CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ABLANDAMIENTO DE LA GUAYABA PALMIRA ICA I (*Psidium guajava*)

MAURICIO ESPINAL RUIZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2010

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ABLANDAMIENTO DE LA GUAYABA PALMIRA ICA I (*Psidium guajava*)

MAURICIO ESPINAL RUIZ

Tesis presentada como requisito para optar al título de
Magíster en Ciencias Química

Directora
Luz Patricia Restrepo Sánchez
Química, M.Sc. Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2010

Nota de aceptación

_____

_____

_____

_____

_____

Jurado

_____

Jurado

_____

Director

A Jeimmy por ofrecerme su incondicional amor

A mis padres por su enorme paciencia y comprensión

A mis hermanos por su inmenso apoyo

A Juan David por traer felicidad a nuestras vidas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia por ofrecerme una educación íntegra y permitirme alcanzar este importante logro en mi carrera profesional.

Al Departamento de Química y al Posgrado en Química por la educación de alta calidad impartida.

A COLCIENCIAS y a la División de Investigación sede Bogotá (DIB) por la financiación de mi pasantía de investigación en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) en Valencia-España, a ASOHOFRUCOL y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación del proyecto de investigación "Obtención de antioxidantes y fibra dietaria a partir de la guayaba" del programa de investigación "Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba para el fortalecimiento de la cadena productiva".

Al grupo de investigación Estudio de los Cambios Químicos y Bioquímicos de Alimentos Frescos y Procesados por permitirme acceder al conocimiento que aprendí allí y por permitirme llevar a cabo este estudio.

A la profesora Luz Patricia Restrepo por toda la confianza depositada en mi a lo largo de mis estudios de pregrado y posgrado, por su interminable paciencia y por todos lo conocimientos impartidos a lo largo de toda la investigación.

A los profesores del grupo de investigación Carlos Narváez, Fabián Parada, Cecilia Anzola y Laura Ortiz por todos los aportes realizados.

A los profesores Elizabeth López, Rubén Darío Godoy, Néstor Algecira, Pedro de Britto, Mario Velásquez, César Sierra, Fabián Parada y Freddy Ramos que me impartieron sus valiosas enseñanzas a lo largo de la maestría.

A mis compañeros de laboratorio Sandra, Juanita, Martha, Henry, Kelly, Julio, Leidy, Leo, Francy, Jorge Iván, Javier y Enrique por su grata compañía y su gran colaboración.

Al grupo de investigación Bioquímica de Interacción Hospedero-Patógeno, a las profesoras Blanca Higuera y Sixta Martínez y a los estudiantes Harold, Ana Patricia, María Mercedes y Sandra por todos los aportes realizados.

A los doctores Lorenzo Zacarías, María Jesús Rodrigo, María Teresa Lafuente, Patricia Roche, José Vicente Gil y Aníbal Herrera del grupo de investigación en Fisiología y Biotecnología Poscosecha del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) por permitirme realizar la pasantía de investigación y por su inmensa colaboración en la realización de este trabajo.

A Ana, Cristina, Pedro, Paco, Víctor, Arancha, Lourdes y Mónica, estudiantes del grupo de investigación Fisiología y Biotecnología Poscosecha del IATA-CSIC por ofrecerme su gran ayuda y amistad durante la realización de la pasantía.

A Amparo Beneyto por haberme acogido en su casa y por haberme brindado su inmensa e incondicional amistad.

A mis amigos de siempre Sofía, Wold, Fernando, Catalina, Carolina y Juan Camilo por su compañía, apoyo y amistad.

A mi familia por todo su apoyo e incondicional compañía en cada uno de las etapas de mi carrera y de mi vida.

A Jeimmy por toda su comprensión, amor y su apoyo incondicional, por ser mi principal motivación para seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN....1
2. INTRODUCCIÓN....4
3. HIPÓTESIS....8
4. OBJETIVOS....9
4.1. General....9
4.2. Específicos....9
5. ASPECTOS TEÓRICOS....10
5.1. Generalidades del fruto....10
5.2. Cambios asociados a la maduración....12
5.3. Pardeamiento enzimático....15
5.4. Compuestos fenólicos, ácido ascórbico y capacidad antioxidante....17
5.5. Polifenoloxidasa PFO (E.C. 1.10.3.2)....24
5.6. Peroxidasa POD (E.C. 1.11.1.7)....25
5.7. Ablandamiento del fruto durante la maduración....27
5.8. Sustancias pécticas....27
5.9. Fibra dietaria....29
5.10. Enzimas pécticas....31
5.11. Pectinesterasa PE (E.C. 3.1.1.11)....31
5.12. Poligalacturonasa PG (E.C. 3.2.1.67)....32
6. METODOLOGÍA....34
6.1. Material vegetal....35
6.2. Caracterización fisicoquímica del estado de madurez....35
6.2.1. Intensidad respiratoria....35
6.2.2. Índice de madurez....35
6.2.3. Color instrumental....36
6.2.4. Firmeza instrumental....36
6.3. Cuantificación de la capacidad antioxidante total....37
6.3.1. Extracción de los compuestos antioxidantes....37
6.3.2. Método ABTS....37
6.3.3. Método DPPH....38
6.3.4. Método FRAP....38
6.3.5. Método de decoloración del β-caroteno....39

6.4. Identificación y cuantificación de los compuestos con actividad antioxidante 40
6.4.1. Cuantificación HPLC-UV de ácido ascórbico 40
6.4.2. Cuantificación de los compuestos fenólicos libres 40
6.4.3. Identificación y cuantificación HPLC-DAD de los compuestos fenólicos 41
6.4.4. Cuantificación de los compuestos carotenoides totales, Identificación y cuantificación HPLC-DAD de los compuestos carotenoides 42
6.5. Cuantificación de la fibra dietaria total, soluble e insoluble 45
6.6. Extracción y medida de actividad de las enzimas antioxidantes y de ablandamiento 46
6.6.1. Parámetros evaluados para la extracción de las enzimas 46
6.6.2. Parámetros evaluados para la medida de actividad de las enzimas 46
6.6.3. Extracción de las enzimas 47
6.6.4. Medida de actividad de la peroxidasa (POD) 47
6.6.5. Medida de actividad de la polifenoloxidasa (PFO) 47
6.6.6. Medida de actividad de la poligalacturonasa (PG) 47
6.6.7. Medida de actividad de la pectinesterasa (PE) 48
6.6.8. Cuantificación de proteína 48
6.7. Ensayo de estrés oxidativo sobre levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) 49
6.7.1. Medio de cultivo 49
6.7.2. Preparación del inóculo 49
6.7.3. Preparación de las medidas 50
6.7.4. Cuantificación del crecimiento celular 50
6.7.5. Selección del mejor solvente para los compuestos carotenoides 51
6.8. Diseño experimental 51
6.9. Análisis de datos 52
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 53
7.1. Caracterización fisicoquímica del estado de madurez 53
7.2. Cuantificación de la actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica 60
7.3. Identificación y cuantificación preliminar de los compuestos con antioxidantes 65
7.4. Comportamiento de la fibra dietaria durante la maduración 83
7.5. Enzimas antioxidantes (POD y PFO) y de ablandamiento (PG y PE) 85
7.5.1. Determinación de las mejores condiciones de extracción de las enzimas 85
7.5.2. Determinación de las mejores condiciones de medida de actividad de enzimas 93
7.5.3. Comportamiento de la actividad enzimática durante la maduración 103
7.6. Determinación de correlaciónes 107

7.7. Ensayo de estrés oxidativo sobre la levadura 110
8. CONCLUSIONES 116
9. RECOMENDACIONES 120
10. BIBLIOGRAFÍA 121
11. ANEXOS 139

1. RESUMEN

El objetivo central del presente estudio fue contribuir al conocimiento de los fenómenos químicos y bioquímicos relacionados con la capacidad antioxidante y el proceso de ablandamiento de los frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) variedad Palmira ICA I a lo largo de su maduración. Para cumplir con este objetivo, se realizó la cuantificación de la capacidad antioxidante por métodos hidrofílicos (ABTS, DPPH y FRAP) y lipofílico (decoloración del β-caroteno) del fruto de guayaba en los estados de maduración verde, pintón, maduro y senescente. Con el fin de atribuir la capacidad antioxidante química del fruto de guayaba a diferentes compuestos específicos, se realizó la cuantificación de los compuestos fenólicos, ácido ascórbico y carotenoides totales. Se identificaron y cuantificaron por HPLC-DAD los principales compuestos fenólicos y carotenoides que podrían contribuir significativamente a la capacidad antioxidante del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I. Se determinó también la capacidad antioxidante enzimática mediante la cuantificación de la actividad de las enzimas POD (peroxidasa) y PFO (polifenoloxidasa). Para esto, se puso a punto una metodología de extracción y medida de actividad de estas enzimas y se evaluó su comportamiento en los frutos en estados verde, pintón, maduro y senescente. El efecto protector de los compuestos antioxidantes extraídos de la guayaba (carotenoides) en los estados verde, pintón, maduro y senescente fue evaluado mediante la medida de la supervivencia de una cepa de levadura (*Saccharomyces cervisiae*) sometida a un estrés oxidativo inducido con H_2O_2.

El fenómeno de ablandamiento enzimático del fruto de guayaba fue realizado mediante la cuantificación de la actividad de las enzimas PG (poligalacturonasa) y PE (pectinesterasa) y la posible relación que éstas tienen con los cambios composicionales de la fibra dietaria total, soluble e insoluble que ocurren en el fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante el proceso de maduración. Para lograr este objetivo se puso a punto una metodología de extracción y medida de actividad de estas enzimas y se evaluó su comportamiento durante el proceso de maduración.

Para determinar el estado de maduración del fruto y asegurar que los frutos presentaron procesos normales de crecimiento y desarrollo se midieron las características fisicoquímicas de la guayaba durante el proceso de maduración. Se observó que el contenido en sólidos solubles aumentó, mientras que la acidez titulable disminuyó, por lo que el índice de madurez aumentó progresivamente. El color de la corteza cambió desde verde en el estado más inmaduro hasta el

amarillo en los estados pintón y maduro, para evolucionar hasta tonalidades marrón-ocre en estado senescente. La pulpa presentó color rojo durante toda la maduración, aunque se observó un claro aumento de la intensidad del color a lo largo de este proceso. La firmeza de la corteza y de la pulpa disminuyó a lo largo de la maduración, siendo la firmeza de la corteza mayor que la de la pulpa en todos los estados analizados. La intensidad respiratoria aumentó hasta el estado maduro y disminuyó durante la etapa de senescencia, permitiendo verificar que la guayaba es un fruto que presenta un patrón respiratorio climatérico.

Como resultados del estudio se encontró que la actividad antioxidante por todos lo métodos, la concentración de fenoles libres, carotenoides totales, ácido ascórbico y la actividad de la POD y PFO aumentan durante el proceso de maduración del fruto, donde se encuentra el máximo climatérico y las mejores cualidades sensoriales, y disminuyen durante la etapa de senescencia del fruto. El método de actividad antioxidante de FRAP usando $FeSO_4$ como patrón fue el método que presentó la mejor respuesta a la actividad antioxidante (56,87 μmol $FeSO_4$/ g fruta), seguido del método ABTS (48,57 μmol trolox/ g fruta), FRAP con trolox como patrón (36,09 μmol trolox/ g fruta), decoloración del β-caroteno (13,06 μmol α-tocoferol/ g fruta) y DPPH (5,93 μmol trolox/ g fruta), todos medidos en el estado maduro (índice de madurez de 20,17 ºBrix/ % ácido cítrico). Los compuestos polifenólicos, el ácido ascórbico y las enzimas POD y PFO contribuyeron significativamente a la actividad antioxidante hidrofílica, mientras que los compuestos carotenoides totales contribuyeron significativamente a la actividad antioxidante lipofílica, además de que se evidenció que la actividad antioxidante del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I es principalmente de carácter hidrofílico.

Por otro lado, la evolución del perfil de carotenoides y polifenoles se analizó mediante HPLC-DAD. En todos los estados el licopeno fue el carotenoide mayoritario, seguido de fitoeno, β-caroteno, luteína y fitoflueno, mientras que el ácido elágico, morina y quercetina fueron los principales compuestos polifenólicos identificados durante el proceso de maduración. El licopeno, un caroteno con alta capacidad antioxidante y propiedades beneficiosas para la salud, aumentó su concentración desde 65,9 μg/g en el estado verde hasta 143,3 μg/g en el estado maduro, y disminuyó hasta 111,3 μg/g en el estado senescente, mientras que el ácido elágico, un importante metabolito antioxidante, aumentó su concentración desde 54,3 μg/g en el estado verde hasta 140,1 μg/g en el estado maduro, y disminuyó hasta 64,1 μg/g en el estado senescente. En general, los resultados de este trabajo indican que el contenido y composición de carotenoides, polifenoles, ácido ascórbico y las enzimas POD y PFO contribuyen

significativamente con la capacidad antioxidante total del fruto, y que en los estados pintón y maduro se encuentran el mayor potencial antioxidante del fruto de guayaba, siendo indicativo de que en estos estados de madurez el fruto ha desarrollado sus mejores características sensoriales y funcionales y que son los mejores estados de maduración para el consumo del fruto en fresco y procesado.

En cuanto al fenómeno de ablandamiento del fruto de guayaba se determino que fue promovido por las enzimas PG y PE. Durante el proceso de maduración, entre los estados verde y maduro, se encontró que el ablandamiento del fruto fue mayor (observado en la rápida disminución de la firmeza) y que las enzimas fueron más activas en estos estados de maduración, indicando una estrecha correlación entre la firmeza, el ablandamiento y la actividad enzimática de PG y PE. La concentración de la fibra dietaria soluble se correlacionó directamente con la actividad de la PG, mientras que la fibra dietaria total se correlacionó con la actividad de la PE, indicando que la composición de la fibra dietaria contribuye significativamente a la actividad de las enzimas de ablandamiento, y que el control de la actividad de estas enzimas con tratamientos poscosecha podría evitar el excesivo ablandamiento del fruto de guayaba durante la maduración, permitiéndole conservar así sus óptimas propiedades organolépticas durante un mayor período de tiempo.

Las excelentes propiedades funcionales encontradas en los frutos de guayaba en los estados pintón y maduro hacen que los frutos en estos estados de madurez sean los mejores frutos para el consumo en fresco, como fuente natural de antioxidantes y fibra dietaría o para su uso como suplementos alimentarios en alimentos funcionalmente menos favorecidos.

2. INTRODUCCIÓN

La comercialización de los frutos exóticos en Colombia va en continuo crecimiento, en especial aquellos frutos cuyo fin es el consumo fresco basado en sus propiedades funcionales, como la guayaba variedad Palmira ICA I (conocida también como guayaba pera). Sin embargo, en la mayoría de los casos, las condiciones de manipulación y almacenamiento no siempre son las mejores debido a que no se cuenta con la tecnología y conocimientos apropiados para llevar a cabo los adecuados tratamientos y manipulaciones poscosecha de la fruta. La guayaba es un fruto exótico proveniente de la región tropical y subtropical del mundo que es ampliamente conocido por su alta calidad nutricional y por sus diversas propiedades funcionales, entre las que se encuentran su actividad antinflamatoria asociada a los flavonoides, actividad analgésica asociada a los triterpenos, actividad antipirética asociada a la pulegona, actividad espasmolítica asociado a los derivados de la L-DOPA, actividad antibacterial asociada a los taninos y la actividad antioxidante química asociada a los compuestos polifenólicos, ácido ascórbico y carotenos, mientras que la actividad antioxidante enzimática está asociada a las enzimas POD y PFO (Olajide *et al.* 1999).

En Colombia existen diversas variedades de guayaba, entre las que se encuentra las variedades Regional Roja, Regional Blanca, Regional Rosada, Guavatá Victoria y Palmira ICA I. Las variedades Regional Blanca, Roja, Rosada y Guavatá Victoria, son altamente susceptibles a problemas fitosanitarios como la mosca de la guayaba, generando pérdidas poscosecha adicionales (Marín-Patiño 2002). Por esta razón, en esta investigación se busca contribuir al conocimiento bioquímico de las propiedades antioxidantes del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I y a la comprensión de la relación estructura química con las propiedades funcionales y nutricionales del fruto, como parte del fortalecimiento de la cadena productiva de la guayaba en Colombia, ya que ésta es una variedad con gran importancia fitosanitaria, resistente a la mosca y a otras plagas, que ha ganado el mercado en lo últimos años y que se ha convertido en la variedad de guayaba más importante en el comercio nacional e internacional.

Debido a que la guayaba tiene una alta capacidad de adaptación y una alta capacidad de crecimiento en un amplio rango de climas (entre 400 y 2000 m.s.n.m.), este fruto se encuentra ampliamente distribuido en todo el territorio nacional (FAO 2008). La producción y explotación comercial de la guayaba en Colombia se da principalmente en los departamentos de Santander,

Tolima, Cundinamarca, Huila, Antioquia, Cauca, Nariño y Atlántico. Santander es el principal productor de guayaba en Colombia, donde el municipio de Vélez produce el 34,0% de la producción nacional. El 24% de la producción local se utiliza como materia prima para la elaboración de bocadillos y el 73% se destina para el procesamiento en otras industrias del país (mermeladas, jugos, etc.) o como fruto fresco, por su alta capacidad de procesamiento es de gran interés en el mercado nacional e internacional (FAO 2008). No obstante la comercialización de guayaba de buena calidad es relativamente baja respecto a su producción potencial, perdiéndose cerca del 22,1% de la producción por el inadecuado manejo poscosecha del fruto generando considerables pérdidas económicas al sector agricultor. Esto se debe principalmente a limitaciones tecnológicas como la mezcla de material genético de guayaba en un mismo lote (varias variedades), el deficiente manejo fitosanitario y las inadecuadas prácticas poscosecha que conllevan daños mecánicos, pudrición del fruto, heterogeneidad en los estados de madurez, limitantes tecnológicas asociadas al manejo agronómico de los cultivos, deficiencias en selección y clasificación de los frutos, y los inadecuados sistemas de cosecha, transporte y empaque. Adicionalmente tampoco hay un amplio conocimiento acerca de la fisiología de las variedades de guayaba de esta región, por lo tanto hay un profundo desconocimiento de su metabolismo y de las adecuadas técnicas poscosecha que permitan la conservación prolongada del fruto (Universidad de Antioquia 2008). A nivel mundial, Colombia es el cuarto productor de guayaba, contribuyendo con cerca del 5% de la producción mundial, antecediendo a India y Pakistán que producen cerca del 50%, seguidos de México que aporta cerca del 25% de la producción mundial total del fruto. Debido a que la guayaba representa el 6,5% del gasto total de frutas en Colombia, siendo la variedad de guayaba más consumida la Palmira ICA-I, las actividades comerciales con este fruto genera cerca de 4000 empleos directos en Colombia que le representan al país cerca de $30000 millones de pesos anuales (Universidad de Antioquia 2008).

Los cambios composicionales que ocurren durante el ciclo vital del fruto son importantes para la comprensión de los procesos metabólicos relacionados con el desarrollo, maduración y senescencia del mismo, así como el desarrollo de sus óptimas cualidades sensoriales y de la aparición de síntomas relacionados con los fenómenos de pardeamiento y ablandamiento enzimático. Una vez que los frutos de guayaba son cosechados, su actividad metabólica continúa debido a su comportamiento respiratorio climatérico, por consiguiente, sus propiedades fisicoquímicas, sensoriales y nutricionales van cambiando conforme avanza el proceso de maduración (Bashir *et al.* 2003). Algunas de las transformaciones más notorias

están relacionadas con la necrosis, el pardeamiento y el ablandamiento tanto en la corteza como en la pulpa. Estos fenómenos se atribuyen a la acción de algunas enzimas que actúan sobre diversos sustratos presentes en el tejido del fruto. Un ejemplo de estas enzimas es la peroxidasa (POD) considerada como una enzima antioxidante ya que puede evitar la necrosis de los frutos ocasionado por sustancias oxidantes, y la polifenoloxidasa (PFO) que está relacionada con la actividad antioxidante y con el proceso de pardeamiento enzimático del fruto (Baquero-Duarte *et al.* 2005).

La actividad antioxidante del fruto de guayaba ha tenido un particular interés como una de sus principales propiedades funcionales. Se ha determinado que la actividad antioxidante de las frutas se debe a la presencia de los compuestos polifenólicos, ácido ascórbico y los compuestos carotenoides en el caso del sistema antioxidante químico (Souza *et al.* 2008), mientras que la POD y la PFO son las enzimas responsables del sistema antioxidante enzimático (Prochazkova *et al.* 2001). El sistema antioxidante de los frutos esta constituido principalmente por los compuestos polifenólicos, carotenoides, ácido ascórbico y las enzimas POD y PFO responsables simultáneamente de la actividad antioxidante como del pardeamiento enzimático (Thaipong *et al.* 2006). Los frutos sufren una serie de cambios bioquímicos debido a la maduración, la cosecha, el procesamiento y el almacenamiento. Estos cambios son ocasionados por varios factores, incluyendo reacciones de pardeamiento, deterioro microbiano y autoxidación de lípidos, viéndose afectadas sus propiedades antioxidantes, funcionales y nutricionales (Soto y Yahia 2002). La actividad antioxidante química (ácido ascórbico, carotenoides y polifenoles) y enzimática (POD y PFO) desempeñan un papel clave en la neutralización de las especies reactivas del oxígeno (ROS), al reaccionar directamente con las ROS reduciendo sustancias oxidantes como el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($^{\bullet}OH$) hasta H_2O, o por quelar oxígeno singulete $^1O_2$ (una de las tantas formas de oxígeno activo que ocasiona de efectos nocivos como daños necróticos). Esto puede ocurrir a través de una serie de reacciones de óxido-reducción que involucran al ascorbato, enzimas antioxidantes, polifenoles y glutatión (Holden 1994).

Por otro lado, el fenómeno de ablandamiento ocurre por la participación de las enzimas pectinesterasa (PE) y poligalacturonasa (PG) las cuales degradan la pectina y el ácido poligalacturónico presente en la pared celular de las células del fruto (Imsabai *et al.* 2002). El efecto físico observable de este fenómeno es la pérdida de dureza o firmeza del fruto (ablandamiento) responsable de la susceptibilidad mecánica (Bateman y Millar 1966) y a los

patógenos (Collmer y Keen 1986) de los frutos y de la disminución de su vida útil. La textura de las frutas depende en gran medida de su contenido en pectinas, protopectina y pectina soluble en agua. La protopectina atrapa el agua formando una especie de malla, y es la que proporciona a la fruta no madura su particular textura (Worth 1967). Con la maduración, la concentración de esta sustancia disminuye debido a la acción de enzimas pécticas y se va transformando en pectina soluble, que queda disuelta en el agua que contiene la fruta, produciéndose el característico aumento de los sólidos solubles y el ablandamiento de la fruta. En algunas frutas como la manzana, la consistencia disminuye muy lentamente, mientras que en otras como la pera y la guayaba, la disminución es muy rápida, debido a la alta actividad enzimática de PG y PE que presentan las últimas y a las diferencias en la composición y conformación estructural de la pectina que compone la pared celular (Wood 1960).

El presente trabajo se enmarca dentro de los estudios que desde hace algunos años el grupo de investigación “Estudio de los Cambios Químicos y Bioquímicos de Alimentos Frescos y Procesados” ha venido realizando en cuanto a los fenómenos bioquímicos involucrados en el proceso de maduración y senescencia de los frutos, así como el estudio de diferentes mecanismos de conservación que permitan prolongar el tiempo de vida útil del fruto. Con este trabajo se busca comprender la influencia de los compuestos fenólicos y de la vitamina C en la actividad antioxidante del fruto, y su relación con las enzimas antioxidantes y de pardeamiento como la POD y PFO. También se busca evaluar la influencia de la PG y PE en el ablandamiento del fruto durante el proceso de maduración, así como su relación con los cambios en las características de la fibra dietaria, así como contribuir con el estudio bioquímico del comportamiento poscosecha del fruto relacionando el ablandamiento y la capacidad antioxidante durante su proceso de maduración.

3. HIPÓTESIS

La capacidad antioxidante total del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I está relacionada directamente con la concentración de los compuestos fenólicos, el ácido ascórbico, los carotenoides y con la actividad enzimática de la peroxidasa y la polifenoloxidasa durante el proceso de maduración. La concentración de la fibra y la actividad enzimática de la poligalacturonasa y la pectinesterasa están relacionadas directamente con el fenómeno de ablandamiento enzimático del fruto durante el proceso de maduración.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Estudiar la capacidad antioxidante y el ablandamiento del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I (*Psidium guajava* L.) y establecer su relación con el proceso de maduración.

4.2. Específicos

- Cuantificar la actividad antioxidante por los métodos ABTS, DPPH y FRAP, la concentración de los compuestos fenólicos y del ácido ascórbico del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante el proceso de maduración.

- Determinar la concentración de la fibra dietaria total (FDT), soluble (FDS) e insoluble (FDI) del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante el proceso de maduración.

- Establecer las mejores condiciones de extracción y medida de la actividad de las enzimas peroxidasa (POD), polifenoloxidasa (PFO), poligalacturonasa (PG) y pectinesterasa (PE) del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I.

- Evaluar la actividad enzimática de la peroxidasa (POD), polifenoloxidasa (PFO), poligalacturonasa (PG) y pectinesterasa (PE) del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante el proceso de maduración.

5. ASPECTOS TEÓRICOS

5.1. Generalidades del fruto

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un fruto proveniente de los países tropicales y subtropicales del mundo que crece en diversas condiciones climáticas, prefiriendo los climas cálidos y secos. Es un fruto ampliamente consumido alrededor de todo el mundo (Pérez *et al.* 2008). Debido a su capacidad de crecer en diversos climas y adaptación a diversos suelos, la guayaba ha sido introducida en muchos países en el mundo (Salazar *et al.* 2006).

La guayaba crece con requerimientos de agua de 1000 - 2000 m^3/ha*año entre 800 y 2000 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 18 ºC, humedad relativa de 78% y con un pH del suelo entre 5,0 y 6,0. La guayaba es una baya ovoide de 5 cm de diámetro que cuyo mesocarpio (pulpa) contiene numerosas pequeñas semillas y varía de color dependiendo de la variedad (figura 1). El árbol de guayaba es un arbusto frondoso que alcanza de 5 a 6 m de altura como promedio. Las hojas nacen en pares y son de color verde pálido, coreáceas y de forma alargada que terminan en una punta aguda con una longitud que oscila entre 10 y 20 cm, con 8 cm de ancho y posee pelos finos y suaves en ambos lados, con una nervadura central y varias secundarias que resaltan a simple vista. Las flores nacen en la base de las hojas con gran cantidad de estambres y un solo pistilo. La forma del fruto depende de la variedad, al igual que el color de la pulpa y la corteza (Salazar *et al.* 2006). La clasificación taxonómica de la guayaba se muestra en la tabla 1 (USDA 2010).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I.

Reino	*Plantae*
Subreino	*Dicotiledónea*
División	*Magnoliophyta*
Subdivisión	*Lignosea*
Clase	*Magnoliopsida*
Subclase	*Rosidae*
Orden	*Myrtales*
Familia	*Myrtaceae*
Género	*Psidium*
Especie	*Psidium guajava*

Figura 1. Fruto de guayaba variedad Palmira ICA I.

Las variedades botánicas de la guayaba más importantes en el país son las variedades Regional Roja, Regional Blanca, Palmira ICA I (guayaba pera) y Palmira ICA II. La variedad regional blanca se caracteriza por ser un poco más grande que la variedad regional roja y por tener una mayor capacidad antioxidante (Universidad de Antioquia 2008), además de tener una mayor cantidad de sólidos solubles, azúcares reductores, acidez titulable y compuestos polifenólicos (Bashir *et al.* 2003). El fruto de guayaba es un fruto climatérico que durante su proceso de maduración y senescencia es susceptible a lesiones como el pardeamiento enzimático ocasionado por la acción de la peroxidasa (POD) y la polifenoloxidasa (PFO) y el ablandamiento enzimático ocasionado por la acción de las enzimas poligalacturonasa (PG) y pectinesterasa (PE). La actividad de las enzimas PG y PE sobre la pectina durante la etapa de maduración y senescencia del fruto es la causante de la pérdida de firmeza del fruto y su consecuente ablandamiento, mientras que la alta actividad de la enzimas POD y PFO sobre los compuestos polifenólicos es la causante de la aparición de los compuestos pardos conocidos como melaninas en la corteza y en la pulpa del fruto. Estos cambios químicos indeseables característicos de la senescencia del fruto son los que ocasionan una pérdida de interés en el consumidor y su rechazo en el mercado y en el comercio (Altunkaya y Gokmen 2008).

El fruto de guayaba tiene un alto y reconocido valor nutricional y funcional gracias a su alta capacidad antioxidante, contenidos de fibra dietaria, carbohidratos, minerales y vitaminas (Pérez *et al.* 2008, Restrepo-Sánchez *et al.* 2009), la composición química promedio de la guayaba variedad Palmira ICA I (parte comestible correspondiente a corteza y pulpa) se muestra en la tabla 2 (ICBF 2010).

Tabla 2. Composición química del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I.

Componente	g / 100 g*	Componente	mg / 100 g*
Agua	84,0	Niacina	2,49
Carbohidratos	4,5	Riboflavina	0,10
Energía	23 kcal (96 kJ)	Tiamina	0,27
Lípidos	0,1	Vitamina C	74,92
Proteínas	0,9	Vitamina A	63,40
Fibra Dietaria	9,9	Potasio (K)	235,44
Cenizas	0,6	Hierro (Fe)	0,67
Magnesio (Mg)	0,012	Calcio (Ca)	14,06

*Contenido / 100 g de parte comestible (corteza y pulpa)

5.2. Cambios asociados a la maduración

La maduración de las frutas está ligada a complejos procesos de transformación de sus componentes. Cuando los frutos son cosechados quedan separados de su fuente natural de nutrientes, pero sus tejidos aún respiran y siguen activos. Los azúcares y otros componentes sufren importantes modificaciones produciéndose energía, CO_2 y H_2O. Estos procesos tienen gran importancia porque influyen en los cambios que se producen durante el almacenamiento, transporte y comercialización de las frutas, afectando también en cierta medida el valor nutritivo y la rentabilidad del fruto (Pérez *et al.* 2008).

Los fenómenos que se producen durante la maduración y senescencia son la respiración, el endulzamiento, cambios en la textura, aroma, producción de compuestos volátiles, cambios en la coloración, y disminución del valor nutritivo. Sin embargo, la velocidad y naturaleza del proceso de maduración difiere significativamente entre las especies de frutas, cultivos, diferentes estados de madurez de la misma variedad y también entre zonas de producción. Las frutas también difieren en sus respuestas a la maduración a diversos ambientes poscosecha, sin embargo, es posible identificar ciertos fenómenos generales en relación al comportamiento de la maduración y senescencia de los frutos (Bashir *et al.* 2003).

La intensidad respiratoria de un fruto depende de su grado de desarrollo y se mide como la cantidad de CO_2 (mg) que desprende 1 Kg de fruta por hora de almacenamiento. Durante el crecimiento de la fruta se produce en primer lugar un incremento de la intensidad de la respiración, que va disminuyendo lentamente hasta el estado de máximo desarrollo o madurez fisiológica. La medida de la intensidad respiratoria y el patrón respiratorio de cada fruto sirve para clasificarlo como fruta climatérica o no climatérica (Bhande *et al.* 2008), según como se puede observar en la figura 2. En las frutas no climatéricas (figura 2, abajo) los procesos de maduración y respiración son graduales y continuos, que se presentan de forma lenta y atenuada. Los frutos no climatéricos no presentan cambios drásticos en su aspecto físico y su composición química y presentan un mayor contenido de almidón y pectina, mientras que su tasa de respiración decrece gradualmente con el tiempo. La recolección de las frutas no climatéricas se hace después de la maduración porque si se hace cuando están en estado verde, después no madurarán y solo se pondrán blandas. En las frutas no climatéricas se encuentran frutos como naranja, toronja, limón, lima, mandarina, piña, uva, melón, cereza, aceituna, fresa y marañón (Calegario *et al.* 2001).

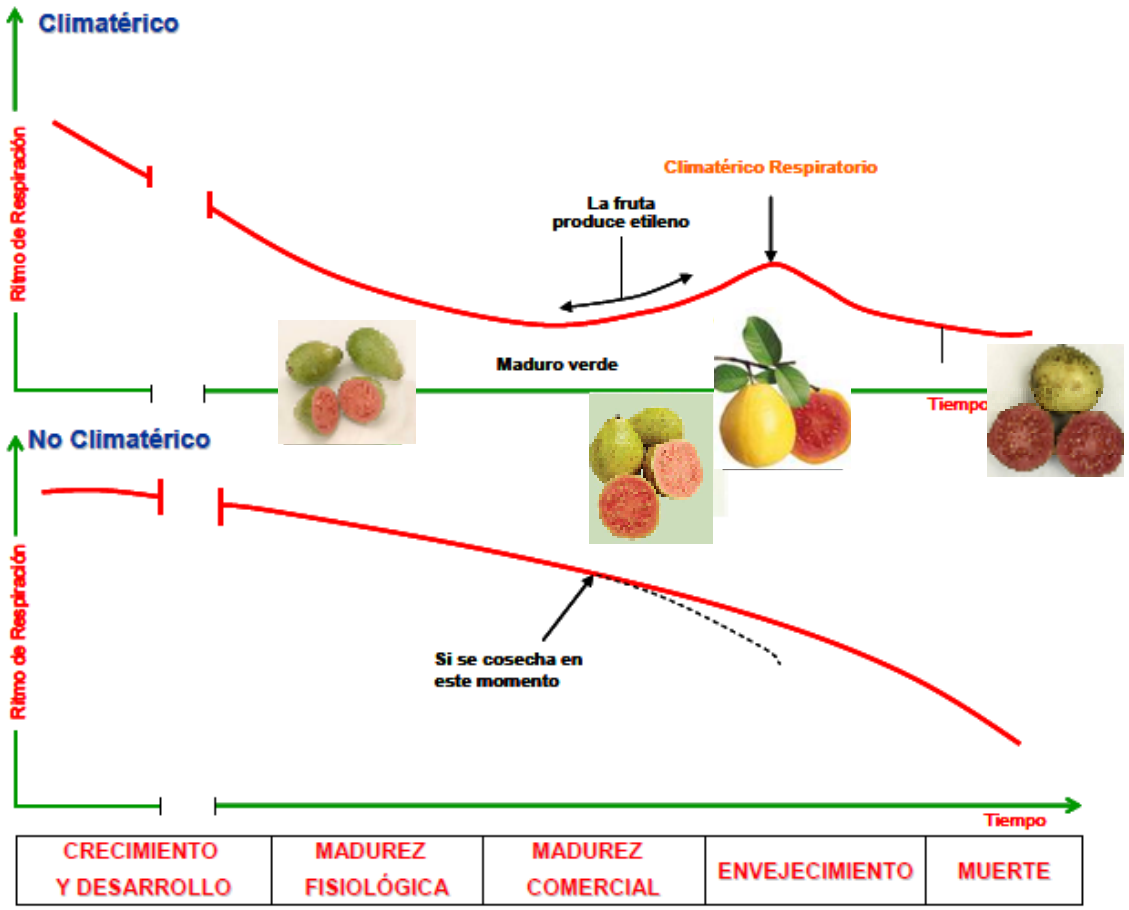


Figura 2. Diferencias en el patrón respiratorio durante la maduración de frutos climatéricos (arriba) y no climatéricos (abajo). Reproducido de Rodríguez-Nieto (2008).

En las frutas climatéricas (figura 2, arriba), el proceso natural de maduración es iniciado de acuerdo a cambios en la composición hormonal. El inicio de la maduración climatérica es un proceso bien definido, caracterizado por un rápido aumento en la velocidad de la respiración y el desprendimiento de etileno por la fruta, patrón conocido como respiración climatérica. Cuando las frutas climatéricas maduran, la velocidad de respiración se eleva llegando a un máximo, conocido como pico o máximo climatérico, después del cual la intensidad respiratoria disminuye de nuevo hasta el comienzo de la senescencia o muerte del fruto. Las frutas climatéricas normalmente se recolectan antes del máximo climatérico para su distribución comercial, de forma que terminan de madurar fuera del árbol, evitando que se produzcan pérdidas poscosecha ya que el período de conservación de una fruta madura es relativamente corto. Entre las frutas climatéricas se encuentran el lulo, ciruela, melón, tomate, mango, patilla,

papaya, higo, guayaba, pitaya, maracuyá, guanábana, mamey, zapote, manzana, pera, banano, melocotón, durazno y chirimoya (Pech *et al.* 2008).

Otro importante proceso metabólico asociado a la maduración de frutas es la transpiración. La transpiración es el proceso por el cual se pierde agua en forma de vapor a través de aberturas microscópicas en la epidermis de la fruta y constituye la causa principal de perdida de peso. A medida que el proceso de transpiración avanza la apariencia del fruto se deteriora, al igual que su elasticidad y resistencia mecánica, volviéndose blando y marchito reduciendo su valor comercial y su susceptibilidad a sufrir daños mecánicos y ataques de patógenos. La transpiración del fruto depende de la temperatura del ambiente en el que se almacene, métodos apropiados como control de la humedad relativa, la temperatura de almacenamiento y un empaque efectivo que permita la permeabilidad de los gases, pueden ayudar a minimizar las pérdidas poscosecha asociadas a la transpiración (Fonseca *et al.* 2002).

La maduración de las frutas va unida a una variación del color. La transición de color más habitual durante la maduración es de color verde en los estados más inmaduros a otro color dependiendo del fruto. Este cambio está relacionado con la descomposición de la clorofila, quedando al descubierto pigmentos coloreados como los carotenoides y las antocianinas, donde se aumenta la producción de pigmentos rojos y amarillos característicos de las frutas maduras. La formación de otros pigmentos como las antocianinas suele ser activada por la luz (El-Bulk *et al.* 1997). Durante la maduración también se producen compuestos volátiles como ésteres alifáticos e hidrocarburos terpénicos que son los que proporcionan a cada fruta su particular aroma (Pino *et al.* 2001). Además, es bien conocido que el contenido de azúcares y de sólidos solubles totales aumentan durante la maduración, mientras que la acidez titulable y el contenido de fenoles totales disminuye en algunas frutas tropicales (Bashir *et al.* 2003).

La textura de las frutas depende en gran medida de su contenido de pectina, protopectina y pectina soluble. La protopectina atrapa el agua formando una especie de malla y es la que proporciona a la fruta no madura su particular textura. Con la maduración, esta sustancia es degradada por enzimas pécticas y se va transformando en pectina soluble, que queda disuelta en el agua que contiene la fruta, produciéndose el característico ablandamiento y la pérdida de firmeza de la fruta madura, haciéndola más susceptible a daños mecánicos. En las manzanas se ha observado que la consistencia disminuye lentamente, pero en las peras, guayabas y lulos

la disminución es más rápida afectando la integridad de la pared celular y la calidad sensorial y económica de los frutos (Duan *et al.* 2008).

La aparición de colores pardos durante la senescencia de los frutos es debido al fenómeno de pardeamiento enzimático. Este fenómeno es el resultado de la acción del oxígeno contenido en el aire en combinación con los compuestos polifenólicos de la fruta. En la reacción interviene como catalizador la enzima PFO, la cual oxida los polifenoles en presencia de oxígeno molecular (O_2) a las respectivas quinonas, que posteriormente se polimerizan o reaccionan con los grupos amino de diferentes aminoácidos y proteínas formando las melaninas (compuestos pardos). La manifestación del pardeamiento enzimático en frutos frescos puede ser ocasionada por daños directos al fruto como cortes y laceraciones, debido a que ocasionan una pérdida en la compartimentalización celular y la posterior interacción de los polifenoles con las enzimas, conllevando a la aparición de síntomas de pardeamiento. La aparición de compuestos pardos en la corteza del fruto también es un síntoma de envejecimiento y estrés oxidativo avanzado característico de los frutos que se encuentran en la etapa de senescencia y ocasionan el rechazo del fruto por parte del consumidor (Ayaz *et al.* 2008).

5.3. Pardeamiento enzimático

El pardeamiento enzimático es un proceso químico en el cual la enzima PFO oxida los compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular (O_2) para formar las quinonas y los compuestos pardos conocidos como melaninas. La aparición de color en los frutos es debido a la degradación de las clorofilas y la simultánea aparición de pigmentos como los carotenoides y las antocianinas, además de los pigmentos indeseados ocasionados por el pardeamiento enzimático. El pardeamiento enzimático es un proceso característico de la etapa de senescencia de los frutos y de daño estructural de tejidos de la corteza y la pulpa del fruto, por lo que la aparición de compuestos pardos es síntoma de deterioro y alto estrés oxidativo en el fruto y por consiguiente, es un síntoma de deterioro fisiológico. Por lo general, el pardeamiento enzimático genera pérdidas considerables económicas por el rechazo de los frutos por parte del consumidor (Altunkaya y Gokmen 2008). El pardeamiento enzimático no ocurre en células sanas. Los fenoles se encuentran ubicados en las vacuolas, mientras que la PFO se encuentra en los cloroplastos y en el citoplasma. Al ocurrir diversos tipos de estrés que generen la pérdida de compartimentalización celular, los polifenoles y la PFO pueden entrar en contacto, ocurriendo así la reacción de pardeamiento enzimático, el mecanismo de la

producción de melaninas catalizado por la PFO se puede observar en la figura 3. Este indeseable proceso puede ser controlado por varios mecanismos, entre los que se encuentran el escaldado, refrigeración, congelación, deshidratación, irradiación, tratamientos con las presiones, tratamiento con atmósfera controlada de CO_2, ultrafiltración, tratamiento con ultrasonido, adición de inhibidores quelantes y adición de antioxidantes. Es de resaltar que aunque el pardeamiento enzimático promovido por la PFO genera rechazo del fruto por parte del consumidor, este proceso también esta íntegramente asociado a la protección natural que tiene el fruto contra el estrés oxidativo, ya que la capacidad que tiene la PFO de neutralizar el O_2 ocasiona una disminución en la producción de las especies reactivas del oxígeno y permite clasificar a la PFO como una enzima antioxidante (Degl`innocenti *et al.* 2007). En algunos alimentos, el pardeamiento enzimático trae consigo beneficios y aceptabilidad del alimento. El color pardo del café y del té son características deseadas en estos productos ya que son indicativos de un buen desarrollo del color y del sabor ya que es el responsable de la aparición de colores pardos en frutos secos como pasas, ciruelas, nueces e higos. También es uno de los fenómenos enzimáticos más indeseados en las frutas exóticas debido a puede influenciar negativamente el valor nutritivo y funcional del fruto. Se estima que más del 50% de las pérdidas poscosecha en el sector de las frutas se producen como resultado de pardeamiento enzimático. Estas pérdidas han llevado a un considerable interés en la comprensión y el control del mecanismo de acción de la PFO en los frutos (Marshall *et al.* 2000).

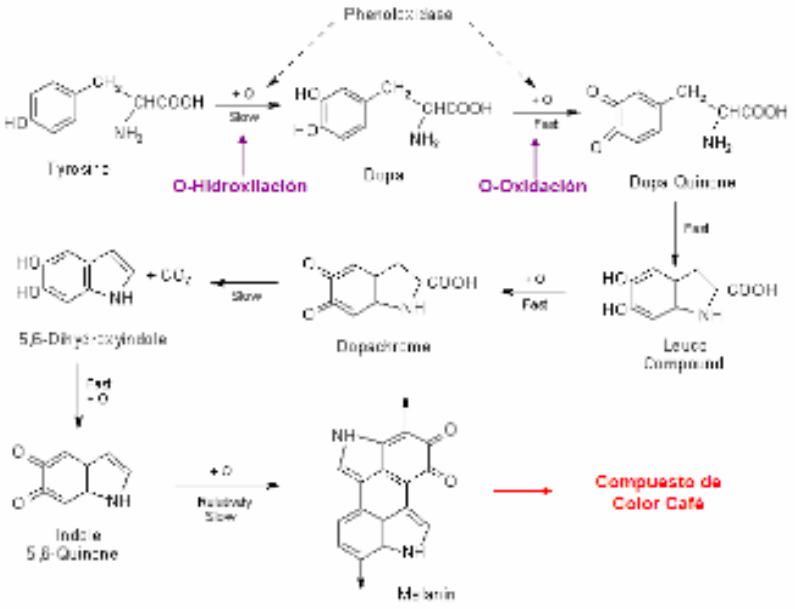


Figura 3. Oxidación de polifenoles a quinonas promovida por la PFO. Mecanismo de la formación de melaninas, compuestos característicos del pardeamiento enzimático (Marshall *et al.* 2000).

5.4. Compuestos fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico y capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos o polifenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y funciones fisiológicas. Su estructura química más frecuente es la de polímeros o ligninas insolubles. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico del que se trate, situándose en el interior de las células (vacuolas) o en la pared celular. Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, además de ser reconocidos agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo sintetizados como mecanismo de defensa. Los compuestos fenólicos están relacionados ampliamente con la calidad sensorial y funcional de las frutas tropicales (Celik *et al.* 2008).

Su contribución en la pigmentación de los frutos está claramente reconocida a través de las antocianidinas y carotenoides, responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura. Además, las reacciones de oxidación de los compuestos fenólicos hacia la formación de quinonas, catalizada por la enzima PFO y POD producen un pardeamiento enzimático en los frutos. Igualmente los compuestos fenólicos, y en concreto los taninos condensados o antocianidinas se asocian con la astringencia que presentan muchas de las frutas comestibles antes de la maduración. Muchas de las propiedades funcionales descritas en las frutas, asociadas principalmente a la actividad antioxidante y las propiedades nutritivas de estos compuestos, están relacionadas con la presencia y con el contenido de compuestos fenólicos como taninos, flavonoides, antocianinas y carotenoides.

Los compuestos polifenólicos también influyen en la calidad sensorial y nutricional del fruto, ya que pueden contribuir con la generación de aromas y sabores característicos del fruto, además de su importante función como sustancias antioxidantes (Robards *et al.* 1999), propiedad de interés en este trabajo. Los compuestos polifenólicos son los principales contribuyentes al sistema antioxidante químico de los frutos. La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos ha sido asociada a sus características químicas estructurales como la capacidad de donación de protones del hidroxilo fenólico, la capacidad de deslocalizar y estabilizar electrones desapareados por resonancia en el anillo aromático (figura 4), bajo potencial de oxidación (alto potencial de reducción), alta capacidad de quelación de metales que estos tienen e interacción con otras moléculas fácilmente oxidables (Rice *et al.* 1997).

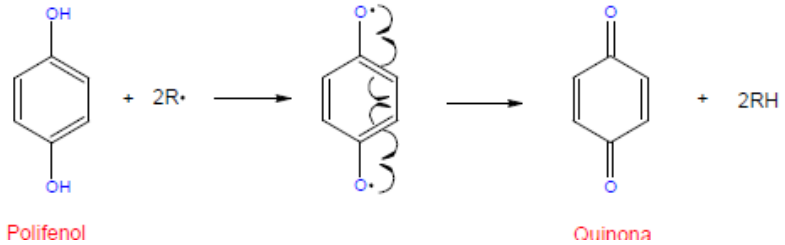


Figura 4. Oxidación de polifenoles a quinonas promovida por un radical libre. Estabilización por resonancia del catión aromático formado (Rice *et al.* 1997).

Las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico (vitamina C) y de los compuestos carotenoides también han sido ampliamente estudiadas. Se ha encontrado que las características estructurales asociadas a la actividad antioxidante del ácido ascórbico son su alta capacidad de donación de protones, su capacidad de formación de enolatos (deslocalización de electrones desapareados), bajo potencial de oxidación (alto potencial de reducción) y por la capacidad del ácido dehidroascórbico de ser nuevamente reducido hasta ácido ascórbico mediante el ciclo de Halliwell-Asada. En la figura 5 se puede observar el mecanismo de deslocalización de electrones del ácido ascórbico que le proporciona su alta actividad antioxidante, así como la capacidad del ácido dehidroascórbico de ser nuevamente reducido a ácido ascórbico mediante el ciclo de Halliwell-Asada para seguir actuando como compuesto antioxidante. Es de destacar que una vez el ácido dehidroascórbico es hidrolizado al ácido 2,3-dicetoglucónico se pierde su capacidad de ser reducido nuevamente a ácido ascórbico y de seguir actuando como compuesto antioxidante (Dalton *et al.* 1986).

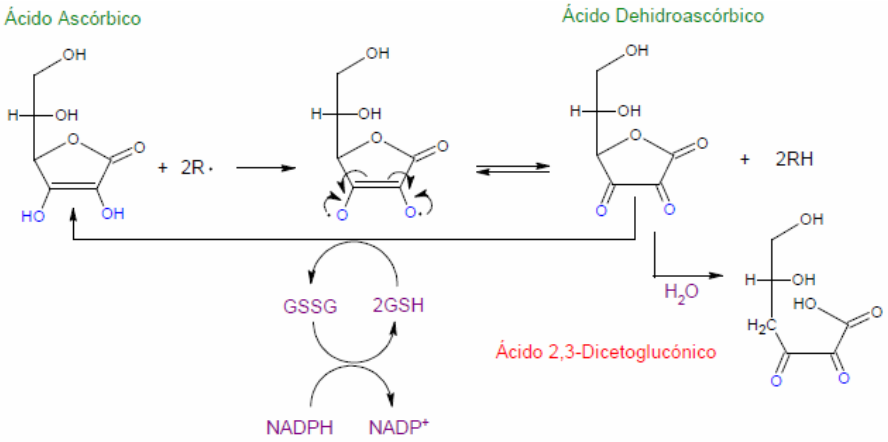


Figura 5. Ciclo de Halliwell-Asada. Mecanismo de la actividad antioxidante del ácido ascórbico (Dalton *et al.* 1986). La reducción del ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico se lleva a cabo mediante la oxidación del glutatión (GSH) al glutatión disulfuro (GSSG).

La actividad antioxidante de los carotenos ha sido relacionada con la capacidad de deslocalizar electrones (deslocalización por resonancia) en el sistema conjugado de dobles enlaces que estos tienen en su cadena hidrocarbonada, lo cual determina la baja energía de sus estados tripletes y su alta capacidad de neutralizar (quench) los radicales libres y el oxígeno singlete $^1O_2$ (Stahl y Sies 2003). Esta particular propiedad de los compuestos carotenoides se aprovecha para la cuantificación de la actividad antioxidante lipofílica por el método de decoloración del β-caroteno (figura 6). En este método de medida de la actividad antioxidante, se promueve la peroxidación térmica del ácido linoleico (LH) en presencia de oxígeno molecular (O_2) para formar el radical peroxilo (LOO•). Este radical puede ser neutralizado por el β-caroteno (λ= 470 nm) ocasionando la ruptura de su conjugación y por consiguiente se anule su capacidad de trasnsferencia de carga, manifestándose en el proceso de decoloración que puede ser medido espectrofotométricamente. De esta manera, la actividad antioxidante de un extracto de compuestos fenólicos o carotenoides (AH_2) puede ser medida al evaluar la capacidad que estos compuestos tienen de neutralizar el radical LOO• e impedir así el proceso de decoloración del β-caroteno. Entre más actividad antioxidante tenga el compuesto evaluado, menor será la decoloración del β-caroteno (Marco 1968, Velioglu *et al.* 1998).

