ESTUDIO DEL CONTENIDO DE FENOLES Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN 3 VARIEDADES DE GUAYABA (*Psidium guajava L*) COLOMBIANA EN DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ

JULIO ANDRES OLAYA ZEA

Trabajo para optar al título de magíster en Ciencias Químicas

Directora
LUZ PATRICIA RESTREPO SANCHEZ
MSc Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTE DE QUIMICA
BOGOTA D.C
2009

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que en algún momento de mi vida me ayudaran a cumplir este gran sueño.
A mi hermosa esposa Elaine y a precioso hijo Simón, por ser los motores que me impulsaron a llevar adelante este propósito y por toda la paciencia que me tuvieron durante el proceso de elaboración de este trabajo.
A mi Papa Carlos Olaya, a mi tío Germán y su familia, mis hermanos Kamilo, Juan Carlos y Mauricio y mis amigos, Cristian, Diego, Andrés, Ronald, Vlacho, Alejo, Camilo, John Víctor , Luis Alfredo, y muchos más que siempre estuvieron listos a apoyarme en todo.
A la profesora Luz Patricia Restrepo por brindarme su amistad, por preocuparse de mí en todo momento, por su grandísimo apoyo y orientación anivel personal y academico.
A la química Liliana cruz por su valiosa ayuda con el análisis LC MS.
A mis compañeros del grupo y docentes pertenecientes al grupo Estudios de los cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados, que siempre se mostraron atentos a ayudarme en lo que pudiesen.
Asohofrucol (Asociación Colombiana de Frutas y Hortalizas), al Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural de Colombia, a la DIB (División de Investigación Bogotá, Universidad Nacional de Colombia) por el apoyo económico necesario para sacar adelante este trabajo.
Y muy especialmente a mi mama Noelia (QEPD) que siempre se esmeró por hacer de mí una persona luchadora y perseverante.

TABLA DE CONTENIDO **paginas**

1. INTRODUCCION……..…..1

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA…….....2

3. REVISION DE LA LITERATURA

3.1 Generalidades de la guayaba ……....3

3.2 Producción de la guayaba en Colombia…….....4

3.3 Propiedades fisicoquímicas de la guayaba……....8

3.4 Capacidad antioxidante …….....9

3.5 .Mecanismos de actividad antioxidante……....10

3.6 Compuestos fenólicos …….....11

3.7 Principales tipos de fenoles vegetales

Ácidos fenólicos……12

Taninos condensados …….....13

Taninos hidrolizables…….....15

Flavonoides…….....15

3.8 Otros compuestos importantes con actividad antioxidante presentes en los vegetales

Vitamina C…….....16

Carotenoides……..…....18

3.9 Técnicas de medición del contenido de fenoles y de la capacidad antioxidante

3.9.1 Determinación del contenido de fenoles libres con el reactivo de Folin Ciocalteu(Shahidi 1995)…….....19

3.9.2 Determinación de capacidad antioxidante con ensayo por Bloqueo de cationes radicalesABTS$^{\bullet+}$(Re999)…….....19

3.9.3 Determinación de capacidad antioxidante con Ensayo por bloqueo de radicales DPPH (Brand Williams 1995)…….....20

3.9.4 Determinación de capacidad antioxidante con ensayo de capacidad reductora FRAP (Ferric reducing activity/antioxidant power - Benzie &Strain 1996) …….....21

3.9.5 Determinación de capacidad antioxidante con ensayo por decoloración del β caroteno (Velioglu et al. 1998) ….....22.

4 METODOLOGIA

4.1 Muestras de guayaba ……24

4.2 Extracción de fenoles…….. ……...25

4.3 Análisis de extractos obtenidos……...25

4.3.1 Determinación del contenido de fenoles libres…….....26

4.3.2 Medidas de la capacidad antioxidante…….....26

4.3.2.1 Determinación del Bloqueo de radicales $ABTS^{\bullet+}$……...26

4.3.2.2 Determinación del Bloqueo de radicales $DPPH^{*}$…….....27

4.3.2.3 Determinación de la capacidad reductora FRAP…….....28

4.3.2.4 Determinación de la decoloración β caroteno…….....29

4.4 Determinación de vitamina C total…….....30

4.5 Análisis estadístico de datos……...…..31

4.6 Extracción y análisis preliminar de fenoles de la variedad con Mayor contenido de fenoles y capacidad antioxidante extracción de Fenoles con Amberlita® XAD 2

4.6.1 Extracción de fenoles…….....33

4.6.2 Pruebas colorimétricas de identificación de fenoles…….....33

4.6.3 Análisis por cromatografía liquida de alta eficiencia con detector UV (HPLC-UV) de fracciones obtenidas por separación con la Amberlita ®XAD …….…....34

4.6.4 Hidrólisis de fenoles eluidos con metanol …….....35

4.6.5 Análisis cromatográfico por HPLC-UV de productos de la hidrólisis acida …….....35

4.6.6 Determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante de fracciones producto de la extracción por Amberlita® XAD 2 y de la hidrólisis acida ……..36

4.6.7 Identificación preliminar de de fenoles por HPLC –MS……...…....36

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Determinación de estado de madurez de las variedades de estudio ….....37

5.2 Evaluación del contenido de fenoles , capacidad antioxidante y contenido de vitamina C total en las variedades de estudio……..…...38

5.2.1 Resultados de la determinación del contenido de fenoles libres ..….....38

5.2.2 Capacidades antioxidantes ……..42.

5.2.2.1 Resultados de la determinación de la capacidad antioxidante por bloqueo de radicales $ABTS^{\bullet+}$ expresado en equivalentes Trolox (TEAC)…….....42

5.2.2.2 Resultados de la determinación de la capacidad antioxidante por bloqueo de radicales $DPPH^{\bullet}$…….…....44

5.2.2.3 Resultados de la determinación de la Capacidad reductora FRAP.....46

5.2.2.4 Resultados del ensayo de Decoloración del β caroteno por acido linoleico …….….....49

5.2.3 Resultados de la determinación de vitamina C total …….....50

5.3 Correlación entre los distintos ensayos de contenido de fenoles, capacidad antioxidante y contenido de vitamina C ……...…….....53

5.4 Comparación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante y vitamina C con otras frutas tropicales ……..……...54

5.5 Análisis preliminar de los fenoles obtenidos de la guayaba blanca madura……..…..….....58

5.5.1 Pruebas cualitativas de identificación de fenoles …….....59

5.5.2 Análisis por cromatografía liquida de alta eficiencia con detector UV(HPLC- UV) de fracciones obtenidas por separación con la Amberlita® XAD 2 ….……..…….....59

5.5.3 Análisis cromatográfico por HPLC-UV de productos de la hidrólisis acida ……...60

5.5.4 Determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante para las fracciones y subfracciones producto de la extracción por Amberlita® XAD 2 y de la hidrólisis acida y las subfracciones obtenidas ….……..…...61

5.6 Identificación preliminar de fenoles por HPLC –MS ……..…….....63.

6. Conclusiones ……...72

7. Recomendaciones ……..…..74

8. Bibliografía……...…....75.

GLOSARIO …….....…83

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS **pagina**

Figura 1. Guayaba variedad regional roja y regional blanca en estado maduro……..4

Figura 2. Localización geográfica del departamento de Santander y la provincia de Vélez……....6

Figura 3. Principales países importadores de la guayaba producida en Colombia……..7

Figura 4. Centros de consumo a nivel nacional 2005……..7

Figura 5. Exportaciones de guayaba en los últimos años (en toneladas)……..…8

Figura 6. Esquema de mecanismo de reacción de donación de hidrogeno de Compuestos fenólicos……11

Figura 7. Ejemplos de estructuras de ácidos fenólicos ……..…13.

Figura 8. Ejemplos de estructuras de l principal precursor de los taninos condensados (flavan3-ol) y de taninos condensados ……14

Figura 9. Ejemplo de taninos hidrolizables: galotaninos y elagitaninos …….....15

Figura 10. Principales estructuras de tipos de flavonoides ……..15

Figura 11. Estructura del acido ascórbico ……...16.

Figura 12. Formación de puentes de hidrogeno por el acido ascórbico …….....17

Figura 13. Movimiento de los pares de electrones en la desprotonación…….....17

Figura 14. Estructuras del β-Caroteno y α carotenos respectivamente…….....18

Figura 15. Esquema de formación de radical $ABTS^{\bullet+}$ e interacción de este con antioxidante.....20.

Figura 16. Estructura del Trolox …….....20

Figura 17. Reacción de antioxidante (ácido ascórbico) con radical DPPH ……21

Figura 18. Reducción del por efecto del antioxidante TPTZ Fe^{3+} a TPTZ Fe^{2+}……....21

Figura 19. Mecanismo de reacción entre el acido linoleico y el β caroteno …….....22

Figura 20. Metodología utilizada para el análisis de contenido de fenoles, actividad .antioxidante y vitamina C para la guayaba en sus tres variedades y diferentes estados de madurez.....24

Figura 21. Cambio de coloración del reactivo folin Ciocalteu en presencia del antioxidante.....26

Figura 22. Cambio de coloración de $ABTS^{\bullet+}$ con presencia de antioxidante ……27

Figura 23. Cambio de coloración del reactivo en presencia del antioxidante…….....28

Figura 24. Metodología aplicada para la extracción y análisis preliminar de fenoles de la variedad con mayor contenido de fenoles y capacidad antioxidante……32

Figura 25. Perfil cromatográfico comparativo del extracto metanólico (negro) vs extracto acuoso (rojo) obtenido por elución en Amberlita® XAD 2 ……..59

Figura 26. Cromatograma comparativo extracto metanólico (negro) vs producto hidrólisis acida vs producto hidrólisis acida fase orgánica (rojo) vs fase acuosa (azul) ……..60

Figura 27. Cromatograma del extracto metanólico de Amberlita® XAD 2 por HPLC MS ……63

Figura 28. Espectro de masas para tiempos de retención de 1.425, 1.843 y 2.334 min ……....63

Figura 29. Estructura del ácido 4-O-β-D-glucopiranosil ferúlico……...63

Figura 30. Espectro de masas para tiempos de retención de 3.317, 5.135 y 9.73 min ….……...64

Figura 31. Estructura de la epigalocatequina …….....64

Figura 32. Cromatograma de fase orgánica producto de la hidrólisis acida del extracto metanólico…65

Figura 33. Espectros de masas para tiempos de retención de 1.252, 6.53 y 11.22 min ….....65

Figura 34. Estructura de la cianidin 3- glucósido ……...……..66

Figura 35. Espectros de masa para estándar cianidin 3- glucósido ……..……....67

Figura 36. Espectros de masa para tiempos de retención de 13,07 , 22.24 y 28.67 min….....67

Figura 37. Espectro de masas y estructura de la quercetina reportado en la literatura ...….....68

Figura 38. Estructura química del acido elágico. …….....68

Figura 39. Cromatograma de fase acuosa producto de la hidrólisis acida del extracto metanólico….69

Figura 40. Espectros de masa para tiempos de retención de 6,489 11,173 y 14,997 mi.…….69

Figura 41 Estructura de la quercetina 3- glucósido ……70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación científica de la guayaba ……4

Tabla 2. Características de algunas variedades de guayaba seleccionadas en la hoya del rió Suárez ……..5

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la guayaba blanca …….....8

Tabla 4 .Propiedades fisicoquímicas de la guayaba roja …….....9

Tabla 5. Pruebas colorimétricas de identificación de fenoles …….....34

Tabla 6. Gradiente de elución utilizado para el análisis de HPLC UV de fracciones obtenidas por separación con la Amberlita® XAD …….....35

Tabla 7. Gradiente de elución utilizado para el análisis de HPLC MS de fracciones obtenidas por separación con la Amberlita® XAD y de productos de la hidrólisis acida del extracto metanólico……...37

Tabla 8.Valores de índices de madurez (º Brix/AT) calculados para las diferentes variedades de guayaba …….,…….37

Tabla 9. Resultados del contenido de fenoles libres para las variedades guayaba en sus diferentes estados de madurez ……38

Tabla 10. Tabla comparativa de resultados del contenido de fenoles obtenidos por otros investigadores para las guayaba …….....41

Tabla 11. Resultados de Capacidad antioxidante por Bloqueo de radicales $ABTS^{\bullet+}$ De las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez……42

Tabla 12. Tabla comparativa de resultados de capacidad antioxidante por bloqueo de radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ para la guayaba …….43

Tabla 13. Resultados de capacidad antioxidante por bloqueo de radicales $DPPH^{\bullet}$ de las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez…….44

Tabla 14. Tabla comparativa de resultados obtenidos de capacidad antioxidante por bloqueo de radicales libres DPPH● en guayaba……46

Tabla 15. Resultados Capacidad reductora FRAP de las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez……..47

Tabla 16. Tabla comparativa de resultados obtenidos por capacidad reductora FRAP para la guayaba …….,,,…….48

Tabla 17. Resultados Ensayo de Decoloración del β caroteno por acido linoleico de las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez……...49

Tabla 18. Resultados determinación de vitamina C total de las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez……..51

Tabla 19. Tabla comparativa de resultados obtenidos para el contenido de vitamina C total ….52

Tabla 20. Coeficientes de correlación entre contenido de fenoles ensayos de capacidad antioxidante y contenido de vitamina C……...53

Tabla 21. Comparación de valores de contenido de fenoles y capacidad antioxidante

para otras frutas. ……..55

Tabla 22. Resultados de pruebas colorimétricas ……..……..58

Tabla 23. Contenido de fenoles y capacidad antioxidante de fracciones obtenidas de la extracción con Amberlita XAD2 y los productos de la hidrolisis acida. ……...…….61

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Resultados del Contenido de fenoles por variedades y estado de madurez estudiadas…….39

Grafica 2. Resultados de Capacidad antioxidante por bloqueo de radicales libres ABTS$^{\bullet+}$ por variedades y estado de madurez estudiadas ……....42

Grafica 3. Resultados de capacidad antioxidante por bloqueo de radicales libres DPPH● por variedades y estado de madurez estudiadas ……....45

Grafica 4. Resultados capacidad reductora FRAP por variedades y estado de madurez estudiadas ..47

Grafica 5. Resultados de Ensayo de decoloración del β caroteno por variedades y estado de madurez estudiadas ……..49

Grafica 6. Resultados contenido de vitamina C por variedades y estado de madurez estudiadas ….51

Grafica 7. Correlaciones contenido de fenoles con ensayos de capacidad antioxidante y vitamina C… 53

Grafica 8. Comparación del Contenido de fenoles en otras frutas con la guayaba blanca madura……..56

Grafica 9. Comparación de las capacidades antioxidantes por bloqueo de radicales libres DPPH$^{\bullet}$ con otras frutas. ……..56

Grafica 10. Comparación del contenido de vitamina C con otras frutas……....57

LISTA DE ANEXOS

Índice I Índice de color de Gélvez
Índice II Análisis estadístico de datos ANOVA

RESUMEN

La guayaba (*Psidium guajava L*) presenta un importante contenido de nutrientes que pueden ser utilizados como antioxidantes y fibra dietaría. De acuerdo a sus características fisicoquímicas, podrían enriquecer diferentes tipos de alimentos o para aplicaciones farmacéuticas, como una nueva alternativa no convencional de uso de la fruta.

El presente trabajo estudió el contenido de compuestos fenólicos, su actividad antioxidante y el contenido total de vitamina C de tres variedades de guayaba producidas en Colombia y su variación de acuerdo al estado de madurez del fruto(inmaduro, pintón, maduro y sobremaduro). Dos variedades de alta producción silvopastoril (*regional roja y regional blanca*) y una de carácter promisorio (*guavatá victoria*) provenientes de la región de la hoya del río Suárez, en el Departamento de Santander (Colombia).

Se obtuvieron extractos etanólicos de cada variedad en sus diferentes estados de madurez y se les evaluó el contenido de fenoles libres por el método de Folin Ciocalteu, la capacidad antioxidante por las metodologías de bloqueo de radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ y $DPPH^{\bullet}$, la capacidad reductora FRAP, decoloración del β-caroteno y el contenido de vitamina C total (acido ascórbico y dehidroascórbico) por HPLC-UV (Gokmen 2000).

La variedad y estado de madurez que mostró mayor valor de contenido de fenoles libres y capacidad antioxidante fue la regional blanca en estado maduro y la que mayor valor de contenido de vitamina C total fue la regional roja madura.

Con la variedad regional blanca en estado maduro, se obtuvieron fracciones utilizando una columna con Amberlita® XAD 2: la eluida con agua y la eluida con metanol. A la fracción metanólica se le realizó una hidrólisis acida. De la hidrólisis anterior se obtuvieron otras dos fracciones: la fase orgánica que fue extraída con acetato de etilo y la fase acuosa. A todas las fracciones obtenidas anteriormente se les midió el contenido de fenoles libres y la capacidad antioxidante por las técnicas antes descritas (excepto el ensayo de decoloración del β caroteno).

Se hizo un análisis preliminar de los fracciones fenólicas y las obtenidas por producto de la hidrolisis mediante pruebas colorimétricas cualitativas ,análisis por HPLC UV y HPLC MS, con el fin de identificar tentativamente en comparación con

estándares y reportes de literatura , los principales compuestos fenólicos presentes en esta variedad de estudio y que podrían ser los principales responsables de su actividad antioxidante.

Se observó que la fracción metanólica obtenida a partir de la guayaba regional blanca presenta mayor valor de contenido de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante respecto a las otras fracciones analizadas, pero menor valor en comparación al extracto etanólico obtenido.

Se podría sugerir que existe una posible actividad sinergistica entre los compuestos fenólicos presentes en la guayaba blanca y entre los compuestos responsables de la actividad antioxidante tales como carotenoides y acido ascórbico con los fenoles, ya que se observa una menor capacidad antioxidante en el extracto metanólico obtenido por separación con Amberlita® XAD 2 , respecto al extracto etanólico inicial.

Se identificaron tentativamente la presencia de derivados del acido cafeoilquinico, epigalocatequina, quercetina y flavonoles glicosidados.

Aunque también se muestran indicios de la presencia de taninos condensados.

Palabras clave

Guayaba, estado de madurez; contenido de fenoles, capacidad antioxidante,vitamina C

ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava L*) presents an important nutrient content that can use as antioxidants and dietary fiber. Based to their physicochemical characteristics, could be used to enrich various types of food or pharmaceutical applications as an alternative on-conventional use of the fruit. This work studied free phenolic content , antioxidant activity and total vitamin C of three varieties of Colombian guava in different stage of ripening of the fruit(unripe, preripe, ripe and overripe), two varieties with major production in wild (*regional red and regional white*) and a promising (*guavatá Victoria*) from the region of hoya del río Suarez, Santander(Colombia).

Ethanolic extracts were obtained for each variety in its different stages and evaluated the content of free phenolics by the method of Folin Ciocalteu

Four different antioxidant capacity methods were followed: using the free radical scavenging $ABTS^{\bullet+}$and $DPPH^{\bullet}$, ferric reduced antioxidant power (FRAP) and bleaching of β-carotene and the total vitamin C (ascorbic and dehydroascorbic acid) was determined by HPLC (Gokmen2000).

The variety and ripeness stage showed higher free phenolic content and antioxidant capacity was the regional ripe white and the highest content of total vitamin C was the red ripe.

The variety regional white ripe stage, were obtained fractions using a column with Amberlite ® XAD 2: one eluted with water and other with methanol. The fraction eluted with methanol was hydrolyzed with acid obtaining two fractions, organic phase that was extracted with ethyl acetate and aqueous phase.

All fractions were measured by the phenolic content and antioxidant capacity by the assay already mentioned (except the assay bleaching of β carotene).

Preliminary analyses of phenolic compounds was determined with colorimetric test and HPLC UV and HPLC-MS to identify tentatively the main phenolic compounds present in this variety of study and maybe responsible for the antioxidant activity.

The data from this study indicate that the methanolic fraction presented a higher content of phenolic compounds and a higher antioxidant capacity compared to the other fractions studied, but lower compared to ethanolic extract.

Maybe there is potential synergy between phenolic compounds or between phenols and other substances with antioxidant capacity such as carotenoids and ascorbic acid presents in the regional guava ripe, comparing the lower antioxidant capacity showed the methanolic fraction with the value showed for the ethanolic extract .

Were identified mainly the presence of derivaded cafeoylquinic, ellagintannins and flavonols glycosides.

Also showing possible compounds like a condensed tannins

1. INTRODUCCION

Los beneficios de la guayaba (*Psidium guajava* L) por su alto contenido de fibra dietaría y contenido de fenoles ya han sido descritos con anterioridad (Jimenez-Escrig 2001**;** Lim 2006). Además, de sus múltiples usos tradicionales con base a su variada actividad biológica (R.M.P. Gutiérrez 2008*)*. Sin embargo, a pesar de ser Colombia un importante país productor de guayaba, el hecho de ser una fruta altamente perecedera y poseer muchos problemas fitosanitarios (mosca de la fruta y pestalosia) hace que realmente sea muy poco la exportación comparado con otros países latinoamericanos como Brasil o México.

Este constituye uno de los primeros estudios sobre tres importantes variedades Colombianas (regionales Roja, regional blanca y guavatá victoria) que actualmente son utilizadas principalmente en la elaboración de productos alimenticios de arraigo en la cultura colombiana (bocadillos y dulces).

A nivel interno, uno de los principales motivos de compra por parte de los consumidores de la guayaba son sus propiedades nutricionales basados en su contenido de vitamina C y fibra dietaría. Además de sus bajos precios. (Villamizar 2000). Aprovechando estas tendencias y aprovechando sus propiedades funcionales, se busca evaluar el contenido de fenoles, su actividad antioxidante y contenido de vitamina C total que presentan estas variedades en sus diferentes estados de maduración, con el objetivo de reconocer una nueva propiedad funcional de la fruta que puedan ser utilizada en alimentos de consumo masivo a nivel nacional o internacional , con base en la posibilidad de utilizarlas en la prevención de diferentes tipos de enfermedades, cardiovasculares (arteriosclerosis), circulatorias, neurológicas y en evitar el desarrollo de diferentes tipos de cánceres.

En la actualidad el interés en separar e identificar desde frutas y vegetales compuestos fenólicos con actividad antioxidante se ha incrementado, entre otras cosas, por la necesidad de disminuir el empleo de antioxidantes sintéticos en los alimentos y sustituirlos por antioxidantes de origen natural, dadas las fuertes regulaciones que al respecto se vienen promulgando a nivel internacional (Carter 2004).

La guayaba exhibe un modelo típico de respiración climatérica, lo cual implica un aumento significativo de la actividad respiratoria de la fruta durante el proceso de maduración. los metabolitos primarios varían significativamente su contenido durante este proceso, influyendo notablemente en cualidades de la fruta tales como sabor, aroma y color. Sin embargo, el estudio del contenido de los metabolitos secundarios (fenoles terpenoides y alcaloides) y su variación de acuerdo a su estado de madurez, no presenta una tendencia clara y varía de acuerdo a la fruta de estudio.

Por ejemplo, en frutas como la mora (Tosun 2008) se ha reportado una disminución en el contenido de fenoles con la madurez de la fruta y autores como Alia -Tejacal (2000) con el zapote mamey, y Abu-Goukh & Abu-Sarra con el mango (1993) describen un comportamiento contrario.

En el caso de la guayaba (Bashir 2003) describe una disminución similar al reportado en la mora. Sin embargo, en este estudio no se especifica el criterio de escogencia de madurez de la guayaba utilizada para el análisis.

Por esta razón es necesario hacer un análisis del contenido de fenoles en la guayaba y su variación de acuerdo a sus diferentes estados de madurez.

Se conoce que los compuestos fenólicos son los antioxidantes más abundante en nuestra dieta, ya que la ingesta media diaria esta alrededor de 1 g, lo cual corresponde a 10 veces mas que la ingesta de vitamina C, 100 veces más que la ingesta de vitamina E y 500 veces más que la ingesta de carotenoides (Scalbert y Williamson 2000).

La materia prima se produce en múltiples regiones del país, de manera silvestre y es vital el aprovechamiento de ésta para reducir las perdidas postcosecha que a nivel de finca que son cercanas al 22,1% y van en ascenso (Villamizar 2000).

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La conferencia de las Naciones Unidas celebrada en Chile en el año 2002 por la FAO incluyó a la guayaba dentro de los productos alternativos para superar la crisis alimentaria y factores de cambio para el alivio de la pobreza en el mundo y Colombia. Ese mismo año la FAO publicó el documento "Nutrición humana en el mundo en desarrollo", donde incluyó a la guayaba en la categoría de alimentos requeridos para una dieta balanceada. (Michael y Latham 2002).

La guayaba es un fruto rico en taninos, ácidos fenólicos , triterpenos, flavonoides , aceites esenciales , saponinas, carotenoides, vitamina A y C , fibra, ácidos grasos y una buena fuente de pectinas. (Kamath 2009)

Presenta un largo historial de usos tradicionales para el tratamiento de enfermedades que han sido validadas por múltiples investigaciones científicas. En Colombia, las hojas son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades como: gastroenteritis, diarrea, disentería, dolores reumáticos, gases y ulceras entre otros. Las principales aplicaciones comerciales de la fruta son entre otras: la elaboración de jugos, néctares concentrados, gelatinas y dulces.

En Colombia, trabajos realizados por integrantes del grupo de investigación sobre "Estudio de los cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados de la Universidad Nacional de Colombia" como Restrepo, (2008) y Rojas Barquera(2008) sitúan a la guayaba roja como una buena fuente de antioxidantes por su alto contenido de fenoles y de acido ascórbico.

Mahattanatawee (2006) reporta a la guayaba y al sapote mamey como frutas que exhiben mayores niveles de contenido de fenoles y de pectina. Jimenez-Escrig (2001), confirma el mismo comportamiento anterior para la guayaba.

Stangeland (2008) y Alothman (2008) por su lado correlacionan positivamente en la guayaba el alto contenido de fenoles con su capacidad antioxidante.

Y.Y Lim (2006) sugiere que la guayaba presenta muy buenas propiedades como captador de radicales libres, pero presenta pobres propiedades como agente quelante.

Thaipong (2006) encuentra para la guayaba una alta correlación positiva entre el contenido de fenoles y de vitamina C midiendo las capacidades antioxidantes por los métodos de ABTS, DPPH y FRAP.

3. REVISION DE LA LITERATURA

3.1 Generalidades de la guayaba

La *psidium guajava L* (figura 1) se cree que procede de Centroamérica, aunque se cultiva a nivel mundial en casi todos los países tropicales y subtropicales. En la tabla 1 se relaciona la clasificación científica de la guayaba.

Los países productores más importantes a nivel mundial son Brasil, Colombia, Perú, Ecuador, India, Sudáfrica, México, Filipinas, Venezuela, Costa Rica, Cuba y Puerto Rico.

Tomada de upload.wikimedia.org

Figura 1. Guayaba variedad regional roja y regional blanca en estado maduro.

