

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Departamento Académico de Ciencia, Tecnología e Ingeniería de Alimentos**



**“CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA C, POLIFENOLES TOTALES Y  
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA DE GUAYABA (*Psidium  
Guajava L.*) FRESCA Y TRATADA TÉRMICAMENTE”**

**TESIS**

**Para optar el título de:**

**Ingeniero en Industrias Alimentarias**

**MARÍA DE GUADALUPE DÍAZ DELGADO**

**Tingo María - Perú**

**2010**



F60

D67

Díaz Delgado, María De G.

Cuantificación de Vitamina C, Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante en Pulpa de Guayaba (*Psidium guajava* L.) Fresca y Tratada Térmicamente. Tingo María 2010

75 h.; 10 cuadros; 14 fgrs.; 16 anexo; 52 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

PSIDIUM GUAJAVA L. / ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE / VITAMINA C. /  
POLIFENOLES TOTALES / TRATAMIENTO TÉRMICO / METODOLOGÍA /  
TINGO MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**Tingo María**  
**FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**  
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156  
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fia@unas.edu.pe

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 08 de Abril de 2010, a horas 7:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por la Bach. **DIAZ DELGADO, María de Guadalupe**, titulada:

### **“CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA C, POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA DE GUAYABA FRESCA Y TRATADA TÉRMICAMENTE”**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de *MUY BUENO* en consecuencia la Bachiller, queda apta para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 08 de Abril de 2010

Ing. Eduardo A. Cáceres Almenara  
Presidente

Ing. Jaime E. Basilio Atencio  
Miembro

Ing. Jaime E. Basilio Atencio  
Miembro

Dra. Elizabeth S. Ordóñez Gómez  
Asesora

## DEDICATORIA

A DIOS: Sobre todas las cosas por iluminarme y darme sus bendiciones durante todo el proceso de mi formación profesional y terminar exitosamente mi carrera.

A mi abuelita TERESA y a mi abuelito MARCIAL Q.E.P.D, con mucho cariño y respeto por sus enseñanzas y sabios consejos para superarme y crecer como profesional.

A mis queridos Padres: MARIA TERESA DELGADO DÍAZ y ELMER DIAZ MINAYA, mi más profundo agradecimiento y eterna gratitud por sus consejos y esfuerzos para la culminación de mi carrera profesional.

A mis hermanos, tíos y primos por su apoyo incondicional en la ejecución del presente trabajo de investigación, mi más eterno agradecimiento.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por ser el alma mater donde culminé mi carrera profesional.

A la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, por haberme formado como profesional.

A la Dra. Elizabeth Susana Ordoñez Gómez, por su valiosa orientación como patrocinadora de la tesis.

Al Dr. Manuel Sandoval Chacón, por su valiosa colaboración en la investigación.

Al Ing. Msc. Davy Williams Hidalgo Chávez, por su colaboración y participación en la investigación.

A la Bachiller Patricia Vélez Urrelo por su constante ayuda en la investigación.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente hicieron posible la culminación del presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Generalidades de la guayaba ( <i>Psidium guajava</i> L) .....	3
2.1.1 Agrobotánica .....	3
2.1.2 Identificación taxonómica .....	3
2.1.3 Variedades .....	4
2.1.4 Composición química .....	6
2.1.5 El fruto .....	7
2.2 Vitamina C .....	9
2.2.1 Comportamiento químico de la molécula.....	9
2.2.2 Características funcionales de la vitamina C.....	10
2.2.3 Estabilidad de las vitaminas .....	11
2.3 Polifenoles .....	11
2.3.1 Estructura y clasificación .....	12
2.3.2 Actividad biológica de los compuestos polifenólicos .....	14
2.4 Generalidades de antioxidantes .....	14
2.4.1 Definición.....	14
2.4.2 Actividad antiradicalaria.....	15
2.4.3 Clasificación de los antioxidantes.....	16
2.4.4 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	18
2.4.5 Selección de antioxidantes.....	20
2.5 Radicales libres .....	21

2.5.1 Mecanismo de acción de los radicales libres.....	23
2.5.2 Generación de radicales libres .....	24
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1. Lugar de ejecución.....	25
3.2. Materia prima .....	25
3.3. Equipos, materiales y reactivos .....	26
3.3.1. Equipos de laboratorio.....	26
3.3.2. Materiales .....	26
3.3.3. Reactivos y solventes .....	27
3.4. Métodos de análisis .....	28
3.4.1. Cuantificación de vitamina C .....	28
3.4.2. Cuantificación de polifenoles .....	28
3.4.3. Determinación de la actividad antioxidante .....	29
3.5. Metodología experimental.....	30
3.5.1. Selección de la materia prima .....	30
3.5.2. Preparación de la muestra.....	31
3.5.3. Cuantificación de vitamina C .....	31
3.5.4. Cuantificación de polifenoles totales .....	32
3.5.5. Determinación de la actividad antioxidante .....	33
3.5.6. Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa tratada térmicamente del mejor ecotipo de guayaba .....	34
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 Cuantificación de vitamina C .....	37

4.1.1	Determinación de la curva estándar .....	37
4.1.2	Cuantificación de vitamina C en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba .....	38
4.2	Cuantificación de polifenoles totales.....	39
4.2.1	Determinación de la curva estándar .....	39
4.2.2	Cuantificación de polifenoles totales en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba .....	40
4.3	Determinación de la actividad antioxidante.....	41
4.3.1	Determinación Coeficiente de Inhibición (IC <sub>50</sub> ) radical 2,2-diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba ...	41
4.3.2	Determinación Coeficiente de Inhibición (IC <sub>50</sub> ) radical peroxilo en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba. ....	42
4.4	Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa tratada térmicamente.....	43
V.	DISCUSIONES .....	44
5.1	Cuantificación de vitamina C .....	44
5.1.1	Determinación de la curva estándar .....	44
5.1.2	Cuantificación de vitamina C en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba .....	45
5.2.1	Determinación de la curva estándar .....	47
5.2.2	Cuantificación de polifenoles totales en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba .....	48
5.3	Determinación de la actividad antioxidante.....	50

5.3.1 Determinación Coeficiente de Inhibición (IC <sub>50</sub> ) radical 2,2-diphenyl- picrilhydrazyl (DPPH) en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba. ....	50
5.3.2 Determinación Coeficiente de Inhibición (IC <sub>50</sub> ) radical peroxilo en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba.....	53
5.4 Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa tratada térmicamente.....	56
5.4.1 Vitamina C .....	56
5.4.2 Polifenoles totales .....	57
5.4.3 Actividad antioxidante.....	57
VI. CONCLUSIONES .....	59
VII. RECOMENDACIONES.....	60
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	61
IX. ANEXO .....	69

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Valor nutritivo de 100 g de pulpa de fruto maduro de guayabo.....	6
2. Clasificación de los antioxidantes.....	18
3. Especies reactivas del oxígeno y sus principales características.....	22
4. Resultados de las absorvacias para la curva estándar de vitamina C.....	38
5. Cuantificación de Vitamina C en tres ecotipos de pulpa de guayaba.....	39
6. Resultados de las absorvacias para la curva estándar de polifenoles totales (mg equiv. AG/100g).....	41
7. Cuantificación de polifenoles totales en ecotipos de pulpa de guayaba.....	42
8. Determinación IC <sub>50</sub> con el radical DPPH en ecotipos de pulpa de guayaba...	43
9. Determinación IC <sub>50</sub> con el radical peroxilo en ecotipos de pulpa de guayaba.	44
10. Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa tratada térmicamente.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Fracciones de un corte de guayaba, desde la parte más externa hacia el centro de la fruta.....	7
2. Estructura química del ácido ascórbico.....	9
3. Estructura química de los polifenoles.....	14
4. Reacción del radical DPPH con un medio antioxidante.....	20
5. Ecotipos de guayaba: (a) ecotipo rojo (b) ecotipo blanco (c) ecotipo rosado...	27
6. Preparación de la muestra.....	32
7. Diseño experimental para la cuantificación de Vitamina C, polifenoles y actividad antioxidante en tres ecotipos de guayaba.....	36
8. Diseño experimental para la cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa seleccionada.....	37
9. Comportamiento de la curva estándar de vitamina C.....	39
10. Contenido de vitamina C en pulpa fresca de guayaba.....	40
11. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.....	41
12. Contenido de polifenoles totales en ecotipos de pulpa de guayaba.....	42
13. Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) con el radical DPPH en ecotipos de pulpa guayaba.....	43
14. Coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) con el radical peroxilo en ecotipos de pulpa guayaba.....	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
A - Ia: Análisis de varianza de los resultados de Vitamina C del ecotipo blanco.....	70
A - Ib: Análisis de varianza de los resultados de Vitamina C del ecotipo Rojo.....	70
A - Ic: Análisis de varianza de los resultados de Vitamina C del ecotipo rosado.....	70
A - IIa: Análisis de varianza de los resultados de polifenoles del ecotipo blanco.....	71
A - IIb: Análisis de varianza de los resultados de polifenoles del ecotipo rojo.....	71
A - IIc: Análisis de varianza de los resultados de polifenoles del ecotipo rosado.....	71
A - IIIa: Análisis de varianza de los resultados de DPPH de ecotipo blanco.	72
A - IIIb: Análisis de varianza de los resultados de DPPH de ecotipo rojo.....	72
A - IIIc: Análisis de varianza de los resultados de DPPH de ecotipo rosado.	72
A - IVa: Análisis de varianza de los resultados del radical peroxilo de ecotipo blanco.....	73
A - IVb: Análisis de varianza de los resultados del radical peroxilo de ecotipo rojo.....	73
A - IVc: Análisis de varianza de los resultados del radical peroxilo de ecotipo	

rosado.....	73
A - Va: Análisis de varianza de los resultados del análisis de vitamina C en pulpa de guayaba rosada madura tratada térmicamente.....	74
A - VIa: Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles en pulpa de guayaba rosada madura tratada térmicamente.....	74
A - VIIa: Análisis de varianza de los resultados del análisis del radical DPPH en pulpa de guayaba rosada madura tratada térmicamente.....	74
A - VIIIa: Análisis de varianza de los resultados del análisis del radical peroxilo en pulpa de guayaba rosada madura tratada térmicamente.....	75

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de investigación de productos naturales de la Amazonía (CIPNA) – UNAS. Los objetivos fueron cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y determinación de la actividad antioxidante medido por su capacidad de inhibir radicales libres 1,1-diphenil-2-picrylhidrazil (DPPH) y peroxilo en pulpa fresca de tres ecotipos de guayaba y en la pulpa tratada térmicamente que se obtuvo a partir del mejor resultado en pulpa fresca. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM, para el análisis estadístico se empleó el diseño completo al azar (DCA) y la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). La materia prima fue tres ecotipos de guayaba (blanca, roja y rosada) y dos estados de madurez (pintón y maduro). El mayor contenido de vitamina C y polifenoles totales lo obtuvieron el tratamiento blanco-pintón ( $16,35 \pm 0,30$  mg/100 g) y el rosado-maduro ( $143,973 \pm 1,181$  mg equiv. AG/100g) respectivamente. Con respecto a la actividad antioxidante el mejor coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) frente al radical DPPH y peroxilo correspondió al rosado-pintón ( $3,158 \pm 0,11$  mg/ml) y rosado-maduro ( $0,574 \pm 0,006$  mg/ml) respectivamente. Se observó que los contenidos de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante frente al DPPH en la pulpa tratada térmicamente ( $55^{\circ}\text{C}/ 2$  h y  $70^{\circ}\text{C}/ 1$  h) fueron afectados por los tratamientos térmicos, mientras que la actividad antioxidante frente al radical peroxilo no presentó diferencia estadística con respecto a la pulpa fresca.

## I. INTRODUCCIÓN

El fruto de la guayaba (*Psidium guajava* L.) pertenece a la familia Myrtaceae, es originaria de América tropical pero se ha dispersado ampliamente a lo largo de los trópicos debido a que prospera en una variedad de suelos, se reproduce fácilmente y la producción de frutos es relativamente rápida: La guayaba es considerada como una fruta tropical, destaca su contenido en vitamina C; aporta en menor medida otras vitaminas del grupo B (sobre todo niacina o B3), si la pulpa es anaranjada, es más rica en provitamina A (carotenos), ambas vitaminas cumplen además una función antioxidante; respecto a los minerales destaca su aporte de potasio y también de calcio, su aporte de fibra es elevado por lo que posee un suave efecto laxante y ayuda a una buena digestibilidad, es de bajo valor calórico, por su escaso aporte de hidratos de carbono y menor aún de proteínas y grasas.

En el Valle del Alto Huallaga se cuenta con varios ecotipos de guayaba como “blanca”, “roja” y “rosada” cada uno de ellos con características sensoriales muy especiales principalmente en aroma, color y sabor; la guayaba tiene una alta producción de frutos, pero el poblador no le da valor económico porque el fruto es atacado por la mosca de la fruta antes que alcanzar su madurez deteriorando su calidad, es común encontrarlos en medio de cultivos y potreros, linderos, huertos y patios o formando parte de cortinas protectoras en terrenos de cultivo, en muchas áreas la especie es una buena opción para

producción de leña, ya que rebrota con facilidad después de talas repetidas y su crecimiento es rápido al inicio. Su consumo se da principalmente como fruto fresco y en menor proporción en forma procesada como pulpas, jugos, mermeladas, bocadillos y rellenos para dulces de manera artesanal sin establecer el verdadero valor nutricional ni antioxidante del fruto. En este sentido este cultivo posee un gran potencial y por ello es necesario obtener datos científicos para cuantificar la actividad antioxidante en el fruto, planteando los siguientes objetivos para el presente trabajo de investigación:

- Cuantificación de Vitamina C y polifenoles totales en la pulpa fresca de tres ecotipos de guayaba.
- Determinar la actividad antioxidante de la pulpa fresca de tres ecotipos de guayaba medido por su capacidad de inhibir radicales libres 1,1-diphenil-2-picrylhidrazil (DPPH) y peroxilo.
- Evaluar el contenido de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante mediante la capacidad de inhibir radicales libres 1,1-diphenil-2-picrylhidrazil (DPPH) y peroxilo en pulpa tratada térmicamente a partir del mejor resultado en pulpa fresca.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades de la guayaba (*Psidium guajava* L.)

#### 2.1.1 Agrobotánica

Flores (1997) indica que es una especie nativa de América tropical, probablemente de origen amazónico; tiene amplia distribución en toda la cuenca amazónica. En la selva peruana se cultiva en los departamentos de Loreto, Ucayali, San Martín, Madre de Dios, Huánuco, Cuzco y Ayacucho.

#### 2.1.2 Identificación taxonómica

SIIT (2002) señala que la guayaba (*Psidium guajava* L.) presenta la siguiente identificación taxonómica:

Reino	:	Plantae
Sub-reino	:	Tracheobionta
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub-Clase	:	Rosidae
Orden	:	Mirtales
Familia	:	Mirtaceae

Género : *Psidium*

Especie : *Psidium guajava* Linneo 1753

### 2.1.3 Variedades

Las variedades están en función del país de origen; según la variedad, la guayaba puede tener forma redondeada, semejante a un limón o bien estrecharse hacia el pedúnculo, tomando una forma parecida a la pera (VELEZ, *et al.* 2007).