La determinación del perfil de los compuestos carotenoides (composición y concentración) durante la maduración de los frutos puede permitir atribuir la actividad antioxidante lipofílica de los frutos tropicales a un determinado compuesto carotenoide, y poder diseñar estrategias futuras de conservación de la actividad antioxidante por periodos prolongados de tiempo.

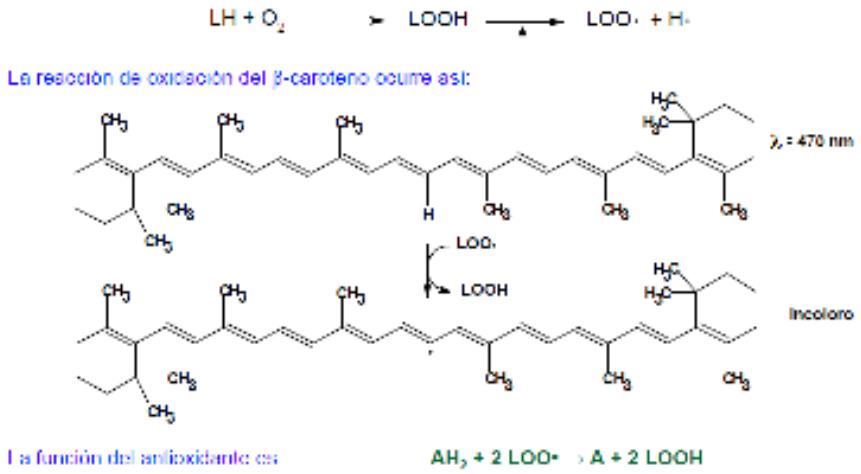


Figura 6. Mecanismo de la actividad antioxidante del β-caroteno, deslocalización de electrones en la cadena hidrocarbonada de los compuestos carotenoides (Velioglu *et al.* 1998).

El estudio de la actividad antioxidante en frutas ha permitido la identificación de los compuestos fenólicos, carotenoides y vitamina C de los frutos como los responsables de la protección del fruto contra las sustancias oxidantes. La actividad química de los polifenoles que definen sus cualidades antioxidantes es producto de su capacidad de donar electrones y átomos de hidrógeno, así como su alta estabilidad y baja reactividad química en su forma oxidada. Anteriormente ya ha sido estudiada la alta capacidad de los polifenoles de reducir sustancias oxidantes como el radical hidroxilo (OH•), anión radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radicales peroxil (ROO•) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), así como los intermediarios oxidados altamente reactivos. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos ha sido estudiada ampliamente en frutas como el durián (Arancibia *et al.* 2008), fresa (Ayala *et al.* 2004), arándano (Celik *et al.* 2008), guayaba (Chen y Yen 2007), persimón (Chen *et al.* 2008), tomate (Javanmardi *et al.* 2006), manzana, pera y durazno (Leontowicz *et al.* 2002), mangostino (Ketsa y Atantee 1998), entre otros, encontrándose que los fenoles presentes en el fruto son los principales responsables de la actividad antioxidante, junto con otros compuestos como ácido ascórbico, α-tocoferol y compuestos carotenoides. Muchos de estos compuestos fenólicos se encuentran en los alimentos conjugados con azúcares de forma natural (glicosidados), mientras que los compuestos fenólicos libres normalmente se encuentran en su forma libre en tejidos muertos, maduros o senescentes (Rice *et al.* 1997).

Existen diversas formas de medir la actividad antioxidante total y el contenido de fenoles en un fruto. Algunos métodos han sido desarrollados para medir la capacidad antioxidante total, entre los que se encuentra el método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) capaz de medir la capacidad de reducción de un antioxidante y los métodos ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfónico)), DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazilo) y el método de decoloración del β-caroteno que miden la capacidad de los antioxidantes de neutralizar y evitar la propagación en cadena de los radicales libres (Thaipong *et al.* 2006). La capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica se puede correlacionar con el contenido de fenoles, vitamina C, carotenoides y enzimas antioxidantes POD y PFO en el fruto (Ozgen *et al.* 2006). El contenido de fenoles puede ser determinado por la capacidad del polifenol de reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico (Chen *et al.* 2008) y ocasionar la formación de los óxidos de molibdeno y tungsteno de color azul que pueden ser cuantificados a 760 nm (figura 7). Se ha determinado que el método FRAP para medir la capacidad antioxidante es el método que mejor correlaciona con el contenido total de fenoles totales y que es el método que presenta la sensibilidad más alta en la medida de la actividad antioxidante (Thaipong *et al.* 2006).

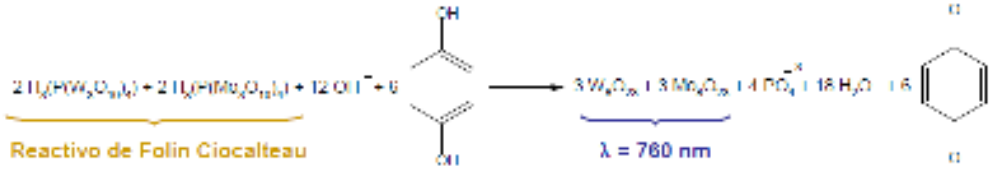


Figura 7. Reacción del método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de los compuestos fenólicos.

Los distintos métodos para medir la actividad antioxidante son consecuencia de la alta capacidad antioxidante que tienen los polifenoles, donde cada método de medida de actividad antioxidante es sensible a las distintas características redox del compuesto polifenólico polifenol. Los métodos ABTS y DPPH actúan sobre polifenoles donores de átomos de hidrógeno a radicales oxidantes, estabilizándolos y disminuyendo así su poder oxidante, el método FRAP actúa sobre los polifenoles capaces de donar electrones reduciendo intermediarios oxidados, mientras que el método de decoloración del β-caroteno actúa deslocalizando y estabilizando los electrones recibidos de un radical libre. Entonces, para poder determinar la capacidad antioxidante total de un fruto, debe medirse la actividad antioxidante con cada uno de los métodos para poder determinar tanto el efecto de neutralización de radicales libres, como su capacidad de reducción (Brand *et al.* 1995).

En la figura 8 se puede observar el mecanismo de medida de la actividad antioxidante por el método ABTS. Inicialmente el ABTS es oxidado por medio del persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) para formar el catón radical $ABTS^{\bullet+}$ que es cuantificable a 734 nm. El $ABTS^{\bullet+}$ es un catión radical estable debido a su capacidad de deslocalizar el electrón desapareado entre los átomos de nitrógeno de su estructura (figura 8, arriba). De esta manera, el $ABTS^{\bullet+}$ puede reaccionar con el compuesto polifenólico (se emplea el trolox como compuesto de referencia), ocasionando la formación del ABTS (incoloro) y la oxidación del compuesto polifenólico (figura 8, centro). Entre mayor es la actividad antioxidante del polifenol, mayor es la decoloración generada sobre el $ABTS^{\bullet+}$ (velocidad de decoloración) debido a que se cuantifica la decoloración del cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ ocasinada por el proceso de reducción. Los compuestos polifenólicos son buenos compuestos antioxidantes debido a la capacidad que tienen de estabilizar la carga generada sobre el polifenol (figura 8, abajo) y la posterior formación de la quinona, ocasionando la completa neutralización de la carga generada tras el proceso de oxidación. De esta manera, el método ABTS permite la cuantificación de la actividad antioxidante de carácter principalmente hidrofílico (antioxidantes solubles en agua), aunque el método también puede ser extrapolado a antioxidantes lipofílicos como los carotenoides (Re *et al.* 1999, Osman *et al.* 2006).

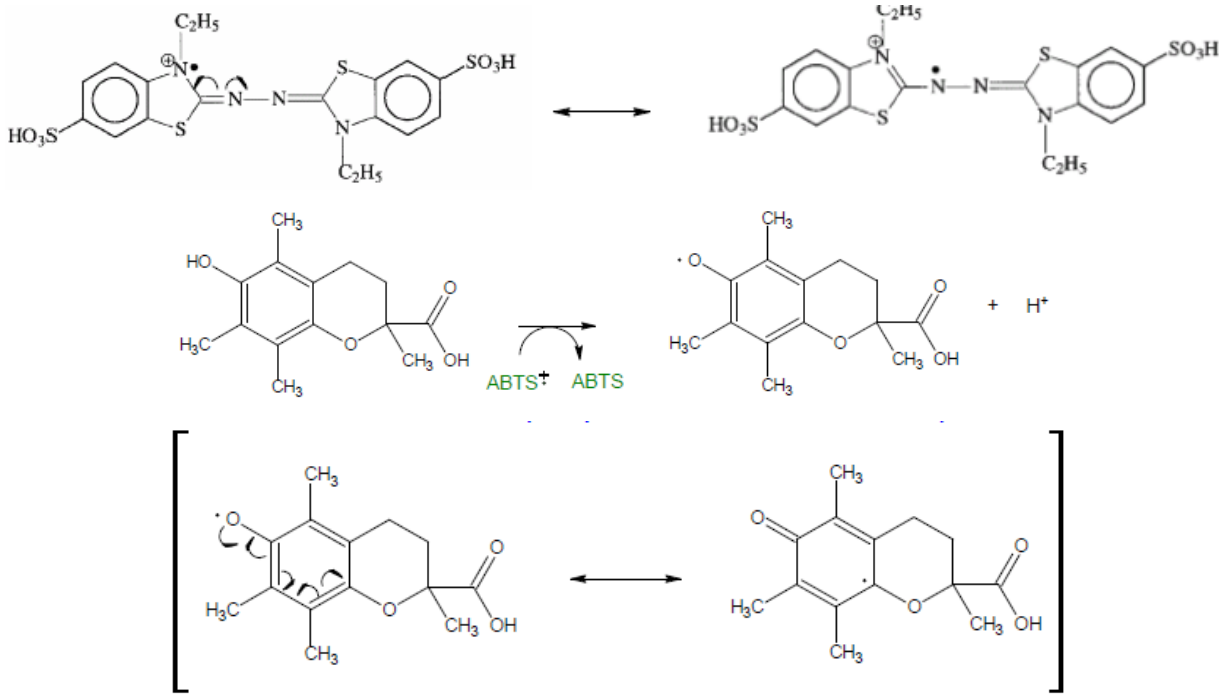


Figura 8. Mecanismo de estabilización del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ (arriba), reacción del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ con el trolox (centro) y mecanismo de estabilización del radical formado en el trolox (abajo).

De la misma manera que el método ABTS, el método DPPH (figura 9) también permite medir la capacidad de transferencia de protones y electrones del compuesto polifenólico. El catión radical estable DPPH• es un cromóforo que absorbe a 515 nm, donde la decoloración del DPPH• es ocasionada por el proceso de reducción promovida por el compuesto antioxidante. Aunque el mecanismo de transferencia de electrones del método DPPH es similar al método ABTS, el método DPPH es un método de muy baja sensibilidad debido a que el potencial de reducción del DPPH• es mucho mayor que el del $ABTS^{\bullet+}$ (Brand *et al.* 1995).

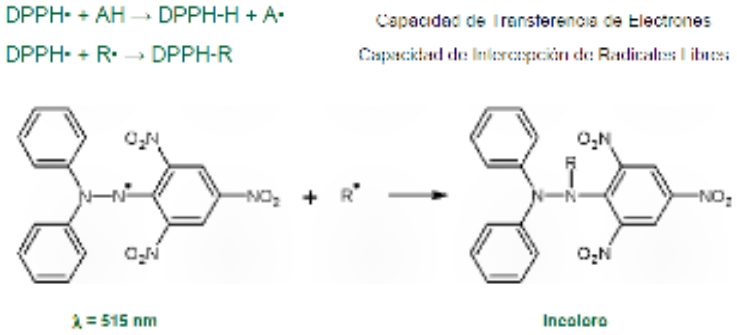


Figura 9. Reacción de transferencia de electrones del compuesto polifenólico (AH) sobre radical DPPH. Mecanismos de transferencia de electrones e intercepción de radicales libres (Brand *et al.* 1995).

El método FRAP (figura 10) permite medir la capacidad de transferencia de electrones y la capacidad de reducción del Fe^{+3} que tienen los compuestos antioxidantes hidrofílicos (AH_2). La reacción de reducción del reactivo de FRAP en medio ácido por el compuesto antioxidante AH_2 (complejo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{+3}$) se muestra a continuación:

$$\mathbf{[Fe(III)(TPTZ)_2]^{+3} + AH_2 \rightarrow [Fe(II)(TPTZ)_2]^{+2} + A + 2H^+ + 1e^-}$$

En el método FRAP se cuantifica la aparición del complejo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{+2}$ que es un cromóforo que tiene su máxima absorción a 593 nm. El mecanismo que se mide en el método de FRAP es la capacidad que tiene un determinado compuesto antioxidante (AH_2) de transferir un electrón al Fe^{+3} y reducirlo a la especie Fe^{+2}, ocasionando la aparición de la quinona (A) en el caso de los compuestos polifenólicos, y del ácido dehidroascórbico en el caso de que se utilice la vitamina C como compuesto antioxidante (Benzie y Strain 1996, Benzie y Szeto 1999, Huang *et al.* 2009). Debido a que el complejo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{+3}$ tiene un potencial de reducción muy bajo, el método FRAP es un método de muy baja especificidad (el complejo puede ser reducido por una gran variedad de compuestos antioxidantes) y por consiguiente es por este método por donde se encuentran las mayores actividades antioxidantes, esto ocasiona que el método FRAP sea muy sensible y reproducible, siendo el mejor método para cuantificar la actividad antioxidante de especies que sean pobres en concentración antioxidantes.

Los compuestos polifenólicos son también los sustratos de las enzimas relacionadas con el pardeamiento enzimático como la POD y PFO. La correlación del contenido de fenoles, vitamina C y la capacidad antioxidante con la actividad de estas enzimas, permitirá caracterizar el proceso de pardeamiento enzimático y permitir una mejor comprensión de la capacidad antioxidante química y enzimática en el fruto de guayaba.

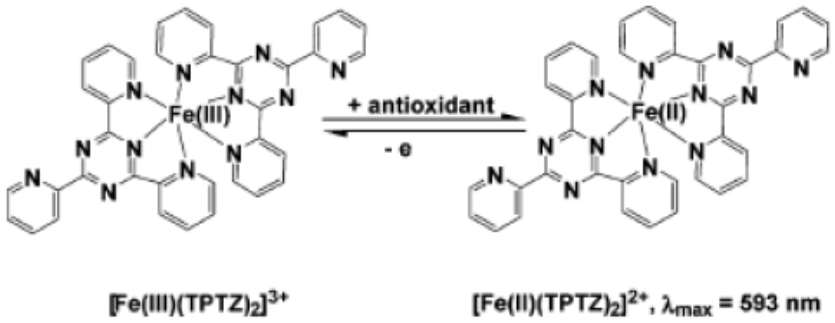


Figura 10. Reacción de reducción del complejo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{+3}$ y aparición del cromóforo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{+2}$ cuantificable a 593 nm (Benzie y Strain 1996).

5.5. Polifenoloxidasa PFO (E.C. 1.10.3.2)

La polifenoloxidasa (PPO) es una enzima encontrada principalmente en plantas y hongos que catalizan una reacción que transforma los o-difenoles en o-quinonas. Las o-quinonas pueden atacar a una gran variedad de biomoléculas como proteínas y aminoácidos libres, favoreciendo la formación de polímeros negro-marrón llamados melaninas. Estos polímeros son los responsables del oscurecimiento de tejidos vegetales cuando existe daño físico o durante el envejecimiento. Este fenómeno puede ser observado fácilmente en plátanos, papas y manzanas que tienen altos niveles de PFO (Concellon *et al.* 2004). Cuando la célula se encuentra sana e intacta, la PFO y sus sustratos, los polifenoles, se encuentran en compartimientos separados (cloroplastos y vacuolas, respectivamente). Sin embargo, cuando la célula se desorganiza al envejecer, o como resultado de un daño físico o infeccioso, las enzimas y sustratos entran en contacto y sucede la reacción de pardeamiento enzimático. El oscurecimiento producido por estas enzimas causa grandes pérdidas a la industria, por esto, el contenido de PFO y su nivel de actividad son muy importantes para determinar la calidad de frutos y vegetales (Kumar *et al.* 2008). La reacción de reducción del O_2 a H_2O y la oxidación del L-DOPA a la DOPA-quinona catalizada por la PFO se muestra en la figura 11.

La PFO tiene dos actividades enzimáticas, una o-hidroxilando monofenoles o actividad cresolasa (E.C. 1.14.18.1) y otra oxidando o-difenoles a diquinonas o actividad catecolasa (E.C. 1.10.3.2). Dependiendo de la fuente, la actividad cresolasa es mayor o menor, incluso inexistente en algunos casos. En cambio, todas las enzimas tienen actividad catecolasa (Soliva *et al.* 2002). La característica estructural más importante de estas enzimas es la presencia en su centro activo de dos átomos de cobre, unidos cada uno de ellos a tres residuos de histidina, en su entorno se sitúan una serie de aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos, que también son importantes en su actividad para la unión y orientación espacial de los sustratos. La doble reacción de o-hidroxilación y o-oxidación de la PFO se muestra en la figura 12 (Marshall *et al.* 2000).

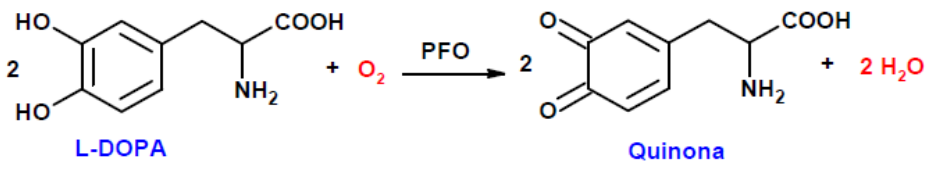


Figura 11. Oxidación de fenoles (L-DOPA) hasta la quinona y reducción del O_2 a H_2O por acción de la PFO (Marshall *et al.* 2000).

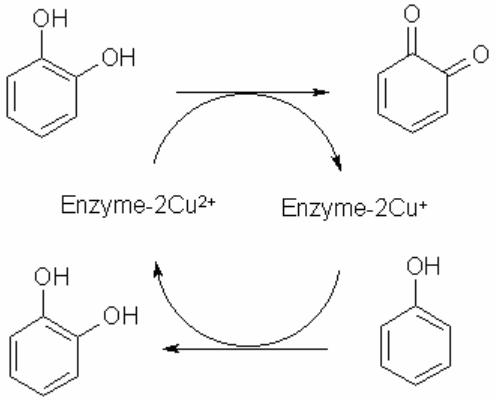


Figura 12. Oxidación de fenoles a quinonas catalizada por la PFO. Abajo se observa la reacción cresolasa y arriba se observa la reacción catecolasa (Marshall *et al.* 2000).

La actividad enzimática de la PFO ha sido determinada anteriormente en mora (Arslan *et al.* 2004), níspero (Ayaz *et al.* 2008), pitaya (Baquero-Duarte *et al.* 2005), uva (Castellari *et al.* 1997), berenjena (Concellon *et al.* 2004), tomillo (Dogan *et al.* 2006), manzana (Espin *et al.* 1995), alcachofa (Espin *et al.* 1997), pera (Franck *et al.* 2007), cereza (Kumar *et al.* 2008), malanga (Lee *et al.* 2007) y aguacate (Soliva *et al.* 2002), entre otros, determinándose que la PFO está relacionada con el proceso de pardeamiento enzimático y que su actividad se hace evidente durante el proceso de maduración y senescencia del fruto y cuando el fruto sufre daños mecánicos o es atacado por patógenos.

5.6. Peroxidasa POD (E.C. 1.11.1.7)

En la pérdida de la calidad de las frutas juega un papel importante el balance entre las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el sistema antioxidante del fruto. Dentro de las ROS se ubican los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (•OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Aunque el proceso de producción de ROS es un proceso producto del metabolismo aerobio, este puede verse incrementado no solo durante la maduración y senescencia, si no también por agentes causantes de estrés como metales, radiación, temperaturas extremas, modificación de atmósferas y ataque de microorganismos (Goodwin y Hertwig 2003). La actividad de la enzima POD ha sido relacionada con la aparición de efectos deteriorativos tales como las modificaciones en color, sabor y textura, así como en la producción de aromas indeseables. Los productos vegetales normalmente requieren de un tratamiento térmico con la finalidad de

inactivar enzimas deteriorativas y de esta manera evitar o minimizar los cambios de calidad en el producto durante el almacenamiento o procesamiento posterior (Padiglia *et al.* 1995).

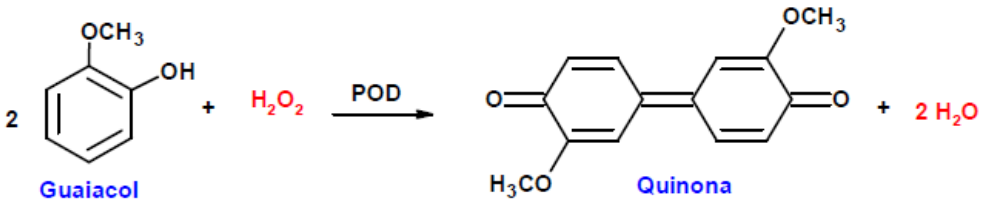


Figura 13. Oxidación de fenoles (guaiacol) hasta la quinona y reducción del H_2O_2 a H_2O por acción de la POD (Altunkaya *et al.* 2008).

Los sistemas de defensa antioxidante celular comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas, macromoléculas con capacidad antioxidante, y también enzimas antioxidantes y enzimas asociadas como la POD y PFO. La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos a través de los cuales la célula anula la reactividad e inhibe la generación de las ROS. Los mecanismos enzimáticos comprenden la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2, la glutatión transferasa que reduce hidroperóxidos (ROO•) a alcoholes, y la catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), que reducen el H_2O_2 a H_2O (García *et al.* 2004).

Dentro de la ROS, el H_2O_2 juega un papel importante ya que tiene funciones vitales en las células vegetales como su participación en la síntesis de la pared celular y en la respuesta hipersensible ante el ataque de microorganismos. Sin embargo, sus niveles deben ser controlados porque puede originar radicales libres que son los principales agentes oxidantes de las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. En el control del H_2O_2 participa la enzima POD (figura 13) que en presencia de un compuesto fenólico puede generar la respectiva quinona reduciendo el peróxido de hidrógeno a agua (Baquero-Duarte *et al.* 2005).

La actividad enzimática de la POD ha sido determinada en frambuesa y fresa (García *et al.* 2004), pitaya (Baquero-Duarte *et al.* 2005), pimentón (Goodwin *et al.* 2003), mangostino (Ketsa *et al.* 1998), calabacín (Lebeda *et al.* 1999), tomate (Lurie *et al.* 1997), tunas (Padiglia et al. 1995), uva (Rivera *et al.* 2004), manzana (Torres *et al.* 2003), arazá (Narváez-Cuenca 2008) entre otros, determinándose que la POD está relacionada con el proceso antioxidante del fruto además, de estar vinculada con el proceso de pardeamiento enzimático de los tejidos.

5.7. Ablandamiento del fruto durante la maduración

La rigidez y textura de las frutas depende en gran medida de su contenido de pectinas, protopectina y pectina soluble en agua. La protopectina atrapa el agua formando una malla y es la que proporciona a la fruta no madura su particular textura y rigidez, con la maduración, esta sustancia es degradada por enzimas pécticas y se va transformando en pectina soluble, que queda disuelta en el agua que contiene la fruta, produciéndose el característico ablandamiento de la fruta madura (Worth 1967). La degradación de las sustancias pécticas ocurre en la pared vegetal que es una estructura rígida que rodea y protege las células vegetales, se ubica externamente sobre la membrana plasmática, desempeñando importantes funciones estructurales como dar forma y soporte a la planta, además de ayudar a regular procesos fisiológicos en el transporte, la absorción y la secreción, incluyendo la respuesta de defensa, actuando como barrera física a la invasión de patógenos. La pared celular está compuesta por una mezcla compleja de carbohidratos, lignina, proteínas, cutina, suberina y algunos componentes inorgánicos que varían de una planta a otra (Bonghi *et al.* 1996).

5.8. Sustancias pécticas

Las pectinas son mezclas complejas de polisacáridos que pueden llegar a constituir un tercio del peso seco de la pared celular de las frutas. Las mayores concentraciones de pectina se han encontrado en la lámina media. Las pectinas tienen función lubricante y estructural en la pared celular de las plantas superiores. También están involucradas en la textura y maduración de los frutos, en el crecimiento de los vegetales y en la interacción entre las plantas huésped y sus patógenos (Rodríguez-Nieto 2008).

Se consideran pectinas los polisacáridos ácidos complejos de naturaleza coloidal que contienen un esqueleto de residuos de ácido galacturónico según el tipo de modificación que sufre la cadena principal o esqueleto de la molécula, el término genérico pectina puede aplicarse a protopectinas, ácido péctico, ácido pectínico y pectina. La protopectina es insoluble en agua, mientras las otras tres sustancias son total o parcialmente solubles en agua (Bonghi *et al.* 1996). La protopectina es una matriz de sustancia péctica que por hidrólisis da lugar a la pectina o al ácido pectínico. La protopectina representa las sustancias pécticas insolubles en agua encontradas en los tejidos vegetales y de las cuales se forman las sustancias pécticas solubles (Worth 1967). Los ácidos pécticos son galacturonanos que no contienen grupos metilos. A las

sales de los ácidos pécticos se les llama pectatos o poligalacturonatos. Los ácidos pectínicos son galacturonanos con cantidades variables de grupos metilos esterificados con los grupos carboxilos del C-6. A las sales de los ácidos pectínicos, se les llama pectinatos. Estas sustancias tienen la propiedad de formar geles con azúcares, con ácidos y, si el contenido de metilos es bajo, con otros componentes como sales de calcio (Zhou 2000).

La pectina es una mezcla amplia de sustancias pécticas de diferente composición que contiene como componente principal el ácido pectínico. La pectina en forma nativa se encuentra localizada en la pared celular y puede estar entrecruzada con otros polisacáridos estructurales y proteínas para formar protopectina insoluble (Priya *et al.* 1996). El componente más abundante de las pectinas es el ácido galacturónico, que forma el esqueleto principal de la molécula consistente en una cadena de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces α-(1,4). Estos residuos pueden estar parcialmente metilados, esterificados en el C-6 con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina. La pectina también contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa (figura 14). Generalmente la ramnosa forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones (El-Bulk *et al.* 1997).

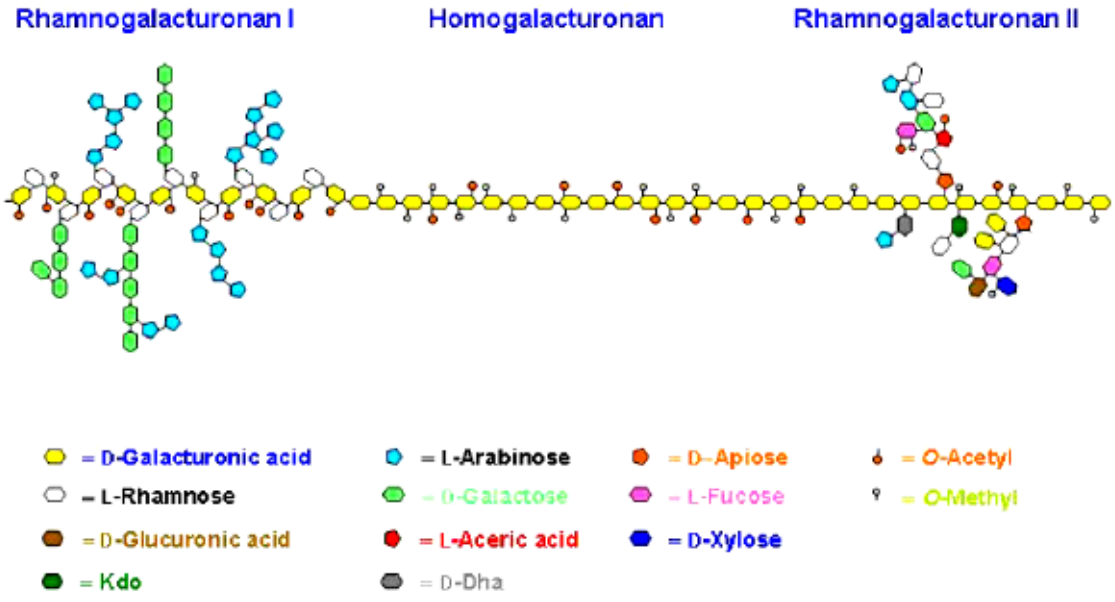


Figura 14. Estructura de la Pectina (Reproducido de Rodríguez-Nieto 2008).

5.9. Fibra dietaria

La fibra dietaria es un constituyente no nutritivo presente principalmente en la pared celular de los tejidos vegetales de leguminosas, cereales, frutas y verduras. Aunque no es hidrolizado ni absorbido, ejerce efectos fisiológicos benéficos para el ser humano contribuyendo a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, obesidad y diabetes (DeVries *et al.* 2005).

Existen numerosas definiciones en relación con el término de fibra, donde la causa principal de estas diferencias es el método analítico empleado para la determinación de sus componentes. El término fibra dietaria en los Estados Unidos es definido con base en diferentes métodos analíticos aceptados por la Asociación Oficial Internacional de Químicos Analíticos (AOAC) en los cuales se aíslan carbohidratos no digeribles de animales y plantas, mientras que en países como Canadá la definición de fibra involucra solo carbohidratos no digeribles de origen vegetal. El Instituto de medicina (IOM) en el año 2001 estableció que el termino fibra total comprende la suma de fibra dietaria y fibra funcional, y definió la fibra dietaria como todos los compuestos constituidos por los carbohidratos no digeribles y la lignina que son constituyentes de los tejidos estructurales de la planta y que no han sufrido modificaciones (están intactos), y fibra funcional como los compuestos aislados, constituidos por carbohidratos no digeribles que ejercen efectos fisiológicos benéficos en humanos (Vitaglione *et al.* 2008).

Esta definición es más flexible y adecuada puesto que permite incorporar en un futuro otros componentes, siempre y cuando se demuestre que ejercen efectos benéficos sobre la salud, también considera la diversidad de carbohidratos no digeribles que se encuentran naturalmente en los alimentos y aquellos que se adicionan de manera intencional a un alimento, incluyendo los carbohidratos que se encuentran en la pared celular de los vegetales, en los tejidos animales y los carbohidratos de bajo peso molecular que son aislados, sintetizados e incorporados a los productos alimentarios durante su elaboración (Saura-Calixto 1998).

La fibra dietaria está constituida por la lignina y por los carbohidratos no digeribles de las plantas presentes en los alimentos los cuales están compuestos, generalmente, por una mezcla de polisacáridos que forman parte integral de la pared celular de las plantas o de su estructura intercelular, lo que indica que la matriz tridimensional de las plantas es responsable de algunas de las propiedades fisicoquímicas que se atribuyen a este tipo de fibra. Estos componentes de los tejidos vegetales son considerados fibra dietaria si las células de la planta y sus

interrelaciones tridimensionales permanecen intactas. La fibra funcional involucra a todos los carbohidratos no digeribles que son aislados o extraídos empleando métodos químicos, enzimáticos o extractos acuosos. Dentro de este tipo de fibra se incluyen los oligosacáridos y los polisacáridos obtenidos sintéticamente o aislados de fuentes naturales con o sin modificación (Jenkins *et al.* 2004).

La hipótesis de la fibra dietaria (figura 15) propuesta por Trowell, Burkitt y Walker en 1976 (DeVries *et al.* 2005), la cual propone que los efectos benéficos de la fibra dietaria tales como la disminución de constipaciones, hemorroides y enfermedades diverticulares, úlceras duodenales, cáncer intestinal, cálculos biliares, hernias hiatales, enfermedades coronarias y cardiovasculares, formación de venas várices, diabetes, obesidad y coagulación sanguínea hacen que el estudio de las propiedades funcionales de la fibra aislada de la guayaba variedad Palmira ICA I sea de gran interés, debido a que en estudios anteriores (Jiménez-Escrig *et al.* 2001) se ha demostrado que el fruto de guayaba es muy rico en fibra dietaria, especialmente en pectina, lo que hace interesante el estudio de la fibra de la guayaba variedad Palmira ICA I para darle un valor agregado como alimento funcional en fresco o como una posible fuente natural de fibra dietaria para ser empleada en productos alimenticios que son funcionalmente menos favorecidos que la guayaba.

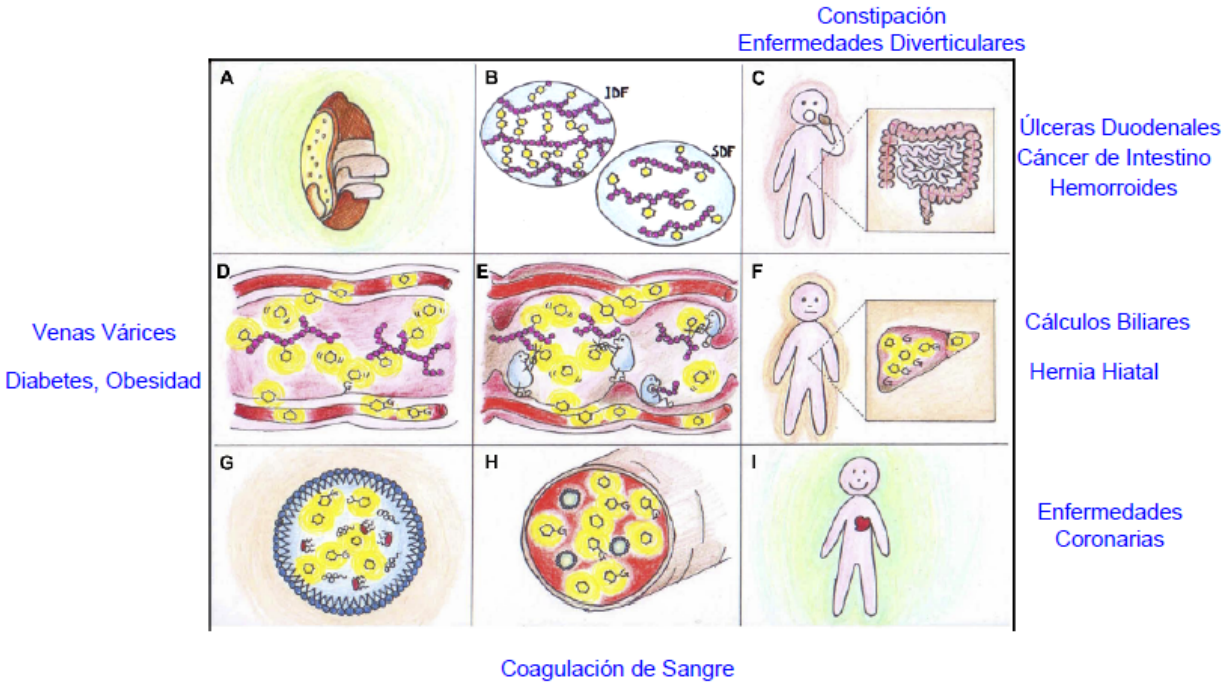


Figura 15. Hipótesis de la fibra dietaria de Hippsley. Funciones fisiológicas de alimentos funcionales ricos en fibra dietaria (Vitaglione *et al.* 2008).

5.10. Enzimas pécticas

Las enzimas pécticas comprenden un grupo muy grande de enzimas dada la complejidad del sustrato, pero en forma resumida, conforman dos grupos: uno de ellos incluye las esterasas que son activas sobre los enlaces metil o acetil ésteres, ubicados en los residuos del ácido galacturónico y el otro grupo de enzimas comprende las despolimerizantes que incluyen tanto las hidrolasas como las liasas (Wu *et al.* 2004). Las enzimas pécticas están relacionadas directamente con el cambio de textura durante el proceso de maduración de frutos climatéricos. El ablandamiento, producido por la maduración, genera un mayor deterioro en el epicarpio (corteza) que en el mesocarpio (pulpa) debido a la acción de las enzimas pécticas que hidrolizan las sustancias pécticas y que se caracterizan por la aparición de zonas necróticas, pardeamiento y ablandamiento excesivo (Rodríguez-Nieto 2008).

5.11. Pectinesterasa PE (E.C. 3.1.1.11)

La PE esta ampliamente distribuida en los tejidos vegetales y su actividad consiste en hidrolizar el enlace éster entre el metanol y el grupo funcional carboxílico del ácido galacturónico. La PE al hidrolizar los enlaces éster metílico, libera metanol de los grupos carboxilos esterificados y transforma la pectina metoxilada en pectina de bajo metoxilo e incluso en ácido poligalacturónico (figura 16). La PE se encuentra ampliamente distribuida en plantas y microorganismos (Warrilow *et al.* 1995).

La pectinesterasa tiene un peso molecular promedio de 25 a 54 kDa, su punto isoeléctrico varia ampliamente desde 3,1 para PE fúngica hasta 11,0 para tomate, tiene termoestabilidad moderada entre 40 y 70ºC, siendo más termoestables las PE de plantas con respecto a las de origen microbiano (Rodríguez-Nieto 2008). La estabilidad al pH depende del origen de la enzima, su pH óptimo se encuentra entre 6,0 y 8,0 y a menudo se requiere la adición de NaCl para que la catálisis sea máxima. En cuanto a su reacción sobre las pectinas, el grado de metoxilación de la molécula de pectina perece ser un factor importante en la degradación, algunas isoformas de PE son más activas con moléculas de alto grado de metoxilación, mientras que otras no lo son. De igual manera, algunas formas de la enzima se inhiben en presencia de Hg^{2+}, Al^{3+}, NH_4^+, azúcares o ácido gálico, mientras que otras no y muchas de ellas se inhiben por el producto de su reacción, el ácido galacturónico (Pires *et al.* 2005).

La pectinesterasa se ha extraído y caracterizado como parte del comportamiento que presenta el complejo proceso de maduración de la fracción comestible del chalote (Wu *et al.* 2004), durazno (Zhou *et al.* 2000), arracacha (Pires *et al.* 2005), tomate (Warrilow *et al.* 1995), papaya (Fayyas *et al.* 1995), papa (Puri *et al.* 1982), pitaya (Carabalí-Miranda *et al.* 2009), lulo (Rodríguez-Nieto 2008), encontrándose en todas las investigaciones que la pectinesterasa está involucrada en el proceso de ablandamiento de los frutos y que si se logra controlar la acción enzimática de la pectinesterasa se controlará el proceso de ablandamiento y la comercialización de los frutos será mas rentable.

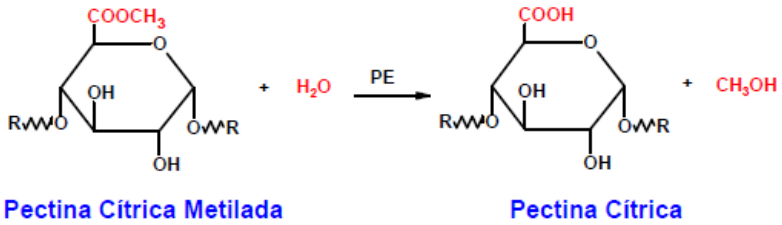


Figura 16. Degradación de la pectina por acción de la pectinesterasa, hidrólisis del enlace éster del ácido poligalacturónico metilado.

5.12. Poligalacturonasa PG (E.C. 3.2.1.67)

Las PG son las enzimas que rompen el enlace glicosídico α-(1-4) del ácido galacturónico (enlaces galactosídicos) a través de un mecanismo de hidrólisis (figura 17). Dependiendo del ataque del sustrato, estas pueden ser endopoligalacturonasas (E.C. 3.2.1.15), produciendo una marcada disminución en la viscosidad debido a la hidrólisis de los enlaces glicosídicos internos, o puede ser en los extremos del polímero por medio de las exopoligalacturonasas (E.C. 3.2.1.67), produciendo moléculas libres de ácido galacturónico. En este caso la viscosidad no se ve afectada significativamente. Las poligalacturonasas son activas con pectinas de bajo o moderado grado de esterificación (Muchuweti *et al.* 2005).

Las exopoligalacturonasas pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas, tienen un peso molecular que varia entre 30 y 75 kDa, y su punto isoeléctrico varía entre 3,8 y 8,8, mientras que su pH óptimo de actividad se encuentra entre 3,5 y 6,0. La mayoría tienen su mayor actividad a temperaturas entre 40 y 55 ºC, aunque generalmente los ensayos de actividad enzimática se realizan entre 25 y 37ºC. Dada la presencia de varias isoformas de la enzima, sus propiedades cinéticas también muestran diferencias entre ellas. Los cationes divalentes pueden

tener un efecto inhibitorio, ya que al interactuar con el sustrato lo hace menos accesible a la acción de la enzima (Bonghi *et al.* 1996). Se ha descrito también la presencia de inhibidores de esta enzima que son de naturaleza proteica (proteínas inhibidoras de poligalacturonasa), a las que se les ha asociado un papel importante en los sistemas de defensa de las plantas contra el ataque de microorganismos, además se ha comprobado con técnicas de biología molecular que hay especificidad de las proteínas inhibidoras de poligalacturonasa hacia determinados tipos de endopoligalacturonasas y que hay genes de esas proteínas que se expresan a través del daño mecánico y por ataque de patógenos (Priya *et al.* 1996).

Las poligalacturonasas se encuentran naturalmente en los frutos y se les ha atribuido como responsables del ablandamiento de los frutos durante la maduración, ya sean frutos climatéricos o no climatéricos, además se ha evidenciado que el control de estas enzimas está directamente relacionado con el tiempo de vida de anaquel de frutos como pera (Pressey y Avant 1976), tomate (Warrilow *et al.* 1995), fresa (Nogata *et al.* 1993), guayaba (Abu-Bakr *et al.* 2003), kiwi (Bonghi *et al.* 1996), pimentón (Priya *et al.* 1996), banano (Pathak *et al.* 2000), frutos silvestres de Zimbabwee (Muchuweti *et al.* 2005), mango (Prasanna *et al.* 2006), arracacha (Pires *et al.* 2005) y lulo (Rodríguez-Nieto 2008).

La poligalacturonasa no es la única enzima responsable del proceso de ablandamiento de los tejidos, se ha demostrado mediante procesos de biología molecular que en plantas transgénicas de tomate, banano y fresa, con el gen de la poligalacturonasa suprimido, los frutos también sufren el proceso de ablandamiento, indicando que otras enzimas que actúan sobre ostros sustratos no pécticos (celulosa, ligninas y xilanos entre otros) también contribuyen significativamente al proceso de ablandamiento de los frutos (Prassana *et al.* 2006).

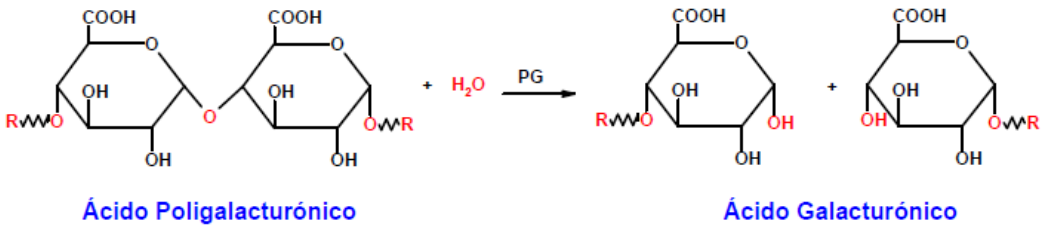


Figura 17. Hidrólisis del enlace glicosídico α-(1,4) tras la acción de la poligalacturonasa.

6. METODOLOGÍA

La metodología experimental general empleada para el estudio de la capacidad antioxidante y el ablandamiento del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I se muestra a continuación:

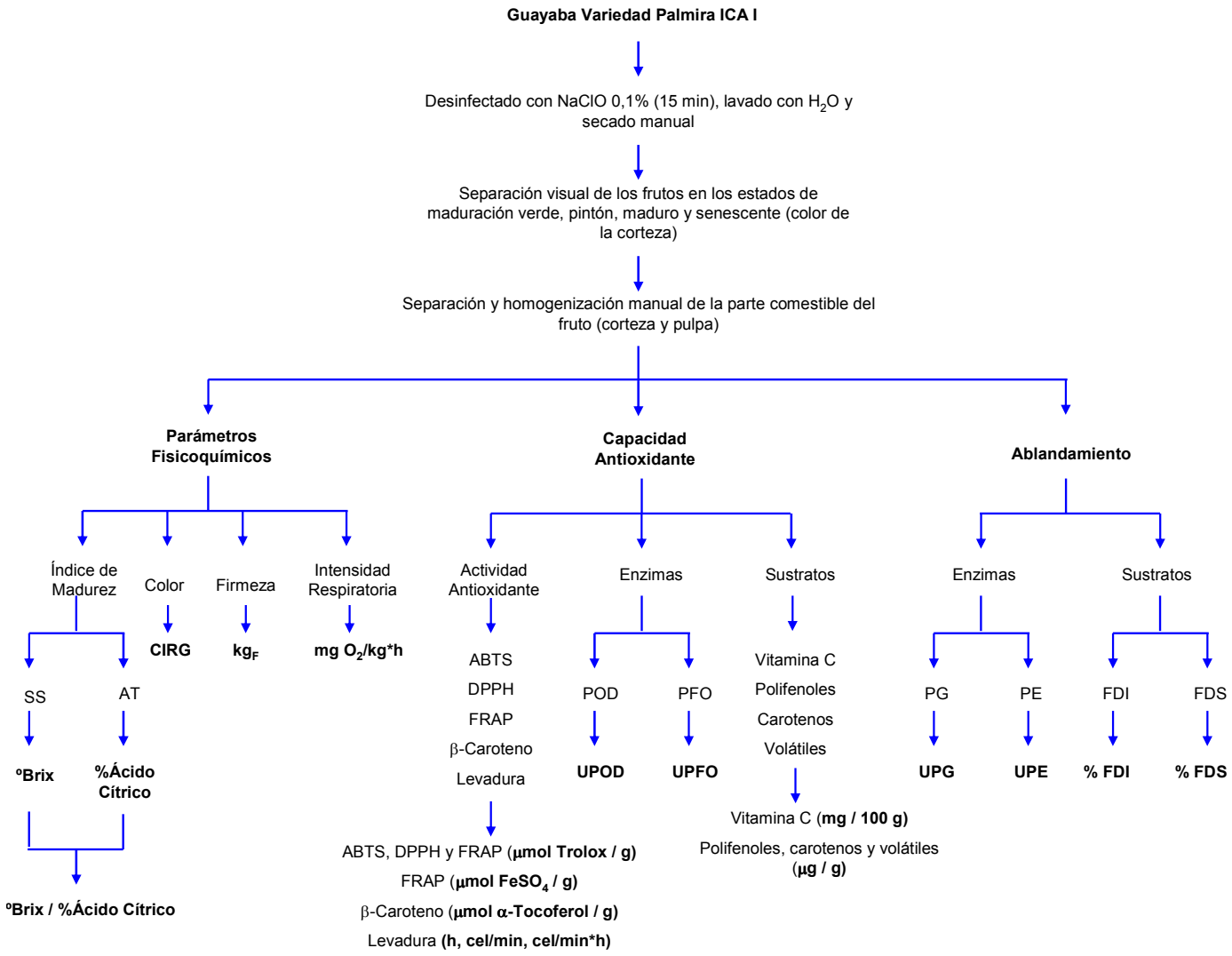


Figura 18. Metodología experimental general para el estudio de la capacidad antioxidante y el ablandamiento del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I. Sólidos solubles (SS), acidez titulable (AT), Color Index Red Grape (CIRG), peroxidasa (POD), polifenoloxidasa (PFO), poligalacturonasa (PG), pectinesterasa (PE), unidades de actividad específica de peroxidasa (UPOD), unidades de actividad específica de polifenoloxidasa (UPFO), unidades de actividad específica de poligalacturonasa (UPG), unidades de actividad específica de pectinesterasa (UPE), fibra dietaria soluble (FDS), fibra dietaria insoluble (FDI), porcentaje de fibra dietaria soluble (%FDS) y porcentaje de fibra dietaria insoluble (%FDI).

6.1. Material vegetal

Los frutos de guayaba variedad Palmira ICA I fueron clasificados taxonómicamente por el Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia como *Psidium guajava* L. con el código 27240. Los frutos fueron adquiridos en el municipio de Puente Nacional de la provincia de Vélez del departamento de Santander-Colombia (5º53″60′ latitud norte, 73º41″60′ longitud oeste de Greenwich, 1625 m.s.n.m. con temperatura promedio de 18 ºC) en cuatro estados de maduración (verde, pintón, maduro y senescente). Se realizó una selección visual por color, sanidad y tamaño (NTC 1263). Los frutos fueron desinfectados con una solución de NaClO (0,1%) durante 20 min, luego fueron lavados con agua y secados manualmente. Se emplearon los frutos enteros para los análisis fisicoquímicos y la parte comestible de los frutos para los análisis químicos y enzimáticos. La parte comestible del fruto (corteza y pulpa) fue separada de las semillas manualmente. Se cortó el fruto en fragmentos pequeños y se trituró durante 5 min en un procesador de alimentos hasta obtener una masa homogénea. La masa formada fue pasada a través de un tamiz casero donde se eliminaron las semillas. Las muestras se guardaron hasta el momento de los análisis a -80 ºC en la oscuridad en bolsas de plástico herméticamente selladas.

6.2. Caracterización fisicoquímica del estado de madurez

6.2.1. Intensidad respiratoria: La intensidad respiratoria se estimó por la cantidad de O_2 consumido por el fruto entero de guayaba. La medida del O_2 consumido se realizó con un sensor electroquímico selectivo a O_2 O2-BTA Vernier de 0 – 27 ppm acoplado a una calculadora Texas Instrument TI 83 Plus. La medida del O_2 consumido por el fruto entero se realizó mediante la diferencia entre las concentraciones de O_2 inicial y final, después de 1 h de almacenamiento en una cámara de 1 L (Bower *et al.* 1998). Los intensidad respiratoria fue expresada como mg O_2/ kg fruta.h. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3).

6.2.2. Índice de madurez: El índice de madurez fue calculado como la relación entre los sólidos solubles y la acidez titulable y fue expresado como ºBrix/% ácido cítrico. Los sólidos solubles se midieron sobre la parte comestible del fruto a una temperatura de 19 ºC con un refractómetro manual ATAGO 8382 entre 0-90 % y se expresaron como ºBrix (NTC 4624). La acidez titulable se midió mediante una titulación con una solución estandarizada de hidróxido de sodio 0,05 N de 1 g de la parte comestible del fruto (NTC 4623). La acidez titulable se expresó como %p/p de

ácido cítrico. Las medidas de sólidos solubles y de acidez titulable fueron realizadas por triplicado (n=3).

