
3. Fenoles	+	+	+	+	+	+	+	+
4. Cetonas-metil cetonas	-	-	-	-	-	+	+	+
5. Esteroides y triterpenos	A	+	+	+	+	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	-	+
6. Flavonoides	-	+	+	+	-	-	+	+
7. Taninos	+	+	+	+	+	+	+	+
8. Glicósidos	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): positiva presencia de los metabolitos secundarios, (-): negativa, A: prueba de *Liebermann-Burchard*, B: prueba de *Salkowski*.

Cromatografía en capa fina

Se evaluaron por cromatografía en capa fina las fracciones FA de los extractos etanólicos crudos (M1, M2 y M3). Los cromatogramas revelados con los agentes cromogénicos, como también la cantidad de

manchas presentes, indican la presencia de metabolitos secundarios, compuestos con doble enlaces conjugados: esteroides, fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides (tabla 2).

Tabla 2. Valores de Rf de manchas presentes en las fracciones éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, por las pruebas de revelado a UV y reactivo químico específico

Fracciones Prueba	M1FE	M1FD	M1FA	M3FE	M3FD	M3FA
A	0,82 0,90	0,75	-	-	0,73	-
B	0,58	0,56	0,59	0,61	-	-
C	0,62	0,51 0,18	0,8	0,24	0,51	0,24
D	0,91	-	-	-	0,35 0,66	0,73
E	0,69	0,84	0,84	-	0,64	0,72
F	-	0,29 0,49	0,5	-	0,24	0,55
G	0,49	-	0,47	-	-	0,61
H		-	0,88	-	-	0,88
I	0,85 0,96	0,73	0,08	-	0,67	0,08

A: técnica H_2SO_4 , B: *Liebermann-Burchard*, C: vainillina H_3PO_4 , D: cloruro de aluminio, E: cloruro de

hierro (III), F: cloruro de cobalto, G: *Dragendorff*, H: *Mayer*, I: vainillina H_2SO_4 , (-): no presenta

manchas.

Evaluación de la actividad antibacterial

De acuerdo con los resultados de la tabla 3, se observa que los extractos etanólicos de *P. guineense* presentaron actividad inhibitoria alrededor de 70 % frente al *S. mutans* ATCC 31089, dando mayor porcentaje las muestras M1 (choba cáscara verde seca) Y M3 (choba pulpa verde seca), 70,83 y 75 %,

respectivamente. De los crudos M1 y M3 que mostraron mayor porcentaje de inhibición se evaluaron las fracciones FE, FD, FA y FM. Las fracciones que tuvieron mayor porcentajes de inhibición a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fueron las de acetato M1FA, M3FA (50 %), respectivamente comparado con el control positivo penicilina (0,12 mg/mL) que presentó un halo de inhibición de 30 mm.

Se observó que los extractos etanólicos de *P. guineense* presentaron actividad inhibitoria frente al *S. mutans* aislada de paciente con valores de 13,33 a 33,33 % dando mayor porcentaje la muestra M5 (33,33 %), las fracciones M1FA y M3FA que presentaron mayor porcentaje de inhibición frente a *S. mutans* ATCC 31089 se tomaron para ser evaluadas frente a *S. mutans* aislada de paciente a las concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en donde presentó valores de M1FA y M3FA de 31,5 y 36,25, respectivamente, y a 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no presentó inhibición. Se comprobó que el control negativo DMSO, disolvente de las fracciones no presentó inhibición, lo cual garantiza que el extracto es el que tiene la propiedad inhibitoria.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de M1, M2, M3, M4, M5 y fracciones frente a *S. mutans*, *S. mutans* paciente y *E. coli* y porcentajes de halo de inhibición

Extractos	% Inhibición			% Inhibición	
	<i>S. mutans</i> ATCC 400 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$			<i>S. mutans</i> paciente 400 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	
M1	70,83			13,33	
M2	58,33			13,33	
M3	75			13,33	
M4	33,33			13,33	
M5	33,33			33,33	
C (+) P	24 mm			30 mm	
C (+) N					
Fracciones	100	50	25	400	200
M1FE	37,5	16,66	-		
M1FD	45,83	18,16	-		
M1FA	50	29,16	12,45	50,8	37,5
M1FM	31,25	25			
M3FE	45,5	-	-		
M3FD	32,5	-	-		
M3FA	50	31,25	27,08	50,8	36,25
M3FM	32,5				
C (+) P	20	15	27,08	30	13,5
C (+) N					

C (-) D	-	-	-	-	-
---------	---	---	---	---	---

Control (+) P: penicilina a 0,12 μg /mL para *S. mutans* expresado en mm, control (+) N: norfloxacin 4 μg /mL para *E. Coli.* expresado en mm, control (-) D = DMSO no presentó inhibición, (-): no hay inhibición.

