

100

1110
May 10-2014
02-17-00hr.

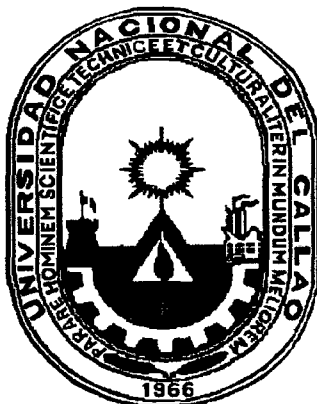
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

INSTITUTO DE INVESTIGACION



OCT 2014



**« DETERMINACION DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN
LA GUAYABA (Psidium guajava L.) »**

PRESENTADO POR:

ING. CIRIA ZENaida LEON ROMANI

PERIODO DE EJECUCIÓN:

01 NOVIEMBRE 2012 A 31 OCTUBRE 2014

R .N° 1046-2012-R

CALLAO – PERU

2014

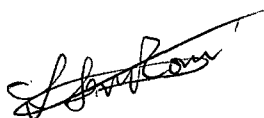
I	INDICE	01
II	RESUMEN	06
III	INTRODUCCIÓN	07
3.1	PRESENTACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION	08
3.2	ENUNCIADO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION	09
3.3	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	10
3.3.1	ALCANCES DE LA INVESTIGACION	10
3.4	IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION	11
3.5	ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION	12
3.6	FORMULACION DE LA HIPOTESIS	16
IV	MARCO TEORICO	18
4.1	GENERALIDADES	18
4.2	CARACTERISTICAS DE LA GUAYABA	19
4.2.1	CLASIFICACION CIENTÍFICA	20
4.2.2	VALOR NUTRITIVO	20
4.2.3	ORIGEN DE LA GUAYABA	21
4.2.4	DISTRIBUCION GEOGRAFICA	21
4.2.5	IMPORTANCIA Y USOS	21
4.3	COMPUESTOS BIOACTIVOS	24
4.3.1	CLASIFICACION DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	24
4.3.2	PRINCIPALES FITOQUÍMICOS	25
4.3.2.1	GLUCOSINOLATOS	25
4.3.2.2	ISOTIOCIANATOS	25
4.3.2.3	FENOLES	25
4.3.2.4	FLAVONOIDES O BIOFLAVONOIDES	27
4.4	METODO DE CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS	29
4.5	VITAMINA C Ó ACIDO ASCORBICO	30



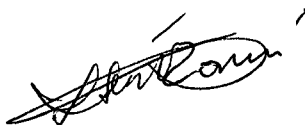
4.5.1	DISTRIBUCION DE VITAMINA C EN LOS ALIMENTOS	31
4.5.2	IMPORTANCIA DE VITAMINA C EN LA DIETA	31
4.5.3	METODO DE CUANTIFICACION DE VITAMINA C	32
4.6	CAROTENOIDES: DEFINICION	33
4.6.1	CLASIFICACION	33
4.6.2	DISTRIBUCION Y ESTADO NATURAL	34
4.6.3	DISTRIBUCION DE CAROTENOIDES EN LOS ALIMENTOS	36
4.6.4	IMPORTANCIA DE CAROTENOIDES EN LA DIETA	38
4.7	EXTRACCION DE LOS CAROTENOIDES	40
4.8	METODOS DE CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES	41
4.8.1	EVOLUCIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA	41
4.8.2	ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA – VISIBLE (UV-VIS)	44
4.8.2.1	EL CONCEPTO DE ABSORBANCIA	45
4.8.3	CROMATOGRAFIA	46
4.8.3.1	ASPECTOS GENERALES	46
4.8.3.2	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	47
V.	MATERIALES Y METODOS	50
5.1	MATERIALES Y REACTIVOS	50
5.2	EQUIPOS	51
5.3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	52
5.3.1	MATERIA PRIMA	52
5.3.2	METODO	52
5.3.3	PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE GUAYABA	52
5.3.4	ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA	55
5.3.4.1	DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD	55
5.3.4.2	DETERMINACIÓN DE CENIZAS	55



5.3.4.3 DETERMINACIÓN DE FIBRA BRUTA	55
5.3.4.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	55
5.3.4.5 DETERMINACIÓN DE GRASAS	55
5.3.4.6 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS	56
5.3.5 ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL PRODUCTO OBTENIDO: EXTRACTO DE GUAYABA	56
5.3.5.1 DETERMINACION DE HUMEDAD	56
5.3.5.2 DETERMINACION DE CENIZAS	56
5.3.5.3 DETERMINACION DE FIBRA BRUTA	57
5.3.5.4 DETERMINACION DE PROTEINAS	57
5.3.5.5 DETERMINACION DE GRASAS	58
5.3.5.6 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS	58
5.3.6 DETERMINACION DEL ACIDO ASCORBICO	59
5.3.7 EXTRACCION DE LOS CAROTENOIDES	59
5.3.7.1 CUANTIFICACION DE LOS CAROTENOIDES POR EL METODO COLORIMETRICO	60
VI. RESULTADOS	61
6.1 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA	61
6.2 CONTENIDO DE ACIDO ASCORBICO O VITAMINA C EN LA GUAYABA (PSIDIUM GUAJAVA L.)	61
6.3 CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LA GUAYABA (PSIDIUM GUAJAVA L.)	62
6.4 CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA GUAYABA (PSIDIUM GUAJAVA L.)	62
VII. DISCUSIÓN	63
VIII. REFERENCIALES	65
IX. APÉNDICE	68



9.1	CUADRO N° 1: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA GUAYABA	68
9.2	CUADRO N° 1: MEDICION DE GRADOS BRUX Y pH DE LA GUAYABA	68
9.3	CUADRO N° 1: CONTENIDO DE MINERALES (mg/100g) EN LA GUAYABA	68
	ANEXO N° 1: CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS	69



ABSTRACT

The results of the study of bioactive compounds of guayaba (*Psidium guajava* L.), from the valleys of Peru is presented. 125 mg / 100 g of ascorbic acid; 2,48mg / 100g of carotenoids; 83.50 mg / 100 g of Chlorogenic acid was obtained and antioxidant capacity of μg Trolox eq / g according to the DPPH method 258.95 μg trolox eq / g, and ABTS (lipophilic) 279.60 μg trolox eq / g ABTS (hydrophilic) 293,80 μg trolox eq / g.

Guayaba analysis as it relates to their physical equals of got a 4.1 pH and Brix equal to 14.6 features.

The proximate composition of guayaba is 76,90% moisture, 0,35% ash, 6,80% crude fiber, 1, 10% protein, 0,41% lipid and 14,44% carbohydrates.

The mineral content expressed as mg / 100g is 17,00 calcium, 12,50 magnesium, 31,00 phosphorus

Keywords: guayaba (*Psidium guajava* L.), antioxidant capacity, bioactive compounds.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'D. S. L.', is located in the bottom left corner of the page.

II RESUMEN

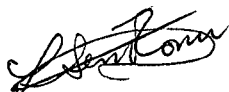
Se presenta los resultados del estudio de los compuestos bioactivos de la guayaba (*Psidium guajava* L.), provenientes de los valles interandinos del Perú. Se obtuvo 125 mg/100 g de ácido ascórbico; 2,48 mg/100 g de carotenoides; 83,50 mg de ácido clorogénico / 100 g y capacidad antioxidante, según el método DPPH 258,95 µg eq trolox/g, y ABTS (lipofílica) 279,60 µg eq trolox/g y ABTS (hidrofílica) 293,80 µg eq trolox/g.

Del análisis de la guayaba en cuanto se refiere a sus características físicas se obtuvo un pH igual 4,1 y grado Brix igual a 14,6.

La composición proximal de la guayaba es: humedad 76,90%, cenizas 0,35%, fibra bruta 6,80%, proteínas 1,10%, lípidos 0,41% y carbohidratos 14,44%.

El contenido de minerales expresado en mg/100 g es de 17,00 de calcio, 12,50 de magnesio y 31,60 de fósforo.

Palabras clave: guayaba (*Psidium guajava* L.), capacidad antioxidante, compuestos bioactivos.



III INTRODUCCIÓN

Los compuestos Bioactivos o fitoquímicos pueden definirse como compuesto biológicamente activos presentes en alimentos vegetales que tienen un efecto protector frente a enfermedades degenerativas en humanos, por lo que su ingesta es beneficiosa para la salud. Por eso la importancia que reviste poder caracterizar dichos compuestos que, además de asegurar la posibilidad de consumo, permite observar sus cualidades beneficiosas para el organismo.

La guayaba (*Psidium guajava* L.), es un género de unas cien especies de árboles pequeños en la familia Myrtaceae, nativas del Caribe, América Central, América del Norte y Sudamérica.

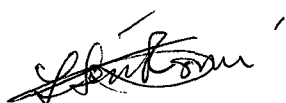
La fruta es comestible, redonda, o en forma de pera entre 3 a 10 cm de diámetro, tiene una corteza delgada y delicada, color verde pálido a amarillo en la etapa madura, en algunas especies, rosa a rojo en otras, pulpa blanca cremosa o anaranjada con pequeñas semillas duras y un aroma característico.