6.2.3. Color instrumental: La medida de color se realizó sobre el fruto entero con un colorímetro de reflactancia Minolta CR-300 con una fuente de iluminación C. El patrón de calibración fue un patrón blanco CR-300 con coordenadas L, a* y b* de 97,05; 0,46 y 1,78 respectivamente. La medida de color fue realizada en la corteza y en la pulpa del fruto. La medida de color en la pulpa de fruto se realizó mediante un corte paralelo al eje ecuatorial del fruto evitando la presencia de las semillas. Se realizaron 3 medidas en la corteza y en la pulpa en sitios al azar de 3 frutos por grupo (n=9). Los resultados fueron expresados como el índice CIRG (Colour Index Red Grape) del sistema CIE L*a*b* para cada estado de madurez (Carreño *et al.* 1995). El índice CIRG se definió como:

$$CIRG = \frac{180 - h^*}{L^* + C^*}$$

Donde L* corresponde a la luminosidad, C* al valor chroma (saturación) y h* al hue angle (tonalidad), que se definen así:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{y}$$

$$h^* = \begin{cases} 180 + \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{360}{2\pi} & si\ a^* \langle 0 \\ \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{360}{2\pi} & si\ a^* \rangle 0 \end{cases}$$

6.2.4. Firmeza instrumental: Los perfiles de fuerza de compresión sobre el fruto entero fueron medidos con un Texturómetro Texture Analyser TA XT PLUS Stable Micro Systems. Se usó una sonda de acero inoxidable P/2 de 2 mm de diámetro. La velocidad del émbolo antes del test de compresión fue de 1 mm/s, durante el test fue de 0,2 mm/s y después del test fue de 10 mm/s. La distancia de penetración del émbolo fue de 15 mm con una fuerza de gatillo de 100 g. La velocidad de adquisición de datos fue de 25 pps (puntos por segundo). La firmeza de la corteza corresponde al valor máximo del perfil de compresión, mientras que la firmeza de la pulpa corresponde al valor promedio de la meseta del perfil de compresión (Batu 2004, Duprat *et al.*

1995). Se realizaron 3 medidas en la corteza y en la pulpa en sitios al azar de 3 frutos por grupo (n=9). Las unidades de firmeza fueron expresadas como kilogramos fuerza (kg_f).

6.3. Cuantificación de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total del fruto fue determinada mediante cuatro métodos de medida de actividad antioxidante. La actividad antioxidante hidrofílica fue determinada mediante los métodos ABTS, DPPH y FRAP mientras que la actividad antioxidante lipofílica fue determinada mediante el método de decoloración del β-caroteno.

6.3.1. Extracción de los compuestos antioxidantes para los métodos ABTS, DPPH, FRAP y Fenoles libres: Se pesó 1 g de muestra (parte comestible de la guayaba) en un tubo Falcon de 50 mL, se le adicionó 10 mL de etanol y se hizo reflujo durante 30 min a 50 ºC. Se centrifugó (4 ºC, 10 min y 3857 x g) y se guardó el sobrenadante. Al residuo se le realizó una segunda extracción con las mismas condiciones anteriores, se desechó el residuo, se reunieron los sobrenadantes y se guardaron en tubos Falcon de 15 mL a -80 ºC hasta el momento del análisis. Todo el procedimiento fue realizado en la oscuridad (Restrepo-Sánchez *et al.* 2009).

6.3.2. Método ABTS: El método ABTS fue realizado según la metodología establecida por Restrepo-Sánchez *et al.* (2009) y Thaipong *et al.* (2006). Se preparó una solución de ABTS 7,0 mM y persulfato de potasio 2,5 mM en agua y se agitó a 4 ºC durante 16 h en la oscuridad para generar el catión radical $ABTS^{\bullet+}$. Se realizó una dilución adecuada de esta solución con etanol hasta obtener la solución de $ABTS^{\bullet+}$ de trabajo con absorbancia a 734 nm de 0,700. 1000 μL de esta solución se incubaron a 30 ºC durante 5 min y se midió la absorbancia inicial a 734 nm. Para construir la curva de calibración (anexo 1) se adicionaron 10 μL de soluciones de Trolox en etanol entre 0 y 1500 μM a la solución de $ABTS^{\bullet+}$, se incubó a 30 ºC durante 6 min y se midió la absorbancia final a 734 nm. La medida de la actividad antioxidante de las muestras se realizó incubando 1000 μL de la solución de trabajo de $ABTS^{\bullet+}$ a 30 ºC durante 5 min y se midió la absorbancia inicial a 734 nm. Se adicionó 10 μL de una dilución al 40% del extracto etanólico de compuestos antioxidantes y se incubó a 30 ºC. Se tomaron medidas de absorbancia a 734 nm cada 5 min durante 1 h, hasta llegar a una lectura constante de absorbancia final. Todo el procedimiento fue realizado en la oscuridad. Se calculó la reducción de la concentración de $ABTS^{\bullet+}$ ocasionada por el antioxidante como $\Delta A_{734nm} = A_{Inicial\ 734nm} - A_{Final\ 734nm}$. La actividad

antioxidante fue expresada como la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) expresada como μmol Trolox / g fruta. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3).

6.3.3. Método DPPH: El método DPPH fue realizado según la metodología establecida por Thaipong *et al.* (2006). Se preparó una solución de DPPH 0,1 mM en etanol con una absorbancia a 515 nm de 1,100. 975 μL de esta solución se incubaron a temperatura ambiente durante 7 min y se midió la absorbancia inicial a 515 nm. Para construir la curva de calibración (anexo 1) se adicionaron 25 μL de soluciones de Trolox en etanol entre 0 y 500 μM a la solución de DPPH, se incubó a temperatura ambiente durante 7 min y se midió la absorbancia final a 515 nm. La medida de la actividad antioxidante de las muestras se realizó incubando 975 μL de la solución de DPPH a temperatura ambiente durante 7 min y se midió la absorbancia inicial a 515 nm. Se adicionaron 25 μL del extracto etanólico de compuestos antioxidantes y se incubó a temperatura ambiente. Se tomaron medidas de absorbancia a 515 nm cada 5 min durante 2 h, hasta llegar a una lectura constante para obtener la absorbancia final. Todo el procedimiento fue realizado en la oscuridad. Se calculó el porcentaje de inhibición del DPPH ocasionada por el antioxidante así:

$$\%Inhibición_{DPPH} = \frac{A_{515nm\ Inicial} - A_{515nm\ Final}}{A_{515nm\ Inicial}} \times 100$$

La actividad antioxidante fue expresada como la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) expresada como μmol Trolox / g fruta. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3).

6.3.4. Método FRAP: El método FRAP fue realizado según la metodología establecida por Restrepo-Sánchez *et al.* (2009) y Thaipong *et al.* (2006). El reactivo de FRAP se preparó mezclando 2,5 mL de una solución de TPTZ 10 mM preparada en HCl 40 mM con 2,5 mL de $FeCl_3$ 20 mM en agua. Se agitó hasta obtener una solución azul y se adicionaron 25 mL de buffer acetatos 300 mM pH 3,6. 900 μL del reactivo de FRAP se incubaron a 37 ºC durante 4 min y se midió la absorbancia inicial a 593 nm. Para construir las curvas de calibración con Trolox y $FeSO_4$ (anexo 1) se adicionaron 90 μL de agua y 30 μL de soluciones de Trolox en etanol ó $FeSO_4$ en agua entre 0 y 1500 μM al reactivo de FRAP, se incubó a 37 ºC durante 4 min y se midió la absorbancia final a 593 nm. La medida de la actividad antioxidante de las

muestras se realizó incubando 900 μL del reactivo de FRAP a 37 ºC durante 4 min y se midió la absorbancia inicial a 593 nm. Se adicionaron 90 μL de agua y 30 μL de una dilución al 50% del extracto etanólico de compuestos antioxidantes y se incubó a 37 ºC. Se tomaron medidas de absorbancia a 593 nm cada 5 min durante 2 h, hasta llegar a una lectura constante para obtener la absorbancia final. Todo el procedimiento fue realizado en la oscuridad. Se calculó el aumento de la concentración del TPTZ-Fe^{+2} ocasionada por el antioxidante como $\Delta A_{593nm} = A_{Final\ 593nm} - A_{Inicial\ 593nm}$. La actividad antioxidante fue expresada como la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) y al $FeSO_4$ expresada como μmol Trolox / g fruta y μmol $FeSO_4$ / g fruta. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3).

6.3.5. Método de decoloración del β-caroteno: La actividad antioxidante lipofílica se midió mediante el método de decoloración del β-caroteno (Velioglu *et al.* 1998, Narváez-Cuenca 2003, *Vargas et al.* 2005, Barros *et al.* 2007). A 0,2 g de muestra (parte comestible de la guayaba) se le adicionaron 4 mL de solución extractante (metanol-agua-HCl 80:19:1% v/v) y se agitó a temperatura ambiente a 2500 rpm en vórtex durante 120 min. Se centrifugó (4 ºC, 10 min y 5550 x g) y el sobrenadante se guardó a -80 ºC en condiciones de oscuridad hasta el momento del análisis. Se tomaron 500 μL de una solución de β-caroteno en cloroformo 0,4 mg/mL, se adicionaron en un tubo Falcon de 50 mL y se evaporó el cloroformo a temperatura ambiente. Se adicionaron 20 μL de ácido linoleico, 200 μL de Tween 20 y 200 μL del compuesto antioxidante, seguido de 50 mL de agua desionizada saturada con oxígeno mediante burbujeo de aire durante 12 h, se agitó fuertemente, se sometió a un baño de ultrasonido de 36 kHz durante 10 min y se incubó a 50 ºC durante 2 horas con agitación constante y varios periodos de 2 min en un baño de ultrasonido para promover la formación de la micela. Se leyó la absorbancia a 470 nm cada 10 min durante 2 horas. Todo el procedimiento fue realizado en la oscuridad. Los compuestos antioxidantes que se midieron fueron la muestra (extracto de compuestos antioxidantes), blanco (solución extractante) y un patrón de α-tocoferol 50 μM. La actividad antioxidante lipofílica de las muestras se determinó mediante la velocidad de decoloración del β-caroteno (pendiente de la curva de decoloración) y se expresó como μmol α-tocoferol / g fruta. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3).

6.4. Identificación y cuantificación de los compuestos con actividad antioxidante

6.4.1. Cuantificación HPLC-UV de ácido ascórbico (vitamina C): Se empleó el método cromatográfico establecido por Yuan y Chen (1999). A 2 g de muestra (parte comestible de la guayaba) se le adicionaron 8 mL de H_2SO_4 5 mM preparado en agua mQ (grado HPLC) y se agitó en vortex a 2500 rpm durante 2 min y se centrifugó (4 ºC, 15 min y 4146 x g). El sobrenadante se guardó a -80 ºC hasta el momento del análisis. Las muestras con 1,4-ditiotreitol (DTT) para la cuantificación del ácido ascórbico total se prepararon adicionando 500 μL del extracto de ácido ascórbico a 200 μL de una solución de DTT 10 mg/mL preparada en agua mQ y 1300 μL de H_2SO_4 5mM y se dejó reaccionar durante 90 min. Las muestras sin DTT para la cuantificación del ácido ascórbico disponible y ácido dehidroascórbico se prepararon adicionando 500 μL del extracto de ácido ascórbico a 1500 μL de H_2SO_4 5 mM. Las muestras y los patrones se filtraron a través de membranas PVDF de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro. Las muestras fueron analizadas mediante un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC Shimadzu LC-20AT con desgasificador DGU-20AS y detector UV/VIS SPD-20A, con loop de inyección de 20 μL. El método cromatográfico empleado fue con elusión isocrática de fase móvil H_2SO_4 5mM, flujo 0,5 mL/min, detector UV a 254 nm, se usó una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H (8% de entrecruzamiento de estireno divinilbenceno sulfonado SDVB) de 300 mm x 7,8 mm x 9 μm selectiva a H^+, a temperatura ambiente (20ºC). La curva de calibración se preparó entre 0 y 100 μg/mL de ácido ascórbico con DTT 1,0 mg/mL de concentraciones finales (anexo 1). La concentración de ácido ascórbico fue expresada como mg ácido ascórbico / 100 g fruta. Todo el procedimiento fue realizado en condiciones de oscuridad. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3).

6.4.2. Cuantificación de los compuestos fenólicos libres: Los compuestos fenólicos libres fueron cuantificados mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Restrepo-Sánchez *et al.* (2009) y Thaipong *et al.* (2006). A 750 μL del reactivo de Folin Ciocalteu diluido al 10% en agua, se le adicionaron 100 μL de la solución de compuestos antioxidantes (patrones de diferentes concentraciones y muestras) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, luego se adicionaron 750 μL de una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 6% en agua, se agitó y se dejó en reposo durante 90 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm. La curva de calibración se realizó con patrones de ácido gálico con concentraciones finales entre 0 y 10 μg/mL en agua (anexo 1). El extracto

de los compuestos fenólicos descrito anteriormente se diluyó un 50% con agua. La concentración de fenoles libres se expresó como mg ácido gálico / 100 g fruta. Todo el procedimiento fue realizado en condiciones de oscuridad. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3).

6.4.3. Identificación y cuantificación HPLC-DAD de los compuestos fenólicos: La identificación y cuantificación HPLC-DAD de los compuestos polifenólicos extraídos del fruto de guayaba fue realizada mediante el método establecido por Ballester *et al.* (2010). Se pesaron 100 mg de muestra (liofilizada, triturada con N_2 líquido y congelada a -80 ºC) en un tubo de plástico de 2 mL, se adicionó 600 μL de metanol grado HPLC al 80% en agua mQ, 5 bolas de acero inoxidable de 2 mm de diámetro y se trituró con un disruptor de bolas metálicas a 4 ºC durante 2 min. Se centrifugó (4 ºC, 5 min y 18327 x g) y se guardó el sobrenadante. Al residuo se le realizó una segunda extracción en las mismas condiciones descritas anteriormente, y se reunieron los sobrenadantes en un tubo de 2 mL. A 400 μL del extracto obtenido se le adicionaron 400 μL de metanol HPLC, se filtró a través de membranas PVDF de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro y se inyectó en el cromatógrafo para identificar y cuantificar las agliconas de los compuestos fenólicos. A 500 μL del extracto obtenido se le realizó hidrólisis ácida con 500 μL de HCl 2 N e incubación a 70 ºC durante 1 h. Se hicieron dos extracciones con 500 μL de cloroformo grado HPLC para recuperar los compuestos fenólicos y la fase orgánica se llevó a sequedad con corriente de N_2, el residuo se resuspendió en 1000 μL de metanol grado HPLC al 80% en agua mQ, se filtró a través de membranas PVDF de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro y se inyectó en el cromatógrafo para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos glicosidados. Para el método cromatográfico se empleó un cromatógrafo HPLC Waters 600, con un bomba de 4 canales de presión máxima de 1000 psi, inyector automático Waters 717 Plus de viales Wheaton de vidrio de 1 mL, volumen de inyección de 20 μL, horno Waters 410 a 35 ºC, detector de arreglo de diodos (DAD) Waters 2996 con espectros de longitudes de onda entre 200 y 400 nm cada 1 nm, detector de fluorescencia Waters 474 con longitudes de onda de excitación-emisión de 313 y 405 nm respectivamente, columna C18 Phenomenex de 250 mm x 4,6 mm x 5 μm con una precolumna C18 μBondpack de 20 mm x 4 mm x 10 μm. El método se llevó a cabo a 35 ºC. Se empleó un flujo de 0,8 mL/min con el siguiente gradiente binario de elusión lineal de acetonitrilo (ACN) y agua mQ pH 2,5 ajustado con H_3PO_4 al 85% (H_2O pH 2,5) para un tiempo de corrida total de 130 min.

Tabla 3. Gradiente binario de elusión lineal utilizado para la separación de los compuestos fenólicos mediante la técnica HPLC-DAD.

Tiempo (min)	0	60	105	115	116	130
ACN (%)	1	30	99	99	1	1
H_2O pH 2,5 (%)	99	70	1	1	99	99

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó con patrones certificados de morina, kaempferol, quercetina, quercetina-3-β-glucósido y los ácidos ferúlico, elágico, cafeico, protocatecuico, clorogénico y gálico. La identificación de los compuestos polifenólicos fue realizada por comparación con los patrones del tiempo de retención y las longitudes de onda de máxima absorción (λ_1, λ_2, λ_3 y λ_4) de los espectros UV-VIS. Las curvas de calibración se realizaron entre cantidades de inyección totales de 5 y 200 ng (anexo 2). Todo el procedimiento fue realizado en condiciones de oscuridad. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3). La concentración de cada uno de los compuestos fenólicos fue expresada como μg polifenol / g de fruta.

6.4.4. Cuantificación de los compuestos carotenoides totales, Identificación y cuantificación HPLC-DAD de los compuestos carotenoides: La identificación y cuantificación HPLC-DAD de los compuestos carotenoides extraídos del fruto de guayaba fue realizada mediante el método establecido por Rodrigo *et al.* (2003). Se pesaron 250 mg de muestra (liofilizada, triturada con N_2 líquido y congelada a -80 ºC) en un tubo de plástico ámbar de 15 mL, se adicionaron 2 mL de metanol grado HPLC y 1,5 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con NaCl 1 M preparado en agua mQ. Se agitó en vortex (25 ºC, 10 s y 2500 rpm) y luego se agitó magnéticamente (4 ºC, 5 min y 3000 rpm). Se adicionaron 4 mL de cloroformo grado HPLC, se agitó en vortex (25 ºC, 10 s y 2500 rpm) y luego se agitó magnéticamente (4 ºC, 5 min y 3000 rpm), se centrifugó (4 ºC, 5 min y 2332 x g) y se recuperó la fase orgánica (inferior) con una pipeta Pasteur, el extracto se adicionó en un balón de fondo redondo ámbar de 50 mL. Se realizaron 4 lavados de la solución acuosa con 4 mL cloroformo grado HPLC cada uno (hasta que la fase orgánica salió incolora) y se juntaron todos los extractos en el balón ámbar. Se llevó a sequedad en rotavapor (40 ºC, 3 min y 0,2 atm) y se adicionó 1,8 mL de metanol grado HPLC y 200 μL de KOH al 60% preparado en agua mQ, se agitó en vortex (25 ºC, 10 s y 2500 rpm), se purgó el balón con corriente de N_2 y se dejó que la reacción de saponificación ocurriera (25 ºC, 12 h en condiciones de oscuridad). El contenido del matraz se transfirió cuantitativamente a un tubo de plástico

ámbar de 50 mL con una pipeta Pasteur, y se lavó el matraz con 2 mL de agua mQ, seguido de 4 mL de solución A (éter de petróleo-éter etílico 90:10% v/v) y 1 mL de cloroformo grado HPLC. Se realizaron varios lavados del matraz con solución A y cloroformo grado HPLC hasta que la solución salió incolora, juntando todos los extractos en el tubo de plástico ámbar de 50 mL. Con una pipeta Pasteur se transfirió la fase orgánica (superior) a otro tubo de vidrio ámbar de 50 mL y se lavó la fase acuosa con 2 mL de solución A, se repitieron los lavados varias veces hasta que la solución A salió incolora, juntando todo el extracto en el tubo de vidrio ámbar de 50 mL. Se ajustó el volumen final con solución A a un volumen conocido y se realizó la cuantificación espectrofotométrica de los compuestos carotenoides totales.

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro UV-VIS Thermo Electron Corporation MultiSkan Spectrum con una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El espectro de absorción se midió entre 270 y 540 nm cada 2 nm. Los compuestos carotenoides totales fueron expresados como μg licopeno ó β-caroteno / g fruta según las constantes de la tabla 4.

Tabla 4. Longitudes de onda de máxima absorción (λ_{Max}) y coeficientes de extinción molar ($\varepsilon_{1cm}^{12\%}$) para la cuantificación de los compuestos carotenoides totales expresados como β-caroteno y licopeno.

Carotenoides	λ_{Max} (nm)	$\varepsilon_{1cm}^{12\%}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
β-Caroteno	450	2500
Licopeno	470	2505

La concentración de los compuestos carotenoides totales se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$Carotenoides\ Totales\ (\mu g / g_{Tejido}) = \frac{(A_{\lambda_{Max(nm)}} - A_{540nm})(1x10^{6})(V_{Final}(mL))}{(\varepsilon_{1cm}^{12\%})(100)(m_{Muestra}(g))}$$

Después de cuantificar los compuestos carotenoides totales, el extracto se llevó a sequedad con corriente de N_2, se resuspendió en 500 μL de una solución de cloroformo-metanol-acetona 50:33:17% v/v, se filtró a través de membranas PVDF de 13 mm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro y se inyectó en el cromatógrafo para identificar y cuantificar los compuestos carotenoides. El análisis HPLC-DAD de los compuestos carotenoides se realizó mediante la siguiente metodología cromatográfica: Se empleó un cromatógrafo HPLC Waters 600, con una

bomba de 4 canales de presión máxima de 1000 psi, loop de inyección de 20 μL, horno Waters 450 a 25 ºC, detector de arreglo de diodos (DAD) Waters 996 con espectros de longitudes de onda entre 250 y 540 nm cada 1 nm, columna C30 YMC Europe GMBH de 250 mm x 4,6 mm x 5 μm con una precolumna C30 YMC Europe GMBH de 20 mm x 4 mm x 5 μm. El método se llevó a cabo a 25 ºC. Se empleó un flujo de 1 mL/min con el siguiente gradiente ternario de elusión lineal de metil-tertbutil-éter (MTBE), agua (H_2O) y metanol (MeOH) para un tiempo de corrida total de 75 min:

Tabla 5. Gradiente ternario de elusión lineal utilizado para la separación de los compuestos carotenoides mediante la técnica HPLC-DAD.

Tiempo (min)	**0**	**12**	**20**	**30**	**50**	**70**	**75**
MTBE (%)	5	5	14	25	50	75	5
H_2O (%)	5	0	0	0	0	0	5
MeOH (%)	90	95	86	75	50	25	90

La identificación y cuantificación de los compuestos carotenoides se realizó con patrones certificados de luteína, fitoeno, fitoflueno, β-caroteno y all-E-licopeno. La identificación de los compuestos carotenoides fue realizada por comparación con los patrones del tiempo de retención, longitudes de onda de máxima absorción (λ_1, λ_2 y λ_3) y relación %III/II de los espectros UV-VIS (anexos 3 y 4). Las curvas de calibración se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. Límites de detección y ecuaciones de las curvas de calibración empleadas para la cuantificación cromatográfica por HPLC de los distintos compuestos carotenoides.

Carotenoide	**Límite de Detección (ng)**	**Curva de Calibración**	**r^2**
Luteína	7	$\mu g=8{,}24810\times10^{-8}\times$Área	0,9900
Fitoeno	20	$\mu g=3{,}73158\times10^{-7}\times$Área	0,9944
Fitoflueno	8	$\mu g=1{,}79116\times10^{-7}\times$Área	0,9944
β-Caroteno	9	$\mu g=8{,}34097\times10^{-8}\times$Área	0,9922
Licopeno	5	$\mu g=8{,}99645\times10^{-8}\times$Área	0,9963

*Fuente: Alquezar *et al.* (2008)

Todo el procedimiento fue realizado en condiciones de oscuridad. Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3). La concentración de cada uno de los compuestos carotenoides

fue expresada como μg carotenoide / g de fruta. Una vez realizados los análisis HPLC-DAD, las muestras se llevaron a sequedad con corriente de N_2, se guardaron a -80 ºC en condiciones de oscuridad y atmósfera inerte (N_2) para ser empleadas posteriormente en la evaluación de su capacidad antioxidante celular *in vitro* en un ensayo de estrés oxidativo inducido con H_2O_2 sobre levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

6.5. Cuantificación de la fibra dietaria total, soluble e insoluble

La cuantificación de la fibra dietaria total, soluble e insoluble se realizó por el método enzimático-gravimétrico establecido por DeVries *et al.* (2005) y por los métodos AOAC 985.29 (1995) para fibra dietaria total, AOAC 991.42 (1995) para fibra dietaria insoluble y AOAC 991.43 (1995) para fibra dietaria soluble. El análisis se realizó con el kit para la determinación de fibra dietaria total SIGMA TDF-100A. El protocolo de cuantificación fue el siguiente: se lavó y se secó (525 ºC, 1 h) un crisol, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se registró el peso inicial del crisol, se adicionó 0,5 g de celita (tierra de diatomeas) y se secó (130 ºC, 1 h), se registró el peso del crisol con la celita, y se guardó en un desecador. Se pesó 1 g de la parte comestible de la guayaba previamente limpiada, desengrasada y liofilizada, se adicionaron 50 mL de buffer fosfatos 0,08 M pH 6,0 y se calentó a 92 ºC. Se adicionaron 100 μL de α-amilasa termoestable y se incubó (92 ºC, 15 min) agitando cada 3 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 7,5 adicionando 10 mL de NaOH 0,275 M y se calentó a 60 ºC. Se adicionaron 100 μL de una solución de proteasa (proveniente de *Bacillus licheniformis*) 50 mg/mL preparada en buffer fosfatos 0,08 M pH 6,0 y se incubó (60 ºC, 30 min) agitando cada 5 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 4,5 adicionando 10 mL de HCl 0,325 M y se llevó a 60 ºC, se adicionaron 100 μL de amiloglucosidasa (proveniente de *Aspergillus niger*) y se incubó (60 ºC, 30 min) agitando cada 5 min. Se dejó enfriar y decantar durante 12 horas. Se filtró, secó (70 ºC, 12 h) y pesó el papel filtro para determinar la fibra dietaria insoluble. Al sobrenadante se le adicionaron 250 mL de etanol y se dejó precipitar durante 12 horas. Se filtró, secó (70 ºC, 12 h) y se pesó el papel filtro para determinar la fibra dietaria soluble, mientras que la fibra dietaria total se determinó como la suma de la fibra dietaria soluble e insoluble. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Zor y Selinger 1996) y la cantidad de cenizas (525 ºC, 5 h) y se restaron a los valores de fibra dietaria (corrección por peso de proteínas y cenizas). Las medidas fueron realizadas por triplicado (n=3). La cantidad de fibra dietaria total, soluble e insoluble fue expresada como porcentaje pero a peso (% p/p).

6.6. Extracción y medida de actividad de las enzimas antioxidantes y de ablandamiento

La puesta a punto de los parámetros de extracción y medida de actividad de las enzimas se realizó con la parte comestible de los frutos de guayaba variedad Palmira ICA I en el estado maduro (aproximadamente 20 ºBrix / %ácido cítrico). La medida de la actividad enzimática de POD, PFO, PG y PE durante el proceso de maduración se realizó en frutos en los estados verde, pintón, maduro y senescente. Los blancos de enzima y sustrato fueron realizados con enzima inactivada al baño de María (92 ºC durante 15 min).

6.6.1. Parámetros evaluados para la extracción de las enzimas: Para la puesta a punto de la extracción de las enzimas POD, PFO, PG y PE se evaluó la mejor relación de material vegetal y buffer de extracción (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:7 y 1:10 g:mL), el mejor tratamiento de extracción (muestra macerada con N_2 líquido, muestra sin maceración y precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ al 80% y posterior diálisis), precipitación de proteínas mediante el método de polvos de acetona (2, 3, 4, 5 y 6 lavados con 5 mL de acetona a 4 ºC cada uno), pH del buffer de extracción (entre 2,0 y 9,0 cada 0,5 unidades de pH), tiempo de extracción (2, 4, 6, 12, 18 y 24 h) y el aditivo de extracción para las enzimas PG y PE (NaCl 0,00; 0,05 y 0,10 M y Tritón X-100 0,00; 0,05 y 0,10 %). Los buffer empleados fueron buffer Glicina-HCl 200 mM para pH entre 2,0 y 2,5; Citratos 200 mM para pH entre 3,0 y 5,5; Fosfatos 200 mM para pH entre 6,0 y 7,0; Tris-HCl 200 mM para pH entre 8,0 y 9,0. Para las enzimas POD, PFO y PG se emplearon concentraciones del buffer de extracción de 200 mM, mientras que para la enzima PE se emplearon concentraciones del buffer de extracción de 20 mM (Narváez-Cuenca 2008).

6.6.2. Parámetros evaluados para la medida de actividad de las enzimas: Para la puesta a punto de la medida de actividad de las enzimas POD, PFO, PG y PE se evaluó el pH del medio de reacción (entre 2,0 y 9,0 cada 0,5 unidades de pH), la temperatura del medio de reacción (entre 20 y 90 ºC cada 0,5 ºC), la concentración de enzima, la concentración de sustrato (guaiacol y H_2O_2 para POD, L-DOPA para PFO, ácido poligalacturónico (APG) para PG y Pectina de guayaba para PE), así como el mejor tiempo de reacción (5, 10, 15, 30, 45 y 60 min). Para las enzimas POD, PFO y PG se emplearon concentraciones del buffer de medida de actividad de 200 mM, mientras que para la enzima PE se emplearon concentraciones del buffer de medida de actividad de 20 mM (Narváez-Cuenca 2008).

6.6.3. Extracción de las enzimas: En un tubo Falcon de 15 mL se pesó 1 g de la parte comestible de la guayaba previamente macerada con N_2 líquido, se le adicionaron 5 mL de acetona a 4 ºC, se agitó en vortex (20 ºC, 2 min y 2500 rpm) y se centrifugó (4 ºC, 15 min y 4146 x g), se eliminó el sobrenadante y al pellet formado se le realizaron varios lavados con acetona hasta que el sobrenadante fue incoloro. El pellet obtenido (polvos de acetona) fue resuspendido en el volumen adecuado del mejor buffer de extracción y se agitó magenéticamente (4 ºC, 2500 rpm) durante el tiempo de extracción adecuado. La suspensión se centrifugó (4 ºC, 15 min y 4146 x g) y el sobrenadante (extracto crudo) se guardó a 4 ºC para la medida de la actividad enzimática de POD, PFO, PG y PE y para la cuantificación de proteína (Narváez-Cuenca 2008).

6.6.4. Medida de actividad de la peroxidasa (POD): La medida de actividad de la POD fue realizada según la metodología establecida por Baquero-Duarte *et al.* (2005) y Narváez-Cuenca (2008). En una celda espectrofotométrica de 1 cm de paso óptico se mezclaron 125 μL de guaiacol 200 mM, 125 μL de H_2O_2 80 mM (preparados en buffer fosfatos 200 mM pH 6,0) y 225 μL de buffer fosfatos 200 mM pH 6,0, se incubó a 35 ºC durante 5 min y se adicionaron 25 μL del extracto enzimático crudo (1,09 μg de proteína). Se midió la absorbancia de la quinona formada a 470 nm cada 5 s durante 2 min. La unidad de actividad enzimática específica de peroxidasa (UPOD) fue expresada como el cambio en una unidad de absorbancia por segundo por mg de proteína del extracto enzimático (ΔA_{470nm} / s*mg proteína).

6.6.5. Medida de actividad de la polifenoloxidasa (PFO): La medida de actividad de la PFO fue realizada según la metodología establecida por Baquero-Duarte *et al.* (2005). En una celda espectrofotométrica de 1 cm de paso óptico se adicionaron 500 μL de L-DOPA 28 mM (preparado en buffer fosfatos 200 mM pH 6,0), se incubó a 35 ºC durante 5 min y se adicionaron 500 μL del extracto enzimático crudo (18,55 μg de proteína). Se midió la absorbancia de la quinona formada a 475 nm cada 5 s durante 2 min. La unidad de actividad enzimática específica de polifenoloxidasa (UPFO) fue expresada como el cambio en una unidad de absorbancia por segundo por mg de proteína del extracto enzimático (ΔA_{475nm} / s*mg proteína).

6.6.6. Medida de actividad de la poligalacturonasa (PG): La medida de actividad de la PG fue realizada según la metodología establecida por Rodríguez-Castro *et al.* (2006). A 120 μL de una solución de ácido poligalacturónico 12,5 mg/mL preparado en buffer citratos 200 mM pH 4,5 se

le adicionaron 50 μL de buffer citratos 200 mM pH 4,5. Se incubó a 35 ºC durante 5 min y se adicionaron 80 μL del extracto enzimático crudo (2,97 μg de proteína), se incubó a 35 ºC durante 30 min y se detuvo la reacción mediante calentamiento a 92 ºC durante 5 min. El ácido galacturónico formado se cuantificó mediante el método de Nelson & Somogyi para la determinación de azúcares reductores (Nelson 1944, Somogyi 1951, Green *et al.* 1989). A los 250 μL de la mezcla de reacción se le adicionaron 200 μL del reactivo de Somogyi I (anexo 5) y 50 μL del reactivo de Somogyi II (anexo 5), la mezcla se calentó a 92 ºC durante 20 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 250 μL del reactivo de Nelson (anexo 5) y 1000 μL de agua, se agitó en vortex (2500 rpm, 20 ºC, 10 s), se dejó en reposo durante 20 min y se midió la absorbancia a 500 nm. La curva de calibración del método de Nelson & Somogyi se realizó con D-(+)-glucosa entre concentraciones finales de 0 y 300 μM (anexo 1). La unidad de actividad enzimática específica de poligalacturonasa (UPG) fue expresada como los nmol de ácido galacturónico generados por segundo por mg de proteína (nmol APG / s*mg proteína).

6.6.7. Medida de actividad de la pectinesterasa (PE): La medida de actividad de la PE fue realizada según la metodología establecida por Carabalí-Miranda *et al.* (2009). 22,5 mL de una solución de pectina de guayaba (77% de metoxilación) 10 mg/mL preparada en buffer fosfatos 20 mM pH 7,0 con NaCl 0,10 M fue incubada a 40 ºC durante 5 min, se adicionaron 2500 μL del extracto enzimático crudo (935,13 μg), se incubó a 40 ºC durante 30 min y se detuvo la reacción mediante calentamiento a 92 ºC durante 5 min. Los protones de los grupos carboxilos generados tras la acción enzimática se titularon con una solución estandarizada de NaOH 0,01 M y se determinó el volumen de base necesario para llevar el medio de reacción a pH 7,0. La unidad de actividad enzimática específica de pectinesterasa (UPE) fue expresada como los mEq de protones (H^+) generados por minuto por mg de proteína (mEq H^+ / min*mg proteína).

6.6.8. Cuantificación de proteína: La cuantificación de proteína total se realizó mediante el método de Bradford modificado por Zor y Selinger (1996), para la determinación de la actividad enzimática específica. A 20 μL del extracto enzimático crudo se le adicionaron 500 μL del reactivo de Bradford (anexo 6), se agitó en vortex (2500 rpm, 20 ºC, 10 s), se dejó en reposo durante 15 min y se midió la relación de absorbancias A_{590nm}/A_{450nm}. La curva de calibración del método de Bradford se realizó con albúmina sérica bovina (BSA) entre concentraciones finales de 0 y 60 μg/mL (anexo 1). La cantidad de proteína fue expresada como mg de proteína.

6.7. Ensayo de estrés oxidativo sobre levadura (*Saccharomyces cerevisiae*): actividad antioxidante celular *in vitro* de los compuestos carotenoides

La cuantificación del efecto protector (actividad antioxidante lipofílica) que tienen los compuestos carotenoides extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I sobre el crecimiento de una cepa de levadura sometida a estrés oxidativo con H_2O_2 fue realizada mediante el método establecido por Belinha *et al.* (2007).

6.7.1. Medio de cultivo: El medio de cultivo YPD (Yeast-Peptone-D(+)glucose) fue preparado mediante la adición de 95% de agua mQ estéril, 2% de D-(+)-glucosa, 2% de peptona y 1% de extracto de levadura. El YPD fue esterilizado en autoclave (121 ºC, 103 kPa y 15 min). El extracto de levadura contenía 11,10% de nitrógeno total, 5,10% de nitrógeno amínico en forma de uracilo, 0,15% de cloruros y 4% de agua (el pH de una solución al 2% p/v en agua fue de 7,0). La peptona contenía 14,1% de nitrógeno total, 2,6% de nitrógeno amínico, 6,6% de cenizas y 4% de agua (el pH de una solución al 2% p/v en agua fue de 7,0).

6.7.2. Preparación del inóculo: De una solución stock de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa auxotrófica de uracilo BY4741 INVITROGEN) de una concentración de 4,0 $x10^6$ células/mL preparada en 70% de glicerol y 30% de YPD estéril, se realizó un pre-inóculo por repique en fase sólida con YPD estéril (30 ºC, 6 h). Con un asa de platino se sacó una pequeña cantidad de las células del pre-inóculo y se inocularon en 5 mL de YPD estéril, se incubó (30 ºC, 40 rpm y 6 h). A 80 μL del inóculo se le adicionaron 720 μL de YPD estéril (dilución 1:10) y se midió la densidad óptica a 600 nm.

La densidad óptica a 600 nm (D.O. 600 nm) se midió en un espectrofotómetro Boeco Germany UV-VIS S-22 con celdas de vidrio de 10 mm de paso óptico (el blanco del equipo se hizo con YPD). La concentración de las células se calculó con la siguiente curva de calibración:

$$Concentración\ Celular\ \ (células/mL) = (30x10^6)(D.O.600\,nm)$$

Conociendo la densidad óptica, se calculó el volumen del cultivo celular a usar para inocular las muestras así:

$$V\,(\mu L) = \frac{(5\,mL)(1000)}{(D.O.\ 600\,nm)(4096)}$$

Un buen cultivo celular tiene una D.O. 600 nm entre 0,200 y 0,400 (intervalo lineal) y un volumen del cultivo celular óptimo entre 3 y 6 μL.

6.7.3. Preparación de las medidas: Se realizaron las medidas de un blanco (YPD estéril), de un control positivo (ácido ascórbico de 20 μg/mL de concentración final preparado en 6 mL de YPD estéril) y de los extractos de los compuestos carotenoides obtenidos de los frutos de guayaba en los estados verde, pintón, maduro y senescente, cuya obtención fue descrita anteriormente, que fueron resuspendidos en 5 mL de YPD estéril. En tubos Falcon estériles de 15 mL se adicionaron 5 mL de cada una de las muestras preparadas en YPD y el volumen del cultivo celular obtenido anteriormente, se incubó (30 ºC, 40 rpm y 17 h). Después de la incubación, a 80 μL de las muestras se le adicionaron 720 μL de YPD estéril (dilución 1:10) y se midió la densidad óptica a 600 nm. Conociendo la densidad óptica se calculó el volumen de las muestras concentradas a usar en la cuantificación del crecimiento celular así:

$$V\,(\mu L) = \frac{(4\,mL)(50000)}{(D.O.\ 600\,nm)(10)(4096)}$$

En tubos Falcon estériles de 15 mL (muestras finales) se adicionó el volumen del cultivo celular calculado para cada una de las muestras concentradas y se llevó a un volumen final de 4 mL con YPD estéril, para obtener muestras de células con una D.O. 600 nm inicial cerca de 0,100.

6.7.4. Cuantificación del crecimiento celular: En placas de Elisa multipocillos (96 pocillos) se adicionaron 230 μL de las muestras finales y se incubó (30 ºC, 4,5 h) en un espectrofotómetro termostatado lector de placas Spectro-Star Omega BMG Lab Tech que tomó lecturas de D.O. 600 nm cada 10 min (se realizaron 30 lecturas/pocillo y una agitación doble orbital a 600 rpm durante 20 s antes de cada lectura). Una vez las muestras alcanzaron un D.O. 600 nm de 0,300 (inicio de la fase de latencia), se les indujo el estrés oxidativo mediante la adición de 20 μL de H_2O_2 0,0 mM (control) y H_2O_2 1,0 mM preparados en agua mQ estéril, y se continuó la medida de D.O. 600 nm incubando (30 ºC, 40 rpm y 17 h) y tomando lecturas cada 10 min.

6.7.5. Selección del mejor solvente para los compuestos carotenoides: Debido al carácter lipofílico de los compuestos carotenoides y de su baja solubilidad en el YPD, se realizó un ensayo para establecer el mejor solvente para disolver completamente de los carotenoides extraídos de la guayaba, estableciendo la influencia que tiene el solvente sobre el crecimiento de la levadura. Los solventes que se probaron fueron el cloroformo 100% y una micela de Tritón X-100. A 500 μL del respectivo solvente se le adicionaron 4500 μL de un cultivo celular de levadura (D.O. 600 nm inicial de 0,100), se incubó (30 ºC, 40 rpm) y se tomaron las medidas de D.O. 600 nm a las 0, 3,5 y 17 h de crecimiento. Se seleccionó el solvente que tuvo el menor efecto sobre el crecimiento de la levadura (el que más se pareció al control). La micela de tritón X-100 se preparó adicionando 800 μL de cloroformo HPLC (para disolver los compuestos carotenoides), seguido de una solución de Tritón X-100 en etanol al 2%, se llevó a sequedad con corriente de N_2 y la micela formada fue resuspendida en 500 μL de agua mQ estéril (Ilg *et al.* 2009).

El efecto protector de los compuestos antioxidantes sobre el crecimiento de la levadura sometida a estrés oxidativo fue cuantificado mediante la medida del tiempo de latencia (h), la velocidad de crecimiento celular (células/mL.h) y la concentración final de células (células/mL) después de 17 h de crecimiento. Todo el experimento fue realizado en condiciones de esterilidad. Todas las muestras fueron filtradas a través de filtros estériles de PVDF de 13 mm de diámetro y de 0,45 μm de diámetro de poro. Las incubaciones fueron realizadas con constante agitación a 40 rpm para mantener las células en suspensión. Antes de realizar las lecturas de D.O. 600 nm el inóculo se agitó vigorosamente en vórtex (250 rpm, 30 ºC y 10 s) para asegurar la homogeneidad de las células. Las curvas de crecimiento fueron medidas cuatro veces (n=4).

6.8. Diseño experimental

Con el fin de evaluar con validez estadística el efecto del proceso de maduración sobre las diferentes variables de respuesta, se empleó un diseño experimental completamente al azar con 4 tratamientos (estados de maduración verde, pintón, maduro y senescente del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I). Los frutos de guayaba fueron separados en los cuatro estados de maduración según sus características fisicoquímicas, y a cada grupo se le realizó las diferentes medidas de las variables de respuesta descritas anteriormente.

6.9. Análisis de datos

Todas las medidas fueron realizadas como mínimo por triplicado, se empleó el promedio como medida de centralización y la desviación estándar (D.E.) como medida de dispersión. Para evaluar las diferencias específicas entre los valores de cada uno los parámetros evaluados se usó la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) con un nivel de significancia de α = 0,05. Gráficamente, letras diferentes indican diferencias significativas en los valores de las medidas realizadas.

Para la puesta a punto de los parámetros de extracción y medida de actividad de las enzimas POD, PFO, PG y PE se empleó un diseño experimental escalonado, donde el mejor parámetro obtenido se empleó para evaluar el siguiente, hasta establecer todos los mejores parámetros. La puesta a punto de la medida de actividad de las enzimas se realizó encontrando los mejores valores de los parámetros que determinan la estabilidad de las enzimas (pH, temperatura y tiempo de extracción), seguido de los parámetros que definen la velocidad de las enzimas (concentración de enzima y sustrato).

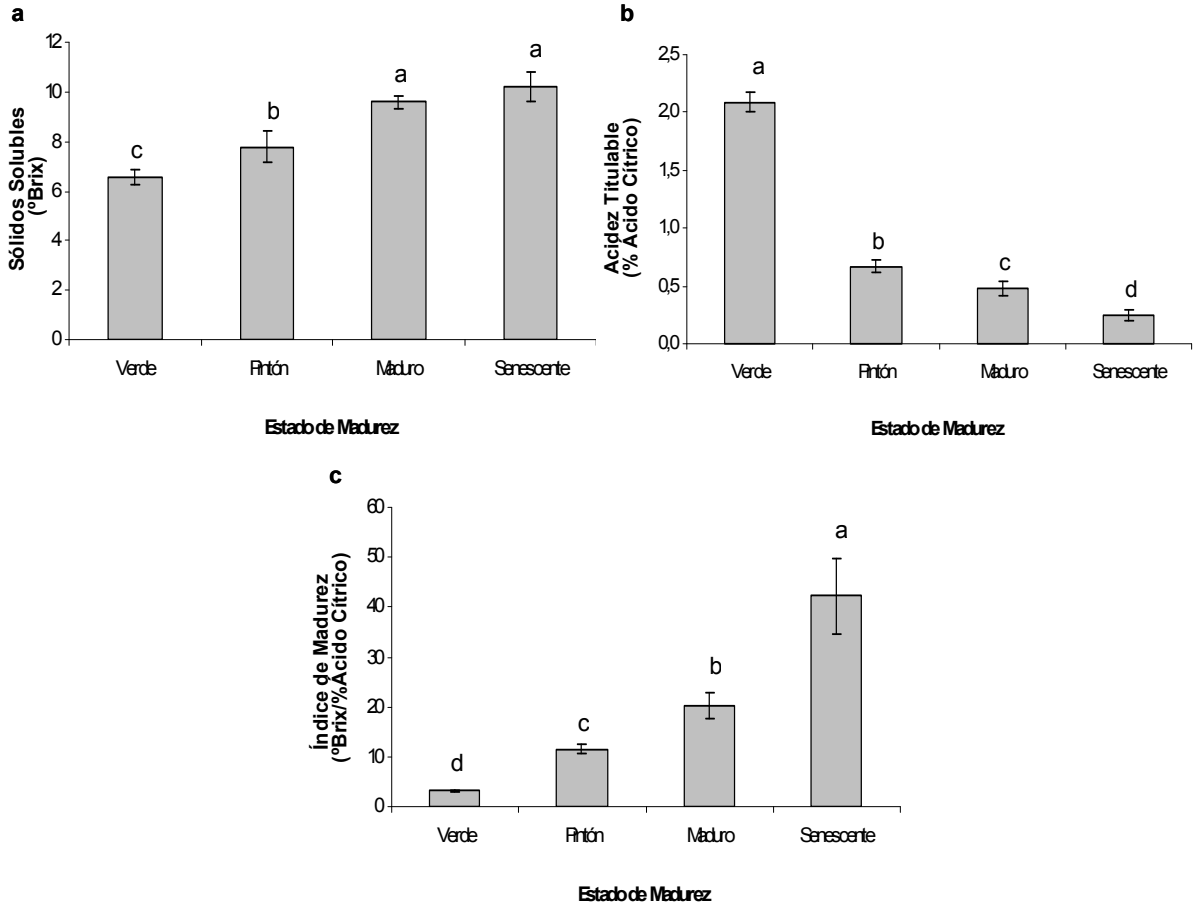
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización fisicoquímica del estado de madurez del fruto de Guayaba variedad Palmira ICA I

La caracterización fisicoquímica del proceso de maduración del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I fue realizada mediante la medición de la intensidad respiratoria, índice de madurez, color instrumental (corteza y pulpa) y la firmeza instrumental (corteza y pulpa) del fruto. La caracterización fisicoquímica del estado de madurez de los frutos de guayaba fue realizada para establecer un control del proceso de maduración de los frutos de guayaba, con el fin de asegurarse que los frutos no presentaban desordenes metabólicos asociados a daños del fruto y que las medidas de los diferentes parámetros fisicoquímicos realizadas corresponden a los cambios producidos por los procesos metabólicos característicos del desarrollo y la maduración normal, y no a respuestas a estrés generadas por alteraciones metabólicas asociadas a daños fisiológicos (Nerd y Mizrahi 1999). El parámetro más comúnmente usado como control del proceso de maduración de frutos es el índice de madurez (Brookfield *et al.* 1997). Se observó que durante el proceso de maduración, los sólidos solubles aumentaron progresivamente, encontrándose valores de 6,57 ºBrix en el estado verde, con un aumento hasta 10,23 ºBrix en el estado senescente (gráfica 1a). El constante aumento en el contenido de sólidos solubles puede ser atribuido a la degradación hidrolítica de polímeros de carbohidratos como el almidón, la celulosa y la pectina, con la consecuente aparición de monosacáridos solubles como la glucosa y el ácido galacturónico, ocasionando el consecuente aumento del sabor dulce del fruto (Hodge *et al.* 2008). La disminución de la acidez titulable durante el proceso de maduración, desde 2,09% de ácido cítrico en el estado verde hasta 0,25% en estado senescente (gráfica 1b), es debida a la degradación de los ácidos orgánicos en el ciclo de Krebs en los primeros estados de la maduración, cuando la concentración de azúcares es baja, y ocasiona la desaparición del sabor ácido del fruto (Saradhuldhat y Paull 2007). Este comportamiento ha sido observado anteriormente en frutos de guayaba por El-Bulk *et al.* (1997) en frutos de las variedades Shambati y Shendi, Mercado-Silva *et al.* (1998) en frutos de variedad roja, Jain *et al.* (2003) en frutos de variedad Banarsi Surkha y Bashir *et al.* (2003) en frutos de variedad Shambati, García-Galvis (2009) en regional roja, rosada y guavatá victoria, y en otros frutos como melón (Villanueva *et al.* 2004), pitaya (Nerd y Mizrahi 1999), banano (Palomer *et al.* 2005), piña (Saradhuldhat y Paull 2007) y mango (Montalvo *et al.* 2007), confirmando que el fruto de guayaba variedad Palmira ICA I presentó un proceso de

maduración normal y que no se presentaron comportamientos anómalos característicos de daños fisiológicos. Debido al constante aumento y a las diferencias significativas observadas en el índice de madurez durante el proceso de maduración, desde un índice de madurez de 3,15 ºBrix/%ácido cítrico en el estado verde hasta 42,17 ºBrix/%ácido cítrico en el estado senescente (gráfica 1c), éste parámetro fisicoquímico fue usado como el parámetro base para la correlación del estado de madurez con las otras variables fisicoquímicas medidas en los frutos de guayaba.

Además, también se pudo emplear el índice de madurez como parámetro fisicoquímico de control del estado de madurez de los frutos de guayaba ya que tanto los sólidos solubles como la acidez titulable son parámetros químicos característicos del metabolismo primario del fruto, debido a que representan los principales procesos metabólicos de los sustratos más importantes que participan en los procesos primarios de obtención de energía de los frutos durante el proceso de maduración (Saradhuldhat y Paull 2007).



Gráfica 1. Cuantificación de los sólidos solubles (a), acidez titulable (b) e índice de madurez (c) del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante la maduración. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

La intensidad respiratoria es un importante parámetro fisicoquímico empleado como medida del estado de madurez de los frutos, ya que puede ser empleado como un parámetro control del proceso de maduración y como una medida del estado oxidativo de la guayaba, debido a que la intensidad respiratoria está asociada al metabolismo oxidativo de los frutos. El metabolismo aeróbico natural ocasiona un alto consumo de O_2 durante el proceso de maduración hasta el máximo climatérico (punto de la maduración donde se encuentra la máxima intensidad respiratoria) y la consecuente generación de las especies reactivas del oxígeno (EROS) producto del metabolismo del O_2, que son las principales causantes de la aparición de lesiones asociadas al estrés oxidativo durante la maduración del fruto, como manchas necróticas y pardeamiento enzimático (Geigenberger 2003). En el máximo climatérico, donde la intensidad respiratoria es mayor, se encuentra un mayor estrés oxidativo y la aparición de lesiones en la corteza en una mayor proporción que en otros estados de maduración, cuya aparición es síntoma de un pronunciado estrés oxidativo y/o de una fase avanzada del estado de madurez, pero es en este punto donde los sistemas químicos y enzimáticos de defensa endógenos del fruto contra el estrés oxidativo presentan una mayor actividad y un consecuente potencial beneficio como alimento funcional antioxidante para consumo humano (Trinchero *et al.* 1999).