Tabla 1. Clasificación científica de la guayaba

TIPO	FRUTA
NOMBRE COMUN	GUAYABA
NOMBRE CIENTÍFICO	**Psidium guajava L.**
REINO	*Plantae*
DIVISION	**Magnoliophyta**
CLASE	*Magnoliodsida*
ORDEN	*Myrtales*
FAMILIA	*MYRTACEAE*
GENERO	*Psidium*
OTROS NOMBRES	Guajaba, guava, goyabe, guayabe,

Fuente http://www.edinformatics.com/culinaryarts/food_encyclopedia/guava.htm 25/03/09

3.2 Producción de la guayaba en Colombia

El número aproximado de productores en todo el país es de 8.800 personas, de las que se generan 3.000 empleos permanentes. El valor de la cosecha por año es de $ 5.800 millones de pesos, con un valor de producción de bocadillo y dulces de 23.500 millones de pesos, para un total de aporte del sector de $ 29.300 millones de pesos. Los departamentos que sobresalen en la producción de guayaba son: Santander, Boyacá, Huila, Tolima, Cundinamarca, Meta. (Villamizar 2000)

El área estimada de cultivo de guayaba es de 18.000 hectáreas aproximadamente (14.300 en Santander y Boyacá, con un número de 4000 productores), con un rendimiento promedio de 10 toneladas por hectárea y un rendimiento potencial de 60 a 80 toneladas por hectárea. Genera 4.000 empleos indirectos como vendedores y distribuidores. La producción del año 2002 fue de 159.397 toneladas, con un valor de $100 a $400 por kilo.

Se calcula que el número de jornales por año es de 1'140.000, de este un 80% de la participación corresponde a la mujer. Existen 113 fábricas de bocadillo en Santander y

128 fábricas o microempresas en el resto del país, para un total de 241 empresas a nivel Nacional (Cuestas 2002).

La producción total de guayaba en el país, para el año 2002 con la participación de 14 departamentos fue de 159.397 toneladas de guayaba, si tenemos en cuenta los seis departamentos más importantes en producción, el volumen de fruta en el año 2002 fue de 147.857 toneladas de guayaba, es decir, que estos departamentos tienen el 92.7% de la producción total del país. La producción más alta de guayaba al igual que en área sembrada la tiene el departamento de Santander, en el año 2002 la producción de guayaba fue de 66.209 toneladas (cerca del 44%) (Villamizar 2000)

Se destaca que el municipio de Barbosa es el mayor productor de guayaba con 4.494.95 toneladas y una participación total en las ventas de Corabastos del 23.13% le sigue el municipio de Vélez con 2.148 toneladas de guayaba y una participación del 11.05%, el municipio del guamo en el departamento del Tolima con 1.886 toneladas y una participación del 9.71% entre los mas importantes. Las variedades colombianas regionales existentes debido a la propagación natural son la regional roja, Polo nuevo, Guayabita de Sandoná (Nariño), regional rosada, regional blanca, guavatá victoria y Guayaba Agria; Se cuenta con otras variedades seleccionadas por el ICA como la: guayaba manzana, guayaba pera, las río Suárez (RS) 961,962 y 963, la ICA roja y la Palmira ICA 1 (Villamizar 2000).

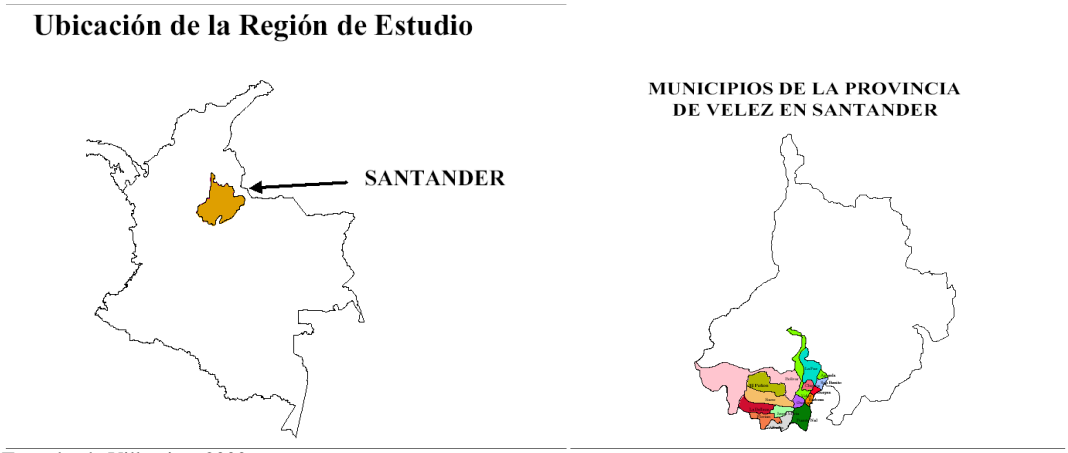
A continuación en la tabla 2 se presenta las características más importantes de algunas variedades seleccionadas de la hoya del río Suárez.

Tabla 2. Características de algunas variedades de guayaba seleccionadas en la hoya del rió Suárez.

VARIEDAD	RS-961	RS-962	RS-963	Guavatá victoria	Regional roja	Brasil redonda
MÍNIMA TON /HA	15.2	25.0	15.0	27.6	11.5	14
PESO PROMEDIO FRUTO(G)	144	173	159	155	116	143
FORMA DE FRUTO	esférica	aperado	aperado	aperado	esférica	esférica
COLOR PULPA	Roja	Rosado	Roja	Blanca	roja	Crema
SEMILLA (%)	2.5	2.7	2.7	3.8	4.3	1.6
SÓLIDOS SOLUBLES	8.7	9.4	9.2	8.1	10.5	9.9
ACIDEZ	0.32	2.02	0.34	0.40	0.51	2.44

Regional blanca, no se tienen los datos Fuente: MINAGRICULTURA (citado por CORPOICA 1996)

La figura 2 muestra la ubicación de la provincia de Vélez, principal región agroindustrial de guayaba en Colombia, está se ubicada al oriente del país en el departamento de Santander (a 260 Km por vía terrestre de Bogotá. Sus coordenadas están entre los 73º 37' 30" y 73º 52' 30" de longitud oeste y 6º 7' latitud norte. Dentro de los principales municipios productores de guayaba se destacan: Vélez, Barbosa, Guavatá, Jesús María y Puente Nacional.



Tomada de Villamizar 2000

Figura 2. Localización geográfica del departamento de Santander y la provincia de Vélez.

El sistema de producción de guayaba, está ubicado predominantemente en el agroecosistema Hoya del río Suárez. Después de la caña el renglón con mayor extensión e importancia socioeconómica es la guayaba con 9.500 hectáreas.

El clima es templado, muy húmedo, con más de 2.000 mm de precipitación, con un período seco entre diciembre a marzo y un "veranillo" entre julio y agosto. La humedad relativa en promedio es del 78% y la altitud oscila entre los 1.300 a 2.000 msnm.

En la Provincia de Vélez el 24% de la producción local se utiliza como materia prima para la elaboración de bocadillo y el 73% restante se destina para el procesamiento en otras industrias del país (obtención de pulpas y jugos) y como fruto fresco para el consumo directo. Una apreciable cantidad se pierde en el campo (cerca del 23- %), los otros usos de la guayaba están representados en la producción de conservas y compotas.

(Villamizar 2000).

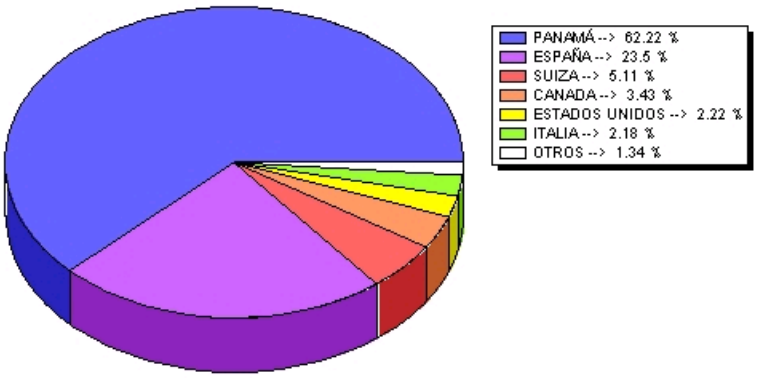
La zona productora de guayaba se caracteriza por un alto dominio de la población rural, con un 50% de niños menores de 15 años, con deficiencia en servicios públicos básicos, infraestructura, salud y educación. En términos generales, existe un porcentaje elevado de personas con necesidades básicas insatisfechas y bajos índices de calidad de vida.

El sistema de producción de guayaba, es silvopastoril, que comprende la explotación de árboles de guayaba en praderas, sometidos al pastoreo de bovinos doble propósito y permite calificarlo como un sistema "limpio", armónico con los conceptos de desarrollo sostenible y producción ecológica, puesto que no se usan productos de síntesis química y la intervención del hombre es principalmente como recolector de la fruta. (Villamizar 2000).

La figura 3 muestra los países donde se realizan las mayores importaciones de guayaba colombiana. La figura 4 muestra a Bogotá D.C y el departamento de Cundinamarca como los principales centros de consumo.

La figura 5 muestra la tendencia de los últimos años sobre las exportaciones de guayaba y como estas han venido decreciendo.

Figura 3. Principales países importadores de la guayaba producida en Colombia.



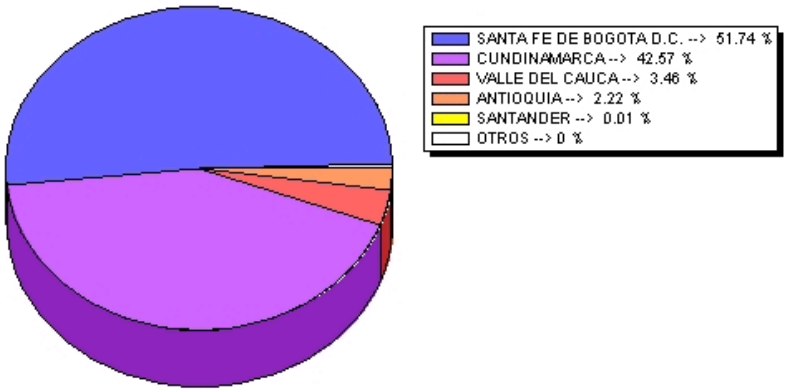


Figura 4. Centros de consumo a nivel nacional 2005.

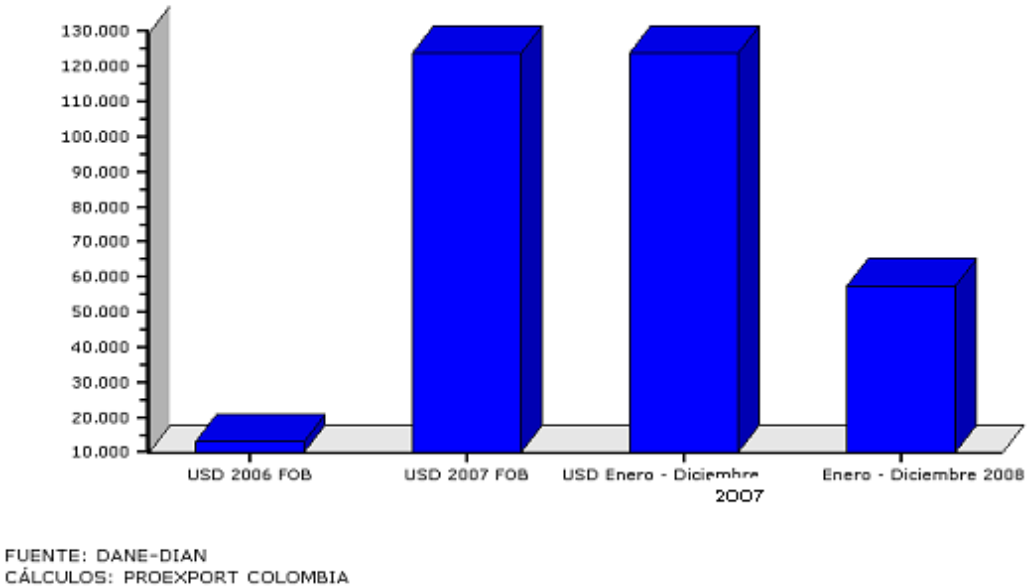


Figura 5. Exportaciones de guayaba en los últimos años (en toneladas).

Fuente de información-Departamento Nacional de Estadística DANE- cálculos PROEXPORT Colombia. http://www.proexport.com.co/

3.3 Propiedades fisicoquímicas de la guayaba

Con base en la tabla de composición de alimentos del ICBF (2008) se tienen los siguientes propiedades fisicoquímicas reportadas para la guayaba en Colombia:

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la guayaba blanca

Componente	Cantidad	Componente	cantidad	Componente	Cantidad
Agua (g)	**86**	Sodio (mg)	**-**	Ácidos grasos poliinsaturados (g)	**-**
Proteínas (g)	**0,9**	Potasio (mg)		Colesterol (mg)	
Grasas (g)	**0,1**	Calcio (mg)	**15**	Ácidos grasos saturados (g)	**-**
Cenizas (g)	**0,7**	Fósforo (mg)	**22**	Ácidos grasos monoinsaturados (g)	**-**
Fibra dietética (g)		Hierro (mg)	**0,7**	Tiamina (mg)	**0,03**
Carbohidratos totales (g)	**12,3**	Zinc (mg)	**-**	Riboflavina (mg)	**0,03**
Carbohidratos disponibles (g)	**-**	Vitamina A Equiv. totales (µg)	**0**	Niacina (mg)	**0,6**
Energía (kcal)	**54**	β- caroteno Equiv. totales (µg)	**-**	Vitamina C (mg)	**240**

Tabla 4 .Propiedades fisicoquímicas de la guayaba roja

Componente	Cantidad	Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Agua (g)	**86**	Sodio (mg)	**-**	Ácidos grasos saturados (g)	**-**
Proteínas (g)	**0,9**	Potasio (mg)	**-**	Ácidos grasos monoinsaturados (g)	**-**
Grasas (g)	**0,1**	Calcio (mg)	**17**	Ácidos grasos poliinsaturados (g)	**-**
Cenizas (g)	**0,7**	Fósforo (mg)	**30**	Colesterol (mg)	**-**
Fibra dietética (g)	**-**	Hierro (mg)	**0,4**	Tiamina (mg)	**0,05**
Carbohidratos totales (g)	**12,3**	Zinc (mg)	**-**	Riboflavina (mg)	**0,03**
Carbohidratos disponibles (g)		Vitamina A Equiv. totales (µg)	**120**	Niacina (mg)	**0,6**
Energía (kcal)	**54**	β -caroteno Equiv. totales (µg)	**-**	Vitamina C (mg)	**200**

Fuente; http://www.rlc.fao.org/bases/alimento/busca.asp

Se observa principalmente un alto contenido de carbohidratos totales y de vitamina C (mayor para la variedad blanca que roja).

3.4 Capacidad Antioxidante

La capacidad antioxidante de una sustancia se define como la capacidad que tiene ésta de: captar químicamente los radicales libres o suprimir la formación de especies reactivas envueltas en la producción de radicales libre que actúan sobre los sustratos en la propagación de la cadena de reacciones oxidativas.

Los antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de 2 formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios (incluyen compuestos fenólicos, tales como la vitamina E, y se destruyen durante el periodo de propagación); o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios. (Estos mecanismos incluyen unión a metales pesados, captación del oxigeno, conversión de

hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de la radiación UV, o desactivación del oxígeno singlete). Normalmente éstos solo poseen actividad en presencia de un segundo componente minoritario, tales como iones metálicos u otros antioxidantes primarios (Halliwell 1989).

También han sido reportados trabajos que atribuyen su acción antioxidante a la inhibición de enzimas prooxidantes como la lipooxigenasa (Decker 1995).

La actividad antioxidante total se define como una estimación fiable y global de la capacidad antioxidante de un alimento, además de ser un parámetro interesante para valorar la calidad dietética del producto en cuestión (Arnao 1996).

Mencionado con anterioridad, los antioxidantes primarios tienen la capacidad de capturar radicales libres para inhibir etapas como la de iniciación y propagación de las reacciones en cadena.

Siguiendo el siguiente Mecanismo:

$L^* + AH \rightarrow LH + A^*$

$LO^* + AH \rightarrow LOH + A^*$

$LOO^* + AH \rightarrow LOOH + A^*$

De esta forma los pasos de iniciación (por reacción con el radical lipídico: L^*) y propagación (por reacción con radicales alcoxi: LO^* o peroxilo: LOO^*) son inhibidos por el antioxidante AH (Apak. R 2007).

Los antioxidantes secundarios previenen la formación de nuevos radicales libres y protegen contra el daño oxidativo. Estos también incluyen enzimas como por ejemplo: la Superoxidodismutasa (SOD), la catalasas (CAT), la glutatión peroxidasas (GHS-Px) entre otras. (La calle 2007).

3.5 Mecanismos de capacidad antioxidante

Los mecanismos de capacidad antioxidante se pueden clasificar en dos:

Por transferencia de átomos de hidrogeno o HAT: este mecanismo mide la capacidad de un antioxidante de bloquear radicales libres (generalmente radicales peroxilo) por donación de un átomo de H ejemplo:

$ROO^* + AH/ArOH \rightarrow ROOH + A^* / ArO^*$

El radical ariloxi (ArO^*) formado por la reacción entre el antioxidante fenólico (ArOH) y el radical peroxilo (ROO^*) es estabilizado por resonancia.

Por transferencia de electrones o ET

Este mecanismo se basa en el siguiente esquema de reacciones:

$$ROO^* + AH/ArOH \rightarrow ROO^- + AH^{+*}/ArOH^{+*}$$

$$AH^{+*}/ArOH^{+*} + H_2O \leftrightarrow A^* / ArO^* + H3O^+$$

$$ROO^- + H_3O^+ \rightarrow ROOH + H_2O$$

Donde $AH^{+*}/ArOH^{+*}$ son cationes radicales.

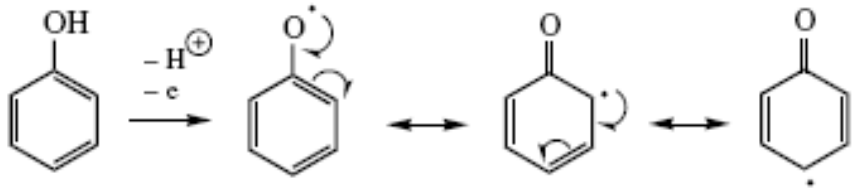
Los ensayos basados en este mecanismo son relativamente más lentos que algunas basadas en el mecanismo HAT y generalmente son dependientes del solvente y el pH.

El radical ariloxi (ArO^*) es posteriormente oxidado a la correspondiente quinona (Ar=O), lo que más estabiliza al radical ariloxi, es la facilidad con que se dé la oxidación del ArOH a Ar=O debido a la reducción del potencial redox.

En muchos ensayos basados en el mecanismo por ET la acción antioxidante es convenientemente simulada por una prueba de potencial redox (Apak. R 2007).

3.6 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas, y en productos derivados como el vino o la cerveza. Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo (Bravo 1998). Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado (Pannala 2001).



(Tomado de Fernández pachón 2006)

Figura 6. Esquema de mecanismo de reacción de donación de hidrogeno de compuestos fenólicos.

La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene en su estructura (Cao 1997; Laugthon 1991).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional (Berra 1995). Así, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidante sintéticos , a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer así como en procesos de envejecimiento por lo que está siendo intensamente estudiado mediante ensayos "*in vivo*" e "*in vitro*"(Fernández pachón 2006)

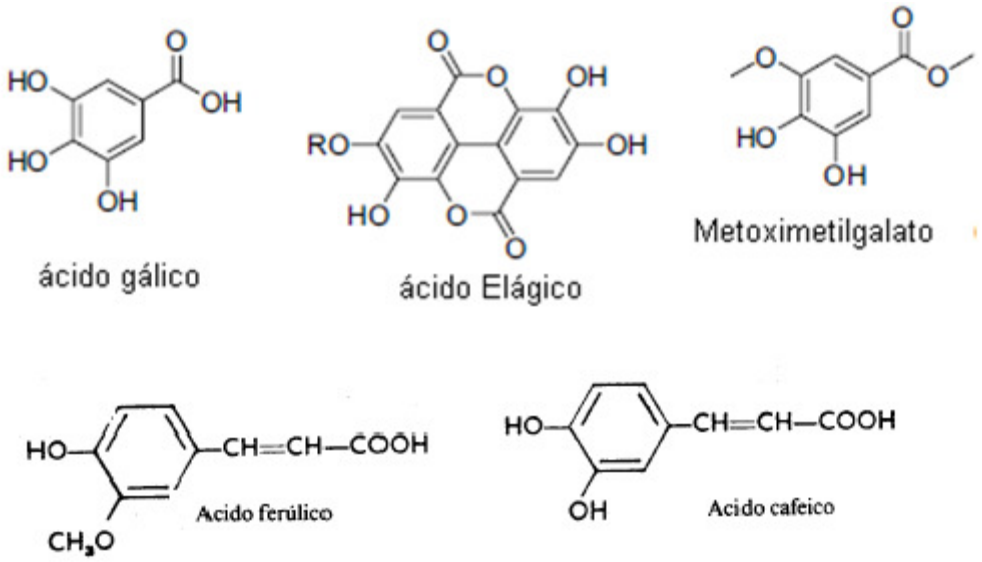
3.7 Principales tipos de fenoles vegetales

Los ácidos fenólicos: Este grupo de compuestos se caracteriza por poseer un anillo aromático, el grupo hidroxílico comunes a los compuestos fenólicos y una función carboxílica. Los ácidos fenólicos que tienen interés terapéutico son derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico (caféico, ferúlico, *p*-cumárico).

Los derivados del acido benzoico son muy abundantes en la naturaleza tanto libres, como ácidos o aldehídos (anisaldehído), y combinados en formas heterosídicas (resultado de condensación de uno o varias azucares simples con una estructura no glucídica), correspondiendo a este grupo la unidad básica estructural de los taninos gálicos o hidrolizables (el ácido gálico).

Los derivados del acido cinámico también son abundantes en la naturaleza pero en este caso se encuentran casi siempre esterificados con azúcares o alcoholes alifáticos

como por ejemplo el ácido clorogénico y otros metabolitos secundarios como los flavonoides.



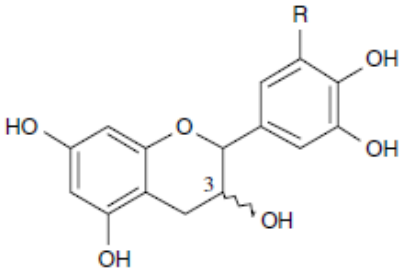
N.
Tomada de Nuengchamnong, 2009

Figura 7. Ejemplos de estructuras de ácidos fenólicos

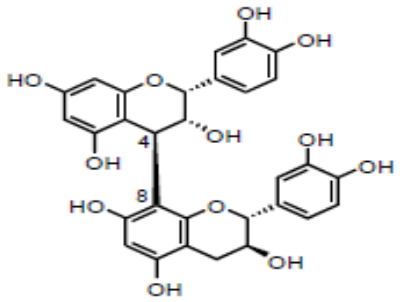
Taninos condensados: Se conocen también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (llamados flobáfenos). Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal.

Químicamente se forman por condensación de catequinas o catecoles (flavanoles) con uniones directas C-C entre las moléculas, generalmente en 4→8 o en 4→6 y no contienen azúcares en su estructura. Biogenéticamente proceden del metabolismo de los flavonoides y se forman a partir de una flavanona por hidroxilación en el C-3.

Las propiedades más interesantes de este tipo de taninos se deben a su capacidad de combinarse con diversas sustancias formando complejos. El empleo más antiguo conocido de estas sustancias, como ya se ha comentado, es en la industria de los curtidos. Aunque en la actualidad se utilizan otros compuestos para curtir, todavía en algunos sitios y para curtidos especiales se sigue recurriendo a su uso.

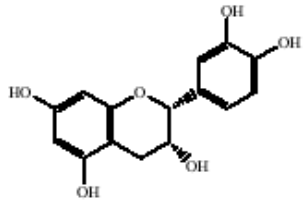


flavan-3-ol
catequina

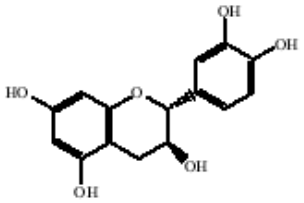


Procianidina B-1

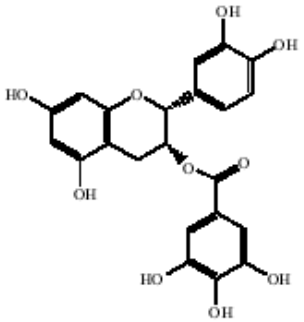
(Tomado de Isaza 2007)



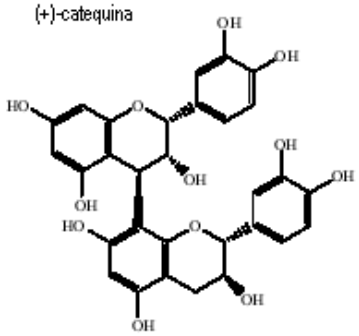
(-)-Epicatequina



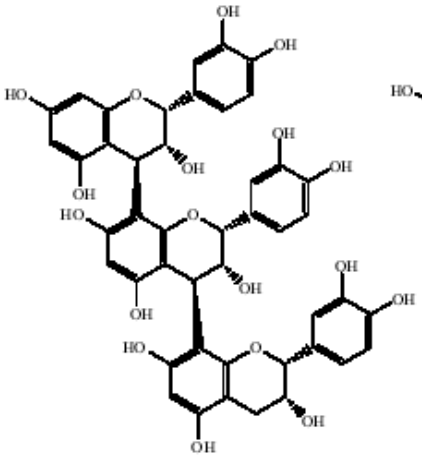
(+)-catequina



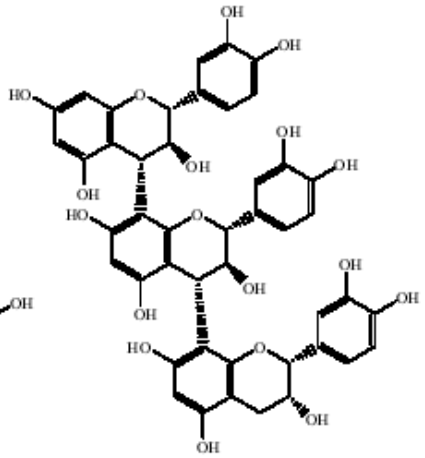
(-).Epicatequina galato



Proantocianidina dimero B1



Proantocianidina trimero C1

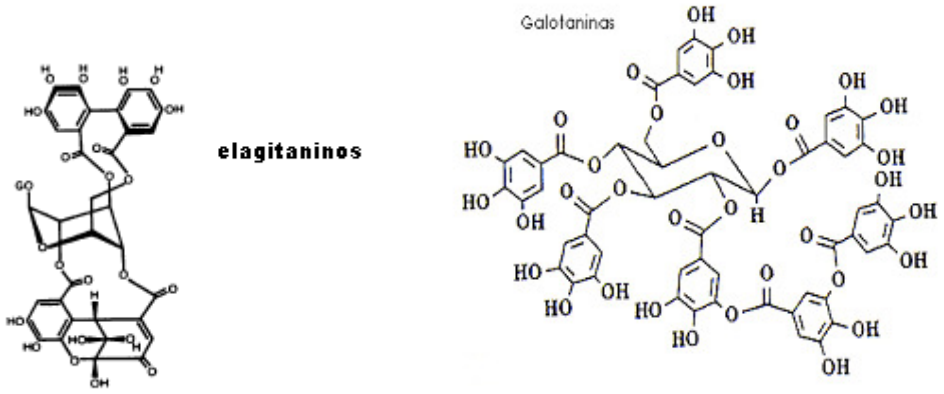


proantocianidina trimero C2

Tomado de J.K. Prasain 2009

Figura 8. Ejemplos de estructuras del principal precursor de los taninos condensados (flavan3-ol) y de algunos taninos condensados.