MORTON (1987) indica que anteriormente las guayabas redondas y con forma de pera se consideraban especies separadas, *P. pomiferum* L. y *P. pyriferum* L., el autor los clasifica de la siguiente manera:

#### 2.3.1.1 Por cultivares

- **Redland**; el primer nombre de cultivar en la Florida, fue desarrollado en la Universidad de la Florida Agricultural Research and Education Center, el fruto se caracteriza por tener tamaño muy grande, con poco olor, de pulpa blanca y relativamente pocas semillas .
- **Supremo**; de olor débil, de pulpa blanca, semillas pequeñas, de alto contenido de ácido ascórbico y la capacidad para producir cosechas abundantes durante un período de 8 meses de finales de otoño a primavera.
- **Roja de la India**, de olor fuerte, de tamaño medio a grande, redondo, pero ligeramente achatado en la base y el ápice, a menudo con la piel amarilla a rosa, con espesor medio, la pulpa roja de sabor dulce, con pequeñas y numerosas semillas, agradable para el consumo en fresco.

- **Ruby**; con olor acre, de tamaño medio a grande, oval, pulpa gruesa, sabor dulce, y pocas semillas. Su fruto es excelente para el consumo en fresco y para conserva.
- **Blitch**; de olor fuerte, de tamaño mediano, oval, de pulpa rosada, pequeñas y numerosas semillas, sabor agradable y buena para elaborar mermeladas.
- **Palillo**; de olor muy suave, de tamaño medio, ovaladas, pulpa rosada, número moderado de pequeñas semillas; sub ácido, sabor agradable y buena para la cocina en general.

#### 2.3.1.2 Por el color de pulpa

- **Apple Colour**; de tamaño medio, ligeramente achatado; de piel rosa, cremoso, carne blanca, cantidad moderada de semillas, de sabor muy dulce (0,34-2,12% de ácido, de 9 a 11,36% de azúcar).
- **Lucknow 49**; medio-grande, carne blanca y gruesa, pocas semillas, ácido-dulce, de buena calidad; alta en pectina y bueno para mermeladas.
- **Safeda**; de tamaño medio, con piel muy fina, pulpa blanca, pocas semillas. Extraordinaria calidad para el enlatado.
- **Allahabad**; frutos grandes, de pulpa blanca y bastante semillas duras.
- **Karela**; medio-grande, en forma de pera, surcado, de piel áspera, pulpa suave, granular, pulpa blanca y de sabor dulce agradable.
- **Anakapalle**; pequeñas, pulpa fina, roja, con muchas semillas, apto para el enlatado.
- **Biodiversidad de la Florida**; pequeñas, delgadas y rojas, pulpa ácida; muchas semillas y no son muy aptos para el enlatado.

- **Kothrud**; de tamaño medio, pulpa de espesor medio, rojo, moderada cantidad de semillas y no aptos para el enlatado.

- **Red-carne**; de tamaño medio, con muchas semillas bastante suave y alta en pectina.

#### 2.1.4 Composición química

La composición química de la guayaba es variable dependiendo de los ecotipos, tipo de suelo, condiciones edafológicas, etc. La composición promedio se presenta en el siguiente cuadro.

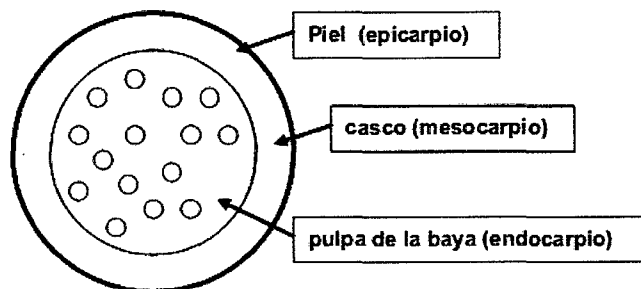
**Cuadro 1.** Valor nutritivo de 100 g de pulpa de fruto maduro de guayabo.

<b>Componentes</b>	<b>100 g de parte comestible</b>	
Energía	58,0	cal
Agua	88,0	g
Proteína	1,5	g
Lípidos	0,2	g
Carbohidratos	9,6	g
Fibra	8,1	g
Cenizas	0,8	g
Calcio	49,0	mg
Fósforo	26,0	mg
Hierro	1,3	mg
Vitamina A (Retinol)	208,0	mg
Tiamina	0,09	mg
Riboflavina	0,11	mg
Niacina	1,60	mg

Fuente: FLORES (1997).

### 2.1.5 El fruto

El fruto es una baya redondeada, ovoide, globosa, globosa-ovoide o periforme, de color amarillo verdoso en su exterior o de color amarillo claro en su madurez, arrugados o lisos, punteados densamente brillantes, fragantes, de 4 - 12 cm de longitud y 5 - 7 cm de ancho, con 4 - 5 sépalos en el ápice, la pulpa es jugosa, de color blanco amarillento, rosado, rojo encendido, con sabor dulce y aromático; semillas numerosas, pequeñas, óseas, uniformes, comprimidas, de color amarillo claro o pardo amarillento (FLORES, 1997). Bajo la cáscara se encuentra una primera capa de pulpa, consistente, firme, de aproximadamente 0,25 centímetros de espesor, variable según la especie; la capa interior es más blanda, jugosa, cremosa y está repleta de semillas de constitución leñosa y dura (VELEZ *et al.*, 2007)



**Figura 1.** Fracciones de un corte de guayaba, desde la parte más externa hacia el centro de la fruta.

#### 2.1.5.1 Maduración del fruto

GARCÍA y PRADERES (2007) indican que la maduración es una secuencia de cambios en el color, sabor y textura que pueden resumirse en las siguientes características:

- Pérdida de la clorofila y aparición de otros pigmentos como xantofilas y carotenos, que dan lugar al cambio de color característico en las frutas, bien sea en la planta o fuera de ella.
- Cambios en la acidez y astringencia, los cuales conducen a un sabor agridulce en la fruta de aceptación por el consumidor.
- Transformación de almidones en azúcares mediante una degradación hidrolítica de los carbohidratos que se transforman en azúcares, apareciendo el sabor dulce e incrementando la palatabilidad del fruto promoviendo un aumento en los sólidos solubles.
- Rompimiento de la pared celular a nivel de la protopectina y ablandamiento del fruto.
- Aparición de compuestos volátiles de bajo peso molecular, que atribuyen al fruto las características organolépticas.

LARA *et al.* (2007) indican que la maduración es la etapa más importante y compleja en el desarrollo de las frutas; puede dividirse en dos fases: la fase de maduración fisiológica y la fase de maduración organoléptica. La primera, suele iniciarse antes de que termine el crecimiento celular y finaliza, más o menos, cuando el fruto tiene las semillas en disposición de producir nuevas plantas; la evolución de esta fase sólo se completa adecuadamente cuando el fruto se encuentra en la planta; la fase de maduración organoléptica hace referencia al proceso por el cual se transforma un tejido fisiológicamente maduro en otro visual olfatoria y gustativamente atractivo; este es el resultado de un complejo conjunto de transformaciones que incluyen: maduración de las semillas, cambios de color, cambios en la composición de sustancias pépticas,

modificación de los ácidos orgánicos, producción de sustancias volátiles y desarrollo de cera en la piel.

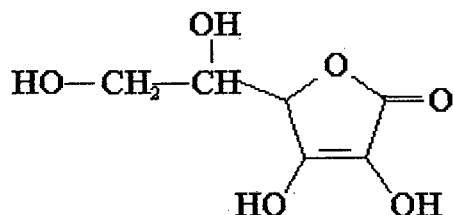
### 2.1.5.2 Utilización del fruto

El fruto maduro es comestible; se consume al estado natural, en su totalidad o sólo el mesocarpio; tiene aroma agradable y sabor que varía de muy ácido a dulce, el mejor sabor es el agridulce.

Se utiliza en la fabricación casera o industrial de conservas de fruta o del mesocarpio; en almíbar, puré, gaiabada (dulce en masa), mermeladas y jaleas, zumos y néctares. Es muy apreciable como saborizante del yogur, gelatinas y halados (FLORES, 1997).

## 2.2 Vitamina C

BADUI (1988), señala que la vitamina C es una cetona cíclica que corresponde a la forma enólica de 3 – ceto – 1 – gulofuranolactona; contiene un enol entre los carbonos 2 – 3 que le hace un agente ácido y muy reductor, por lo cual se oxida fácilmente.



**Figura 2.** Estructura química del ácido ascórbico

### 2.2.1 Comportamiento químico de la molécula

SOTO (2005) indica que la vitamina C pura, es un sólido blanco cristalino soluble en agua y en alcohol etilo, su nombre químico se conoce

como ácido ascórbico; debido a que esta vitamina es un ácido, es razonablemente estable en soluciones ácidas, pero en soluciones básicas o neutrales es fácil y rápidamente oxidada por oxígeno disuelto; la oxidación de la vitamina C, ácido ascórbico, ocurre por la pérdida de dos átomos de hidrógeno, según la molécula es convertida en ácido dehidroascórbico.

### **2.2.2 Características funcionales de la vitamina C**

SOTO (2005) menciona que la vitamina C juega un importante rol en el funcionamiento del cuerpo humano, es un componente presente en todos sus órganos; sin la vitamina C el cuerpo no sería capaz de absorber otros dos importantes componentes: hierro y ácido fólico. La vitamina C es considerada como un antioxidante altamente efectivo, aún en cantidades pequeñas, esta vitamina puede proteger moléculas indispensables en el cuerpo, tales como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos (DNA y RNA). Ésta los protege de daños causados por radicales libres (moléculas altamente reactivas con oxígeno) o por especies de oxígeno reactivo que puede ser generado por el metabolismo normal o por exposición a toxinas y contaminantes (Ej. Fumar). La vitamina C también es capaz de regenerar otros antioxidantes presentes como por ejemplo la vitamina E.

El ácido ascórbico puede obtenerse fácilmente a través de la fuente dietaria, siendo las frutas principalmente el grupo de alimentos de mayor contenido, figurando los cítricos como fuente excelente; también algunos vegetales pueden ser catalogados como buena fuente de este nutriente.

### **2.2.3 Estabilidad de las vitaminas**

BADUI (1997) menciona que los alimentos se deterioran principalmente por contaminación microbiana, por acción enzimática y por reacción química, para evitar estos cambios y conservar los productos se someten a procesos que están basados en uno o algunos de los siguientes principios:

- Uso de altas temperaturas: escaldado, pasteurización, esterilización.
- Uso de bajas temperaturas: refrigeración, congelación.
- Eliminación del agua: deshidratación, concentración.
- Empleo de aditivos.
- Control de pH: acidificación, fermentación.
- Irradiaciones.

En muchos casos la aplicación de alguno de estos tratamientos trae consigo la alteración de las características nutritivas del alimento; es decir que para que se conserve se debe cambiar de alguna manera su naturaleza y esto provoca una alteración en sus componentes. Los procesos térmicos son los más generalizados en la industria pero su abuso destruye muchos de los nutrimentos con la consecuente reducción del valor nutritivo; en general el daño térmico es menor en los nutrimentos cuando se emplean temperaturas elevadas por tiempos menores.

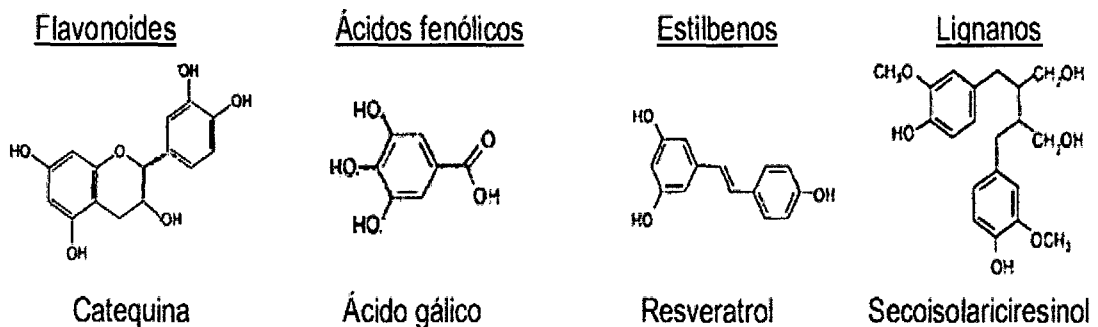
### **2.3 Polifenoles**

Los frutos, en adición a los nutrientes esenciales y a una serie de micronutrientes tales como minerales, fibras y vitaminas, aportan además diversos metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, denominados

polifenoles. Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal, se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales; se encuentran en las verduras y frutas. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres (KUSKOSQUI *et al.*, 2005).

### 2.3.1 Estructura y clasificación

UGARTONDO (2009) menciona que desde el punto de vista químico, los polifenoles se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo (grupo fenol); la estructura de los polifenoles varía de moléculas simples, como los ácidos fenólicos, a estructuras complejas, como los taninos condensados. Se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos.



**Figura 3.** Estructura química de los polifenoles.

#### 2.3.1.1 Los flavonoides

Los flavonoides son polifenoles de bajo peso molecular formados por la combinación de derivados de fenilalanina y el ácido acético; comparten

una estructura común caracterizada por tener un esqueleto difenilpropano ( $C_6C_3C_6$ ) basado en el núcleo flavonoide formado por tres anillos conocidos como A, B y C. El anillo aromático A está condensado con un anillo de seis carbonos (C), un heterociclo oxigenado, que en posición dos tiene un anillo bencénico como sustituyente (B). Son compuestos fenólicos que pertenecen a los populares fitoquímicos, sustancias derivados de vegetales, con acción potencialmente beneficiosa para la salud y que constituyen el principio activo de muchas plantas medicinales.

Las diferencias entre los diversos grupos de flavonoides se establecen por el grado de aromaticidad (dobles enlaces conjugados), el patrón de hidroxilación (orden y número), el tipo de sustituciones (glicosilación, metilación, sulfatación, etc.) y el grado de polimerización de sus estructuras. Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en seis subclases flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles (catequinas y proantocianidinas) y antocianidinas.

### **2.3.1.2 Ácidos fenólicos**

Los ácidos fenólicos son los compuestos no flavonoides más estudiados y se caracterizan por tener un ácido carboxílico funcional. Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico. Ejemplos de los derivados del ácido hidroxibenzoico son el ácido p- hidroxibenzoico, gálico y elágico, dentro de los ácidos hidroxicinámico los que se encuentran en mayor proporción en frutas son los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico. Generalmente los ácidos

fenólicos están presentes en diversas formas conjugadas, siendo más frecuentes como ésteres que como glucósidos (ODRIOZOLA, 2009).

### **2.3.2 Actividad biológica de los compuestos polifenólicos**

La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres (scavengers) y de quelación de metales, su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones.

Además de sus propiedades antioxidantes, los polifenoles poseen otras actividades biológicas específicas derivadas o no de su acción antioxidante. Se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antimutagénicas, inhiben *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) relacionadas con enfermedades coronarias, y protegen el ADN del daño oxidativo que tiene graves consecuencias en algunos cánceres relacionados con la edad, además inhiben la agregación plaquetaria y presentan efectos antiinflamatorios (UGARTONDO, 2009).