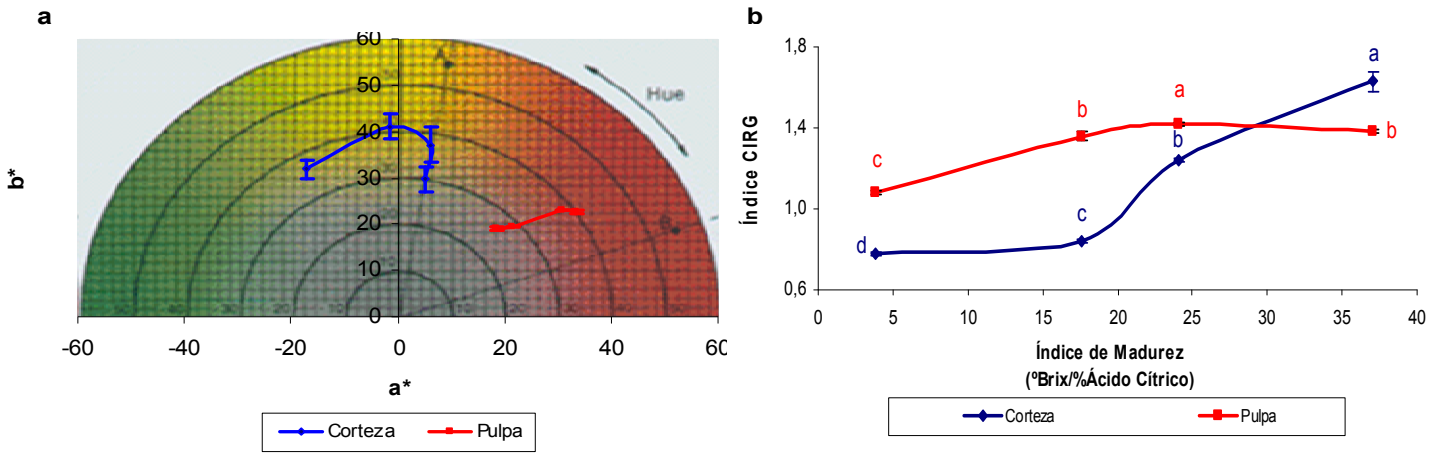
Se observó que la intensidad respiratoria del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I presentó un patrón respiratorio climatérico (gráfica 2). Durante el desarrollo del fruto (estados verde y pintón) se observó un aumento en la intensidad respiratoria, hasta llegar al máximo climatérico observado en el estado maduro (20,17 ºBrix/ % ácido cítrico, 33,73 mg O_2/kg fruta .h), donde el fruto desarrolló sus mejores cualidades organolépticas y sensoriales. En el estado senescente, se observó una disminución en la intensidad respiratoria característica del proceso de muerte y senescencia del fruto. El patrón respiratorio climatérico en frutos de guayaba ha sido encontrado anteriormente por El-Buluk *et al.* (1995) en las variedades Shambati, Shendi y Ganib, Mercado-Silva *et al.* (1998) en la variedad roja, Bashir *et al.* (2003) en la variedad Shambati, Bassetto *et al.* (2005) en la variedad roja y por Singh y Pal (2008) en la variedad Allahabad Safeda, mientras que en otros frutos se ha encontrado comportamientos climatéricos en mango con valores de 19,73 mg O_2/kg fruta .h (Ravindra y Goswami 2008) y en tomate (21 mg O_2/kg fruta .h), manzana (28,4 mg O_2/kg fruta .h), fresa (18,0 mg O_2/kg fruta .h) y mora (21,0 mg O_2/kg fruta .h) por Fonseca *et al*. 2002. De esta manera, se verificó que el fruto de guayaba presentó un patrón respiratorio climatérico normal a lo largo de todo el proceso de maduración y no se observaron la aparición o la presencia de desordenes y daños fisiológicos que induzcan un estrés oxidativo adicional al del proceso natural de la maduración.

Gráfica 2. Medida de la intensidad respiratoria expresada como la cantidad de O_2 consumida por el fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante la maduración. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

Los cambios químicos y bioquímicos que ocurren durante el proceso de maduración de frutas se pueden evidenciar visualmente mediante el cambio de color en la corteza y en la pulpa que estos sufren. Los cambios de color de los frutos puede ser empleado como un factor indicativo del proceso de maduración normal de los frutos de guayaba, y permite correlacionar el cambio de color con la aparición de características funcionales como la actividad antioxidante debido a la aparición de compuestos como los carotenoides y las antocianinas. En los frutos de guayaba se observó que la corteza era de color verde en el estado de madurez verde, pasando por el color amarillo en los estados pintón y maduro, llegando al color café en el estado senescente (gráfica 3a), el cual es un color característico de la aparición de melaninas debido al proceso de pardeamiento enzimático (Quevedo *et al.* 2009), mientras que la pulpa fue de color rojo en todos los estados de madurez, aumentando únicamente su intensidad (coordenada a*) durante el proceso de maduración. El comportamiento de la medida instrumental del color indicó que en la pulpa de la guayaba se puede encontrar una alta acumulación de compuestos carotenoides durante el proceso de maduración, y que debido al color rojo observado, estos compuestos carotenoides podrían corresponder a β-caroteno y licopeno (Wilberg y Rodríguez-Amaya 1995). Se observó que en el estado de madurez verde, la corteza del fruto de guayaba se encontraba en color verde ($a^* \approx -20$) con una luminosidad intermedia ($L^*=50,13$). A medida que aumentó el estado de maduración del fruto, se encontró que aumentó el valor de luminosidad en los estados pintón y maduro a 63,14 y 67,83 respectivamente, manifestado en un aclaramiento de la corteza y un cambio de color verde a color amarillo (valor $a^* \approx 0$), siendo el color característico

del fruto de guayaba en el estado maduro, donde se presentaron las mejores características sensoriales del fruto. Durante la etapa de senescencia, se observó una disminución en la luminosidad (valor L*=48,13) debido al oscurecimiento de la corteza y al cambio al color café (a*≈5), característico de los frutos de guayaba que han sufrido el fenómeno de pardeamiento enzimático. En la pulpa se observó que los frutos que se encontraban en estado verde, se presentó un color rosado (a*=18,59), y a medida que aumentó el estado de maduración del fruto, se encontró que en los estados pintón, maduro y senescente, el fruto de guayaba aumentó su valor a* y disminuyó su valor de luminosidad progresivamente, indicando que el color rosado del fruto de guayaba se fue oscureciendo hasta el color rojo (gráfica 3a), característico del color de la pulpa de guayaba en el estado maduro y senescente (Singh y Pal 2008).

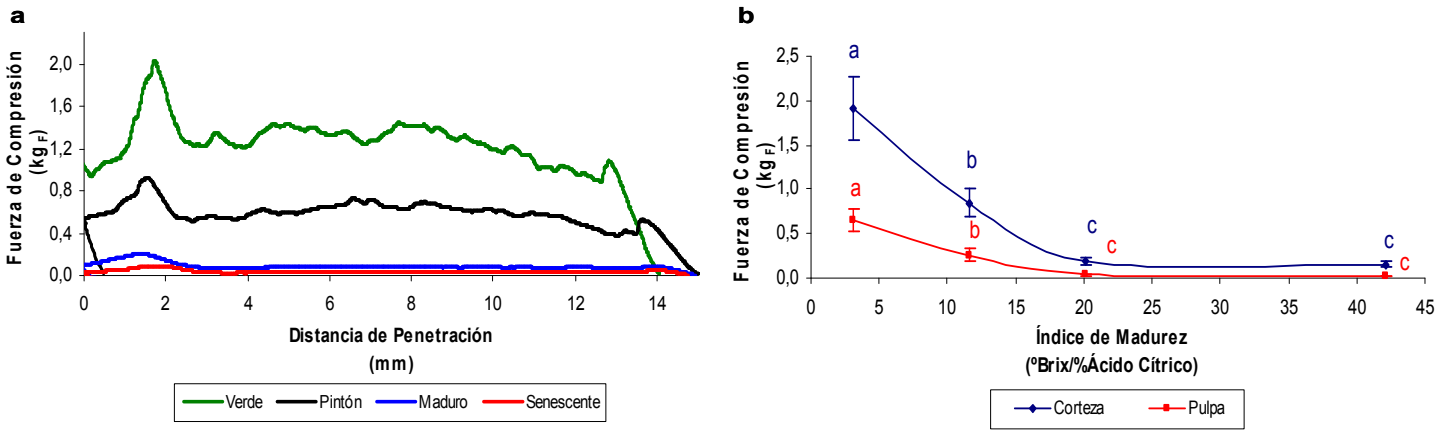
El índice CIRG permite correlacionar los parámetros de luminosidad, valor a* (color en la escala del verde al rojo) y valor b*(color en la escala del azul al amarillo), permitiendo establecer con un único parámetro instrumental el comportamiento del color en el fruto a lo largo del proceso de maduración. Un índice CIRG alto es indicativo de un color más oscuro y menos luminoso, mientras que un valor bajo es indicativo de colores más claros y más luminosos (Carreño *et al.* 1995). En la gráfica 3b se observó que el índice CIRG aumentó progresivamente durante el proceso de maduración, donde el cambio de color en la corteza fue más significativo que el cambio de color en la pulpa. Se observó que el índice CIRG en la corteza aumentó significativamente en todos los estados de maduración, donde el cambio de color más importante fue observado entre los estados pintón y maduro, indicando que la corteza se oscureció progresivamente a lo largo del proceso de maduración del fruto. El comportamiento del color de la pulpa presentó cambios menos significativos a lo largo del proceso de maduración, debido a que la pulpa siempre se mantuvo de color rojo, cambiando únicamente su intensidad a lo largo de la maduración, síntoma característico de la aparición de carotenoides. Debido a que no se observaron colores extraños ni en la corteza ni en la pulpa característicos de daños fisiológicos en ninguno de los estados de maduración del fruto, y que solo hay presencia de colores característicos de los síntomas normales de maduración y senescencia tanto en la corteza como en la pulpa en todos los estados de maduración (anomalías que se podrían detectar por cambios anómalos en el índice CIRG), se puede sugerir que todos los cambios de color que ocurrieron en el fruto son debido al proceso de maduración normal del fruto y que no se observaron la presencia de desordenes metabólicos como la aparición de manchas necróticas inducidas por lesiones en el fruto.



Gráfica 3. Medida instrumental del color de la corteza y pulpa del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I. Cambio de color de la corteza y pulpa en el espacio tridimensional CIELAB (a) e índice CIRG de la corteza y de la pulpa durante la maduración (b). Promedio de la medida (n=9) ± 1 D.E.

Debido a los procesos metabólicos asociados a la degradación de los carbohidratos responsables de la conformación estructural de la pared celular, como las sustancias pécticas, el almidón y la celulosa, y la aparición de carbohidratos solubles como la glucosa y el ácido galacturónico, los frutos sufren el proceso de ablandamiento enzimático durante la maduración (Ali *et al.* 2004). La evaluación del cambio de firmeza en la corteza y la pulpa del fruto de guayaba durante el proceso de maduración se realizó con la cuantificación de los perfiles de fuerza de compresión (gráfica 4a). Los perfiles de fuerza de compresión presentaron un pico máximo cerca de los 2 mm de distancia de penetración del fruto debido a la fuerza que se debe realizar para romper la corteza y poder penetrar el fruto, este valor corresponde a la firmeza de la corteza y es el máximo valor de firmeza que se puede medir en el fruto. La meseta que presenta valores de fuerza aproximadamente constantes durante la penetración del fruto corresponde a la fuerza que se necesita para atravesar la pulpa. De esta manera, mediante la medida de los perfiles de compresión, se pudo observar que la corteza del fruto de guayaba tiene una firmeza mayor que la pulpa. El cambio de la firmeza de la corteza y de la pulpa del fruto fue medido a lo largo del proceso de maduración (gráfica 4b), donde se encontró que en el estado verde la corteza tenía una firmeza de 1,911 kg_F, mientras que la pulpa presentó una firmeza de 0,653 kg_F. A medida que aumentó el estado de madurez del fruto, la firmeza disminuyó progresivamente hasta valores de 0,153 kg_F en la corteza y 0,017 kg_F en la pulpa en el estado senescente, siendo mayor el ablandamiento en la pulpa que en la corteza. Debido a que en promedio, el contenido de pectinas de la corteza es mayor que en la pulpa, el proceso de ablandamiento de la corteza es más lento, permitiéndole mantener su firmeza durante más

tiempo y generar una protección al fruto contra los daños mecánicos externos (Bonghi *et al.* 1996). El proceso de ablandamiento también puede ser ocasionado por la ruptura mecánica de los componentes estructurales de la pared celular por factores externos, o puede ser mediado enzimáticamente por las enzimas de ablandamiento. El proceso enzimático es el proceso que se presenta naturalmente en el fruto, y es síntoma de que el fruto se encuentra en un avanzado estado de maduración y cercano a la etapa de senescencia, y debido a que la presencia de daños fisiológicos y mecánicos puede inducir prematuramente el ablandamiento de los frutos, es importante asegurarse que el ablandamiento de los frutos es producto únicamente del proceso enzimático natural y que no es promovido por la presencia de daños fisiológicos y mecánicos que puedan ocasionar un mayor ablandamiento (Goulao y Oliveira 2008). En la gráfica 4b se observa que a medida que los frutos de guayaba maduran, la firmeza tanto de la corteza como de la pulpa disminuye, siendo mayor la disminución de la firmeza en la pulpa que en la corteza, debido probablemente a su alto contenido de pectina, almidón, celulosa y otros polisacáridos presentes responsables de la conformación estructural de la pared celular (Duan *et al.* 2008). Se observó una disminución considerable de la firmeza entre el estado verde y el estado pintón, y se mantuvo constante durante los estados maduro y senescente, indicando que es durante la etapa de maduración y desarrollo del fruto donde las enzimas que promueven el ablandamiento son más activas. Debido a que no se encontraron comportamientos anómalos en el proceso de ablandamiento de los frutos de guayaba durante la maduración, se puede decir que los frutos de guayaba estudiados no presentaron desordenes metabólicos y que tuvieron un proceso de maduración y senescencia normal característico de frutos sin daños fisiológicos (Muruyama *et al.* 1998).



Gráfica 4. Medida de la firmeza de la guayaba. Perfiles de fuerza de compresión (a) y fuerza de compresión de la corteza y pulpa durante la maduración (b). Promedio de la medida (n=9) ± 1 D.E.

7.2. Cuantificación de la actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica total del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I

La capacidad antioxidante total del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I fue medida por los métodos hidrofílicos ABTS, DPPH y FRAP y por el método lipofílico de decoloración del β-caroteno. La medida de la capacidad antioxidante por varios métodos permite establecer la contribución relativa de los diferentes mecanismos de actividad antioxidante que tienen los compuestos extraídos de la guayaba (Marinova y Yanishlieva 2003). En la gráfica 5 se observan las cinéticas obtenidas para cada uno de los métodos de actividad antioxidante medidos. En los métodos ABTS, DPPH y decoloración del β-caroteno (gráficas 5a, 5b y 5d) se observa que la medida de actividad antioxidante se basa en la cinética de descomposición del compuesto cromóforo, mientras que en el método FRAP (gráfica 5c) la medida de la actividad antioxidante está basada en la cinética de formación del cromóforo.

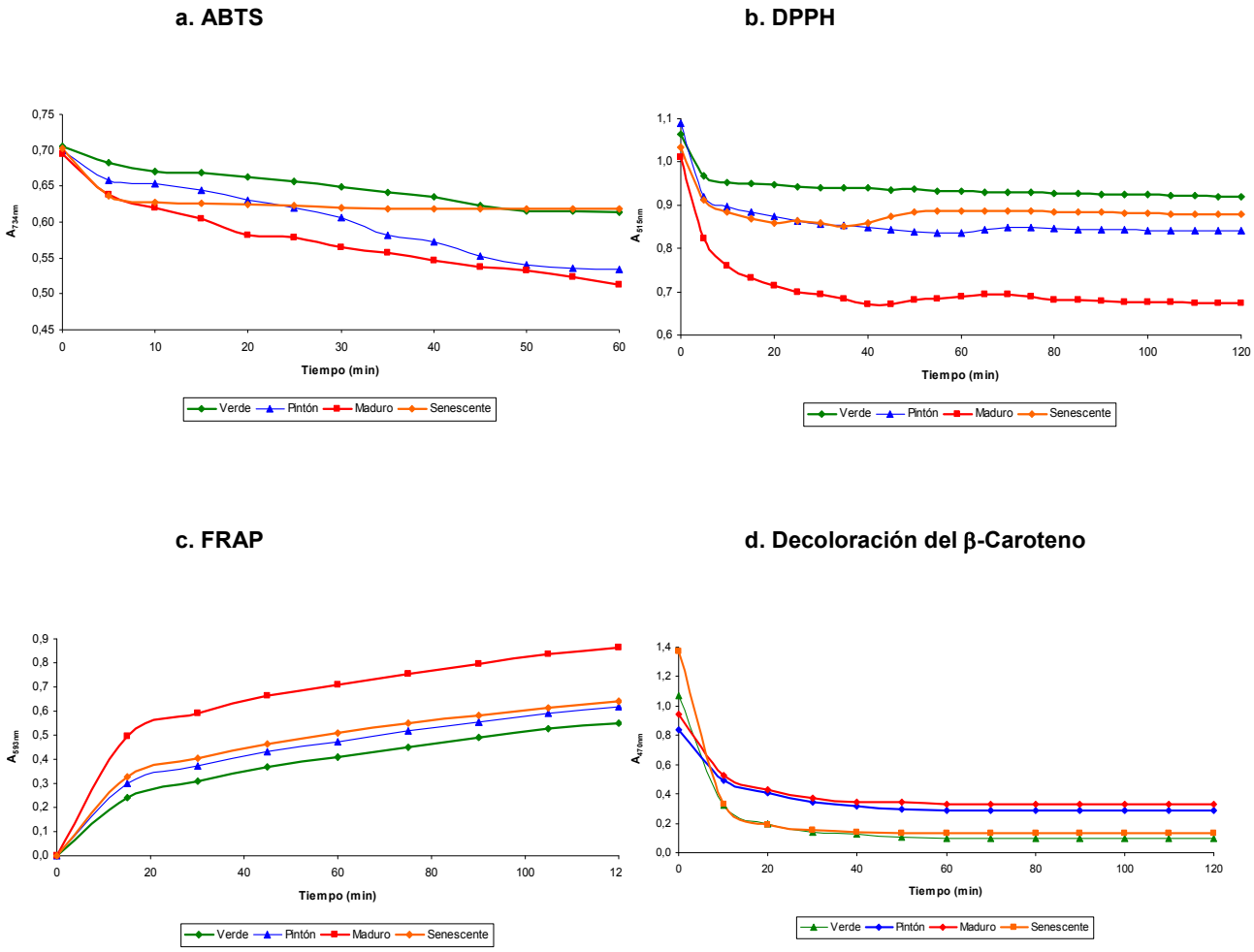
En el método ABTS, el compuesto antioxidante extraído de la guayaba ocasiona la reducción (decoloración) del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ que es un cromóforo con máxima absorción a 734 nm (Re *et al.* 1999). La reducción del $ABTS^{\bullet+}$ dependerá de la capacidad que tenga el compuesto antioxidante de transferir electrones o donar protones. En el método DPPH, el compuesto antioxidante también ocasiona la reducción (decoloración) del radical estable $DPPH^{\bullet}$ que es un cromóforo con máxima absorción a 515 nm (Bondet *et al.* 1997). La reducción del $DPPH^{\bullet}$ dependerá al igual que en el método ABTS, de la capacidad que tenga el compuesto antioxidante de transferir electrones o donar protones. En el método FRAP, el compuesto antioxidante promueve la reducción del complejo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ al complejo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ que es un cromóforo con máxima absorción a 593 nm (Benzie y Strain 1996). La reducción del complejo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ dependerá únicamente de la capacidad que tenga el compuesto antioxidante de transferir electrones al átomo de hierro. En el método de decoloración del β-caroteno, el compuesto antioxidante evita la oxidación (decoloración) del β-caroteno, que es un compuesto coloreado con máxima absorción a 470 nm. La decoloración es debida a la interrupción en la conjugación de su cadena de dobles enlaces ocasionada por el ataque del producto de peroxidación térmica con O_2 del ácido linoleico LOO• (Velioglu *et al.* 1998). En este caso ya diferencia de los métodos ABTS, DPPH y FRAP, los compuestos antioxidantes que tienen la capacidad de evitar la oxidación del β-caroteno son compuestos que tienen un carácter lipofílico. De esta manera, una mayor decoloración en los métodos ABTS y DPPH y una mayor

aparición del compuesto cromóforo en el método FRAP, implica que el extracto obtenido de la guayaba presenta una mayor actividad antioxidante hidrofílica, mientras que en el método lipofílico de decoloración del β-caroteno, una menor decoloración del β-caroteno implica que el extracto presenta una mayor actividad antioxidante y por consiguiente, una mayor capacidad de evitar la oxidación (decoloración) del β-caroteno.

En los métodos ABTS (gráfica 5a) y DPPH (gráfica 5b) se observó que los compuestos antioxidantes extraídos de la guayaba en los estados maduro (rojo) y pintón (azul) ocasionaron la mayor reducción (decoloración) de los cromóforos, mientras que los antioxidantes en los estados verde (verde) y senescente (naranja) casi no produjeron la reacción de reducción. De la misma manera, en el método FRAP (gráfica 5c), los compuestos antioxidantes extraídos de la guayaba en los estados maduro (rojo) y senescente (naranja) ocasionaron la mayor aparición del cromóforo $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$, mientras que los antioxidantes del fruto en los estados verde (verde) y pintón (azul) tuvieron poca capacidad de reducción. En el método lipofílico de decoloración del β-caroteno (gráfica 5d), se observó nuevamente que los compuestos antioxidantes extraídos de la guayaba en los estados maduro (rojo) y pintón (azul) tuvieron una mayor capacidad de inhibir la decoloración del β-caroteno que los antioxidantes de la guayaba en los estados verde (verde) y senescente (naranja). Este primer resultado sugiere que el fruto de guayaba en el estado maduro contiene la mayor concentración de compuestos con actividad antioxidante, o bien, que contiene compuestos con una alta actividad antioxidante, y que en el estado verde, los compuestos extraídos tienen poca actividad antioxidante o que estos se encuentran en poca concentración. Entonces, la cuantificación de la actividad antioxidante por los métodos ABTS, DPPH, FRAP y decoloración del β-caroteno, y la determinación de la concentración y composición de los compuestos con actividad antioxidante (polifenoles, carotenoides y vitamina C) extraídos de la guayaba, permitirá explicar el comportamiento antioxidante del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante el proceso de maduración.

Para esto, se realizó la medida de la actividad antioxidante hidrofílica por los métodos ABTS, DPPH, FRAP y lipofílica por el método de la decoloración del β-caroteno durante el proceso de maduración del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I (gráfica 6). Se observó que la capacidad antioxidante del fruto de guayaba aumentó desde el estado verde hasta el estado maduro y disminuyó durante la etapa de senescencia por todos lo métodos de medida de actividad antioxidante. Esto sugiere nuevamente que los frutos de guayaba en el estado maduro (20 ºBrix / % ácido cítrico) presentan las mejores propiedades funcionales y que son los mejores

frutos para el consumo en fresco o como fuente natural de compuestos antioxidantes. Debido a que el complejo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ tiene un potencial de reducción muy bajo, haciéndolo fácilmente reducible y de baja especificidad a antioxidantes hidrofílicos (Benzie y Strain 1996), el método FRAP cuando se empleó $FeSO_4$ como patrón fue el método que presentó la mayor respuesta a la actividad antioxidante del fruto de guayaba, seguido del método ABTS (trolox), FRAP cuando se empleó trolox como patrón, método del β-caroteno (α-tocoferol) y por último el método de DPPH (trolox). El método DPPH presentó la menor respuesta a la actividad antioxidante debido al alto potencial de reducción del radical estable DPPH•, que lo hace más difícil de reducir (Brand *et al.* 1995).



Gráfica 5. Perfiles cinéticos de los métodos de cuantificación de la actividad antioxidante total. ABTS (a), DPPH (b), FRAP (c) y método de decoloración del β-caroteno (d) en los estados de maduración verde (verde), pintón (azul), maduro (rojo) y senescente (naranja).

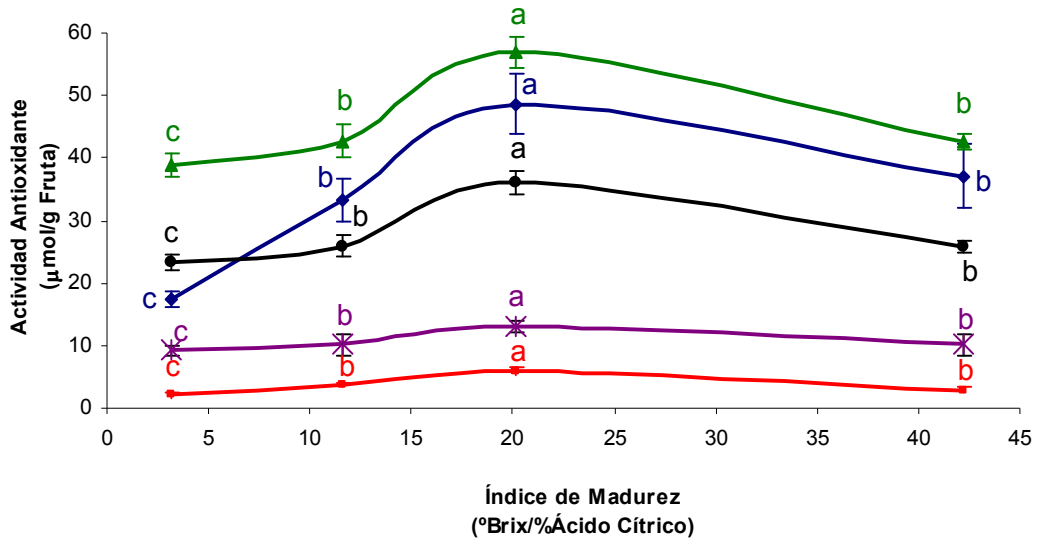
Este resultado sugiere que la actividad antioxidante de la guayaba variedad Palmira ICA I es principalmente de carácter hidrofílico, donde los compuestos como los polifenoles, el ácido ascórbico y las enzimas antioxidantes POD y PFO podrían presentar la contribución más importante a la capacidad antioxidante total del fruto, además que la transferencia de electrones y protones son los principales mecanismos de actividad antioxidante de los compuestos de la guayaba. Los compuestos carotenoides podrían presentar una contribución significativamente alta a la actividad antioxidante lipofílica del fruto.

En frutos de guayaba, se han encontrado valores de actividad antioxidante por el método ABTS de 22,3 μmol trolox / g fruta para la variedad regional roja y 37,9 μmol trolox / g fruta para la variedad blanca (Thaipong *et al.* 2006), 3,78 μmol trolox / g para hojas de guayaba (Tachakittirungrod *et al.* 2007), 16,2 μmol trolox / g fruta para la variedad roja y 32 μmol trolox / g fruta para la variedad blanca por el método DPPH (Thaipong *et al.* 2006) y 63,1 μmol trolox / g fruta para la variedad pera y 66,2 μmol trolox / g fruta para la variedad blanca por el método FRAP (Rojas y Narváez 2009), verificándose así que la mayor respuesta a la actividad antioxidante se obtiene con el método FRAP y que la respuesta más baja la presenta el método DPPH. También se ha encontrado que el fruto de guayaba tiene una actividad antioxidante mayor que otros frutos, razón por la cual el fruto de guayaba es un fruto muy apetecido a nivel nutricional y funcional. Se han encontrado valores de actividad antioxidante en frambuesa negra de 43,8 con ABTS, 93,1 con FRAP y 75,4 μmol trolox / g fruta con DPPH, en frambuesa roja de 14,5 con ABTS, 34,7 con FRAP y 25,3 μmol trolox / g fruta con DPPH, en mora de 19,2 con ABTS, 46,0 con FRAP y 35,0 μmol trolox/ g fruta con DPPH, en uva valores de 9,1 con ABTS, 26,6 con FRAP y 14,2 μmol trolox / g fruta con DPPH y en fresa valores de 11,5 con ABTS, 24,9 con FRAP y 15,9 μmol trolox/ g fruta con DPPH (Ozgen *et al.* 2006), verificando se nuevamente en otros frutos que el método FRAP presenta mayores valores de actividad antioxidante que el método DPPH y que el fruto de guayaba presenta valores de actividad antioxidante más altos que muchos de frutos comerciales.

Debido a la amplia variedad de productos elaborados a partir de guayaba, y dado que los compuestos antioxidantes del fruto de guayaba pueden ser extraídos para ser adicionados a otros alimentos funcionalmente menos favorecidos como suplemento nutricional, el estudio de la capacidad antioxidante del fruto de guayaba en función de la madurez, permitió determinar que el fruto de guayaba debe ser consumido en estado maduro (máximo climatérico del fruto

donde se presentan las óptimas condiciones sensoriales del fruto) para lograr el máximo de aprovechamiento de sus cualidades antioxidantes. De esta manera, la determinación de la estructura y la composición química de los antioxidantes endógenos de la guayaba en los diferentes estados de madurez es de vital importancia para poder comprender el fenómeno de la capacidad antioxidante del fruto y poder determinar cuales son los compuestos químicos que tienen las mayores contribuciones a las propiedades antioxidantes de este fruto.

Es de destacar que el ácido ascórbico, los compuestos polifenólicos y los carotenoides, y en general, todos lo metabolitos que contribuyen a la capacidad antioxidante total del fruto de guayaba, cumplen una importante función tanto como compuestos antioxidantes que evitan la prematura entrada del fruto en la etapa de senescencia debido al estrés oxidativo causado por la maduración (protección propia del fruto), como compuestos funcionales aprovechables para el hombre al ser consumidos como alimento (protección contra el estrés oxidativo al hombre), mientras que las enzimas antioxidantes POD y PFO que también aportan a la capacidad antioxidante total del fruto, contribuirán solo a la neutralización del estrés oxidativo *in vivo* de la fruta, pero no tendrán ningún efecto funcional benéfico a la salud humana, debido a que son proteínas que serán hidrolizadas en el tracto gastrointestinal al ser consumidas (Thaipong *et al.* 2005).

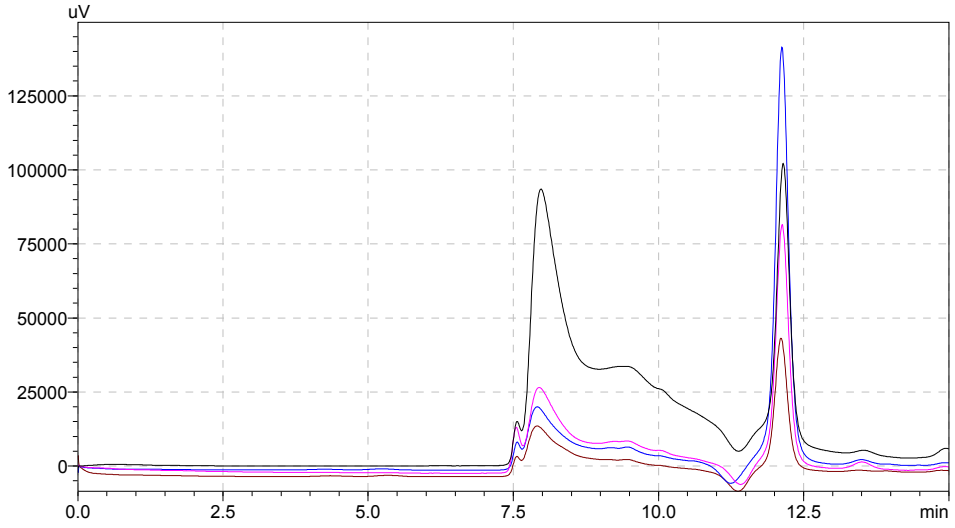


Gráfica 6. Cuantificación de la actividad antioxidante total del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I por los métodos ABTS con Trolox (azul), DPPH con Trolox (rojo), FRAP con Trolox (negro), FRAP con $FeSO_4$ (verde) y método de la decoloración del β-caroteno con α-Tocoferol como compuesto patrón (violeta). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

7.3. Identificación y cuantificación preliminar de los compuestos con capacidad antioxidante del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante la maduración

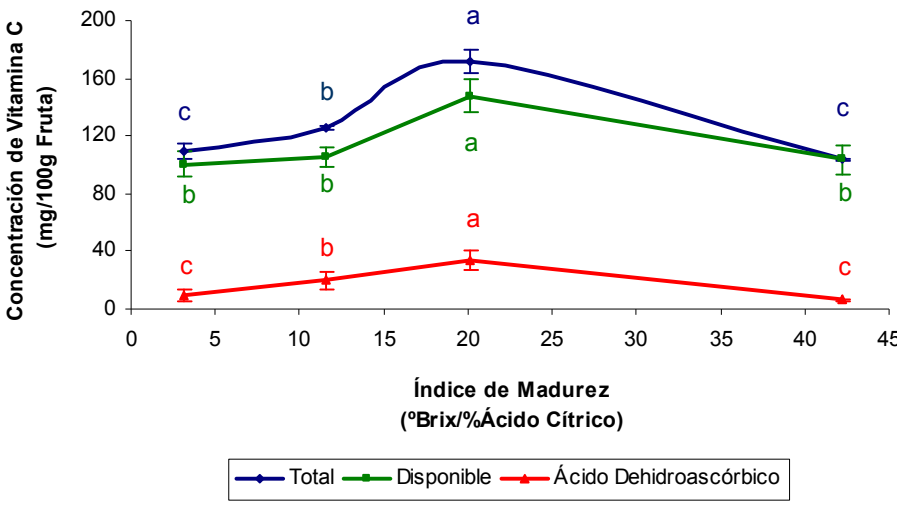
En estudios anteriores ha sido establecido que la capacidad antioxidante de frutos de guayaba de variedades desconocidas es debida a la presencia del ácido ascórbico (vitamina C), compuestos polifenólicos, carotenoides y enzimas antioxidantes (Thaipong *et al.* 2005). Por esta razón, se realizó la cuantificación del ácido ascórbico, compuestos fenólicos y carotenoides totales, así como la identificación y cuantificación preliminar por HPLC-DAD de los principales compuestos fenólicos y carotenoides que son quienes le proporcionan al fruto de guayaba variedad Palmira ICA I su valiosa capacidad antioxidante química.

La cuantificación del ácido ascórbico (vitamina C) fue realizada mediante una técnica cromatográfica debido a la alta selectividad que esta técnica proporciona con respecto a las técnicas espectrofotométricas, debido a que elimina las interferencias de los analitos que pueden reaccionar con los compuestos como en el método del ácido 2-nitro-salicílico (Arya *et al.* 2000). En la gráfica 7 se puede observar el perfil cromatográfico en fase normal del ácido ascórbico extraído del fruto de guayaba en los estados verde, pintón, maduro y senescente. El pico del ácido ascórbico fue cuantificado a 254 nm y se detectó en un tiempo de retención de 12,14 min.



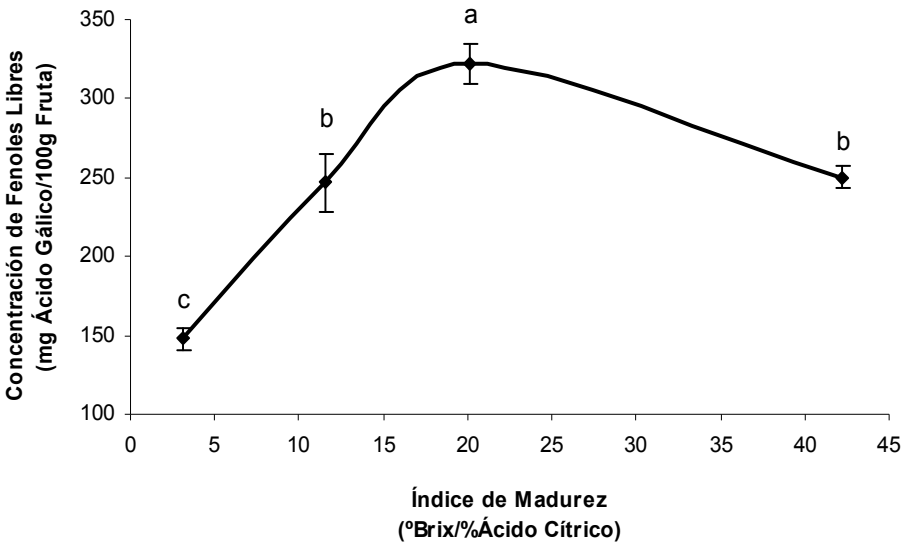
Gráfica 7. Superposición de los perfiles cromatográficos HPLC-UV a 254 nm del ácido ascórbico total (tiempo de retención de 12,14 min) en los estados de maduración verde (rosado), pintón (negro), maduro (azul) y senescente (rojo) del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I.

Durante la maduración del fruto de guayaba, el contenido de ácido ascórbico total presentó un aumento desde 109,93 mg / 100 g fruta en el estado verde hasta 171,27 mg / 100 g fruta en el estado maduro, y la posterior disminución hasta 103,51 mg / 100 g fruta en el estado senescente (gráfica 8). Debido a que los ácidos ascórbico total, disponible y dehidroascórbico tuvieron el mismo comportamiento durante la maduración de la guayaba, se puede sugerir que la síntesis y la degradación de los ácidos ascórbico y dehidroascórbico es un proceso que ocurre simultáneamente en el fruto de guayaba, observándose un aumento desde 9,35 y 100,57 mg / 100 g fruta en el estado verde, hasta 33,44 y 147,72 mg / 100 g fruta en el estado maduro, y la posterior disminución hasta 6,21 y 103,64 mg / 100 g fruta en el estado senescente, en ácido dehidroascórbico y ácido ascórbico disponible respectivamente. Este particular comportamiento que hace que el ácido ascórbico sea un excelente antioxidante, es debido que a medida que el ácido ascórbico es oxidado a ácido dehidroascórbico por el estrés oxidativo propio del proceso de maduración, el ciclo de Halliwell-Asada se encarga de restablecer el equilibrio oxidativo reduciendo nuevamente el ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico (Arrigoni y De Tullio 2002). Se encontró que aproximadamente cerca del 88% del ácido ascórbico total de fruto de guayaba se encuentra como ácido ascórbico disponible, mientras que el 12% se encuentra como ácido dehidroascórbico. Se observó que los frutos en estado maduro presentaron los mayores contenidos de vitamina C y que el comportamiento del ácido ascórbico fue similar al comportamiento de la capacidad antioxidante durante la maduración, sugiriendo que el ácido ascórbico podría estar involucrado en el sistema antioxidante del fruto de guayaba.



Gráfica 8. Comportamiento de la concentración del ácido ascórbico total, ácido ascórbico disponible y del ácido dehidroascórbico durante el proceso de maduración del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

Los compuestos polifenólicos son también metabolitos importantes responsables de la actividad antioxidante del fruto de guayaba. En la gráfica 9 se puede observar que los compuestos fenólicos libres (se llaman compuestos fenólicos libres debido a que el extracto no se sometió a una reacción de hidrólisis para cuantificar los fenoles que se encuentran glicosidados) tuvieron un aumento durante el proceso de la maduración del fruto desde 147,7 mg ácido gálico / 100 g fruta en el estado verde hasta 322,5 mg ácido gálico / 100 g fruta en el estado maduro, y una posterior disminución hasta 250,2 mg ácido gálico / 100 g fruta en el estado senescente. La síntesis de los compuestos fenólicos durante la etapa de crecimiento y desarrollo del fruto hasta el estado maduro permitió verificar nuevamente que el estado de madurez óptimo de consumo del fruto de guayaba para aprovechar su máximo potencial antioxidante como alimento funcional es el estado maduro. La disminución del contenido de compuestos fenólicos libres en la etapa de senescencia debido a la oxidación de los compuestos fenólicos a su forma de quinona ocasiona que el fruto presente una disminución en su calidad nutricional y funcional y no sea el estado de madurez óptimo de consumo del fruto. También se observó que el comportamiento de los polifenoles durante la maduración fue similar al comportamiento del ácido ascórbico y de la capacidad antioxidante, sugiriendo que los compuestos polifenólicos también podrían estar involucrados en el sistema antioxidante hidrofílico del fruto. Por esta razón, la identificación de los polifenoles permitirá atribuir el potencial antioxidante de la guayaba a metabolitos específicos conllevando el posible diseño de estrategias de conservación de la capacidad antioxidante durante periodos prolongados de tiempo.

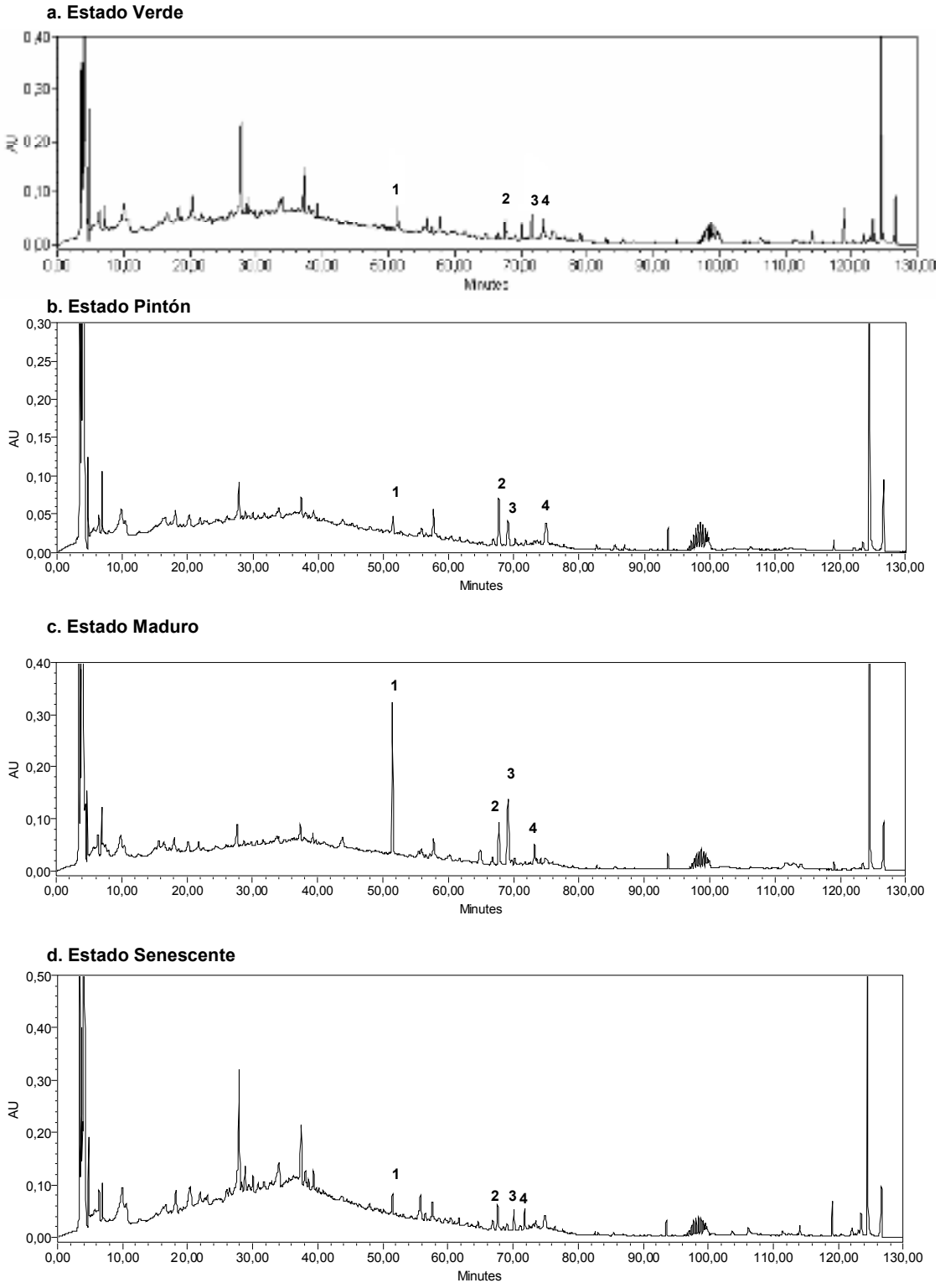


Gráfica 9. Concentración de los compuestos fenólicos libres del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante la maduración. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

La identificación preliminar de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el fruto de guayaba que podrían ser los responsables de su capacidad antioxidante, concentración y composición a lo largo del proceso de maduración fue realizada mediante la técnica cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). En la gráfica 10 se pueden observar los perfiles cromatográficos a 280 nm de los extractos sin realizar la reacción de hidrólisis ácida de los compuestos antioxidantes obtenidos del fruto de guayaba en los estados verde (a), pintón (b), maduro (c) y senescente (d). Aunque los perfiles cromatográficos son complejos y se detectaron una gran cantidad de compuestos, la mayoría de estos compuestos no corresponden a compuestos polifenólicos (los picos no presentaron absorciones significativas en el detector de arreglo de diodos y sus espectros UV-VIS obtenidos entre 200 y 400 nm no corresponden al espectro característico de los compuestos polifenólicos). Aún así, en los perfiles cromatográficos de los extractos sin hidrolizar de los compuestos antioxidantes de la guayaba en los cuatro estados de madurez se pudieron identificar cuatro compuestos importantes cuyo espectro de absorción corresponde al espectro característico de los compuestos polifenólicos. Estos compuestos fueron identificados a tiempos de retención de 51,25 min (pico 1), 66,52 min (pico 2), 71,55 min (pico 3) y 73,19 min (pico 4).

En estudios anteriores realizados en frutos y hojas de guayaba de variedades desconocidas se había realizado la identificación y cuantificación de los compuestos polifenólicos asociados a la actividad antioxidante hidrofílica y en general, a sus propiedades nutricionales y funcionales (Pérez *et al.* 2008, Tachakittirungrod e Ikegami 2007). En estos estudios se encontró que los principales compuestos polifenólicos que contribuyen a la actividad antioxidante hidrofílica de las hojas y de los frutos de la guayaba fueron la quercetina, quercetina-3-glucósido, morina, y los ácidos protocatecuico, elágico, gálico y clorógénico, siendo estos compuestos los patrones empleados para realizar la identificación preliminar y la cuantificación de los compuestos polifenólicos presentes en el fruto de guayaba variedad Palmira ICA I.

Para realizar la identificación preliminar de estos compuestos, se realizó una corrida cromatográfica de una mezcla de 10 patrones certificados de compuestos polifenólicos (ácido elágico, morina, quercetina, quercetina-3-glucósido, kaempferol, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido cafeíco y ácido protocatecuico) y se realizó la identificación preliminar de los compuestos por comparación del tiempo de retención y de sus características espectrales (longitudes de onda de máxima absorción λ_1, λ_2, λ_3 y λ_4) con los compuestos patrón.



Gráfica 10. Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 280 nm de los compuestos polifenólicos extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I sin realizar la reacción de hidrólisis ácida en los estados de madurez verde (a), pintón (b), maduro (c) y senescente (d).

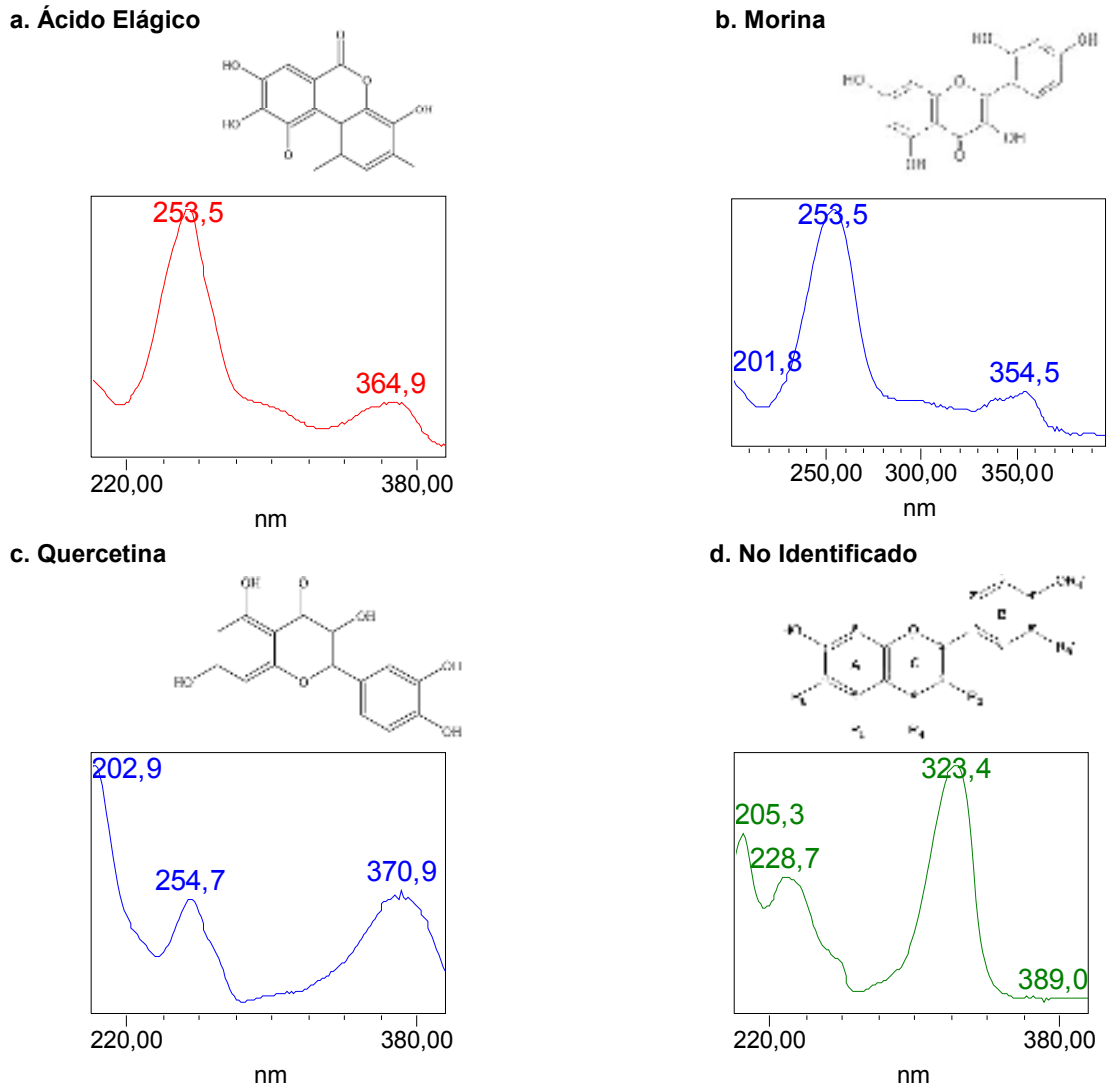
En la identificación cromatográfica preliminar basada en los tiempos de retención de los compuestos polifenólicos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I (tabla 7) se observó que el pico 1 corresponde al ácido elágico (51,25 min), el pico 2 a la morina (66,52 min), el pico 3 a la quercetina (71,55 min) y el pico 4 a un compuesto polifenólico no identificado (73,19 min). Ningún otro compuesto polifenólico fue detectado en los perfiles cromatográficos, siendo estos cuatro compuestos los únicos compuestos fenólicos quienes podrían tener una contribución considerable a la capacidad antioxidante hidrofílica del fruto de guayaba. Para confirmar la identidad de los compuestos, se realizó el análisis espectral UV-VIS comparativo con los compuestos patrones de cada uno de los picos. Se observó que en el compuesto que tuvo el tiempo de retención de 51,25 min, el patrón del ácido elágico presentó dos longitudes de onda de máxima absorción en 254 y 365 nm, mientras que en los picos de las muestras se observaron los mismos máximos de absorción y la misma forma del espectro, permitiendo confirmar parcialmente que este pico corresponde al ácido elágico. Este compuesto, tanto el patrón como en la muestra, presentó la emisión de fluorescencia a 405 nm, permitiendo confirmar en parte la identidad de este compuesto como el ácido elágico. De la misma manera, en el compuesto que tuvo el tiempo de retención de 66,52 min, el patrón de morina presentó dos longitudes de onda de máxima absorción en 252 y 352 nm, mientras que en los picos de las muestras se observaron los máximos de absorción en 254 y 355 y la misma forma del espectro, permitiendo confirmar parcialmente también que la morina se encuentra presente en el fruto de guayaba. El compuesto que tuvo el tiempo de retención de 71,55 min, el patrón de quercetina presentó tres longitudes de onda de máxima absorción en 203, 255 y 373 nm, mientras que en los picos de las muestras se observaron los máximos de absorción en 203, 255 y 371 y la misma forma del espectro, permitiendo concluir que la quercetina es un compuesto polifenólico que podría estar presente en el fruto de guayaba.