Es una de las frutas con mayores contenidos de vitamina C o ácido ascórbico, lo que la convierte en un antigripal natural. Las hojas y la corteza son astringentes intestinales, especialmente en las diarreas de los niños, pues son ricas en taninos. La corteza y la raíz de la guayaba son un buen reconstituyente que cura la anemia y debilidades nerviosas.

La guayaba es una fruta muy apreciada por sus valores nutritivos y su alto contenido en diversas vitaminas y ha sido denominada "la fruta reina".

A la guayaba se le atribuyen distintas propiedades nutritivas y medicinales entre las que figuran:

- Ayuda a reducir los niveles de colesterol y triglicéridos.
- Ayuda a combatir y prevenir enfermedades infecciosas.
- Ayuda a mejorar y disminuir la presión arterial.



- Estimula el tránsito intestinal y previene enfermedades del tracto digestivo, como el cáncer de colon.
- Por sus propiedades sedantes, puede ser utilizada para tratar problemas de ansiedad.
- Ayuda a reforzar las defensas del organismo e interviene en la formación de colágeno, entre otras funciones.

La investigación sobre los nutrientes de la guayaba (*Psidium guajava* L.) permitirá promover la preservación de las especies más relevantes, por sus propiedades curativas, y generar fuentes de ingresos para los productores locales.

3.1 PRESENTACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un arbusto o arbolito de hasta seis metros de altura escasamente ramificado. Sus hojas aromáticas opuestas enteras de 4-8 cm de longitud, con los nervios prominentes en la cara inferior, semejando a costillas. Su flores son blancas vistosas, en grupos de 1-3; estambres numerosos dispuestos sobre un disco ancho.

El fruto de la guayaba es carnoso, redondo o en forma de pera, tiene una corteza delgada y delicada, color verde pálido a amarillo en la etapa madura, en algunas especies, rosa a rojo en otras, pulpa blanca cremosa o anarnjada con pequeñas semillas duras y aroma característico.

La guayaba es originaria de américa tropical; cultivada y naturalizada en trópicos del viejo mundo en zonas rurales y urbanas.

La guayaba es una fruta muy apreciada por sus valores nutritivos y su alto contenido en diversos nutrientes, es antiescorbutica por su alto contenido en vitamina C.



Las hojas de la guayaba contienen un aceite esencial rico en cariofileno, nerolidiol, betbisaboleno, aromandreno, p-selineno. Contienen además beta sitosterol, titerpenoides, leucocianidinas y alrededor de un 10% de taninos

A la guayaba se le atribuyen distintas propiedades nutritivas y medicinales entre las que figuran:

- Ayuda a reducir los niveles de colesterol y triglicéridos.
- Ayuda a combatir y prevenir enfermedades infecciosas.
- Ayuda a mejorar y disminuir la presión arterial.
- Estimula el tránsito intestinal y previene enfermedades del tracto digestivo, como el cáncer de colon.
- Por sus propiedades sedantes, puede ser utilizada para tratar problemas de ansiedad.
- Ayuda a reforzar las defensas del organismo e interviene en la formación de colágeno, entre otras funciones.

La investigación sobre los nutrientes de la guayaba (*Psidium guajava* L.) permitirá promover la preservación de las especies más relevantes, por sus propiedades curativas, y generar fuentes de ingresos para los productores locales.

3.2 ENUNCIADO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION

¿Los valores de Compuestos Bioactivos determinados, flavonoides totales, ácido ascórbico, polifenoles totales, carotenos totales se encontraran presentes en la guayaba (*Psidium guajava* L.)?



3.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

- **Objetivo General:**

- Determinar los compuestos Bioactivos, flavonoides totales, ácido ascórbico, polifenoles totales, carotenos totales en la guayaba (*Psidium guajava* L.)

- **Objetivos Específicos:**

- Analizar la composición química de la Guayaba *Psidium guajava* L.)
- Evaluar el contenido de calcio magnesio y fósforo en la guayaba (*Psidium guajava* L.)
- Analizar las propiedades físicas de la guayaba (*Psidium guajava* L.)

3.3 1 ALCANCES DE LA INVESTIGACION

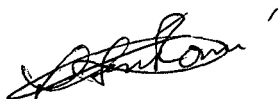
El tema de investigación es aplicada. Los resultados del tema de investigación a nivel de laboratorio serán en beneficio de los siguientes sectores:

- ✓ **Salud:** En beneficio de la población en general para prevenir y combatir enfermedades infecciosas, enfermedades del tracto digestivo como el cáncer de colon, reforzar las defensas del organismo, prevenir los malestares cardiovasculares, depresión, cataratas y enfermedades renales, etc.
- ✓ **La industria farmacéutica y alimentaria:** Se verá favorecida encontrando en los frutos nativos una fuente de industrialización de suplementos vitamínicos.



3.4 IMPORTANCIA Y JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

- a) La ejecución del tema de investigación permitirá desarrollar nuevos estudios orientados a comprobar la actividad antioxidante de los compuestos Bioactivos como son los flavonoides, ácido ascórbico, polifenoles y carotenos. Las propiedades antioxidantes de estos compuestos ayudan a neutralizar los radicales libres y a eliminar determinadas sustancias tóxicas, reduciendo la probabilidad de desarrollar cáncer, inhiben el crecimiento de bacterias dañinas para el organismo, favorece el sistema inmunitario, previene enfermedades cardiovasculares al reducir la presión arterial.
- b) La presente investigación sobre la determinación de compuestos bioactivos en la guayaba (*Psidium guajava* L.), es importante debido a que posee alto contenido de compuestos antioxidantes fenólicos como lo destaca en el año 2007 el artículo denominado Great Guava, publicado en la revista Agricultural Research por investigadores del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de N.A., además el contenido de vitamina C o ácido ascórbico en la guayaba es 6 a 7 veces más que en la naranja y por lo tanto tiene un papel destacado en el mantenimiento de cartílagos, huesos y dientes; ayuda a la absorción del hierro y es imprescindible en la formación de colágeno, por lo que previene contra afecciones de la piel y contribuye a la cicatrización de heridas y quemaduras, también es sabido que mejora la visión y reduce la posibilidad de aparición del



glaucoma y cataratas, además de combatir el estreñimiento por sus propiedades laxantes. Debido a la alta concentración de carotenos, la guayaba actúa como antioxidante previniendo el envejecimiento celular y protegiendo el organismo frente a radicales libres, a la vez que aumenta la eficiencia del sistema inmunitario y se reducen las probabilidades de ataques cardíacos, los carotenos son también requeridos por nuestro organismo para la formación de vitamina A.

3.5 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

Los compuestos bioactivos o fitoquímicos pueden definirse como compuesto biológicamente activos presentes en alimentos vegetales que tienen un efecto protector frente a enfermedades degenerativas en humanos, por lo que su ingesta es beneficiosa para la salud. Por eso la importancia que reviste poder caracterizar dichos compuestos que, además de asegurar la posibilidad de consumo, permite observar sus cualidades beneficiosas para el organismo.

Polifenoles, son un conjunto heterogéneo de moléculas con actividad antioxidante que incluye a los fenoles ácidos y flavonoides. En términos generales, los fenoles ácidos se caracterizan por tener un anillo aromático central como el caso del ácido cinámico y otros derivados.

Los fenoles ácidos como son los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico, inhiben la actividad de agentes mutágenos, estimulan la actividad de la



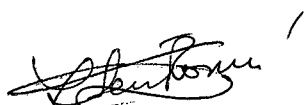
enzima fenolsulfotransferasa implicada en la detoxificación de compuestos metabólicos potencialmente tóxicos y poseen actividad bactericida.

La actividad antioxidante de los polifenoles se ha relacionado con su capacidad para prevenir falla cardíaca, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular y neoplasias.

Los flavonoides son los compuestos polifenólicos mejor estudiados que se caracterizan por tener una estructura de tres anillos formando dos centros aromáticos y un heterociclo central oxigenado. Dentro de los flavonoides se incluyen a las flavonas, flavononas, catequinas y antocianinas.

La vitamina C, también llamada ácido ascórbico, es un derivado de una hexosa, sintetizada por las plantas a partir de la glucosa y galactosa. El ser humano y otros primates y algunas especies animales carecen de la enzima L-gulonolactona oxidasa que es capaz de catalizar la conversión de la glucosa en vitamina C.

En humanos la vitamina C es un potente antioxidante, actuando para disminuir el stress oxidativo, un substrato para el ascorbato-peroxidasa, así como un factor enzimático para la biosíntesis de importantes bioquímicos.



Los carotenoides son pigmentos naturales que se incluyen en el grupo de los lípidos, porque son insolubles en agua y su consistencia es grasa.

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

Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos sólo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo el β -caroteno, el licopeno, etc.), mientras que las xantofilas contienen además oxígeno (por ejemplo la luteína). Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias y muy pocos se han reportado en animales (por ejemplo los colores rojizos de las plumas del flamenco son debidas a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar y otros.

En los animales superiores el β -caroteno es un requerimiento dietético esencial pues es precursor de la vitamina A.