## **2.4 Generalidades de antioxidantes**

### **2.4.1 Definición**

Antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones reduce, retrasa significativamente o previene la oxidación de un sustrato (SIES, 1997). Los antioxidantes son sustancias químicas que inactivan los radicales libres o inhiben su producción, impidiendo así deterioro en las células. Los

antioxidantes ceden un electrón al radical libre, oxidándose y transformándose en un radical libre débil que es inofensivo, en algunos casos puede llegar a regenerarse como en el caso de la vitamina E (PINEDA, 2005).

Los antioxidantes son compuestos que prolongan la vida útil de alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación, inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados para prevenir el deterioro de los alimentos, evitando la rancidez de las grasas y los cambios de color. (SIES, 1997).

#### **2.4.2 Actividad antiradicalaria**

PALOMINO (2006) menciona que los antioxidantes son sustancias que tienen la propiedad de impedir la formación de radicales libres, o de disminuir el número de radicales libres y se pueden clasificar en tres categorías: las de tipo I aquellas sustancias capaces de interrumpir la cadena de radicales, cediendo un radical hidrógeno (H) a un radical lipídico libre; el radical que se forma es relativamente estable y no reacciona con los lípidos, es decir, estas sustancias antioxidantes disminuyen el número de radicales libres y por tanto bajan la velocidad de oxidación y prolongan el periodo de inducción. Los antioxidante de tipo I más usados para los alimentos son los compuestos fenólicos, donde los derivados "orto" y "para" son los más eficaces porque dan radicales libres relativamente estables, debido a la localización del electrón entre dos formas de resonancia, aquí tenemos al galato de propilo, el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT), ambos son solubles en los lípidos y resisten bien al calor, en este grupo también podemos mencionar a los tocoferoles.

Los antioxidantes de tipo II son compuestos que actúan impidiendo o disminuyendo la formación de radicales libres, los más utilizados son los agentes que complejan los metales, su acción depende del pH y de la temperatura porque la estabilidad de los complejos formados está en relación con estos parámetros, entre los principales tenemos el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), aminoácidos como la histidina, cisteína y fosfatos complejan trazas de metales; existen otros compuestos que provocan la descomposición de peróxidos en sustancias no radicales, entre los cuales tenemos principalmente a las aminas terciarias y ácidos fuertes (por esta razón no son utilizables en los alimentos).

Entre los antioxidantes de tipo III están los procedimientos de protección contra la oxidación y que consiste en establecer ciertas condiciones físicas, principalmente de contenido de oxígeno, humedad relativa y temperatura convenientemente escogidas. En el ser humano la acción antioxidante se realiza en diferentes partes del organismo, inclusive en distintos compartimentos de una misma célula. Los antioxidantes muestran su efecto protector tanto en el interior de las células como en líquidos extracelulares, así tenemos que los alfa tocoferoles ejercen su acción fundamentalmente en las membranas celulares.

### **2.4.3 Clasificación de los antioxidantes**

#### **2.4.3.1 Antioxidantes endógenos**

Los antioxidantes endógenos o antioxidantes enzimáticos, actúan a nivel celular. Existe tres sistemas principales de enzimas antioxidantes: 1)

Superóxido dismutasa (SOD), 2) Catalasa (CTL) y 3) Glutación peroxidasa (GPX) (GONZÁLEZ – TORRES *et al.*, 2000).

### 2.4.3.2 Antioxidantes exógenos

Los agentes antioxidantes exógenos son aquellos que se ingieren a través de la alimentación y desde el punto de vista práctico son los más importantes de todos, ya que son los únicos que pueden ser introducidos al organismo de forma voluntaria por cada persona, en función de sus conocimientos sobre el tema, la disponibilidad de alimentos en un momento dado y la voluntad e interés que tenga de consumir una dieta saludable (LIMA, 2002). Los antioxidantes exógenos o no enzimáticos, transforman los radicales en menos agresivos (POLYAKOV *et.al.*, 2001).

**Cuadro 2.** Clasificación de los antioxidantes

<b>Exógenos</b>	<b>Endógenos</b>	<b>Cofactores</b>
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido tióctico	Manganeso
	Enzimas:	
Flavonoides	Superoxidodismutasa (SOD)	Hierro
	Catalasa	
	Glutación peroxidasa	
Licopeno		Selenio

FUENTE: CRIADO y MOYA (2009).

En cuanto a los antioxidantes no endógenos, mientras las vitaminas actúan donando o aceptando electrones en las reacciones de óxido-reducción, los minerales regulan la actividad de las enzimas antioxidantes actuando como cofactores (CRIADO y MOYA, 2009).

#### **2.4.4 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro***

El estudio de nuevos compuestos con potencial efecto antioxidante cada vez adquiere más relevancia en los campos de la biología, la nutrición, la industria alimentaria y la medicina, lo que hace necesaria la existencia de métodos *in vitro* simples, rápidos y sobre todo, fiables, para la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos ya sea en su forma pura (moléculas aisladas) o compleja (alimentos o muestras biológicas) (UGARTONDO, 2009).

##### **2.4.4.1 Ensayos de capacidad secuestradora de radicales peroxilo (ROO·)**

UGARTONDO (2009) indica que éste método mide la habilidad de un antioxidante para secuestrar radicales peroxilo por transferencia de un átomo de hidrógeno. Los generadores de radicales peroxilo más utilizados son los compuestos azo termolábiles 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorido (AAPH) soluble en agua y el 2,2'-azobis(2,4- dimetilvaleronitrilo) (AMVN), liposoluble; entre estos ensayos destacan:

- **Ensayo TRAP** (total radical-trapping parameter): Se desarrolló para medir el estado antioxidante del plasma humano. Los radicales peroxilo oxidan

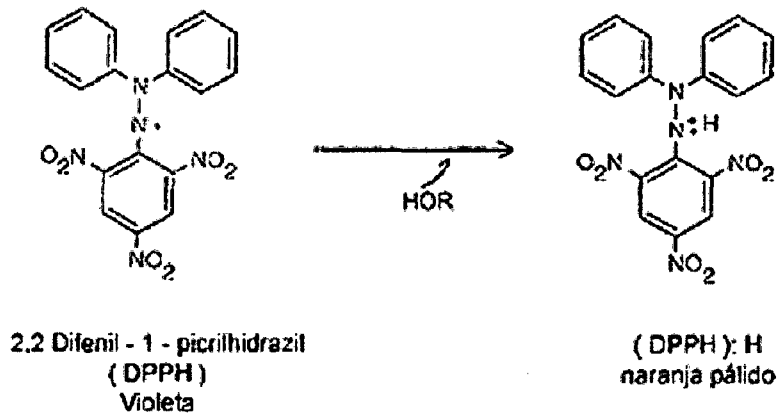
antioxidantes del plasma y la oxidación y su inhibición se miden por absorción de oxígeno, como antioxidante de referencia se usa el Trolox (derivado sintético de la Vitamina E).

- **Método TOSC** (total oxyradical scavenging capacity): Se basa en la oxidación del ácido  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -metiolbutírico a etileno por radicales generados por el AAPH. La formación de etileno es inhibida por los antioxidantes y puede determinarse por cromatografía de gases.

- **Ensayo ORAC** (oxygen radical absorbance capacity): Mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente como la fluoresceína sometida a un flujo constante de radicales peroxilo generados por el AAPH. La protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia.

#### **2.4.4.2 1,1 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)**

Es un radical libre estable y se utiliza como indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto que posea actividad antioxidativa. El principio del método de DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (ejemplo compuesto fenólico) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazina y una especie radical. En este proceso, la reacción desarrolla un cambio de color de violeta a amarillo o naranja pálido, a medida que disminuye la absorbancia detectable a 515 nm. (Lebeau *et. al.*, 2000).



**Figura 4.** Reacción del radical DPPH con un medio antioxidante.

#### 2.4.5 Selección de antioxidantes

BADUI (1997) indica que las principales consideraciones que se deben tomar en cuenta al seleccionar un antioxidante son las siguientes:

- **Potencia:** cada uno de ellos presenta una capacidad o potencia para inhibir la rancidez en un determinado sistema lipídico lo cual depende de la facilidad de donación de protones de acuerdo con su molécula y del medio que lo rodea.
- **Solubilidad:** los compuestos deben tener una relación hidrófila/ lipófila que determina su solubilidad.
- **Tendencia a la coloración:** en determinadas circunstancias los antioxidantes llegan a producir compuestos coloridos indeseables en los alimentos en presencia de otros compuestos; por otra parte los propios antioxidantes pueden oxidarse, polimerizarse y generar complejos propiamente oscuros, esta transformación se acelera con la luz y las altas temperaturas, pero generalmente no disminuye su poder protector.
- **pH del alimentos:** generalmente los antioxidantes fenólicos tienen más carácter ácido que básico, por lo que son más compatibles en productos con pH menores de 7.

- **Temperatura del proceso:** cada antioxidante tiene una temperatura a la que se volatiliza, lo cual es preciso tomar en cuenta para elegir un determinado tratamiento a la que se someterá al alimento.
- **Estabilidad en el almacenamiento:** es necesario considerar que los antioxidantes sufren cambios químicos en el almacenamiento y que sus soluciones llegan incluso a cristalizar lo que ocasiona una reducción de su poder.

## 2.5 Radicales libres

UGARTONDO (2009) indica que los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado (aquél que ocupa una órbita atómica o molecular por sí mismo), pueden existir de forma independiente y que, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media. La generación de RL no se ha de relacionar siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos.

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término Especies Reactivas del Oxígeno (reactive oxygen species, ROS) como nombre colectivo para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y/o

fácilmente convertibles en radicales (la presencia de un “ · ” en una especie reactiva indica que ésta posee un electrón no apareado, es decir, que es un radical). De forma análoga existen Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS), del Cloro (RCIS) y del Bromo (RBrS).

**Cuadro 3.** Especies reactivas del oxígeno y sus principales características

Radical	Nombre	Características
$O_2^{\cdot -}$	Superóxido	Es muy reactivo en un medio hidrofóbico pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas pueden transformarse en peróxido de hidrógeno.
$^{\circ}OH$	Hidroxilo	Es el más reactivo y se le ha relacionado con el daño sufrido directamente al ADN, proteínas y lípidos.
$H_2O_2$	Peróxido de Hidrógeno	No es un radical pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos, como el fierro y el cobre.
$ONOO^{\cdot -}$	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado con la patología de varios desordenes neurodegenerativos, con la enfermedad de alzheimer
$O_2$	Oxígeno simple	Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido durante la lipoperoxidación. Juega un papel importante en los procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y desordenes degenerativos.

FUENTE: GONZALEZ - TORRES *et al.* 2000

### 2.5.1 Mecanismo de acción de los radicales libres

El mecanismo de "ataque" a las estructuras biológicas se inicia cuando el RL le sustrae un átomo de hidrógeno o alternativamente un electrón, a la molécula diana, lo que convertirá al electrón no apareado del radical en un par de electrones más estable. Dado que desde un punto de vista electroquímico la molécula que pierde el hidrógeno o el electrón se oxida, los RL y RS se conocen como (pro)oxidantes.

Una de las principales dianas de los procesos de oxidación inducidos por los radicales libres son los ácidos grasos poliinsaturados presentes, mayoritariamente, en las membranas celulares. El daño a los lípidos consta de tres etapas, iniciación, propagación y terminación. La reacción de oxidación se inicia cuando el ácido graso diana pierde un átomo de hidrógeno convirtiéndose así en un radical lipídico. Este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar su estabilidad y reacciona rápidamente con el oxígeno, creando un radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). Este radical peroxilo dará lugar a un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrógeno de un segundo ácido graso y así sucesivamente en lo que constituye la etapa de propagación. Esta cadena de reacción se conoce como peroxidación lipídica (LPO) y se va prolongando por el paso continuo de un electrón desapareado de una molécula a otra. La reacción en cadena finalizará cuando se cumpla alguna de las siguientes condiciones, (1) se consume una de las moléculas reactivas, es decir, los ácidos grasos o el oxígeno, (2) se forma un radical relativamente poco reactivo o (3) dos radicales al reaccionar forman un par no radical. Entre los productos formados durante la peroxidación

lipídica se incluyen el 4-hidroxi-2-alquenal y el malondialdehído (MDA); este último presenta una elevada capacidad de reaccionar con las bases de ADN, por lo que puede causar lesiones mutagénicas que pueden estar implicadas en la patogenia de varias enfermedades (UGARTONDO, 2009).

### **2.5.2 Generación de radicales libres**

La mitocondria es el principal productor radicales libres (RL) o más modernamente llamados especies reactivas de oxígeno (ERO), ya que la respiración celular se verifica específicamente a este nivel. Como se sabe el 90% del total del oxígeno inhalado se consume en la mitocondria y alrededor del 2 % del oxígeno reducido se transforma en el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Otra fuente de este radical son los fagocitos activados que producen el superóxido como mecanismo protector frente a agentes u organismos extraños. Por otros mecanismos el superóxido se transforma en el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), que es aun más reactivo que el anterior. Otro radical libre fisiológico es el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), que se produce en el endotelio vascular como factor relajante. Este puede transformarse en peróxido nítrico (ONOO) que contribuye en gran medida a lesiones de tipo oxidativo en múltiples enfermedades (LIMA, 2002).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se ejecutó en el laboratorio del Centro de investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS); ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Latitud Oeste ,con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84% y temperatura media anual de 24 °C.

#### 3.2. Materia prima

La materia prima usada fue pulpa de guayaba de tres ecotipos (rojo, blanca y rosada) recolectadas de huertas familiares ubicadas en la provincia de Leoncio Prado, los frutos se transportaron en cestas de plástico hasta el laboratorio.



(a) (b) (c)  
**Figura 5.** Ecotipos de guayaba: rojo(a), blanco (b) y rosado (c)

### **3.3. Equipos, materiales y reactivos**

#### **3.3.1. Equipos de laboratorio**

- Equipo de HPLC (Shimadzu Scientific, MD, USA.).
- Espectrofotómetro modelo Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation).
- Balanza analítica modelo AE 163 (METLER TOLEDO, Switzerland).
- Estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS Heating Drying Oven).
- Congelador FFV-2065FW (Frigidaire, USA).
- Desionizador modelo D 7035 (Barnstead).
- Agitador magnético modelo 625 standard (VWR™ hotplate/stirrer).
- Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industries SI™).
- Baño maría modelo YCW-010E (Associated With Cannic, Inc, USA).
- Refrigeradora Icebeam Door Cooling LG GR-5392QLC.

#### **3.3.2. Materiales**

##### **3.3.2.1 Materiales de vidrio**

- Matracas erlenmeyer de 250 ml.
- Vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 1 000 ml.
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 ml.
- Micropipetas 10 – 50 µl, 20-200 µl y 100-1 000 µl.
- Tubos de ensayo Gene Mate® de 10 ml.
- Fiolas de 50, 100, 500 y 1 000 ml.
- Probetas graduadas de 10, 100, 250 y 500 ml.

### 3.3.2.2 Otros materiales

- Cubetas de poliestireno, Gene Mate® (1cmx 1cmx4.5cm).
- Tips, FISHERBRAND® (1 000ul, 200ul).
- Microtubos (1,5 -2,00 ml).
- Filtros de membrana de 2 mm y 0,2 µm.
- Espátulas.
- Gradillas.
- Sujetadores de balones.