Taninos hidrolizables: son ésteres de ácidos fenólicos (principalmente gálico o elágico) con un azúcar (generalmente glucosa) o un polialcohol. Estos taninos como su denominación indica se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática.

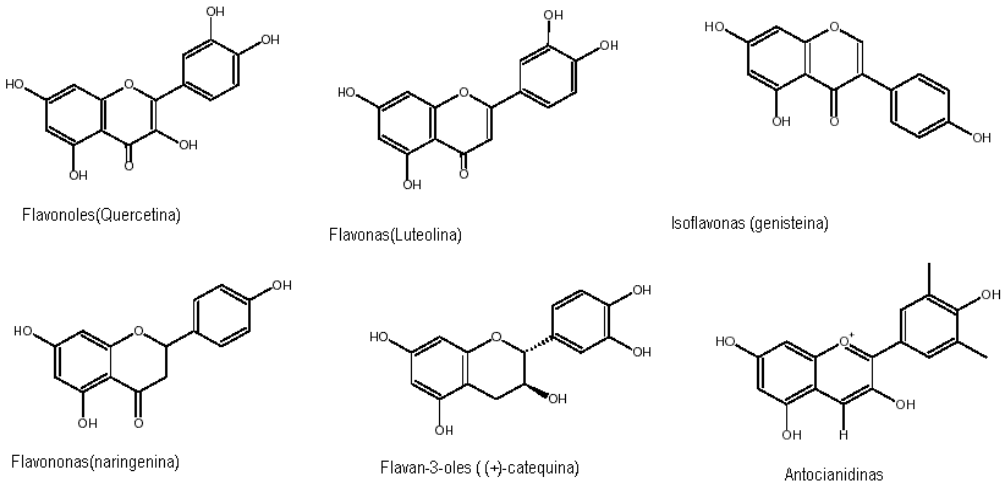


Tomado de Mueller Harvey 2001

Figura 9. Ejemplo de taninos hidrolizables: galotaninos y elagitaninos

Flavonoides

Son metabolitos secundarios polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y encontrado en altos niveles en varias frutas, vegetales y bebidas. La familia de los flavonoides, se divide en 6 subgrupos principalmente: flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas.

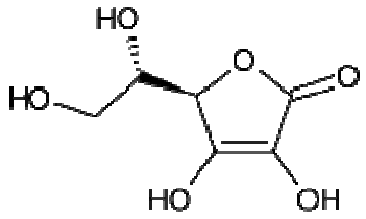


Tomado de Crozier ,2000

Figura 10. Principales estructuras de tipos de flavonoides

3.8 Otros compuestos importantes con actividad antioxidante presentes en los vegetales

Vitamina C



Tomado de http://www.acidoascorbico.com/vitamina_c marzo 25/2009

Figura 11. Estructura del acido ascórbico

La vitamina C es una vitamina hidrosoluble sensible al calor. Se trata de un ácido L-ascórbico y sus sales, los ascorbatos (los más comunes, que son ascorbatos de sodio y de calcio).

Es un cofactor enzimático implicado en diversas reacciones fisiológicas (hidroxilación). Es necesaria para la síntesis del colágeno y de los glóbulos rojos, y contribuye al buen funcionamiento del sistema inmunitario. También juega un papel en el metabolismo del hierro, en la transformación de dopamina en noradrenalina y en la biosíntesis de carnitina. Es muy frágil en solución, se destruye al contacto con el aire, por la luz o el calor.

Se trata de un antioxidante, capaz de contrarrestar la acción nociva de oxidantes como los radicales libres. Con este fin, también se emplea la forma R- del ácido ascórbico, la cual, al contrario que la forma L-, no presenta actividad vitamínica.

El ácido L-ascórbico

El ácido ascórbico L es una molécula soluble en agua con propiedades antioxidantes. Su aspecto es de polvo o cristales de color blanco-amarillento. Su estructura presenta una lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario. El acido ascórbico forma dos enlaces de puentes de hidrógeno intramoleculares (líneas discontinuas en la figura 12) que contribuyen de manera decisiva a la estabilidad, y con eso a las cualidades químicas de la estructura endiol.

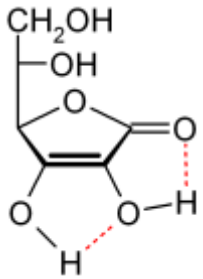
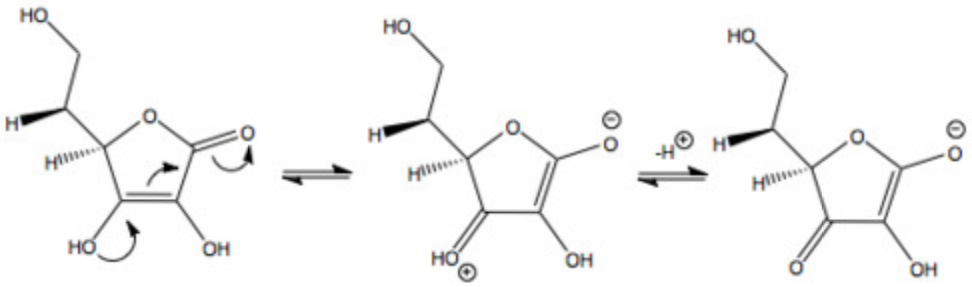


Figura tomado de http://www.acidoascorbico.com/vitamina_c marzo 25/2009

Figura 12. Formación de puentes de hidrogeno por el acido ascórbico

El ácido ascórbico se comporta como un ácido carboxílico vinílogo, en donde el doble enlace ("vinilo") transmite pares de electrones entre el hidroxilo y el carbonilo. Hay dos estructuras de resonancia para la forma desprotonada, que se diferencia en la posición del doble enlace. Otro modo de ver el ácido ascórbico es considerarlo como un enol. La forma desprotonada es un enolato, que por lo general es fuertemente básico. Sin embargo, el doble enlace adyacente estabiliza la forma desprotonada.. http://www.acidoascorbico.com/vitamina_C marzo 25/2009



Tomado de http://www.acidoascorbico.com/vitamina_c marzo 25/2009

Figura 13. Movimiento de los pares de electrones en la desprotonación.

Carotenoides

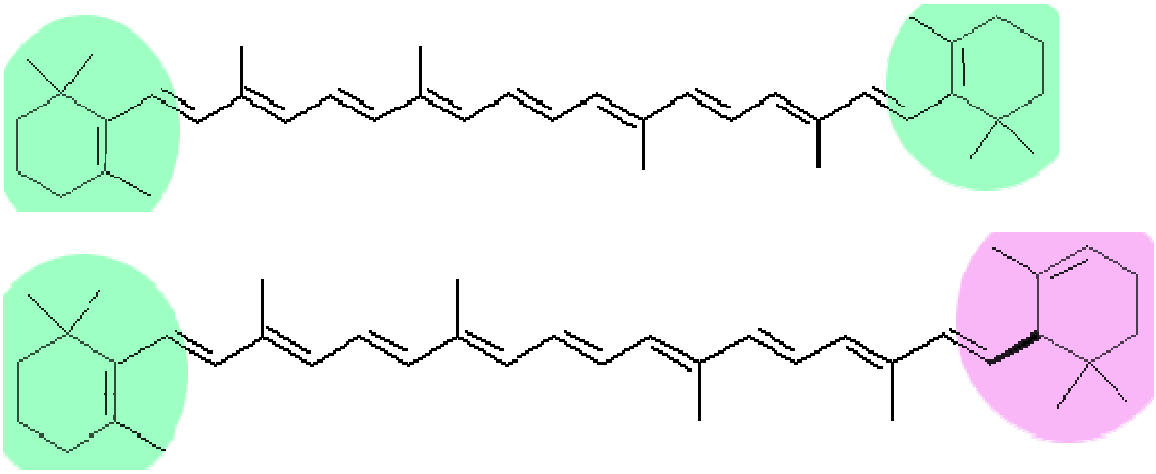
Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranilpirofosfato. En su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el ß-caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno).

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han reportado en animales (por ejemplo los colores rojizos de las plumas del flamingo son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar, y otros. En los animales superiores el ß-caroteno es un requerimiento dietario esencial pues es precursor de la vitamina A.

Se conocen más de 600 carotenoides, y se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glicósidos. Sin embargo los glicósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de estos últimos es la crocina.

Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón, etc.) y en menor proporción en raíces (por ejemplo la zanahoria).

La Figura 14 muestra algunos ejemplos de los carotenoides más distribuidos en la naturaleza.



Tomado de www.ffyb.uba.ar/qca_org/teo_2006/**Carotenos**.ppt

Figura 14. Estructuras del β-Caroteno y α carotenos respectivamente.

3.9 Técnicas de medición del contenido de fenoles y de la capacidad antioxidante

3.9.1 Determinación del contenido de fenoles libres con el reactivo de Folin Ciocalteu(Shahidi 1995)

El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla por su estructura formada por un complejo de fosfotungteno molibdato (posiblemente $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$).

Los compuestos fenólicos tienden a oxidarse para reducir al Molibdeno presente en el complejo lo que produce la formación de una solución de coloracion azul.

En medio básico (ajustado con Na_2CO_3 pH =10), la disociación del protón fenólico permite al anión fenolato reducir al reactivo de folin Ciocalteu por un mecanismo de transferencia de electrones.

La intensidad del color azul se mide espectrofotométricamente a 765 nm y de esta forma se está midiendo la capacidad total reductora de una muestra

Se expresa en mg equivalentes de ácido gálico/100 g de fruta. Las principales interferencias para esta determinación son algunos azucares como la glucosa, fructosa y sacarosa, aminas aromáticas, el acido ascórbico. Además, reacciona con muchas sustancias inorgánicas como por ejemplo: sulfato de manganeso, nitrito de potasio, cianuro de sodio y sulfato de hierro (Michael 2002).

3.9.2 Determinación de capacidad antioxidante con ensayo por bloqueo de cationes radicales $ABTS^{\bullet+}$ (Re et al 1999)

El compuesto cromógeno ABTS 2,2'-azino-bis (acido 3-etillbenzotiazolina-6-sulfónico) mostrado en la figura 15 presenta un color azul verdoso, es soluble en agua y disolventes orgánicos y químicamente estables.

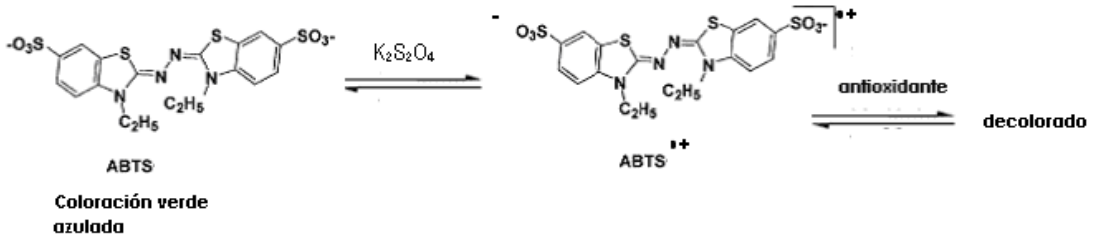
Al reaccionar el ABTS con persulfato de potasio se genera el radical cationico $ABTS^{\bullet+}$ el cual presenta nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815nm; en presencia de un antioxidante se inhibe la formación del radical que se traduce en una pérdida de la coloración verde azulada y se determina la reducción de la absorbancia a 734 nm.

Ventajas del método: el método estable, reproducible y puede usarse en medios lipofilicos e hidrofilicos.

Desventaja del método: El radical $ABTS^{\bullet+}$ no se encuentra en el organismo, por lo que no representa una fuente fisiológica (Michael 2002). Además, con algunas reacciones requieren mayor tiempo para alcanzar su estado estacionario.

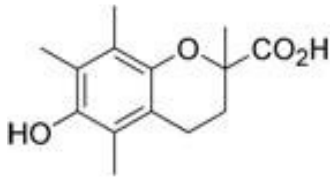
El resultado se expresa en µmoles equivalente de trolox por gramo de muestra.

El trolox (acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxilico) se utiliza como un antioxidante estándar y es un análogo de la vitamina E (ver estructura en la figura 16) .



Tomado Huang 2005

Figura 15. Esquema de formación de radical $ABTS^{\bullet+}$ e interacción de este con antioxidante.



Tomado de upload.wikimedia.org

Figura 16. Estructura del Trolox

Una de las ventajas del trolox es que puede ser utilizado en sistemas hidrofilicos y lipofílicos, además de su simplicidad y rapidez en las reacciones (Re 1999).

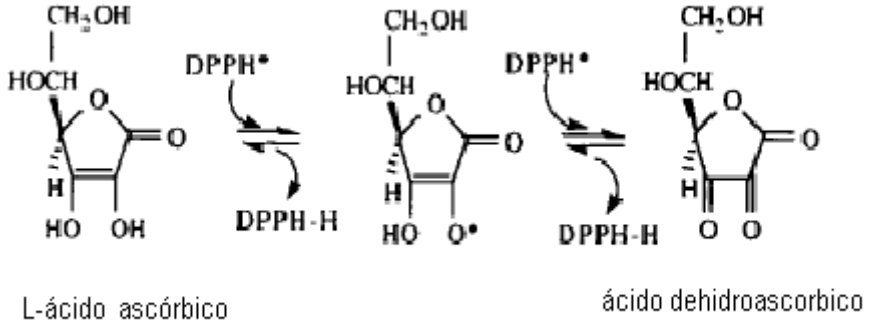
3.9.3 Determinación de capacidad antioxidante con ensayo por bloqueo de radicales DPPH (Brand Williams 1995).

Este método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-Difenyl-l-picrilhidrazil) de color violeta que se torna amarillo de acuerdo a la presencia de los antioxidantes.

La decoloración se determina a 517 nm y se expresa en µMoles trolox /g de muestra.

Ventajas: es un ensayo sencillo y no se necesita generarse el radical, ya que el DPPH* se comercializa como tal.

Desventajas: solo puede disolverse en medio orgánico. Además, presenta como importante interferencias a los carotenoides que presentan un espectro similar (Michael 2002).



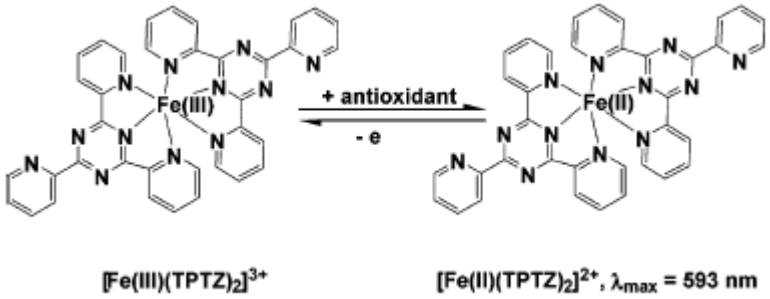
Tomado Brand Williams 1995

Figura 17. Reacción de antioxidante (ácido ascórbico) con radical DPPH y

3.9.4 Determinación de capacidad antioxidante con ensayo de capacidad reductora

FRAP (Ferric reducing activity /antioxidant power -Benzie & Strain 1996).

Mide la capacidad que tiene una sustancia de reducir un complejo férrico, con la molécula tripiridil s-triazina (TPTZ), a su forma ferrosa (a pH bajo). Se utiliza como patrón antioxidante al sulfato ferroso en µMoles/g de muestra o al Trolox, Se mide la coloración producto de la formación del complejo ferroso a una longitud de onda de 593 nm.



Tomado de Huang 2005

Figura 18. Reducción del por efecto del antioxidante TPTZ Fe^{3+} a TPTZ Fe^{2+}.

Ventajas del método: el ensayo FRAP es sencillo y fácilmente automatizable. Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 10 y 30 minutos.

Desventajas del método; en el caso de algunos polifenoles se han descrito reacciones más lentas, llegando incluso a requerir mas de 30 minutos para completar la reducción del complejo. La reacción no es específica, y por tanto, cualquier sustancia con un potencial redox menor a 0.70 V originará la reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ por ejemplo, el acido ascórbico presenta un potencial redox de 0.28 V (Michael 2002).

Los cuatro ensayos anteriores utilizan como mecanismo de capacidad antioxidante la transferencia de electrones.

3.9.5 Determinación de capacidad antioxidante con ensayo por decoloración del β caroteno (Velioglu et al. 1998).

Este método se basa en la oxidación del ácido linoléico con el aumento de la temperatura, generándose radicales peroxil debido a la abstracción de un átomo de hidrogeno del grupo metilen dialilico del acido (Kumaran& Karunakaran, 2006).

El radical libre oxida el altamente insaturado β-caroteno quien se oxidará y fraccionará con la correspondiente perdida de absorbancia a 470 nm. (figura 19) La presencia de antioxidantes en el extracto minimiza la oxidación del β-caroteno por los hidroperóxidos. Los hidroperóxidos formados en el sistema serán degradados por los antioxidantes de los extractos.

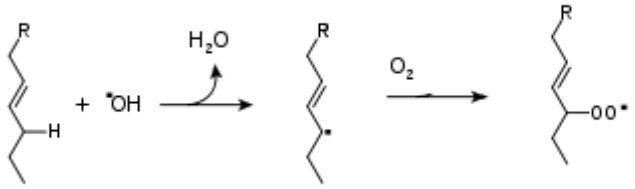
Algunos estudios muestran que no hay correlación entre el contenido de fenoles totales y este ensayo. (Amarowicz 1993; Mariod 2006).

Este ensayo está indicado para compuestos liposolubles. El patrón utilizado suele ser trolox o también ácido gálico.

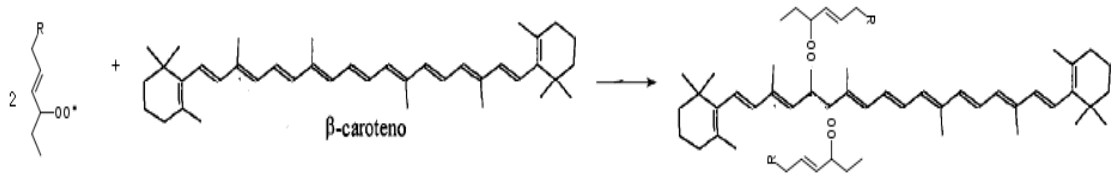
Ventajas: el uso de ácido linoléico como sustrato acerca el ensayo a condiciones biológicas reales.

Desventajas: existen numerosos compuestos orgánicos como el catecol y la hidroquinona, que reaccionan con los peróxidos formando compuestos quinónicos que absorbe a 470 nm. A continuación se muestra un esquema del mecanismo de reacción entre el acido linoleico y el β caroteno.

Formación del radical peroxil.



Interacción del radical peroxil con el β caroteno



Fragmentación de b caroteno oxidado.

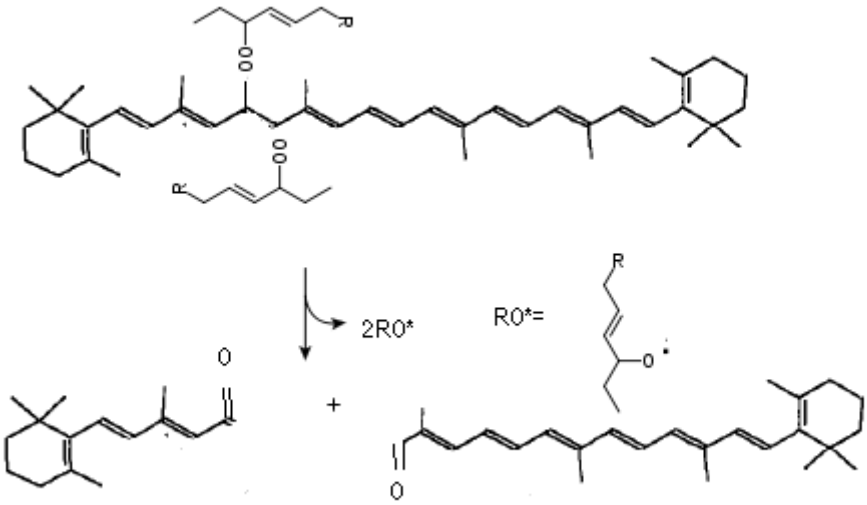


Figura 19. Mecanismo de reacción entre el acido linoleico y el β caroteno

4. METODOLOGIA

En la figura 20 se presenta un diagrama general de la metodología aplicada para el estudio del contenido de fenoles, su actividad antioxidante y vitamina C en las tres variedades de guayaba estudiadas y sus diferentes estados de madurez.

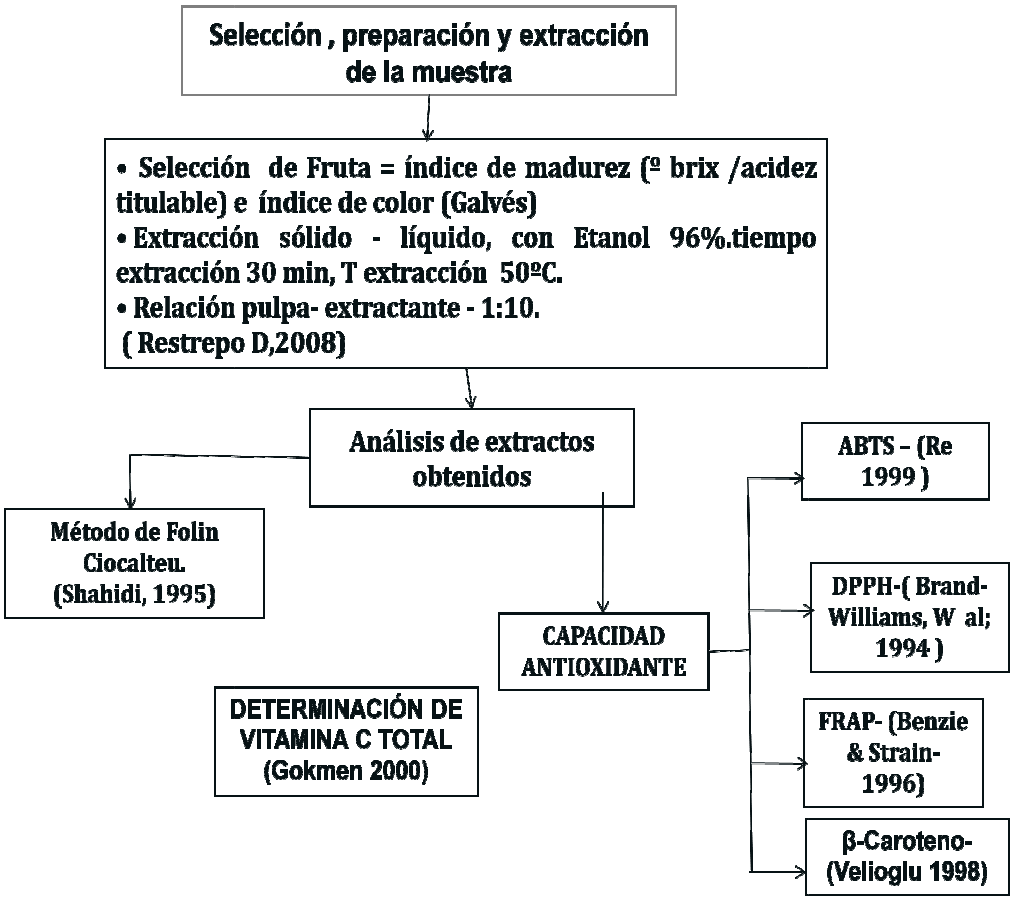


Figura 20. Metodología utilizada para el análisis de contenido de fenoles, actividad antioxidante y vitamina C para la guayaba en sus tres variedades y diferentes estados de madurez.

4.1 Muestras de guayaba

En este estudio se trabajaron 3 variedades de guayaba: regional roja, regional blanca y guavatá victoria en sus diferentes estados de madurez (verde, pintona, madura, sobre madura), suministradas por la cooperativa éxito ubicada en el municipio de Vélez departamento de Santander.

De las variedades estudiadas, la regional roja tiene como principal característica la pulpa de color rosado oscuro, la regional blanca presenta la pulpa de color crema y la guavatá victoria presenta una pulpa de color crema un poco más claro que la regional blanca. El color de la cascara varia de verde a amarillo según el estado de madurez.

El estado inmaduro presenta coloracion verde, el estado pintón toma una coloracion verde con ligeras visos de color amarillo. El estado maduro se presenta con una coloracion amarilla y el estado sobremaduro es de color amarillo pero presenta una notable disminución de firmeza lo cual lo hace más susceptible a daños por manipulación mecánica. Las variedades regional roja y regional blanca son de forma esférica y la guavatá victoria es de forma aperada e (ver anexo I, índice de color de Gélvez).

De cada lote de muestras de las variedades estudiadas en sus diferentes estados de madurez se seleccionaron tres guayabas al azar en buen estado de sanidad , se lavaron con abundante agua y se obtuvieron un puré por maceración de la fruta completa (pulpa, casco, cascara y semillas).

Se clasificaron las fruta de acuerdo a su estado de madurez, mediante el índice de madurez que se conoce como la relación entre los grados brix (º brix) sobre la acidez tituláble (expresada en % de acido cítrico) y se complementó con al índice de color reportado por Gálvez (1998).

La acidez tituláble se evalúo de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana, NTC 4623 y el contenido de sólidos solubles se midió con un refractómetro Atago 8682. El resultado se expresa como grados Brix (º brix).

4.2 Extracción de fenoles

Para la extracción de fenoles se realizaron extracciónes sólido- líquido con etanol al 96% y con base en las condiciones previamente optimizadas por Restrepo (2008) con algunas modificaciones. Se utilizaron proporciónes en masa de fruta- extractante - 1:10 con un tiempo de 30 minutos y a una temperatura de 50°C

Se realizó una segunda extracción bajo las mismas condiciones, y el extracto total obtenido se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm(3500 gravedades) a 4ºC.

El sobrenadante obtenido de cada lote de muestra se utilizó para las determinaciones del contenido de fenoles libres y las diferentes técnicas de medidas de capacidad antioxidante.

4.3 Análisis de extractos obtenidos

Todas las siguientes determinaciones fueron realizadas por triplicado.

4.3.1 Determinación del contenido de fenoles libres (Shahidi 1995)

El contenido de fenoles libres se cuantificó por el método de Folin Ciocalteu con algunas modificaciones. Se preparó una curva de calibración utilizando ácido gálico como patrón de cuantificación en un rango de concentración de 0 - 6 mg/L.

Se tomaron 100 µL de una mezcla formada por solución stock 1,0 mM de acido gálico y agua destilada teniendo en cuenta que en el volumen final de la mezcla (1.6 mL), se obtengan concentraciones dentro del rango deseado (0 - 6 mg/L). Posteriormente Se adicionaron 750 µL de reactivo de Folin Ciocalteu 10% v/v y 750 µL de de Na_2CO_3 al 6% m/m.