Los carotenoides son muy importantes ya que representan una fuente de provitamina A (1 equivalente de retinol = 1 μ g de retinol = 6 μ g de β -caroteno), no son tóxicos, presentan dentro de la célula actividad antioxidante, participan en la desactivación de radicales libres,



producidos en el metabolismo celular, imparten colores amarillos y rojos a las plantas y animales; la purificación de estos metabolitos permitiría utilizarlos como colorantes naturales para la fortificación del color en los jugos y/o en cualquier otro alimento en lugar de la utilización de los colorantes artificiales que son de naturaleza tóxica. Los colorantes utilizados en la agroindustria, en su mayoría son importados y de origen artificial. Muchos de estos compuestos producen alergias en los niños y en valores altos son tóxicos.

Por el contrario estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación inversa entre la incidencia de cáncer y el consumo de fuentes naturales de carotenoides, sin embargo, la purificación de estos compuestos es costosa para el uso de solventes orgánicos en su extracción.

Los métodos más utilizados en la extracción de carotenoides son: remoción con solventes orgánicos, fluidos supercríticos y aceites.

La vitamina C (ácido ascórbico) y los carotenos son poderosos antioxidantes, reduciendo los efectos del envejecimiento, contrarrestan las enfermedades que afectan a los ojos como las cataratas y la pérdida de visión por la degeneración de la retina. Previene el cáncer de próstata y disminuye considerablemente las probabilidades de ataques cardiacos, además de aumentar la eficacia de nuestro sistema inmunológico.



Se ha encontrado la siguiente bibliografía relacionada con el tema de investigación:

- DITTRICH, K. y LEITZMANN, C. "Los alimentos Bioactivos. Guía de los alimentos que curan y protegen de las enfermedades." Editorial Integral Barcelona. España 1998.
- KING, A. and YOUNG, G. "Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals". J. Am. Diet. Assoc. 99(2): 213-218 February 1999.
- BRAND – WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. AND BERSET, C. 1995. "Use of free radical method to evaluate antioxidant activity". Lebensmittel Wissenschaft. 28.25 – 30.
- SWAIN, F. AND HOWARD, L. 1999. "The phenolic constituents of prunus domestica". Journal of the Science of Food and agriculture. 10.63 – 68.
- LUXIMON – RAMMA, A; BAHORUM, T. and CROZIER, A. 2003 – "Antioxidant actions and phenolic and vitamina C contents of common Mauritian exotic fruits". Journal of the science of food and agriculture. 83. 496 – 502.

3.6 FORMULACION DE LA HIPOTESIS

Los contenidos de compuestos Bioactivos, flavonoides totales (capacidad antioxidante, 250 µg equiv. Trolox/g), compuestos fenolicos (70 – 80 mg ácido clorogénico/100g), ácido ascórbico (150 – 170



mg/100g) y carotenos totales (1,37 mg β caroteno/100g), en la guayaba (*Psidium guajava* L.), serán determinantes.


VARIABLE DEPENDIENTE

La determinación de compuestos Bioactivos, flavonoides totales, ácido ascórbico, polifenoles totales, carotenos totales en la guayaba (*Psidium guajava* L.)

VARIABLES INDEPENDIENTES

- El análisis de la composición química de la guayaba (*Psidium guajava* L.)
- La evaluación del contenido de calcio magnesio y fósforo en la guayaba (*Psidium guajava* L.)

El análisis de las propiedades físicas de la guayaba (*Psidium guajava* L.)



IV. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES

La guayaba (*Psidium guajava* L.) son un género de unas cien especies de árboles tropicales y árboles pequeños de la familia Myrtaceae, nativas del Caribe, América Central, América del Norte y Sudamérica.

En algunos países se le conoce con el nombre de guayabo, arrayana, luma, guara, matos y es muy apreciada por sus bondades nutritivas y medicinales.

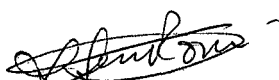
La guayaba es una fruta carnosa de piel blanda, con un exquisito y penetrante aroma. Es de forma redondeada y su pulpa puede ser blanca, rosada o roja parda con numerosas semillas. Su piel varía de lisa a rugosa y adopta distintos colores.

Por su alto contenido en fibra y agua, la guayaba tiene un efecto saciante, lo cual junto a su bajo aporte calórico y a su poder depurativo, la convierten en una fruta ideal en dietas de adelgazamiento.

La guayaba es también muy recomendable para niños, personas debilitadas y anémicas y personas con diabetes, ya que no provoca picos de glucemia elevados como otras frutas más dulces.

A la guayaba se le atribuyen distintos propiedades nutritivas y medicinales y hasta afrodisiacas, entre los que figuran:

- Ayuda reducir los niveles de colesterol y triglicéridos.
- Ayuda a combatir y prevenir enfermedades infecciosas
- Ayuda a mejorar y a disminuir la tensión arterial.
- Estimula el tránsito intestinal y previene enfermedades del tracto digestivo como el cáncer de colón.
- Posee propiedades expectorantes
- Por sus propiedades sedantes, puede ser utilizada para tratar problemas de ansiedad, nerviosismo o insomnio.



- Ayuda a reforzar las defensas del organismo e interviene en la formación de colágeno, entre otras funciones.

4.2. CARACTERÍSTICAS DE LA GUAYABA

Las guayabas, son un género de unas cien especies de árboles tropicales y árboles pequeños de la familia Myrtaceae, nativas del Caribe, América Central, América del Norte y Sudamérica.

Las hojas son contrarias, simples, elípticas a ovaladas, de 5 a 15cm de largo. Las flores son blancas, con cinco pétalos y numerosas estambres.

La fruta es comestible, redonda o en forma de pera, entre 3 a 10cm de diámetro; tiene una corteza delgada y delicada, color verde pálido a amarillo en la etapa madura en algunas especies, rosa a rojo en otros, pulpa blanca cremosa o anaranjada con muchas semillitas duras y un fuerte aroma característicos.

El origen del nombre de la guayaba es polémico: para algunos estudiosos proviene de una voz caribe y se atribuye a escritos de navegantes que descubrieron la guayaba en los primeros viajes que Colón realizó por esa región de América. Para otros, el origen de la palabra guayaba sería el náhuatl y provendría de cuáhuatl, árbol y tlacoyahua, descortezado, resultando cuayahua, en alusión al constante desprendimiento de la capa externa de la corteza que caracteriza al árbol de guayabo.

El nombre botánico del árbol es *Psidium guajava* L. y pertenece a la familia de los mirtáceas, según decidió el sueco Carlos Linneo, considerado padre de la botánica científica desde el siglo XVIII. Como dato curioso Linneo nunca salió la Uppsala, Suecia, lo que no impidió que clasificara en su casa las miles de plantas que le enviaban sus admiradores y alumnos desde todos los continentes.



4.2.1. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

La guayaba “*Psidium guajava* L.” pertenece a la familia Myrtaceae y su taxonomía es la siguiente:

Reino : Plantae
 División : Magnoliophyta
 Clase : Magnoliopsida, Rosidae
 Orden : Myrtales
 Familia : Myrtaceae, Myrtoideae
 Tribu : Myrteae
 Género : *Psidium*
 Especie : *Psidium guajava*
 Fuente : Leiva, A.M. Museo de Historia Natural.

4.2.2 VALOR NUTRITIVO

Se presenta el valor nutritivo en g/100g de guayaba

Concepto	Contenido
Humedad	78,90
Proteína	1,20
Grasos	0,42
Fibra	5,84
Carbohidratos	13,64

Fuente-. Morales de León, J. 2007 Tablas de Composición de Alimentos Mexicanos.



4.2.3. ORIGEN DE LA GUAYABA

Es un especie nativa de los valles interandinos de América, desde México hasta Bolivia, planta domesticada desde la época prehispánica en la zona andina.

En algunos países se le conoce con el nombre de guayaba, arrayana, luma, guata, matos, chamicuil.

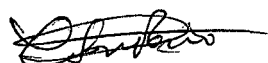
4.2.4. DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Las zonas de producción se ubican desde 200 a 3000 m.s.n.m de preferencia en la sierra de las regiones de Ancash, Huancavelica, Junin, Moquegua, Lima. Requiere clima con temporadas altamente húmedas y secas, con mayor éxito en valles interandinos, con temperaturas que van de 18° a 24°C, cultivándose mayormente bajo lluvia (Moreno, A.J 2000).

4.2.5. IMPORTANCIA Y USOS

La guayaba, es un fruto de los valles interandinos del Perú, destaca por su alto contenido de vitamina C, a manera de ejemplo, se muestra un comparativo de los valores de vitamina C reportados en muestras de guayaba y naranja en las Tablas de Composición de alimentos Mexicanos 2007 del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), donde se observa que la guayaba es una excelente fuente de esta vitamina.

Guayaba
Vitamina C (mg/100 g)
171



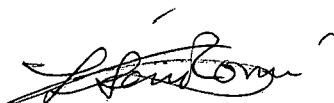
Naranja
Vitamina C (mg/100 g)
48,4

Además, por su contenido en vitamina C, el consumo de la guayaba es importante en la prevención de enfermedades crónicas; las hojas de la guayaba tienen propiedades medicinales que coadyuvan en los trastornos digestivos acompañados de diarrea y dolor abdominal, también evita la caída del cabello y la aparición prematura de las canas, se emplea contra la ictericia; las llagas e hinchazones; es buena para aliviar las molestias que se presentan en el padecimiento del reumatismo (Adame, 2008).