### 3.3.3. Reactivos y solventes

- L(+) ácido ascórbico puro, Sigma Chemical
- (+)-catequin, Sigma Chemical
- 2,2-Diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azinobis (3-etilenbenzotiazolino-6 ácido sulfónico) (ABTS; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azobis-aminodinopropano (ABAP; Sigma Aldrich, USA)
- Fosfato de potasio dihidrogenado (Scharlau, UE).
- Ácido orthofosfórico (Scharlau, UE)
- Etanol (grado HPLC), Sigma Chemical
- Metanol (grado HPLC), Sigma Chemical
- Etanol absoluto al 96% y 80 %.
- Folin-ciocalteus, Merck. Germany.
- Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) p.a. ISO. Scharlau.
- Hidróxido de Sodio (NaOH) en lentejas p.a. ISO. Merck. Germany.

- Agua destilada desionizada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>).

### **3.4. Métodos de análisis**

#### **3.4.1. Cuantificación de vitamina C**

Se procedió de acuerdo al método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de ácido ascórbico de frutas descrito por GO"KMEN *et al.* (2000). Se utilizó como fase móvil una solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,2 M ajustado a un pH de 2,4 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y a una tasa de flujo (flow - rate) de 0.5 ml/min., la detección fue a una longitud de onda de 254 nm del espectro UV-VIS.

#### **3.4.2. Cuantificación de polifenoles**

Se realizó mediante el método de espectrofotometría de absorción molecular desarrollado por Folin y Ciocalteu con modificaciones descrito por SANDOVAL *et al.* (2001), se preparó soluciones stocks de 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mL) y 1 mM ácido gálico en metanol (grado HPLC) (10 mL); a partir del stock de ácido gálico (AG) se preparó concentraciones de 1, 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 y 0,03125 µg/mL, se agregó a cada tubo 1,58 mL de agua desionizada y 20 µL de muestra, control y estándares, se homogenizó ligeramente. Luego se agregó 100 µL de solución de fenol Folin-Ciocalteu a cada muestra, control y estándares, a estas mezclas se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutralizó la reacción agregando 300 µL de 20% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y finalmente se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, para una completa reacción; para determinar la cantidad de compuestos fenólicos producidos durante la reacción,

se agregó 1 mL de muestra, control o estándar en una cubeta de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4.5 cm) y fue leída la absorbancia a 700 nm.

### **3.4.3. Determinación de la actividad antioxidante**

#### **3.4.3.1. Determinación del Coeficiente de Inhibición (IC<sub>50</sub>) radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH)**

Se siguió el método descrito por YAMAGUCHI *et al.* (1998), se preparó una solución stock de DPPH a 1mM (0,004g de DPPH en 10 ml de metanol grado reactivo) y se almacenó a 4°C protegido de la luz, a partir de este stock se preparó una solución de trabajo de DPPH (200 µM) que sirvió para hacer reaccionar con las muestras. La inhibición del radical DPPH fue determinado por la adición de 500 µl de extracto a 500 µl de la solución stock del radical DPPH (200 µM), inmediatamente se procedió a las lecturas de absorbancia a 414 nm cada 30 s por 10 min.; a medida que hay un mayor secuestro de los radicales por un antioxidante, la absorbancia disminuye. Para la determinación del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%InhibicionDPPH = \left[ \frac{(AbsControl - AbsMuestra)}{AbsControl} \right] \times 100$$

Abs Control: es la absorbancia a tiempo = 0 min y Abs Muestra: es la absorbancia a tiempo = 10 min.

#### **3.4.3.2. Determinación Coeficiente de Inhibición (IC<sub>50</sub>) radical peroxilo**

Se procedió de acuerdo al método de TRAP (poder total de actividad reductora), modificado por SANDOVAL *et al.* (2002). Se preparó soluciones stock en agua destilada desionizada (H<sub>2</sub>O dd) de ABTS a 2,25 mM y

ABAP a 20 mM, también se preparó una solución buffer fosfato a pH 7,4 (PBS) con cloruro de sodio (NaCl) a 154 mM, fosfato de sodio heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 2,7 mM y fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 1,5 mM. La preparación de radical peroxilo consistió en mezclar 10 ml de solución de ABTS, 10 ml ABAP y 80 ml de PBS (pH 7,4), se incubó a 70°C en baño maría por 15 minutos y se dejó enfriar durante 5-10 minutos. La Inhibición del radical peroxilo fue determinado por la adición de 50  $\mu\text{l}$  a 950  $\mu\text{l}$  de la solución stock del radical peroxilo, inmediatamente se procedió a las lecturas de absorbancia a 414 nm cada 30 s por 10 min.

Para la determinación del porcentaje de inhibición se utilizó la

siguiente ecuación:  $\%InhibicionPeroxilo = \left[ \frac{(AbsControl - AbsMuestra)}{AbsControl} \right] \times 100$

Abs Control: es la absorbancia a tiempo = 0 min y Abs Muestra: es la absorbancia a tiempo = 10 min.

### 3.5. Metodología experimental

#### 3.5.1. Selección de la materia prima

Se seleccionó tres ecotipos de guayaba (rojo, blanco y rosado) y de cada ecotipo se tomó dos estados de madurez (pintón y maduro), considerándose pintón a aquellos frutos que presentan del 60 – 65 % de coloración amarilla con  $8,5 \pm 0,3$  °Bx y maduros a aquellos frutos con un 100% de coloración amarilla con  $10 \pm 0,3$  °Bx; solo fueron evaluados los frutos sanos (libre de ataque de mosca de la fruta).

### 3.5.2. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra consistió en obtener la pulpa del fruto, para ello los frutos se pelaron con la finalidad de separar la piel (epicarpio) del casco (mesocarpio); luego la fracción obtenida se hizo pasar por un tamiz (colador) obteniendo solo pulpa pura (libre de pepa, fibras y otros). De la pulpa obtenida se tomó 5 g, se diluyó en 50 ml de etanol y se dejó reposar por 24 h, luego se filtra con papel Whatman 150 mm (pasada rápida). El extracto obtenido fue puesto en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para sus análisis posteriores.



Figura 6. Preparación de la muestra

### 3.5.3. Cuantificación de vitamina C

#### 3.5.3.1. Determinación de la curva estándar

Se preparó una solución estándar de ácido ascórbico de 1000  $\mu\text{g/ml}$  a partir de la cual se obtuvieron soluciones estándares diluidas de 1, 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Se inyectó 20  $\mu\text{l}$  de cada solución en el HPLC y se realizó las lecturas durante 15 min a una longitud de onda de 254 nm. Se utilizó el software Class – VP del sistema del HPLC para obtener la ecuación generada por el software la cual es usada para determinar la cantidad de ácido

ascórbico presente en el extracto de pulpa de guayaba.

### **3.5.3.2. Cuantificación de vitamina C en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba**

Para la cuantificación de vitamina C, el extracto utilizado para el análisis correspondió a 100 mg/ml, se realizó un microfiltrado con una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ , para la inyección se utilizó 20  $\mu\text{l}$  de extracto y la lectura se realizó a 254 nm. Se procedió de acuerdo al método descrito por GO'KMEN *et al.* (2000) la distribución de los tratamientos se presenta en la figura 7.

### **3.5.4. Cuantificación de polifenoles totales**

#### **3.5.4.1. Determinación de la curva estándar**

Para la determinación de la curva estándar de polifenoles se procedió de acuerdo a la metodología de Folin y Ciocalteu con modificaciones descrito por SANDOVAL *et al.* (2001); para ello se preparó una solución stock de ácido gálico a 1  $\mu\text{M}$  a partir de la cual se prepararon diluciones de 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 y 0,03125 mg equivalente AG/100g, cada dilución se preparó por triplicado.

#### **3.5.4.2. Cuantificación de polifenoles totales en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba**

Para la cuantificación de polifenoles totales, se procedió de acuerdo a la metodología de Folin y Ciocalteu con modificaciones descrito por SANDOVAL *et al.* (2001), el extracto utilizado para el análisis correspondió a

100 mg/ml, las absorbancias registradas de las muestras de pulpa de guayaba fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar, obteniendo la cantidad de polifenoles totales expresados en (mg equivalente AG/100g) y se siguió el diseño experimental presentado en la figura 7.

### **3.5.5. Determinación de la actividad antioxidante.**

#### **3.5.5.1. Determinación del Coeficiente de Inhibición ( $IC_{50}$ ) radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH) en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba**

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el radical DPPH se realizó mediante el método de YAMAGUCHI (1998), el extracto utilizado para el análisis correspondió a 100 mg/ml a partir de este se prepararon soluciones de trabajo (soluciones intermedias) cuyas concentraciones variaron de acuerdo al ecotipo y estado de madurez de la guayaba, el porcentaje de inhibición obtenido con cada una de las concentraciones de las muestras de pulpa de guayaba fue utilizado para determinar el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) para el radical DPPH, este coeficiente indica la cantidad de pulpa de guayaba en mg/ml, requerido para inhibir el 50 % del radical libre DPPH y se siguió el diseño experimental fig. 7.

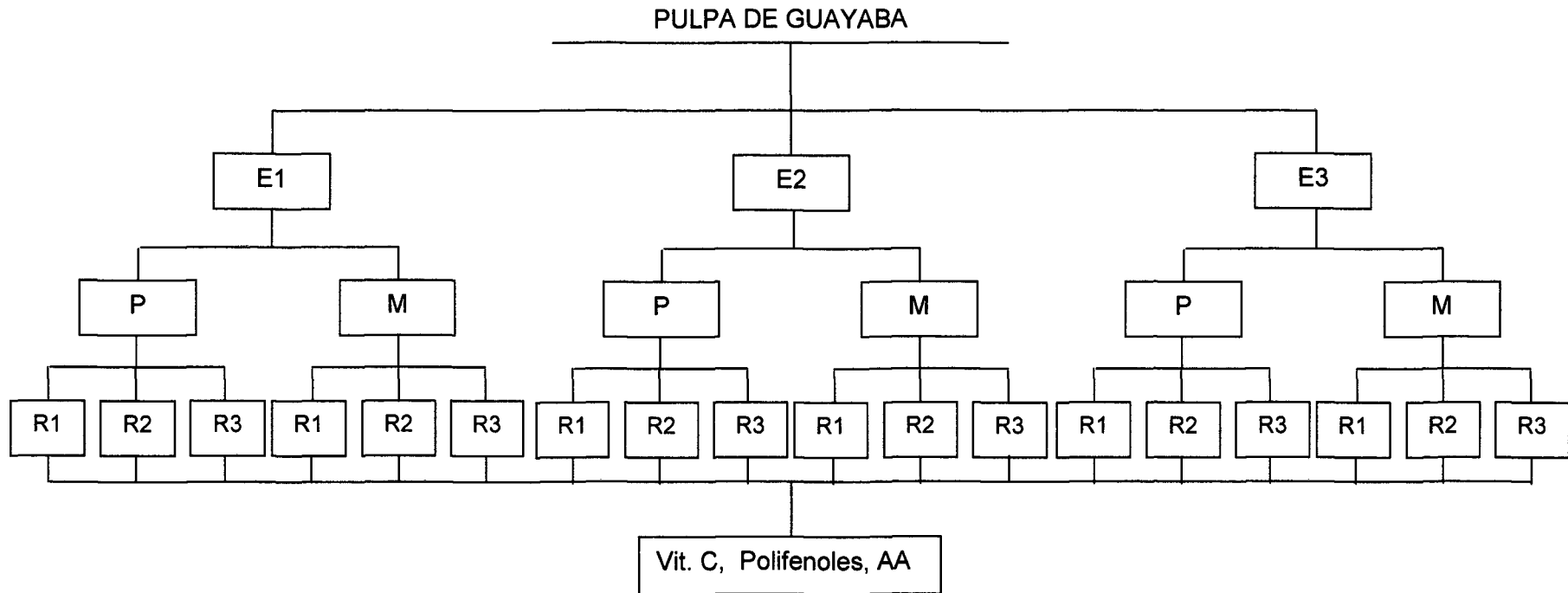
#### **3.5.5.2. Determinación Coeficiente de Inhibición ( $IC_{50}$ ) radical peróxilo en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba**

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el radical peróxilo se realizó mediante el método TRAP (poder total de actividad reductora), modificado por SANDOVAL *et al.* (2002). El extracto utilizado para

el análisis correspondió a 100 mg/ml a partir del cual se prepararon soluciones de trabajo (soluciones intermedias) cuyas concentraciones variaron de acuerdo al ecotipo y estado de madurez de la guayaba. El radical peroxilo inicia una decoloración de verde a blanco, inmediatamente después de reaccionar con la muestra, esto se refleja en la absorbancia que es medido a 515 nm cada 30 s por 10 min y se siguió el diseño experimental figura 7.

### **3.5.6. Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa tratada térmicamente del mejor ecotipo de guayaba**

Se seleccionó la pulpa de guayaba del ecotipo y estado de madurez que mejor resultado de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante mostró, fue sometida a dos tratamientos térmicos 55 °C /2 h y 70 °C/1 h respectivamente, con los productos obtenidos se prepararon los extractos etanólicos a una concentración de 100 mg/ml, los cuales fueron congelados hasta realizar los análisis correspondientes como se puede observar en la figura 8.



Donde:

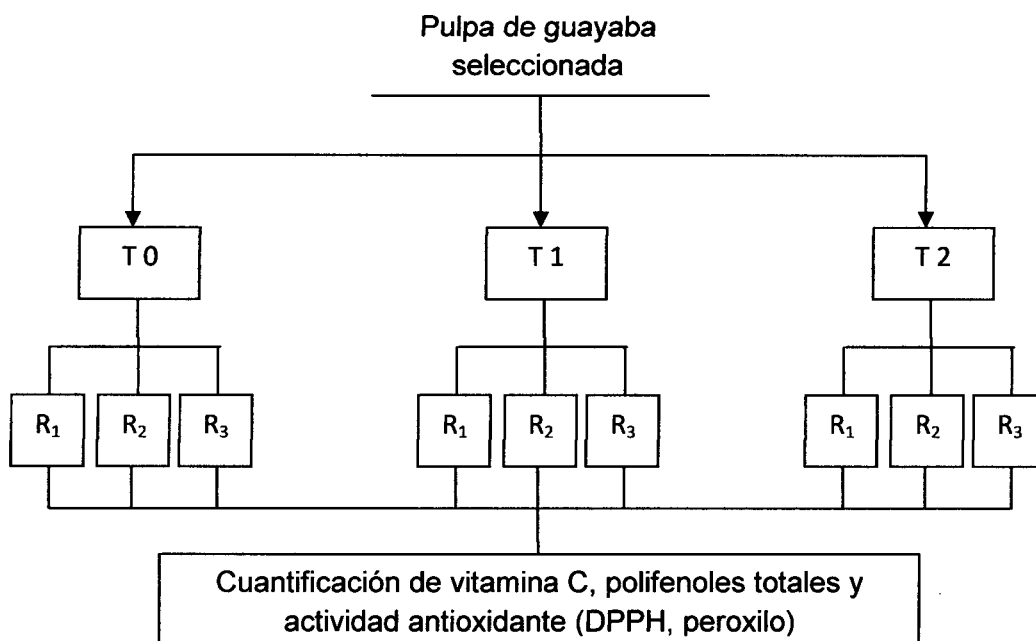
$E_1, E_2, E_3$  = ecotipo rojo, blanco y rosado

P, M = Estado de madurez pintón y maduro

AA = Resultados de la evaluación actividad antioxidante Vit. C = Resultados de la evaluación vitamina C

Polifenoles = Resultados de la evaluación de polifenoles Repeticiones = R1, R2, R3

**Figura 7.** Diseño experimental para la cuantificación de Vitamina C, polifenoles y actividad antioxidante en tres ecotipos de guayaba.