Transcurridas dos horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad se hicieron lecturas directas de absorbancia a 765 nm de la mezcla anterior, con un espectrofotómetro Genesys 10 UV (Madison WI 53711, USA).

Para el extracto etanólico obtenido de la guayabas se realizaron diluciones al 40% v/v en agua y se tomaron los mismos volúmenes y condiciones descritas con anterioridad.

La muestra control o blanco se utilizó bajo las mismas condiciones pero con 100 µL de agua destilada. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico /100g fruta entera en base húmeda.

Figura 21. Cambio de coloración del reactivo folin Ciocalteu en presencia del antioxidante.

4.3.2 Medidas de la capacidad antioxidante

4.3.2.1 Determinación del Bloqueo de radicales $ABTS^{\bullet+}$ (Re, 1999)

Se preparó una mezcla 1:1 v/v compuesta por ABTS 7,0 mM y persulfato de potasio 0,45 mM, ésta se deja reposar en oscuridad durante mínimo 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se toma un pequeño volumen de la solución anterior (**$ABTS^{\bullet+}$**) y se diluyó con etanol hasta alcanzar una absorbancia inicial de 0,7 ± 0,20 a 734 nm.

Se preparó una curva de calibración utilizando trolox como patrón de cuantificación en un rango de concentración de de 0 a 20 µM. Se tomaron 950 µL del reactivo catión radical $ABTS^{\bullet+}$ y se adicionaron 50 µl de soluciones patrón de Trolox teniendo en cuenta que con el volumen final de la mezcla (1.0 mL), se obtengan concentraciones dentro del rango deseado. La mezcla se dejó incubando 30 minutos a una temperatura de 30°C.

Para los extractos etanólicos obtenido a partir de las guayabas se realizaron diluciones al 40% v/v en etanol y se toman las mismos volúmenes y condiciones descritas con anterioridad, pero con tiempo de incubación de 60 minutos

Se hicieron lecturas directas de absorbancia a las mezclas a 734 nm con un espectrofotómetro Genesys 10 UV (Madison WI 53711, USA).

La muestra control se utilizó bajo las mismas condiciones pero con 50 µL de etanol. Los resultados se expresaron como µmol equivalentes de Trolox/g fracción comestible en base húmeda.

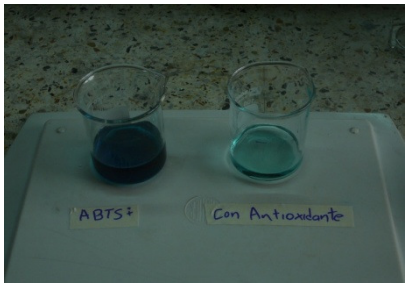


Figura 22. Cambio de coloración de $ABTS^{\bullet+}$ con presencia de antioxidante.

% inhibición de decoloración por parte del antioxidante se expresa como
A = [(A control – A muestra)/(A control] * 100 donde A= absorbancia

4.3.2.2 Determinación del Bloqueo de radicales DPPH* (Brand Williams et al;1994)

Se preparó una solución stock de DPPH 1mM en etanol. Posteriormente, se tomó un pequeño volumen de solución anterior y se diluyó con etanol hasta alcanzar una absorbancia de 1,00 ± 0,20 a 517 nm. Se preparó una curva de calibración utilizando Trolox como patrón de cuantificación en un rango de concentración de de 0 a 25 µM. Se tomaron 950 µL del reactivo radical DPPH* y se adicionaron 50 µl de soluciones patrón trolox teniendo en cuenta que con el volumen final de la mezcla (1.0 mL) ,se obtenga concentraciones dentro del rango deseado. La mezcla se dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente.

Para los extractos etanólicos obtenido a partir de las guayabas se realizaron diluciones al 40% v/v en etanol pero con tiempos de incubación de 90 minutos.

Se hicieron lecturas directas de absorbancia a las mezclas a 517 nm con un espectrofotómetro Genesys 10 UV (Madison WI 53711, USA).

La muestra control se utilizó bajo las mismas condiciones pero con 50 µL de etanol.

Los resultados se expresaron como µmol equivalentes de Trolox/g fracción comestible en base húmeda

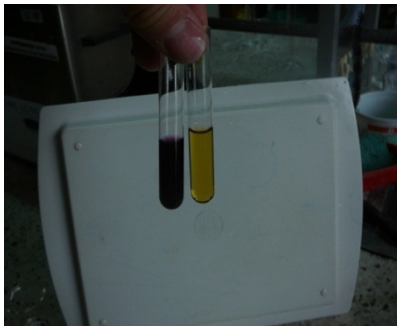


Figura 23. Cambio de coloración del reactivo en presencia del antioxidante.

% inhibición decoloración por parte del antioxidante se expresa como:
A = [(A control – A muestra)/(A control] X100 donde A= absorbancia

4.3.2.3 Determinación de la capacidad reductora FRAP (Benzie y Strin, 1996).

Para el ensayo FRAP se preparó un buffer acetato de sodio 300 mM pH 3.6, TPTZ en concentración 10 mM disuelto en HCL 40 mM y $FeCl_3 \cdot 6H2O$ 20mM. El complejo férrico fue preparado mezclando las siguientes cantidades: 25 ml de buffer de acetato de sodio, 2,5 ml de solución de TPTZ y 2,5 ml de solución $FeCl_3 \cdot 6H2O$ en un volumen final de 100 mL.

Se preparó una curva de calibración utilizando Trolox como patrón de cuantificación en un rango de concentración de de 0 a 35 µM. Se toman 950 µL del reactivo de FRAP y se adicionaron 50 µl de soluciones patrón trolox teniendo en cuenta que con el volumen final de la mezcla (1.0 mL), se obtenga concentraciones dentro del rango deseado. La mezcla se dejó incubando 10 minutos a una temperatura de 37 °C.

Para los extractos etanólicos obtenidos a partir de las guayabas se realizaron diluciones al 40% v/v en etanol pero con un tiempo de incubación de 30 minutos. Los resultados se expresaron en µmol Trolox/g de fruta en base húmeda.

Se hicieron lecturas directas de absorbancia a las mezclas a 593 nm con un espectrofotómetro Genesys 10 UV (Madison WI 53711, USA).

La muestra blanco se utilizó bajo las mismas condiciones pero con 50 µL de agua.

Los resultados se expresan como µmol equivalentes de Trolox/g fracción comestible en base húmeda

% reducción por parte del antioxidante se expresa como:
A = [(A muestra - A control)/(A control] X100 donde A= absorbancia

4.3.2.4 Determinación de la decoloración del β caroteno (Velioglu et al. 1998).

Para este método se prepararon 2 emulsiones: la emulsión blanco o referencia que está formado por 0,20 mL de $CHCl_3$, 0,6 mL tween 20, 0,04 mL de acido linoleico en un volumen final de 100 mL con agua desionizada.

La otra emulsión que se llamó solución coloreada se preparó añadiendo los mismos componentes pero se adicionaron 0,20 mL de β caroteno (1mg/mL en cloroformo) en vez de cloroformo. Ambas se mantuvieron 5 minutos en ultrasonido

Se prepararon 3 soluciones a partir de las emulsiones previamente descritas. La solución blanco se preparó mezclando 3,5 mL de emulsión blanco con 0,5 mL de mezcla metanol, la solución control se preparó mezclando 3,5 mL de emulsión coloreada con 0,5 mL de metanol y La solución con muestra preparó mezclando 3,5 mL de emulsión coloreada con 0,5 mL de muestra antioxidante o patrón de referencia acido gálico o trolox en este trabajo fue de concentración 65,5 µM.

Las anteriores soluciones se incuban a 50°C durante dos horas.

% de inhibición decoloración del β caroteno se calcula como:

$= A_{control} - A_{muestra} / A_{control} * 100$

Donde

$A_{control}$ = absorbancia solución control

$A_{muestra}$ = absorbancia solución muestra con antioxidante o estándar utilizado

El resultado se expresa como % de inhibición relativo al patrón utilizado en µmol equivalentes acido gálico /g de fruta en base húmeda.

4.4 Determinación de vitamina C total (Gokmen 2000)

Para la determinación de vitamina C total (ácido ascórbico y dehidroascórbico) en las tres variedades de guayabas en los cuatro estados de maduración se utilizó cromatografía liquida de alta resolución HPLC según metodología de Gokmen (2000),

El ácido ascórbico es separado en una columna C18 utilizando un *buffer* de fosfatos como fase móvil a pH 2.4 y con un detector UV a 254 nm. El ácido ascórbico total se determina mediante la reducción del acido deshidroascórbico presente en la muestra con ditiotreitol (DTT).

Extracción de la vitamina C total de la fruta fresca

Para la extracción de la vitamina C de las frutas de guayaba se pesaron 2,0 ± 0,10 g del puré que fueron extraídos con 8,0 mL de agua desionizada mediante agitación magnética durante 5 minutos. Los extractos se centrifugaron a 5000 r.p.m.(3500 gravedades) a 4 °C por 15 minutos. El sobrenadante es filtrado a través de un filtro Millipore de 0,45 µm, se tomó 1,0 mL del extracto y se llevó a un volumen final de 10,0 mL de fase móvil.

Curva de calibración

Para la cuantificación del acido ascórbico, se preparó una curva de calibración utilizando soluciones recién preparadas de acido ascórbico (reactivo analítico) en un rango de concentración de 10 a 50 mg acido ascórbico/L.

Se transfirió 1,0 mL de cada patrón a frascos ámbar (para evitar la oxidación por la luz) y se le adicionó 1,0 mg de ditiotreitol utilizado como agente reductor del acido deshidrascórbico. La mezcla de dejó reaccionar durante 2 h en la oscuridad, se filtró a través de microporo de 0,45 mm y se inyectó al equipo de análisis.

La curva de calibración obtenida se utiliza para la cuantificación de la vitamina C total.

Para las muestras de guayaba se transfirió 1,0 mL del extracto obtenido de la fruta fresca y se colocó en un frasco ámbar (para evitar la oxidación por la luz), se le adicionó 1,0 mg de ditiotreitol utilizado como agente reductor del acido deshidrascórbico. La mezcla de dejó reaccionar durante 2 h en la oscuridad, se filtró a través de microporo de 0,45 mm y se inyectó al equipo de análisis.

El valor de la concentración en la muestra se estimó interpolando el área a partir de la regresión de la curva de calibración. La concentración del ácido ascórbico total se calculó utilizando la siguiente fórmula:

mg/100g = Cn x 10/masa muestra

Donde C_n es la concentración de la muestra obtenida a partir de la interpolación el área a partir de la regresión de la curva de calibración

Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para las muestras y se reportó el contenido de vitamina C total

Condiciones de trabajo

La fase móvil utilizada fue una solución de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0,2 M ajustado a pH 2,4 con H_3PO_4 filtrada por filtro de 0,45mm y desgasificada en ultrasonido por 10 minutos. El flujo utilizado fue de 0,5 mL/min y la columna utilizada fue RP-18 Licrhosorb (150 mm x 4.0 mm×5 µm) manejada a temperatura ambiente. El detector UV-Vis utilizó a una longitud de onda de 254 nm para el ácido ascórbico..

El contenido de ácido ascórbico total (AAT) se expresa como mg ácido Ascórbico /100g de fruta.

4.5 Análisis estadísticos de datos

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus Versión 5.1 El análisis estadístico del contenido de fenoles libres, y capacidad antioxidante medido por los ensayos $ABTS^{\bullet+}$ y DPPH* , capacidad reductora FRAP y decoloración del β caroteno, así como el contenido de vitamina C total se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas entre ellas, fueron separadas a través del método de Fisher (LSD); se consideró p-valor < 0,05 como estadísticamente significativo (Ver anexo II).

4.6 Extracción y análisis preliminar de fenoles de la variedad con mayor contenido de fenoles y capacidad antioxidante

En la figura 24 se presenta un diagrama general de la metodología aplicada para la extracción y análisis preliminar de fenoles obtenidos de la guayaba.

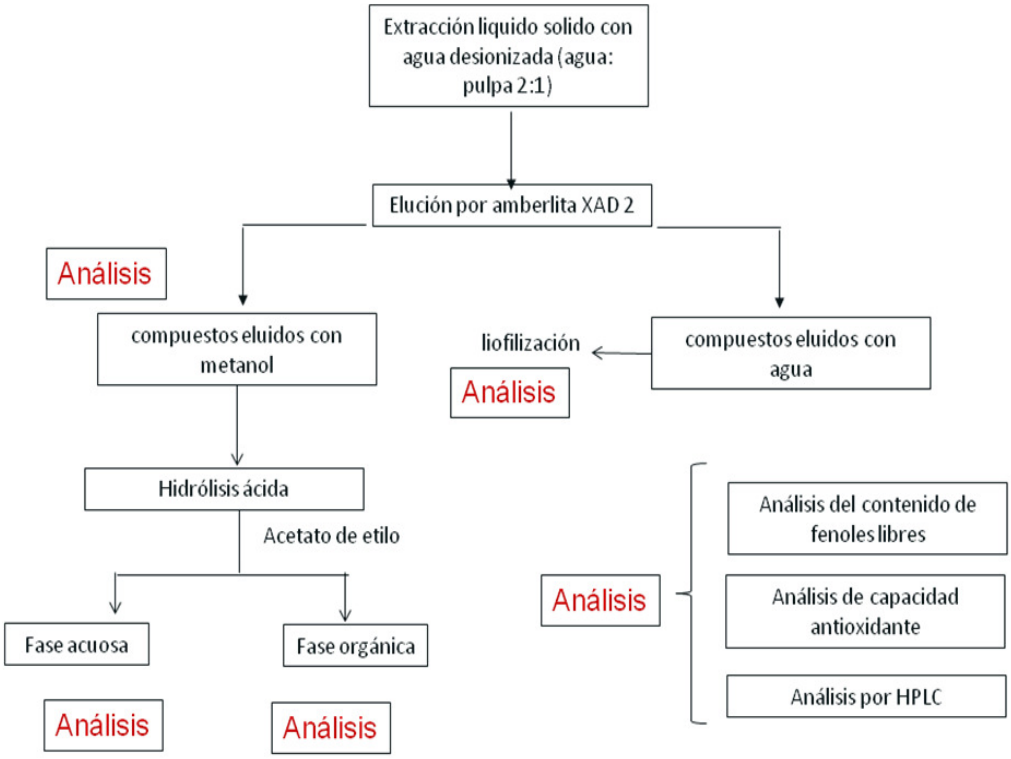


Figura 24. Metodología aplicada para la extracción y análisis preliminar de fenoles de la variedad con mayor contenido de fenoles y capacidad antioxidante.

Se escogió la variedad y estado de madurez que presentó mayor contenido de fenoles libres, mayores capacidades antioxidantes y mayor contenido de vitamina C. además, se verificaron la correlaciones existentes entre estas variables como criterio para continuar con el análisis preliminar de fenoles.

4.6.1 Extracción de fenoles

Se realizó una extracción de los fenoles preparando una columna con Amberlita® XAD 2 Previamente lavada con abundante agua desionizada y luego con solventes orgánicos con un gradiente de polaridad para eliminar la presencia de iones cloruros y otras impurezas. La guayaba entera se maceró y se mezcló con agua en proporción 2:1 m/m (agua: fruta) por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm (3500 gravedades) otros 10 minutos a una temperatura de 4ºC recolectando el sobrenadante.

El paso anterior se hizo por duplicado.

El sobrenadante se eluyó a través de la columna en proporción m/m amberlita y sobrenadante 1:1 y posteriormente se lavó con agua desionizada hasta que el eluido se mostró completamente incoloro, en este paso son eluidos los compuestos altamente polares como ácidos orgánicos y azucares.

A continuación se eluyeron los fenoles con metanol y el extracto obtenido se concentró a sequedad en un rotavapor a 50ºC a presión reducida (Simunic2005), y se redisolvió con 8,0 mL de metanol.

El extracto metanólico obtenido se monitoreó por espectroscopia UV a una longitud de onda de 280 nm, y se consideró el fin de la extracción cuando la absorbancia correspondiera al 10% de la absorbancia inicial.

4.6.2 Pruebas colorimétricas de identificación de fenoles

A los extractos (metanólico y acuoso) obtenidos en el numeral 4.6.1 se aplicaron para su reconocimiento preliminar diferentes ensayos de coloración. A continuación se describen algunos ensayos hechos con base en lo reportado por Mueller Harvey (2001).

Tabla 5. Pruebas colorimétricas de identificación de fenoles

Prueba Colorimétricas		
	Indicativo	**Presencia de**
$FeCl_3$ 1%	Coloración marrón verdoso Coloración azul negruzco	Flavonoides o taninos condensados taninos hidrolizables
KIO_3 1%	Coloración rosado Coloración naranja	presencia de galotaninos y elagitaninos Acido gálicos libres
Gelatina 2%	Si precipita	presencia de taninos condensado
$NaNO_2$ 1% en acido acético	Coloración rosada	presencia de Elagitaninos

4.6.3 Análisis por cromatografía liquida de alta eficiencia con detector UV(HPLC-UV) de fracciones obtenidas por separación con la Amberlita® XAD

Este análisis se hizo con el objetivo de obtener el perfil cromatográfico de las diferentes fracciones obtenidas por la elución en la columna con Amberlita® XAD 2 y además poner a punto ciertas condiciones que fueron utilizadas en el análisis por HPLC MS como la escogencia de la fase móvil, flujo y gradientes de elución.

Se utilizó un equipo Shimadzu SPD20 AV (detector UV VIS) con un volumen de inyección de 20 µL de muestra, una columna Licrhosorb RP-18 (150 mm x 4.0 mm×5 µm) a temperatura ambiente, la fase móvil utilizada fue: acido fórmico al 1% en agua . (solvente A); metanol 100% (Solvente B). Se puso a punto el siguiente gradiente: 0 - 55 min (15-80% la concentración de B) ,55-57 minutos, pasó de 80% a 15 % de B y de 57-62 minutos se mantuvo la concentración de B en 15% .con un flujo total de 0,5 mL/min. Se utilizó un detector UV a longitudes de onda de 280 nm para ácidos fenólicos y flavonoles y 320 nm para derivados del acido hidroxicinámicos (Weisz G 2009) a 30 °C.

Antes de la inyección, Se hizo filtración previa de los eluidos producto de la separación con Amberlita® XAD 2 con filtros de acetato de celulosa Millipore 0,45 µm, y se desgasificó la fase móvil durante 10 minutos en ultrasonido.

Se compararon tiempos de retención y espectros de absorción con estándares de acido clorogénico, acido ferúlico, acido caféico, acido gálico, rutina, catequina.

Tabla 6. Gradiente de elución utilizado para el análisis de HPLC UV de fracciones obtenidas por separación con la Amberlita® XAD

solvente A	solvente B	gradiente	
		tiempo(min)	%B
Agua con acido fórmico1%	metanol	0	15
		55	80
		57	15
		62	15

4.6.4 Hidrólisis de fenoles eluidos con metanol

Se tienen antecedentes acerca del contenido de flavonoides glicosidados en la guayaba. Reynertson (2008), Mahattanatawee (2006) y Eidenberger (2007).

El proceso de hidrólisis se realizó con el objeto de liberar los posibles carbohidratos ligados y obtener la correspondiente agliconas flavonoides presentes en el extracto metanólico, producto de la separación con Amberlita® XAD 2. Se tomaron 10 mL de extracto metanólico o acuosos obtenido de la extracción de la columna amberlita y se mezclaron con HCL 1,5 M en reflujo durante 2 horas. Se dejaron enfriar, y se llevaron al rotavapor a 50ºC y con vacio para retirarle el metanol aún presente. Se le adicionaron 15 mL de acetato de etilo, y se llevaron a la fase acuosa (la más densa) a pH 7.0 con NaOH 1.0M para posibilitar la liofilización. La fase orgánica (la menos densa) se produjo a sequedad en un rotavapor a 50ºC a presión reducida, y se redisolvió con 8,0 mL de metanol.

4.6.5 Análisis cromatográfico por HPLC-UV de productos de la hidrólisis acida

Este análisis se hizo con el objetivo de Identificar preliminarmente posibles flavonoides como agliconas o glucósidos responsables de la posible actividad antioxidante.

La fracción orgánica y acuosa obtenida de la hidrólisis acida, se analizaron por HPLC. Utilizando un equipo Shimadzu SPD20 AV (detector UV VIS) con un volumen de inyección de 20 µL de muestra, una columna Licrhosorb RP-18 (150 mm x 4.0 mm×5 µm)a temperatura ambiente, la fase móvil utilizada fue: acido fórmico al 1% en agua . (solvente A); metanol 100% (Solvente B). Se utilizó el mismo gradiente descrito en

la tabla 6, con un detector UV a longitudes de onda de 280 nm para ácidos fenólicos y flavonoles y 320 nm para derivados del acido hidroxicinámicos (Weisz G 2009) a 30 °C. Se compararon tiempos de retención y espectros de absorción con estándares como acido clorogénico, acido ferúlico, acido caféico, acido gálico, rutina, catequina.

4.6.6 Determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante de fracciones producto de la extracción por Amberlita® XAD 2 y de la hidrólisis acida

Con el fin de determinar la variación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante de las diferentes fracciones, producto de de la separación por Amberlita® XAD 2 y las obtenidas por hidrólisis acida, se utilizaron los ensayos de determinación de contenido de fenoles libres, bloqueo de radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ y DPPH* y capacidad reductora FRAP ya descritos con anterioridad.

4.6.7 Identificación preliminar de fenoles por HPLC –MS

Con el fin de complementar la identificación preliminar de los compuestos fenólicos presentes en la guayaba. Se analizó el extracto metanólico obtenido de la elución por Amberlita® XAD 2 junto con las fracciones producto de la hidrólisis acida.

Se utilizó un equipo Shimadzu con detector SPD 10A vp(detector UV VIS) , con dos bombas de presión marca SCL 10Avp, con columna Phenomenex (150 mm x 2,0 mm×3.0 µm) **.** La fase móvil fue acido fórmico en agua al 1% (solvente A) y metanol 100% (solvente B). Se utilizó el siguiente gradiente: 0 -30 min 15-55 % de B , de 30 a 35 minutos 55-57 % de B y 35 a 40 minutos de 57-15 % de B y se mantiene al 15% de B por 5 minutos , el flujo total es de 0,3 mL/min.

El espectrómetro de *masas* Shimadzu LCMS 2010 se acopló al HPLC con una sonda de ionización por electrospray y presenta un analizador de cuadrupolo simple tipo.

Las siguientes fueron las condiciones que se utilizaron para el análisis LC MS con los siguientes parámetros instrumentales: voltaje del detector de 1,5 kV, flujo de gas nebulizador (N_2) 1,5 L/min, temperatura HEAT BLOCK de 200 ºC. voltaje CDL de 25,0 V y temperatura CDL de 250 ºC, el análisis de los espectros se escaneo en el rango m/z entre 100 y 1500

Tabla 7. Gradiente de elución utilizado para el análisis de HPLC MS de fracciones obtenidas por separación con la Amberlita® XAD y de productos de la hidrólisis acida del extracto metanólico.

solvente A	solvente B	gradiente	
		tiempo(min)	%B
Agua con acido fórmico1%	metanol	0	15
		30	55
		35	57
		40	15

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.3 Determinación de estado de madurez de las variedades de estudio

Para clasificar las muestras de guayaba de las diferentes variedades de estudio según su estado de madurez, se determinaron los correspondientes índices de madurez

Tabla 8. Valores de índices de madurez (º Brix/AT) calculados para las diferentes variedades de guayaba

variedad	**Roja**			
	inmadura	**pintona**	**madura**	**sobremadura**
Índice de madurez	2,21+/-0,52[a]	8,42+/-1,72[a]	11,37+/-1,5[a]	21,85+/-0,95[a]
variedad	**Blanca**			
	inmadura	**pintona**	**madura**	**sobremadura**
Índice de madurez	1,53+/-0,020[b]	7,91+/-0,20[b]	15,26+/-0,94[b]	18,05+/-2,25[b]
variedad	**Guavatá Victoria**			
	inmadura	**pintona**	**madura**	**sobremadura**
Índice de madurez	5,15+/-1,13[c]	19,36+/-1,96[c]	24,0+/-4,9[c]	35,95+/-0,89[c]

Letras diferentes dentro de una columna corresponden a diferencias significativas por la prueba de Fisher (a = 0,05).

De manera general, el contenido de los sólidos solubles en cada estado de madurez para las diferentes variedades fue similar (3,0 º brix para el estado inmaduro, 5,0º brix para el estado pintón, 10,0º brix para el estado maduro y 12,0º brix para el sobremaduro), lo que se observó fue una variación importante en la acidez tituláble.

Se obtuvo una mayor acidez tituláble para la guayaba blanca en comparación a la roja y mucha menor acidez tituláble para la guavatá victoria, lo anterior se expresó en los altos valores de índice de madurez para la guavatá victoria en comparación a las otras variedades de estudio. La guavatá victoria se estableció como una variedad con alto contenido de ácidos orgánicos en comparación a las otras variedades estudiadas.

Rojas Barquero (2008) reportó valores de índice de madurez (° Brix/Acidez tituláble)

en un rango de 10,38 - 11,73 para la guayaba regional roja en estado maduro que resultaron similares a los obtenidos en este trabajo, y de 8,33 - 11,50 para la guayaba regional blanca en estado maduro.

Aunque el lugar de procedencia de las guayabas haya sido el mismo (Vélez Santander), posiblemente el comportamiento metabólico de la fruta fue diferente, de ahí las diferencias encontradas respecto a los índices de madurez.

5.4 Evaluación del contenido de fenoles , capacidad antioxidante y contenido de vitamina C total en las variedades de estudio

Después de las correspondientes extracciones con etanol al 96 % de los fenoles de cada una de las variedades y en los diferentes estados de madurez, se procedió a realizar los correspondientes ensayos de contenido de fenoles libres y actividad antioxidante descritos con anterioridad para observar su variabilidad y destacar los mayores valores obtenidos. Todos los resultados mostrados en el estudio son el promedio de mínimo tres determinaciones y su correspondiente desviación estándar.

5.2.1 Resultados de la determinación del contenido de fenoles libres

Los resultados de la determinación del contenido de fenoles libres medido por el método de folin Ciocalteu se muestran en la tabla 9.