En 2007, el artículo denominado Great Guava, publicado en la revista Agricultural Research por investigadores del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de N.A, muestran que la carambola, pitahaya roja y mamey tienen niveles muy altos de compuestos antioxidantes llamados fenólicos, concluyendo que la fruta que tiene los niveles más altos de antioxidantes es la guayaba.

Los antioxidantes son sustancias químicas producidas por algunas plantas y que tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres, que son compuestos perjudiciales para el cuerpo humano y que se relacionan con enfermedades crónicas tales como el cáncer, el Alzheimer, artritis reumatoide, enfermedades cardíacas, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad y el envejecimiento.

En cuanto al aporte nutricional, es un alimento que destaca por su contenido en carotenoides fibra, agua. El resto de nutrientes presentes en esta fruta son vitaminas E, A, B9, B6, cinc, magnesio, calcio, fósforo, ácidos grasos



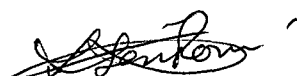
poliinsaturados, proteínas, ácidos grasos saturados, sodio y ácidos grasos monoinsaturados.

La vitamina C en la guayaba inhibe además el crecimiento de bacterias dañinas para el organismo, favorece el sistema inmunitario, previene enfermedades vasculares al reducir la tensión arterial, y es empleada en tratamiento contra alergias como el asma o la sinusitis. En cuanto al desarrollo del organismo, esta vitamina tiene un destacado papel, en el mantenimiento de cartílagos, huesos y dientes, ayuda a la absorción del hierro no hémico, y es imprescindible en la formación de colágeno, por lo que previene contra afecciones de la piel y contribuye a la cicatrización de heridas y quemaduras. También es sabido que mejora la visión y reduce la posibilidad de aparición de glaucoma y catarata, además de combatir el estreñimiento por sus propiedades laxantes.

Debido a la elevada concentración de carotenoides, la guayaba actúa como antioxidante, previniendo el envejecimiento celular y protegiendo al organismo frente a los radicales libres y la aparición de cáncer, a la vez que se incrementa la eficiencia del sistema inmunitario y se reducen las probabilidades de ataques cardíacos. Los carotenos son también requeridos por nuestro organismo para la formación de vitamina A.

La guayaba por su contenido en fibra, ayuda a que se den en el organismo las condiciones favorables para la eliminación de determinadas sustancias nocivas como colesterol o ciertas sales biliares, y colaboran en la disminución de glucosa y ácidos grasos en la sangre. Por este motivo, los alimentos ricos en fibra se antojan indispensables en una dieta excesivamente rica en carbohidratos, proteínas o grasas; además colaboran en la eliminación de agentes cancerígenos.

La guayaba tiene un alto contenido de agua, y por lo tanto favorece la hidratación de nuestro organismo, a que debemos abastecer, incluyendo el consumo a través de los alimentos, con una cantidad de agua que oscila entre 2,7 a los 3,7 litros



diarios, dependiendo de cada constitución, de la actividad física desarrollada, o de estados como el embarazo, la lactancia, enfermedades o exposición a fuentes de calor, circunstancias estas últimas donde las necesidades de consumo aumentan.

4.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS

Las sustancias bioactivos o fitoquímicos se encuentran abundantemente en frutas y verduras, y en las bacterias "ácido lácticos" presentes en productos lácteos obtenidos por fermentación ácido láctica como yogurt, leche cortada y verduras fermentadas (Barnes, 1996).

4.3.1. CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

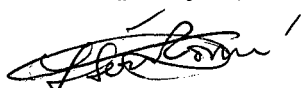
Según Dittrich, H.Y. Leitzmann se clasifican en:

Compuestos fenólicos y se encuentran en una amplia variedad de alimentos de origen vegetal y sus derivados como cebolla, manzana, bayas, vino.

Fitoesteroles, presentes en diversos aceites vegetales, como el de oliva, maíz, girasol soja.

Fitoestrógenos, los más estudiados son las isoflavonas y lignanos por sus potenciales efectos benéficos para el organismo. Dentro de cada fase de compuestos bioactivos existen diversas subclases, por ejemplo los ácidos fenólicos, flavonoles, flavones, flavononas y lignanos son subclases de los compuestos fenólicos. Estos subclases tienen en la mayoría de casos, la misma estructura química genérica.

Carotenoides o tetraterpenoides son una clases de pigmentos con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranyl-geranylpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno).



4.3.2. PRINCIPALES FITOQUIMICOS

4.3.2.1 GLUCOSINOLATOS

Según Barnes, S. 1996 son sustancias aromáticas picantes que conceden un sabor especial a la mostaza, rábano, coles y otras verduras, liberan los compuestos aromáticos y bioactivos sólo cuando son cortados. Se les atribuye efectos anticancerígenos y son efectivos en infecciones urinarias.

Los glucosinolatos son sustancias liposolubles, se absorben en el intestino delgado y se eliminan casi sin alteraciones por las vías urinarias, es por este motivo por lo que los aceites aromáticos de las raíces y hojas picantes de las plantas citadas son efectivos en las inflamaciones de las vías urinarias.

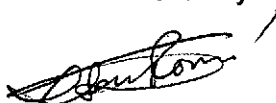
4.3.2.2 ISOTIOCIANATOS

Según Barnes S. 1996 existen como sus glucosinolatos conjugados en una amplia variedad de vegetales crucíferos, los isotiocianatos son responsables, en parte del sabor especial de ciertos vegetales como el berro y los repollos.

Los isotiocianatos son agentes quimiopreventivos más efectivos conocidos. Una amplia variedad de isotiocianatos previenen el cáncer de diferentes tejidos incluyendo el de pulmón, mamas, esófago, hígado, intestinos, vesícula biliar evidenciada en experimentos con ratas.

4.3.2.3 FENOLES

Según Luximon Ranma, A. Bahorum T. y Crozier 2003 en este grupo se incluyen los monofenoles, polifenoles, flavonoides y taninos; las frutas y vegetales frescos, así como los cereales contienen cantidades apreciables de fenoles naturales. Los tres grupos más importantes de fenoles dietéticos son los flavonoides, ácidos fenólicos y los polifenoles; los flavonoides son el grupo más numerosos de fenoles



vegetales y los más estudiados. Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico.

Los polifenoles o polímeros fenólicos, conocidos como taninos, son compuestos de alto peso molecular que se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados.

Los monofenoles presentan un solo grupo $-OH$ en el anillo aromático del benceno.

Entre los polifenoles existen, los difenoles, con dos grupos $-OH$ en el anillo aromático, como la hidroquinona; los trifenoles, con tres grupos $-OH$ en el anillo aromático, siendo el ácido gálico un ejemplo de estos, está presente en forma esterificada en las catequinas de té, o condensado en taninos hidrolizables (ácidos tánicos)

La vainillina cuyo nombre químico es 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído es otro componente del grupo de los fenoles simples, y es un saborizante popular.

Ejemplos de los derivados del ácido hidrocínámico son los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico, generalmente están presentes en diversas formas conjugadas, siendo más frecuentes como ésteres que como glucósidos, el miembro más importante de este grupo, en los alimentos, es el ácido clorogénico.

Los flavonoides son el grupo simple de fenoles más grande en alimentos vegetales; son compuestos de bajo peso molecular que generalmente existen enlazados a moléculas de azúcares. Los flavonoides están agrupados en antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son moléculas de pigmentos rojos, azules y púrpuras. Las antoxantinas, que incluyen flavonoles, flavonas e isoflavonas son moléculas incoloras o de colores que oscilan desde el blanco hasta el amarillo.



Los polifenoles tienen acción antioxidante, pueden reducir la peroxidación de los lípidos, el consumo frecuente de frutas y vegetales frescos se asocia con una menor incidencia de cáncer en humanos y en carcinogénesis experimental. Los polifenoles se hallan en las capas superficiales de verduras, frutas, cereales y otras semillas, para proteger de la oxidación los tejidos de las capas inferiores; son también anticoagulantes, antimicrobianos, inmunoestimulantes y reguladores de la presión arterial y de la glucemia.

Los principales fuentes de fenoles y polifenoles son frambuesas, zarzamoras, el té, manzanas, peras, guayabas, frambuesas, nueces.

4.3.2.4 FLAVONOIDES O BIOFLAVONOIDES

Los flavonoides (del latín flavus, amarillo) y las antocianinas son compuestos fenólicos solubles en agua, metanol y etanol, con características de glucósidos; contienen como aglucon un núcleo flavilo al cual se une a una fracción de azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. En realidad, algunos flavonoides son precursores en la biosíntesis de antocianinas. Son pigmentos no nitrogenados, con un esqueleto de difenilpropano derivado del ácido shiquímico. Los flavonoides pueden tener estructuras simples o muy complejas, debidos a la polimerización, como es el caso de los taninos condensados, que alcanzan pesos superiores a 30,000 Da. Hay 13 subclases de flavonoides, lo que da un total de más de 5000 compuestos, que proporcionan colores amarillo y naranja a frutas como peras, fresas, manzanas, cerezas, duraznos, naranjas y limones; así como a hortalizas como cebollas y brócoli y otros alimentos como el té verde, en donde son responsables en gran parte de su astringencia.