Discusión

Evaluando la actividad antimicrobiana de la especie *P. guineense* frente a la cepa de referencia se puede pensar que la inhibición es atribuida a los metabolitos presentes en este fruto y directamente relacionado con el estado de madurez y fracción acetato de etilo (FA) las cuales presentaron altos porcentajes de inhibición, cerca del 70 %.

Las fracciones que exhibieron mayor porcentaje de inhibición fueron M1FA, M3FA (choba cáscara verde y pulpa verde), resultado atribuido a la presencia de los metabolitos secundarios como flavonoides (avicularina, guayajaverina y quercetina)¹⁴ comprobados por las pruebas de cloruro férrico, *Shinoda* para flavonoides y CCD revelado con cloruro de aluminio. En cuanto a las fracciones FA, son medianamente polares, por tanto extraen metabolitos secundarios similares a su polaridad los cuales poseen la actividad. Verificado por las pruebas preliminares químicas se determinó la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, fenoles.

El estado de madurez es de gran importancia desde el punto de vista de la composición de los metabolitos secundarios y por ende condiciona la actividad antimicrobiana, se puede decir que las propiedades de inhibición se atribuyen a los metabolitos secundarios que están presentes en estado de madurez verde, los cuales pueden ser taninos, flavonoides que son compuestos polares. En la tabla 1 se aprecia que las hojas extracto M5 tienen metabolitos de interés por tanto se infiere que son los responsables de la actividad antimicrobiana ya que la cepa de referencia es una cepa donde se encuentra sólo el *S. mutans* y es más selectivo que la cepa aislada de paciente en donde se encuentran más bacterias implicadas en la iniciación de la carie dental. El extracto crudo etanólico M5 fue la única muestra que mantuvo su actividad antimicrobiana significativa frente a las 2 cepas (*S. mutans* ATCC 31089 y *S. mutans* aislada de paciente (viridans), presentó un porcentaje de inhibición de 33,33 % frente a la cepa ATCC y de 33,33 % para la cepa aislada de paciente, esto quiere decir que en las hojas se encuentran los metabolitos que poseen actividad frente a estas 2 bacterias.

Se observa que el porcentaje de inhibición frente a *S. mutans* paciente, aumentó notablemente en las muestras analizadas con FA, por ejemplo de un porcentaje del crudo de la choba pulpa verde seca (M3) de 13,33 % a un 36,25 % para su fracción (M3FA).

A los metabolitos secundarios como los taninos se les puede atribuir la actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* ATCC 31089 y aislada de paciente. Estos metabolitos por sus propiedades de astringencia,¹⁴

en afecciones de la boca¹⁵ dan una sensación de sequedad producida probablemente por reducción de la acción lubricante de las glicoproteínas de la saliva¹⁶ por lo tanto para que se produzca la carie dental se necesita de la adhesión del *S. mutans* al diente mediada por la interacción entre proteínas del mismo y algunas de la saliva; por lo anterior los taninos inhiben esta adhesión *in vivo*.¹⁷

Las bacterias evaluadas *S. mutans* ATCC 31089 y aislada de paciente son estreptococos, poseen una membrana citoplasmática con fosfolípidos y proteínas; por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra la pared celular que está compuesta por una ancha capa de peptidoglucano y bajo contenido de lípidos (*Iañez, E. 2002, Curso de Microbiología General "Quimioterapéuticos de Síntesis y Antibióticos"*) esto hace que los metabolitos identificados polares, catiónicos sean más permeables y susceptibles a la pared que permite el paso de sustancias a su interior, entonces las bacterias no tienen la capacidad del balance electrolítico y puede ocasionar la muerte.

Finalmente se puede concluir que la actividad antimicrobiana de la especie *P. guineense* pudiera ser atribuida a los metabolitos secundarios, taninos y flavonoides, terpenos y aldehídos, entre otros, que están presentes en el fruto de la especie.

Summary

Phytochemical study and antibacterial activity of *Psidium guineense* Sw (choba) against *Streptococcus mutans*, causal agent of dental caries

The antibacterial potentialities of the ethanol extract and its petroleum ether, dicloromethane, ethyl acetate, and aqueous fractions obtained from the peel and pulp of *Psidium guineense* Sw (choba) against the Gram positive *Streptococcus mutans* ATCC 31089 and a strain of the same germ isolated from a patient, were proved. *S. Mutans* is recognized as the causal agent of dental caries. The content of secondary metabolites in the crude ethanol extracts and in its respective fractions were proved by staining and thin layer chromatography. The antibacterial tests were made by means of the gel perforation technique and using McFarland's 0.5 scale at 10^8 ufc/mL. Blood base agar was utilized and 50 mL of the ethanol extracts from the peel and pulp of *P. guineense* diluted in DMSO at concentrations of 400 and 0.4 mg/mL were applied. According to the highest percentages of inhibition obtained from these extracts, the fractions were taken in concentrations between 25 and 100 mg/mL and from 400 and 200 mg/mL for the *S. mutans* strain isolated from a patient. The crude ethanol extracts showed activity against these bacteria. The fractions with the greatest activity were the so-called M1FA (fraction of acetate of choba fruit's dry green peel) and M3FA (fraction of acetate of choba fruit's dry green pulp). The antimicrobial activity of the *P. guineense* species may be attributed to secondary metabolites, taninns, flavonoids, terpenes and aldehydes present in the fruit of this species.