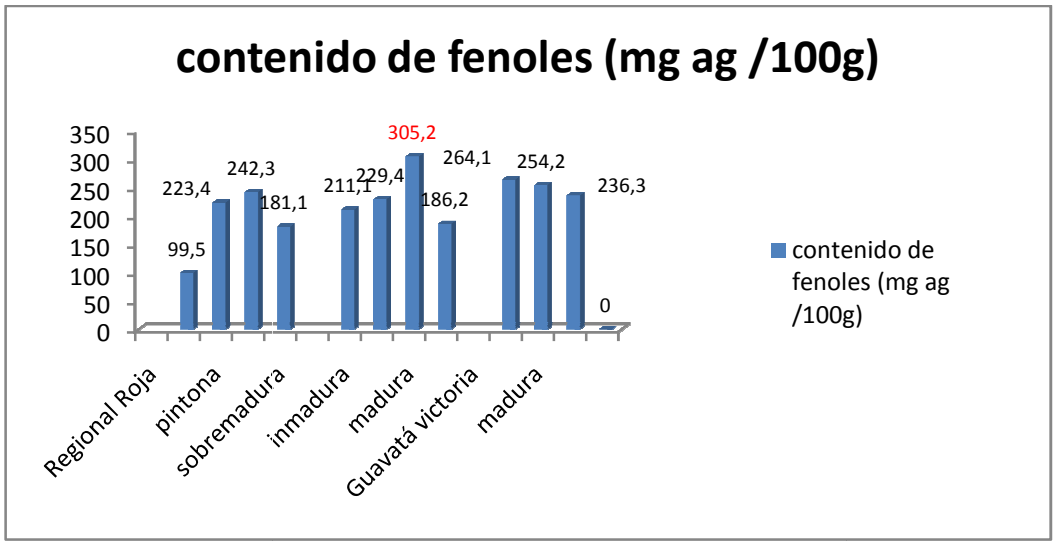
Tabla 9. Resultados del contenido de fenoles libres para las variedades guayaba en sus diferentes estados de madurez.

MUESTRAS	Contenido de fenoles libres	
Regional roja	**mg ácido gálico/100 g fruta**	**±DS**
inmadura	99,5 [e]	2,37
pintona	223,4 [a]	4,43
madura	242,3 [a]	16,7
sobremadura	181,1 [b]	0,519
Regional blanca		
inmadura	211,1 [a]	0,899
pintona	229,4 [a]	11,2
madura	305,2 [d]	10,23
sobremadura	186,2 [b]	5,42
Guavatá victoria		
inmaduro	nd	nd
pintona	264,1 [c]	12,6
madura	254,2[a]	30,4
sobremadura	236,3 [a]	2,38

nd: no determinado

Letras diferentes dentro de una columna corresponden a diferencias significativas por la prueba de Fisher (a = 0,05).

Gráfica 1. Resultados del Contenido de fenoles por variedades y estado de madurez de guayaba.



Excel 2007

Se observó que para todas las variedades estudiadas el contenido de fenoles presenta la tendencia de aumentar con la maduración de la fruta,

La mayoría de los compuestos monofenólicos como los ácidos fenólicos y los fenilpropanoides son intermediarios y derivados de las rutas metabólicas fenilpropanoide y shikimato . La conversión de L-fenilalanina a ácido trans-cinámico es el paso inicial de la ruta biosintética de fenilpropanoides, reacción que es catalizada por la fenilalaninaamonialiasa (FAL), una enzima reguladora de la síntesis de fenoles (Salisbury y Ross, 1996). Esta enzima permanece activa durante las últimas etapas del crecimiento del fruto e inicios de la maduración favoreciendo la biosíntesis de compuestos fenólicos. (Arellano Gómez 2005).

Al hasta llegar al estado sobremaduro o fase de senescencia se notó una disminución en el contenido de fenoles, que podría ser explicado por el alto metabolismo oxidativo que en esta fase favorece la aparición de especies reactivas de oxigeno singlete (EROS). Los fenoles al igual que el acido ascórbico, actúan como antioxidantes primarios produciéndose su disminución. Este comportamiento coincidió con estudios en otras frutas tropicales como el zapote mamey (Alia-Tejacal 2000), el zapote negro (Arellano Gomez 2005), banano (Ibrahim et al., 1994) y mango (Abu-Goukh & Abu-Sarra, 1993).

La técnica de Folin Ciocalteu tiene como principal interferencia el acido ascórbico y los azucares. Se conoce que el contenido de acido ascórbico disminuye con la senescencia posiblemente por la mismas razones descritas anteriormente para los

compuestos fenólicos. Otra posible explicación complementaria podría ser que la guayabas, en su fase de senescencia y debido a la producción de etileno (comportamiento propio de frutas climatéricas), producen un aumento de permeabilidad de las membranas que favorece la interacción de enzimas como la polifenoloxidasa (PFO) y peroxidasas (POD) (solubles en el citosol) con compuestos fenólicos que actúan como sustrato (Yang 1995) disminuyendo su contenido. La disminución en el contenido de fenoles fue más notoria en la guayaba regional blanca en comparación a la regional roja, tendencia que se observa también en el trabajo de Bashir (2003).

La variedad que presentó mayor contenido de fenoles libres fue la variedad regional blanca en estado maduro con un valor de **305,2 ± 10,2** mg ácido gálico/100 g de fruta . A continuación presentamos una tabla comparativa de resultados obtenidos por otros investigadores:

Tabla 10. Tabla comparativa de resultados del contenido de fenoles obtenidos por otros investigadores para las guayaba

Autor	Variedad (estado maduro)	Contenido de fenoles en mg ácido gálico/100 g fruta	Observaciones
Restrepo (**2008)**	**Regional roja**	616±59	Solvente de extracción metanol al 50% seguido de cuatro extracciones sucesivas con una mezcla acetona agua70:30, disponiendo únicamente de la fracción comestible (pulpa y corteza).
Rojas Barquera (**2008)**	Regional roja Regional blanca	508,3±46,9 456,2±88,9	Igual metodología que Restrepo
Vasco (2008)	Roja	462 ± 128	Igual metodología que Restrepo, pero con solo una extracción con acetona
Hassimoto (2005)	Roja Blanca	420 ± 14 428 ± 19	Valores correspondientes a la cascara de la fruta. metanol al 70% como solvente de extracción
Alothman (2008	No especifica	191 ± 4.35	Solvente de extracción Acetona al 90%
Y.Y Lim (2006)	Roja (variedad Kampuchean) Con semilla Sin semilla	138± 41 179± 49	Solvente de extracción Etanol al 50%
Thaipong (2006)	*Pulpa blanca (Allahabad Safeda)* *Pulpa rosada (Fan Retief)*	344,9 ± 33.6 300.8± 12.7	Solvente de extracción metanol
Mahattanatawee (2006)	Roja (sardina) Blanca (Thai)	231,67 ± 16,76 1589.3 ± 75.4	Solvente de extracción Metanol
Kuskoski (2005)	No especifica	83,0±1,3	Solvente de extracción Etanol-agua

De manera general se pudo observar que los investigadores que utilizaron etanol o mezclas etanol-agua como solventes de extracción reportaron menores valores respecto a los que trabajan con metanol y acetona considerados por muchos investigadores buenos solventes para la extracción de antioxidantes polares. (Lu & Foo 1999) pero no permitidos como aditivos en alimentos por su toxicidad.

Sin embargo, en este trabajo se utilizó etanol como solvente de extracción y los valores resultaron más altos que los reportados en la literatura utilizando el mismo solvente, posiblemente por la utilización de la fruta entera para los análisis respectivos.

5.2.2 Capacidades antioxidantes

5.2.2.1 Resultados de la determinación de la capacidad antioxidante por bloqueo de radicales $ABTS^{\bullet+}$ expresado en equivalentes Trolox (TEAC)

Los resultados de la capacidad antioxidante medido a través bloqueo de radicales $ABTS^{\bullet+}$ expresado en equivalentes Trolox (TEAC) se muestran en la tabla 11.

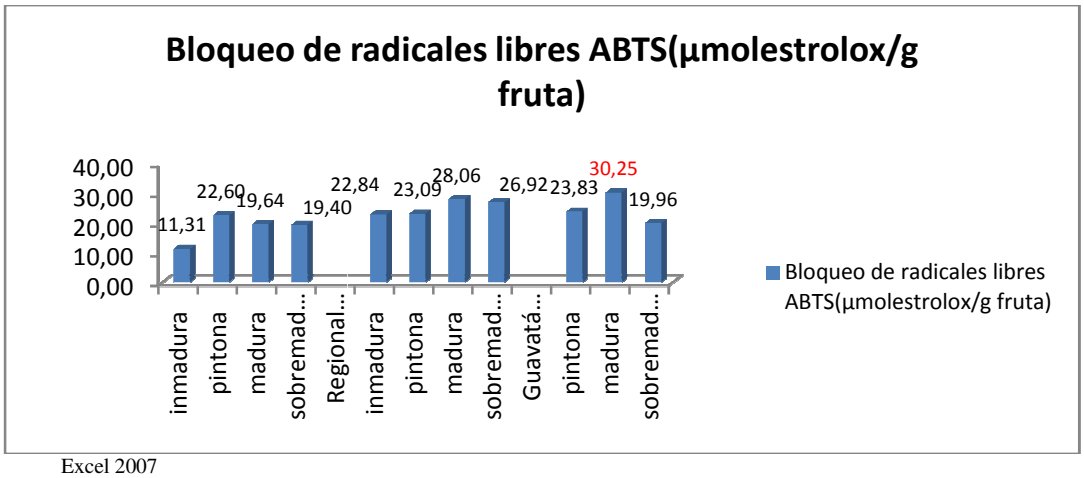
Tabla 11. Resultados de Capacidad antioxidante por Bloqueo de radicales $ABTS^{\bullet+}$ De las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez.

MUESTRAS	Capacidad de bloquear radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ (TEAC)	
Regional roja	**µmolTrolox/ g fruta**	**±DS**
inmadura	$11{,}31^{e}$	0,19
pintona	$22{,}60^{a}$	0,86
madura	$19{,}64^{c}$	0,37
sobremadura	$19{,}40^{c}$	0,30
Regional blanca		
inmadura	$22{,}84^{a}$	0,64
pintona	$23{,}09^{a}$	1,14
madura	$28{,}06^{b}$	0,40
sobremadura	$26{,}92^{b}$	0,72
Guavatá victoria		
inmadura	nd	nd
pintona	$23{,}83^{a}$	0,40
madura	$30{,}2^{d}$	1,42
sobremadura	$19{,}96^{c}$	0,56

Nd: no determinada

Letras diferentes dentro de una columna corresponden a diferencias significativas por la prueba de Fisher (a = 0,05).

Gráfica2. Resultados de Capacidad antioxidante por bloqueo de radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ por variedades y estado de madurez de la guayaba.



Excel 2007

La variedad que presentó mayor capacidad de bloquear los radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ fue la variedad guavatá victoria en estado maduro con un valor de 30,25 µmolTrolox/ g de fruta, seguido de la variedad regional blanca en estado maduro con un valor 28,06 µmolTrolox/ g de fruta. Según el contraste múltiple de rango si existen diferencias estadísticamente significativas (DES) para el TEAC entre las dos variedades.

La tendencia que se observa es que a medida que la fruta madura se presenta una mayor capacidad de bloqueo de radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ hecho que podría estar relaciona con el aumento en el contenido de fenoles libres que actúan como captadores de radicales libres.

A continuación se presenta una tabla comparativa de resultados obtenidos por otros investigadores para la guayaba.

Tabla 12. Tabla comparativa de resultados de capacidad antioxidante por bloqueo de radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ para la guayaba

Autor	Variedad (estado maduro)	Capacidad de bloquear radicales libres $ABTS^{\bullet+}$ (TEAC) µmolTrolox/ g	Observaciones
Restrepo (2008)	Regional roja	184±12	45 minutos de incubación. Solventes de extracción (metanol-agua lavados de acetona)
Rojas Barquera (2008)	Regional roja Regional blanca	107,3±34,6 100,1±23,7	Igual metodología que Restrepo
Vasco (2008)	Roja	41±1	6 min de incubación solvente de extracción(metanol agua acetona)
Thaipong (2006)	*Pulpa blanca (Allahabad Safeda)* *Pulpa rosada (Fan Retief)*	37.97± 3.4 34.472.1	2 horas de incubación Solvente de extracción (metanol)
Kuskoski (2005)	No especifica	8,2±0,4	Incubación de 7 min solvente de extracción(etanol-agua)

Si se comparan los valores obtenidos, se puede decir que se obtuvieron valores más bajos con referencia a los reportados en la literatura (excepto a los de Kuskoski) pero no muy distantes. Pero en comparación a los datos reportados por Restrepo(2008) y Rojas Berquera(2008) si se observan diferencias notables. Posiblemente los lavados efectuados con acetona por este autor mejoraron la extracción de fenoles de polaridad intermedia que con etanol son más difícil de extraer, hecho que influyo influyeron notablemente en los valores reportados.

5.2.2.2 Resultados de la determinación de la capacidad antioxidante por bloqueo de radicales $DPPH^{\bullet}$

Los resultados de la capacidad antioxidante medidos a través bloqueo de radicales $DPPH^{\bullet}$ expresado en equivalentes Trolox (TEAC) se muestran en la tabla 13.

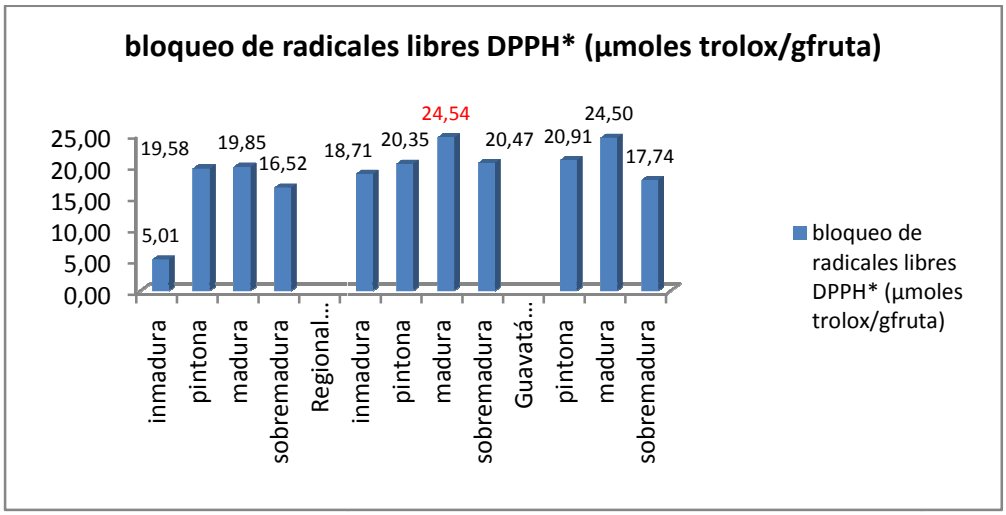
Tabla 13. Resultados de capacidad antioxidante por bloqueo de radicales DPPH• de las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez.

MUESTRAS	Capacidad de bloquear radicales libres DPPH•	
Regional roja	**µmolTrolox/ g fruta**	**±DS**
inmadura	5,01[c]	0,27
pintona	19,58[b]	0,15
madura	19,85[b]	0,38
sobremadura	16,52[d]	0,42
Regional blanca		
inmadura	18,71[e]	0,54
pintona	20,35[b]	0,88
madura	24,54[a]	0,83
sobremadura	20,47[b]	0,23
Guavatá victoria		
Inmadura	Nd	nd
pintona	20,91[b]	0,48
madura	24,50[a]	0,34
sobremadura	17,74[b]	0,61

Nd: no determinada

Letras diferentes dentro de una columna corresponden a diferencias significativas por la prueba de Fisher (a = 0,05).

Gráfica 3. Resultados de capacidad antioxidante por bloqueo de radicales libres DPPH• por variedades y estado de madurez de la guayaba.



Excel 2007

La variedad que presentó mayor capacidad de bloquear los radicales libres **DPPH•** fue la variedad regional blanca en estado maduro con un valor de 24,54 ±0.83 µmolTrolox/ g de fruta, seguido de la variedad guavatá en estado maduro con un valor

24,50 µmolTrolox/ g de fruta. Según el contraste múltiple de rango no hay diferencias estadísticamente significativas (DES) entre las dos variedades.

La tendencia que se observó fue que a medida que la fruta se maduró se presenta una mayor capacidad de bloqueo de radicales libres **DPPH•**, hecho que podría estar relaciona con el aumento en el contenido de fenoles libres que actúan como captadores de radicales libres. De igual manera hubo una disminución de la Capacidad de bloquear radicales libres DPPH• en el estado sobremaduro, esto va ligado al comportamiento característico de los fenoles ya explicado con anterioridad.

A continuación se presenta una tabla comparativa de resultados obtenidos por otros investigadores para la guayaba.

Tabla 14. Tabla comparativa de resultados obtenidos de capacidad antioxidante por bloqueo de radicales libres DPPH● en guayaba.

Autor	Variedad (estado maduro)	Capacidad de bloquear radicales libres DPPH• µmolTrolox/ g	Observaciones
Rojas Barquera (2008)	Regional roja Regional blanca	107,3±34,6 100,1±23,7	Solventes de extracción (metanol-agua lavados de acetona)
Vasco (2008)	Roja	30±7	16 min de incubación. solvente de extracción (metanol-agua lavados de acetona)
Thaipong (2006)	*Pulpa blanca (Allahabad Safeda)* *Pulpa rosada (Fan Retief)*	32.0 ± 5.1 27.771.7	24 horas de incubación Solvente de extracción (metanol)
Kuskoski (2005)	No especifica	7,4 ±0,01	Incubación de 60 min solvente de extracción(etanol-agua)

Cabe recordar que los tiempos de incubación en este trabajo fueron de 90 minutos, lo anterior confirma que en solventes fuertemente aceptores de hidrógenos como el etanol trabajan muy lentamente con el DPPH, además, por impedimento estérico

moléculas de gran tamaño se pueden obtener menores valores de capacidad antioxidante.

Por otro lado, con esta técnica se ha reportado un escaso rango lineal de absorbancia *versus* concentración (Prior 2005). Además, los carotenoides constituyen un importante interferencia a la longitud de onda de trabajo (517 nm)

5.2.2.3 Resultados de la determinación de la Capacidad reductora FRAP

Los resultados de la capacidad antioxidante medido a través la capacidad reductora expresado en equivalentes Trolox (TEAC) se muestran en la tabla 15.

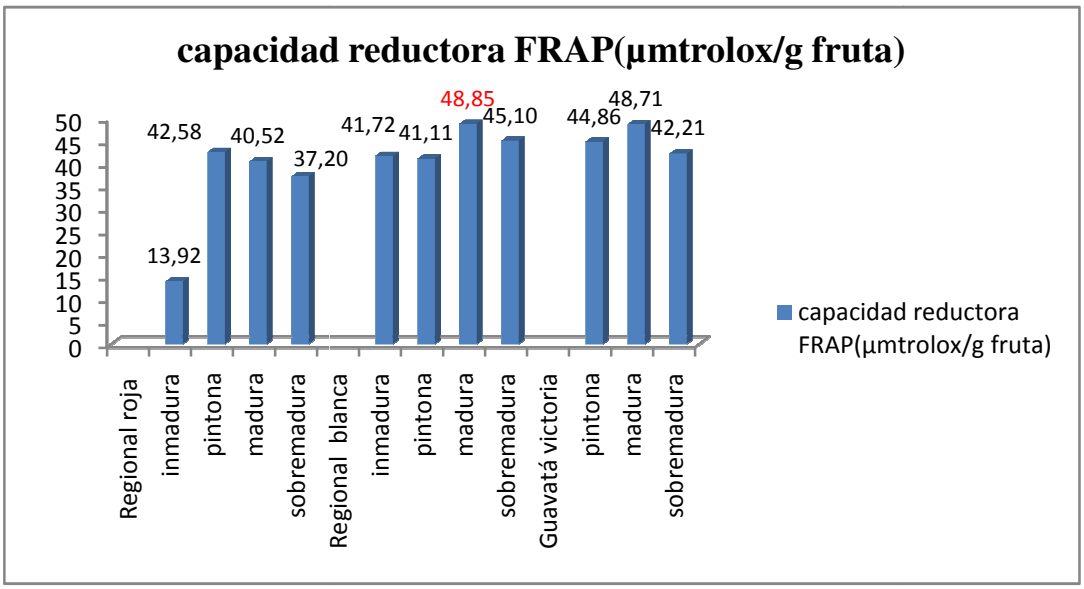
Tabla 15. Resultados Capacidad reductora FRAP de las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez.

MUESTRAS	**Capacidad reductora FRAP**	
Regional roja	**µmolTrolox/ g fruta**	**±DS**
inmadura	13,92[d]	0,17
pintona	42,58[a]	0,17
madura	40,52[a]	0,17
sobremadura	37,20[e]	0,20
Regional blanca		
inmadura	41,72[a]	1,26
pintona	41,11[a]	0,79
madura	48,85[b]	0,34
sobremadura	45,10[c]	0,08
Guavatá victoria		
inmadura	Nd	nd
pintona	44,86[c]	0,20
madura	48,71[b]	0,14
sobremadura	42,21[a]	3,06

Nd: no determinado

Letras diferentes dentro de una columna corresponden a diferencias significativas por la prueba de Fisher (a = 0,05).

Gráfica 4. Resultados capacidad reductora FRAP por variedades y estado de madurez de guayaba



Excel 2007

La variedad que presentó mayor capacidad reductora FRAP fue la variedad regional blanca en estado maduro con un valor de 48,85±0,34 µmolTrolox/ g de fruta, seguido de la variedad guavatá en estado maduro con un valor 48,71±0,71 µmolTrolox/ g de fruta. Según el contraste múltiple de rango no hay diferencias estadísticamente significativas (DES) entre las dos variedades.

La tendencia que se observa es que a medida que la fruta madura se presenta una mayor capacidad para reducir el complejo férrico (presencia de sustancias con potencial redox menor a 0.70 V), hecho que podría estar relaciona con el aumento en el contenido de fenoles que actúan como oxidantes. En el estado sobremaduro se notó una disminución capacidad reductora FRAP a causa de la menor disponibilidad de fenoles de funcionar como especies reductoras.

A continuación se presenta una tabla comparativa de resultados obtenidos por otros investigadores

Tabla 16. Tabla comparativa de resultados obtenidos por capacidad reductora FRAP para la guayaba

Autor	Variedad(estado maduro)	Capacidad reductora FRAP µmolTrolox/ g	Observaciones
Rojas Barquera (2008)	Regional roja Regional blanca	79,9±8,5 77,76±10,58	2horas de incubación (metanol-agua lavados de acetona)
Vasco (2008)	Roja	31.9 ± 0.9	no indica tiempo de incubación (metanol-agua lavados de acetona)
Thaipong (2006)	Pulpa blanca *(Allahabad Safeda)* Pulpa rosada (*Fan Retief)*	33.3 ± 1.4 30.4 ± 1.2	30 minutos de incubación Solvente de extracción (metanol)
Kuskoski (2005)	No especifica	7,4 ±0,01	incubación de 60 min Agua etanol
Jimenez-Escrig (2001)	guayaba roja cascara pulpa	462 ± 51 238 ± 7	30 minutos de incubación

Se observa que se obtuvo un alto valor en comparación a los otros datos reportados en la literatura. El valor tan alto reportado por Jimenez-Escrig (2001) en comparación a los vistos con anteriormente se deba a que los reporta en base seca.

Esta es una de las técnicas más utilizadas en la medición de capacidad antioxidante, es poco especifica y también se puede reportar como mmol o µmol de Fe^{2+} / 100 g fruta o en mg Acido gálico/g fruta.

5.2.2.4 Resultados del ensayo de Decoloración del β caroteno por acido linoleico

Los resultados de la capacidad antioxidante medido a través de la decoloración del β caroteno en equivalentes de ácido gálico se muestran en la tabla 17.

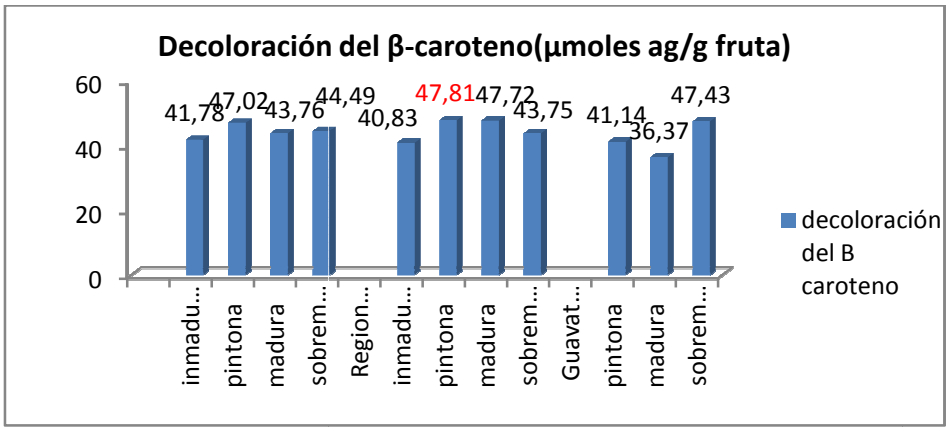
Tabla 17. Resultados Ensayo de Decoloración del β caroteno por acido linoleico de las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez.

MUESTRAS	β caroteno	
Regional roja	**µmol acido gálico/ g fruta**	**±DS**
inmadura	41,78[a]	**0,31**
pintona	47,02[b]	**0,15**
madura	43,76[a]	**0,24**
sobremadura	44,49[b]	**0,35**
Regional blanca		
inmadura	40,83[a]	**0,19**
pintona	47,81[b]	**0,26**
madura	47,72[b]	**0,24**
sobremadura	43,75[a]	**0,54**
Guavatá victoria		
inmadura	Nd	**nd**
pintona	41,14[a]	**0,36**
madura	36,37[c]	**1,15**
sobremadura	47,43[b]	**1,25**

Nd : no determinado

Letras diferentes dentro de una columna corresponden a diferencias significativas por la prueba de Fisher (a = 0,05).

Gráfica 5. Resultados de Ensayo de decoloración del β caroteno por variedades y estado de madurez de la guayaba.



Excel 2007

La variedad que presentó mayor inhibición de la peroxidación lipídica fue la variedad blanca en estado pintón con un valor de 47,81 ± 0,26 µmol acido gálico/ g fruta**,** seguido de la variedad blanca en estado maduro con un valor 47,72 ±0,24 µmol acido gálico/ g fruta y la guavatá en estado sobremaduro con 47,43 ±1,25 µmol acido gálico/ g fruta. Según el contraste múltiple de rango no hay diferencias estadísticamente significativas (DES) entre estas tres variedades.

No existe una tendencia definida respecto a su variación respecto al estado de madurez. Sin embargo. Se sabe que a medida que madura la fruta, el contenido de clorofilas disminuye, mientras los carotenoides aumentan (cambio que permite en muchos casos la discriminación visual del estado de madurez de la frutas). Una mayor disponibilidad de carotenoides en el extracto permite que se minimice la oxidación del β-caroteno por los hidroperóxidos, De manera que en el estado sobremaduro no se presentan diferencias significativas respecto a los otros estados de madurez como se observa en otros ensayos de capacidad antioxidante.

Como referencia se puede citar a Kuskoski (2005) quien obtuvo valores de 52.8 ± 4.7 µmol acido gálico / g de fruta para la pulpa y 29.7 ± 2.1 µmol acido gálico / g de fruta para la cascara de la guayaba roja y valores de 14.6 ± 1.2 µmol acido gálico / g de fruta para la pulpa y 23.2 ±1.6 µmol acido gálico / g de fruta para la cascara de la guayaba blanca relativo al patrón de 50µM de acido gálico.

5.5.3 Resultados de la determinación de vitamina C total

Los resultados obtenidos en la determinación de la vitamina C expresado en mg de acido ascórbico/100 g de fruta se muestran en la tabla 18.