Tabla 7. Identificación cromatográfica y espectral (HPLC-DAD) preliminar de los principales polifenoles aislados de los frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

t_R (min)	Compuesto	Observado				Patrones**			
		λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	λ_3 (nm)	λ_4 (nm)	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	λ_3 (nm)	λ_4 (nm)
51,25	Ácido Elágico*	-	254	-	365	-	254	-	365
66,52	Morina	-	254	-	355	-	252	-	352
71,55	Quercetina	203	255	-	371	203	255	-	373
73,19	No Identificado	205	229	323	389	-	-	-	-

*Fluorescencia detectada a 405 nm
**Datos obtenidos con los patrones

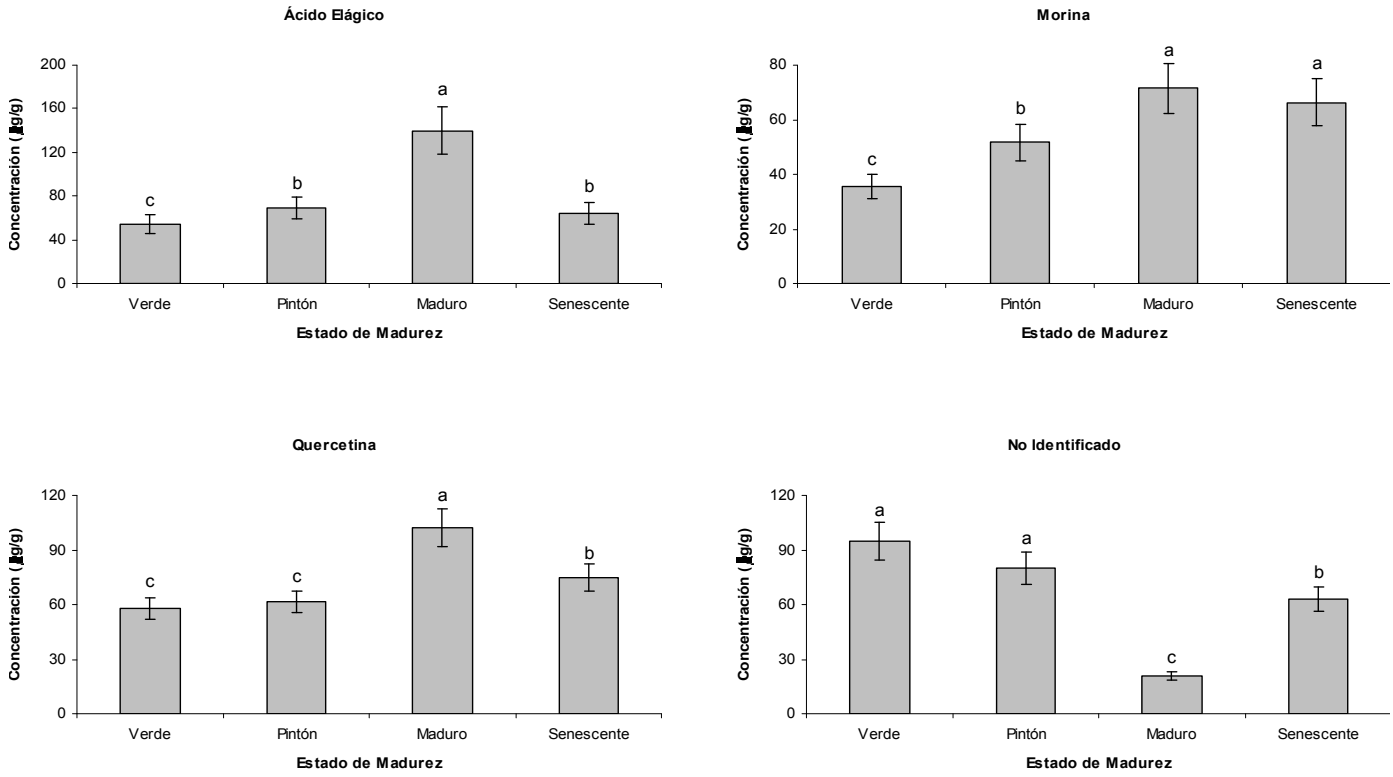
El compuesto que tuvo el tiempo de retención de 73,19 min no correspondió ni en tiempo de retención ni en características espectrales a ninguno de los patrones analizados, razón por la cual este compuesto no pudo ser identificado, pero debido a la forma de su espectro, a las longitudes de onda de máxima absorción (205, 229, 323 y 389) y a la similitud espectral que tiene este compuesto con la quercetina, se puede concluir que el compuesto no identificado corresponde a un flavonoide. Los espectros de absorción UV-VIS y las estructuras químicas de los compuestos polifenólicos identificados preliminarmente en el fruto de guayaba variedad Palmira ICA I se muestran en la gráfica 11.



Gráfica 11. Espectros de absorción UV-VIS entre 200 y 400 nm y estructura de los compuestos polifenólicos identificados preliminarmente por la técnica HPLC-DAD en el fruto de guayaba. Los polifenoles identificados fueron ácido elágico (a), morina (b), quercetina (c) y no identificado (d).

Cabe resaltar que los perfiles cromatográficos de los extractos de los compuestos antioxidantes del fruto de guayaba que fueron sometidos a la reacción de hidrólisis ácida (HCl 2N) para la identificación y cuantificación preliminar de los compuestos polifenólicos glicosidados, no presentaron ninguna diferencia con los perfiles de la gráfica 10 (extractos sin hidrólisis), lo cual permite proponer que en ninguno de los estados de maduración del fruto de guayaba se encuentran compuestos polifenólicos glicosidados y que la concentración de los compuestos fenólicos libres determinados por el método de Folin-Ciocalteu (gráfica 9) corresponde aproximadamente a la concentración de los compuestos fenólicos totales del fruto de guayaba.

Para la cuantificación de cada uno de los compuestos polifenólicos identificados preliminarmente en la guayaba, se establecieron curvas de calibración con los patrones de cada compuesto (anexo 2), donde el compuesto polifenólico no identificado fue cuantificado con la curva de calibración de la quercetina debido a sus semejanzas estructurales. En la gráfica 12 se observa el cambio de concentración de cada compuesto polifenólico durante la maduración.



Gráfica 12. Cuantificación de los polifenoles identificados preliminarmente por HPLC-DAD del fruto de guayaba durante la maduración. Los polifenoles cuantificados fueron ácido elágico, morina, quercetina y un polifenol no identificado. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

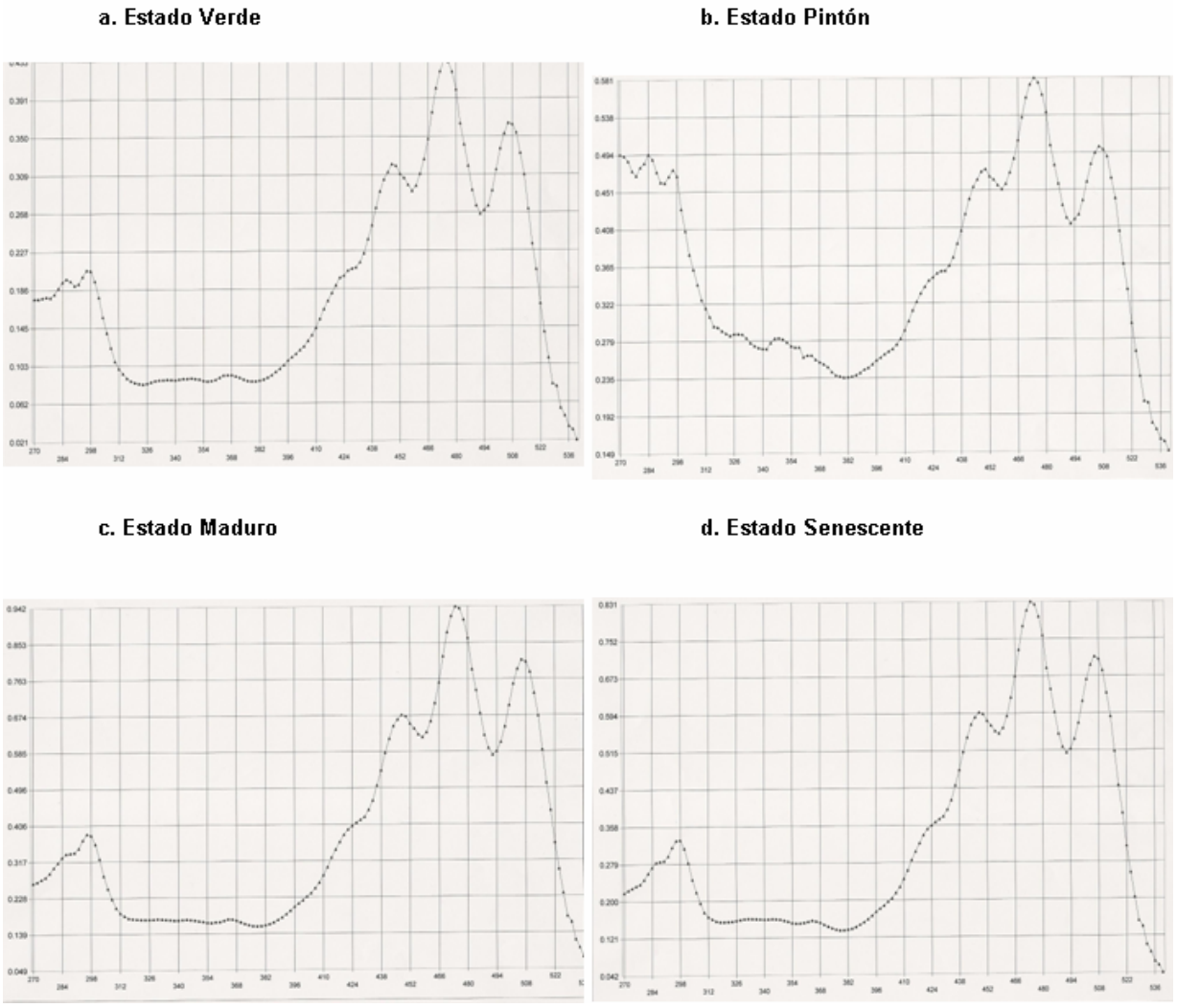
Se observó que la concentración del ácido elágico, la morina y la quercetina aumentó desde el estado verde hasta el estado maduro, y disminuyó durante la etapa de senescencia, mientras que la concentración del compuesto polifenólico no identificado tuvo una tendencia a disminuir durante la maduración. También se puede observar que el ácido elágico es el compuesto polifenólico que presenta la mayor concentración (cerca de 150 μg / g en el estado maduro), siendo este el compuesto que podría presentar la mayor contribución a la capacidad antioxidante, seguido de la quercetina, la morina y el compuesto polifenólico no identificado (Tachakittirungrod e Ikegami 2007). Este comportamiento ya había sido observado anteriormente en los compuestos fenólicos libres y en la capacidad antioxidante por todos los métodos, sugiriendo que la correlación encontrada en el comportamiento de la concentración de los compuestos polifenólicos, específicamente el ácido elágico, la morina y la quercetina, y el comportamiento de la capacidad antioxidante, lo cual podría ser indicativo nuevamente de que estos compuestos son en parte los responsables de la alta capacidad antioxidante y de las propiedades funcionales del fruto de guayaba. En la tabla 8 se puede observar el cambio de la composición porcentual de los compuestos polifenólicos identificados preliminarmente a lo largo del proceso de maduración. Se puede apreciar que el ácido elágico, la quercetina y la morina son los polifenoles más abundantes del fruto de guayaba, y que el cambio en su composición a lo largo de la maduración se correlaciona con el cambio de la actividad antioxidante del fruto, indicando de nuevo que estos compuestos podrían presentar las mayores contribuciones a la actividad antioxidante hidrofílica del fruto. Aunque el compuesto polifenólico no identificado tiene una composición porcentual alta a lo largo de la maduración, este compuesto parece no relacionarse con la capacidad antioxidante debido a que su concentración disminuye a lo largo de la maduración, presentando el comportamiento inverso al de la actividad antioxidante.

Tabla 8. Composición porcentual relativa de los compuestos polifenólicos extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante el proceso de maduración.

Compuesto	Composición Porcentual (%)			
	Verde	Pintón	Maduro	Senescente
Fenoles Totales (mg/100g)	147,7 ± 6,5^{b}	247,0 ± 18,2^{b}	322,5 ± 12,6^{a}	250,2 ± 7,3^{a}
Ácido Elágico	26,63 ± 1,83^{b}	23,10 ± 1,52^{c}	32,77 ± 2,13^{a}	26,27 ± 1,70^{b}
Morina	8,18 ± 1,16^{c}	11,57 ± 1,36^{b}	17,19 ± 1,89^{a}	11,32 ± 0,94^{b}
Quercetina	22,19 ± 1,45^{c}	22,75 ± 2,59^{c}	28,23 ± 2,03^{a}	24,78 ± 2,51^{b}
No Identificado	43,00 ± 2,60^{a}	42,58 ± 3,61^{a}	21,81 ± 2,81^{c}	37,63 ± 3,72^{b}

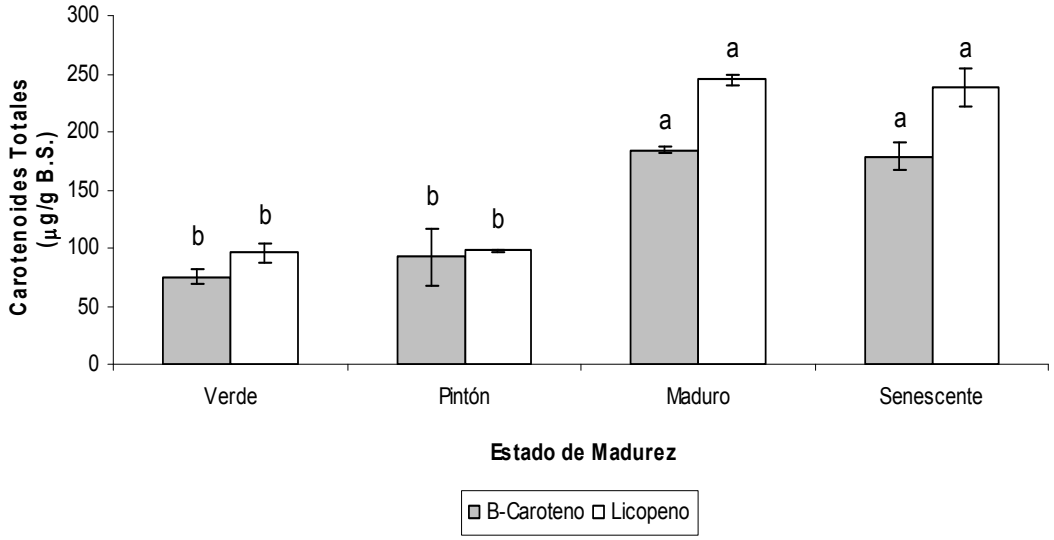
Promedio de las medidas (n=3) ± 1 D.E.

Los carotenoides son también importantes compuestos responsables de la actividad antioxidante lipofílica del fruto de guayaba (Thaipong *et al.* 2005). En primer lugar, se realizó la cuantificación de los compuestos carotenoides totales por el método espectrofotométrico. Los espectros de absorción UV-VIS obtenidos (gráfica 13) permitieron observar que los compuestos carotenoides totales extraídos del fruto de guayaba presentan una contribución significativa del licopeno, ya que los espectros de absorción en todos los estados de madurez presentaron las bandas características de este carotenoide a las longitudes de onda de 448 (λ_1), 474 nm (λ_2) y 506 nm (λ_3), además que la composición relativa de los compuestos carotenoides no presentó un cambio significativo a lo largo de todo el proceso maduración.



Gráfica 13. Espectros de absorción UV-VIS entre 270 y 500 nm de los compuestos carotenoides totales extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I en los estados de madurez verde (a), pintón (b), maduro (c) y senescente (d).

En la gráfica 14 se puede observar que los compuestos carotenoides totales tuvieron un aumento durante el proceso de la maduración del fruto desde 95,5 μg licopeno / g fruta en el estado verde hasta 244,9 μg licopeno / g fruta en el estado maduro, y una posterior disminución hasta 238,5 μg licopeno / g fruta en el estado senescente, además de que la mayor contribución a los carotenoides totales podría ser aportada por el licopeno, ya que se observó que cuando los compuestos carotenoides fueron expresados como licopeno, éstos parecieron encontrarse en una menor concentración. La síntesis de los compuestos carotenoides durante la etapa de maduración hasta el estado óptimo permitió verificar nuevamente que el estado de madurez de consumo del fruto de guayaba para aprovechar su máximo potencial antioxidante y sus propiedades funcionales es el estado maduro. La pequeña disminución del contenido de compuestos carotenoides totales en la etapa de senescencia del fruto puede ser debida a la oxidación a su forma no conjugada, ocasionando que el fruto presente una disminución en su calidad nutricional y funcional y no sea el estado adecuado de consumo del fruto. También se observó que el comportamiento de los carotenoides totales durante la maduración fue similar al comportamiento del ácido ascórbico, de los polifenoles y de la capacidad antioxidante, sugiriendo que estos compuestos podrían estar involucrados en el sistema antioxidante lipofílico del fruto (existe correlación entre la concentración de carotenoides y la actividad antioxidante). Por esta razón, la identificación parcial de los carotenoides permitirá atribuir el potencial antioxidante lipofílico de la guayaba a compuestos específicos, permitiendo el posible diseño de estrategias de conservación de la capacidad antioxidante lipofílica durante periodos amplios.

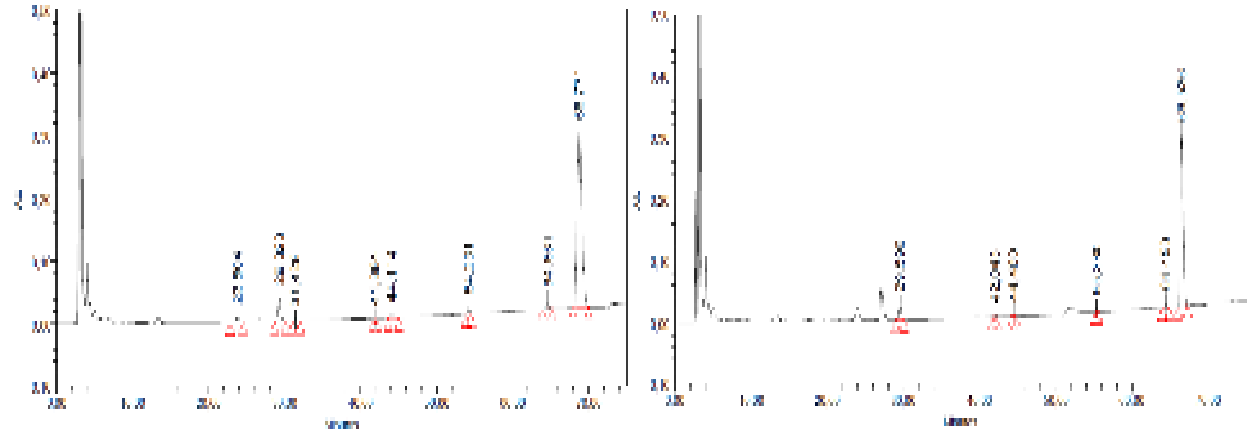


Gráfica 14. Cuantificación de los compuestos carotenoides totales extraídos de la guayaba variedad Pamira ICA I expresados como β-caroteno y licopeno. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

La identificación preliminar de los compuestos carotenoides que son los responsables de la capacidad antioxidante lipofílica, junto a su concentración y composición a lo largo del proceso de maduración, fue realizada mediante la técnica HPLC-DAD. En la gráfica 15 se pueden observar los perfiles cromatográficos a 450 nm de los extractos de los compuestos carotenoides obtenidos del fruto de guayaba en todos los estados de maduración. En una primera aproximación, se puede observar que el perfil de compuestos carotenoides está influenciado principalmente por un compuesto de baja polaridad detectado a los 68,77 min, mientras que otros carotenoides de mayor polaridad presentaron una contribución relativa mucho menor.

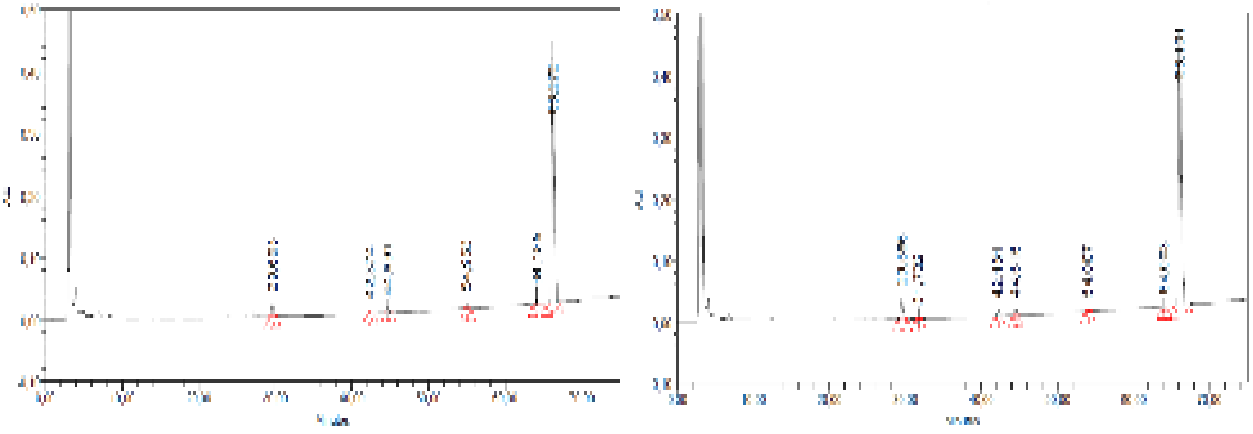
a. Estado Verde

b. Estado Pintón



c. Estado Maduro

d. Estado Senescente



Gráfica 15. Perfiles cromatográficos HPLC-DAD a 450 nm de los compuestos carotenoides extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I en los estados de madurez verde (a), pintón (b), maduro (c) y senescente (d).

En los perfiles HPLC-DAD de los extractos de carotenoides del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I fueron detectados preliminarmente 8 compuestos carotenoides (tabla 9). Para determinar la identidad de los compuestos, se realizó el análisis espectral UV-VIS comparativo con los compuestos patrones de cada uno de los compuestos. Se observó que el compuesto que tuvo el tiempo de retención de 23,80 min presentó las bandas de absorción λ_1, λ_2, y λ_3 características de los carotenoides en 419, 444 y 473 nm, con una relación de %III/II de 66, siendo identificado preliminarmente como luteína. El compuesto que tuvo el tiempo de retención de 29,32 min presentó las bandas de absorción en 275, 285 y 297 nm, con una relación de %III/II de 10, siendo identificado preliminarmente como fitoeno. El compuesto que tuvo el tiempo de retención de 31,43 min presentó las bandas de absorción en 332, 347 y 364 nm, con una relación de %III/II de 91, siendo identificado preliminarmente como fitoflueno. El compuesto que tuvo el tiempo de retención de 41,88 min presentó las bandas de absorción en 427, 452 y 478 nm, con una relación de %III/II de 30, siendo identificado preliminarmente como β-caroteno. El compuesto que tuvo el tiempo de retención de 44,11 min presentó las bandas de absorción en 411, 435 y 463 nm, con una relación de %III/II de 56, no pudo ser identificado. Con respecto a este compuesto y a sus características espectrales, se podría sugerir que este compuesto podría corresponder a la (all E)-violaxantina (tiempo de retención de 22,13 min, bandas de absorción en 411, 437 y 468 nm, con una relación de %III/II de 92) que debido a sufrir la reacción de saponificación incompleta, el fragmento del ácido graso de cadena larga quedó esterificando a la molécula haciéndola menos polar y ocasionando el retraso en su tiempo de retención y la modificación significativa de su relación %III/II (Rodrigo *et al.* 2003). El compuesto que tuvo el tiempo de retención de 54,23 min presentó las bandas de absorción en 430, 456 y 487 nm, con una relación de %III/II de 55, siendo identificado preliminarmente como (9 Z)-licopeno. El compuesto que tuvo el tiempo de retención de 64,66 min presentó las bandas de absorción en 432, 458 y 490 nm, con una relación de %III/II de 79, siendo identificado preliminarmente como (15 Z)-licopeno, y por último, el compuesto que tuvo el tiempo de retención de 68,77 min presentó las bandas de absorción en 445, 472 y 502 nm, con una relación de %III/II de 72, siendo identificado preliminarmente como (all E)-licopeno.

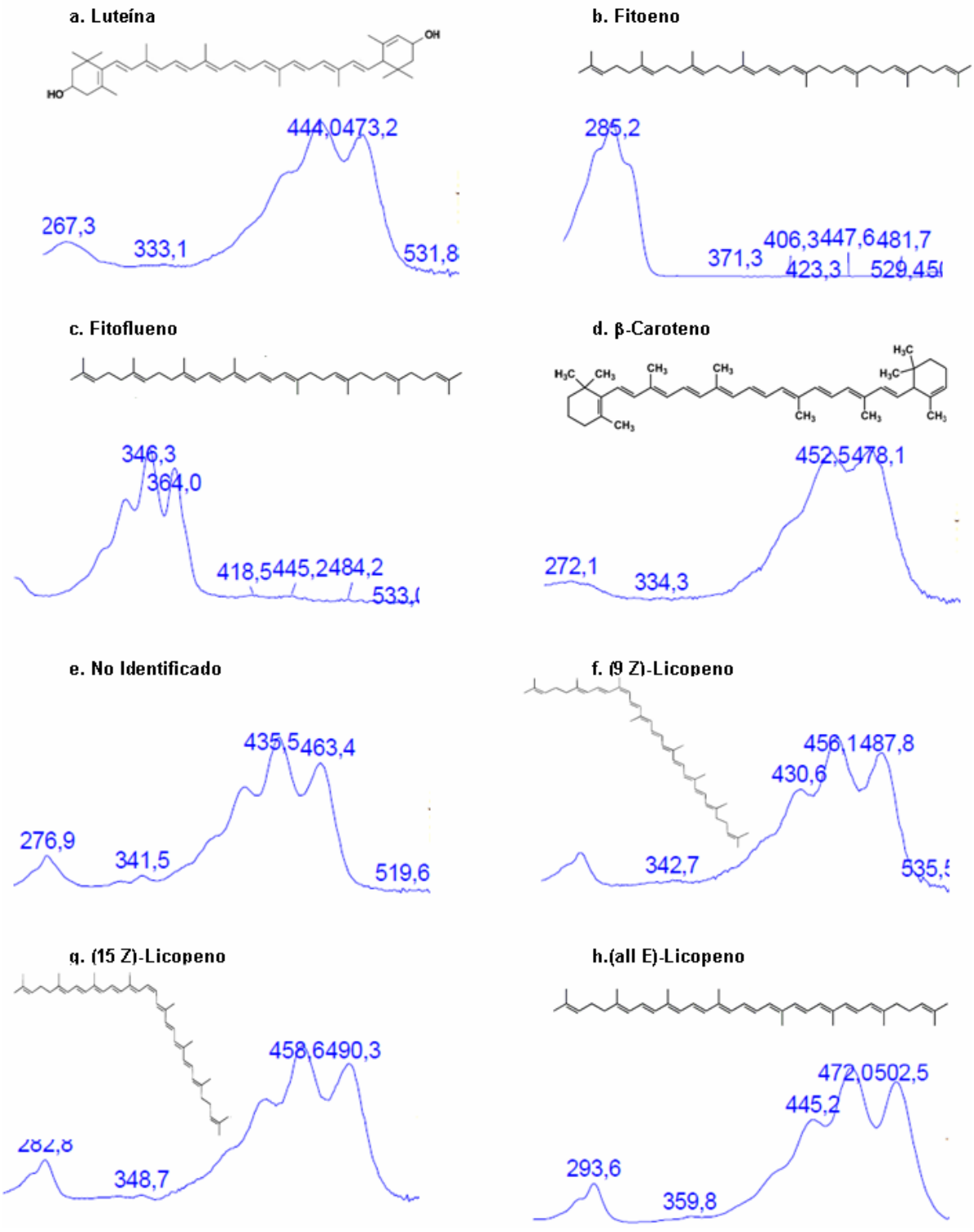
Cabe destacar que el método cromatográfico empleado presentó una alta capacidad de resolución, permitiendo la separación de los isómeros estructurales del licopeno y la posterior determinación de la contribución relativa que cada uno de los isómeros tendrá a la capacidad antioxidante lipofílica del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I.

Tabla 9. Identificación cromatográfica y espectral (HPLC-DAD) preliminar de los principales carotenoides extraídos de los frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

t_R (min)	Compuesto	Observado				Literatura*			
		λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	λ_3 (nm)	% III/II	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	λ_3 (nm)	% III/II
23,80	Luteína	419	444	473	66	421	445	474	60
29,32	Fitoeno	275	285	297	10	276	286	297	10
31,43	Fitoflueno	332	347	364	91	331	348	367	90
41,88	β-Caroteno	427	452	478	30	425	450	477	25
44,11	No identificado	411	435	463	56	-	-	-	-
54,23	(9 Z)-Licopeno	430	456	487	55	430	455	486	55
64,66	(15 Z)-Licopeno	432	458	490	79	434	460	492	74
68,77	(all E)-Licopeno	445	472	502	72	445	472	502	75

*Fuente: Rodrigo *et al.* (2003), Mercadante *et al.* (1999)

En la gráfica 16 se puede observar los espectros de absorción UV-VIS y las estructuras de los 8 compuestos carotenoides identificados preliminarmente en el fruto de guayaba. Los compuestos carotenoides parcialmente identificados permiten proponer una hipótesis con respecto a la acumulación del licopeno en el fruto de guayaba y su relación con el color de la pulpa del fruto. El licopeno es una molécula polinsaturada lineal que es ciclada por las enzimas ε-licopeno ciclasa (ε-LCY) que permite formar el α-caroteno y por la β-licopeno ciclasa (β-LCY) que permite formar el β-caroteno. Debido a que se detectó poca cantidad de β-caroteno, mientras que el α-caroteno no fue detectado en ningún estado de maduración, se puede sugerir que el gen que codifica la síntesis de la enzima ε-LCY no presenta niveles transcripcionales de expresión, mientras que el gen que codifica la síntesis de la enzima β-LCY presenta niveles transcripcionales de expresión muy bajos, explicando el hecho de que el licopeno no es degradado a lo largo de la maduración y que el color de la pulpa siempre es el rojo (color característico del licopeno), aumentando únicamente su intensidad con la maduración debido a la acumulación del mismo (gráfica 3). Es de resaltar que la acumulación de licopeno es un proceso benéfico para las propiedades funcionales de la guayaba debido a las reconocidas propiedades benéficas para la salud que este compuesto tiene (Shami y Moreira 2004). Para confirmar esta hipótesis, es necesario realizar estudios de biología molecular para realizar la cuantificación de los niveles transcripcionales de expresión de las enzimas β-LCY y α-LCY durante el proceso de maduración por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real RT-PCR (Alquezar *et al.* 2008(a)).

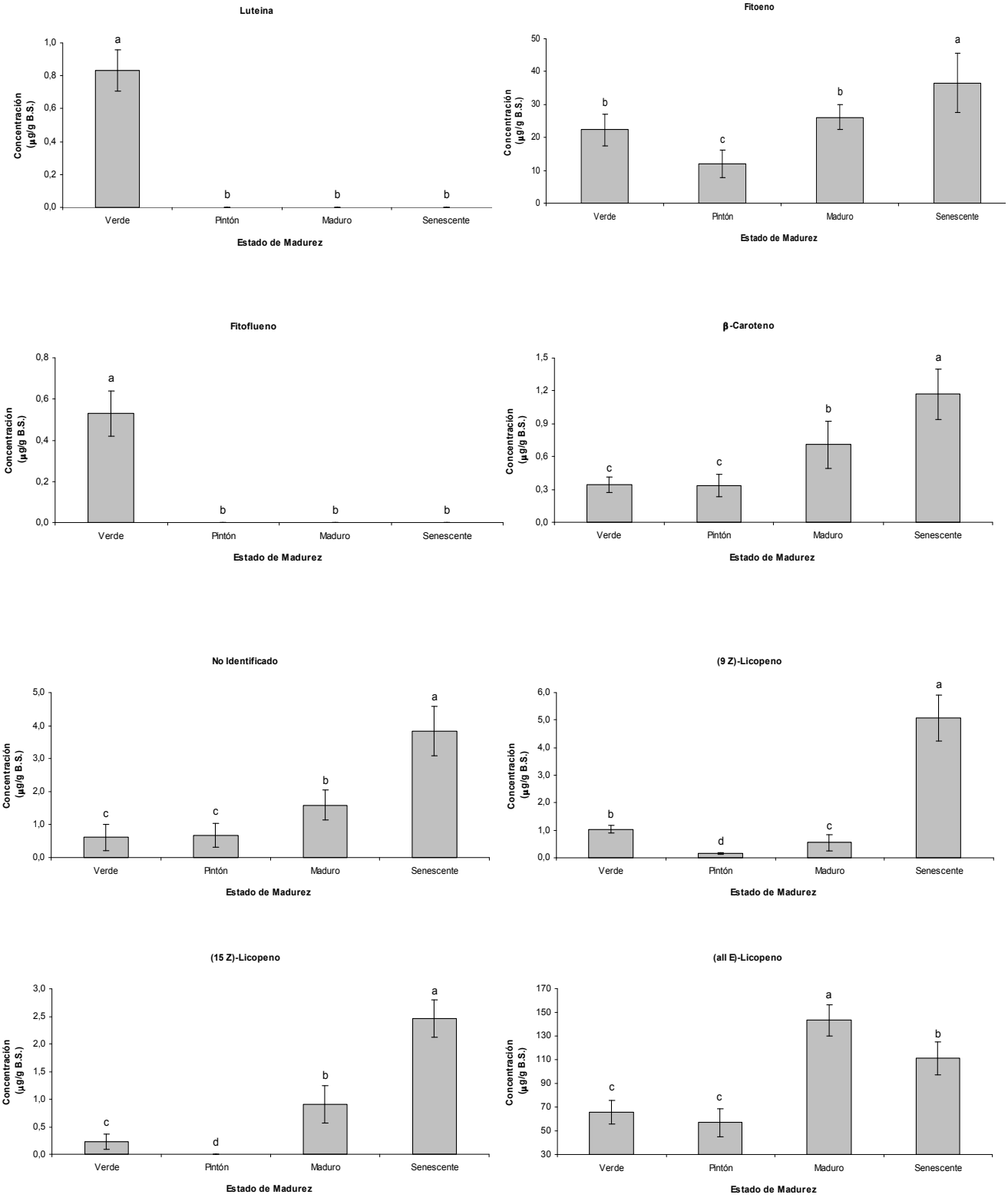


Gráfica 16. Espectros de absorción UV-VIS entre 270 y 500 nm y estructura de los compuestos carotenoides identificados preliminarmente por la técnica HPLC-DAD del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I. Los carotenoides identificados fueron luteína (a), fitoeno (b), fitoflueno (c), β-caroteno (d), no identificado (e), (9 Z)-licopeno (f), (15 Z)-licopeno (g) y (all E)-licopeno (h).

Para verificar la hipótesis de la acumulación de licopeno en el fruto de guayaba y para realizar una identificación definitiva de los compuestos carotenoides y polifenólicos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I, es necesario realizar un aislamiento y purificación de estos compuestos, para posteriormente realizar un análisis profundo de elucidación estructural mediante las técnicas de espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN).

Para la cuantificación de cada uno de los compuestos carotenoides identificados preliminarmente en la guayaba, se establecieron curvas de calibración con los patrones de cada compuesto (tabla 6), donde el compuesto carotenoide no identificado fue cuantificado con la curva de calibración de la luteína debido a sus semejanzas estructurales determinadas por su semejanza en el espectro UV-VIS (el compuesto no identificado podría ser una xantofila). En la gráfica 17 se observa el cambio de concentración de cada compuesto carotenoide durante la maduración. El fitoflueno y la luteína solo fueron detectadas en el estado verde, mientras que en el estado pintón, maduro y senescente desaparecieron. El fitoflueno es un carotenoide parcialmente saturado e incoloro que es precursor del licopeno. Su presencia en los frutos de guayaba podría ser indicativo de que el gen que codifica la enzima ζ-caroteno desaturasa (ZDS) podría estar expresándose en una menor cantidad, siendo el paso limitante en la síntesis metabólica del licopeno (Alquezar *et al.* 2008(a)). Por otro lado, las concentraciones del fitoeno, β-caroteno, (9 Z)-licopeno, (15 Z)-licopeno y del carotenoide no identificado, tuvieron una tendencia a aumentar a lo largo de todo el proceso de maduración. También se puede observar que el (all E)-licopeno es el compuesto carotenoide que presenta la mayor concentración (cerca de 143 μg / g en el estado maduro), siendo éste el compuesto que podría presentar la mayor contribución a la capacidad antioxidante lipofílica de la guayaba, seguido del fitoeno y de los isómeros 9 y 15-Z del licopeno. La concentración del (all E)-licopeno aumentó desde el estado verde hasta el estado maduro y disminuyó durante la etapa de senescencia del fruto, presentando el mismo comportamiento que tuvo la actividad antioxidante lipofílica determinada por el método de decoloración del β-caroteno, sugiriendo nuevamente que estos compuestos podrían contribuir a la capacidad antioxidante y a las propiedades funcionales de la guayaba.

Debido a que la concentración del licopeno es cerca de 150 veces mayor que la del β-caroteno a lo largo de todo el proceso de maduración, y que el α-caroteno y las α y β-xantofilas no fueron detectadas (o detectadas en trazas como la luteína), se puede seguir apoyando la hipótesis de que la acumulación del licopeno en el fruto de guayaba es debido a los bajos niveles transcripcionales de expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas ε y β-LCY.



Gráfica 17. Cuantificación de los carotenoides identificados preliminarmente por HPLC-DAD en la guayaba durante la maduración. Los carotenoides cuantificados fueron luteína, fitoeno, fitoflueno, β-caroteno, (9 Z)-licopeno, (15 Z)-licopeno y (all E)-licopeno. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

En la tabla 10 se puede observar el cambio de la composición porcentual de los compuestos carotenoides identificados preliminarmente a lo largo del proceso de maduración. Se puede apreciar nuevamente que el (all E)-licopeno (cerca del 90%), fitoeno y los isómeros 9 y 15-Z del licopeno son los carotenoides más abundantes del fruto de guayaba, y que el cambio en su composición a lo largo de la maduración se correlaciona con el cambio de la actividad antioxidante lipofílica del fruto, indicando que estos compuestos son los carotenoides que podrían presentar las mayores contribuciones a la actividad antioxidante lipofílica del fruto. También se observa que en el estado verde se detectan pequeñas cantidades de luteína y fitoflueno. Este resultado podría sugerir que en este estado de maduración, la síntesis de los carotenoides y xantofilas α se presenta en pequeña proporción, pero a medida que el fruto de guayaba madura, la composición de compuestos carotenoides producto de la ciclación del licopeno obedece principalmente a la orientación β promovida por la β-LCY. En estudios anteriores había sido determinada la composición de carotenoides de la guayaba. Se encontró que el principal carotenoide del fruto de guayaba es el (all E)-licopeno (Pérez *et al.* 2008), pero más interesante aún es el hecho que se encontraron todos los precursores del licopeno, así como las xantofilas procedentes del β-caroteno (β-criptoxantina, zeaxantina, violaxantina y neoxantina), mientras que las xantofilas provenientes del α-caroteno (α-criptoxantina y luteína) fueron detectadas en niveles de trazas, permitiendo corroborar que el fruto de guayaba podría tener un bloqueo genético en la síntesis de la enzima ε-LCY (Mercadante *et al.* 1999).

Tabla 10. Composición porcentual relativa de los compuestos carotenoides extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante el proceso de maduración.

Compuesto	Composición Porcentual (%)			
	Verde	Pintón	Maduro	Senescente
Carotenoides Totales (μg/g)	95,52 ± 8,57^{b}	97,40 ± 1,40^{b}	244,86 ± 3,98^{a}	238,51 ± 15,95^{a}
Luteína	1,20 ± 0,15^{a}	0,00 ± 0,00^{b}	0,00 ± 0,00^{b}	0,00 ± 0,00^{b}
Fitoeno	6,78 ± 2,80^{b}	6,15 ± 2,23^{b}	4,08 ± 0,84^{c}	7,04 ± 1,34^{a}
Fitoflueno	0,34 ± 0,11^{a}	0,00 ± 0,00^{b}	0,00 ± 0,00^{b}	0,00 ± 0,00^{b}
β-Caroteno	0,28 ± 0,17^{d}	0,60 ± 0,04^{b}	0,49 ± 0,12^{c}	0,73 ± 0,09^{a}
No identificado	0,44 ± 0,07^{d}	0,85 ± 0,15^{c}	1,02 ± 0,24^{b}	1,59 ± 0,14^{a}
(9 Z)-Licopeno	1,42 ± 0,29^{a}	0,47 ± 0,15^{d}	0,61 ± 0,14^{c}	0,92 ± 0,06^{b}
(15 Z)-Licopeno	1,85 ± 0,13^{a}	0,00 ± 0,00^{d}	0,19 ± 0,03^{c}	0,48± 0,06^{b}
(all E)-Licopeno	87,69 ± 2,04^{c}	91,93 ± 2,58^{b}	93,61 ± 1,55^{a}	89,24 ± 1,21^{c}

Promedio de las medidas (n=3) ± 1 D.E.

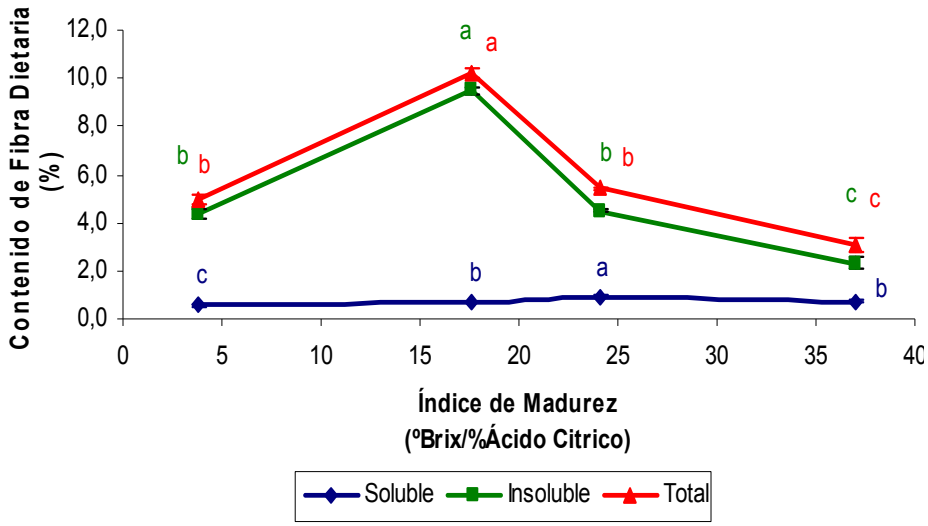
7.4. Ablandamiento del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I: comportamiento de la fibra dietaria durante la maduración

La fibra dietaria es un constituyente no nutritivo presente principalmente en la pared celular de los tejidos vegetales de leguminosas, cereales, frutas y verduras. Aunque no es hidrolizado ni absorbido, ejerce efectos fisiológicos benéficos para el ser humano contribuyendo a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, obesidad y diabetes. La fibra dietaria total (FDT) se encuentra compuesta por una fracción soluble (FDS) y por una fracción insoluble (FDI). La FDS está formada principalmente por pectina y almidón resistente, mientras que los principales componentes de la FDI son la celulosa, hemicelulosa y lignina (Galisteo *et al.* 2008). Todos los componentes de la fibra dietaria se encuentran ubicados en la pared celular, cumpliendo importantes funciones estructurales, otorgándole al fruto la resistencia y protección necesaria para soportar daños mecánicos y daños inducidos por el ataque de patógenos (Goulao y Oliveira 2008), además, los cambios de textura que sufren los frutos asociados al proceso de maduración son debidos principalmente a las modificaciones estructurales y en la composición que sufre la pared celular (Murayama *et al.* 1998). Así, la caracterización del contenido de fibra dietaria durante la maduración es de vital importancia para entender el fenómeno de ablandamiento y su posible relación la actividad de las enzimas de ablandamiento PG y PE durante la maduración, además de darle un valor agregado al consumo de guayaba por los numerosos beneficios fisiológicos que tiene la fibra dietaria que ésta contiene, y determinar la viabilidad de que la fibra dietaria del fruto de guayaba pueda ser empleada como suplemento funcional en alimentos de consumo diario.

En la gráfica 18 se observa el comportamiento que tuvo la concentración de FDT, FDS y FDI a lo largo del proceso de maduración del fruto de guayaba. Se observó que la FDT del fruto de guayaba está compuesta principalmente por FDI, mientras que la FDS tiene una contribución menor a la FDT. La composición relativa de la FDT cambió a lo largo del proceso de maduración, siendo en todos los estados de maduración mayor FDI que FDS. Se observó que en el estado verde, la FDT estuvo compuesta por un 11% de FDS y por un 89% de FDI, por un 7% de FDS y 93% de FDI en el estado pintón, 17% de FDS y 83% de FDI en el estado maduro y 24% de FDS y 76% de FDI en el estado senescente. Este resultado indica que la fibra dietaria de guayaba está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, y que son las modificaciones enzimáticas que ocurren sobre estos compuestos son las que definen el cambio de textura que ocurre en la guayaba durante la maduración. La concentración de la fibra dietaria

en el fruto de guayaba aumentó desde 0,57% de FDS y 4,39% de FDI en el estado verde, hasta 0,69% de FDS y 9,49% de FDI en el estado pintón, seguido de una un cambio hasta 0,92% de FDS y 4,50% de FDI en el estado maduro y 0,73% de FDS y 2,32% de FDI en el estado senescente. Este resultado permite resaltar nuevamente las propiedades funcionales del fruto de guayaba en los estados pintón y maduro ya que fue donde se observó la mayor concentración de fibra dietaria, ubicando a la guayaba como una posible fuente natural de fibra dietaria para el empleo como suplemento en la industria de alimentos.

Es de resaltar que la concentración de la FDT y FDI aumentó desde el estado verde hasta el estado pintón y disminuyó en los estados maduro y senescente, mientras que la concentración de la FDS aumentó desde el estado verde hasta el estado maduro y disminuyó en el estado senescente. La degradación de la FDT, FDS y FDI en los estados maduro y senescente coincide con la marcada pérdida de firmeza del fruto en estos estados de maduración (gráfica 4), sugiriendo que los cambios composicionales que ocurren en la fibra dietaria podrían estar relacionados con el ablandamiento enzimático del fruto. Aunque la concentración de la fibra dietaria permite explicar en medida el proceso de ablandamiento del fruto de guayaba, es necesario realizar estudios de las enzimas que atacan la pared celular y determinar la correlación que existe entre la actividad de estas enzimas, la pérdida de firmeza y la composición de la fibra dietaria durante la maduración.