Los flavonoides de mayor importancia en los alimentos es el de los flavonoles, siendo la quercetina que se encuentra en la cebolla, miel, manzana, brócoli, cerezas, uvas, col, col de Bruselas, espinacas, habas, el kamferol en fresas,



puerro brócoli, rábano, remolacha y la miricetina en uvas. Dada su capacidad de capturar radicales libres y de crear complejos con los iones metálicos, tienen una actividad antioxidante muy alta.

Antocianinas, estas cuyo nombre proviene del griego anthos, flor y Kyanos, azul. Se consideran una subclase de los flavonoides, también se conocen como flavonoides azules. Son compuestos vegetales no nitrogenados pertenecientes a la familia de los flavonoides, de amplia distribución en la naturaleza. A pesar de contener pocos grupos cromóforos, se han identificado 300 de estos compuestos, que son responsables de una gama muy amplia de colores, desde el incoloro hasta el púrpura. Producen colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas, rosas, fresas y otros productos de origen vegetal, principalmente frutas o piel. Generalmente se encuentran en la cáscara o piel, como en el caso de las peras y las manzanas, pero también se pueden localizar en la parte carnosa, como en las fresas y las ciruelas.

Betalainas, son un grupo de aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles, con estructuras de glucósidos, derivados de la 1,7-diazohepta metina, y que se han dividido en dos grandes clases: los rojos o betacianinas, y los amarillos o betaxantinas.

Son parecidas a los antocianinos y flavonoides en apariencia visual, anteriormente se las llamaba antocianinas nitrogenadas.

Las betalainas, al igual que las antocianinas, se acumulan en las vacuolas celulares de las flores, frutos y hojas que los sintetizan, principalmente en la epidermis y subepidermis.

De las fuentes de betalainas, sólo el betabel, el amaranto y los frutos de cactáceas (tunas rojas, pitaya, garambullo, fiotilla), son productos alimentarios. En el betabel, la betalaína corresponde a un 75-95% de los pigmentos, los otros son



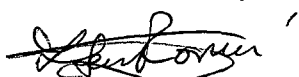
isobetanina, prebetanina e isoprebetanina; los dos últimos son monoésteres sulfatados de la betanina e isobetanina respectivamente. La del amaranto (*Amaranthus tricolor*), amarantina, es una de las betacianinas que últimamente ha sido motivo de investigación, se ha usado en algunos países para colorear diversos alimentos.

Las betalainas son uno de los pigmentos autorizados como aditivos por la FDA que no necesita certificación; se comercializan como polvo de betabel, que incluye el pigmento y estabilizantes como azúcares y proteínas y antioxidantes.

4.4. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS.

La evaluación de los compuestos bioactivos en una muestra que contengan estos, se basa en la capacidad antioxidante, mediante el método DPPH, (reactivo: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), fue propuesto por primera vez por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH[•] para aceptar un átomo de hidrógeno (H[•]) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable, debido a la deslocalización de un electrón desapareado, sobre la molécula completa, por lo cual ésta no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso, típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm.

Otro método denominado ABTS (reactivo: ácido 2,2'-azino-bis-3-estibenzotrazolin-6-sulfónico); se basa en la generación del radical ABTS y constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras o mezclas acuosas. El ensayo original de ABTS^{•+} estaba basado en la activación de la metil mioglobulina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión en presencia o ausencia de antioxidantes.



Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidante (Rec. al. 1999).

La tecnología mejorada para la generación del radical catión $ABTS^{*+}$, implica la producción directa del cromóforo $ABTS^{*+}$ verde-azul a través de la reacción entre $ABTS$ y el persulfato de potasio. Se mide a 645 nm, y la adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a $ABTS$. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^{*+}$ esta determinado en función de la concentración y el tiempo; así como el valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

Trolox (cuyo nombre en inglés es: 6-hidroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromon-2-carboxylic acid) es un análogo de la vitamina E, soluble en agua. En un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo.

La capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) en inglés se lee como equivalent antioxidant capacity, mide la capacidad antioxidante de una sustancia dada, en comparación con el estándar de trolox, medido en unidades llamados trolox equivalentes (TE). Por ejemplo micromol TE/100 g. Debido a las dificultades para medir componentes antioxidantes individuales de una mezcla compleja (como los arándanos o los tomates), Trolox equivalencia se utiliza como referencia para la capacidad antioxidante de una mezcla de este tipo.

4.5 VITAMINA C Ó ACIDO ASCORBICO

El ácido ascórbico tiene una estructura de lactosa. La acidez no se debe a un grupo carboxílico, sino a la posibilidad de que se iónice el hidroxilo situado sobre el carbono 3, formando un anión que queda estabilizado por resonancia.



Se sabe que es un compuesto polar con gran masa molecular 140 000, que le impide atravesar la membrana celular por simple difusión (Duran, M.H. 2000).


Las propiedades del ácido ascórbico o vitamina C, que junto a las vitaminas B pertenecen al grupo de hidrosolubles, son variadas y complejas, pues los investigadores informan, desde su descubrimiento en 1936, casi periódicamente sobre nuevas aplicaciones del ácido ascórbico, un alimento funcional, porque más allá de nutrir tienen efectos benéficos para la salud, tales como, su utilidad en la prevención de la formación de cataratas y en el riesgo de desarrollar degeneración macular en personas mayores o ancianas, al servir de coadyuvante en la fecundidad masculina, al apuntalar al sistema inmune contra los efectos del resfriado, asma, tabaco y contaminantes aéreos, también suprime la aparición de células leucémicas y el crecimiento del tumor rectal y cáncer de cérvix; en los diabéticos potencia la acción de la insulina y en el metabolismo de los carbohidratos y acelera la curación de los heridas, ayuda en la formación de colágenos, puede reducir edemas, por su efecto de estimulación de la diuresis, es un potente neutralizador de venenos (mercurio, arsénico y toxinas bacterianos) y retarda el envejecimiento de la piel(Duran, M.H. 2000).

4.5.1 DISTRIBUCION DE VITAMINA C EN LOS ALIMENTOS

La vitamina C o ácido ascórbico se encuentran en las frutas cítricas en mayor porcentaje y vegetales como las hortalizas y legumbres (Duran, M.H. 2000).

4.5.2 IMPORTANCIA DE VITAMINA C EN LA DIETA

La importancia de la vitamina C o ácido ascórbico es tal que la mayoría de los mamíferos son capaces de sintetizarla, pero algunas especies, entre ellas el hombre, dependen de fuentes exógenas para obtenerla (Duran, M.H. 2000).



El humano adquiere, de forma natural, vitamina C de los alimentos, el organismo no lo almacena, por tanto la biodisponibilidad sérica del ácido ascórbico este ceñida por la interacción entre absorción intestinal y excreción renal.

Las propiedades del ácido ascórbico son variados y complejos referidos la mayoría de ellas al papel como antioxidante de las especies de oxígeno reactivos que se generan durante la respiración mitocondrial, que afecta irremediamente al sistema inmunitario, circulatorio y respiratorio, visión, metabolismo, piel y a todos los células del organismo. De la complejidad funcional de la Vitamina C deriva la necesidad de mantener al día lo que se conoce de este nutriente.

El hombre que no consuma vitamina C, pues el cuerpo no la puede producir, sufre irremediamente de escorbuto, patología caracterizada por fragilidad de los vasos sanguíneos, daño del tejido conectivo, fatiga y finalmente muerte. Por otro lado, la toxicidad del ácido ascórbico no es común porque el organismo no lo almacena, sin embargo no es prudente consumir suplementos liposolubles en cantidades superiores a 2000mg/día debido a que puede provocar malestar estomacal, diarrea, ataques de gota, empeorar la litiasis renal por cálculo de oxalato, generar daños genéticos (efecto oxidante en el ácido desoxirribonucleico ADN), e incluso provocar deterioro al corazón y otro órganos, debido a que el ácido ascórbico de los suplementos moviliza el hierro almacenado en el organismo (férrico) y lo convierte en la forma dañina (ferroso), que daña los órganos(Duran, M.H. 2000).

4.5.3 METODO DE CUANTIFICACION DE VITAMINA C

Para determinar la concentración de vitamina C o ácido ascórbico en una muestra que contenga éste se procede a una valoración redox(Ruiz, H.J. 2001)



El ácido ascórbico en presencia de iodo se oxida, siendo éste el oxidante para este proceso redox, que se obtiene al hacer reaccionar, lodato de potasio con yoduro de potasio(Ruiz, H.J. 2001).

El ácido ascórbico se oxida en presencia del exceso de iodo, produciendo el ácido deshidroascórbico, luego se añade yoduro de potasio para obtener yodo libre. Conocida la cantidad de yodo generada, se procede a valorar el exceso de iodo remanente, luego valorar el ácido ascórbico, con una solución de tiosulfato de sodio es decir se realiza una valoración en retroceso, utilizando indicador de almidón(Ruiz, H.J. 2001).

4.6 CAROTENOIDES: DEFINICION

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranyl-geranylpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno)(Moreno, A.M. 1999).

Los carotenoides son pigmentos orgánicos que se encuentran en forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias; se conoce la existencia de más de 700 compuestos pertenecientes a este grupo (Moreno, A.M. 1999).

4.6.1 CLASIFICACION

En los carotenoides los átomos de carbono se encuentran ordenados formando cadenas poliénicas conjugadas en ocasiones terminadas en anillos de carbono; a los carotenoides que contienen átomos de oxígeno se les conoce más específicamente como xantófilos; los restantes constituyen el grupo de los llamados carotenos(Moreno, A.M. 1999).