**Donde:**

T0 = Pulpa sin tratamiento

T1 = Pulpa tratada térmicamente 55°C/2h

T2 = Pulpa tratada térmicamente 70°C/1h

R1, R2, R3 = Repeticiones

**Figura 8.** Diseño experimental para la cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa seleccionada.

## IV. RESULTADOS

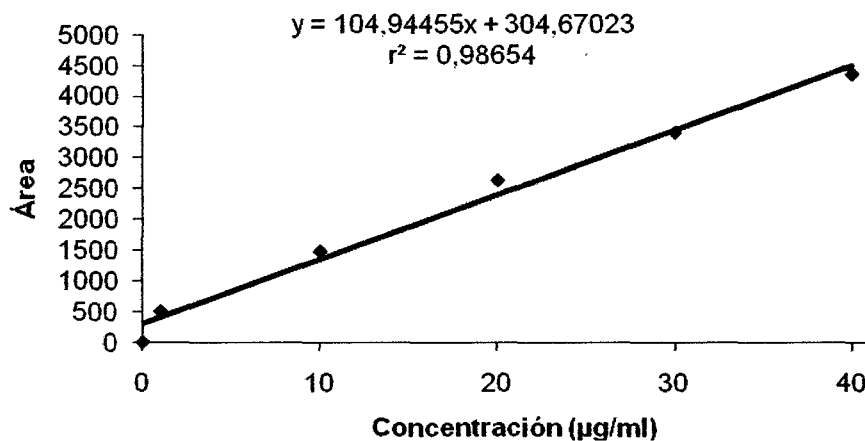
### 4.1 Cuantificación de vitamina C

#### 4.1.1 Determinación de la curva estándar

La curva estándar para la cuantificación de vitamina C se elaboró con ácido ascórbico, en el cuadro 4 y figura 9 se presenta los resultados expresados en  $\mu\text{g/ml}$ .

**Cuadro 4.** Resultados de las absorvacias para la curva estándar de vitamina C.

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Área	Tiempo retención (min)	Absorvancia ( $\text{m}\mu\text{A}$ )
1	506 360	8,502	59 090
10	1 484 880	8,552	173 823
20	2 644 306	8,570	262 273
30	3 420 599	8,552	371 106
40	4 371 276	8,598	498 495



**Figura 9.** Comportamiento de la curva estándar de vitamina C

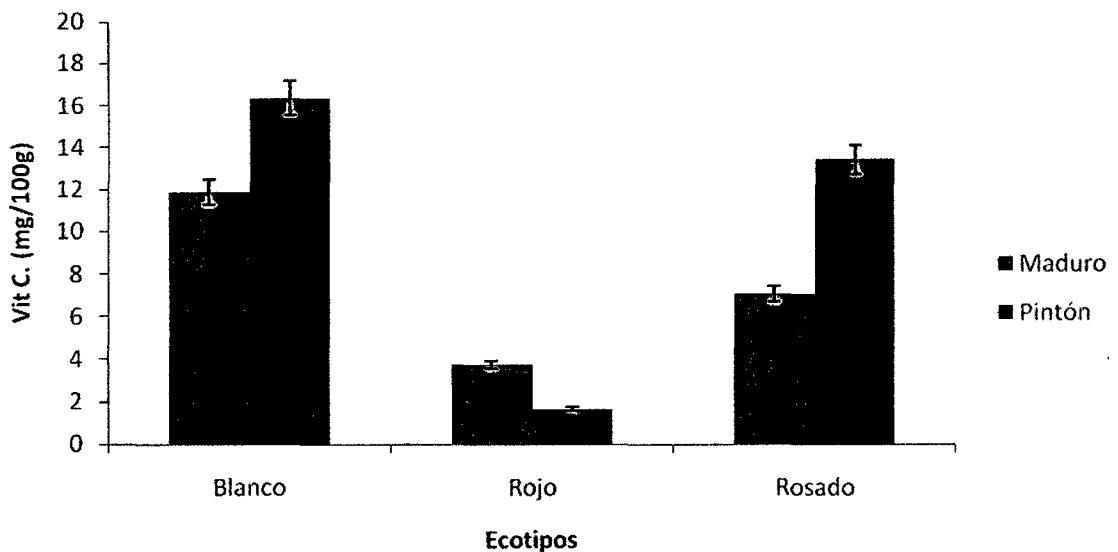
#### 4.1.2 Cuantificación de vitamina C en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba

La cuantificación de vitamina C se realizó en la pulpa fresca de guayaba de los ecotipos blanco, rojo y rosado, estos resultados se presentan en el cuadro 5 y figura 10.

**Cuadro 5.** Cuantificación de Vitamina C en tres ecotipos de pulpa de guayaba.

Ecotipo	Vitamina C (mg/100 g)	
	Maduro	Pintón
Blanco	11,88 ± 0,58 <sup>b</sup>	16,35 ± 0,30 <sup>a</sup>
Rojo	3,74 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,09 <sup>b</sup>
Rosado	7,08 ± 0,62 <sup>b</sup>	13,42 ± 0,51 <sup>a</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma fila con superíndices diferentes son significativos (p<0,05)



**Figura 10.** Contenido de vitamina C en pulpa fresca de guayaba.

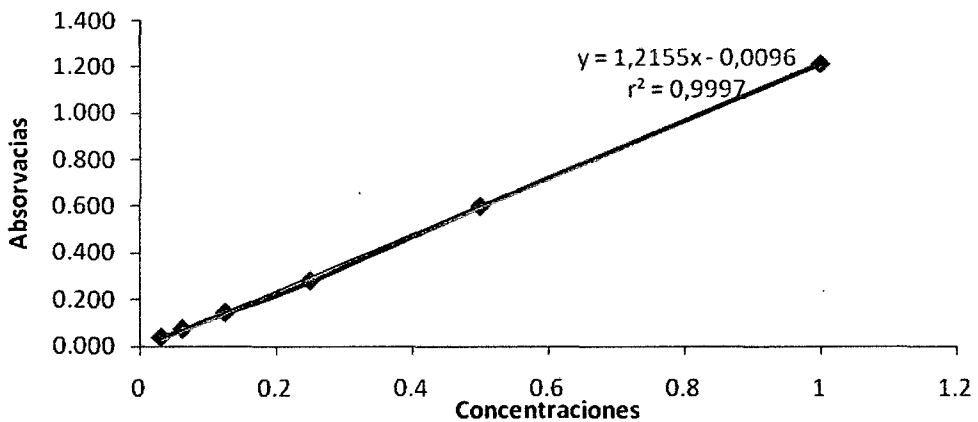
## 4.2 Cuantificación de polifenoles totales

### 4.2.1 Determinación de la curva estándar

La curva estándar para la cuantificación de polifenoles se realizó con el ácido gálico expresado como (mg/ml), las concentraciones consideradas fueron 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 y las lecturas se realizaron a 700 nm, los resultados se presentan en el cuadro 6 y figura 11.

**Cuadro 6.** Resultados de las absorvancias para la curva estándar de polifenoles totales (mg equiv. AG/100g).

Concentraciones (mg AG/ml)	Absorvancia (700nm)			Promedio
	r1	r2	r3	
1	1,209	1,219	1,200	1,209
0,5	0,589	0,608	0,596	0,598
0,25	0,277	0,272	0,289	0,279
0,125	0,145	0,141	0,14	0,142
0,0625	0,073	0,071	0,07	0,071
0,03125	0,025	0,033	0,024	0,027



**Figura 11.** Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.

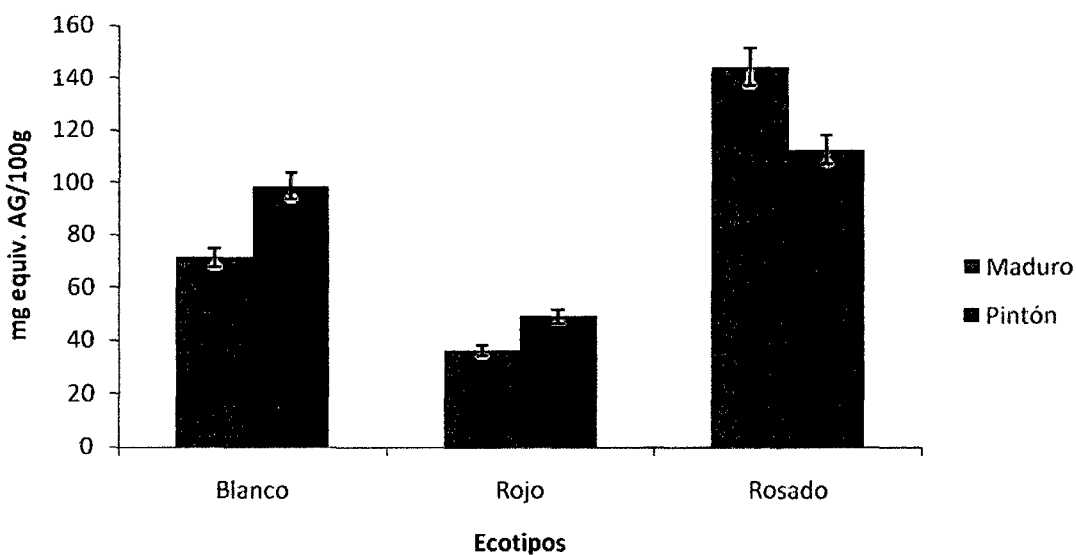
#### 4.2.2 Cuantificación de polifenoles totales en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba

En el cuadro 7 y figura 12 se presentan los resultados de la cuantificación de polifenoles totales en la pulpa fresca de guayaba.

**Cuadro 7.** Cuantificación de polifenoles totales en ecotipos de pulpa de guayaba.

Ecotipo	Polifenoles totales (mg equiv. AG/100g)	
	Maduro	Pintón
Blanco	71,246 ± 0,863 <sup>b</sup>	98,560 ± 1,694 <sup>a</sup>
Rojo	36,199 ± 1,059 <sup>b</sup>	49,033 ± 1,072 <sup>a</sup>
Rosado	143,973 ± 1,181 <sup>a</sup>	112,546 ± 1,434 <sup>b</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=5) valores de una misma fila con superíndices diferentes son significativos (p<0,05).



**Figura 12.** Contenido de polifenoles totales en ecotipos de pulpa de guayaba.

### 4.3 Determinación de la actividad antioxidante

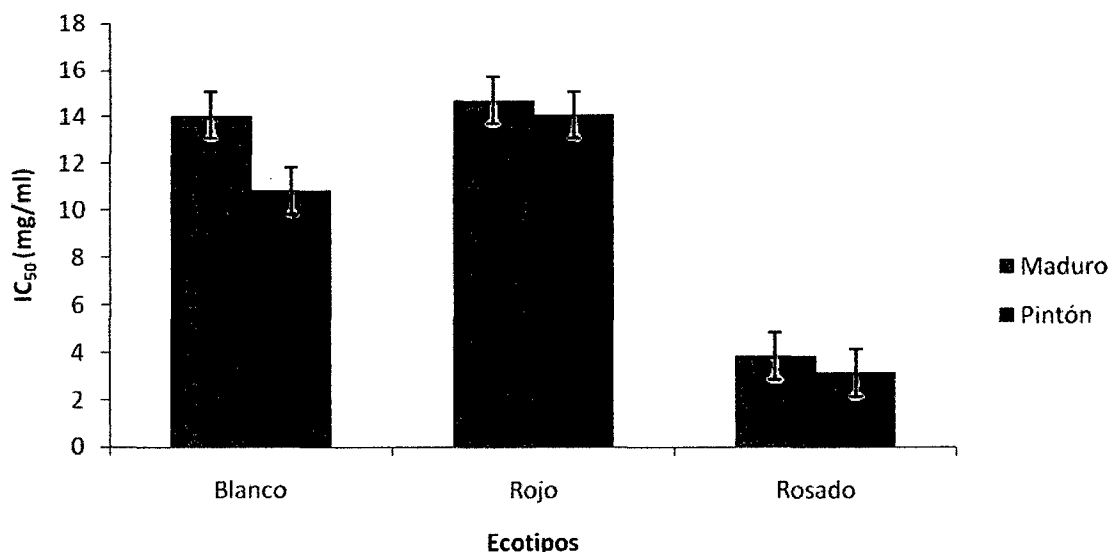
#### 4.3.1 Determinación Coeficiente de Inhibición (IC<sub>50</sub>) radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH) en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba

La determinación del coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) con el radical DPPH en la pulpa fresca de los ecotipos blanco, rojo y rosado de guayaba se presenta en el cuadro 8 y figura 13.

**Cuadro 8.** Determinación IC<sub>50</sub> con el radical DPPH en ecotipos de pulpa de guayaba.

Ecotipo	Actividad antioxidante IC <sub>50</sub> (mg/ml)	
	Maduro	Pintón
Blanco	14,055 ± 0,22 <sup>a</sup>	10,834 ± 0,21 <sup>b</sup>
Rojo	14,727 ± 0,21 <sup>a</sup>	14,090 ± 0,16 <sup>b</sup>
Rosado	3,841 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,158 ± 0,11 <sup>b</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma fila con superíndices diferentes son significativos (p<0,05).



**Figura 13.** Coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) con el radical DPPH en ecotipos de pulpa guayaba.

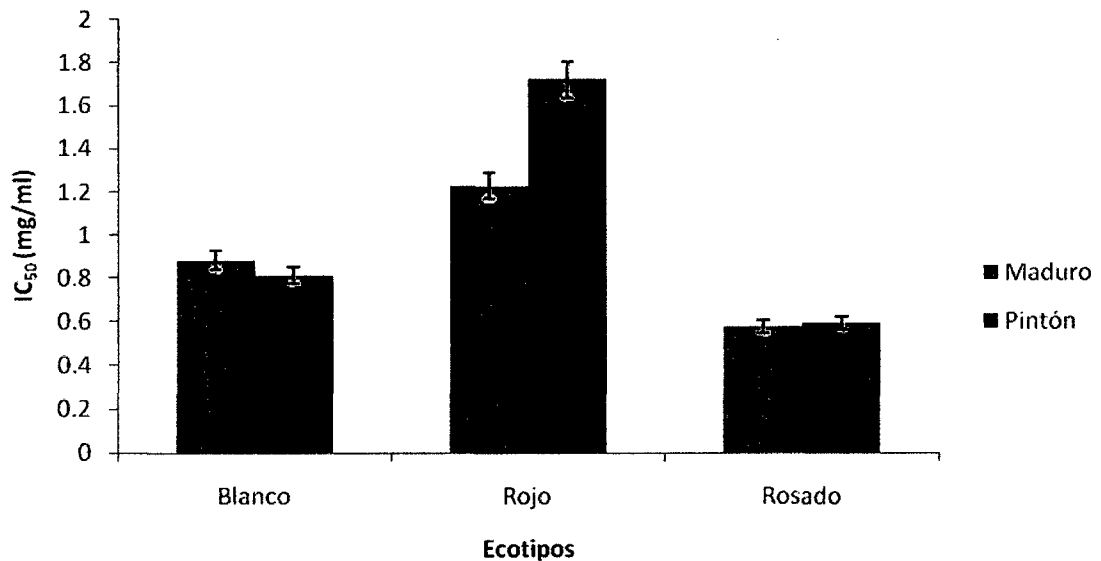
#### 4.3.2 Determinación Coeficiente de Inhibición (IC<sub>50</sub>) radical peroxilo en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba.