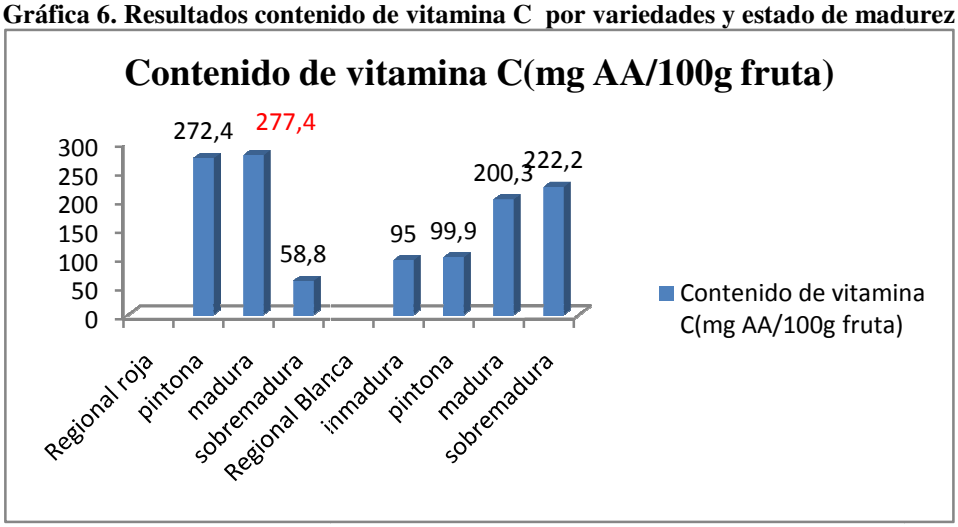
Tabla 18. Resultados determinación de vitamina C total de las tres variedades de guayaba en sus diferentes estados de madurez.

Muestras	**Vitamina C**	
ROJA	**mg acido ascórbico/g fruta**	**±DS**
inmadura	nd	
pintona	272,4[b]	**3,22**
madura	277,4[a]	**5,15**
sobremadura	58,8[d]	**1,65**
BLANCA		
inmadura	95,0[c]	**2,24**
pintona	99,9[e]	**3,65**
madura	200,3[f]	**1,01**
sobremadura	222,2[f]	**0,95**
GUAVATA		
Inmaduro	nd	-
pintona	nd	-
madura	nd	-
sobremadura	nd	-

Nd: no determinado

Letras diferentes dentro de una columna corresponden a diferencias significativas por la prueba de Fisher (a = 0,05). Nd: no determinado

Gráfica 6. Resultados contenido de vitamina C por variedades y estado de madurez de guayaba



Excel 2007

La variedad que presentó mayor contenido de vitamina C total fue la variedad regional roja en estado maduro con un valor de 277,4 mg ácido ascórbico /100 g de fruta, seguido de la variedad regional roja en estado pintón con un valor 272,4 mg ácido ascórbico / g de fruta. Según el contraste múltiple de rango si hay diferencias estadísticamente significativas (DES) entre las dos variedades.

Se presentó un comportamiento atípico respecto a los valores entre el estado maduro y el sobremaduro en la regional blanca. Podría explicarse este comportamiento posiblemente porque en esta variedad (según vimos en el índice de madurez) la acidez es mucho mayor y esto facilitó una mayor disponibilidad de otros ácidos orgánicos susceptibles a ser utilizados como fuente de energía para los procesos oxidativas propios de la senescencia, permitiendo una mayor disponibilidad de acido ascórbico.

A continuación se presenta una tabla comparativa de resultados obtenidos por otros investigadores:

Tabla 19. Tabla comparativa de resultados obtenidos para el contenido de vitamina C total

Autor	Variedad(estado maduro)	mg ácido ascórbico /100 g fruta	Observaciones
FAO ICBF Colombia	Blanca rosada	240 200	No especifica
Rojas Barquera (2008)	Regional roja Regional blanca	268,7±68,2 216,7±32,0	Misma metodología utilizada en este trabajo
Vasco (2008)	Roja	74-84	Método no especificado
Lim (2007)	Roja (variedad Kampuchean) Con semilla Sin semilla	144 ± 60 132 ± 46	HPLC : columnaC-18 (3.9 m.150 mm, 5 µm), fase móvil acético ácido 5% 254 nm
Soarez (2007)	Guayaba blanca	168.36	Se extrajo con acido oxálico 5% ,HPLC UV Columna ODS-II C18 (ID 4.6 · 250 mm), Fase móvil 5 mmol/L brometocetiltrimetil amonio and 50 mmol/L of fosfato monobásico de potasio monobasico and pH 4.0 con H3PO4, 254 nm
Thaipong (2006)	Pulpa blanca *(Allahabad Safeda)* Pulpa rosada (*Fan Retief)*	378.6±29.2 396.7±25.0	Método de 2, 6-diclorofenol-indophenol
Mahattanatawee (2006)	Roja (*sardina*) Blanca (*Thai*)	122.3 ±15.0 201±17.4	Se extrajo con 0.05 N H3PO4 Analizado con HPLC PAD columna (OA-1000, 9 μm, 300 mm, 6.5 mm, Fase móvil 0.01 N H2SO4. Flujo isocrático
Hassimotto(2005)	Blanca -cascara -Pulpa Roja cascara pulpa	268.9 0.3 136.4 ±0.2 198 ±1 56 ±2	Se extrajo con acido metafosforico (0.3% w/v) y analizado por fase reversa HPLC PAD columna µ Bondapack (300 mm _ 3.9 mm i.d.) Flujo isocrático 0.2 M Buffer acetate de sodio/acido acetic (pH4.2) 262 nm.

Se observó un mayor contenido de vitamina C total para la regional roja respecto a los valores reportados en la literatura, esto se podría justificar debido a que este trabajo utilizó la fruta entera (cascara, casco, pulpa y semillas), y en otros trabajos se acostumbra a analizar únicamente la pulpa(Vasco 2008, YY.Lim 2006).

Diversos autores como Bashir (2003) reportó valores mayores de vitamina C y fenoles en la cascara de la guayaba respecto a la pulpa. Esto podría estar justificado en la utilización por parte de las plantas de este tipo de compuestos en la protección

contra enfermedades, insectos y en la captación que estas hacen hasta del 90% de las radiaciones UV, para impedir efectos nocivos de estas radiaciones en los tejidos internos de la planta. (Palazón 2009).

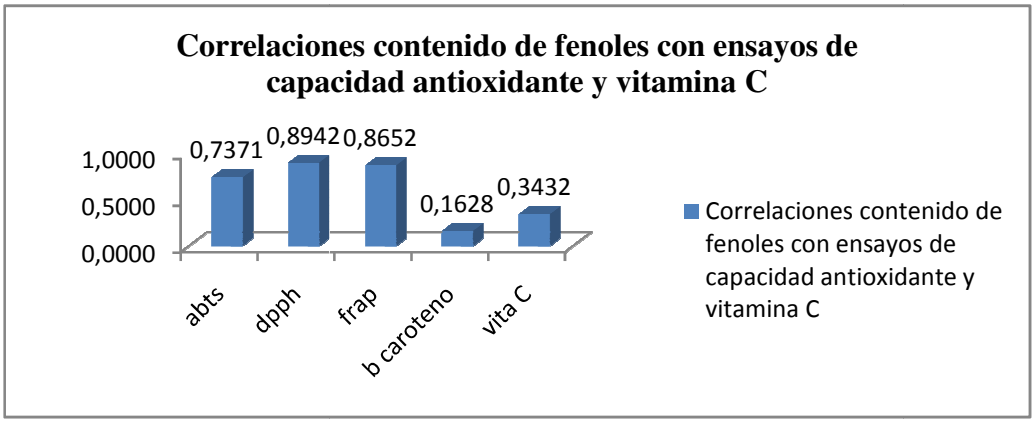
5.3 Correlación entre los distintos ensayos de contenido de fenoles, capacidad antioxidante y contenido de vitamina C

Para observar la relación existente entre el contenido de fenoles, capacidad antioxidante y contenido de vitamina C se evaluó la correlación entre las anteriores variables calculando los coeficientes de correlación.

Tabla 20. Coeficientes de correlación entre contenido de fenoles ensayos de capacidad antioxidante y contenido de vitamina C.

VARIABLE	ABTS	DPPH	FRAP	β caroteno	Vitamina C
Contenido de fenoles	0,7371	0,8942	0,8652	0,1628	0,3432
vitamina C	0,1992	0,4324	0,4379	0,1882	

Gráfica 7. Correlaciones contenido de fenoles con ensayos de capacidad antioxidante y vitamina C para la guayaba.



Excel 2007

Se observó que hubo una alta correlación entre el contenido de fenoles y los ensayos de capacidad antioxidante de DPPH, FRAP Y ABTS, pero una baja correlación con el ensayo de β caroteno y el contenido de vitamina C.

También se determinó una relación intermedia entre el contenido de vitamina C y los ensayos de capacidad antioxidante de DPPH y FRAP, pero una baja relación entre el contenido de vitamina C con el ensayo de β caroteno y el de ABTS

Estos resultados están acordes a lo reportado por autores como Mahattanatawee (2006), quien reportan una alta correlación entre el ensayo de DPPH y el contenido de fenoles, sin embargo, también se encontró una baja correlación entre la técnica de DPPH y el contenido de acido ascórbico.

Por otro lado, Vasco (2008) obtuvo correlación entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante medida como DPPH, FRAP y ABTS, con valores de 0.86, 0.90 and 0.96 respectivamente.

Thaipong (2006) y G.Du (2009) encontraron alta correlación entre los ensayos ABTS, DPPH , FRAP con el contenido de fenoles y vitamina C , y entre el contenido de fenoles y la vitamina C. G Du(2009), plantea medir la capacidad antioxidante de forma indirecta por estos métodos dada la alta correlación existente entre las variables.

Respecto a la baja correlación observada en este trabajo entre el contenido de fenoles, vitamina C y la capacidad antioxidante medido por el ensayo de de β caroteno Hassimotto (2005) reporta el mismo comportamiento.

El ensayo de β caroteno es más selectivo con especies de carácter lipofílico, y los solventes de extracción utilizados (metanol y etanol) no corresponden a ese carácter, por lo que puede ser la causa de la baja correlación obtenida con el contenido de fenoles.

En algunas trabajos como el de Kalt (1999), frutas como la fresa, arándano y frambuesa reportan una correlación negativa entre el contenido de acido ascórbico y la capacidad antioxidante La vitamina es muy susceptible a ser oxidada y podría mostrar actividad pro-oxidante, esto podría ser una aplicación a la baja correlación entre la vitamina y el ensayo de ABTS y el de β caroteno. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de diversos factores tales como: su carácter hidrofílico, el solvente de extracción utilizado, su concentración, el sistema generador de radicales y el tipo de compuestos fenólicos,

No todos reaccionan del mismo modo con los ensayos de capacidad antioxidante.

Incluso algunos como Cao (1997) reporta actividad pro-oxidante en especies como los flavonoides

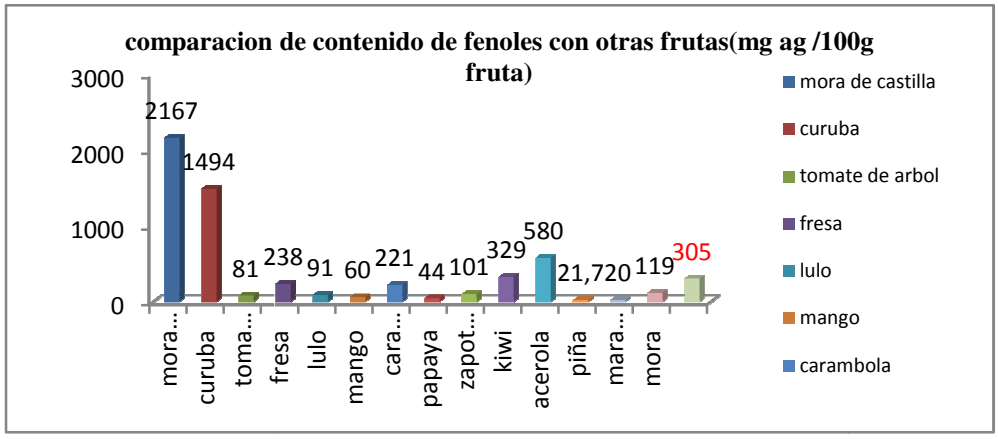
5.4 Comparación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante y vitamina C con otras frutas tropicales

En la siguiente tabla se presentan valores de contenido de fenoles y capacidad antioxidante para otras frutas

Tabla 21. Comparación de valores de contenido de fenoles y capacidad antioxidante para otras frutas.

Autor	Fruta	Contenido de fenoles en mg ácido gálico/100 g fruta	Capacidad antioxidante o vitamina C
Vasco (2008)			DPPH (µmolTrolox/ g)
	Andean blackberry(mora de castilla)	2167 ± 835	41 ± 16
	Banana passion fruit (curuba)	1494 ± 385	76 ± 21
	Tomate de árbol	81 ± 29	4.2 ± 1.0
	Fresa (frutilla)	238 ± 86	11 ±3
	Lulo	91 ± 17	3.2 ± 0.9
	mango	60 ± 26	3.1 ± 0.6
Mahattanatawee (2006)			Vitamina C mg AA/100g
	Carambola	220,7 ± 15,7	16.9 ± 1.6
	Papaya	44,2 ± 2,97	153.8 ± 12.1
	Sapote mamey	101,1 ± 4,02	7.5 ± 2.1
G.Du (2009)	Kiwi	329.33 ± 7.02	Vitamina C mg AA/100g 1284.87
Kuskoski (2005)			DPPH (µmolTrolox/ g)
	Acerola	580,1±4,6	68,0±2,2
	Piña	21,7±4,5	0,6±0,1
	Maracuyá	20,0±2,6	1,02±0,4
	Mora	118,9±2,1	5,9±0,3

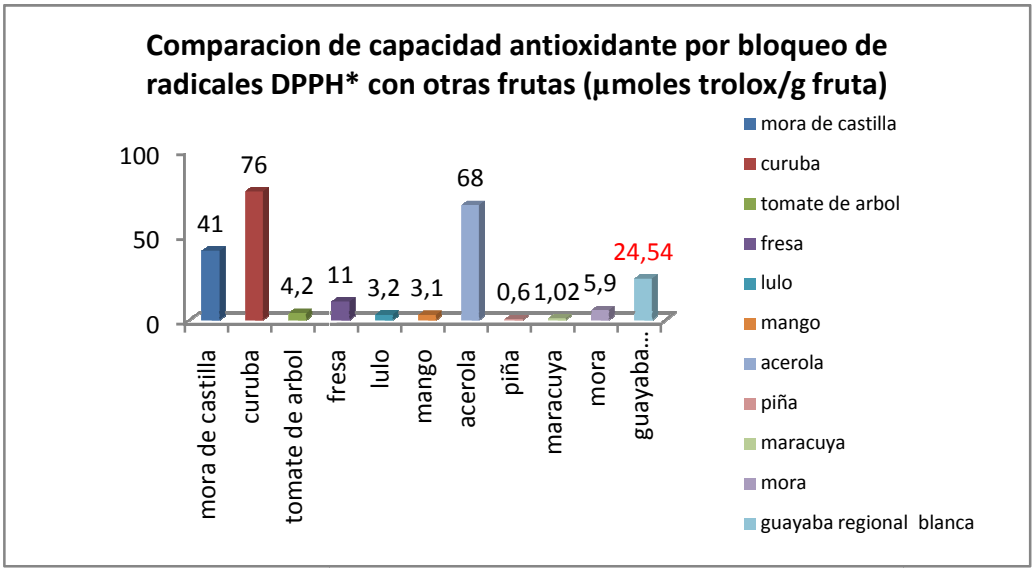
Gráfica 8. Comparación del Contenido de fenoles en otras frutas con la guayaba blanca madura.



Excel 2007

La grafica 8 ubica a la guayaba como una de las frutas con un contenido intermedio de fenoles tal como lo reportó Vasco (2008).

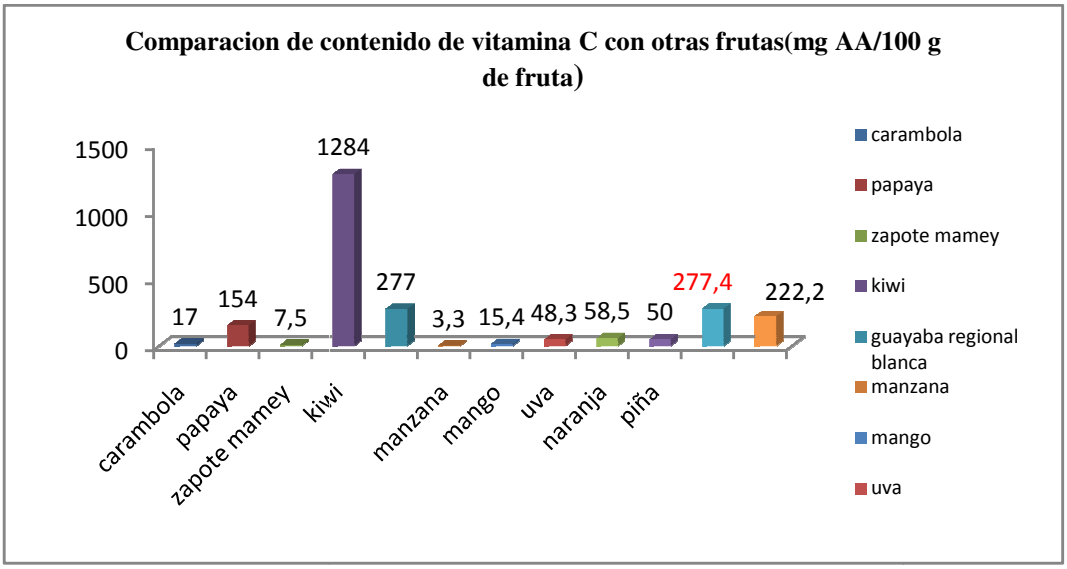
Gráfica 9. Comparación de las capacidades antioxidantes por bloqueo de radicales libres DPPH• dela guayaba con otras frutas.



Excel 2007

La grafica 9 ubica a la guayaba como una de las frutas con un nivel intermedio de capacidad de bloqueo de radicales DPPH•

Gráfica 10. Comparación del contenido de vitamina C con otras frutas.



Excel 2007

La gráfica 10 compara el contenido de vitamina C total de la guayaba variedad regional roja y regional blanca en estado maduro respecto a otras frutas .Se observa un alto contenido solo superada por frutas como la mora de castillo, la curuba, acerola y el kiwi.

Las anteriores graficas permiten confirmar a la guayaba y las variedades estudiadas, de acuerdo a los resultados que se obtuvieron para el contenido de fenoles, actividad antioxidante y vitamina C la sitúan como una fruta con alto valor nutricional.

Se podría discutir que las variedades de guayaba estudiadas presentaron altos contenido de fenoles libres (especialmente la regional blanca), contenido de vitamina C (especialmente la regional roja) , niveles intermedios de capacidad antioxidante (especialmente altos con el ensayo FRAP) y baja correlación con el ensayo de decoloración por β caroteno.

Además se encontró altas correlaciones entre el contenido de fenoles libres y la capacidad antioxidante medidas con los ensayos de DPPH, ABTS Y FRAP. Lo anterior permitiría deducir que los fenoles son los principales causantes de esa actividad antioxidante. El hecho que la guayaba presentara un nivel intermedio de correlación entre el contenido de fenoles con el contenido de vitamina C podría indicar que la presencia de esta especie no influye de manera importante en el

contenido de fenoles y por ende en la capacidad antioxidante dela la fruta, además la baja correlación con el ensayo de decoloración por β caroteno podría indicar que los fenoles presentes en la guayabas de estudio prefieren utilizar como mecanismo de capacidad antioxidante la transferencia de electrones.

5.5 Análisis preliminar de los fenoles obtenidos de la guayaba blanca madura. Pruebas cualitativas de identificación de fenoles

En razón a que la guayaba blanca madura fue la que presentó mayor contenido de fenoles libres y mayores capacidades antioxidantes y con base en las altas correlaciones determinadas para estas variables, se decidió escogerla para continuar con esta parte del trabajo, que se hizo con el fin de tratar de realizar una identificación preliminar delos posibles fenoles responsables de la actividad antioxidante de la guayaba.

5.5.1 pruebas cualitativas de identificación de fenoles

A continuación se reportan resultados de los ensayos de reconocimiento hechos con base la metodología de Mueller Harvey (2001)

Tabla 22. Resultados de pruebas colorimétricas

Prueba Colorimétricas			
	Coloracion obtenida	**Fracción(es) que dieron positiva la prueba**	**Indicativo**
$FeCl_3$ 1%	Coloración marrón verdoso	Extracto metanólico. y fase orgánica producto hidrólisis acida	Fenoles o taninos de tipo catecol (flavonoides o taninos concentrados).
KIO_3 1%	se tornó rosado	Extracto metanólico fase acuosa producto hidrólisis acida	Indica presencia de elagitaninos
Gelatina 2%	Se observó precipitación	Extracto metanólico crudo	presencia de taninos condensados
$NaNO_2$ 1% en acido acético	Coloración rosada	Extracto metanólico	Presencia de Elagitaninos

Las anteriores pruebas cualitativas dan un indicativo de lo complejo que es la mezcla de fenoles obtenido a partir de la guayaba blanca madura, ya que según los resultados obtenidos, se tendría principalmente una mezcla de taninos concentrados y elagitaninos.

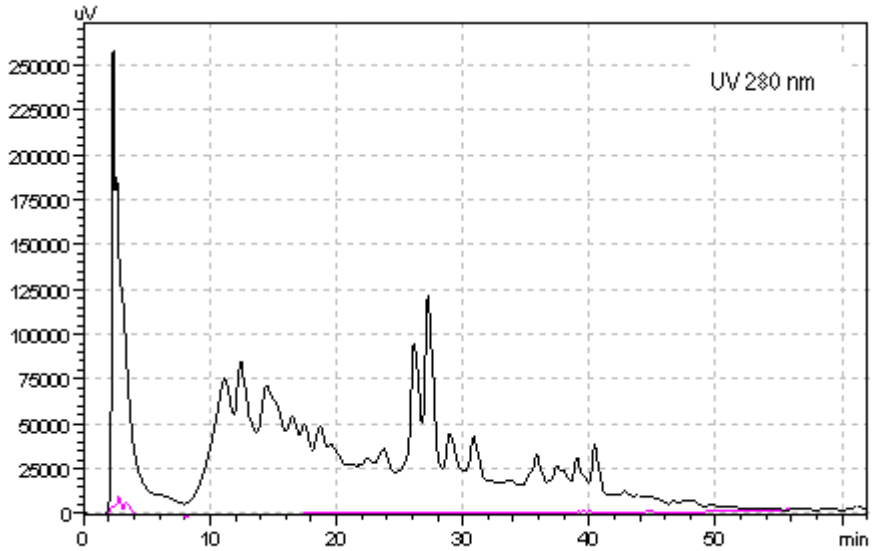
Pero es claro no es válido como criterio único de identificación. Ya que muchos elagitaninos y galotaninos de alto peso molecular no son detectados por los ensayos

colorimétricos de nitrito de sodio en medio acido y yodato de potasio respectivamente. (Mueller Harvey 2001) por eso debe complementarse con otras técnicas de análisis.

5.5.2 Análisis por cromatografía liquida de alta eficiencia con detector UV (HPLC- UV) de fracciones obtenidas por separación con la Amberlita® XAD 2

Del extracto metanólico obtenido de la Amberlita® XAD 2 se obtuvo el siguiente perfil cromatográfico con base en las condiciones descritas con anterioridad

Figura 25. Perfil cromatográfico comparativo del extracto metanólico (negro) vs extracto acuoso (rojo) obtenido por elución en Amberlita® XAD 2



La figura 25 muestra la complejidad del extracto metanólico obtenido de la Amberlita® XAD 2 representado en la formación de múltiples espectros de absorción. El extracto acuoso (línea roja) obtenido no mostró señales de absorción en el cromatograma comparativo. lo cual denotó que existe pocas posibilidades que en halla presentes compuestos fenólicos. Sin embargo, se le realizaron medidas de contenido de fenoles y capacidad antioxidante.

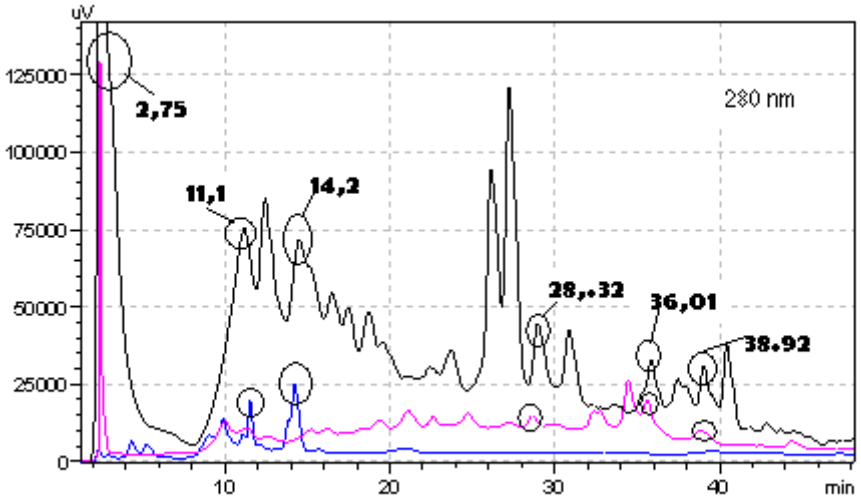
5.5.3 Análisis cromatográfico por HPLC-UV de productos de la hidrólisis acida

Con las fracciones obtenidas producto de la hidrolisis acida del extracto metanólico obtenido con Amberlita® XAD 2 se procedió a realizar el análisis cromatográfico de las respectivas fases acuosa y fase orgánica.

Al final de la hidrólisis se observó la formación de una solución rojiza y un precipitado marrón.

A continuación se presenta un cromatograma comparativo entre el extracto metanólico obtenido de la extracción con Amberlita® XAD 2 (**negro**) vs producto de hidrólisis acida fase orgánica (rojo) vs fase acuosa (azul)

Figura 26. Cromatograma comparativo extracto metanólico (negro) vs producto hidrólisis acida vs producto hidrólisis acida fase orgánica (rojo) vs fase acuosa (azul)



La figura 26 muestra comparativamente los productos de la hidrólisis acida, respecto al correspondiente cromatogramas del extracto metanólico

Se observan algunos espectros de absorción con similares tiempos de retención (remarcados en círculos) entre el extracto metanólico y los productos de la hidrólisis acida.

Los cromatogramas anteriores indican la presencia de compuestos fenólicos.

Sin embargo al compararlos con los estándares disponibles (acido clorogénico, acido ferúlico, acido caféico, acido gálico, rutina, catequina.), no se observaron tiempos de retención similares, por ende se descartó la presencia de estos compuestos en el extracto metanólico de guayaba regional blanca madura.