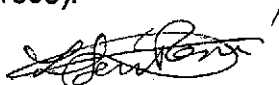
Su color, varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro, se encuentran directamente relacionado con su estructura, los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en su proceso denominado conjugación; mientras el número de dobles enlaces conjugados aumenta la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza. Por ejemplo el fitoeno que posee únicamente tres dobles enlaces conjugados absorbe luz en el rango ultravioleta y apareciendo por tanto incoloro a la vista. El licopeno compuesto que confiere el color rojo al tomate contiene once enlaces dobles conjugados. Existen también carotenoides de color verde (β -caroteno), amarillo (α -caroteno), y anaranjado (neurosporaxantina) (Moreno, A.M. 1999).

4.6.2 DISTRIBUCION Y ESTADO NATURAL

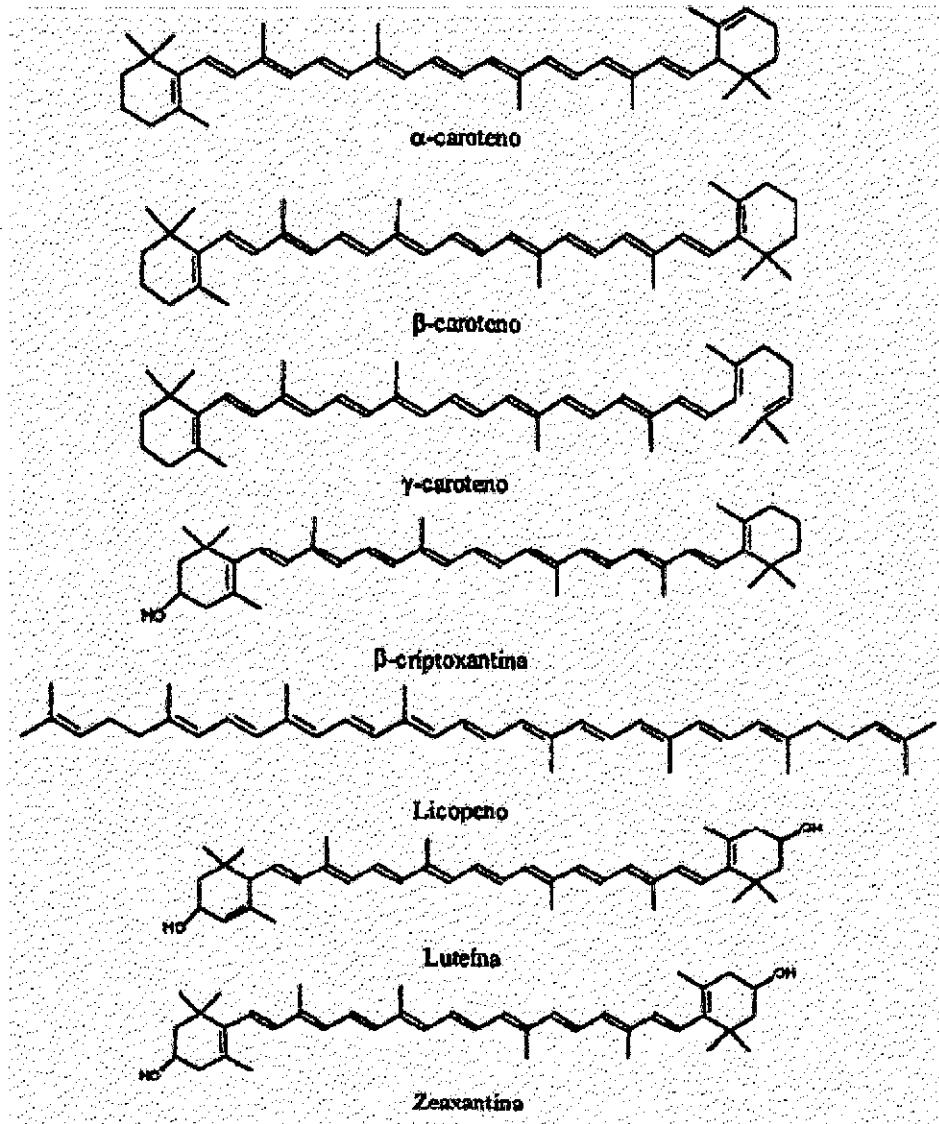
Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en bacterias y muy pocos se han reportado en animales, (por ejemplo los colores rojizos de las plumas del flamenco son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas estrellas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

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

Los carotenoides se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón, zanahorias). Se presenta a continuación las estructuras químicas de α - β - γ -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina (Moreno, A.M. 1999).



Estructuras químicas de α - β - γ -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.



Fuente: Estructuras químicas de α - β - γ -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina (Meléndez-Martínez - 2004).

Los carotenoides se encuentran en frutos y vegetales amarillos y en los cloroplastos de tejidos verdes, donde están enmascarados por la clorofila hasta que el tejido envejece. El contenido en carotenoides de las frutas aumenta

[Handwritten signature]

durante la maduración, si bien parte de la intensificación del color se debe a la pérdida de clorofila (Moreno, A.M. 1999).

Hasta hace pocos años, gran parte de la importancia nutricional de éstos pigmentos ha radicado en el hecho de que algunos de ellos poseían actividad provitamina A, si bien recientemente se ha puesto de manifiesto que la relevancia de estos compuestos va más allá, al haberse demostrado que juegan un papel importante en la prevención de diversas enfermedades degenerativas humanas.

4.6.3 DISTRIBUCION DE CAROTENOIDES EN LOS ALIMENTOS

Los carotenoides están ampliamente distribuidos entre los seres vivos. Es en los vegetales donde se encuentran en mayor concentración y variedad, aunque también se encuentran en bacterias, algas, hongos, así como en animales, si bien estos no pueden sintetizarlos. Se estima que en la naturaleza se producen anualmente más de 100 000 000 de toneladas de carotenoides; la mayor parte de esta cantidad se encuentra en forma de fucoxantina (en diversas algas) y en los tres principales carotenoides de las hojas verdes: luteína, violaxantina y neoxantina; en algunas especies como *Lactuca sativa*, la lactucaxantina es un pigmento mayoritario, se presenta a continuación la distribución de carotenoides en diversos alimentos (Meléndez, M.A. 2002).



Distribución de carotenoides en diversos alimentos

Alimento	Carotenoides Mayoritarios
Zanahoria (<i>Daucuscarota</i>)	α - β -caroteno
Naranja (<i>Citrussinensis</i>)	Violaxantina, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Violaxantina, β -caroteno
Tomate (<i>Lycopersicomesculentum</i>)	Licopeno
Pimiento rojo (<i>capsicumannuum</i>)	Capsantina, capsorrubina
Melocotón (<i>Prunuspersica</i>)	β -criptoxantina, luteína
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	β -criptoxantina, β -caroteno
Guayaba (<i>Psidiumguajava</i>)	Licopeno, β -caroteno
Ciruela (<i>Spondiaslutea</i>)	β -criptoxantina

Fuente: Meléndez-Martínez, Antonio. Área de Nutrición y Bromatología.

Universidad de Sevilla. España 2002.

La distribución de carotenoides entre los distintos grupos de plantas no presenta un patrón único; en verduras, el contenido en carotenoides sigue el modelo general de los cloroplastos de todas las plantas superiores, siendo generalmente luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina, en este orden, los mayoritarios. En pequeñas cantidades se encuentran zeaxantina, β -caroteno, β -criptoxantina y anteraxantina (Meléndez, M.A. 2002).



En frutos, las xantofilas suelen encontrarse en mayor proporción, aunque en algunos casos, los pigmentos mayoritarios son carotenos, como es el caso del licopeno del tomate (Meléndez, M.A. 2002).

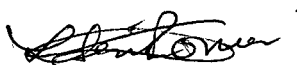
A veces, en ciertos frutos ocurre que algún carotenoide, además de ser mayoritario, se limita a una sola especie de plantas. La capsantina y capsorrubina se encuentran casi exclusivamente en frutos del género *Capsicum* y son los principales pigmentos que dan color al pimiento rojo, se debe tener en cuenta que el patrón de carotenoides en un mismo fruto varía en función de factores como la variedad y las condiciones climáticas entre otros (Meléndez, M.A. 2002).

En los animales, los carotenoides son incorporados a través de la dieta y se almacenan en el tejido adiposo sin transformarse. La yema de huevo debe su color a dos xantofilas, luteína y zeaxantina, y a trazas de β -caroteno, mientras que la astaxantina es responsable del color rosado de la carne del salmón. En ocasiones, algunos carotenoides como la astaxantina, se unen a proteínas originando unos compuestos conocidos como carotenoproteínas, lo cual ocurre en algunos crustáceos; estos confieren a estos animales colores verdosos o azulados, si bien cuando estos complejos se desnaturalizan durante la cocción se pone de manifiesto el color rojo del carotenoide (Meléndez, M.A. 2002).