La determinación de IC<sub>50</sub> con respecto al radical peróxilo en la pulpa fresca de los 3 ecotipos de guayaba se presenta en el cuadro 9 y figura 14.

**Cuadro 9.** Determinación IC<sub>50</sub> con el radical peroxilo en ecotipos de pulpa de guayaba.

Ecotipo	Actividad antioxidante IC <sub>50</sub> (mg/ml)	
	Maduro	Pintón
Blanco	0,881 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,813 ± 0,006 <sup>b</sup>
Rojo	1,228 ± 0,007 <sup>b</sup>	1,721 ± 0,014 <sup>a</sup>
Rosado	0,574 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,593 ± 0,009 <sup>a</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma fila con superíndices diferentes son significativos (p<0,05).



**Figura 14.** Coeficiente de inhibición (IC<sub>50</sub>) con el radical peroxilo en ecotipos de pulpa guayaba.

#### 4.4 Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa tratada térmicamente.

Los resultados de los análisis de cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba rosada estado maduro se presentan en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa tratada térmicamente.

Tratamiento	Vitamina C (mg/100g)	Polifenoles totales (mg equiv. AG/100g)	Actividad Antioxidante IC <sub>50</sub> (mg/ml)	
			DPPH	Peroxilo
Pulpa fresca	7,08±0,51 <sup>a</sup>	143,97±1,18 <sup>a</sup>	3,84±0,10 <sup>c</sup>	0,57±0,01 <sup>a</sup>
55°C/ 2 h	3,81±0,25 <sup>b</sup>	69,59±0,15 <sup>b</sup>	7,00±0,13 <sup>a</sup>	0,59 ±0,01 <sup>a</sup>
70°C/ 1 h	3,78±0,49 <sup>b</sup>	68,52±0,15 <sup>b</sup>	6,46±0,07 <sup>b</sup>	0,57±0,01 <sup>a</sup>

Los valores representan (promedio ± SEM) los datos provienen del experimento (n=3, n=5 y n=9) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos (p<0,05).

## V. DISCUSION

### 5.1 Cuantificación de vitamina C

#### 5.1.1 Determinación de la curva estándar

Para la determinación del contenido de vitamina C por HPLC en la pulpa fresca de guayaba se elaboró una curva patrón utilizando como estándar ácido áscorbico con concentraciones fueron de 1 a 40  $\mu\text{g/ml}$ , las absorvancias fueron medidas a 254nm. En el cuadro 4 se presenta el área de la curva estándar para cada concentración y el tiempo de retención en minutos. En la figura 9 se presenta el diagrama de dispersión de las absorvancias y como se puede observar la unión entre cada punto describe una línea recta, matemáticamente es una ecuación de primer orden, a este comportamiento se le conoce como línea de correlación. Al respecto MURRAY (1969) indica que la correlación o el grado de relación entre las variables se estudia para determinar en que medida una ecuación lineal o de otro tipo describe o explica de una forma adecuada la relación entre variables.

En la misma figura se observa que existe una correlación positiva ya que un incremento en el nivel de concentración ( $x$ = concentración  $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico) se relaciona con un incremento en el nivel de absorvancia ( $Y$ = resultados de absorvancia). MURRAY (1969) indica que si "Y" tiende a incrementarse cuando de incrementa "X" la correlación se dice positiva o

correlación directa. Este comportamiento dio como resultado un valor de  $r^2=0,9856$ ; al respecto WEBSTER (2000), menciona que entre mayor sea el valor absoluto de "r" mas fuerte será la relación entre "x" y "y". Así mismo, HERNANDEZ *et.al.*, (2001) indica valores cercanos a 1 se considera ajustes casi perfectos, esto indica que tiene una buena estimación de ajuste de los datos o la capacidad predictiva de los datos ajustados a la variable total explicativa del modelo.

El patrón utilizado fue ácido ascórbico, SANDAR (2007) refiere que el ácido ascórbico se tiene en forma natural con el L-isómero y D-isómero, este último tiene alrededor de 10% de la actividad del L- isómero y el D-isómero es adicionado a los alimentos con fines no vitamínicos; este es un ácido dibásico (pKa 4,1 y 11,8) porque sus grupos hidroxil enólico puede disociarse. Según BADUI (1988) el ácido ascórbico tiene la formula  $C_6H_8O_6$ , pm 176,13 su estructura responde a la lactona del ácido L-xilo-2-cetohexónico.

### **5.1.2 Cuantificación de vitamina C en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba**

El contenido de vitamina C en los tres ecotipos de guayaba se presentan en el cuadro 5 y figura 10, los resultados para el ecotipo blanco muestran que existe diferencia estadística significativa (A - la) entre el estado maduro y pintón, comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) se observa que en el estado de madurez pintón existe el mayor contenido de Vitamina C 16,35 mg/100 g y en el estado maduro 11, 88 mg/100 g; al respecto CAÑIZARES *et. al.* (2003) indican que generalmente los ácidos disminuyen durante la maduración ya que ellos son sustratos respiratorios o son

convertidos en azúcares, pueden ser considerados una fuente de energía y se espera que disminuya durante la fase metabólica que se desarrolla durante la maduración.

Al comparar los resultados entre los estados de madurez del ecotipo rojo se encontró diferencia estadística significativa (A - Ib); cabe resaltar que el mayor contenido se encontró en el estado maduro 3,74 mg/100 g y el estado pintón 1,66 mg/ 100 g, al respecto LIM *et al.* (2006) mencionan que el incremento de ácido ascórbico en frutas maduras es debido a ruptura de almidón a glucosa la cual es usada en la biosíntesis del ácido ascórbico.

En el ecotipo rosado se encontró diferencia estadística significativa (A - Ic) entre los estados de madurez, el mayor contenido de vitamina C se reportó en el fruto pintón 13,42 mg/100g y fue menor en el fruto maduro 7,08 mg/100 g; con respecto a los resultados obtenidos MEDINA y PAGANO (2003) mencionan que los rangos tan amplios en el contenido de ácido ascórbico en la guayaba se debe a factores como: el estado de madurez del fruto que es mayor en la guayabas verdes y ligeramente maduras declinando en las completamente maduras y su distribución en la fruta no es uniforme, su contenido es mayor en la piel y muy poco en la pulpa central.

Al comparar los ecotipos de guayaba blanco, rojo y rosado en sus dos estados de madurez se observa que el mayor contenido de vitamina C se encuentra en el ecotipo blanco estado de madurez pintón 16,35 mg/100 g y el menor se encontró el ecotipo rojo y estado de madurez pintón 1,66 mg/100g; esta variación en el contenido de vitamina C puede ser explicado por MEDINA y PAGANO (2003) quienes mencionan que la proporción en la que se encuentran

los ácidos orgánicos dependen de factores como :Localización geográfica, las practicas de cultivo, estación del año y cultivar de guayaba. Cabe resaltar que la guayaba es una fruta tropical que comercialmente en la zona no tiene valor, sin embargo GUALDRÓN y JIMENEZ (2006) indican que la vitamina C o ácido ascórbico principalmente se encuentran en cítricos y frutas tropicales, tiene propiedades antioxidantes y reductoras, es la vitamina más vulnerable ya que la destruyen múltiples factores.

## **5.2 Cuantificación de polifenoles totales**

### **5.2.1 Determinación de la curva estándar**

Para la cuantificación de polifenoles totales en la pulpa de guaya fresca fue necesario establecer una curva patrón, y se elaboró en base al ácido gálico. Las concentraciones estuvieron comprendidas entre 1 a 0,03125 mg/ml, los resultados se presentan en el cuadro 6, con los valores encontrados se procedió a realizar la curva estándar la cual se presenta en la figura 11.

Para una curva estándar se debe utilizar compuestos puros y recomendados por los protocolos de análisis, en este caso se trabajó con ácido gálico recomendado por SANDOVAL *et al.*, (2001). Según BADUI (1988) indica que el ácido gálico tiene una formula  $C_7H_6O_5$ , pm 170,12. Por otro lado, ANDREW *et al.* (1989) indican que el método de Folin-Ciocalteu permite medir fenoles totales y para la cuantificación debe crearse la curva de calibración y puede realizarse con ácido gálico (GAE), porque este es un compuesto estable y se pierde solo 5% de su valor real después de dos semanas de refrigerado y tapado.

Según los resultados de la gráfica la ecuación encontrada es de primer orden teniendo como variables “y” (absorvancia) y “x” (concentración, al

respecto CORDOVA (2 003) indica que la forma de estudio de la asociación entre las variables "x" e "y" es la regresión, que consiste en determinar una relación funcional (recta de regresión) entre ellas, con el fin de que se pueda predecir el valor de una variable en base a la otra. El valor de  $r=0,9997$  indica que existe una relación positiva muy fuerte o casi perfecta (HERNANDEZ *et al.*, 2001).

### **5.2.2 Cuantificación de polifenoles totales en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba**

La cuantificación de polifenoles totales en los ecotipos de guayaba blanco, rojo y rosado en los estados de madurez maduro y pintón, se presentan en el cuadro 7 y la figura 12. Con respecto a estos resultados para el ecotipo blanco se encuentra que existe diferencia estadística significativa (A - Ila) entre el estado maduro y pintón, comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) se observa que el estado de madurez pintón se encuentra la mayor concentración de polifenoles totales 98,560 mg equiv. AG/100g y el menor contenido fue en fruto maduro 71,246 mg equiv. AG/100g, al respecto MUÑOZ *et.al.*, (2007) indican que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (ejm. flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavononas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc), estos compuestos fenólicos actúan como agentes protectores frente a patógenos, radiaciones UV, entre otros. VARGAS *et.al.*, (2006) en su investigación encontraron flavonoles y flavononas en frutos pero en menor concentración que en hojas.

Con respecto al ecotipo rojo en los dos estados de madurez se encontró diferencia estadística (A- IIb) comparando los resultados se aprecia que el estado pintón tiene el mayor contenido de polifenoles totales 49,033 mg equiv. AG/100g y en el fruto maduro el contenido de polifenoles fue 36,199 mg equiv. AG/100g; según LIM *et.al.*, (2006) indican que la disminución del contenido de polifenoles en la fruta de la guayaba causa la pérdida de astringencia durante la maduración del fruto. OJEDA (2007) indica que los taninos juegan un rol importante tanto en el plano organoléptico como nutricional, fisiológico y farmacológico. Su capacidad de formar complejos con las proteínas es el origen de sus múltiples propiedades, principalmente la propiedad de astringencia percibida en la cavidad bucal. Así mismo AYMOTO *et.al.*, (2005) comparando los ecotipos blanco y rojo encuentra el blanco tiene mayor contenido de polifenoles 160 mg equiv. AG/100g y la guayaba roja 124 mg equiv. AG/100g.

En el ecotipo rosado en los dos estados de madurez se encontró diferencia estadística (A - IIc), el mayor valor correspondió al estado maduro 143,973 mg equiv. AG/100g y el menor valor fue 112,546 mg equiv. AG/100g en el estado pintón; al respecto REPO DE CARRASCO y ENCINA (2 008) indican que la madurez influye directamente en el contenido de compuestos bioactivos, dado que se generan en la madurez procesos de biosíntesis los que generan mayor contenido de carotenoides, compuestos fenólicos, ácido ascórbico, etc.

Comparando los ecotipos de guayaba blanco, rojo y rosado en los estados de madurez maduro y pintón el mayor contenido de polifenoles totales se encontró en el ecotipo rosado y estado de madurez maduro 143,973 mg equiv. AG/100g. Al respecto ROJAS *et.al.*, (2008) en su investigación de fenoles totales

determinados en las variedades de guayaba pera, regional roja y blanca fueron 29,8; 50,8 y 45,6 mg equiv. AG/100g de fracción comestible respectivamente. Según THAIPONG *et.al.*, (2005) en el estudio de 4 genotipos de guayaba encontraron Allahabad safeda (pulpa blanca) 344,9 mg equiv. AG/100g, Fan retief (pulpa rosada) 300,8 mg equiv. AG/100g y Ruby supreme (pulpa rosada) 170 mg equiv. AG/100g y Advanced selection (pulpa rosada) 270,6 mg equiv. AG/100g el mismo autor afirma que existe variación entre los genotipos.

El menor contenido de polifenoles se encontró en el ecotipo rojo 36,199 mg equiv. AG/100g según MEDINA y PAGANO (2003) reportan que los rangos amplios en el contenido de polifenoles se debe a varios factores: entre ellos el estado de maduración de los frutos, la distribución en el fruto no es uniforme, la localización geográfica, las prácticas de cultivo, estación del año y el cultivar del guayabo.

Comparando el contenido de polifenoles con otras frutas tenemos según AYMOTO *et.al.*, (2005) indican para piña 67,2 mg equiv. AG/100g, manzana Gala 82 mg equiv. AG/100g; LYM *et.al.*, (2006) indica valores para banana 51 mg equiv. AG/100g, manzana de agua 35 mg equiv. AG/100g y naranja 75 mg equiv. AG/100g; KUSKOSKI *et.al.*, (2005) indica valores para guayaba 83 mg equiv. AG/100g, copoazú 20,5 mg equiv. AG/100g, maracuyá 20 mg equiv. AG/100g.

### **5.3 Determinación de la actividad antioxidante**

#### **5.3.1 Determinación Coeficiente de Inhibición ( $IC_{50}$ ) radical 2,2-diphenyl-picrilhydrazyl (DPPH) en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba.**

La guayaba es una fruta tropical poco valorada comercialmente en nuestra región, su aceptabilidad está basado en su sabor y aroma agradable,

excelente fuente de vitamina C, tiamina, riboflavina y ácido nicotínico; por estas bondades encontradas en la guayaba se evalúa la actividad antioxidante determinando el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) cuyos resultados se presentan en el cuadro 8 y la figura 13. Al respecto analizando el ecotipo blanco en los dos estados de madurez se encontró diferencia estadística significativa (A - IIIa), comparando las medias mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) la guayaba blanca en estado de madurez pintón tuvo la mayor capacidad de inhibición  $IC_{50}$  10,834 mg/ml. Este comportamiento comparando con los polifenoles también se encontró que el estado pintón es el que tiene el mayor contenido 98,560 mg equiv. AG/100g, según KUSKOSKI *et.al.*, (2005) relaciona la actividad antioxidante con el contenido de fenoles totales y los antocianos, cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente, sin embargo en algunos trabajo se ha encontrado una correlación baja.