5.5.4 Determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante para las fracciones y subfracciones producto de la extracción por Amberlita® XAD 2 y de la hidrólisis acida y las subfracciones obtenidas

Se determinó el contenido de fenoles libres, capacidad antioxidante (únicamente por las técnicas ABTS, DPPH y FRAP que fueron las que mejor correlación tuvieron con el contenido de fenoles) obteniéndose la siguiente tabla de resultados:

Tabla 23. Contenido de fenoles y capacidad antioxidante de fracciones obtenidas de la extracción con Amberlita XAD2 y los productos de la hidrolsis acida.

Técnica	Extracto metanólico (EMC) Amberlita XAD 2	Extracto acuoso Amberlita XAD 2	Hidrólisis acida EMC fase acuosa	Hidrólisis acida EMC fase orgánica	Hidrólisis acida Extracto acuoso Amberlita XAD 2	Extracto etanólico guayaba Bianca
CFL mg ag/ 100 g fbH	62,50 +- 3,8	9,32 +- 0,53	0,76 +/-0,04	5,72+/-0,32	6,65+/- 0,63	305,2+/- 10,23
ABTS µmoles /g fbH	6,31 +/- 0,17	2,60+- 0,23	0,16 +/-0,003	5,21+/- 0,17	0,64+/- 0,012	28,06+/- 0,4
DPPH µmoles /g fbH	2,52 +/- 0,13	0,28 +/- 0,043	0,020 +/-0,05	0,85 +/-0,042	0,49 +/-0,009	24,54+/- 0,83
FRAP µmoles /g fbH	62,24 +/- 1,45	0,71 +/- 0,21	0,157 +/- 0,008	1,20 +/- 0,88	0,75 +/- 0,20	48,85+/- 0,34

Letras diferentes dentro de una fila corresponden a diferencias significativas por la prueba de Fisher (a = 0,05).

Respecto al estudio de las fracciones obtenidas por separación de la Amberlita® XAD 2 y la hidrólisis acida, se observó con base en la tabla de resultados, que las fracciones obtenidas presentan menores valores del contenido de fenoles libres y de la capacidad antioxidante que del extracto etanólico total obtenido por extracción sólido liquido.

Se podría sugerir que existe una actividad sinergistica entre los compuestos fenólicos presentes en la guayaba blanca y los compuestos responsables de la actividad

antioxidante tales como carotenoides y acido ascórbico con los fenoles, ya que se observa una menor capacidad antioxidante en el extracto metanólico crudo, respecto al extracto etanólico inicial. Como antecedente principal de este comportamiento, Bandy & Bechara (2001) reportaron cierta actividad sinergistica antioxidante entre la pareja ascorbato/quercetina.

Cabe la posibilidad que los fenoles que contiene la guayaba blanca en estado maduro, sean de naturaleza medianamente polar, más afines a solventes de extracción tales como el etanol o la acetona, lo cual podría justificar los menores valores hallados para las fracciones metanólicos en comparación a las fracciones etanólicos iníciales.

De manera general, se torna difícil establecer una relación estructura-actividad en el caso de los fenoles y determinar con efectividad los tiempos de reacción, toda vez que las muestras poseen una composición compleja. Se hace necesario, por consiguiente, un estudio debidamente extenso y específico en este sentido.

Recientemente, también se ha descrito la capacidad antioxidante de las proantocianinas o taninos condensados y los taninos hidrolizab1es (elagitaninos) de alto peso molecular, que llega a ser incluso 15 ó 30 veces superior a la atribuida a los fenoles simples. Como estos polifenoles no son absorbidos, pueden desarrollar su actividad antioxidante en el tracto gastrointestinal y proteger a las proteínas, lípidos e hidratos de carbono del daño oxidativo durante la digestión, actuando como antioxidantes solubles (Satuá-Gracia 1997).

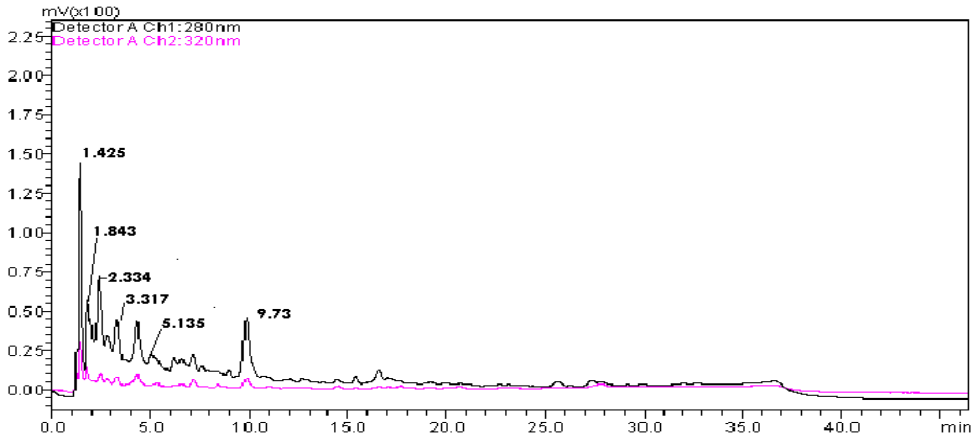
5.6 Identificación preliminar de fenoles por HPLC –MS

Este constituye una parte adicional de los objetivos inicialmente propuestos para este trabajo. Simplemente se quiso hacer una contribución a la identificación preliminar de algunos compuestos fenólicos que están presentes en la guayaba blanca en estado madura y que posiblemente son los responsables de la alta actividad antioxidante encontrada para esta fruta.

Números trabajos en la literatura destacan a la espectrometría de masas acoplada a un sistema de HPLC como una poderosa herramienta de análisis de muestras complejas tales como lo son frutas (Mullen 2003 , Chirinos 2009).

El cromatograma de la figura 27, muestra el perfil del extracto metanólico obtenido con Amberlita® XAD 2 obtenido bajo las condiciones descritas en el numeral 4.6.7

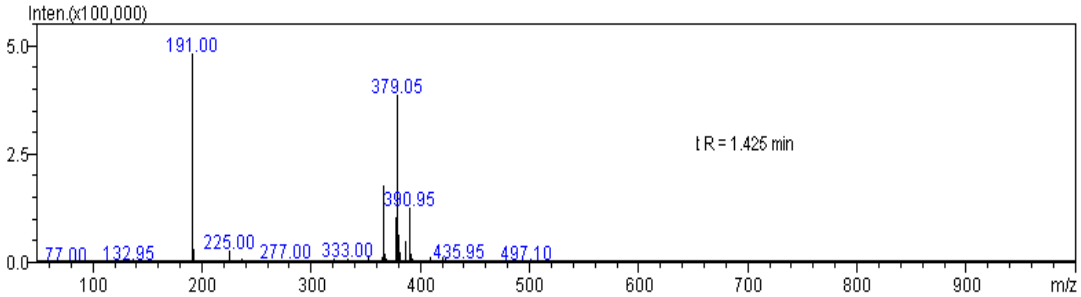
Figura 27. Cromatograma del extracto metanólico de Amberlita® XAD 2 por HPLC MS

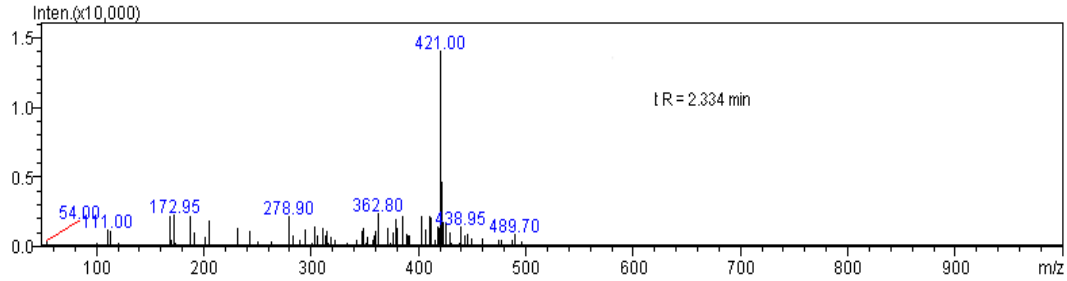


La anterior grafica muestra alrededor de 9 picos de absorción que fueron posteriormente analizados obteniéndose los espectros de masa con las respectivas respectivas fragmentaciones.

La figura 28 muestra los espectros de masas correspondientes a los tiempos de retención de 1.425 min y 2.334 minutos en modo negativo.

Figura 28. Espectro de masas para tiempos de retención de 1.425, 1.843 y 2.334 min

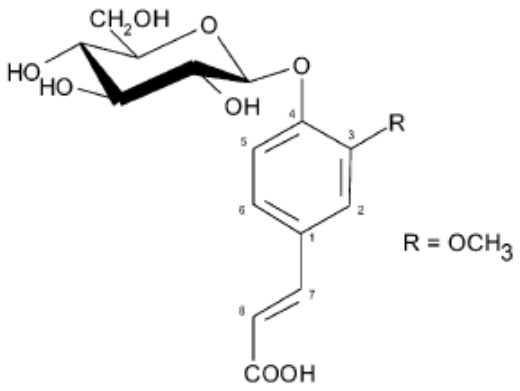




El primer espectro presenta un pico base de m/z 191 muy característico de compuestos derivados del acido cafeoilquinico producto de la pérdida del grupo del acido quínico (Y. Matsui 2007, Weisz 2009). Con base en la revisión bibliográfica y

lo reportado por P. Johnsson (2002) se determinó que el pico ion molecular m/z de 379 ha sido reportado para el compuesto ácido 4-O-β-D-glucopiranosil ferúlico.

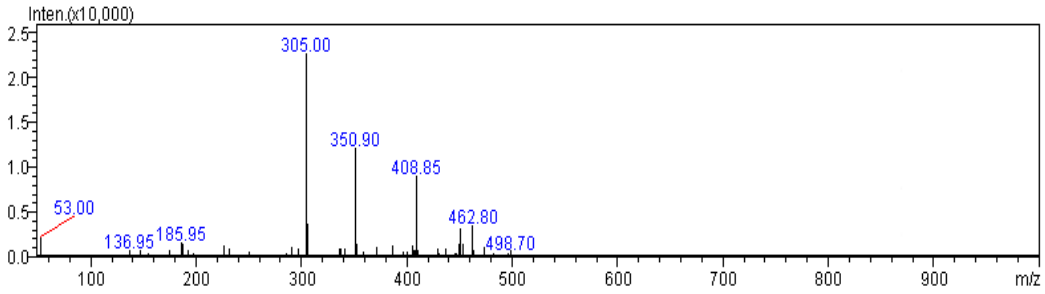
Figura 29. Estructura del ácido 4-O-β-D-glucopiranosil ferúlico.

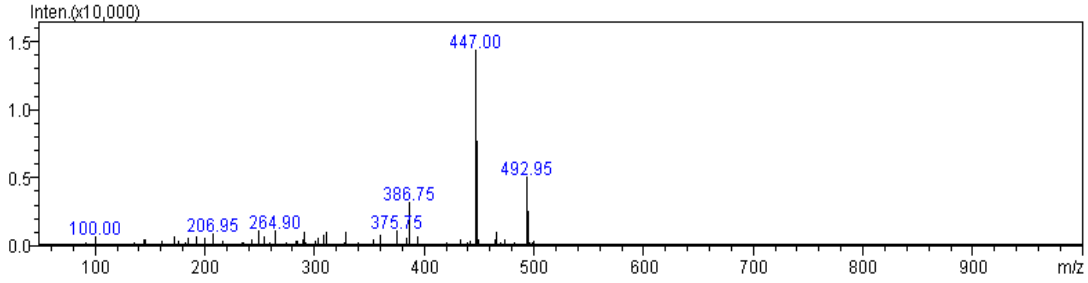


El segundo espectro muestra un pico base de m/z 421 y con base en la revisión bibliográfica y lo reportado por Bedgoog (2001) se determina que este fragmento es característico de un pentósido de catequina,

La figura 30 muestra los espectro de masas correspondientes a los tiempos de retención de 3,317 min, 5.135 y 9.73 minutos en modo negativo.

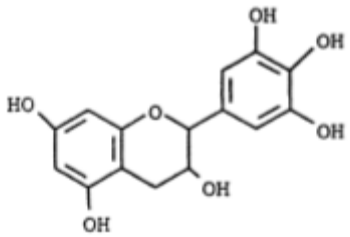
Figura 30. Espectro de masas para tiempos de retención de 3.317, 5.135 y 9.73 min





El primer espectro presenta un pico base de m/z 305 muy característico de la epigalocatequina (G.K Poon 1998) cuya estructura se muestra en la figura 31.

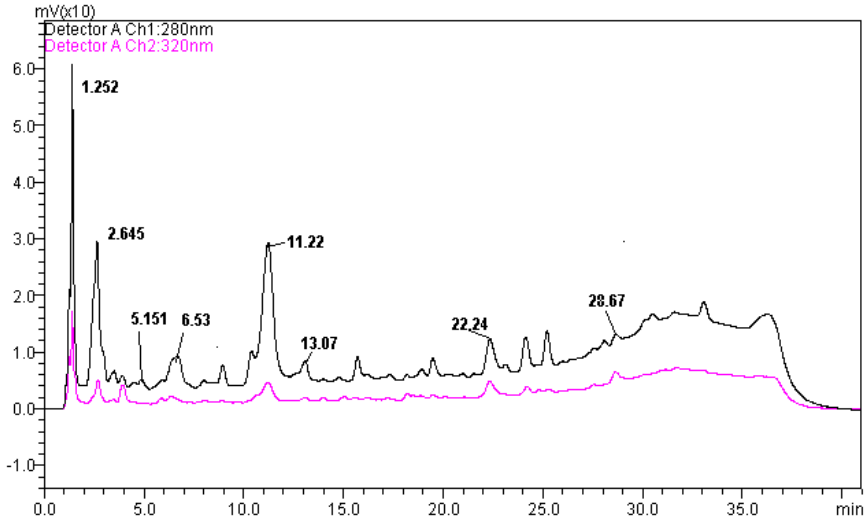
Figura 31. Estructura de la epigalocatequina.



El tercer espectro muestra un pico base de m/z 447 y con base en la revisión bibliográfica es un fragmento característico de flavonoides glicosilados (posiblemente quercetina O-ramnosido)

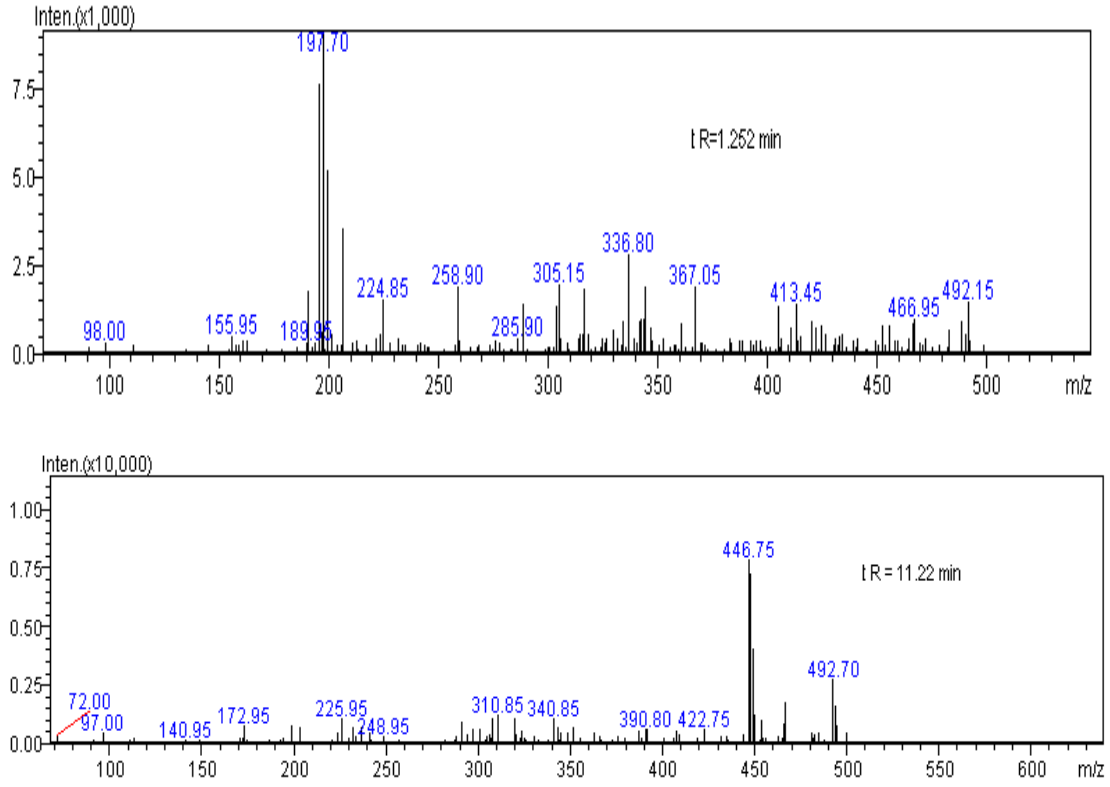
La figura 32 muestra el perfil cromatográfico de la fase orgánica producto de la correspondiente hidrólisis acida.

Figura 32. Cromatograma de fase orgánica producto de la hidrólisis acida del extracto metanólico.



La figura 33 muestra los espectro de masas correspondientes a los tiempos de retención de 1.252 min, 6.53 y 11.22 minutos en modo negativo.

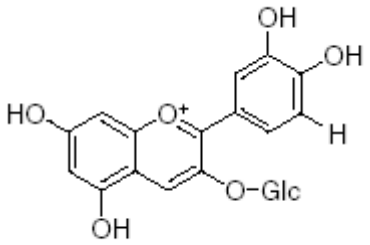
Figura 33. Espectros de masas para tiempos de retención de 1.252, 6.53 y 11.22 min



El primer espectro presenta un pico base de m/z 197.7 muy característico de de la pérdida de un fragmento estireno en flavonoides [M-104]. (H. Hao 1996) Además, presenta unos fragmentos característicos tales como m/z 337 reportado para compuestos tipo acidos cafeoilquinicos. Sin embargo no se presenta el fragmento m/z 191 que es que caracteriza principal de esta clase de compuestos.

También se reporta en compuestos tipo di –C-hexosil falvonas fragmentos m/z 337 y 367 observados en este espectro (J. Han 2007).

El segundo espectro muestra un pico base de m/z 447 que es muy común en compuestos tipo antocianidinas y coincide con la fragmentación hecha para el compuestos cianidin 3-glucosido (Q. Tian 2006) cuya estructura química se observa en la figura 34.



Tomado de Reynertson 2008

Figura 34. Estructura de la cianidin 3- glucosido

A continuación se presenta el espectro de masas del cianidin 3 glucósido reactivo estándar. Si se compara con el segundo espectro de la figura 33. Se observa una fragmentación similar.

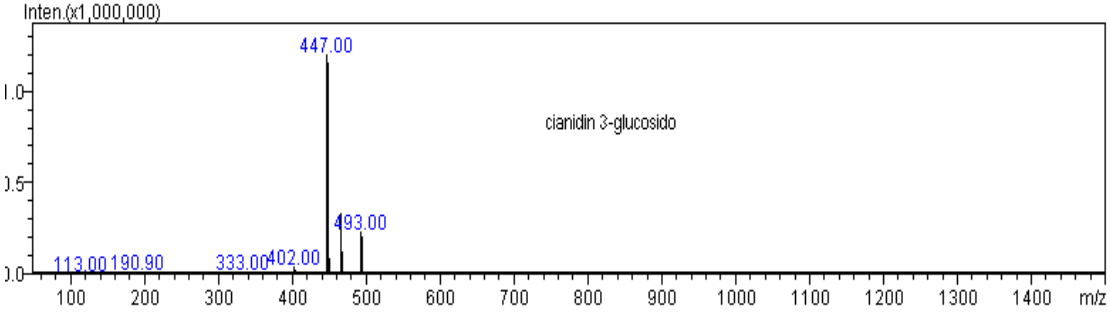
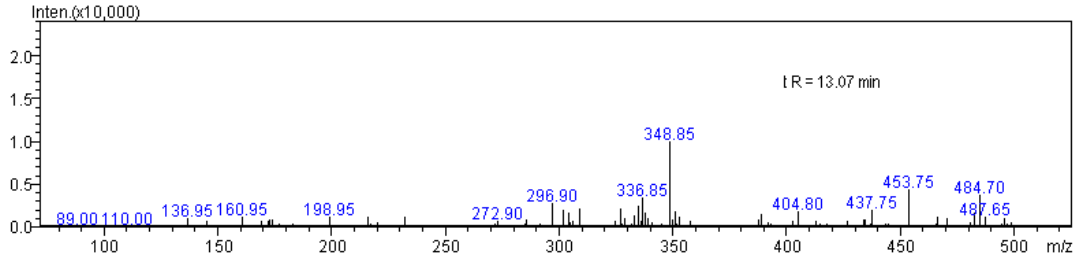


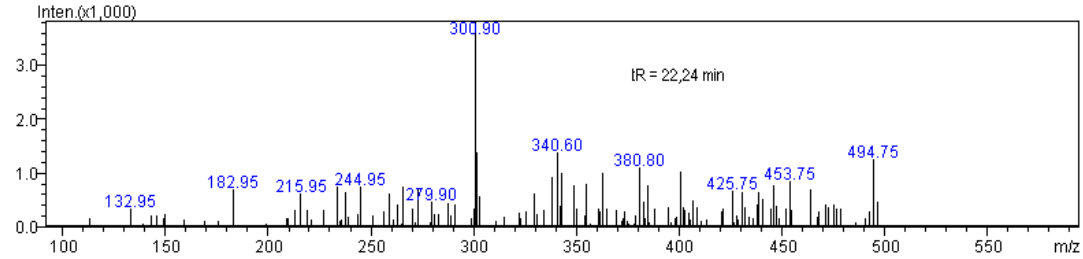
Figura 35. Espectros de masa para estándar cianidin 3- glucósido

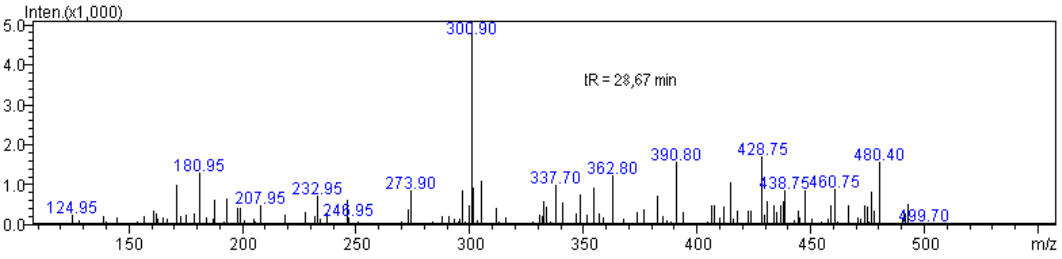
Lo anterior concuerda lo reportado por algunos autores (.Haslam 2007) que indican que los taninos condensados al hidrolizarse en medio acido y con altas temperaturas , producen antocianidinas. Por lo tanto este hecho puede dar indicios de la presencia de taninos condensados en la guayaba blanca.

La figura 36 corresponde a los espectros de masas de los tiempos de retención de 13,07 , 22.24 y 28.67 min.

Figura 36. Espectros de masa para tiempos de retención de 13,07 , 22.24 y 28.67 min







El primer espectro presenta un pico base de m/z 348.85 característico de derivados catequinicos enlazados a unidades de acido gálico (Rodríguez 2007) .

El segundo y tercer espectro muestra un pico base de m/z 301 característico en compuestos tales como la quercetina o de el acido ellagico (Mullen 2003).

Sin embargo, otros fragmentos característicos que se reportan en la literatura para identificación tentativa como son (m/z 257 y 229 para el acido elágico y m/z 179 y 151 para la quercetina) no se alcanzan a visualizar en los espectros de masa , de manera que no hay confirmación de la estructura del compuesto.

Figura 37. Espectro de masas y estructura de la quercetina reportado en la literatura.

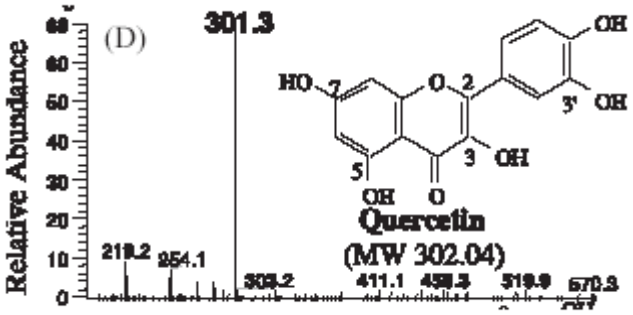
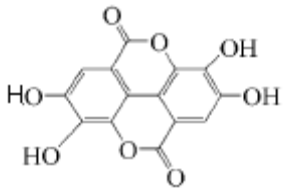


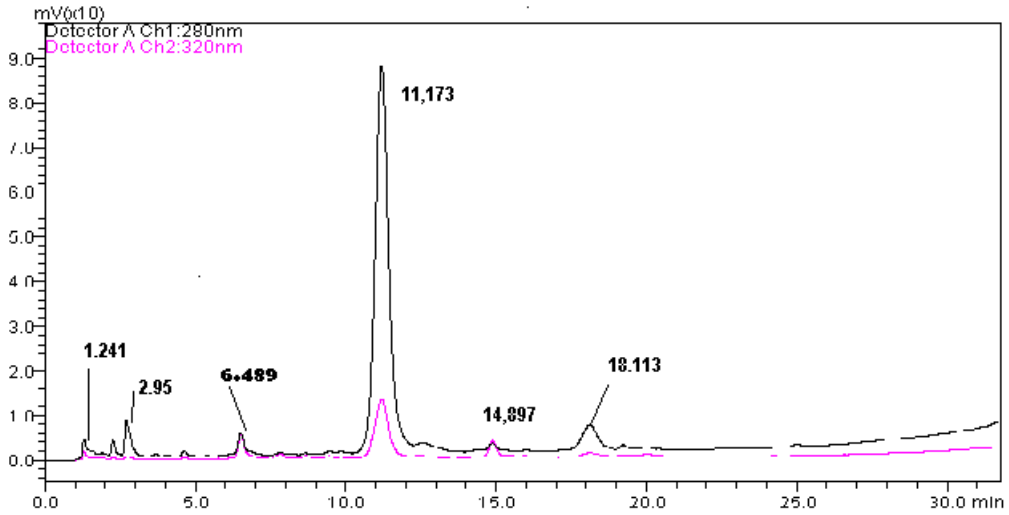
Figura 38. Estructura químico del acido elágico



Tomado de A.A. Franke 2004

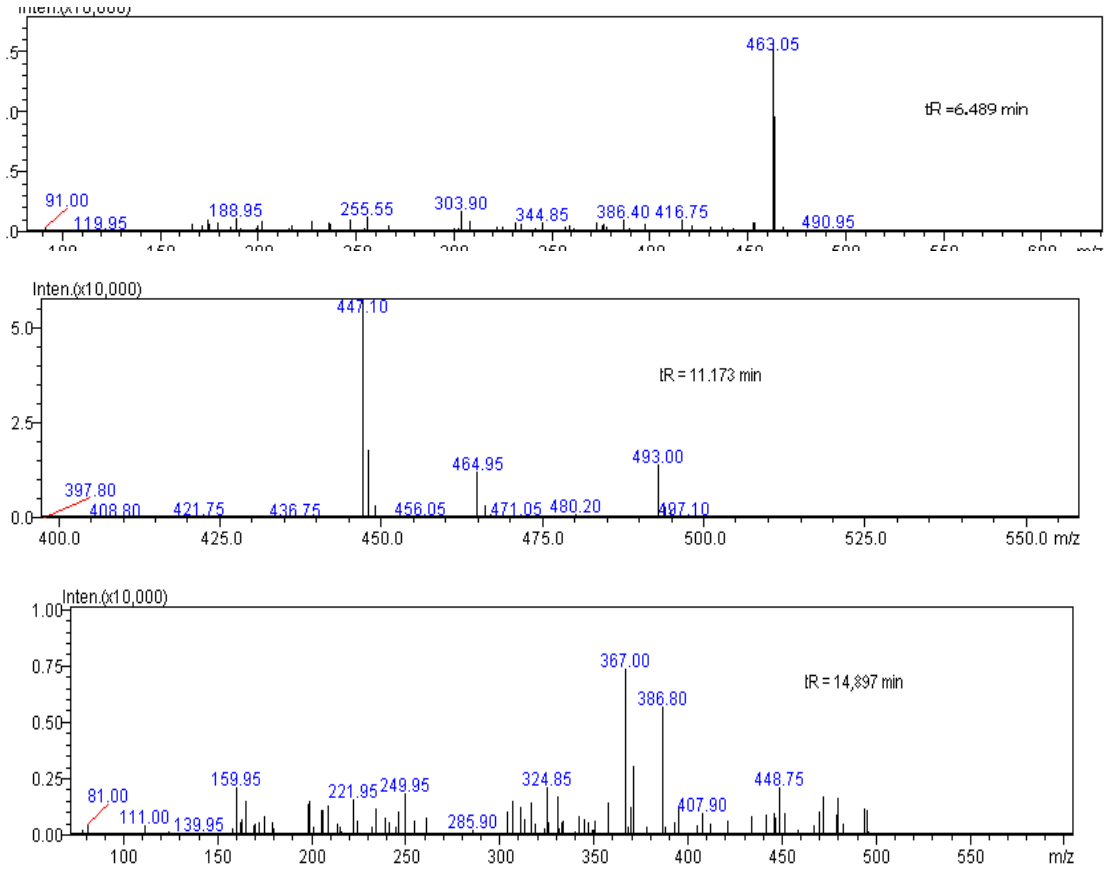
La figura 39 muestra el perfil cromatográfico de la fase acuosa producto de la correspondiente hidrólisis acida.