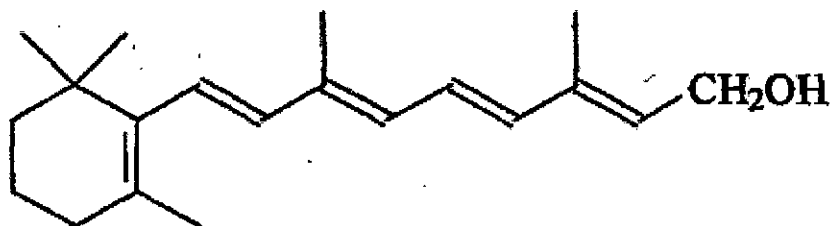
4.6.4 IMPORTANCIA DE CAROTENOIDES EN LA DIETA

Además de la contribución de los carotenoides al color atractivo de las frutas y verduras, destaca, por su importancia a nivel fisiológico y dietético, la propiedad de algunos de ellos de tener actividad como pro vitamina A (Meléndez, M.A. 2002).

La vitamina A es esencial para la visión nocturna y necesaria para mantener sanos la piel y los tejidos superficiales. Puede aportarse como tal vitamina,



llamada retinol, como algunos análogos menos activos, o como sus precursores, los carotenoides. El retinol es un alcohol cíclico, insaturado, de veinte átomos de carbono, compuesto por un núcleo de β -ionona y una cadena lateral insaturada; en la molécula de retinol existen cinco dobles enlaces conjugados, incluido el doble enlace del anillo de β -ionona que está conjugado con los de cadena lateral, a continuación se presenta la estructura del retinol(Meléndez, M.A. 2002).



No todos los carotenoides son precursores de la vitamina A, por lo que se divide en dos grandes grupos: provitamínicos y no provitamínicos. El número de carotenoides precursores de vitamina A oscila entre 50 y 60, destacando los carotenos (α - β - γ -caroteno) y algunas xantofilas (β -criptoxantina) (Meléndez, M.A. 2002).

La capacidad de los carotenos para actuar como provitamina A depende de la conversión en retinol por los animales, así como de la presencia de β -ionona. Los carotenos que contienen como mínimo un anillo de β -ionona pueden convertirse en retinol en los animales; de esta forma, el carotenoide más importante al respecto es el β -caroteno, que contiene 2 de estos anillos; el α - y el γ -caroteno pueden convertirse en retinol en los animales con la misma eficacia que el β -caroteno, ya que el anillo del α -caroteno, no puede convertirse en el organismo en β -ionona, y la estructura abierta de la cadena del γ -caroteno no

puede hacerse cíclica en los animales. Últimamente los carotenoides están suscitando un gran interés debido a una serie de estudios que demuestran su actividad antioxidante (Meléndez, M.A. 2002).

La actividad antioxidante de estos pigmentos depende de una serie de factores, como su estructura química (tamaño, número de sustituyentes, configuración cis o trans, etc.) su concentración, la presión parcial del oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E.

Existen estudios que relacionan la aparición de algunos tipos de cáncer con la carencia de ciertos carotenoides en la dieta, por lo que son considerados compuestos anticancerígenos, varias investigaciones epidemiológicas han mostrado que el riesgo de padecer cáncer es inversamente proporcional al consumo de vegetales y frutas ricos en carotenoides (Meléndez, M.A. 2002).

4.7 EXTRACCION DE LOS CAROTENOIDES

Los carotenoides debido a su alta conjugación de dobles enlaces presentes en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire; la luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide (por ejemplo isomerismocis y trans) es un factor a considerar al momento de realizar la extracción (Meléndez, M.A. 2002).

El calor también favorece reacciones térmicas de degradación, el aire debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidróxidos y peróxidos, entre otros. Por las razones expuestas se debe preferiblemente realizar en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de oxígeno (por ejemplo con una atmósfera artificial de nitrógeno). Debido a que los carotenoides en su mayoría son solubles en solventes apolares como éter etílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, entre otros; y que se deben extraer de tejidos frescos, los cuales presentan



un alto contenido de agua, la cual dificulta una extracción eficiente, conviene eliminar dicha agua (Meléndez, M.A. 2002).

Un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición seguido de filtración; una alternativa a este proceso de deshidratación es la liofilización, la cual resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de aire (Meléndez, M.A. 2002).

Si en el extracto existen carotenoides esterificados, estos se pueden hidrolizar disolviendo el extracto en un volumen pequeño de solución de KOH al 60% etanólico, esta mezcla se deja en la oscuridad durante la noche, a temperatura ambiente y con agitación magnética, con lo cual los carotenoides son liberados.

Las mezclas de carotenos y las xantofilas mono y dihidroxiladas pueden separarse agitando una solución en éter de petróleo con un volumen de metanol al 90%; las xantófilas dihidroxiladas quedan en la fase metanólica, las monohidroxiladas y los carotenos quedan en la fase etérea.

Debido a que los extractos de carotenoides generalmente están impurificados por otras sustancias como los esteroides, estos se pueden eliminar dejando el extracto concentrado en solución de éter etílico, tapado y a -10°C durante la noche, de esta manera los esteroides se precipitan y pueden ser retirados por centrifugación o filtración (Meléndez, M.A. 2002).

4.8. METODOS DE CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES

4.8.1. EVOLUCIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

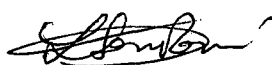
En el análisis de los carotenoides presentes en los alimentos, especialmente en los productos vegetales, dos actividades analíticas distintas pueden ser citadas: a) dilucidación de las estructuras de los carotenoides desconocidos, y b)



determinación de la composición. Los químicos orgánicos y bioquímicos están involucrados en la primera actividad. En éste, el principal interés es obtener el carotenoide puro y sin alteraciones, el criterio de pureza es riguroso, pero se toleran pérdidas cuantitativas. Para la dilucidación de estructuras de los carotenoides desconocidos, los analíticos recurren los técnicos como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la espectrometría de masas. Los científicos de alimentos y nutricionistas están interesados en la segunda actividad para la cual el requerimiento de pureza no es tan estricto, pero se necesita una extracción completa, separación eficiente, identificación conclusiva y una cuantificación exacta. En ambos casos, son esenciales precauciones severas para proteger a los carotenoides de la oxidación, isomerización (Rodríguez – Amaya, 1993).

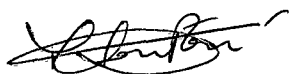
Con los diversos roles atribuidos a los carotenoides, el análisis cuantitativo ha sido aproximado en muchas formas, dependiendo del objetivo del analista. Los carotenoides se estudiaron inicialmente debido a su color, por lo tanto el contenido de carotenos totales fue determinado simplemente por extracción, medida espectrofotométricamente y cálculo, basado en el coeficiente de absorción del β -caroteno o de aquel carotenoide principal (Rodríguez-Amaya, 1993).

El contenido de carotenoides totales también fue usado para estimar el valor de vitamina A de los alimentos. Sin embargo, temprano se comprendió que grandes cantidades de carotenoides sin actividad de provitamina A estaban presentes en muchos alimentos. Por lo tanto se propusieron métodos que involucran la separación de la fracción de los "carotenos" por cromatografía de columna abierta (columna clásica de flujo por gravedad). El más conocido de estos métodos es el de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) introducido en su forma presente en 1955. La fracción de "carotenos" eluida a partir de una columna MgO: Hyflo-supercel se asume β -caroteno. Sin embargo, esta fracción puede contener



cantidades considerables de otros carotenoides provitamina A, obviamente con actividad menor, junto con otros carotenoides desprovistos de actividad de provitamina A, por lo tanto, el valor de vitamina A podría ser ampliamente subestimado (Rodríguez-Amaya,1993). Según Wills et al (1984), Mercadante y Rodríguez-Amaya (1989-1991) con el ajuste correcto de las fases estacionario y móvil, la cromatografía de columna abierta puede ser utilizada para separar y cuantificar las provitaminas individualmente.

Con la introducción de la tecnología de la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC (High PerformanceLiquidChromatography), la investigación en los carotenoides de los alimentos ha sido intensificada en los últimos años. Muchos científicos han investigado en los últimos años la separación de las provitaminas o de los carotenoides en general. Sin embargo, incluso con esta poderosa técnica pronto se volvió evidente que ningún sistema por sí solo es aplicable a diferentes muestras de alimento y es capaz de separar todos los carotenoides en una sola corrida. El análisis cuantitativo es acosado por varios problemas: a) los carotenoides absorben máximamente a diferentes longitudes de onda; b) sus coeficientes de absorción difieren; c) los efectos de solvente pueden ser sustanciales, d) los estándares son inestables, de pureza variable y comercialmente no están disponibles para la mayoría de los carotenoides. El procedimiento más simple de cuantificación, el cálculo de los porcentajes de área, por lo tanto, sólo se puede tomar como un método que brinda resultados aproximados. Se requiere de una estandarización externa e interna para obtener las concentraciones absolutas, sin embargo, la necesidad de estándares confiables complica el procedimiento (Rodríguez – Amaya, 1993).