Los resultados del cuadro 8 y figura 13 en el ecotipo rojo fueron analizados estadísticamente y se encontró diferencia significativa (A - IIIb), esto indica que ambos estados de madurez tienen el comportamiento diferente al momento de determinar el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) maduro 14,727 mg/ml y pintón 14,090 mg/ml, según REPO DE CARRASCO Y ENCINA (2008) indican que la capacidad antioxidante de un alimento se debe a la actividad de sus diferentes compuestos entre los cuales están los compuesto fenólicos, carotenos y ácido ascórbico presentes.

Con respecto al coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) del ecotipo rosado se encontró diferencia estadística significativa (A - IIIc), comparando las medias mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) entre los estados de madurez el pintón

tuvo el mayor coeficiente de inhibición con 3,158 mg/ml. Al respecto LIM *et al.*, (2006) mencionan que la actividad antioxidante de la fruta de la guayaba disminuye durante la maduración del fruto.

Realizando la comparación de ecotipos y los estados de madurez en pulpa de guayaba fresca el mejor comportamiento tuvo la guayaba rosada pintón (3,158 mg/ml) y el menor coeficiente de inhibición fue 14,727 mg/ml correspondió al ecotipo rojo maduro. THAIPONG *et al.*, (2005) como resultado de su investigación referido a la actividad antioxidante reportan para el genotipo Allahabad safeda (pulpa blanca) 32 ( $\mu$ MTE/gFM), Fan retief (pulpa rosada) 27,7 ( $\mu$ MTE/gFM), Ruby supreme (pulpa rosada) 16,2 ( $\mu$ MTE/gFM) y Advanced selection (pulpa rosada) 24,9 ( $\mu$ MTE/gFM), el mismo autor afirma que la actividad antioxidante y los componentes activos dependen de los cultivares y tipos. KUSKOSKI *et al.*, (2005) reportan que las determinaciones de capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan solo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. LIM *et al.* (2006) autor indica una actividad antioxidante en guayaba expresado en coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de 2.11 mg/ml. Así mismo JIMÉNEZ *et al.*, (2001) obtuvieron un coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) en pulpa de guayaba de 3.7 g/ g DPPH .

Según los resultados se encuentra diferencia entre los estados de madurez, cada uno tiene ciertas características sensoriales ya que generalmente se consumen los frutos con madurez organoléptica, al respecto SORIA (1998) indica que entre las reacciones bioquímicas relacionadas con la maduración, predominan las de hidrólisis; el almidón, principal sustancia de reserva, se hidroliza para dar azúcares sencillos, responsables del sabor dulce de la fruta. La

protopectina insoluble de las paredes celulares se degrada a pectinas solubles, provocando una disminución de la consistencia y un reblandecimiento de la pulpa. La clorofila se descompone y se sintetizan o desenmascaran otros pigmentos. Los ácidos orgánicos van disminuyendo y van desapareciendo los taninos provocando una pérdida de astringencia de la pulpa. Los cambios en el aroma se deben a compuestos volátiles como esterres, alcoholes, aldehídos y cetonas, que se desarrollan durante la maduración.

Los resultados encontrados en la presente investigación fueron comparados con otros frutos tropicales, según MONGKOLSILP *et. al.*, (2004) obtienen un coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de 2,34 mg/ml. Al comparar el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) con otros frutos tenemos que LIM *et. al.*, (2006) indica para banana 13,4 mg/ml y para manzana de agua 12 mg/ml. Según MURILLO (2006) la guanaba es el fruto que tiene mayor actividad antioxidante  $IC_{50}$   $2\pm 0.9$ , Guayaba  $2,5 \pm 0,6$ ; Carambola  $3,9\pm 0,6$ ; Papaya  $11,4\pm 1$ ; Taperiba  $14,9\pm 1,8$  y Maracuyá  $20,8 \pm 2$  mg/ml.

### **5.3.2 Determinación Coeficiente de Inhibición ( $IC_{50}$ ) radical peroxilo en pulpa fresca de 3 ecotipos de guayaba**

Diversos compuestos cromógenos (DPPH, ABTS, DMPD y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS), por esta razón en la presente investigación se planteo evaluar el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) con el radical peróxilo, cuyos resultados se presentan en el cuadro 9 y figura 14.

Con respecto al ecotipo blanco en los dos estados de madurez (maduro y pintón) se encontró diferencia estadística significativa (A - IVa) teniendo mejor eficiencia el estado de madurez pintón 0,813 mg/ml. Al respecto PÉREZ y SAURA (2007) mencionan que el contenido de compuestos antioxidantes en frutas y hortalizas está dado por su capacidad antioxidante asociada a factores fisiológicos como la maduración. La utilización del radical peróxilo para medir la actividad antioxidante en pulpa fresca de guayaba fue considerando la indicación de AYMOTO *et.al.*, (2005) en la cual refiere que muchos estudios de la actividad antioxidante de flavonoides pueden ser medidos por la habilidad de secuestrar especies reactivas oxidantes como el anión superóxido, hidroxilo y radicales peróxilo.

Los resultados del ecotipo rojo analizando estadísticamente se encontró diferencia significativa (A - IVb), realizando la comparación de los promedios mediante la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) el mayor coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) se presentó en el estado maduro 1,228 mg/ml. Al respecto VARGAS *et. al* (2006) menciona que durante la maduración podrían generarse productos de condensación o incremento en algunos compuestos fenólicos que aporten a una mayor actividad antioxidante o que hay otros tipos de compuestos que contribuyen de una manera significativa con el potencial antioxidante.

En el ecotipo rosado el coeficiente de inhibición no presentó diferencia estadística (A - IVc) entre los estados de madurez, maduro y pintón 0,574 y 0,593 mg/ml respectivamente. Comparando este ecotipo en la cuantificación de polifenoles y el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) del radical DPPH este tuvo el mejor comportamiento, según MURCIA (2001) indica que la actividad antioxidante de

los fenólicos se debe sobre todo a las propiedades redox, que les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, bloqueantes del singlete de oxígeno y captadores de radicales OH.

Analizando los resultados de los ecotipos (blanco, rojo y rosado) en los estados de madurez (maduro y pintón) referente al comportamiento del radical peróxilo el que logró mayor eficiencia fue rosado maduro y pintón (0,574 y 0,593 mg/ml) y el que tuvo el menor coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) fue rojo pintón 1,721mg/ml; al respecto THAIPONG *et. al.*, (2005) en su estudio sobre la actividad lipolítica e hidrofílica en frutos de guayaba mencionan que la pulpa del clon blanco también tiene nivel alto de actividad antioxidante lipolítica como la pulpa del clon rosado, aunque su contenido de concentración de  $\beta$  – caroteno es mínima. Así mismo, menciona que la mayor contribución del potencial antioxidante depende de la especie de planta y sus productos.

Comparando los resultados del coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) de pulpa fresca de guayaba con otros frutos tenemos el reporte de MURCIA (2001) que trabajo con frutas mediterráneas y tropicales (plátano, lima, mango, maracuyá, papaya y piña) para valorar su actividad antioxidante comparada con la de los aditivos alimentarios (BHA (E-320), BHT (E-321) y propilgalato (E-310)). Entra las frutas mediterráneas destaco la uva negra y la ciruela y en las frutas tropicales el plátano fueron las más efectivas captadoras de los radicales peróxilo.

## **5.4 Cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante en pulpa tratada térmicamente**

### **5.4.1 Vitamina C**

Los resultados de la cuantificación de vitamina C, polifenoles totales y actividad antioxidante son presentados en el cuadro 10, de los tratamientos de pulpa fresca sin tratamiento térmico, con tratamiento térmico de 55°C /2 h y 70°C/1 h, con respecto a la cuantificación de vitamina C se encontró que existe diferencia estadística significativa (A - Va) entre la pulpa fresca  $7,08 \pm 0,51$  mg/100g y las pulpas tratadas térmicamente  $3,81 \pm 0,25$  y  $3,78 \pm 0,49$  mg/100g respectivamente, esto indica que el tratamiento térmico tiene efecto sobre el contenido de vitamina C. Este fenómeno puede ser explicado por GUALDRÓN y JIMENEZ (2006) quienes indican que las vitaminas son compuestos sensibles a diferentes procesos, principalmente oxidación, extracción acuosa (lixiviación) y tratamiento térmico. La pérdida de vitaminas inducida por el efecto térmico depende adicionalmente de la naturaleza química del alimento, el pH, la humedad relativa, la presencia de metales de transición y concentración de oxígeno disuelto entre otros. Así mismo, SANIAH (2005) indica que el ácido ascórbico puede ser degradado por oxígeno activo y por reacciones iniciadas por metales de transición, su acción como antioxidante consiste en quitar oxígeno en los sistemas y queda oxidado como ácido dehidroascórbico, en medios donde existe poca disponibilidad de agua libre o con alto contenido de pectina la pérdida de ácido ascórbico puede ser menor.

## 5.4.2 Polifenoles totales

Del cuadro 10 se puede apreciar que los resultados presentan diferencia estadística altamente significativa (A - VIa) entre los tratamientos, comparando las medias de los tratamientos se tiene que la pulpa sin tratamiento térmico contiene 143,97 mg equiv. AG/100g, y las pulpas tratadas térmicamente disminuyeron su contenido pero ambas son iguales estadísticamente  $69,59 \pm 0,15$  y  $68,52 \pm 0,15$  mg equiv. AG/100g respectivamente. Al respecto, MARQUINA *et al.* (2008) indican la transformación de la pulpa de fruta en mermelada, reduce el contenido de polifenoles totales presentes en la pulpa por lo que se recomienda consumir la pulpa de fruta en lugar de mermelada. MOHD *et al.* (2009) indican que la pérdida de macromoléculas como los flavonoides durante el tratamiento térmico podría ser debido a la temperatura y la duración usada. El procesamiento térmico puede afectar los fitoquímicos por descomposición térmica que afectan la integridad de la estructura de la célula lo que resulta en la migración de componentes, conduciendo a las pérdidas por fuga, descomposición por varias reacciones químicas que involucran enzimas, luz y oxígeno.

## 5.4.3 Actividad antioxidante

### 5.4.3.1 Radical DPPH

Analizando el comportamiento de la actividad antioxidante frente al radical DPPH se presenta los resultados en el cuadro 10, al ser analizado estadísticamente se encontró diferencia altamente significativa (A - VIIa) entre los tratamientos, esto indica que tiene efecto la temperatura sobre los componentes antioxidantes. En la pulpa fresca se encontró la mayor capacidad antioxidante IC<sub>50</sub> 3,84 mg/ml, en cambio las pulpas tratadas al calor disminuyen su actividad

55°C /2 h IC<sub>50</sub> 7,00 mg/ml y 70°C/1 h IC<sub>50</sub> 6,46 mg/ml. Este comportamiento puede ser explicado por MARQUINA (2008) que indica que la cocción de las frutas y vegetales causa la reducción de su actividad antioxidante y su concentración de polifenoles, tal como ocurrió en la mermelada de guayaba. Así mismo AYMOTO *et.al.*, (2005) indican que la actividad antioxidante es muy susceptible a oxidaciones químicas y enzimáticas durante el procesamiento, cocinado o almacenamiento.

#### **5.4.3.2 Radical peroxilo**

Del cuadro 10 referido al radical peroxilo analizando los resultados se encontró que no existe diferencia estadística (A - VIIIa), los tres tratamientos (pulpa fresca y pulpas tratadas térmicamente). Este comportamiento puede deberse a lo explicado por SANIAH (2005) que menciona que en el procesado algunos tratamientos no afectan o causan cambios insignificantes en el contenido y actividad natural que ocurren en los antioxidantes, como el contenido de carotenoides de los cuales el licopeno y el  $\beta$  - caroteno son muy estables al calor aún después de prolongados tratamientos térmicos. Así mismo indica que el cambio en la actividad del antioxidante, particularmente durante el procesamiento térmico, es principalmente debido a la pérdida de frescura ocurrido en las propiedades antioxidantes, la presencia de muchos antioxidantes naturales estables al calor, la presencia de polifenoles y formación de compuestos nuevos teniendo actividad prooxidante y antioxidante; así la actividad antioxidante en alimentos procesados se pueden perder, pueden permanecer estables o iguales y aun aumentar.

## VI. CONCLUSIONES

- El contenido de vitamina C, polifenoles totales, y actividad antioxidante de la pulpa fresca de guayaba varía en función del ecotipo y estado de madurez. El mayor contenido de vitamina C se encontró ecotipo blanco estado de madurez pintón 16,35mg/100g.
- Los polifenoles totales y el coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) del radical peroxilo en la pulpa fresca de guayaba correspondió al ecotipo rosado maduro 143,973 mg equiv. AG/100g y 0,574 mg/ml respectivamente. El mejor coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ) frente al radical DPPH correspondió al ecotipo rosado pintón 3,158 mg/ml.
- La actividad antioxidante frente al radical peroxilo no fue afectado en la pulpa de guayaba tratada térmicamente.
- El contenido de vitamina C y polifenoles totales fue afectado por la temperatura 55°C/ 2h y 70°C/1 h y la actividad antioxidante frente al radical DPPH que más se afectó fue a 55°C/2 h.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Según los resultados obtenidos en el estudio, se recomienda lo siguiente:

- Promover el consumo del fruto fresco de guayaba conociendo las propiedades antioxidantes que posee.
- Promover la industrialización del fruto (bebida funcional) y así darle un valor agregado, ya que se comprobó que la pulpa es resistente al tratamiento térmico.
- Evaluar el contenido de compuestos bioactivos en los diferentes ecotipos de guayaba, frutos, corteza, flores y yemas terminales.
- Cuantificar el contenido de pectinas en los ecotipos de guayaba encontrados en nuestra zona pues estas son una excelente fuente de fibra dietética.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ANDREW, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C. y STEIN, M. 1 989. Plants metabolites, structure and im vitro antiviral activity of quinovic acid glycosydes from *Uncaria tomentosa* and *Guetarda playpoda*. Journal of natural products. Vol. 52: 679 – 685.
- AYMOTO, H.; GENOVESE, M. y LAJOLO, F. 2 005. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and comercial frozen fruits pulps. University Sao Paulo, Brazil. J. Food Chem. Vol. 53, N°8. 2 928 – 2 935.
- BADUI, S. 1 997. Química de los Alimentos. Edit. Alambra mexicana, S.A. México. p. 259 – 265, 358 - 361.
- BADUI, S. 1 988. Diccionario de tecnología de los alimentos. Edit. Alambra mexicana, S.A. México. 298 p.
- CAÑIZARES, A.; LAVERDE, D.; PUESME, R. 2 003. Crecimiento y desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava L.*) en Santa Bárbara, Estado de Monagas, Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Revista UDO Agrícola 3 (1): 34 – 38.
- CÓRDOVA, Z. 2 003. Estadística descriptiva e inferencial. Aplicaciones. Quinta edición. Edit. Librería Moshera S.R.L. Lima – Perú. 87 p.
- CRIADO D. y MOYA M. 2 009. Vitaminas y antioxidantes. Grupo Saned. Sanidad y ediciones S.L. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid – España.