Figura 39. Cromatograma de fase acuosa producto de la hidrólisis acida del extracto metanólico.

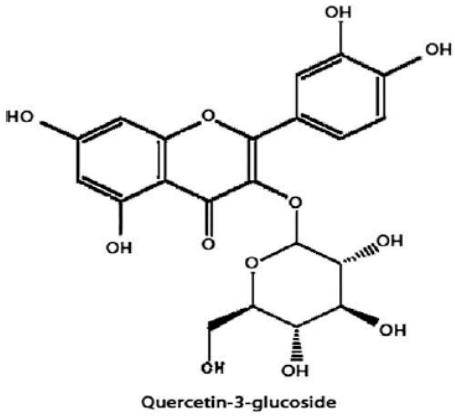


En este se muestran 4 espectros de absorción de importante intensidad. A continuación se muestran los espectros correspondientes a los tiempos de retención de 6,489, 11,173 y 14,997 min correspondientes a compuestos tipo antocianidinas.

Figura 40. Espectros de masa para tiempos de retención de 6,489 11,173 y 14,997 min



En el primer espectro, el pico base m/z 463 coicide con el reportado por Sihn (2009) para el compuesto quercetina-3- glucósido.



Tomado de Sihn 2009

Figura 41. Estructura de la quercetina 3- glucósido

Por otro lado, el segundo espectro presenta un pico base de m/z 447 característicos del compuesto hallado con anterioridad en la fase orgánica llamado cianidin -3-glucósido. El tercero espectro presenta la fragmentación característica de la

antocianidina llamada Cianidin ramnosa ya que coincide con algunos fragmentos reportados por autores como *Q. Tian (2005).*

Reynertson (2008) investigó 14 frutas de la familia de las *Myrtaceae* y reportó fenoles tales como cianidin 3-glucosido (1), delfinidin 3-glucoside, acido elágico (3), kaempferol , miricetina , quercetina, quercitrina , y rutina en extractos metanólicos.

Mahattanatawee 2006 reporta en muestras de guayabas blancas y rojas , acido ellagico, quercetina y ácidos gálicos conjugados. Aunque este mismo autor cita que Seshadri, (1964) reporta en la guayaba la presencia de quercetina, acido gálico, acido elágico, y guaijaverina-3-arabinosido.

Eidenberger en el 2007 en su patente de extracto de guayaba describe la presencia de compuestos como Quercitina-hexosa ,y pentosa. Guaijaverina e isoquercetina .

6 CONCLUSIONES

- De las variedades y estados de madurez de guayaba analizados, el extractos etanolitos obtenidos a partir de la regional blanca en estado maduro fue la que presentó mayor contenido de fenoles libres obteniendo un valor promedio de 305,5 ±10.23 mg de acido gálico/100g de guayaba en base húmeda , presentando diferencias estadísticamente significativas(DES) respecto las otras variedades y estados de madurez estudiados.
- La mayor capacidad antioxidante por las técnicas de DPPH*, FRAP se presentó en el extracto etanólico de la guayaba blanca en estado maduro, con el ensayo de ABTS se presentó mayor valor para la variedad guavatá victoria en estado maduro, obteniéndose resultados muy similares con la regional blanca madura pero con diferencias estadísticamente significativas.
- Se halló correlación entre el contenido de fenoles totales y los ensayos de capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de la guayaba medidos en los diferentes estados de madurez ABTS, DPPH y FRAP.
- Se hallo correlación intermedia entre el contenido de fenoles y el contenido de vitamina C total.
- Se halló muy baja correlación entre el contenido de fenoles libres y el ensayo de medición de capacidad antioxidante de decoloración del β caroteno.
- Las anteriores tres conclusiones nos permiten sugerir que la capacidad antioxidante de la guayaba va ligada al alto contenido de fenoles que esta presenta y por lo tanto a un alta capacidad captadora de radicales libres.
- La variedad regional roja madura fue la que presentó un mayor contenido de vitamina C total con un valor de 277,4±3,32 mg /100 g .
- La extracción con Amberlita® XAD 2 de los fenoles, permitió determinar que el extracto metanólico presentó un mayor contenido de fenoles libres y capacidad antioxidante que las fracción acuosa y que las obtenidas de la hidrólisis acida. Sin embargo, esta fracción metanólica no supera el valores obtenidos para el extracto etanólico inicial.
- El análisis cromatográfico realizado por HPLC-UV y HPLC MS de los productos de separación con amberlita e hidrólisis acida obtenidos para la guayaba blanca en estado maduro permitió identificar de manera preliminar compuestos fenólicos tales como: derivados del acido cafeoilquinico, epigalocatequina, quercetina y flavonoles

glicosidados, aunque también se muestran indicios de la presencia de taninos condensados.

- La información estructural fue obtenida tentativamente a través de comparación de espectros de masa con fragmentaciones características encontradas en la literatura, sin la necesidad de aislar los compuestos de manera individual.
- Se podría sugerir que existe una posible actividad sinergistica entre los compuestos fenólicos presentes en la guayaba blanca y entre los compuestos responsables de la actividad antioxidante tales como carotenoides y acido ascórbico con los fenoles, ya que se observa una menor capacidad antioxidante en el extracto metanólico obtenido por separación con Amberlita® XAD 2 , respecto al extracto etanólico inicial.
- Al comparar la guayaba de la variedad y estado de madurez que presentó mayor contenido de fenoles libres, (regional blanca madura) con otras frutas se observó un alto contenido de fenoles para la guayaba, y es superada solo por frutas tales como la acerola, la curuba y la mora de castilla.
- Al comparar la guayaba de la variedad y estado de madurez que presentó mayor contenido de vitamina C, (la regional roja madura), con otras frutas, se observó un alto contenido para la guayaba y solo es superada por el kiwi-

- Se confirmó a la guayaba como una fruta de gran valor nutricional, de acuerdo a los altos resultados obtenidos para el contenido de fenoles, capacidad antioxidante y vitamina C total.

7 RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de capacidad antioxidante tales como TRAP , ORAC. que utilizan el mecanismos de transferencia de átomos de hidrogeno para medir la capacidad antioxidante y compararlos con los ABTS,DPPH, FRAP que utilizan mecanismos de transferencia de electrones.
- Utilizar cromatografía preparativa o extracción con fase solida como una alternativa para fraccionar y purificar, para identificar tentativamente compuestos fenólicos presentes en las variedades de guayaba estudiadas.
- Investigar la capacidad antioxidante de los principales fenoles purificados y aislados obtenidos de la guayaba blanca.
- Realizar un trabajo con técnicas de purificación y análisis RMN C^{13} H^{1}para una mejor identificación de los fenoles q ue se han identificado de manera preliminar.
- Utilizar solventes de extracción de de mayor carácter lipofílico (como por ejemplo cloroformo), para observar el efecto y la correlación de la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles.
- Utilizar otras técnicas cromatográficas para intentar obtener un mejor fraccionamiento de compuestos fenólicos con base en su tamaño y peso molecular.
- Hacer un estudio especifico de extracción y purificación de los fenoles de la pulpa de la guayaba blanca para determinar su composición cuali y cuantitativa

8. BIBLIOGRAFIA

- Aaby et al. **(2007).** Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria ´ ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4395-4406

- A.A. Franke et al. **(2004).** Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii **.** *Journal of Food Composition and Analysis* 17 1–35

- Abu-Goukh, A. A., & Abu-Sarra, A. F**.** **(1993).** Compositional changes during mango fruit ripening. University of Khartoum. *Journal of Agricultural Sciences,* 1(1), 33–51.

- Alia Tejecal M , Saucedo Veloz .C, Martinez Damina M, Colina Leon, **(2008).** Temperaturas de almacenamiento en frutos de Mamey pouteria sapota j . *Revista Chapingo*, serie horticultura 6(1) 73-78.

- Alothman, M., Bhat, R., Karim, A.A. (**2008).** Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents, *Food Chemistry* doi: 10.1016/*J.Food.chem*. 12.005.

- Amarowicz, R., Wanasundara, U., Wanasundara, J., & Shahidi, F**.** **(1993).** Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a *â*-carotene–linoleate model system. *Journal of Food Lipids*, *1*, 111–117.

- Apak. R et al **(2007).** Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant CapacityAssays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, *12*, 1496-1547

- A.P. Singh et al. **(2009).** Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp/.*Food Chemistry* 114 955–961

- Arellano Gomez L,Saucedo Veloz C.Arevalo Galarz L. **(2005) .** Biochemical and physiological changes during ripening of black sapote fruit (*Diospyros digyna* Jacq.) *Agrociencia* , Marzo – abril.

- Arnao, M.B. **(2000).** Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science &Technology.* 11; 419-421.

- Bandy, B. Bechara, E. J. H. (**2001**). Bioflaavonoid rescue of ascorbate at a membrane interface. *Journal of Bioenergertics and Biomembranes*, 33, 269–277.

- Bedgood .D et al **(2005).** Analytical approaches to the determination of simple biophenols in forest trees such as *Acer*(maple), *Betula*(birch), *Coniferus*, *Eucalyptus*, *Juniperus*(cedar), *Picea*(spruce) and *Quercus*(oak) *The Analyst*, 130**,** 809

- Benzie, IF; Strain, JJ. (**1996).** The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power:" the FRAP assay. *Anal Biochem.*;239:70–76.

- H.A. Bashir, A.-B.A. Abu-Goukh . **(2003).** Compositional changes during guava fruit ripening. *Food Chemistry*. 80 557–563

- Berra B, Caruso D, Cortesi N, Fedeli E, Rasetti MF, Galli G. (**1995).** Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. *Riv. It. Sost. Grasse*;72: 285- 291.

- Brand-Williams W; Cuvelier, M. E;. Berset, C. (**1995).** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. Lebensm.-Wiss. u.-Technol.. 28.25-30.

- Bravo L. (**1998).** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*.; 56 (11): 317-333.

- Cao G, Sofic E, Prior RL. (**1997).** Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol Med*; 22: 749-760.

- Carter, T. Using Synthetic Antioxidants to Ensure Food Quality technologist, EastmanChemicalCompany.www.foodprocessing.com/whitepapers/2004/23.html 14-07-07

- Chirinos R. et al. **(2009).** HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (Oxalis tuberosa Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry* 113 1243–1251

- Crozier. A.et al. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages:measurements and bioavailability**.(2000).***Biol.Res*. v.33 n.2 Santiago

- Cuestas, M; Acuerdo regional de competitividad para la cadena productiva de guayaba, en Boyacá y Santander-Hoya del río Suárez. Corpoica.**(2002).**

- Decker, E. A.The Role of Phenolics, Conjugated Linoleic Acid, Carnosine, and Pyrroloquinoline Quinone as Nonessential Dietary Antioxidants.**(1995).** *Nutrition Reviews*. 53 (3) : 49-58.

- Eidenberger T.**(2007).** Patente extracto de guayaba. IPC8 Class:

AA61K31704FI

- FAO-www.rlc.fao.org/es/bases/alimento/print.asp?dd=1803
- Garcıa -Alonso, M;Pascual-Teresa S. Santos-Buelga C; Rivas-Gonzalo J.(**2004).**Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry.* 84 .. 13–18.
- Fernandez pachon M,Villaño D. Troncoso A. Garcia Parrilla A. **(2006).** Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*. v 56. 2.
- Gelves Torres, C. Manejo postcosecha y comercialización de guayaba (*psidum guajava L*); convenio Sena-Reino Unido, Cáp. 2;9 y 21.(**1998).**
- Gökmen V. ; Kahraman N. ; Demir N. ; Acar J. ; **(2000).** Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables, *Journal of chromatography.* 881, no 1-2. 309-316.
- G. Du et al. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. **(2009).** *Food Chemistry*. 113 557–562.
- *G .K .Poon* (1998).Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry *J . Chromatogr .A* 794 63– 74
- Gutierrez *R.M.P* et al. **(2008*).*** *Journal of Ethnopharmacology 117. 1–27*
- Halliwell, B; Gutteridge, J. (**1989).** In Free Radicals in Biology and Medicine; *Oxford University Press*: Oxford, U.K.**;**35-60.
- E. Haslam . **(2007)**. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime *Phytochemistry* 68 2713–2721
- H.Hao et al **.(1996)**. Flavonoids from *isodon oresbius. phytochemistry, vol.* 42, no. 4, pp. 1247-1248
- H.A. Bashir, A.-B.A. Abu-Goukh. **(2003)** Compositional changes during guava fruit ripening. *Food Chemistry* 80. 557–563.
- Horemans, N.; Foyer, C. H.; Potters, G.; Asard, H. **(2000).** Ascorbate funtion and associated transport system in plants. *Plant Physiol. Biochem*. 38, 531-540.
- Huang D.Ou B. Prior R. **(2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*., 53, 1841-1856.

- Ibrahim, K. E., Abu-Goukh, A. A., & Yusuf, K. S. (**1994).** Use of ethylene, acetylene and ether on banana fruit ripening. *Journal of Agricultural Sciences*, 2(1), 73–92.

- Isaza H.J .Taninos o polifenoles vegetales. **(2007).** *Scientia Et Technica*. Abril vol XIII.n 033. P 13-18

- Jimenez-Escrig A. Rincón M. Pulido R Saura-Calixto .F. **(2001).** Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. *J. Agric. Food Chem.***,** *49,* 5489-5493.

- *J. Han et al.* **(2007) .** Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupledwith electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B 848 355–362*

- *J. Zhang et al.* **(2005).** Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of *Adinandranitida* by high performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection *Analytica Chimica Acta* . 532. 97–104

- J.K. Prasain et al.(**2009).** Liquid chromatography tandem mass spectrometry identfication of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. *Phytomedicine* 16 .233–243.

- K.A. Reynertson et al. **(2008).** Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry* .109. 883–890

- Kalt, W.; Forney, C. F.; Martin, A.; Prior, R. L. (**1999).**Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem*. 47, 4638- 4644.

- (Kamath.J. Rahul N.Kumar A.Laskshmi M.(**2009).** *Psidium Guajava* L. Review. *International Journal of Green pharmacy* .January /March, vol 2. Issue 1.

- Kumaran, A., & Karunakaran, J. R.(**2006).** Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry, 97*, 109–114.

- Kuskoski, et Al. (**2005).** Determination de la capacidad antioxidante de pulpa de frutos; *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*; 25(4): 726-732.

- La calle A. **(2007).** Antioxidantes en la alimentación: diferentes formas de expresar la actividad antioxidante. Barcelona. Neiker editores.pdf

- Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JRS, Halliwell B. (**1991).** Inhibition of mammalian 5-lipooxigenase and cyclooxigenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron reducing ability. *Biochem Pharmacol*.; 42: 1673-1681.

- Lu, Y., & Foo, L.Y. **(1999).** Rosmarinic acid derivatives from Salvia officinalis.
  Phytochemistry, *51*, 91–94. 295.

- Mahattanatawee, et al (**2006**). Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits. *J. Agric. Food Chem*. 54, 7355-7363.

- Mariod.A. Matthaus B. **(2006).** Antioxidant activity of extracts from *sclerocarya birrea* kernel oil cake. *Grasas y Aceites*, 57 (4), octubre-diciembre, 361-366 ,

- Michael, C. Latham. De las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, Roma,.,Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, *Colección FAO Alimentación y nutrición N° 2.* **2002.**

- Mueller Harvey I. Tannins Hydrolysable**. (2001).** *Animal feed and science technology*.91. 3-20

- Mullen W, Yokota T. Lean M, Crozier A. **(2003).** Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MS *Phytochemistry* 64 . 617–624

- N. Nuengchamnong, K. Ingkaninan. (**2009).** On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection .*Food Science and Technology.* 42. 297–302.

- Noruma, T.; Kikuchi, M.; Kawakami, Y. **(1997).** Proton-Donative Antioxidant Activity of Fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem. Mol. Biol. Int.*, *42*, 361-370.

- P. Johnsson et al .Polymeric fractions containing phenol glucosides in axseed **(2002)** . *Food Chemistry* 76 207–212

- Palazón, J. Cusidó. R.M. y C. Morales. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino. *ACE Revista de enología.* www.acenologia.com/ciencia55_2.htm.consultada 22/04/09

- Pannala AS, Chan TS, O'Brien P, Rice-Evans C. (**2001).** Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Com.***;** 282: 1161-1168.

- Patthamakanokporn et al. **(2008).** *Journal of Food Composition and Analysis* 21. 241–248.

- Phipps S. M, Maged H. M. Sharafz, Butterweck V. **(2007).** Pharmacopeial Assessing Antioxidant Activity in Botanicals and Other Dietary Supplements. Forum 810 of the USPC or the USP Council of Experts Vol. 33(4) July–Aug.

- Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. **(2005).** Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem. 53*, 4290-4302.

- Q. Tian et al. **(2005)** Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis,common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *Journal of Chromatography* A, 1091.72–82

- Q. Tian et al. **(2006)** .Characterization of a new anthocyanin in black raspberries
  Rubus occidentalis) by liquid chromatography electrosprayionization tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 94. 465–468

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. **(1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9/10), 1231–1237.L.

- Restrepo, D. Narváez -Cuenca C, Restrepo-Sánchez L. **(2008).** Extracción de compuestos con actividad de frutos de guayaba cultivada en Vélez Santander, Colombia. *Quím. Nova*, in press .

- Rodriguez J. et al. (2007) Identification of secundary metabolites of *miconia* species (melastomataceae) by esi/ms/ms analyses. Reporte

- Salisbury F., y C. Ross. **(1996).** Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamericana.México. 759 p.

- Satué-Gracia MT, Heinonen M y Frankel EN. **(1997).** Anthocyanins as antioxidants on human low-densidity lipoprotein and lecitin-liposome systems. *J Agric Food Chem*,45: 3362-3367.

- Shahidi, F.Y; Naczk, (**1995).** M. Methods of Analysis and Quantification of Phenolic Compounds in Food phenolics. Technomic, Publishing Co. Inc.;Lancaster,**.** 281-319.

- Simirgiotis et al. **(2009).** Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya Vasconcellea pubescens A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry* 115. 775–784.

- Soares et al .Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava
fruit (Psidium guajava) at diferent stages of maturity. **(2007).** *Food Chemistry* 100 .15–21.

- Soong Y; Barlow J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. (**2004) .***Food Chemistry* 88 . 411–417..

- Stangeland et al **(2008).** Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables *Food chemistry*.

- Simunic et al.Determination of anthocyanins in four croatian cultivars of sour cherries (prunus cerasus). **(2005).** *Eur Food res technol* .220:575–578.

- Thaipong K; B oonprakobl U; Cisneros-Zevallos L; Byrne D. **(2005).** Hydrophilic and lipophilic antioxidants activities guava fruits.vol 36.suppl 4.

- Thaipong. K; Boonprakoba U. Crosbyb K; Cisneros-Zevallosc L. Byrne D. **(2006).** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19. 669–675.

- Tosun. I. Sule Ustun1 N.Tekguler B. **(2008) .** Physical and chemical changes during ripening of blackberry fruits. *Sci. Agric*. v.65, n.1, p.87-90,

- Tsimidou, M.(**1998).** Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital J Food Sc*i;2,(10): 99-116.

- Vasco C, Ruales J; Kamal-Eldin A. (**2008**). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry.* 111. 816–823.

- Velioglu, Y.S., G Mazza; L. Gao ; B.D. Oomah. (**1998).** Antioxidant and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J. *Agric. Food Chem*.**.** 46, 4113-4117**.**

- Villamizar Cesar. CIMPA-La agroindustria de la guayaba en la provincia de Vélez, en el departamento de Santander Colombia. Barbosa sep **2000.**

- Vinson, J. A.; Su, X.; Zubik, L.; Bose, P. **(2002) .**Phenol antioxidant *Chem*, *50*, 7449-7454.(18).

- Wang, S.Y.; Lin, H.S. **(2000).** Antioxidant activity in fruits and leaves of Blackberry, Raspberry and Strawberry varies with cultivar and development stage. *J. Agric. Food Chem*. **48**, 140-146.

- Weisz G.M et al. **(2009).** Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (Helianthus annuus L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS. *Food Chemistry* in press .

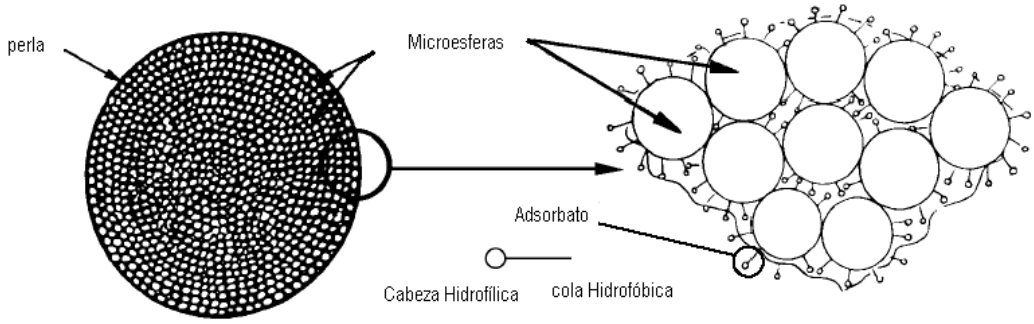
- Yang, S. F. **(1985).** Biosynthesis and action of ethylene. *HortScience*.20 (1): 41-45.

- Y.Y. Lim et al. **(2006).** Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*.

- Y. Matsui et al.**(2007).** Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of chlorogenic acids and their metabolites in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 858 96–105

GLOSARIO

Amberlita® XAD 2: es una resina adsorbente polimérica no iónica, formada por un copolímero de poliestireno entrecruzado. La resina es ampliamente utilizada para adsorber compuestos orgánicos solubles de flujos acuosos o de solventes orgánicos. Se caracteriza por presentar una porosidad macroreticular (macroporosa) única y su apariencia es la de pequeñas perlas esféricas blancas y duras. Cada perla está formada por una aglomeración de múltiples y pequeñas microesferas que presentan una fase gel continua y una fase gel porosa. La estructura porosa de celdas abiertas permite al agua penetrar los poros fácilmente. Durante el proceso de adsorción la porción hidrofóbica de, la molécula del adsorbato, se adsorbe preferencialmente sobre la superficie hidrofóbica de la resina de poliestireno, mientras la parte hidrofílica del adsorbato permanece orientada en la fase acuosa.



Tomado de www.Sigma Aldrich.com

Antioxidantes: Moléculas que a bajas concentraciones, respecto a las de un sustrato oxidable, retardan o previenen su oxidación.

Capacidad antioxidante: se define como la capacidad que tiene ésta de: captar químicamente los radicales libres o suprimir la formación de especies reactivas envueltas en la producción de radicales libre que actúan sobre los sustratos en la propagación de la cadena de reacciones oxidativas.

Fenoles: compuestos que tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo.Cuando se habla de fenoles libres se efiere a fenoles que no

Guayaba: Es una fruta de la familia de las *Mirtáceas*, nativa del Caribe, América Central, América del Norte y el norte de Sudamérica, comestible, redonda o en forma de pera, entre 3 a 10 cm en diámetro. Tiene una corteza delgada y delicada, color verde pálido a amarillo en la etapa madura en algunas especies, rosa a rojo en otras, pulpa blanca cremosa o naranja-salmón con muchas semillitas duras y un fuerte aroma característico. Es rica en vitaminas A, B y C.

Tomado de wikimedia.com

Liofilización: es un proceso de secado mediante sublimación que se ha desarrollado con el fin de reducir las pérdidas de los compuestos responsables del sabor y el aroma en los alimentos, los cuales se afectan en gran medida durante los procesos convencionales de secado.

La liofilización involucra varias etapas:

- Congelación (y acondicionamiento en algunos casos) a bajas temperaturas
- Secado por sublimación del hielo (o del solvente congelado) del producto congelado, generalmente a muy baja presión
- Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas.

Tomado de www.demoprogresista.org.ar/actago06/Liofilizaci%F3n.doc

Radical libre: Un radical libre es cualquier especie que contiene uno o más electrones desapareados y que es capaz de mantener una existencia independiente.

HPLC UV-vis (*cromatografía liquida de alta resolución con detector UV-VIS*): Es un tipo de cromatografía de alta resolución que utiliza como medio de discriminación de especies un detector UV-VIS que mide la habilidad de los compuestos cromóforos de absorber la luz ultravioleta o luz visible en el rango de 190-400 nm o 400 a 700 nm respectivamente.

HPLC MS o EM: es una técnica de análisis químico que combina la capacidad de separación de la cromatografía liquida de alta presión (HPLC) con el análisis de masas de un espectrómetro de masas (EM). Generalmente su aplicación se da en la detección y potencial identificación de especies químicas en mezclas complejas.

ESI (modo de ionización por electrospray): es una técnica utilizada en espectrometría de masas para producir iones. El mecanismo de ionización se debe a que el líquido que contiene el analito de interés es dispersado por electrospray para formar un fino aerosol.