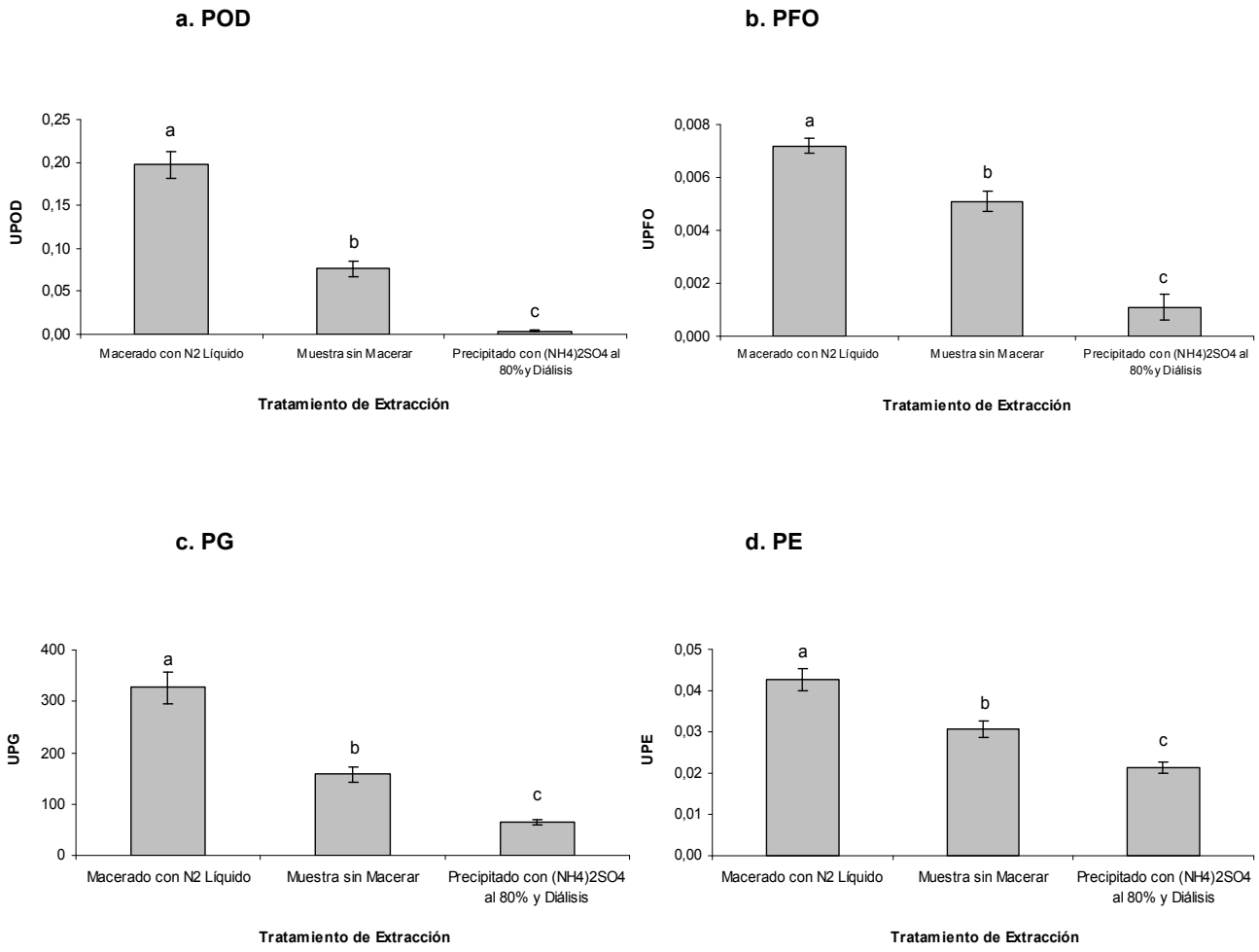
Gráfica 18. Cuantificación de la fibra dietaria total, soluble e insoluble del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante la maduración. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

7.5. Enzimas antioxidantes (POD y PFO) y de ablandamiento (PG y PE) del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I durante la maduración

7.5.1. Determinación de las mejores condiciones de extracción de las enzimas

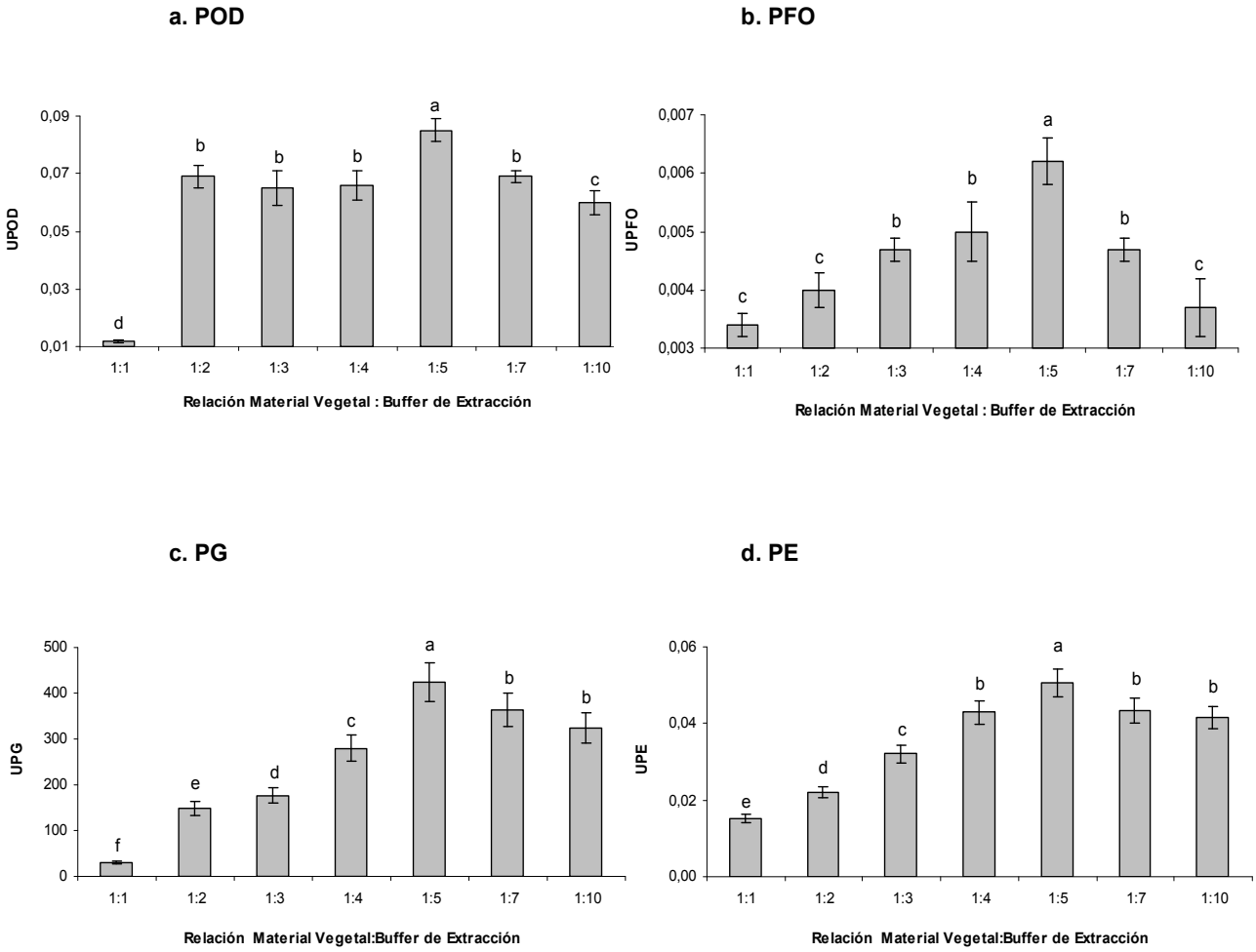
La determinación de la influencia de la actividad antioxidante, inducida por las enzimas POD y PFO, puede ser establecida mediante la cuantificación de la actividad de éstas durante el proceso de maduración, determinando su posterior correlación con los diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante. De la misma manera, la determinación de la influencia de la actividad de las enzimas PG y PE puede ser establecida mediante la cuantificación de su actividad enzimática durante la maduración, determinando su correlación con la concentración de la fibra dietaria total, soluble e insoluble. Para poder realizar una determinación confiable de la actividad de las enzimas POD, PFO, PG y PE es necesario poner a punto una metodología de extracción, que permita obtener un extracto crudo con una concentración considerablemente alta de enzima activa, y una metodología de medida de actividad de actividad enzimática con una precisión y reproducibilidad analítica aceptable en tiempos razonables con variables de respuesta medibles adecuadamente. Por esta razón, se puso a punto la metodología de extracción y medida de actividad de las enzimas POD, PFO, PG y PE, empleando frutos en estado maduro (20 ºBrix / %ácido cítrico).

El primer parámetro evaluado en la puesta a punto de las mejores condiciones de extracción de las enzimas fue la selección del mejor tratamiento de extracción (gráfica 19). Los tratamientos de extracción evaluados fueron el macerado del tejido con N_2 líquido previo al tratamiento de extracción, la purificación parcial de la enzima mediante precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ y posterior diálisis y la extracción de las enzimas sin realizar ningún tratamiento en el tejido. Se observó que para todas las enzimas el mejor tratamiento de extracción fue el macerado con N_2 líquido del tejido vegetal previo al tratamiento de extracción con el buffer. Es probable que el macerado del tejido vegetal con N_2 líquido contribuya a la ruptura y a la lisis celular facilitando la liberación de las enzimas, aumentando su disponibilidad para el posterior contacto con el buffer de extracción (Garrott *et al.* 1981). El empleo de la muestra sin realizar ningún tratamiento previo a la extracción con el buffer (muestra sin macerar) fue el tratamiento que presentó la respuesta intermedia a la extracción para las cuatro enzimas, mientras que la purificación parcial del extracto enzimático mediante la precipitación de las enzimas con $(NH_4)_2SO_4$ al 80% y posterior diálisis fue el tratamiento que presentó el menor rendimiento en la extracción.



Gráfica 19. Selección del mejor tratamiento de extracción de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

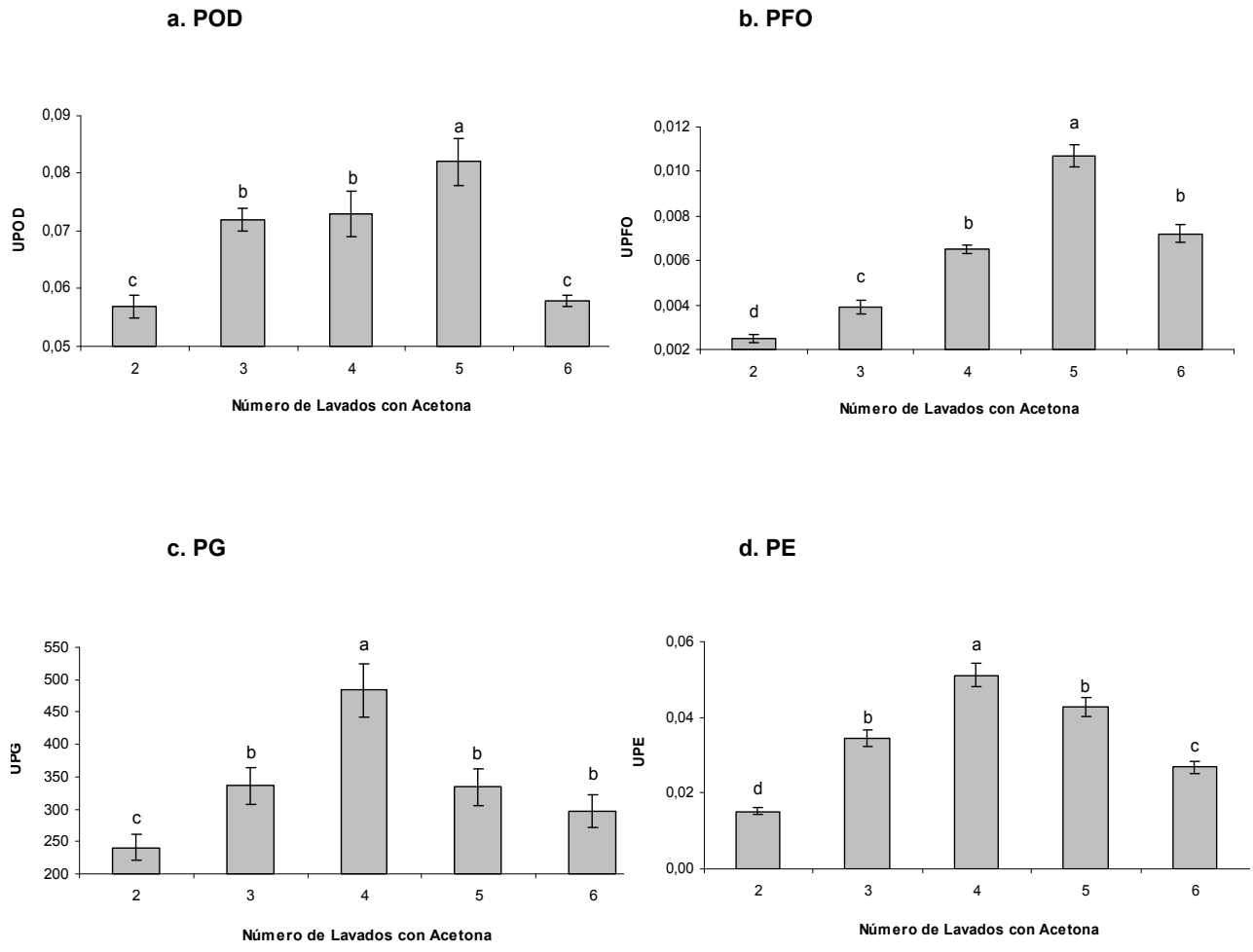
El tratamiento con $(NH_4)_2SO_4$ al 80% permite la precipitación fraccionada de las enzimas (globulinas, solubles en agua), aumentando su actividad específica debido al proceso de concentración. En este caso, se observó que la precipitación fraccionada y la posterior diálisis inhibieron la actividad de todas las enzimas debido posiblemente a que el proceso de diálisis ocasionó la pérdida de los compuestos metálicos que actúan como cofactores en las enzimas (Fe^{+3} para POD, Cu^{+2} para PFO y Na^{+1} para PG y PE). La pérdida de actividad de la POD fue irreversible aún después de reconstituir el cofactor por medio de la adición de una solución de $FeCl_3$, indicando que el cofactor de POD se encuentra coordinado fuertemente al sitio activo de la enzima (Derat y Sheik 2006), mientras que la reconstitución del cofactor de las enzimas PFO con $CuSO_4$ y de PG y PE con NaCl logró que las enzimas presentaran una pequeña actividad.



Gráfica 20. Selección de la mejor relación de tejido vegetal y buffer de extracción (g : mL) de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

Una vez que se determinó que el macerado de la muestra con N_2 líquido es la mejor manera de preparar la muestra del extracto enzimático, se procedió a determinar la mejor relación de tejido vegetal con el buffer de extracción (gráfica 20). Se encontró que para todas las enzimas, la mejor relación de tejido vegetal con el buffer de extracción fue de 1:5 (1 g de material vegetal por 5 mL de buffer de extracción). En general, se puede observar que para todas las enzimas, a medida que se aumenta la relación de tejido vegetal-buffer de extracción, la actividad de las enzimas aumenta, indicando que la extracción de las enzimas se hace más eficiente, hasta llegar al máximo en la relación 1:5. A relaciones mayores, se observa una disminución en la actividad de las enzimas debida probablemente a que estas estaban quedando muy diluidas, además de que la relación 1:5 es donde se logra extraer la mayoría de las enzimas del tejido.

Una vez se determinó que la mejor relación de tejido vegetal con el buffer de extracción es de 1:5 para todas las enzimas, se procedió a determinar el mejor número de lavados con acetona (gráfica 21). Los lavados con acetona (método de polvos de acetona) es un método de limpieza del extracto enzimático empleado para eliminar los interferentes como polifenoles, clorofilas y carotenoides que son inhibidores de la actividad enzimática (Rodakiewics *et al.* 2000). Se encontró que para las enzimas POD y PFO, el mejor número de lavados con acetona fue de 5 (cada lavado con 5 mL de acetona a 4 ºC), mientras que para las enzimas PG y PE, el mejor número de lavados con acetona fue de 4. Debido a que las enzimas POD y PFO pueden ser inhibidas por los compuestos polifenólicos (Mudd y Burris 1959), estas enzimas necesitaron de un lavado más que las enzimas PG y PE.

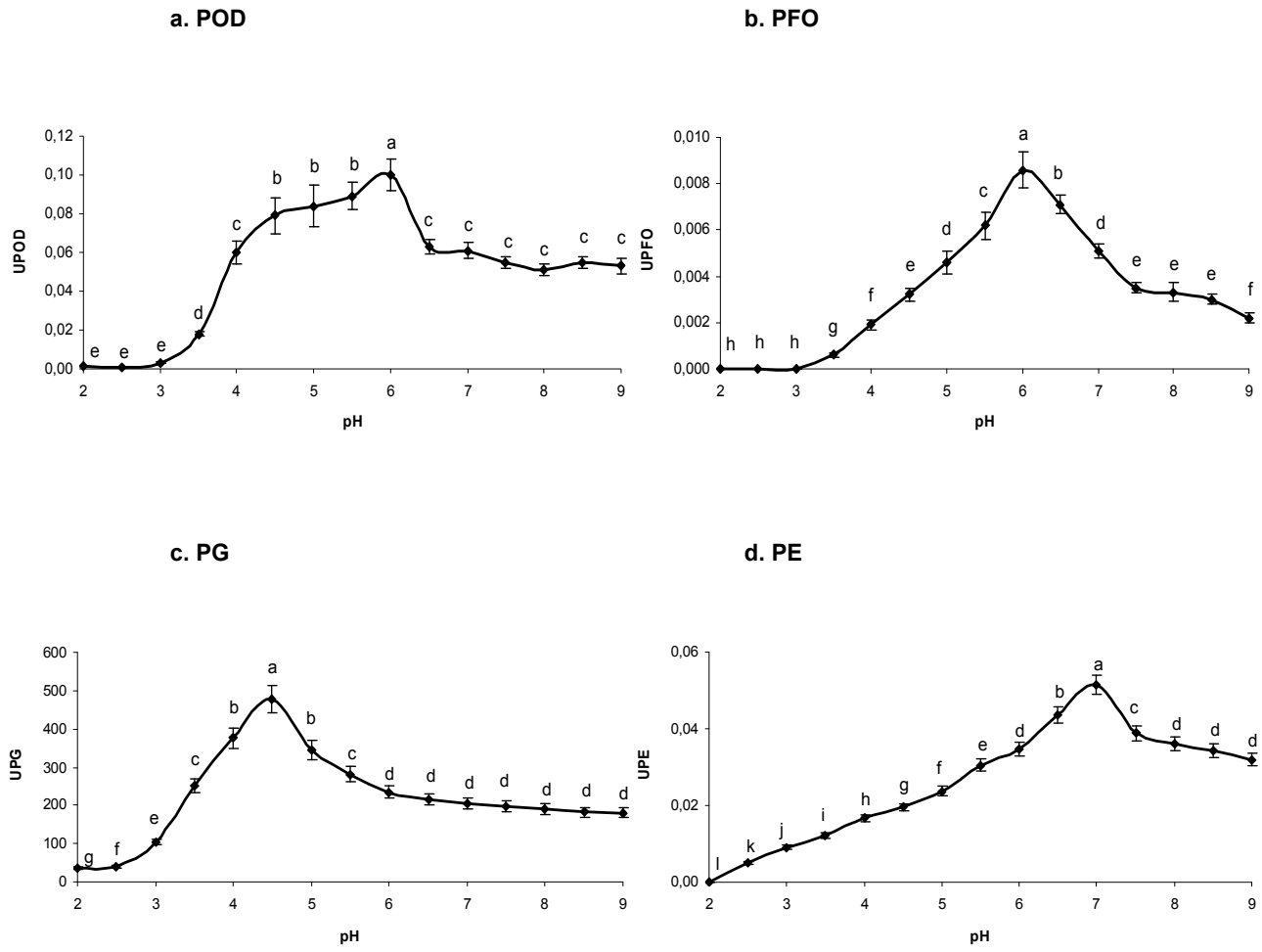


Gráfica 21. Selección del mejor número de lavados con acetona para la extracción de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

En general, se puede observar que para todas las enzimas, a medida que aumenta el número de lavados con acetona, la actividad de las enzimas aumenta, indicando que la eliminación de los interferentes se hace más eficiente, hasta llegar a los 5 lavados para la POD y PFO, y para 4 lavados para la PG y PE. Cuando se hace un exceso de lavados con acetona, se observó una disminución en la actividad específica de las enzimas debida probablemente a la desnaturalización de estas inducida por la acetona, indicando que los lavados con acetona son de vital importancia para definir la estabilidad de las enzimas (Mozhaev *et al.* 1989).

Una vez se determinó que el mejor número de lavados con acetona fue de 5 para la POD y PFO y de 4 para la PG y PE, se procedió a determinar el mejor pH del buffer de extracción (gráfica 22). Para las enzimas POD, PFO y PG se emplearon soluciones buffer de una fuerza iónica moderada (200 mM) que impidieron oscilaciones significativas en el pH manteniendo estable el estado de ionización de la enzimas, mientras que para la enzima PE se empleó un buffer de baja fuerza iónica (20 mM) que tiene como finalidad no generar un error sistemático por sobrestimación en la titulación, debido a la capacidad de amortiguación del buffer (Carabalí-Miranda *et al.* 2009). Se encontró que para las enzimas POD y PFO, la mejor solución de extracción fue el buffer fosfatos 200 mM pH 6,0, mientras que para la enzima PG fue el buffer citratos 200 mM pH 4,5, y para la PE el mejor fue el buffer fosfatos 20 mM pH 7,0.

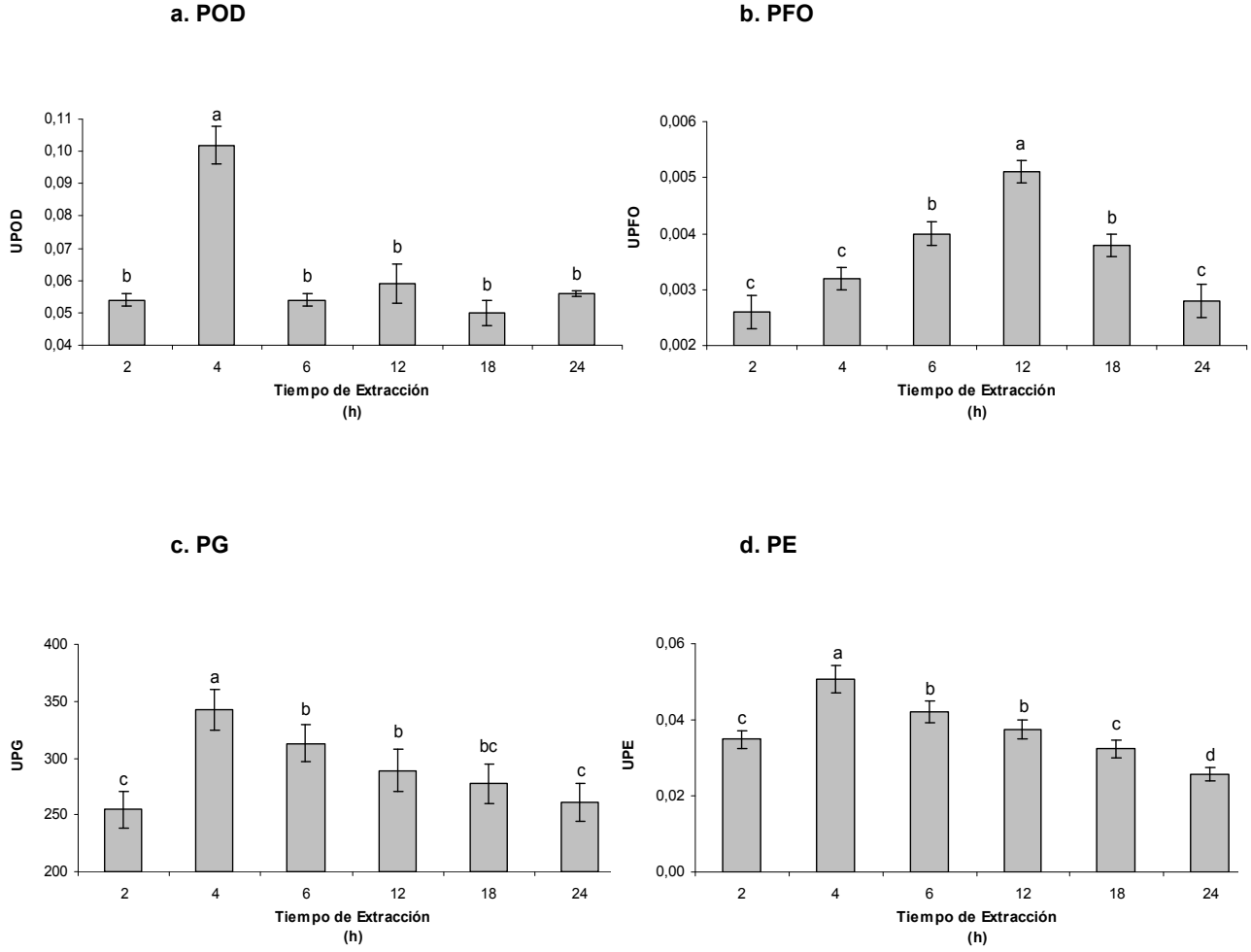
En general, se puede observar que para todas las enzimas, a medida que aumenta el pH de extracción, la actividad específica de las enzimas aumenta, indicando que las enzimas se acercaban a su estado de ionización óptimo (a pH inferiores del mejor pH de extracción, los aminoácidos del sitio activo de las enzimas se encontraban protonados), hasta llegar al mejor pH de extracción para cada enzima, donde la actividad de la enzima es la mayor. Cuando el pH de extracción superó al pH de mayor actividad, se observó una disminución en la actividad específica de las enzimas debida probablemente a la ionización de los aminoácidos del sitio activo de las enzimas, indicando que el pH de extracción es un parámetro de vital importancia para definir la estabilidad y actividad de las enzimas (Wang *et al.* 1999). Comparativamente se puede establecer que la extracción de la PFO (gráfica 25b) es la que más se ve afectada por el efecto del pH. Se pudo observar que en valores por debajo del pH de máxima actividad específica, la actividad de la enzima tiene un rápido aumento con variaciones pequeñas de pH, mientras que valores mayores al pH de máxima actividad específica, la actividad de la enzima tiene una rápida disminución con variaciones pequeñas de pH, mientras que para la POD, PG y PE los cambios de actividad enzimática por efecto del pH son menos pronunciados.



Gráfica 22. Selección del mejor pH de extracción de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

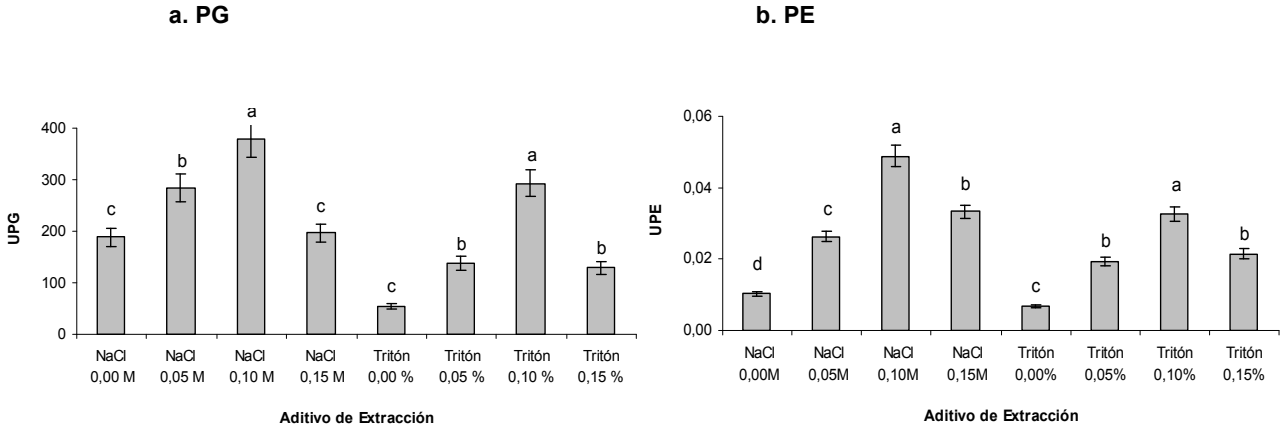
Una vez se determinó que el mejor pH de extracción fue de 6,0 para POD y PFO, de 4,5 para PG y de 7,0 para PE, se determinó el mejor tiempo de extracción (gráfica 23). Se encontró que para las enzimas POD, PG y PE el mejor tiempo de extracción fue de 4 h, mientras que para la PFO fue de 12 h. En general, se puede observar que para todas las enzimas, a medida que aumenta el tiempo de extracción, la actividad específica aumenta, indicando que el proceso de extracción estaba siendo efectivo, hasta llegar al mejor tiempo de extracción donde la actividad fue la mayor debido a que se logró realizar la extracción de la mayor cantidad de la enzima activa del fruto. Cuando el tiempo de extracción superó el tiempo de máxima actividad, se observó una disminución en la actividad específica de todas las enzimas debida probablemente a la pérdida de estabilidad de éstas al ser extraídas de su matriz natural (Kang *et al.* 2006).

En la gráfica 23a se observó que el tiempo de extracción fue un parámetro que determinó sensiblemente la actividad de la enzima POD. Se observó que la actividad de la POD desde 0,052 UPOD a las 2 h de extracción hasta 0,110 UPOD a las 4 h de extracción (aumentó el doble), mientras que a las 6 h de extracción disminuyó nuevamente hasta actividades específicas de 0,060 UPOD aproximadamente, indicando que alejarse considerablemente del mejor tiempo de extracción de la POD (4 h) disminuiría significativamente el rendimiento de la extracción de la enzima de la matriz vegetal debido a que esta enzima presenta una baja inestabilidad en el tiempo (López *et al.* 2001). También, se observó que la actividad específica de las enzimas PFO, PG y PE no se vio significativamente alterada en tiempos cercanos al mejor tiempo de extracción, permitiendo que el rango de tiempo de extracción (cercano al mejor tiempo de extracción) de estas enzimas sea un poco más amplio que en la POD.



Gráfica 23. Selección del mejor tiempo de extracción de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d) a una temperatura de 4 ºC. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

Una vez se determinó que el mejor tiempo de extracción fue de 4 h para POD, PG y PE y de 12 h para PFO, se determinó el mejor aditivo de extracción para las enzimas PG y PE (gráfica 24). Debido a que las enzimas pécticas tienen como sustratos los componentes estructurales que conforman la pared celular, estas enzimas se encuentran unidas a esta. Existen dos posibles mecanismos de unión de las enzimas a la pared celular, los cuales son la unión iónica, que se elimina aumentando la fuerza iónica de la pared celular con NaCl, o la disolución de la enzima en la pared, que se elimina mediante la aplicación de detergentes no iónicos (Tritón X-100) que ocasiona la permeabilización de las células por la disolución de la proteínas de membrana (Micheli 2001). Se encontró que para la PG y PE el mejor aditivo de extracción fue el NaCl 0,10 M. En general, se puede observar que para las dos enzimas, a medida que aumenta la concentración del aditivo, tanto con NaCl como con Tritón X-100, la actividad específica de PG y PE aumenta, indicando que el aditivo de extracción estaba promoviendo la disolución de las enzimas en el buffer de extracción, hasta llegar a la concentración donde la actividad fue mayor debido a que se logró disolver la mayor cantidad de enzima activa. Cuando la concentración del aditivo fue muy alta, se observó una disminución en la actividad específica de las dos enzimas debida probablemente a la inhibición ocasionada por el Na^{+1} y por el Tritón X-100 (Rodríguez-Nieto 2008). También se determinó que la extracción de las enzimas siempre fue más eficiente cuando se empleó NaCl como aditivo de extracción que cuando se empleó Tritón X-100, indicando que la unión de éstas a la pared celular es probablemente de carácter iónico. Cuando se evaluó el efecto del Tritón X-100 en la eficiencia de extracción, se observó el mismo comportamiento que con el NaCl (la mejor concentración del Tritón X-100 fue de 0,10%), pero la diálisis para eliminar el exceso del detergente provocó la inactivación parcial de la PG y PE.



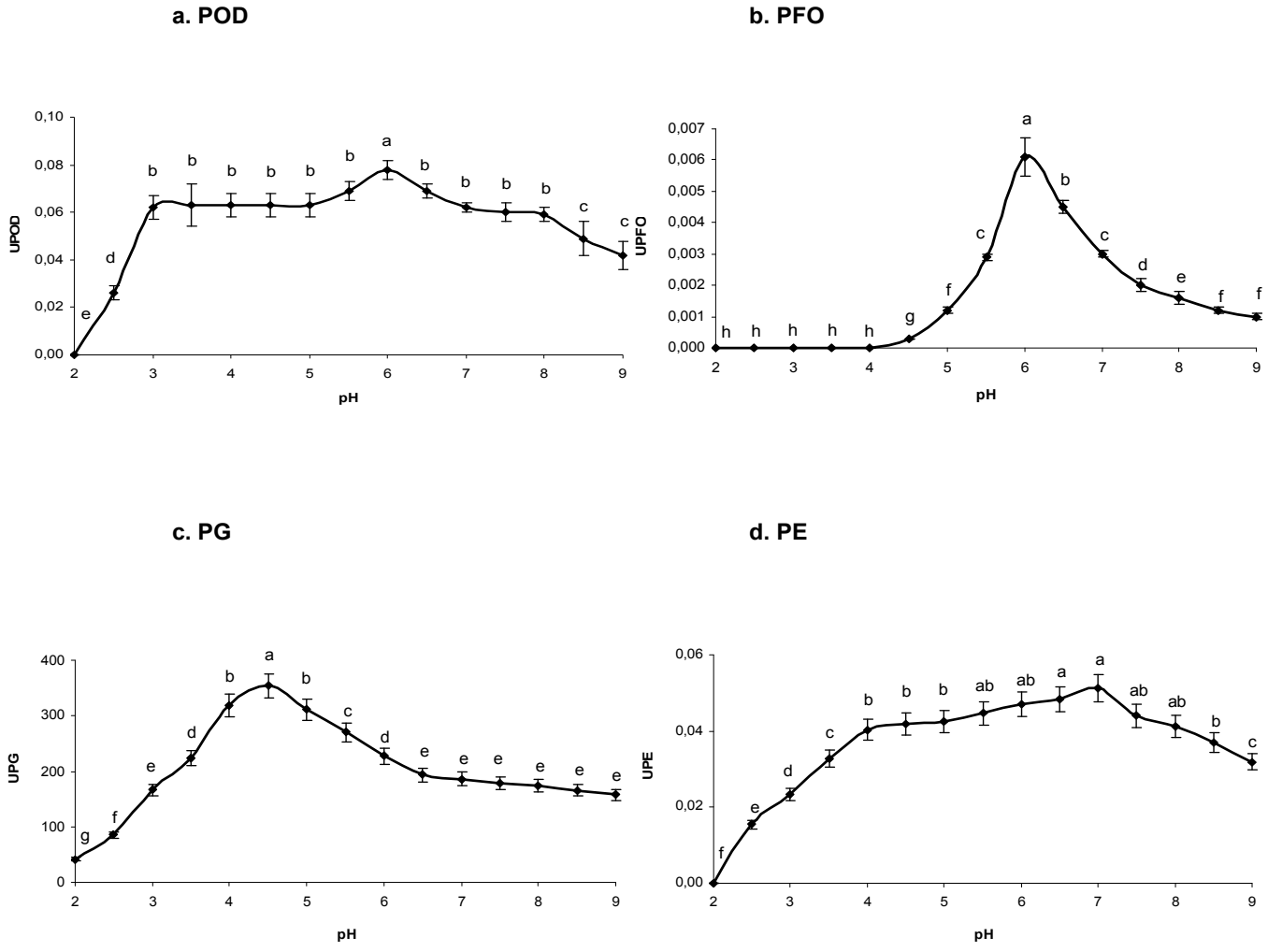
Gráfica 24. Selección del mejor aditivo de extracción de las enzimas PG (a) y PE (b). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

7.5.2. Determinación de las mejores condiciones de medida de actividad de las enzimas

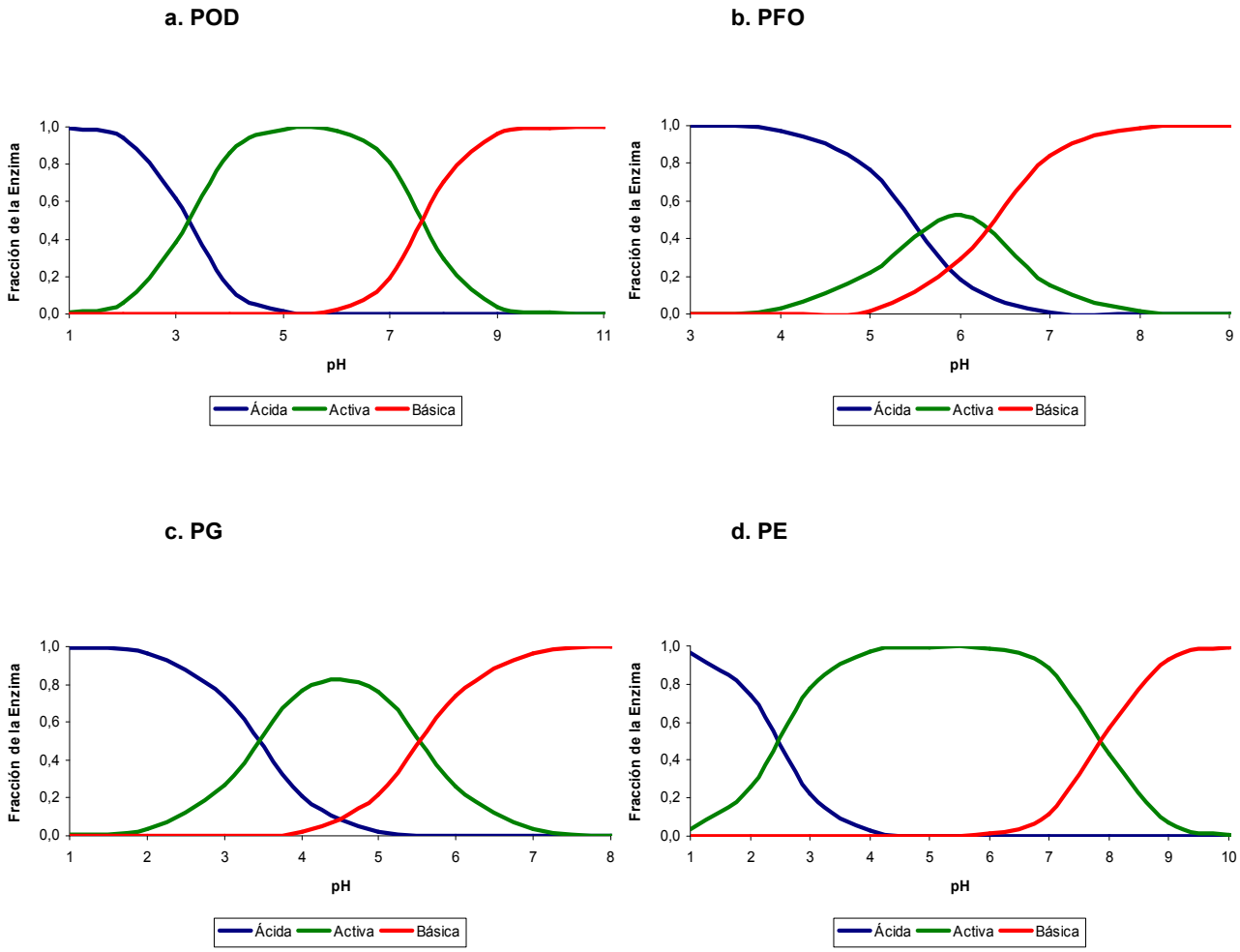
La determinación de las mejores condiciones de extracción de las enzimas solo permite garantizar que el extracto enzimático obtenido contiene la mayor cantidad de enzima activa posible, pero no garantiza nada con respecto a la estabilidad y al comportamiento cinético que la enzima tendrá en el medio de reacción frente al sustrato (Arbaisah *et al.* 1996). Por esta razón, la determinación de las mejores condiciones de medida de actividad de las enzimas en un sistema artificial *in vitro* es de vital importancia para asegurarse que la enzima tiene una estabilidad aceptable y que su velocidad de reacción es representativa de la actividad que estas tienen en los sistemas *in vivo*. Para realizar esto, se puso a punto la metodología de medida de actividad de cada enzima, donde se evaluaron en primer lugar los parámetros que definen la estabilidad de las enzimas (pH y temperatura), seguido de los parámetros que definen su velocidad (tiempo de reacción, concentración de enzima y sustrato).

El primer parámetro evaluado fue el pH de medida de actividad (gráfica 25). De la misma manera que se hizo en la determinación del mejor pH de extracción, para las enzimas POD, PFO y PG se emplearon soluciones buffer 200 mM, mientras que para la enzima PE se empleó un buffer 20 mM. Los resultados obtenidos fueron similares al comportamiento de las enzimas en la extracción, donde se encontró que para las enzimas POD y PFO, la mejor solución de medida de actividad fue el buffer fosfatos 200 mM pH 6,0, mientras que para la enzima PG fue el buffer citratos 200 mM pH 4,5, y para la PE el mejor fue el buffer fosfatos 20 mM pH 7,0. Se puede observar que para todas las enzimas, de la misma manera que se encontró en la determinación del mejor pH de extracción, a medida que aumenta el pH de medida de actividad, la actividad específica de las enzimas aumenta, indicando que las enzimas se acercaban a su estado de ionización óptimo, hasta llegar al mejor pH de medida de actividad para cada enzima, donde la actividad de la enzima fue la mayor. Cuando el pH de medida de actividad fue muy alto, se observó nuevamente una disminución en la actividad específica de las enzimas debida probablemente a la disociación de los aminoácidos del sitio activo de las enzimas. Se verificó que la PFO (gráfica 25b) es la enzima que más se ve afectada por el efecto del pH. Se pudo verificar que en valores por debajo del pH de máxima actividad específica, la actividad de la enzima tiene un rápido aumento con variaciones pequeñas de pH, mientras que valores mayores al pH de máxima actividad específica, la actividad de la enzima tiene una rápida disminución con variaciones pequeñas de pH, mientras que para la POD, PG y PE los cambios de actividad enzimática por efecto del pH son menos pronunciados.

Para cada una de las enzimas, se obtuvo el diagrama de distribución de especies aparente calculado con las funciones de pH de Michaelis (Marangoni 2003). En la gráfica 26 se pudo observar que la fracción activa de las enzimas PFO y PG tiene un menor rango que actividad, mientras que las enzimas POD y PE son activas en un intervalo de pH más amplio. Este resultado permite explicar el hecho de que la enzima PFO y PG sean las enzimas más sensibles a pequeñas variaciones del pH, mientras que la POD y PE tienen una estabilidad relativa un poco mayor. Este resultado también se ve reflejado en los valores de pK aparentes calculados para cada enzima (pK_1 de ionización de la fracción ácida a la fracción activa, y pK_2 de la fracción activa a la fracción básica). Se pudo observar (tabla 11) que la PFO y PG tienen valores de pK muy cercanos (ΔpK de 0,8 para PFO y 2,1 para PG), mientras que las enzimas



Gráfica 25. Selección del mejor pH para la medida de la actividad de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.



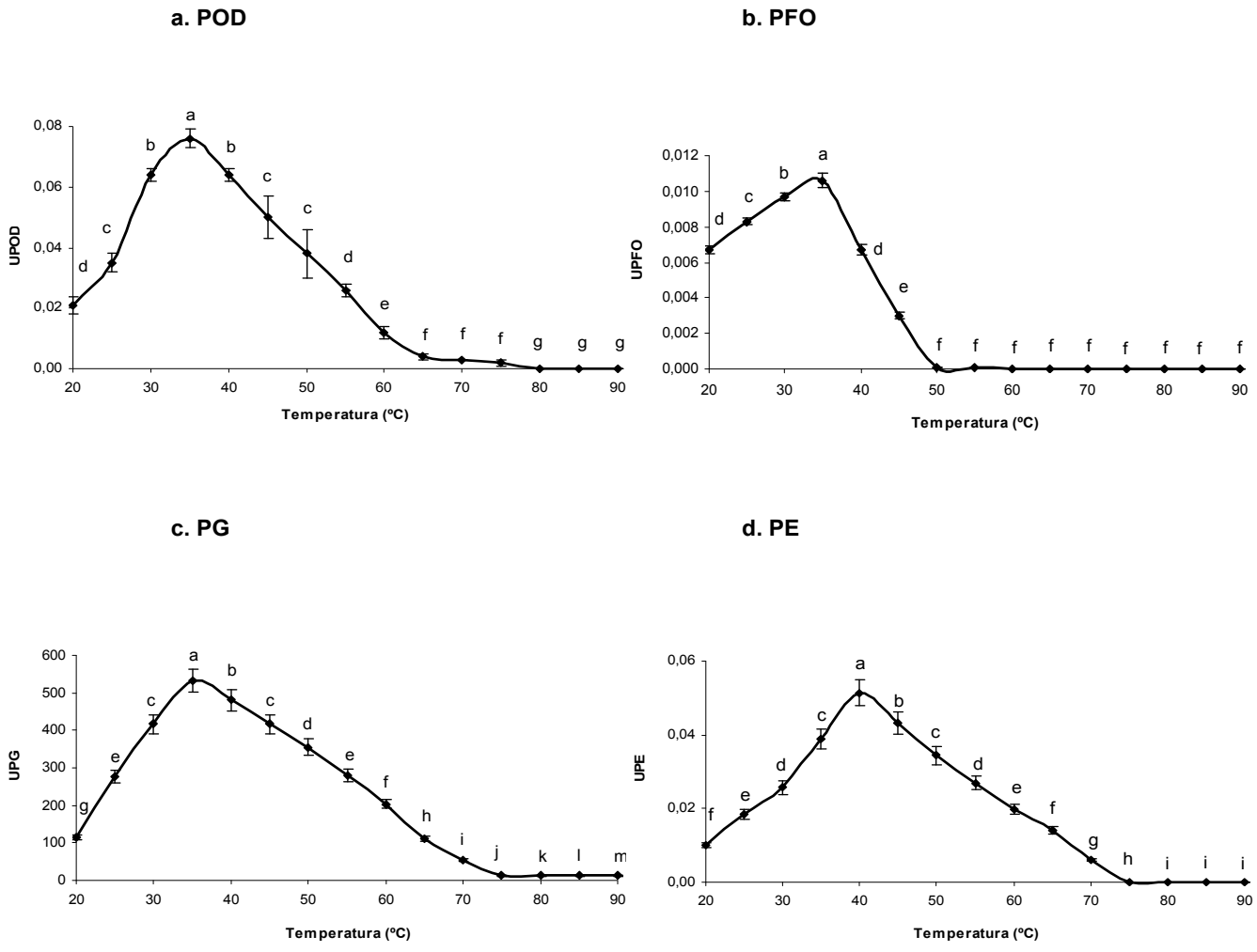
Gráfica 26. Diagramas de distribución de especies de las fracciones ácida, básica y activa de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d). Calculadas según las funciones de pH de Michaelis.

POD y PE tienen valores de pK más lejanos (ΔpK de 4,4 para POD y 5,4 para PE), sugiriendo nuevamente que la estabilidad al pH de las enzimas es función de los pK de ionización de las fracciones ácida, activa y básica de las enzimas, así como del mejor pH de medida de actividad.

Tabla 11. Propiedades aparentes de pH calculadas según las funciones de pH de Michaelis para las enzimas POD, PFO, PG y PE en frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

	POD	**PFO**	**PG**	**PE**
Mejor pH	6,0	6,0	4,5	7,0
pK_1	3,2	5,5	3,4	2,5
pK_2	7,6	6,3	5,5	7,9

El segundo parámetro de estabilidad evaluado fue la temperatura de medida de actividad (gráfica 27). Se encontró que para las enzimas POD, PFO y PG, la mejor temperatura de medida de actividad fue de 35 ºC, mientras que para la enzima PE fue de 40 ºC. Se puede observar que para todas las enzimas a medida que aumenta la temperatura, la actividad específica de las enzimas aumenta hasta llegar a la mejor temperatura de medida de actividad, donde la actividad de la enzima fue la mayor. Cuando la temperatura fue muy alta, se observó una disminución en la actividad específica de las enzimas debida al proceso de desnaturalización térmica (Thompson *et al.* 1998). La desnaturalización térmica de cada enzima (donde no se observó actividad enzimática) se consiguió a los 50 ºC para la PFO, mientras que para la POD, PG y PE no se detectó ninguna actividad residual después de los 70 ºC.



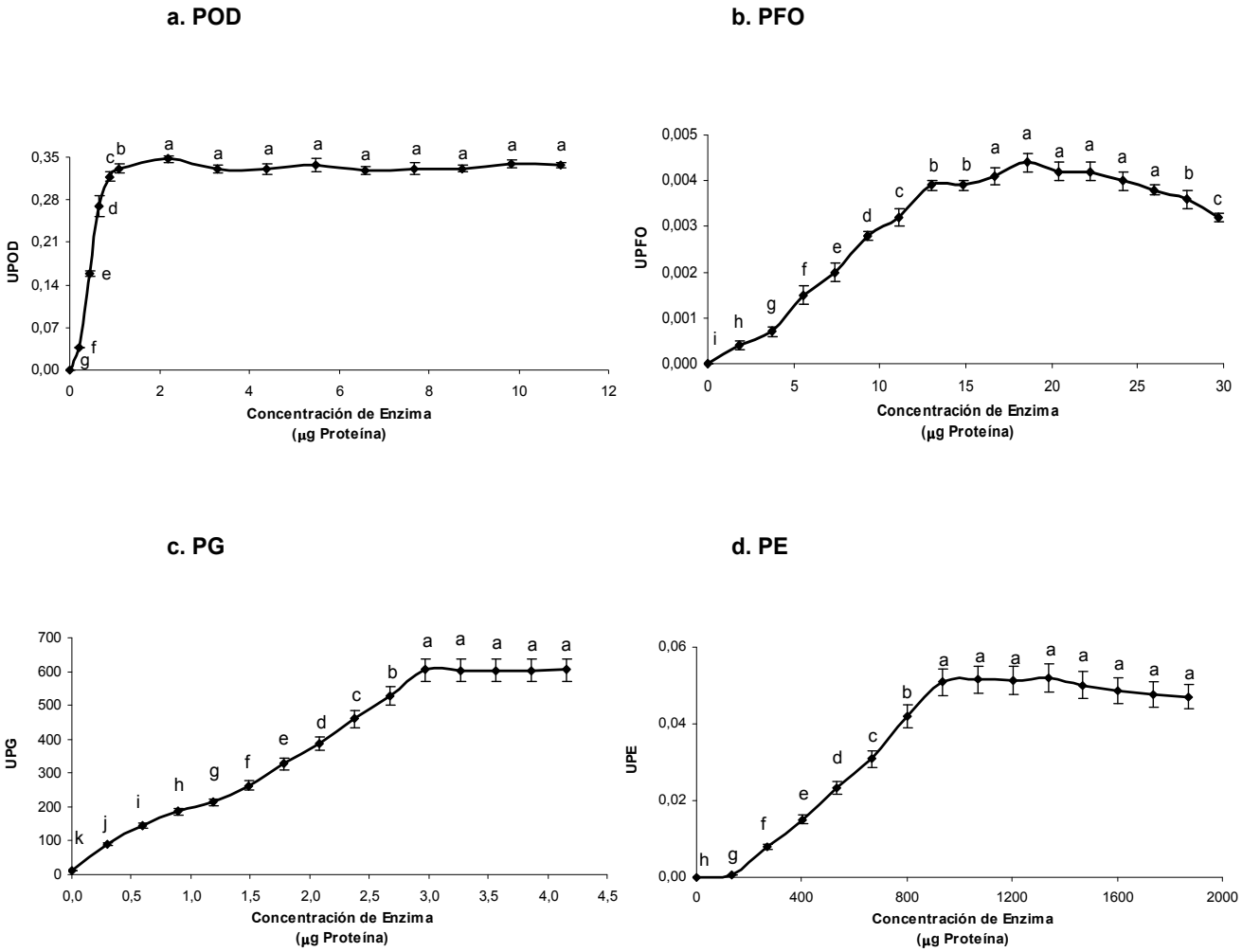
Gráfica 27. Selección de la mejor temperatura para la medida de la actividad de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

Para cada una de las enzimas, se calcularon algunas propiedades termodinámicas aparentes que permiten definir su estabilidad térmica (Marangoni 2003). En la tabla 12 se puede observar que la PFO tiene la energía de activación del proceso de desnaturalización más alta de las cuatro enzimas estudiadas (299,5 kJ/mol), indicando que esta enzima tiene una estabilidad térmica mayor a la desnaturalización que la POD, PG y PE. Este valor puede ser corroborado al observar que el Q_{10} de la PFO (número de veces que aumenta la actividad enzimática por un aumento de temperatura de 10 ºC) es el menor de todos (1,36), sugiriendo nuevamente que la PFO es la enzima menos sensible al efecto de la temperatura antes de la desnaturalización. Por otro lado, es de resaltar que aunque la PFO es térmicamente más resistente que la POD, PG y PE antes del proceso de desnaturalización, es decir, que es una enzima a la que es difícil inducirle el proceso de desnaturalización, una vez se ha iniciado este, la PFO es quien pierde más rápidamente su actividad. Esto se puede confirmar observando que la PFO no presenta ninguna actividad enzimática después de los 50 ºC, además que su temperatura media de desnaturalización (T_M), que es la temperatura a la cual la enzima ha perdido la mitad de su actividad, es la más baja de las T_M de las enzimas, revelando que la PFO es la enzima que más se resiste a comenzar la desnaturalización térmica, pero una vez se llega a la temperatura óptima, es la enzima que se desnaturaliza más rápidamente. También se pudo determinar que la PG tuvo el comportamiento contrario a la PFO, siendo la enzima térmicamente más sensible antes de la desnaturalización, pero la más resistente durante este proceso. Se estableció que la PG puede ser desnaturalizada fácilmente (energía de activación baja de 124,7 kJ/mol), además que presentó la mayor respuesta al efecto de la temperatura (Q_{10} de 2,96), pero una vez inició la desnaturalización, presentó una mayor estabilidad que las otras enzimas, teniendo una T_M alta de 55,2 ºC, desnaturalizándose completamente a los 70 ºC.