Págs. 8 -15. [En línea]: <http://www.elmedicointeractivo.com/Documentos/evaluacion>

FLORES, P. 1997. Cultivo de frutales nativos amazónicos. Tratado de cooperación económica. Lima – Perú. p. 135 – 143.

GARCIA, D; PRADERES, G. 2 007. Bioquímica de la maduración de productos hortofrutícolas. Universidad Central de Venezuela. Cátedra de tecnología de frutas y hortalizas. Págs. 4 – 5. [En línea]: [http://www.74.125.93.132/search?q=cache:SUsPP\\_IVCO0J:ftpctic.agr.ucv.ve/intranet/quimica/frutas/ema2.doc+GARCIA+Y+PRADERES,+MADURACION+DEL+FRUTO&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe](http://www.74.125.93.132/search?q=cache:SUsPP_IVCO0J:ftpctic.agr.ucv.ve/intranet/quimica/frutas/ema2.doc+GARCIA+Y+PRADERES,+MADURACION+DEL+FRUTO&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe)

GUALDRÓN, H. y JIMENEZ, B. 2 006. Retención de nutrientes en bocadillos de guayaba (*Psidium guajava*) y feijoa (*Acca sellowiana*) elaborados en evaporador al vacío y a presión atmosférica. Universidad de la Salle. Revista de investigación, ISSN 16576772. Vol. 6 (2): 171 – 177.

GO"KMEN, V., KAHRAMAN, N; DEMIR, N y ACAR, J. 2 000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and deshidroascorbic acids in fruits and vegetables. Food Engineering Department, Hscettepe University , 06532 Beytepe, Ankara, Turkey. Journal of chromatography A, 881 (2000) 309 – 316.

GONZALES-TORRES, M.; BETACOURT-RULE, M.; ORTIZ-MUÑIZ, R. 2 000. Daño Oxidativo y Antioxidantes. Bioquímica. Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa. Mexico. 25(1): 3-9.

HERNANDEZ, R.; FERNÁNDEZ C. y BAPTISTA L. 2 001. Metodología de la investigación. Edit. McGraw – Hill interamericana de editores, S.A Mexico. 503 p.

- JIMÉNEZ – ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO R. y SAURA – CALIXTO, F. 2001. Guava Fruits (*Psidium guava L.*) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber. Universidad Nacional de Venezuela. Venezuela. J. Food Chem. 49, 5 489 – 5 493. Vol. 49, N°11.
- KUSKOSKI, M.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI, J. y FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciencia Tecnología Alimentos, Campinas, 25(4):726 – 732.
- LARA, C.; NERIO L. y OVIEDO L. 2007. Evaluación fisicoquímica y bromatológica de la guayaba agria (*psidium araca*) en dos estados de maduración. Universidad de Córdoba. Departamento de Química. Montería – Colombia. Temas agrarios - Vol. 12:(1), p. 13 – 21.
- LEBEAU, J; FURMAN, C; BERNIER, J. DURIEZ, P; TESSIER, E; COTELLE, N. 2000 Antioxidant properties of di-tert-butyl hidroxy lated flavonoids. Free Rad. Biol. And Med. 29:290-291.
- LIM, Y.; LIM, T.; TEE, J. 2006. Antioxidant properties of guava fruits: comparison with some local fruits. Monash University Malaysia. Sunway Academic Journal 3, 9 – 20.
- LIMA, H. 2002. Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. Universidad de la Habana. Cuba. p. 2 – 4.
- MAURICIO, V.; RIVERA, C. y NARVAEZ C. 2005. Capacidad antioxidante durante la maduración de Arazá (*Eugenia stipitata Me Vaugh*). Revista colombiana de química. Vol. 34, N°1. Colombia. p. 57-65.
- MARQUINA V.; ARAUJO L.; RUÍZ J.; RODRÍGUEZ-MALAVAR A.; Vit P. 2008. Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y

mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.). Merida – Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. Vol. 58 N° 1. p. 98 – 101.

MEDINA, B. y PAGANO, G. 2 003. Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo “Criolla Roja”. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 20: 72 – 86.

MOHD, M.; ABDUL-HAMID A.; ABU B.; PAK D. 2 009. Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in Centella asiatica. University Putra. Selangor - Malaysia. International Food Research Journal 16: 531- 537.

MONGKOLSILP, S.; PONGBUPAKIT, I.; SAE – LEE, N. y SITTHITHAWORN, W. 2 004. Radical Scavenging Activity and Phenolic Content of Medicinal Plants Used in Primary Health Care. Srinakarinwirot University. SWU Journal Pharm. Sci. Vol.9 N°1. p. 32-35.

MORTON, J. 1 987. Guayaba (*Psidium guajava* L.). Miami - Florida. Págs. 356–363. [En línea]: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/guava.html>

MURCIA, T. 2 001. Importancia de las Frutas como Alimentos con Alta Actividad Antioxidante. Universidad de Murcia. V Congreso Internacional Alimentación, Nutrición y Dietética.

MURILLO, F. 2 006. Actividad antioxidante “in vitro” de las bebidas de frutas. Alfa editores técnicos. p. 20 – 27.

MUÑOZ, J.; RAMOS – ESCUDERO, F.; ALVARADO – ORTIZ, U y CASTAÑEDA, C. 2 007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Revista sociedad química de Perú. 73 N°3 (142 – 149).

- MURRAY, R. 1 969. Estadística. Teoría y 875 problemas resueltos. Edit. McGraw – Hill de México. Colombia. 241 p.
- ODRIOZOLA, S. 2 009. Obtención de zumos y frutos cortados con alto potencial antioxidante mediante tratamientos no térmicos. Memoria para optar el grado de Doctor. Universidad de Lleida. Escuela Técnica Superior De Ingeniería Agraria. Brasil. 367 p.
- OJEDA, M. 2 007. Los compuestos fenólicos de la uva. Revista Enológica Nº 4. Año IV. p. 1 – 11.
- PALOMINO P. 2 006. Propiedades oxidantes y prooxidantes de *Psidium guajava* L. “guayaba”. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- PEREZ, J. y SAURA, F. 2 007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. Instituto del frío. Madrid - España. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. S8-O131. p.1150-1159.
- PINEDA, A. 2 005. Determinación de las propiedades antioxidantes de variedades de injerto (*Pouteria viridis*) que se cultivan en tres regiones de Guatemala. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 79 p.
- POLYAKOV, N; LESHINA, T; KONOVALOVIA, T; KISPERS, L. 2 001. Carotenoides as scavengers of free radicals in fenton reaction: Antioxidantes or prooxidants. J. free rad. Boil. And med. 31(3): 398 – 404
- REPO DE CARRASCO, R. y ENCINA, Z. 2 008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú. Revista de la Sociedad Química del Perú. v.74 n.2 ISSN 1 810 – 634X.

- ROJAS, B.; NARVÁEZ, C. y RESTREPO, S. 2 008. Evaluación del contenido de vitamina C, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) de las variedades pera, regional roja y regional blanca. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. Memorias red-alfa lagrotech. comunidad europea - Cartagena. p. 49-61.
- SANDAR, T. 2 007. Stability of vitamin C content in guava juices during pasteurization and storage at different conditions. Thesis. Faculty of Graduate Studies. Mahidol University. 83 p.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L.; MILLER, M. 2 002. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Food chem. 79: 207-213.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. y ANGELES, F. 2 001. Técnicas de investigación para determinar la actividad antioxidante y anti – inflamatoria de plantas medicinales de la Amazonía. 1<sup>st</sup> international workshop. Iquitos – Perú.
- SANIAH B. 2 005. The effect of heat processing on triterpene glycosides and antioxidant activity of herbal pegaga (centella asiatica l. urban drink). Thesis. Universiti Teknologi Malaysia. 176 p.
- SIES, H. 1 997. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. Vol 38 USA Academic Press. Inc. 293 p.
- SISTEMA INTEGRADO DE INFORMACION TAXONOMICA (SIIT). 2002. *Psidium guajava* L. TSN: 27240. [En línea]: <http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/taxastep?king=Plantae&p action=containing&taxa=PSIDIUM+GU AJAVA&p format=&p ifx=itismx&p lang=es>

- SORIA, V. 1 998. El escaldado superficial en manzana granny smith. Fisiología de la alteración y estudio de métodos de control alternativos a la difenilamina. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària de Lleida. Tesis Doctoral. 205 p.
- SOTO, V. 2 005. Detección de Fitoquímicos, contenido de vitamina C y ácido fólico en Chironja (*Citrus sinensis* x *Citrus paradisi*) injertada en diferentes patrones de cítrica. Tesis para optar el título de Maestro en ciencia y tecnología de los alimentos. Universidad de Puerto Rico, Facultad de Ciencias Agrícolas. 94 p.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CISNEROS – ZEVALLOS, L y HBYRNE. 2 005. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. Kasetsart University. Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. Vol. 36 (suppl 4).
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS – ZEVALLOS, L y HAWKINS, B. 2 005. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidants activity from guava fruits extracts. Kasetsart University. Thailand. ELSEVIER. Journal of Food Composition and Analize. p. 669 – 675.
- UGARTONDO, C. 2 009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. España. 48 p.
- VELEZ, S; VELEZ, A; CORPOICA-CIMPA; UIS; CORPORACIÓN COLOMBIA REGIONAL. 2 007. Cadena productiva de la guayaba y su industria. Colombia – Santander – Boyacá. 85 págs. [En línea]: [http://www.uptc.edu.co/exp\\_ort/sites/default/direccion\\_investigaciones/](http://www.uptc.edu.co/exp_ort/sites/default/direccion_investigaciones/)

[documentos/documentos TCT i/Docs Cadena Guayaba/acuerdo.competitividad.pdf](#)

VARGAS, D.; SOTO, M.; GONZALES, V.; ENGLEMAN, E. y MARTINEZ, A. 2006. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava L.*). Estado de Mexico. Artículo en *Agrociencia* 40: 109 – 115.

WEBSTER, A. 2000. Estadística aplicada a los negocios y a la economía. Edit. McGraw – Hill interamericana de editores, Colombia. 345 p.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMUR, H.; MATOBA, T. y TERAQ, J. 1998. HPLC method for evaluation of free radical – scavenging activity of food by using 1,1-diphenyl – 2 – picrylhydrazil. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 62 (6): 1201 – 1204.

## **IX. ANEXO**

A- Ia : Análisis de varianza de los resultados de Vitamina C del ecotipo blanco

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	29,95642487	29,95642487	135,13	**
Error	4	0,88677174	0,22169294		
Total	5	30,84319662			

$R^2 = 0,97$  CV=3,33 SME=0,47 Prom=14,12

A-Ib : Análisis de varianza de los resultados de Vitamina C del ecotipo Rojo

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	6,44512528	6,44512528	302,77	**
Error	4	0,08514761	0,02128690		
Total	5	6,53027288			

$R^2 = 0,98$  CV=5,39 SME=0,15 Prom=2,71

A-Ic : Análisis de varianza de los resultados de Vitamina C del ecotipo rosado

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	60,39131413	60,39131413	61,77	**
Error	4	3,91062642	0,97765660		
Total	5	64,30194055			

$R^2 = 0,94$  CV=9,64 SME=0,99 Prom=10,25

A-IIa : Análisis de varianza de los resultados de polifenoles del ecotipo blanco

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	1865,117728	1865,117728	206,41	**
Error	8	72,287188	9,035898		
Total	9	1937,404915			

R<sup>2</sup>= 0,96 CV=3,54 SME=3,005 Prom=84,903

A- IIb : Análisis de varianza de los resultados de polifenoles del ecotipo rojo

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	411,7933026	411,7933026	72,43	**
Error	8	45,4840729	5,6855091		
Total	9	457,2773755			

R<sup>2</sup>= 0,90 CV=5,59 SME=2,384 Prom=42,616

A- IIc : Análisis de varianza de los resultados de polifenoles del ecotipo rosado

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	2469,203070	2469,203070	286,13	**
Error	8	69,038324	8,629791		
Total	9	2538,241394			

R<sup>2</sup>= 0,97 CV=2,29 SME=2,938 Prom=128,26

A - IIIa: Análisis de varianza de los resultados de DPPH de ecotipo blanco

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	46,6803427	46,680342	109,0	**
Error	16	6,8518508	0,428240		
Total	17	53,5321936			

R2= 0,87 CV=5,258 SME=0,654 Prom=12,444

A - IIIb: Análisis de varianza de los resultados de DPPH de ecotipo rojo

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	1,82532356	1,82532356	5,86	*
Error	16	4,98410244	0,31150640		
Total	17				

R2= 0,27 CV=3,8735 SME=0,558 Prom=14,41

A - IIIc : Análisis de varianza de los resultados de DPPH de ecotipo rosado

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	2,09715200	2,09715200	19,30	**
Error	16	1,73849778	0,10865611		
Total	17	3,83564978			

R2= 0,55 CV=9,418 SME=0,33 Prom=3,5

A - IVa: Análisis de varianza de los resultados del radical peroxilo de ecotipo blanco

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	0,02087606	0,02087606	44,77	**
Error	16	0,00746156	0,00046635		
Total	17				

$R^2 = 0,74$  CV=2,55 SME=0,021 Prom=0,846

A – IVb: Análisis de varianza de los resultados del radical peroxilo de ecotipo rojo

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	1,09372050	1,09372050	940,95	**
Error	16	0,01859778	0,00116236		
Total	17				

$R^2 = 0,98$  CV=2,31 SME=0,034 Prom=1,474

A - IVc: Análisis de varianza de los resultados del radical peroxilo de ecotipo rosado

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	1	0,00164356	0,00164356	3,01	N.S
Error	16	0,00872222	0,00054514		
Total	17	0,01036578			

$R^2 = 0,16$  CV=3,99 SME=0,023 Prom=0,583

**A - Va: Análisis de varianza de los resultados del análisis de vitamina C en pulpa de guayaba rosada madura tratada térmicamente**

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	2	26.00490822	13.00245411	52.88	0.0002
Error	6	1.47532400	0.24588733		
Total	8	27.48023222			

R<sup>2</sup>= 0.94    CV=9.92    SME=0.49    Prom=4.99

**A - VIa: Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles en pulpa de guayaba rosada madura tratada térmicamente**

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	2	11373.57138	5686.78569	3497.33	**
Error	6	9.75621	1.62604		
Total	8	11383.32759			

R<sup>2</sup>= 0,99    CV=1.35    SME=1.27    Prom=94.19

**A - VIIa: Análisis de varianza de los resultados del análisis del radical DPPH en pulpa de guayaba rosada madura tratada termicamente**

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	2	51,67606050	25,83803025	246,18	**
Error	24	2,51895505	0,10495646		
Total	26	54,19501555			

R<sup>2</sup>= 0,95    CV=5,61    SME=0,32    Prom=5,77

A - Villa: Análisis de varianza de los resultados del análisis del radical peroxilo en pulpa de guayaba rosada madura tratada térmicamente

FV	GL	SC	CM	FC	SIG
Trat	2	0,00268452	0,00134226	3,20	*
Error	24	0,01006622	0,00041943		
Total	26	0,01275074			

R2= 0,21 CV=3,51 SME=0,02 Prom=0,58