Key words: *Psidium guineense* Sw , fractions, *Streptococcus mutans*, antibacterial activity.

Referencias bibliográficas

1. Chavarría F, Masís A, Espinoza R, Guadamuz A, Pérez D. Species de *Psidium guineense* (Myrtaceae). [serie en internet]. [citado 26 Sep 1998]. Disponible en: <http://www.acguanacaste.ac.cr>
2. Akerele O. Tradicional Medicine Programme. Tradicional herbal medicines around the glob: modern perpectives. Swiss Pharma. 1991;13:57-62.
3. García Barriga H. Flora medicinal de Colombia. T2. Santa Fe de Bogotá: Editorial Mundo; 1992. p. 308-11.
4. Herazo B, Moncada O. Estudio de tendencias epidemiológicas de caries dental y periodontopatías en las grandes ciudades colombianas. Bogotá: Ministerio de Salud, Pontificia Universidad Javeriana Press; 1995.
5. Jagtap AG, Karkera SG. Potential of the aqueous extract of *Terminalia chebula* as an anticaries agent. J Ethnopharmacol. 1999; 68:299-306.
6. Abello M, Sánchez S, Rodríguez A, Martínez C. Generalidades sobre las caries dentales. Boletín No. 2. [Serie en Internet]. [citado 15 de Mar 2003]. Disponible en : <http://www.encolombia.com/odontologia/investigaciones/centrodeinvestigacionesjaveriana-htm>
7. Pontificia Universidad Javeriana. Bases moleculares de la carie dental. Revista Científica de la Facultad de Odontología. Santa Fe de Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana Press; 2000 (suplemento 1).
8. Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto. Antibacterial substances in japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. Agric Biol Chem. 1989; 53 2307-11.
9. Neira A, Parra D, Ramírez M, Sánchez L. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. frente al *Streptococcus mutans*. Revista Ciencia en Desarrollo. Bogotá: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia;2003.
10. Domínguez J. Métodos de investigación en Fitoquímica. México DF: Editorial Limusa; 1973. p.30-2.
11. Sanabria Galindo A. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Bogota: Universidad Nacional de Colombia; 1983.
12. Pinzón R, Sánchez C. Manual de Técnicas de Investigación. Santa Fe de Bogota: CYTED; 1995. p. 63-70.
13. Martínez MJ, Molina N, Boucourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava* L. (guayaba). Rev Cubana Plant Med. 1997; 2(1):12-4.
14. Gupta MP. 270 plantas medicinales iberoamericanas. 1ra ed. Santa Fe de Bogotá: CYTED; 1995. p. 413-8.
15. Bate-Smith EC. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. Phytochem. 1973; 12:90712.
16. Loub. W.D. 1973. Partiel characterization of Antitumor tannin isolated from *Calygonum squiamurosum* (Melastomataceae). J. Pharm. Sci. 62,149-150p
17. Razak Fathilah A, ABD RAHIM ZH. The anti-adherence effect of *Piper beetle* and *Psidium guajava* extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to saliva-coated glass surfaces.

J Oral Sci. 2003; 45(4):201-6.

Bibliografía consultada

- Gobernación de Boyacá, Secretaría de Salud. Sistema básico de información, diez primeros diagnósticos por morbilidad de consulta externa según 999 causas por municipio, Boyacá; 1998.
- Hewitt W. Microbiological Assay. London Ac. Press; 1977.
- Khadem HE, Mohammed YS. Constituents of the leaves of *Psidium guajava* L. Part II. Quercetin, avicularin and guajaverin. J Chem Soc Chem Comm. Part III: 3320-3.
- Lock de Ugaz OL. 1998; Investigación Fitoquímica. Métodos en estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial; pp. 161-3, 183-213.
- Nagy S. Tropical and subtropical fruits composition. Properties and uses. TE AVÍ Publishing company; 1980.p. 279-99.

Recibido: 29 de agosto de 2005. Aprobado: 7 de diciembre de 2005.

Adriana María Neira González. Química de Alimentos y Joven Investigadora. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC-Tunja). Grupo Asociado de Investigación Participativa para el Desarrollo Comunitario (GIPA). Tunja, Bocoya, Colombia.

Tel: (098) 7422176 Ext 1690 – FAX: 7436205 e-mail: adrineigonza@yahoo.es

1

Lic. en Química de Alimentos. Joven Investigadora GIPA-UPTC.

2

Doctora en Ciencias Biológicas. Especialista en Fitoquímica.

3

Lic. en Química de Alimentos. UPTC