Tabla 12. Propiedades termodinámicas aparentes calculadas para las enzimas POD, PFO, PG y PE en frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

	POD	**PFO**	**PG**	**PE**
Mejor T (ºC)	35,0	35,0	35,0	40,0
T_M (ºC)	50,0	42,2	55,2	56,7
Q_{10}	1,69	1,36	2,96	1,91
E_a (kJ/mol)	138,7	299,5	124,7	124,4
ΔH_D (kJ/mol)	138,6	300,0	125,0	124,5
ΔS_D (J/mol)	429,2	952,4	381,0	378,1
Factor Pre-exponencial (A)	$2,70 \times 10^{22}$	$4,67 \times 10^{49}$	$7,12 \times 10^{19}$	$5,48 \times 10^{19}$

La mejor concentración de enzima (gráfica 28) fue establecida para asegurarse que las enzimas se encontraban completamente saturadas con sustrato y que la actividad enzimática era únicamente dependiente de la concentración de estas, es decir, que el reactivo limitante de la reacción enzimática era la enzima y no el sustrato, con el fin de asegurarse que la cinética de todas las enzimas puedan ser descrita por el modelo de Michaelis-Menten (Marangoni 2003). Se encontró que la mejor concentración de enzima fue de 25 μL (1,09 μg) para POD, 500 μL (18,55 μg) para PFO, 80 μL (2,97 μg) para PG y 2500 μL (925,13 μg) para PE. Debido a que la POD es la enzima que se satura más rápidamente y la que necesita una menor concentración de proteína (enzima activa) para alcanzar la velocidad máxima, se puede decir que la POD fue la enzima más activa debido probablemente a que presenta una constante catalítica significativamente más alta que las demás enzimas (Hiner *et al.* 2000, Hiner *et al.* 2002).

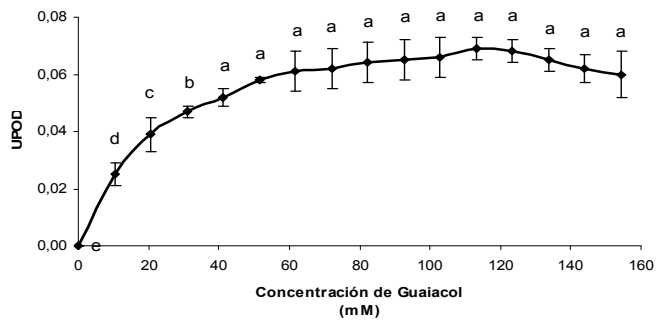


Gráfica 28. Selección de la mejor concentración de enzima para la medida de la actividad de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

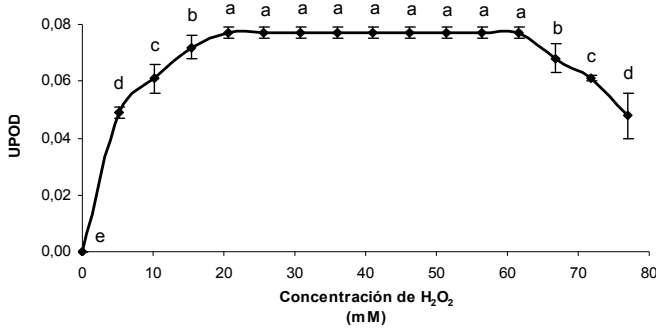
El estudio cinético de las enzimas POD, PFO, PG y PE fue realizado mediante el modelo de Michaelis-Menten (gráfica 29). Se encontró que todas las enzimas aumentaron su actividad a medida que aumentó la concentración de sustrato, hasta llegar al máximo de actividad enzimática, donde todo el sustrato ha sido completamente convertido a producto. Solamente la POD presentó inhibición con sustrato cuando la concentración de guaiacol fue superior a 120 mM y la de H_2O_2 superior a 60 mM, mientras que PFO, PG y PE no presentaron inhibición por sustrato. En la tabla 13 se pueden observar algunas propiedades cinéticas aparentes calculadas para las enzimas según el modelo de Michaelis-Menten. El análisis cinético reveló que la POD tuvo mayor afinidad por el H_2O_2 (K_m de 3,4 mM) que por el guaiacol (K_m de 22,4 mM), pero la V_{max} de la enzima fue similar con los dos sustratos (0,081 UPOD). Es de resaltar que la POD y PFO tuvieron valores de K_m similares con el sustrato de mayor afinidad (3,4 mM de H_2O_2 para POD y 3,5 mM de L-DOPA para PFO), pero la POD presentó una V_{max} 12 veces mayor que la PFO, indicando que la POD es la enzima que podría tener la mayor contribución a la actividad antioxidante del fruto de guayaba. Por otro lado, un comportamiento similar con las enzimas de ablandamiento fue observado, donde la PG y PE tuvieron valores de K_m similares (106,9 μg/mL de ácido poligalacturónico para PG y 112,4 μg/mL de pectina de guayaba para PE), pero la PG presentó una V_{max} 14500 veces mayor que la PE, indicando que la PG es la enzima que podría tener la mayor contribución al ablandamiento enzimático del fruto de guayaba. También se puede observar que todas las enzimas estudiadas tuvieron una correlación significativamente alta con el modelo de Michaelis-Menten (la correlación más baja encontrada fue de r^2 0,987 entre la POD y el H_2O_2). Para la cuantificación de la actividad enzimática de la POD, PFO, PG y PE durante el proceso de maduración del fruto de guayaba, se escogieron concentraciones de sustrato saturantes de la enzima para asegurar que las enzimas estén lo más cerca posible a la V_{max} de cada enzima. Para la POD con guaiacol se escogió una concentración de sustrato de 50 mM (2,2 K_m), 20 mM (5,9 K_m) para POD con H_2O_2, 14 mM (4,0 K_m) para PFO, 577,0 μg/mL (5,4 K_m) para PG y 346,2 μg/mL (3,1 K_m) para PE, consiguiéndose porcentajes de la velocidad máxima de cada enzima de 69,1% de POD con guaiacol, 85,7% de POD con H_2O_2, 79,9% con PFO, 84,4% con PG y 75,5% de PE.

Aunque el comportamiento cinético y termodinámico de las enzimas antioxidantes y de ablandamiento fue determinado parcialmente, es necesario realizar procesos de purificación de las enzimas para determinar las propiedades reales (en este estudio solo se determinaron parámetros aparentes ya que las enzimas no fueron sometidas a procesos de purificación y las constantes calculadas son el resultado de la interacción de todas las isoformas de las enzimas).

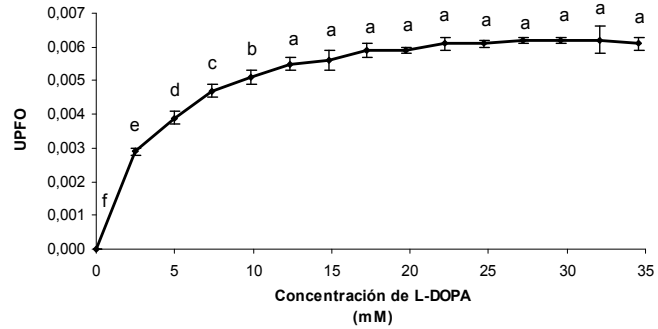
a. POD (Guaiacol)



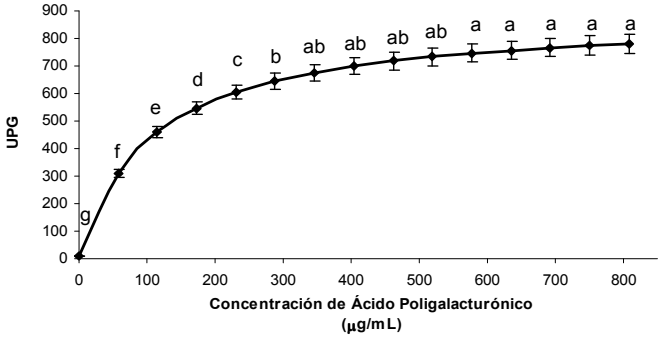
b. POD (H_2O_2)



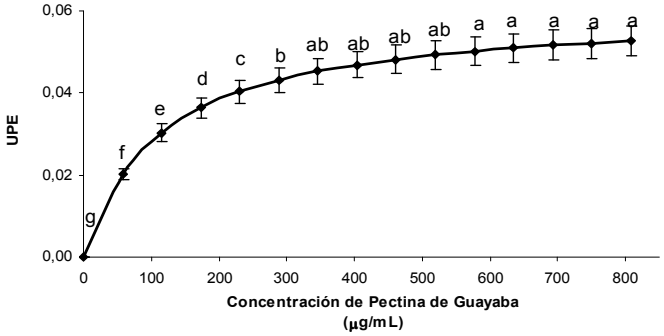
c. PFO



d. PG



e. PE

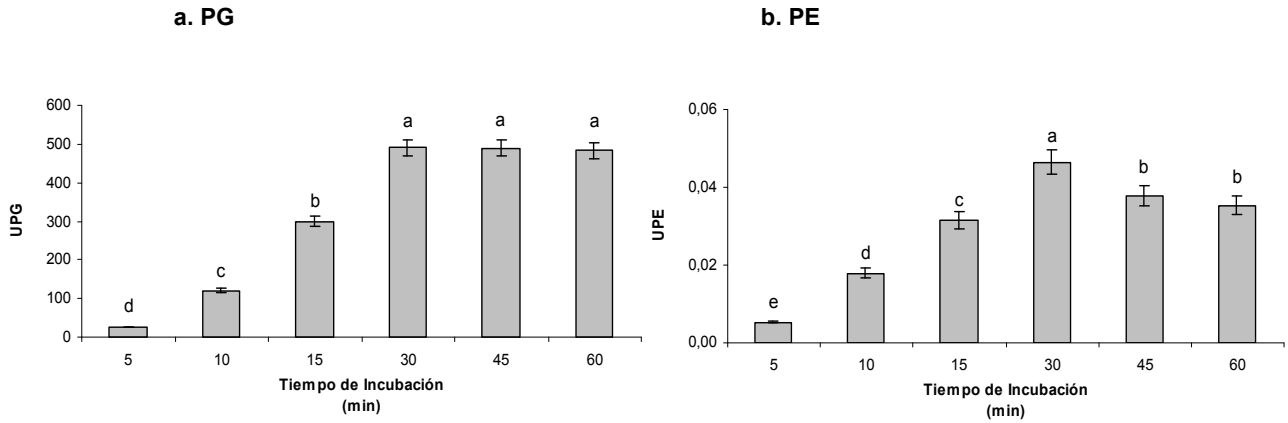


Gráfica 29. Selección de la mejor concentración de sustrato para la medida de la actividad de las enzimas POD con guaiacol (a), POD con H_2O_2 (b), PFO con L-DOPA (c), PG con ácido poligalacturónico (d) y PE con pectina de guayaba (e). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

Tabla 13. Propiedades cinéticas aparentes calculadas para las enzimas POD, PFO, PG y PE en frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

	POD (Guaiacol;H_2O_2)	PFO	PG	PE
Mejor [Sustrato]	50; 20 mM	14 mM	577,0 μg/mL	346,2 μg/mL
V_{max}	0,081; 0,084 UPOD	0,0069 UPFO	885,0 UPG	0,061 UPE
K_m	22,4; 3,4 mM	3,5 mM	106,9 μg/mL	112,4 μg/mL
Porcentaje de V_{max} (%)	69,1; 85,7	79,9	84,4	75,5
r^2 con Michaelis-Menten	0,998; 0,987	0,997	0,993	0,991

Debido a que los estudios cinéticos de la POD y PFO se realizaron mediante ensayos de punto o cinéticos (medida de la actividad enzimática a intervalos discretos de tiempo), mientras que la los estudios cinéticos de la PG y PE fueron realizados mediante ensayos de punto final (la actividad enzimática fue detenida a un determinado tiempo de reacción), fue necesario determinar el mejor tiempo de incubación (reacción) para estas enzimas. En la gráfica 30 se observa que para las enzimas PG y PE, la máxima actividad enzimática se presentó a los 30 min de reacción. A tiempos menores a 30 min, se observó para las dos enzimas que la actividad enzimática era baja, indicando que la reacción enzimática aún no había sido completada. Para la PG, después de los 30 min no se observó una disminución significativa de la actividad enzimática, mientras que para la PE se observó una disminución de la actividad entre los 30 y 60 min, indicando que la enzima PG tiene una estabilidad en el tiempo mayor que la PE. En las tablas 14 y 15 se puede encontrar un resumen de las mejores condiciones de extracción y medida de actividad de la POD, PFO (tabla 14), PG y PE (tabla 15) que serán empleadas para la evaluación de la actividad de estas enzimas durante la maduración del fruto de guayaba.



Gráfica 30. Selección del mejor tiempo de incubación para la medida de la actividad de las enzimas PG (a) y PE (b). Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

Tabla 14. Resultados de la puesta a punto de la metodología de extracción y medida de actividad de las enzimas antioxidantes POD y PFO en frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

Parámetro	POD	PFO
	EXTRACCIÓN	
Tratamiento de extracción	Maceración con N_2 líquido	Maceración con N_2 líquido
Lavados con acetona	5 Lavados (5 mL, 4 ºC)	5 Lavados (5 mL, 4 ºC)
Relación tejido:buffer	1 g : 5 mL	1 g : 5 mL
pH de extracción	Fosfatos 200 mM pH 6,0	Fosfatos 200 mM pH 6,0
Tiempo de extracción	4 horas	12 horas
	MEDIDA DE ACTIVIDAD	
Temperatura	35,0 ºC	35,0 ºC
pH de actividad	Fosfatos 200 mM pH 6,0	Fosfatos 200 mM pH 6,0
Concentración de enzima	25 μL (1,09 μg)	500 μL (18,55 μg)
Concentración de sustrato	50 mM Guaiacol, 20 mM H_2O_2	14 mM L-DOPA

Tabla 15. Resultados de la puesta a punto de la metodología de extracción y medida de actividad de las enzimas de ablandamiento PE y PG en frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

Parámetro	PG	PE
	EXTRACCIÓN	
Tratamiento de extracción	Maceración con N_2 líquido	Maceración con N_2 líquido
Lavados con acetona	4 Lavados (5 mL, 4 ºC)	4 Lavados (5 mL, 4 ºC)
Relación tejido:buffer	1 g : 5 mL	1 g : 5 mL
pH de extracción	Citratos 200 mM pH 4,5	Fosfatos 20 mM pH 7,0
Concentración de NaCl	0,10 M	0,10 M
Tiempo de Extracción	4 horas	4 horas
	MEDIDA DE ACTIVIDAD	
Tiempo de incubación	30 min	30 min
Temperatura	35,0 ºC	40,0 ºC
pH de actividad	Citratos 200 mM pH 4,5	Fosfatos 20 mM pH 7,0
Concentración de enzima	80 μL (2,97 μg)	2500 μL (935,13 μg)
Concentración de sustrato	577,0 μg/mL APG	346,2 μg/mL PG

7.5.3. Comportamiento de la actividad enzimática durante la maduración

En estudios anteriores se ha establecido que los fenómenos de ablandamiento y de pardeamiento enzimático son promovidos por la acción de las enzimas PG y PE en el caso del ablandamiento (Imsabai *et al.* 2002) y de la POD y PFO en el caso del pardeamiento enzimático (Nguyen *et al.* 2003, Aquino y Silva 2004). Una vez que las metodologías de extracción y medida de actividad de las enzimas POD, PFO, PG y PE fueron puestas a punto, se realizó la cuantificación de la actividad enzimática de estas enzimas durante el proceso de maduración del fruto de guayaba y se estableció la relación que estas enzimas tienen con el ablandamiento en el caso de PG y PE, y el pardeamiento y actividad antioxidante enzimática en el caso de PFO y POD (gráfica 31).

En el caso de las enzimas involucradas en el pardeamiento y actividad antioxidante enzimática (gráficas 31a y 31b) se observó que la POD aumentó su actividad desde 0,034 UPOD en el estado verde hasta 0,178 UPOD en el estado maduro y disminuyó hasta 0,116 UPOD en el estado senescente, mientras que la PFO aumentó su actividad desde 0,027 UPFO en el estado verde hasta 0,0070 UPFO en el estado pintón y disminuyó hasta 0,0023 y 0,0006 UPFO en los estados maduro y senescente respectivamente. Debido a que en estos estados de madurez se observó el mayor pardeamiento enzimático (gráfica 3), donde en el color de la corteza del fruto de guayaba aparecieron los colores amarillos en el estado maduro y café (pardo) en el estado senescente, característicos de las melaninas formadas (Riley 1997), y donde la capacidad antioxidante total (gráfica 6) y la concentración de compuestos fenólicos libres (gráfica 9) fue mayor, se puede sugerir que las enzimas POD y PFO están relacionadas con la capacidad antioxidante y con el pardeamiento del fruto de guayaba, además de que los compuestos fenólicos libres identificados no solo podrían estar relacionados con la capacidad antioxidante química del fruto de guayaba, sino que también podrían ser los sustratos de las enzimas POD y PFO contribuyendo también a la capacidad antioxidante enzimática del fruto de guayaba. Es de resaltar que aunque la presencia de las melaninas es una característica sensorial indeseable en los frutos que puede generar rechazo por parte del consumidor, debido a que son síntoma de estrés oxidativo asociado a la maduración y en particular del estado de senescencia del fruto, estos compuestos tienen importantes funciones de protección contra daños mecánicos, protección a la degradación de proteínas, propiedades antibióticas, foto y quimioprotección de pigmentos, entre otras, indicando que el sistema de protección antioxidante del fruto funciona con efectividad y que se ha conseguido la atenuación del efecto dañino de las ROS (Riley

1997). Por esta razón, la búsqueda de tratamientos poscosecha que permitan la conservación de las propiedades antioxidantes del fruto de guayaba durante periodos prolongados de tiempo, deben ir enfocados a encontrar el equilibrio entre la conservación de la actividad antioxidante del fruto y la atenuación en la aparición de melaninas, ya que la supresión total del pardeamiento enzimático podría causar la inefectividad del sistema antioxidante del fruto y exponer al fruto de sufrir daños irreversibles que promuevan su entrada prematura en la etapa de senescencia.

El hecho que la PFO actúe primero que la POD durante la maduración (la PFO tiene su máximo de actividad en el estado pintón, mientras que la POD lo tiene en el estado maduro), podría explicarse por medio de la hipótesis de que la POD es la enzima que tiene la mayor contribución a la actividad antioxidante enzimática del fruto de guayaba, mientras que la PFO está más relacionada con el fenómeno de pardeamiento enzimático durante la maduración. Este resultado es corroborado por las propiedades cinéticas aparentes obtenidas para cada enzima (tabla 13). Como se dijo anteriormente, la POD tiene una mayor afinidad por el H_2O_2 que por el guaiacol, y la afinidad de la POD por el H_2O_2 es similar a la afinidad de la PFO por la L-DOPA, mientras que la POD tiene una velocidad máxima 12 veces mayor que la PFO, indicando que la enzima más activa durante el proceso de maduración es la POD y por consiguiente, que esta es la enzima que más contribuye a la actividad antioxidante enzimática del fruto de guayaba, mientras que la PFO podría tener una función más importante en el proceso de pardeamiento enzimático.

En el caso de las enzimas involucradas en el ablandamiento enzimático (gráficas 31c y 31d) se observó que la PG aumentó su actividad desde 133 UPG en el estado verde hasta 494 UPG en el estado maduro y disminuyó hasta 258 UPG en el estado senescente, mientras que la PE aumentó su actividad desde 0,029 UPE en el estado verde hasta 0,051 UPE en el estado pintón y disminuyó hasta 0,038 y 0,022 UPE en los estados maduro y senescente respectivamente. Debido a que en estos estados de madurez se observó la mayor pérdida de firmeza tanto en la corteza como en la pulpa del fruto (gráfica 4), se puede sugerir que las enzimas PG y PE están relacionadas con el ablandamiento del fruto de guayaba, además de que los componentes de la fibra dietaria total, soluble e insoluble podrían ser los sustratos de las enzimas PG y PE y ser los responsables de conferirle la firmeza al fruto. Es de resaltar que el ablandamiento enzimático es una característica sensorial indeseable en los frutos que puede generar rechazo por parte del consumidor, debido a que frutos que han sufrido un ablandamiento excesivo son susceptibles a

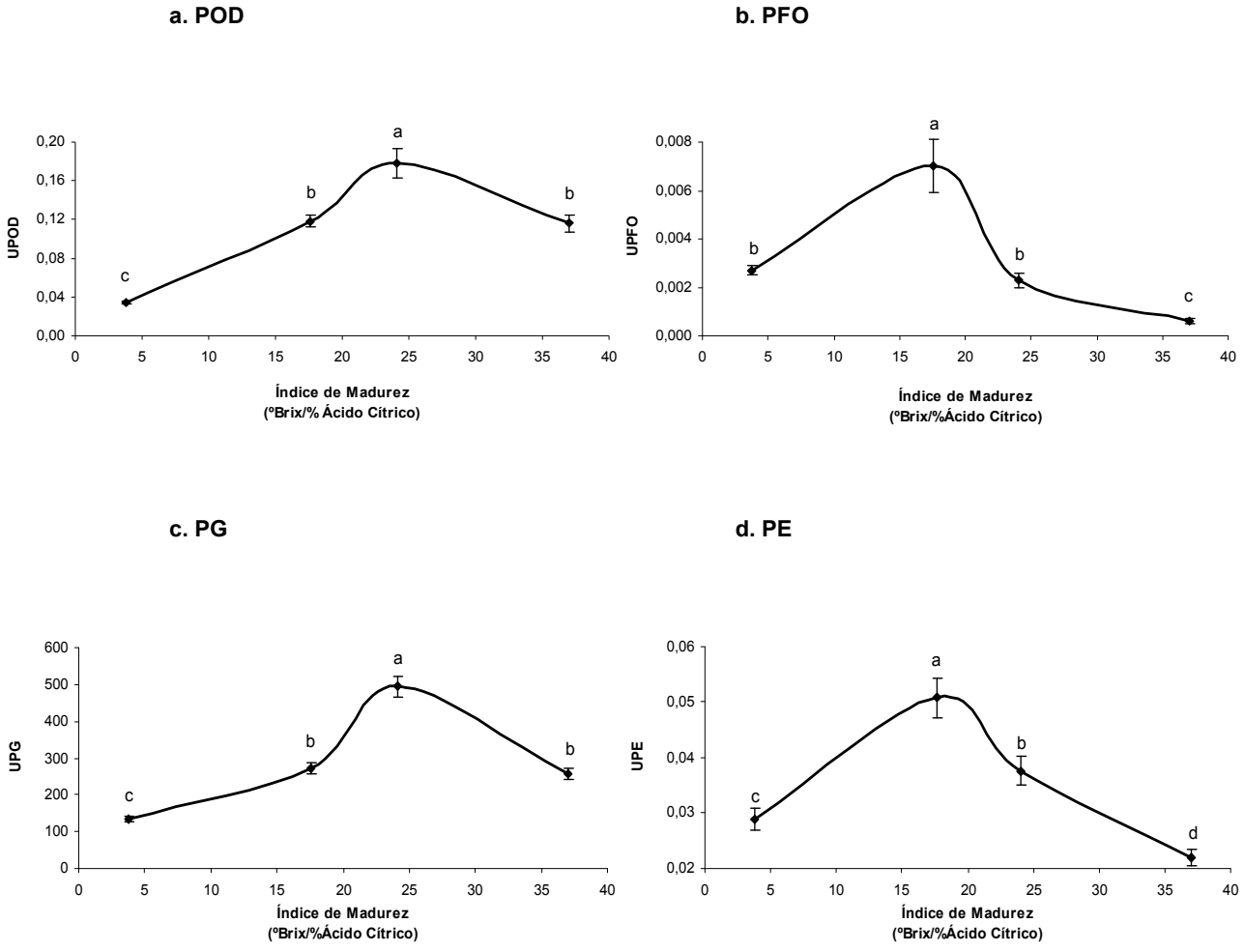
sufrir daños mecánicos importantes y recibir el ataque de patógenos (Collmer y Keen 1988). Por esta razón, la búsqueda de tratamientos poscosecha que permitan la inhibición del ablandamiento del fruto de guayaba durante periodos prolongados de tiempo, deben ir enfocados a la inactivación de las enzimas pécticas en las etapas de maduración y senescencia del fruto, ya que en estas etapas, las enzimas pécticas no presentan funciones adicionales que aporten significativamente a la calidad estructural, nutricional y funcional de fruto (Bateman y Millar 1966).

El hecho que la enzima PE actúe primero que la PG durante la maduración (la PE tiene su máximo de actividad en el estado pintón, mientras que la PG lo tiene en el estado maduro), podría explicarse por medio de la hipótesis de que la PG es la enzima que tiene la mayor contribución al ablandamiento enzimático del fruto de guayaba debido a que es quien que cataliza la reacción de despolimerización de la pectina (la que contribuye a la degradación real de la pectina), mientras que la PE está más involucrada con el proceso de aumentar la disponibilidad del ácido poligalacturónico (sustrato de la PG) en los primeros estadios de la maduración mediante la reducción del grado de metoxilación de la pectina, dejando el sustrato preparado para el posterior ataque de la PG (Beldman *et al.* 1996). Este resultado es corroborado por las propiedades cinéticas aparentes obtenidas para cada enzima (tabla 13). La afinidad de la PG por el ácido poligalacturónico es similar a la afinidad de la PE por la pectina de guayaba, pero la PG tiene una velocidad máxima 14000 veces mayor que la PE, indicando que la enzima más activa durante la maduración es la PG y por consiguiente, que esta es la enzima que más contribuye al ablandamiento enzimático del fruto, mientras que la PE podría tener una función importante en aumentar la disponibilidad de la pectina para la reacción de despolimerización por parte de la PG.

En estudios realizados anteriormente en pectinesterasa de frutos de guayaba de variedad roja Hisar Safeda (Mondal *et al.* 2009), se encontró que la actividad de la PE aumentó desde el estado verde hasta el estado pintón y disminuyó durante la etapa de maduración y senescencia del fruto, además de que esta enzima podría estar relacionada con el ablandamiento enzimático del fruto de guayaba debido a su capacidad de dejar disponible el sustrato para la acción de enzimas despolimerizantes, mientras que en estudios realizados en poligalacturonasa de frutos de guayaba de variedad blanca L-49 (Deo y Shastri 2003) se encontró que la actividad de la PG aumentó desde el estado verde hasta el estado maduro y disminuyó durante la etapa de senescencia del fruto, además de que esta enzima podría estar relacionada con el

ablandamiento enzimático del fruto de guayaba debido a su capacidad de realizar la rápida reacción de despolimerización, confirmando los resultados obtenidos en este trabajo para la guayaba variedad Palmira ICA I.

Los estudios de otras enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa) y de ablandamiento (celulasa, xilanasa y pectato-liasa) permitirían obtener una modelo más general de los fenómenos de pardeamiento y ablandamiento enzimático. El estudio de los niveles transcripcionales de expresión de estas enzimas, podrían permitir elucidar con exactitud el mecanismo de los fenómenos de pardeamiento y ablandamiento enzimático, y poder diseñar con mejores herramientas las técnicas de conservación más adecuadas para conservar el fruto de guayaba manteniendo sus valiosas propiedades funcionales.



Gráfica 31. Comportamiento de la actividad de las enzimas POD (a), PFO (b), PG (c) y PE (d) durante la maduración de la guayaba variedad Palmira ICA I. Promedio de la medida (n=3) ± 1 D.E.

7.6. Determinación de la correlación entre los compuestos y enzimas con actividad antioxidante y los distintos métodos de medida de actividad antioxidante. Correlación entre el contenido de fibra dietaria y la actividad de las enzimas de ablandamiento

La contribución relativa que cada uno de los compuestos antioxidantes tienen en la capacidad antioxidante total, ya sean sustratos (polifenoles, ácido ascórbico y carotenoides) o enzimas (POD y PFO), puede ser establecida mediante un análisis de correlación lineal. En estudios anteriores, Benzie y Szeto (1999) establecieron que la concentración de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante de un fruto, pueden correlacionarse linealmente con cada uno los métodos de cuantificación de la actividad antioxidante total. Esto significa que si un determinado metabolito tiene una contribución significativa a la capacidad antioxidante, la concentración de este metabolito debería tener una correlación lineal con la actividad antioxidante por un determinado método, y a su vez con su mecanismo antioxidante.

En la tabla 16 se pueden observar las correlaciones obtenidas entre cada método de medida de la actividad antioxidante, y la concentración de los compuestos antioxidantes identificados preliminarmente en la guayaba. En general, se puede observar que los métodos de medida de la actividad antioxidante hidrofílica se correlacionaron muy bien con los metabolitos hidrofílicos y con las enzimas (que también son de carácter hidrofílico), mientras que el método de medida de la actividad antioxidante lipofílica se correlacionó muy bien con los metabolitos lipofílicos. El análisis de correlación lineal permitió determinar que los compuestos fenólicos libres contribuyeron significativamente a los métodos de ABTS y DPPH (r^2 con ABTS de 0,990 y con DPPH de 0,833), mientras que el ácido elágico, compuesto polifenólico mayoritario identificado preliminarmente, contribuyó significativamente a la actividad antioxidante por los métodos DPPH (r^2 de 0,921) y FRAP (r^2 de 0,991). Esto indica que los compuestos polifenólicos del fruto de guayaba contribuyen significativamente a la actividad antioxidante hidrofílica y que presentan tanto el mecanismo de transferencia de electrones como el mecanismo de reducción del Fe^{+3}. Por otro lado, el ácido ascórbico correlacionó con la actividad antioxidante por los métodos DPPH (r^2 de 0,911) y ABTS (r^2 de 0,928), indicando que el ácido ascórbico también es un compuesto que contribuye a la actividad antioxidante hidrofílica del fruto de guayaba y que presenta principalmente el mecanismo de transferencia de protones. Cabe aclarar que aunque la correlación permite establecer si un determinado compuesto contribuye a la capacidad antioxidante por un determinado método, no permite establecer si un determinado compuesto contribuye más o menos que otro compuesto que también se correlacione (cualitativo).

Tabla 16. Coeficientes de correlación de Pearson (r^2) entre lo compuestos y enzimas con actividad antioxidante y las medidas de actividad antioxidante de los frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

	ABTS	DPPH	FRAP (Trolox)	FRAP ($FeSO_4$)	Decoloración β-Caroteno
Fenoles Libres	0,990	0,833	0,771	0,775	0,788
Ácido Elágico	0,690	0,921	0,992	0,991	0,988
Carotenoides Totales	0,338	0,291	0,458	0,454	0,905
(all E)-Licopeno	0,593	0,594	0,679	0,655	0,915
Ácido Ascórbico	0,928	0,911	0,895	0,897	0,688
POD	0,982	0,847	0,772	0,776	0,589
PFO	0,226	0,195	0,254	0,230	0,241

De la misma manera, los compuestos carotenoides totales contribuyeron significativamente al método de decoloración del β-caroteno (r^2 0,905), mientras que el (all E)-licopeno, compuesto carotenoide mayoritario identificado preliminarmente, también contribuyó significativamente a la actividad antioxidante por el método de decoloración del β-caroteno (r^2 0,915). Esto indica que los compuestos carotenoides del fruto de guayaba contribuyen significativamente a la actividad antioxidante lipofílica y que presentan el mecanismo de transferencia de electrones. Con respecto a las enzimas antioxidantes POD y PFO, se pudo observar que la POD tuvo una contribución significativa a los métodos hidrofílicos de medida de actividad antioxidante (r^2 de 0,982, 0,847 y 0,776 para lo métodos ABTS, DPPH y FRAP respectivamente), confirmando que la POD es una importante enzima antioxidante del fruto de guayaba y que su contribución es principalmente hidrofílica (Singh *et al.* 2010). Por otro lado, no se observó ninguna correlación entre la actividad de la PFO con ningún método de actividad antioxidante. Este resultado confirma la hipótesis planteada anteriormente de que la PFO es una enzima que está involucrada principalmente en el proceso de pardeamiento enzimático del fruto, teniendo una contribución muy pequeña a la actividad antioxidante enzimática del fruto de guayaba.

Aunque el método de correlación lineal permitió determinar que los compuestos polifenólicos, el ácido ascórbico y la enzima POD son los responsables de la actividad antioxidante hidrofílica, mientras que los compuestos carotenoides son los responsables de la actividad antioxidante lipofílica del fruto de guayaba, solo se puede determinar que la capacidad antioxidante total del fruto de guayaba es principalmente de carácter hidrofílico debido a la respuesta observada de cada uno de los métodos de medida de actividad antioxidante (gráfica 6).

De igual forma, es posible determinar la relación existente entre la actividad de las enzimas PG y PE y la concentración de la FDT, FDS y FDI con el proceso de ablandamiento enzimático del fruto de guayaba. En estudios anteriores, Nicolik y Mojovic (2007) establecieron que la concentración de la FDT, FDS y FDI pueden correlacionarse linealmente con la actividad de las enzimas involucradas en el ablandamiento. Si la fibra dietaria tiene una contribución significativa al ablandamiento enzimático, la concentración de esta debería tener una correlación lineal con la actividad de las enzimas PG y PE porque el ablandamiento (disminución de la firmeza observada en la gráfica 4) es debido en parte a la hidrólisis de la fracción péctica de la FDT por parte de las enzimas PG y PE (Dong *et al.* 2008).

En la tabla 17 se pueden observar las correlaciones obtenidas entre las actividades de las enzimas PG y PE y la concentración de la FDT, FDS y FDI del fruto de guayaba. En general, se puede observar que la actividad de la PG tiene una muy buena correlación lineal con la FDS (r^2 de 0,968), mientras que con la FDI y FDT no tuvo ninguna correlación. Este resultado era de esperarse debido a que la FDS está compuesta principalmente por pectina de bajo metoxilo, que es el sustrato de la PG, mientras que la FDI contiene pectina de alto grado de metoxilación o bien no la contiene (Nawirska y Kwasniewska 2005). No se encontró correlación entre la PG y la FDT debido a que la FDT tiene una muy baja concentración de ácidos poligalacturónicos (gráfica 18), haciéndola un sustrato inerte a la acción de la PG. Por otro lado, la actividad de la PE tuvo una buena correlación con la FDI (r^2 de 0,911) y con la FDT (r^2 de 0,934). Esto indica que la FDI tenía una alta concentración de pectina de alto metoxilo o protopectina (Worth 1967), que es el sustrato de la PE, y a medida que el fruto madura, esta pectina es desesterificada por la acción de PE para convertirla en ácido poligalacturónico, que posteriormente es despolimerizado por PG. Cabe resaltar que la alta correlación de PE con la FDT es debida al alto contenido en FDI que esta posee (gráfica 18), mientras que la baja correlación con la FDS (r^2 de 0,021) es debida a la ausencia de protopectina en esta fracción, sugiriendo que la PG es la enzima que tiene la mayor contribución al ablandamiento de la guayaba.

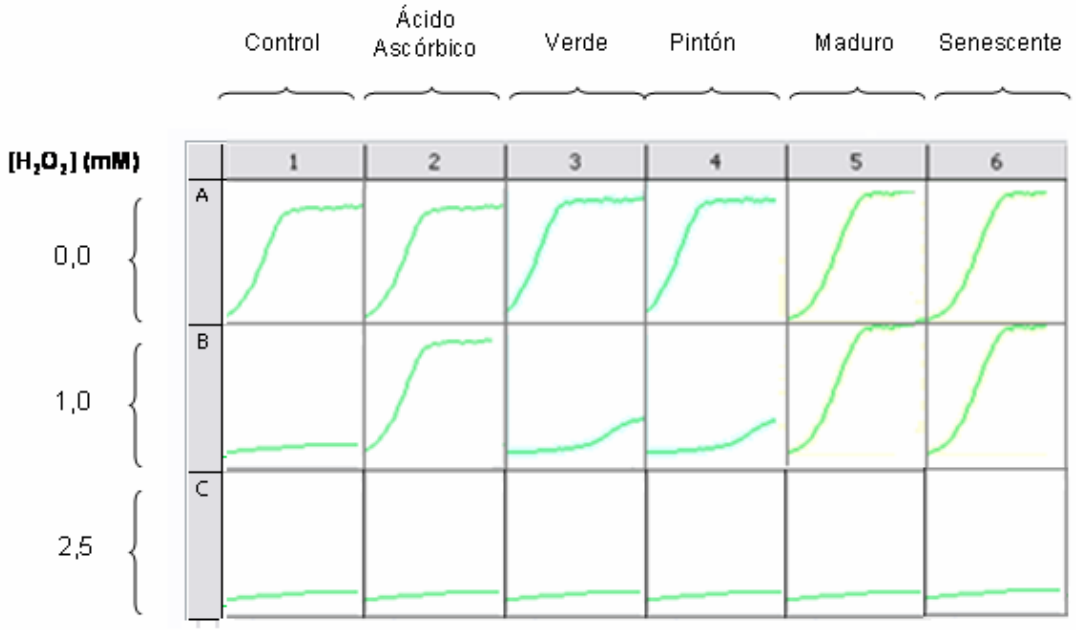
Tabla 17. Coeficientes de correlación de Pearson (r^2) entre la actividad de las enzimas de ablandamiento y la concentración de fibra dietaria de los frutos de guayaba variedad Palmira ICA I.

	Soluble (FDS)	**Insoluble (FDI)**	**Total (FDT)**
PG	0,968	0,002	0,003
PE	0,021	0,911	0,934

7.7. Ensayo de estrés oxidativo sobre la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*): actividad antioxidante celular *in vivo* de los compuestos carotenoides

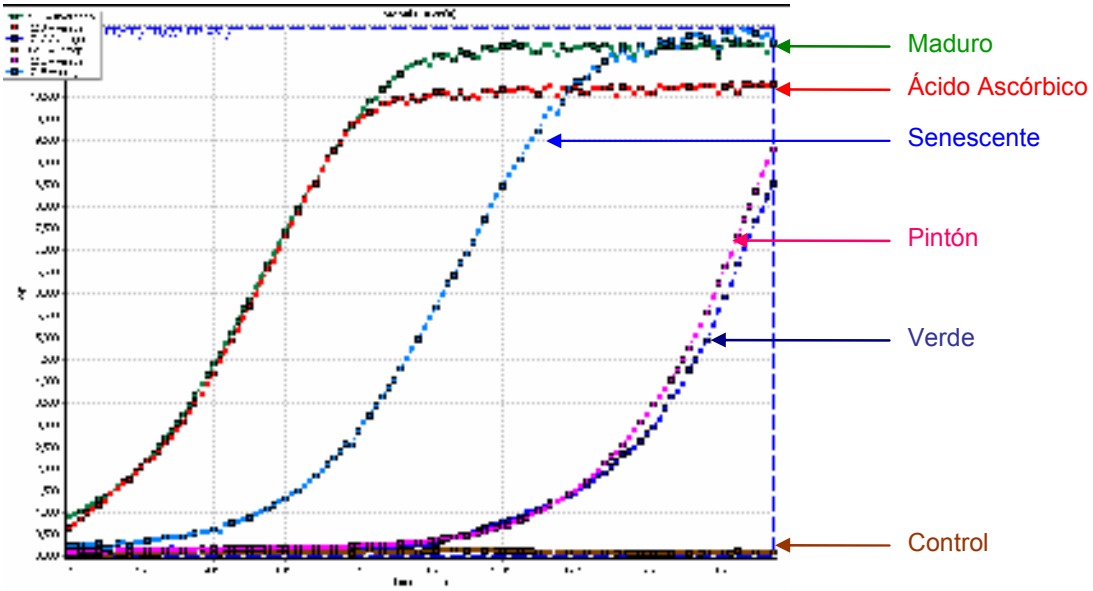
El potencial antioxidante encontrado en el fruto de guayaba variedad Palmira ICA I no solo tiene la función de proteger al fruto de guayaba en si, sino que también puede ser aprovechado como componente funcional para el consumo humano empleado contra el estrés oxidativo. Por esta razón, se planteó un experimento *in vivo* donde se evaluó la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes, específicamente los carotenoides, extraídos del fruto de guayaba en los estados verde, pintón, maduro y senescente, de promover la supervivencia de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) sometida a estrés oxidativo inducido con H_2O_2. Para realizar este experimento, se dejó crecer una cepa de levadura a la cual se le inocularon los carotenoides extraídos de la guayaba, una vez terminó su período de latencia y se dispuso a entrar en la fase de crecimiento exponencial, se le indujo el estrés oxidativo con H_2O_2 y se determinó el efecto protector que tuvieron los antioxidantes de la guayaba sobre el crecimiento de la levadura. En la gráfica 32 se observan los perfiles de crecimiento de la levadura obtenidos (se evaluó la densidad óptica a 600 nm (D.O. 600 nm) en función del tiempo de crecimiento).

En el experimento control (A), es decir, cuando la levadura creció en condiciones normales sin ser sometida a estrés oxidativo (H_2O_2 0 mM), se observó que tanto la levadura control (A1), como el control positivo (al cual se le inoculó ácido ascórbico (A2)) y a las cepas a las cuales se les inocularon los compuestos carotenoides extraídos del fruto de guayaba en los estados verde (A3), pintón (A4), maduro (A5) y senescente (A6), tuvieron un crecimiento normal (todas fueron parecidas al control (A1)), y que la inoculación de los compuestos antioxidantes no tuvieron ningún efecto en el crecimiento de la cepa de levadura. Una vez que se determinó que los compuestos antioxidantes inoculados a la levadura no alteraban su velocidad de crecimiento y que permitieron su desarrollo normal, se procedió a realizar los ensayos de estrés oxidativo. En el primer ensayo, donde a la cepa de levadura se le indujo un estrés oxidativo moderado con H_2O_2 1,0 mM (B), se observaron diferencias significativas en los perfiles de crecimiento de la levadura control con respecto a las levaduras que habían sido inoculadas con los compuestos antioxidantes. En un segundo ensayo, donde a levadura se le indujo un estrés oxidativo muy alto con H_2O_2 2,5 mM (C), se observó que ninguna de las cepas de levadura pudo crecer, sugiriendo que el estrés oxidativo inducido en este experimento fue muy alto y que inhibió por completo el crecimiento de la levadura, inclusive en el control positivo (C2) y en cepas que fueron sometidas a inoculación con los compuestos antioxidantes del fruto de guayaba (C3-C6).



Gráfica 32. Perfiles de crecimiento de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) del control (1), control positivo con ácido ascórbico (2) y con adición de los compuestos carotenoides extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I en los estados verde (3), pintón (4), maduro (5) y senescente (6) con un estrés oxidativo inducido con H_2O_2 0,0 mM (A), H_2O_2 1,0 mM (B) y H_2O_2 2,5 mM (C). Eje x (tiempo en h) y eje y (D.O. 600 nm). Promedio de las curvas (n=4).

En el único experimento que se observaron diferencias en el crecimiento de las cepas de levadura fue cuando se les indujo un estrés oxidativo moderado con H_2O_2 1,0 mM (B). Las curvas de crecimiento comparativas de la levadura en este experimento se muestran en la gráfica 33. Se encontró que la cepa de levadura control (B1), a la cual se le indujo estrés oxidativo pero no se le inocularon antioxidantes, no presentó ningún crecimiento. El control positivo, a la cual se le inoculó ácido ascórbico en una concentración 20 μg/mL (B2), presentó un crecimiento normal, indicando que se le otorgó a la levadura una protección contra el estrés oxidativo, ya sea induciendo una protección endógena o neutralizando parte del H_2O_2 adicionado (Belinha *et al.* 2007). Los resultados obtenidos para las muestras, mostraron que la levadura a la cual se le inocularon los carotenoides de la guayaba en estado verde (B3) logró inducir una pequeña protección. La protección inducida por los carotenoides aumentó desde el estado verde (B3) hasta el estado maduro (B5) y disminuyó en el estado senescente (B6). Se pudo observar que la protección inducida por los carotenoides de la guayaba en los estados maduro y senescente fue mayor que la protección inducida por el control positivo (B2).



Gráfica 33. Perfil de crecimiento de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) del control (marrón), control positivo con ácido ascórbico (rojo) y con adición de los carotenoides extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I en los estados verde (azul oscuro), pintón (rosado), maduro (verde) y senescente (azul claro) con un estrés oxidativo inducido con H_2O_2 1,0 mM (B). Promedio de las curvas (n=4).

Con el fin de determinar el efecto que tuvieron los compuestos antioxidantes del fruto de guayaba en el crecimiento de la levadura, se realizó la cuantificación del tiempo de latencia, la velocidad de crecimiento celular y la concentración celular final (gráfica 34). Debido al carácter lipofílico de los compuestos carotenoides y a su insolubilidad en el medio de cultivo YPD, se realizó una prueba inicial del efecto del solvente de inoculación de los carotenoides, sobre el crecimiento de la levadura (gráfica 34a). Para determinar el mejor solvente de inoculación, se emplearon dos solventes de extracción: cloroformo y una micela acuosa de Tritón X-100. Se observó que después de 17 h de crecimiento, la levadura que fue inoculada con cloroformo no presentó ningún crecimiento, mientras que la levadura a la que se le inoculó la micela acuosa de Tritón X-100 tuvo un crecimiento similar a la levadura control, permitiendo escoger la micela de Tritón X-100 como el mejor solvente para disolver los carotenoides extraídos de la guayaba.

El efecto que tuvieron los compuestos antioxidantes del fruto de guayaba sobre el tiempo de latencia de la levadura (tiempo necesario para que la levadura entre en la fase de crecimiento exponencial) se puede observar en la gráfica 34b. En el experimento control (inoculación de H_2O_2 0,0 mM, barras grises) se observó que la adición de los compuestos antioxidantes no tuvo

ningún efecto significativo sobre el tiempo de latencia de la levadura, pero al realizar la inoculación del H_2O_2 1,0 mM (barras blancas), el tiempo de latencia de la levadura control (sin antioxidantes) se vio sensiblemente incrementado (4 veces), revelando que el estrés oxidativo inducido sobre la levadura retrasa el período de latencia de la cepa, dificultando así su entrada en la etapa de crecimiento exponencial. Las levaduras a las cuales se les inocularon los compuestos antioxidantes de la guayaba, presentaron disminuciones en los tiempos de latencia, desde 15 h en las levaduras a las cuales se les inoculó carotenoides extraídos guayaba en estado verde, hasta 2 h en las levaduras a las cuales se les inoculó carotenoides extraídos de guayaba en estado maduro, para luego volver a aumentar hasta 7 h en las levaduras a las cuales se les inoculó carotenoides extraídos de guayaba en estado senescente. Cabe resaltar que los carotenoides extraídos de la guayaba disminuyeron los tiempos de latencia de la levadura, permitiendo que la cepa entre más fácilmente en la fase exponencial, además de que la protección inducida por los carotenoides de la guayaba en los distintos estados de madurez fue proporcional a la concentración de carotenoides totales que estos exhibieron (gráfica 14), evidenciándose que donde la concentración de carotenoides fue mayor (en los estados maduro y senescente), la disminución del tiempo de latencia fue mayor.

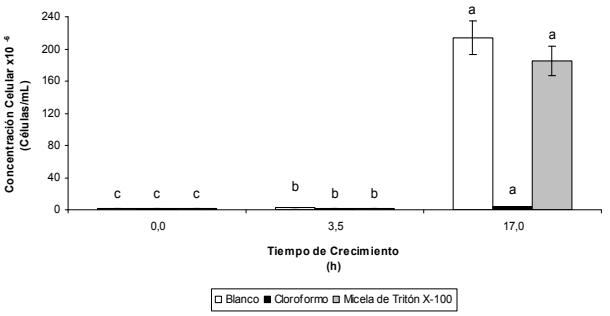
Por otro lado, el efecto que tuvieron los compuestos antioxidantes del fruto de guayaba sobre la velocidad de crecimiento celular de la levadura se puede observar en la gráfica 34c (medida en la fase exponencial). En el experimento control (inoculación de H_2O_2 0,0 mM, barras grises) se observó que la adición de los compuestos antioxidantes no tuvo ningún efecto significativo sobre la velocidad de crecimiento celular de la levadura, pero al realizar la inoculación del H_2O_2 1,0 mM (barras blancas), la velocidad de crecimiento celular de la levadura control (sin antioxidantes) se vio sensiblemente disminuida (150 veces), revelando que el estrés oxidativo inducido sobre la levadura disminuye significativamente la velocidad de crecimiento de la cepa. Las levaduras a las cuales se les inocularon los compuestos antioxidantes de la guayaba, presentaron aumentos en las velocidades de crecimiento celular, desde 20 x 10^6 células / mL*min en las levaduras a las cuales se les inoculó carotenoides extraídos guayaba en estado verde, hasta 28 x 10^6 células / mL*min en las levaduras a las cuales se les inoculó carotenoides extraídos de guayaba en los estados maduro y senescente. Cabe resaltar que los carotenoides extraídos de la guayaba aumentaron la velocidad de crecimiento celular de la levadura con respecto al control, además de que la protección inducida por los carotenoides de la guayaba en los distintos estados de madurez fue igualmente proporcional a la concentración de carotenoides totales que estos exhibieron (gráfica 14), evidenciándose que donde la

concentración de carotenoides fue mayor (en los estados maduro y senescente), la velocidad de crecimiento celular fue mayor.

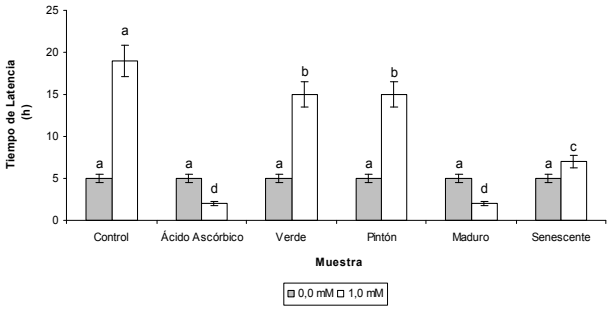
Por último, el efecto que tuvieron los compuestos antioxidantes del fruto de guayaba sobre la concentración celular de la levadura se puede observar en la gráfica 34d (medida después de la fase exponencial). En el experimento control (inoculación de H_2O_2 0,0 mM, barras grises) se observó que la adición de los compuestos antioxidantes no tuvo ningún efecto significativo sobre la concentración celular de la levadura, pero al realizar la inoculación del H_2O_2 1,0 mM (barras blancas), la concentración celular de la levadura control (sin antioxidantes) se vio sensiblemente disminuida (24 veces), revelando que el estrés oxidativo inducido sobre la levadura disminuye significativamente la concentración final de la cepa. Las levaduras a las cuales se les inocularon los compuestos antioxidantes de la guayaba, presentaron aumentos en las concentraciones celulares finales, desde 255 x 10^6 células / mL en las levaduras a las cuales se les inoculó carotenoides extraídos guayaba en los estados verde y pintón, hasta 350 x 10^6 células / mL en las levaduras a las cuales se les inoculó carotenoides extraídos de guayaba en los estados maduro y senescente. Cabe resaltar que los carotenoides extraídos de la guayaba permitieron aumentar la concentración celular de la levadura con respecto al control, además de que la protección inducida por los carotenoides de la guayaba en los distintos estados de madurez fue también proporcional a la concentración de carotenoides totales que estos exhibieron (gráfica 14), evidenciándose que donde la concentración de carotenoides fue mayor, en los estados maduro y senescente, el crecimiento celular fue mayor.

Aunque la metodología para la determinación del efecto protector que tienen los compuestos antioxidantes extraídos de la guayaba sobre la inhibición de la muerte celular de la levadura inducida por estrés oxidativo permitió evidenciar el efecto benéfico de dichos compuestos, es necesario realizar estudios con mayor profundidad para poder elucidar el mecanismo de protección inducido. Por ejemplo, la inoculación de los antioxidantes hidrofílicos como los polifenoles y la evaluación del efecto de la composición de los extractos sobre la protección inducida a la levadura, permitirá tener una idea más acertada con respecto al mecanismo de protección inducido por los compuestos antioxidantes. Igualmente, la determinación de los cambios transcriptómicos de las principales vías metabólicas asociadas al crecimiento de la levadura, permitirá establecer si los compuestos antioxidantes adicionados activan o desactivan vías genéticas asociadas a la protección de la levadura, o si el mecanismo de protección consiste únicamente en la neutralización del H_2O_2 inoculado en el medio.

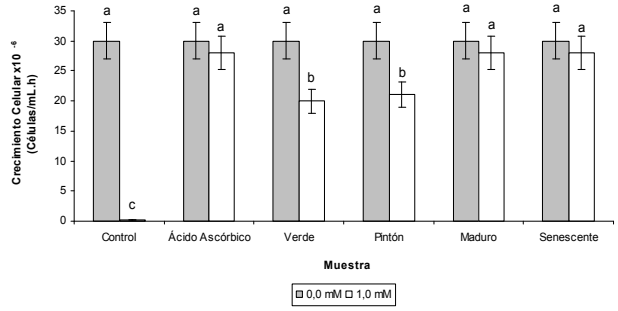
a. Selección del solvente de extracción



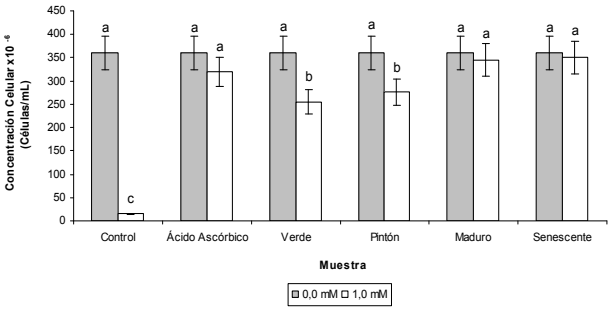
b. Tiempo de latencia



c. Crecimiento celular



d. Concentración celular



Gráfica 34. Influencia del solvente de extracción de los compuestos carotenoides (a) sobre el crecimiento de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Influencia de los compuestos carotenoides extraídos del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I en los estados de madurez verde, pintón, maduro y senescente sobre el tiempo de latencia (b), crecimiento celular (c), y concentración celular final (d) de la levadura con un estrés oxidativo inducido con H_2O_2 0,0 mM y H_2O_2 1,0 mM. Promedio de las medidas (n=4) ± 1 D.E.

8. CONCLUSIONES

Se verificó que el fruto de guayaba variedad Palmira ICA I, tiene un patrón respiratorio climatérico, encontrándose el máximo climatérico en el estado maduro (20 ºBrix/% ácido cítrico).

El cambio de color en la corteza presenta un cambio más significativo que el cambio de color en la pulpa durante la madurez de la fruta. La pulpa siempre se mantuvo de color rojo debido a la presencia de licopeno y su intensidad aumentó a lo largo del proceso de maduración.

La capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica del fruto de guayaba Palmira ICA I, aumentó hasta el estado maduro y disminuyó durante la etapa de senescencia del fruto por todos lo métodos de medida de actividad antioxidante empleados.

Debido a que los métodos FRAP y ABTS presentaron las mayores respuestas a la actividad antioxidante, se estableció que la capacidad antioxidante del fruto de guayaba es principalmente de carácter hidrofílico.

La concentración de ácido ascórbico, fenoles y carotenoides totales aumentó a lo largo de todo el proceso de maduración y disminuyó durante la etapa de senescencia del fruto.

El ácido elágico, la morina y la quercetina son los principales compuestos polifenólicos, mientras que el licopeno es el principal compuesto carotenoide del fruto de guayaba (identificados preliminarmente), indicando que éstos compuestos, junto al ácido ascórbico, podrían contribuir significativamente a la capacidad antioxidante del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I.

El mejor buffer de extracción y medida de actividad para las enzimas POD y PFO fue de buffer fosfatos 200 mM pH 6,0, mientras que para la enzima PG fue el buffer citratos 200 mM pH 4,5 y para PE fue el buffer fosfatos 20 mM pH 7,0. Los diagramas de distribución de especies de las enzimas mostraron que la POD y PE son enzimas muy activas en un rango de pH más amplio que las enzimas PFO y PG.

El mejor tiempo de extracción para las enzimas POD, PG y PE fue de 4 horas, mientras que para la PFO fue de 12 h. El mejor tiempo de reacción para las enzimas PG y PE fue de 30 minutos.

El mejor aditivo de extracción de las enzimas PG y PE fue el NaCl 0,10 M, indicando que estas enzimas se encuentran enlazadas principalmente de manera iónica a la pared celular de las células de la guayaba.

La mejor temperatura de medida de actividad para las enzimas POD, PFO y PG fue de 35 ºC, mientras que para la PE fue de 40 ºC. La alta energía de activación del proceso de desnaturalización térmico y el bajo valor de Q_{10} obtenido para la PFO indican que ésta enzima es térmicamente muy estable, mientras que la PG es una enzima muy sensible a la temperatura.

La mejor concentración de enzima de la POD fue de 25 μL (1,09 μg), de la PFO fue de 500 μL (18,55 μg), de la PG fue de 80 μL (2,97 μg) y de la PE fue de 2500 μL (935,13 μg), indicando que los extractos enzimáticos más activos fueron los de POD y PG, mientras que los de PFO y PE fueron los menos activos.

El modelo de Michaelis-Menten se correlacionó con la cinética de las enzimas POD, PFO, PG y PE. Se encontró que la POD tiene una mayor afinidad por el H_2O_2 que por el guaiacol, además que la afinidad de la PFO por el L-DOPA es similar a la afinidad de la POD por el H_2O_2, pero la velocidad máxima de la POD es cerca de 10 veces mayor que la de PFO, indicando que la POD es la enzima que tiene una mayor contribución relativa a la actividad antioxidante enzimática del fruto de guayaba.

La actividad enzimática de la PFO aumentó durante los estados verde y pintón y disminuyó durante los estados maduro y senescente, mientras que la actividad de la POD aumentó hasta el estado maduro y disminuyó durante la senescencia, confirmando que la POD es la enzima que tiene una mayor contribución relativa a la actividad antioxidante enzimática, mientras que la PFO contribuye significativamente al pardeamiento enzimático del fruto de guayaba.

La actividad enzimática de la PE aumentó durante los estados verde y pintón y disminuyó durante los estados maduro y senescente, mientras que la actividad de la PG aumentó hasta el

estado maduro y disminuyó durante la senescencia (período donde se observó la mayor disminución del fruto), confirmando que la PG es la enzima que tiene una mayor contribución relativa al ablandamiento enzimático del fruto de guayaba.

Los compuestos fenólicos libres y los ácidos elágico y ascórbico tuvieron una alta correlación con los métodos de actividad antioxidante hidrofílica, mientras que los carotenoides totales y el licopeno tuvieron una alta correlación con el método de actividad antioxidante lipofílica (método de decoloración del β-caroteno). La enzima POD tuvo una alta correlación con el método de actividad antioxidante hidrofílica ABTS, mientras que la PFO no se correlacionó con ningún método de actividad antioxidante, evidenciando que los compuestos polifenólicos, el ácido ascórbico y la POD contribuyen significativamente a la actividad antioxidante hidrofílica, mientras que los compuestos carotenoides contribuyen significativamente a la actividad antioxidante lipofílica.

Los compuestos carotenoides extraídos de la guayaba variedad Palmira ICA I en los estados maduro y senescente (donde la concentración de carotenoides totales fue mayor) tuvieron mayor capacidad de promover la supervivencia de la cepa de levadura sometida a estrés oxidativo. Los compuestos carotenoides extraídos de la guayaba en los estados verde y pintón tuvieron una menor capacidad de promover la supervivencia de la cepa debido a que en estos estados de maduración la concentración de carotenoides totales fue menor).

Se encontró que los carotenoides de la guayaba evitan el aumento del tiempo de latencia de levadura sometida a estrés oxidativo, además de evitar la disminución del crecimiento y la concentración celular final, sugiriendo que los carotenoides extraídos de la guayaba indujeron a la levadura una protección contra el estrés oxidativo.

El fruto de guayaba sufrió un marcado proceso de ablandamiento en los estados maduro y senescente, siendo el ablandamiento de la pulpa mayor que el ablandamiento de la corteza.

La concentración de fibra dietaria total e insoluble aumentó a lo largo de todo el proceso de maduración y disminuyó durante la etapa de senescencia del fruto. La fibra dietaria de la guayaba es principalmente de carácter insoluble, indicando que su composición está basada principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina.

La afinidad que tienen la PG y PE por sus respectivos sustratos son similares, pero la velocidad máxima de la PG es cerca de 14000 veces mayor a la de la PE, indicando que el proceso de ablandamiento enzimático de la guayaba es promovido principalmente por la PG.

La actividad enzimática de la PG tuvo una alta correlación con la concentración de la fibra dietaria soluble (donde se encuentra la mayor concentración de pectina) mientras que la PE se correlacionó con la concentración de la fibra dietaria insoluble (que tiene poco contenido de pectina), confirmando que la enzima PG es la enzima que presenta una mayor contribución al proceso de ablandamiento enzimático de la guayaba.

El fruto de guayaba variedad Palmira ICA I en el estado maduro presentó las mejores características funcionales (alta capacidad antioxidante y contenido de fibra dietaria), siendo este el estado de madurez óptimo de consumo del fruto en fresco o como posible fuente natural de antioxidantes y fibra dietaria para ser empleados en alimentos funcionalmente menos favorecidos.

9. RECOMENDACIONES

Realizar un ensayo de almacenamiento controlado para simular el proceso de maduración real del fruto y poder determinar exactamente la influencia de la capacidad antioxidante total y del ablandamiento en la maduración y senescencia del fruto de guayaba variedad Palmira ICA I, incluyendo tratamientos de conservación poscosecha como tratamientos térmicos (temperatura ambiente, refrigeración y choque térmico), atmósferas modificadas (O_2 y CO_2) y controladas (etileno, carburo de calcio y 1-metil-ciclopropeno) con el fin de establecer el mejor tratamiento que permita la conservación de la actividad antioxidante y la inhibición del pardeamiento y ablandamiento enzimático durante la maduración, aumentando la vida útil y conservando las óptimas características funcionales y sensoriales del fruto de guayaba.

Realizar la purificación de las enzimas POD, PFO, PG y PE por cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño para determinar las constantes cinéticas, de pH y termodinámicas reales de cada enzima, y determinar cuales isoformas están involucradas en los procesos de actividad antioxidante, ablandamiento y pardeamiento enzimático. Aislar y purificar los compuestos polifenólicos y carotenoides responsables de la actividad antioxidante del fruto de guayaba y confirmar su identidad por estudios de elucidación estructural por las técnicas de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

Cuantificar la concentración de algunas especies reactivas del oxígeno (ROS) y establecer la relación que estas tienen con la actividad antioxidante y el pardeamiento enzimático durante la maduración y senescencia del fruto de guayaba.

Establecer la capacidad que tiene la actividad antioxidante de la guayaba de prevenir la oxidación de moléculas de importancia biológica para el hombre como las lipoproteínas LDL y HDL y establecer la viabilidad de poder incluir los antioxidantes extraídos de este fruto como suplementos funcionales en alimentos de consumo diario.

Cuantificar los niveles transcripcionales de los genes que codifican la síntesis de las enzimas POD, PFO, PG y PE, así como los genes involucrados en la síntesis de los compuestos volátiles, polifenólicos, carotenoides y vitamina C para poder establecer su expresión durante la maduración y la influencia que tienen los diferentes tratamientos poscosecha sobre su expresión.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Bakr, A.; Abu-Goukh, T.; Bashir-Hind, A. **2003**. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripeninig. *Food Chemistry*. 83: 213-218.

Ali, Z.M.; Chin, L.H.; Lazan, H. **2004**. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*. 167: 317-327.

Alquezar, B.; Rodrigo, M.J.; Zacarías, L. **2008**. Regulation of carotenoid biosynthesis during maturation in the red fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry*. 69: 1997-2007.

Alquezar, B.; Rodrigo, M.J.; Zacarías, L. **2008(a)**. Carotenoid biosynthesis and their regulation in citrus fruits. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. 2(1): 23-37.

Altunkaya, A.; Gokmen, V. **2008**. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chemistry*. 107: 1173-1179.

AOAC Official Method 985.29. **1995**. Total dietary in foods enzymatic-gravimetric method. *Official Methods of Analysis*. 16th edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.

AOAC Official Method 991.42. **1995**. Insoluble dietary fiber in food and food products enzymatic-gravimetric method, phosphate buffer. *Official Methods of Analysis*. 16th edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.

AOAC Method 991.43. **1995**. Total, insoluble and soluble dietary fiber in food enzymatic-gravimetric method, tris-HCl buffer. *Official Methods of Analysis*. 16th edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Aquino-Bolaños, E.N.; Mercado-Silva, E. **2004**. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Postharvest Biology and Technology*. 33: 275-283.

Arancibia, P.; Toledo, F.; Park, Y.; Jung, S.; Kang, S.; Heo, B.; Lee, S.; Sajewicz, M.; Kowalska, T.; Gorinstein, S. **2008**. Antioxidant properties of durian fruit as influenced by ripening. *Food Science and Technology*. 41: 2118-2125.

Arbaisah, S.M.; Asbi, B.A.; Junainah, A.H.; Jamilah, B. **1996**. Determination of optimum conditions for pectinesterase extraction from soursop fruit (*Anona muricata*) using response surface methodology. *Food Chemistry*. 55(3): 289-292.

Arrigoni, O.; De Tullio, M.C. **2002**. Ascorbic acid: much more than an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1569: 1-9.

Arslan, O.; Erzengin, M.; Sinan, S.; Ozensoy, O. **2004**. Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetics and electrophoretic properties. *Food Chemistry*. 88: 479-484.

Arya, S.P.; Mahajan, M.; Jain, M.M. **2000**. Non spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. *Analytica Chimica Acta*. 417: 1-14.

Ayala, F.; Wang, S.; Wang, C.; González, G. **2004**. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensmmittel Wissenschaft Technology*. 37: 687-695.

Ayaz, F.; Demir, O.; Torun, H.; Kolcouglu, A.; Colak, A. **2008**. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic content in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*. 106: 291-298.

Ballester, A.R.; Izquierdo, A.; Lafuente, M.T.; González-Candelas, L. **2010**. Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 56: 31-38.

Baquero-Duarte, L.E.; Castro-Rivera, J.A.; Narváez-Cuenca, C.E. **2005**. Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. *Acta Biológica Colombiana*. 10(2): 49-60.

Barros, L.; Ferreira, M.J.; Queiros, B.; Ferreira, I.C.; Baptista, P. **2007**. Total phenols, ascorbic acid, β-carotene and lycopene in portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 103: 413-419.

Bashir, H.A.; Bakr, A.; Goukh, A. **2003**. Compositional changes during guava fruit ripening. *Food Chemistry*. 80: 557-563.

Bassetto, E.; Jacomino, A.P.; Pinheiro, A.L.; Kluge, R.A. **2005**. Delay of ripening of Pedro Sato guava with 1-methylciclopropene. *Postharvest Biology and Technology*. 35: 303-308.

Bateman, D.F.; Millar, R.L. **1966**. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annual Reviews of Phytopathology*. 4: 119-144.

Batu, A. **2004**. Determination of acceptable firmness and colour values of tomatoes. *Journal of Food Engineering*. 61: 471-475.

Beldman, G.; Mutter, M.; Searle-van Leeuwen, M.J.; van der Broek, L.A.; Schols, H.A.; Voragen, A.J. **1996**. New enzymes active towards pectic estructures. *Progress in Biotechnology*. 14: 231-245.

Belinha, I.; Amorim, M.A.; Rodrígues, P.; De Freitas, P.; Moradas-Ferreira, P.; Mateus, N.; Costa, V. **2007**. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 2446-2451.

Benzie, I.F.; Strain, J.J. **1996**. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.

Benzie, I.F.; Szeto, Y.T. **1999**. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 633-636.

Bhande, S.; Ravindra, M.; Goswami, T. **2008**. Respiration rate of banana fruit under aerobic conditions at different storage temperatures. *Journal of Food Engineering*. 87: 116-123.

Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. **1997**. Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *Lebensmmittel Wissenschaft Technology*. 30: 609-615.

Bonghi, C.; Pagni, S.; Vidrih, R.; Ramina, A.; Tonutti, P. **1996**. Cell wall hydrolases and amylase in kiwi fruit softening. *Postharvest Biology and Technology*. 9: 19-29.

Bower, J.H.; Jobling, J.J.; Patterson, B.D.; Ryan, D.J. **1998**. A method for measuring the respiration rate and respiratory quotient of detached plant tissues. *Postharvest Biology and Technology*. 13: 263-270.

Brand, W.; Cuvulier, M.; Berset, C. **1995**. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmmittel Wissenschaft Technology*. 28: 25-30.

Brookfield, P.; Murphy, P.; Harker, R.; MacRae, E. **1997**. Starch degradation and starch pattern indices: interpretation and relationship to maturity. *Postharvest Biology and Technology*. 11: 23-30.

Calegario, F.; Cosso, R.; Almeida, F.; Vercesi, A. **2001**. Determination of the respiration rate of tomato fruit using for analysis. *Postharvest Biology and Technology*. 22: 249-256.

Carabalí-Miranda, I.L.; Narváez-Cuenca, C.E.; Restrepo-Sánchez, L.P. **2009**. Extracción y medida de actividad de pectin metil estearasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), enzima relacionada con el ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana*. 14(2): 73-82.

Carreño, J.; Martínez, A.; Almela, L.; Fernández-Lopez, J.A. **1995**. Proposal of an index for the objective evaluation of the colour of red table grapes. *Food Research International*. 28(4): 373-377.

Castellari, M.; Matricardi, L.; Arfelli, G.; Rovere, P.; Amati, A. **1997**. Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts. *Food Chemistry*. 60: 647-649.

Celik, H.; Ozgen, M.; Serce, S.; Kaya, C. **2008**. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at tour maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae*. 117: 345-348.

Chen, H.; Yen, G. **2007**. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*. 101: 686-694.

Chen, X.; Fan, J.; Yue, X.; Wu, X.; Li, L. **2008**. Radical scavenging and phenolic compouds in Persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan). *Journal of Food Science*. 73: 24-28.

Collmer, A.; Keen, N.T. **1986**. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Reviews of Phytopathology*. 24: 383-409.

Concellon, A.; Añon, M.; Chaves, A. **2004**. Characterization and changes in polyphenoloxidase from eggplantfruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. *Food Chemistry*. 88: 17-24.

Dalton, D.A.; Russell, S.A.; Hanus, F.J.; Pascoe, G.A.; Evans, H.J. **1986**. Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 83: 3811-3815.

Degl`innocenti, E.; Pardossi, A.; Tognoni, F.; Guido, L. **2007**. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in Lettuce, Escarole and Rocket Salad when stores as fresh cut products. *Food Chemistry*. 104: 209-215.

Deo, A.; Shastri, N.V. **2003**. Purification and characterization of polygalacturonase inhibitory proteins from *Psidium guajava* Linn. (guava) fruit. *Plant Science*. 164: 147-156.

DeVries, J.W.; Prosky, L.; Li, B.; Cho, S. **2005**. Historical perspective as a guide for identifying and developing applicable methods for dietary fiber. *Journal of AOAC International*. 88(5): 1349-1366.

Derat, E.; Shaik, S. **2006**. The Poulos-Kraut mechanism of compound I formation in horseradish peroxidase: A QM/MM study. *Journal of Physical Chemistry B*. 110: 10526-10533.

Dong, T.; Xia, R.; Wang, M.; Xiao, Z.; Liu, P. **2008**. Changes in dietary fiber, polygalacturonase, cellulase of navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck Cara Cara) fruits under different storage condition. *Scientia Horticulturae*. 116: 414-420.

Dogan, S.; Turan, P.; Dogan, M. **2006**. Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *thymbra spicata* L. var. *spicata*. *Process Biochemistry*. 41: 2379-2385.

Duan, X.; Cheng, G.; Yang, E.; Yi, C.; Ruenroengklin, N.; Lu, W.; Luo, Y.; Jiang, Y. **2008**. Modification of pectin polysaccharides during ripening of postharvest of banana fruit. *Food Chemistry*. 111: 144-149.

Duprat, F.; Grotte, M.G.; Pietri, E.; Studman, C.J. **1995**. A multi purpose firmness tester for fruits and vegetable. *Computers and Electronics in Agriculture*. 12: 211-223.

El-Bulk, R.E.; Babiker, E.F.; El-Tinay, A.H. **1997**. Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. *Food Chemistry*. 59(3): 395-399.

El-Buluk, R.E.; Babiker, E.E.; El-Tinay, A.H. **1995**. Biochemical and physical changes in fruits of four guava cultivars during growth and development. *Food Chemistry*. 54: 279-282.

Espin, J.; Morales, M.; Varon, R.; Tudela, J.; García, F. **1995**. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolse activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 231: 237-246.

Espin, J.; Tudela, J.; García F. **1997**. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke heads (*Cynara scolymus* L.). *Lebensmmittel Wissenschaft Technology*. 30: 819-825.

Fayyaz, A.; Sabih, B.M Ghazali, H.; Che Man, Y.; Jinap, S. **1995**. Stability studies of papaya pectinesterasa. *Food Chemistry*. 53: 391-396.

Fonseca, S.C.; Oliveira, F.A.; Brecha, J.K. **2002**. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *Journal of Food Engineering*. 52: 99-119.

Food and Agriculture Organization (FAO). http://www.fao.org/ae620s/pfrescos/guayaba.html (Consultada el 22 de Octubre de 2008).

Franck, C,; Lammertyn, J.; Ho, Q.; Verboven, P.; Verlinden, B.; Nicolai, B. **2007**. Browing disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 43: 1-13.

Galisteo, M.; Duarte, J.; Zarzuelo, A. **2008**. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 19: 71-84.

García-Galvis, J. **2009**. Evaluación de los diferentes estados de madurez y análisis del contenido de fibra dietaria en tres distintas variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Tesis de Maestría en Ciencias Química*. Universidad Nacional de Colombia.

García, A.; Suthanthangjai, W.; Kajda, P.; Zabetakis, I. **2004**. The effects of high hydrostatic pressure on β-galactosidase, peroxidase and polyphenol oxidase in red raspberry (*Rubus iaeus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*). *Food Chemistry*. 88: 7-10.

Garrott, D.J.; Johnson, D.L.; Rubis, D.D.; Dill, G.M. **1981**. Extraction of rubber from guayule using liquid nitrogen. *Analytical Chemistry*. 53(3): 543-544.

Geigenberger, P. **2003**. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 247-256.

Goodwin, D.; Hertwig, K. **2003**. Peroxidase catalyzed oxidation of capsaicinoids: steady state and transient state kinetic studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 417: 18-26.

Goulao, L.F.; Oliveira, C.M. **2008**. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science and Technology*. 19: 4-25.

Green, F.; Clausen, C.A.; Highley, T.L. **1989**. Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing sugar assay to a microassay using microtiter plates. *Analytical Biochemistry*. 182: 197-199.

Hiner, A.N.; Rodríguez-López, J.N.; Arnao, M.B.; Lloyd-Raven, E. **2000**. Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*. 348: 321-328.

Hiner, A.N.; Raven, E.L; Thorneley, R.N.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J.N. **2002**. Mechanism of compound I formation in heme peroxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 91: 27-34.

Hodge, D.B.; Karim, N.M.; Schell, D.J.; McMillan, J.D. **2008**. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource Technology*. 99: 8940-8948.

Holden, C. **1994**. Antioxidants and longevity. *Science*. 263(5150): 1094-1095.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. **2005**. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6): 1841-1856.

ICONTEC. **1970**. Guayaba. *Norma Técnica Colombiana.* NTC 1263.

ICONTEC. **1999**. Productos de frutas y verduras. Determinación de la acidez titulable. *Norma Técnica Colombiana.* NTC 4623.

ICONTEC. **1999**. Jugos de frutas y hortalizas. Determinación del contenido de sólidos solubles. Método refractométrico. *Norma Técnica Colombiana.* NTC 4624.

Ilg, A.; Beber, P.; Al-Babil, S. **2009**. Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranial biosynthesis. *The FEBS Journal*. 276: 736-747.

Imsabai, W.; Ketsa, S.; van Doorn, W.G. **2002**. Effect of temperature on softening and the activities of polygalacturonase and pectinesterase in durian fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 26: 347-351.

Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF). Tabla de composición de alimentos colombianos.http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/principal_alimento.asp?id_alimento=1150&enviado3=1 (Consultada el 24 de Abril de 2010).

Jain, N.; Dhawan, K.; Malhotra, S.; Singh, R. **2003**. Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): compositional and enzymatic changes. *Plant Foods for Human Nutrition*. 58: 309-315.

Javanmardi, J.; Kubota, C. **2006**. Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*. 41: 151-155.

Jenkins, D.J.; Marchie, A.; Augustin, L.S.; Ros, E.; Kendall, C.W. **2004**. Viscous dietary fibre and metabolic effects. *Clinical Nutrition Supplements*. 1: 39-49.

Jiménez-Escrig, A.; Rincón, M.; Pulido, R.; Saura-Calixto, F. **2001**. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 5489-5893.

Kang, J.H.; Kondo, F.; Katayama, Y. **2006**. Importance of control of enzymatic degradation for determination of bisphenol A from fruits and vegetables. *Analytica Chimica Acta*. 555: 114-117.

Ketsa, S.; Atantee, S. **1998**. Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. *Postharvest Biology and Technology*. 14: 117-124.

Kumar, V.; Kishor, T.; Murugan, K. **2008**. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados Cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry*. 110: 328-333.

Lebeda, A.; Kirstkova, E.; Dolezal, K. **1999**. Peroxidase isozyme polymosphism in *cucurbita pepo* cultivars with various morphotypes and different level of field resistance to powdery mildew. *Scientia Horticulturae*. 81: 103-112.

Lee, M.; Lee, M.; Park, I. **2007**. Inhibitory effect of onion extract on polyphenol oxidase and enzymatic browning of taro (*Colocasia antiquorum* var. *esculenta*). *Food Chemistry*. 105: 528-532.

Leontowicz, H.; Gorinstein, S.; Lojek, A.; Leontowicz, M.; Ciz, M.; Soliva, R.; Park, Y.; Jung, S.; Trakhtenberg, S.; Belloso, O. **2002**. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 603-610.

López, T.; Ángeles, M.; Muñoz, R.; Calderón, A. **2001**. Purification and stability of a Basic peroxidase from strawberry callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39: 479-486.

Lurie, S.; Fallik, E.; Handros, A.; Aspira, R. **1997**. The posible involvment of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 50: 141-149.

Marangoni, A.G. **2003**. Enzyme kinetics: a modern approach. *Wiley-Interscience*. 1st Edition. Chapter 6. 79-89.

Marco, G.J. **1968**. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist Society*. 45: 494-598.

Marín, M. L. **2002**. Identificación y caracterización de moscas de las frutas en los departamentos del Valle del Cauca, Tolima y Quindío. *Tesis de Maestría en Ciencias Agronómicas*. Universidad de Caldas. 4-6.

Marinova, E.M.; Yanishlieva, N.V. **2003**. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*. 81: 189-197.

Marshall, M.; Kim, J.; Wei, C. **2000**. Enzymatic browning in fruits, vegetables and sea foods. Food and Agriculture Organization (FAO).
http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMEFINAL/Enzymatic%20Browning.html (Consultada el 14 de Octubre de 2008).

Mercadante, A.Z.; Steck, A.; Pfander, H. **1999**. Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.): isolation and structure elucidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 145-151.

Mercado-Silva, E.; Benito-Bautista, P.; García-Velasco, M.A. **1998**. Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. *Postharvest Biology and Technology*. 13: 143-150.

Micheli, F. **2001**. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*. 6(9): 414-419.

Mondal, K.; Malhotra, S.P.; Jain, V.; Singh, R. **2009**. Partial purification and characterization of pectinmethylesterase from ripening guava (*Psidium guajava* L.) fruits. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31: 81-87.

Montalvo, E.; García, H.S.; Tovar, B.; Mata, M. **2007**. Application of exogenous ethylene on postharvest ripening of refrigerated Atulfo mangoes. *Food Science and Technology*. 40: 1466-1472.

Mozhaev, V.V.; Khmelnitsky, Y.L.; Sergeeva, M.V.; Belova, A.B.; Klyachko, N.L.; Levashov, A.V.; Martinek, K. **1989**. Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvents mixtures: α-chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glicol and water/formamide solvents. *European Journal of Biochemistry*. 184: 597-602.

Muchuweti, M.; Moyo, E.; Mushipe, S. **2005**. Some properties of the polygalacturonase from four zimbabwean wild fruits (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* and *Berchemia* discolor fruits). *Food Chemistry*. 90: 655-661.

Mudd, J.B.; Burris, R.H. **1959**. Inhibition of peroxidase catalyzed oxidations. *The Journal of Biological Chemistry*. 234(12): 3281-3285.

Muruyama, H.; Takahashi, T.; Honda, R.; Fukushima, T. **1998**. Cell wall changes in pear fruit softening on and off the tree. *Postharvest Biology and Technology*. 14: 143-149.

Narváez-Cuenca, C.E. **2003**. Efecto del choque térmico de Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) sobre la tolerancia al frío. *Revista Colombiana de Química*. 32: 93-102.

Narváez-Cuenca, C.E. **2008**. Extracción y medida de peroxidasa en pulpa de Arazá (*Eugenia stipitata* MC Vaugh). *Química Nova*. 31(8): 2047-2051.

Nawirska, A.; Kwasniewska, M. **2005**. Dietary fiber fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry*. 91: 221-225.

Nelson, N. **1944**. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 153: 378-380.

Nerd, A.; Mizrahi, Y. **1999**. The effect of ripening stage on fruit quality after storage of yellow pitaya. *Postharvest Biology and Technology*. 15: 99-105.

Nguyen, T.B.; Ketsa, S.; van Doorn, W.G. **2003**. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*. 30: 187-193.

Nicolik, M.V.; Mojovic, L. **2007**. Hydrolysis of apple pectin by the coordinated activity of pectic enzymes. *Food Chemistry*. 101: 1-9.

Nogata, Y.; Ohta, H.; Voragen, A. **1993**. Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry*. 34: 617-620.

Olajide, O.A.; Awe, S.O.; Makinde, J.M. **1999**. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. *Fitoterapia*. 70: 25-31.

Osman, A.M.; Wong, K.K.; Fernyhough, A. **2006**. ABTS radical driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 346: 321-329.

Ozgen, M.; Reese, N.R.; Tulio, A.Z.; Scheerens, J.C.; Miller, R. **2006**. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1151-1157.

Padiglia, A.; Cruciani, E.; Pazzaglia, G.; Medda, R.; Floris, G. **1995**. Purification and characterization of *Opuntia* peroxidase. *Phytochemistry*. 38: 295-297.

Palomar, X.; Roig-Villanova, I.; Grima-Calvo, D.; Vendrell, M. **2005**. Effects of nitrous oxide (N_2O) treatment on the postharvest ripening of banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 36: 167-175.

Pathak, N.; Mishra, S.; Sanwal, G. **2000**. Purification and characterization of poligalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*. 54: 147-152.

Pech, J.; Bouzayen, M.; Latche, A. **2008**. Climateric fruit ripening: ethylene dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science*. 175: 114-120.

Pérez, R.; Mitchell, S.; Vargas, R. **2008**. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 117: 1-27.

Pires, R.; Finardi-Filho F. **2005**. Extraction and assay of pectic enzymes from peruvian carrot (*Arracacia xanthirriza* B.). *Food Chemistry*. 89: 85-92.

Prasanna, V.; Prabha, T.; Tharahathan, R. **2006**. Multiple forms of polygalacturonase from mango (*mangifera indica* L. cv a*lphonso*) fruit. *Food Chemistry*. 95: 30-36.

Pressey, R.; Avant, J. **1976**. Pear polygalacturonase. *Phytochemistry*. 15: 1349-1351.

Priya, S.; Prabha, T.; Tharanathan, R. **1996**. Postharvest biochemical changes associated with the softening phenomenon in *Capsicum annumm* fruits. *Phytochemistry*. 42: 961-966.

Prochazkova, D.; Sairam, R.K.; Srivastava, G.C.; Singh, D.V. **2001**. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*. 161: 765-771.

Puri, A.; Solomos, T.; Kramer, A. **1982**. Partial purification and characterization of potato pectinesterase. *Food Chemistry*. 8: 203-213.

Quevedo, R.; Díaz, O.; Ronceros, B.; Pedreschi, F.; Aguilera, J.M. **2009**. Description of the kinetic enzymatic browning in banana (*Musa cavendish*) slices using non uniform color information from digital images. *Food Research International*. 42(9): 1309-1314.

Ravindra, M.R.; Goswami, T.K. **2008**. Modelling the respiration rate of green mature mango under aerobic conditions. *Biosystem Engineering*. 99: 239-248.

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

Restrepo-Sánchez, D.C.; Narváez-Cuenca, C.E.; Restrepo-Sánchez, L.P. **2009**. Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*. 32(6): 1517-1522.

Rice, C.; Millar, N.; Paganga, G. **1997**. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 4: 152-159.

Rivera, A.; Restrepo, P.; Narváez, C. **2004**. Polifenoloxidasa y peroxidasa de pupa de uva caimarona (*Pourouma cecropiifolia*). *Revista Colombiana de Química*. 33: 57-66.

Riley, P.A. **1997**. Melanin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29(11): 1235-1239.

Robards, K.; Prenzel, P.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. **1999**. Phenolic compouds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66: 401-436.

Rodakiewicz, J.; Kasture, S.M.; Dudek, S.; Haber, J. **2000**. Effect of various water misicble solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 1-11.

Rodrigo, M.J.; Marcos, J.F.; Alférez, F.; Mallent, M.D.; Zacarías, L. **2003**. Characterization of pinalate, a novel citrus sinensis mutant with a fruit specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany*. 54: 727-738.

Rodríguez-Castro, J.P.; Narváez-Cuenca, C.E.; Restrepo-Sanchez, L.P. **2006**. Estudio de la actividad enzimática de poligalacturonasa en la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). *Acta Biológica Colombiana*. 11(1): 65-74.

Rodríguez-Nieto, J.M. **2008**. Extracción y medida de actividad de enzimas involucradas en el proceso de ablandamiento de lulo (*Solanum quitoense* Lam). *Tesis de Maestría en Ciencias Química*. Universidad Nacional de Colombia.

Rojas-Barquera, D.; Narváez-Cuenca, C.E. **2009**. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia. *Química Nova*. 32(9): 2336-2340.

Salazar, D.; Melgarejo, P.; Martínez, R.; Martínez, J.; Hernández, F.; Burguesa, M. **2006**. Phenological states of the guava tree (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae*. 108: 157-161.

Saradhuldhat, P.; Paull, R.E. **2007**. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. *Scientia Horticulturae*. 112: 297-303.

Saura-Calixto, F. **1998**. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(10): 4303-4306.

Shami, N.J.; Moreira, E.A. **2004**. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrición*. 17(2): 227-236.

Singh, S.P.; Pal, R.K. **2008**. Response of climacteric-type guava (*Psidium guajava* L.) to postharvest treatment with 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*. 47: 307-314.

Singh, B.K.; Sharma, S.R.; Singh, B. **2010**. Antioxidant enzymes in cabbage: variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae*. 124: 9-13.

Soliva, R.; Elez, P.; Caldero, M.; Martín, O. **2002**. Kinetics of polyphenol oxidase activity inhibition and browning of avocado puree preserved by combined methods. *Journal of Food Engineering*. 55: 131-137.

Somogyi, M. **1951**. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*. 195: 19-23.

Soto, G.; Yahia, E. **2002**. Compuestos antioxidantes y tratamientos poscosecha. *Horticultura*. 160: 48-54.

Souza, J.N.; Silva, E.M.; Loir, A.; Rees, J.F.; Rogez, H.; Larondelle, Y. **2008**. Antioxidant capacity of four polyphenol rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. *Food Chemistry*. 106: 331-339.

Stahl, W.; Sies, H. **2003**. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*. 24: 345-351.

Tachakittirungrod, S.; Ikegami, F.; Okonogi, S. **2007**. Antioxidant active principles isolated from *Psidium guajava* grown in Thailand. *Scientia Pharmaceutica*. 75: 179-193.

Tachakittirungrod, S.; Okonogi, S.; Chowwanapoonpohn, S. **2007**. Study of antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*. 103: 381-388.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins-Byrne, D. **2005**. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. *Southeast Asian Journal of Tropical and Medical Public Health*. 36(4): 254-257.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins-Byrne, D. **2006**. Comparision of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruits extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 669-675.

Thompson, D.; Fernández, R.; Mateo, C.; Cowan, D.; Guisan, J.; Daniel, R. **1998**. Degradation and denaturation of stable enzymes. *Progress in Biotechnology*. 15: 349-352.

Torres, R.; Valentines, M.; Usall, J.; Viñas, I.; Larriguadiere, C. **2003**. Posible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanism in Golden Delicious apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 27: 235-242.

Trinchero, G.D.; Sozzi, G.O.; Cerri, A.M.; Vilella, F.; Fraschina, A.A. **1999**. Ripening related changes in ethylene production, respiration rate and cell wall enzyme activity in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) a solanaceous species. *Postharvest Biology and Technology*. 16: 139-145.

Universidad de Antioquia. http://huitoto.udea.edu.co/FrutasTropicales/guayaba.html (Consultada el 10 de Septiembre de 2008).

United States Department of Agriculture (USDA). Natural Resources Conservation Service. http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=PSGU (Consultada el 2 de Mayo de 2010).

Vargas, A.M.; Rivera, A.P.; Narváez, C.E. **2005**. Capacidad antioxidante durante la maduración de Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). *Revista Colombiana de Química*. 34: 57-65.

Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. **1998**. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(10): 4113-4117.

Villanueva, M.J.; Tenorio, M.D.; Esteban, M.A.; Mendoza, M.C. **2004**. Compositional changes during ripening of two cultivars of muskmelon fruits. *Food Chemistry*. 87: 179-185.

Vitaglione, P.; Napolitano, A.; Flogiano, V. **2008**. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science & Technology*. 19: 451-463.

Wang, J.; Araki, T.; Matsuoka, M.; Ogawa, T. **1999**. A graphical method of analyzing pH dependence of enzyme activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1435: 177-183.

Warrilow, A.; Jones, M. **1995**. Different forms of tomato pectinesterase have different kinetic properties. *Phytochemistry*. 39: 277-282.

Wilberg, V.C.; Rodríguez-Amaya, D.B. **1995**. HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*. 28: 474-480.

Wood, R.K. **1960**. Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease. *Annual Reviews of Phytopathology*. 24: 383-409.

Worth, H.G. **1967**. The chemistry and biochemistry of pectic substances. *Chemical Reviews*. 67(4): 465-473.

Wu, M.; Chen, Y.; Hwang, J. **2004**. Transacylation of citrus pectin as catalyzed by pectinesterase from tendril shoots of chayote (*Sechium edule* S). *Food Research International*. 37: 759-765.

Yuan, J.P.; Chen, F. **1999**. Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC dual detection. *Food Chemistry*. 64: 423-427.

Zanatta, C.L.; Zotarelli, M.F.; Clemente, E. **2006**. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 26(3): 705-708.

Zhou, H. **2000**. Pectinesterase, polygalacturonase and gel formation in peach pectin fractions. *Phytochemistry*. 55: 191-195.

Zor, T.; Selinger, Z. **1996**. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*. 236: 302-308.

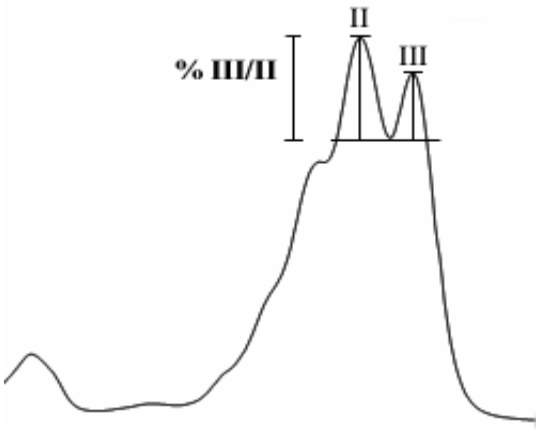
11. ANEXOS

11.1. Anexo 1. Ecuaciones de las curvas de calibración empleadas para la cuantificación espectrofotométrica y cromatográfica de los compuestos, enzimas y actividad antioxidante.

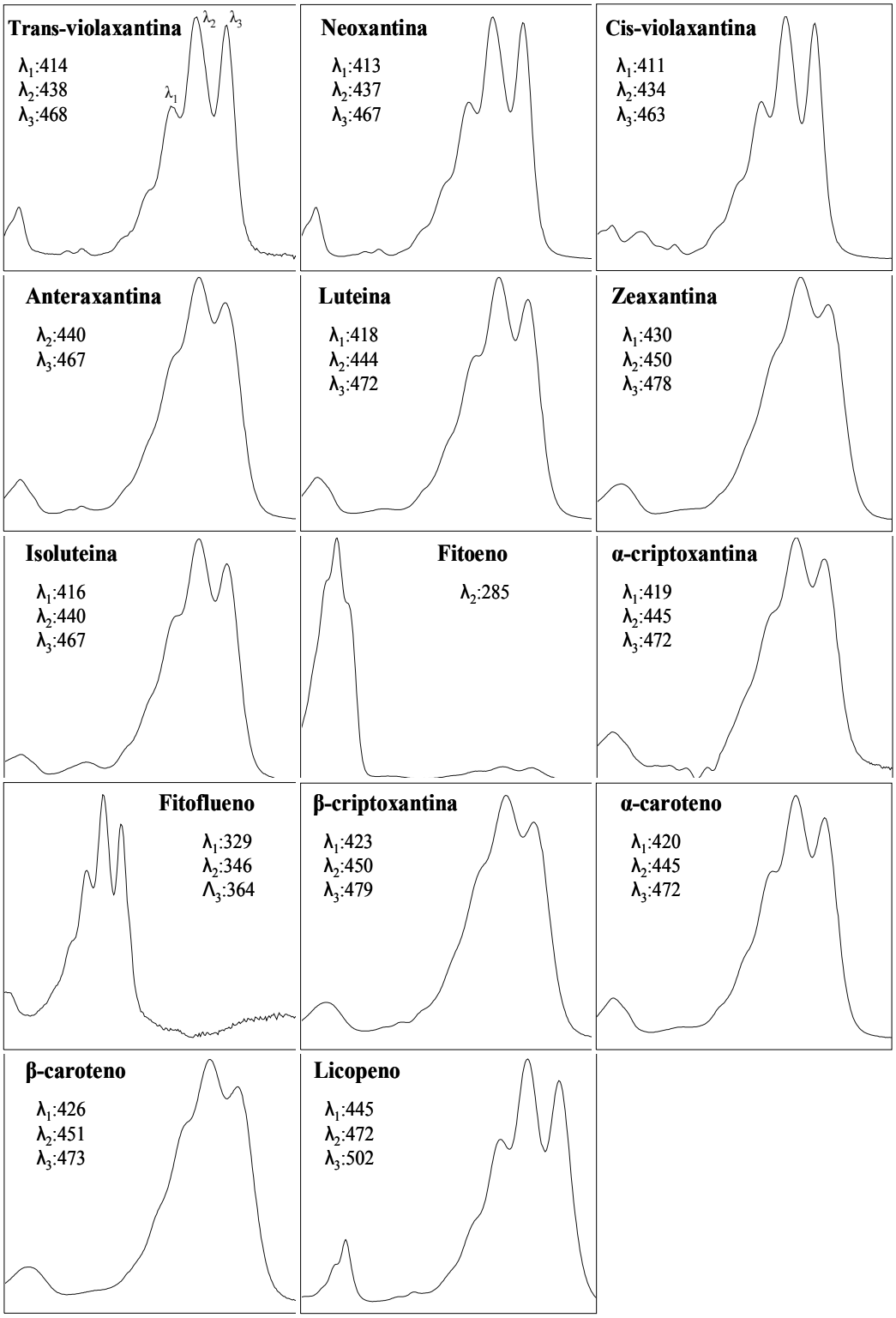
	Patrón-Técnica	Curva de Calibración	r^2
Fenoles Libres (Folin-Ciocalteu)	Ácido Gálico-UV/VIS	Y=0,0864X+0,0102	0,999
Vitamina C	Ácido Ascórbico-HPLC/UV	Y=94803,7X+153517,6	0,999
ABTS	Trolox-UV/VIS	Y=0,0219X+0,0082	0,987
DPPH	Trolox-UV/VIS	Y=4,4817X-0,6387	0,989
FRAP	Trolox-UV/VIS	Y=0,0276X+0,0533	0,991
FRAP	$FeSO_4$-UV/VIS	Y=0,0189X-0,0230	0,993
Proteína (Bradford-Zor & Selinger)	BSA-UV/VIS	Y=0,0443X+0,4331	0,996
Azúcares Reductores (Nelson &Somogyi)	D-(+)-Glucosa-UV/VIS	Y=0,0042X-0,0165	0,999

11.2. Anexo 2. Ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas para la cuantificación cromatográfica de los compuestos polifenólicos.

Compuesto	Curva de Calibración	r^2
Ácido Elágico	Y=10609,7782X-82363,5535	0,995
Morina	Y=5877,9694X-45892,6794	0,993
Quercetina	Y=8786,6822X-54756,0070	0,995



11.3. Anexo 3. Notación numérica (%III/II = $h(\lambda_3)$ / $h(\lambda_2)$ x 100) que describe el porcentaje del cociente entre la altura del pico del máximo del espectro de absorción (banda III) y la altura del pico medio (II).



11.4. Anexo 4. Espectros de absorción característicos de los carotenoides identificados en los frutos de guayaba variedad Palmira ICA I. Las letras λ indican las longitudes de onda máxima de cada espectro.

11.5. Anexo 5. Preparación de los reactivos del método de Nelson & Somogyi para la cuantificación de azúcares reductores.

Reactivo de Somogyi I: Se pesaron 2,5 g de Na_2CO_3, 2,5 g de tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle $KNaC_4H_4O_6 \bullet 4\ H_2O$), 2,0 g de $NaHCO_3$ y 20 g de Na_2SO_4, se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua desionizada.

Reactivo de Somogyi II: Se pesaron 15 g de $CuSO_4 \bullet 5\ H_2O$, se adicionaron 500 μL de H_2SO_4 concentrado (96%) y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua desionizada.

Reactivo de Nelson: Se pesaron 5,0 g de molibdato de amonio ($(NH_4)_2MoO_4 \bullet 4\ H_2O$), se adicionaron 80 mL de agua desionizada, 4,2 mL H_2SO_4 concentrado (96%) y se agitó hasta disolución completa, luego se adicionaron 0,6 g de $Na_2HAsO_4 \bullet 7\ H_2O$ disueltos en 5,0 mL de agua desionizada y se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada.

11.6. Anexo 6. Preparación del reactivo de Bradford.

Reactivo de Bradford: A 10 mg de Azul de Comassie G-250 se le adicionaron 5 mL de etanol del 98% y se agitó hasta disolución completa, se adicionaron 10 mL de H_3PO_4 al 85% y se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada. Se filtró 2 veces hasta que el reactivo de Bradford quedó de color café claro.