4.8.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ULTRAVIOLETA – VISIBLE (UV-VIS)

Esta técnica involucra el uso de un instrumento de laboratorio que mide el grado de absorción de luz de una muestra. El diseño del instrumento es tal que una longitud de onda monocromática de luz proveniente de una fuente de luz (dentro del instrumento) índice a través de una solución de muestra. La cantidad de luz absorbida por esta solución es medida electrónicamente por un tubo fotomultiplicador y visualizada en un dispositivo de lectura. El analista es capaz de cuantificar un constituyente en la muestra relacionando este grado de absorbancia mostrado por el instrumento en la concentración del constituyente (Kenkel, 1992). Además de este análisis cuantitativo, también se puede realizar un análisis cualitativo observando el patrón de absorción que una muestra exhibe a lo largo de un rango de longitudes de onda, lo que se conoce como “espectro de absorción molecular”. En teoría los patrones de absorción de dos especies químicas diferentes no son exactamente iguales. Por lo tanto, se podría decir que se tiene una “huella digital” molecular y esto es lo que hace que la identificación o análisis cualitativo sea posible (Kenkel, 1992).

El instrumento moderno es capaz de llevar tanto el análisis cualitativo como el cuantitativo (Kenkel, 1992). En la figura 1 se muestran los componentes básicos de un espectrofotómetro. La fuente de luz (policromática) proporciona la luz que va a ser dirigida a la muestra.

El selector de longitud de onda o monocromador, aísla la longitud de onda que va a ser usada. El compartimiento de la muestra es una “caja” estrecha donde se sostiene la solución de la muestra y los componentes del detector / lector son los módulos electrónicos, los cuales miden y muestran el grado de absorción (Kenkel, 1992).



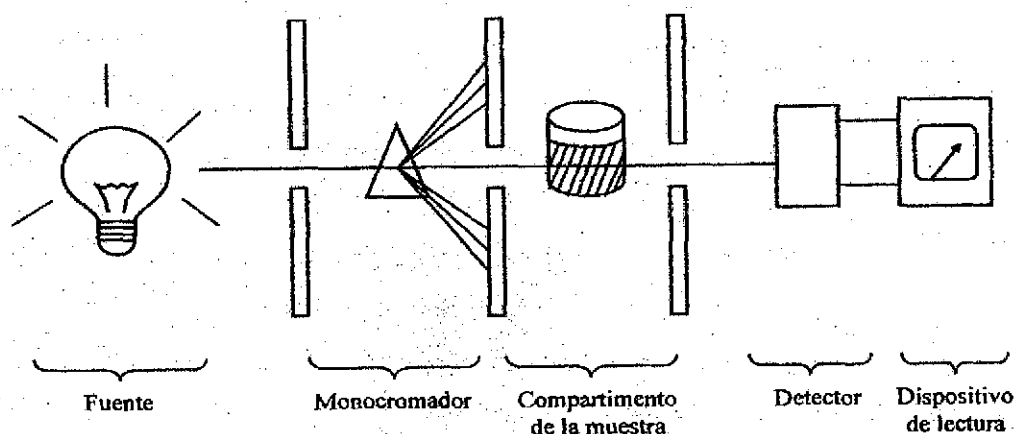


Figura 1. Componentes básicos de un espectrofotómetro. (Kenkel, 1992)

4.8.2.1. EL CONCEPTO DE ABSORBANCIA

La intensidad de luz que golpea al detector cuando una solución "blanco" está presente en la cubeta se le da el símbolo de I_0 . El blanco es una solución que contiene todas las especies químicas que estarán presentes en los estándares y en las muestras que será medidas (a los mismos niveles de concentración), excepto por la especie analítica (Kenkel, 1992).

Una solución de este tipo no deben mostrar absorción y por lo tanto I_0 representa la intensidad máxima que puede golpear al detector en cualquier momento. Cuando el blanco es reemplazado por una solución del analito, se detectará en haz de luz menos intenso. La intensidad de la luz para esta solución es denotada por el símbolo I (Figura 2). Por lo tanto la fracción de luz transmitida de I/I_0 . Esta fracción es definida como la "transmitancia" "T" (Kenkel 1992).

[Firma manuscrita]

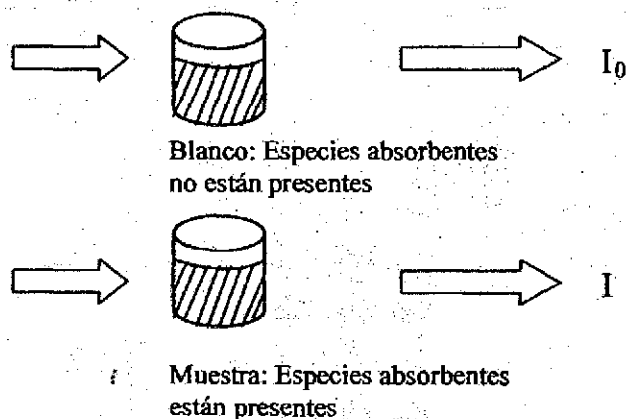


Figura 2. Ilustración de las definiciones de I e I_0 (Kenkel, 1992)

Entonces $T = I/I_0$. El porcentaje de transmitancia es similarmente definido: $\%T = T \times 100$. El aspecto infortunado de la transmitancia es que no es lineal con la concentración, concentraciones bajas resultan transmitancias altas y concentraciones altas producen bajas transmitancias. Sin embargo, la relación no es lineal sino logarítmica. Debido a que la relación es logarítmica, se espera que el logaritmo de la transmitancia sea lineal. Por lo tanto, se definió el parámetro de "absorbancia" como el logaritmo negativo de la transmitancia y se le dio el símbolo "A".

$$A = -\log T$$

Entonces la absorbancia es un parámetro que aumenta linealmente con la concentración (Kenkel, 1992).

4.8.3. CROMATOGRAFIA

4.8.3.1 ASPECTOS GENERALES

La cromatografía puede ser considerada como la separación de los componentes de una mezcla basada en los diferentes grados de interacción de estos

[Handwritten signature]

componentes en dos fases materiales separadas. La naturaleza de las dos fases y el tipo de interacción pueden variar, y esto da origen a los diferentes "tipos" de cromatografía. Una de las dos fases, es una fase en movimiento (la fase "móvil") mientras que la otra no se mueve (la fase "estacionaria"). La mezcla que va a ser separada usualmente se introduce en la fase móvil, la cual se hace mover o filtrar a través de la fase estacionaria ya sea por gravedad o por cualquier otra fuerza. Los componentes de la mezcla son atraídos y retardados por la fase estacionaria en grados variables, y como resultado, se mueven junto con la fase móvil a velocidades diferentes y por lo tanto son separados (Kenkel, 1992).

La fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. Un esquema de clasificación está basado en la naturaleza de las dos fases. Todas las técnicas que utilizan un gas como fase móvil, viene bajo el encabezamiento de "Cromatografía de Gas" (GC). Todas las técnicas que utilizan una fase móvil líquida vienen bajo el encabezamiento de "Cromatografía Líquida" (LC). Adicionalmente, se tiene cromatografía gas-líquido (GLC), cromatografía líquido-sólido (LSC) si queremos estipular la naturaleza de la fase estacionaria así como la de la fase móvil. Sin embargo, es más útil clasificar las técnicas de acuerdo a la naturaleza de la interacción de los componentes de la mezcla con las dos fases. Estas clasificaciones se pueden denominar como "tipos" de cromatografía. Los tipos de cromatografía más importantes son: partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión por tamaño (Kenkel, 1992).

4.8.3.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

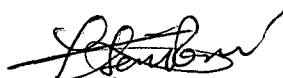
La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia "*High Performance Liquid Chromatography*" (HPLC), es un método de cromatografía instrumental en el cual la fase móvil es líquida. Todos los tipos de cromatografía líquida pueden ser



utilizados en la configuración del HPLC. Por lo tanto existen HPLC de partición (LLC), adsorción (LSC), fase enlazada (BPC), intercambio iónico (IEC) y exclusión por tamaño, incluyendo permeación en el gel (GPC) y filtración en gel (GFC) como tipos de HPLC comúnmente usados. El HPLC involucra el flujo a alta presión de una fase móvil líquida a través de un tubo de metal (columna) que contiene la fase estacionaria, con una detección electrónica de los componentes de la mezcla que ocurre al final del efluente. La alta presión que frecuentemente alcanza 4000 a 6000 psi es derivada de una bomba especial libre de pulsaciones (Kenkel, 1992).

El aumento en popularidad del HPLC se debe en gran parte a las ventajas ofrecidas por esta técnica sobre el método de columna abierta clásico, más antiguo. La ventaja más obvia es la velocidad. Los procedimientos de separación y cuantificación que requieren horas o hasta veces días con el método de columna abierta, pueden ser completados en cuestión de minutos con el HPLC. La tecnología de columnas modernas y sistemas de elusión de solventes por gradiente, han contribuido significativamente con esta ventaja permitiendo que muestras extremadamente complejas puedan ser resueltas con facilidad en un tiempo muy corto (Kenkel, 1992).

El sistema básico de HPLC consiste de: un reservorio para el solvente (fase móvil), bomba, dispositivo de inyección, columna y detector (Figura 6). La bomba arrastra la fase móvil del reservorio y la bombea a través de la columna. En la cabeza de la columna está el dispositivo de inyección, el cual introduce la muestra al sistema. Al final del efluente, un detector detecta los componentes de la muestra y la señal resultante es exhibida como picos en un registro gráfico en papel. Además de estos componentes básicos, una unidad de HPLC puede estar equipada con un programador de gradiente, un "automuestreador", una columna de protección "*guardcolumn*", varios filtros en línea y un integrador computarizado u otro sistema de manejo de datos (Kenkel, 1992).



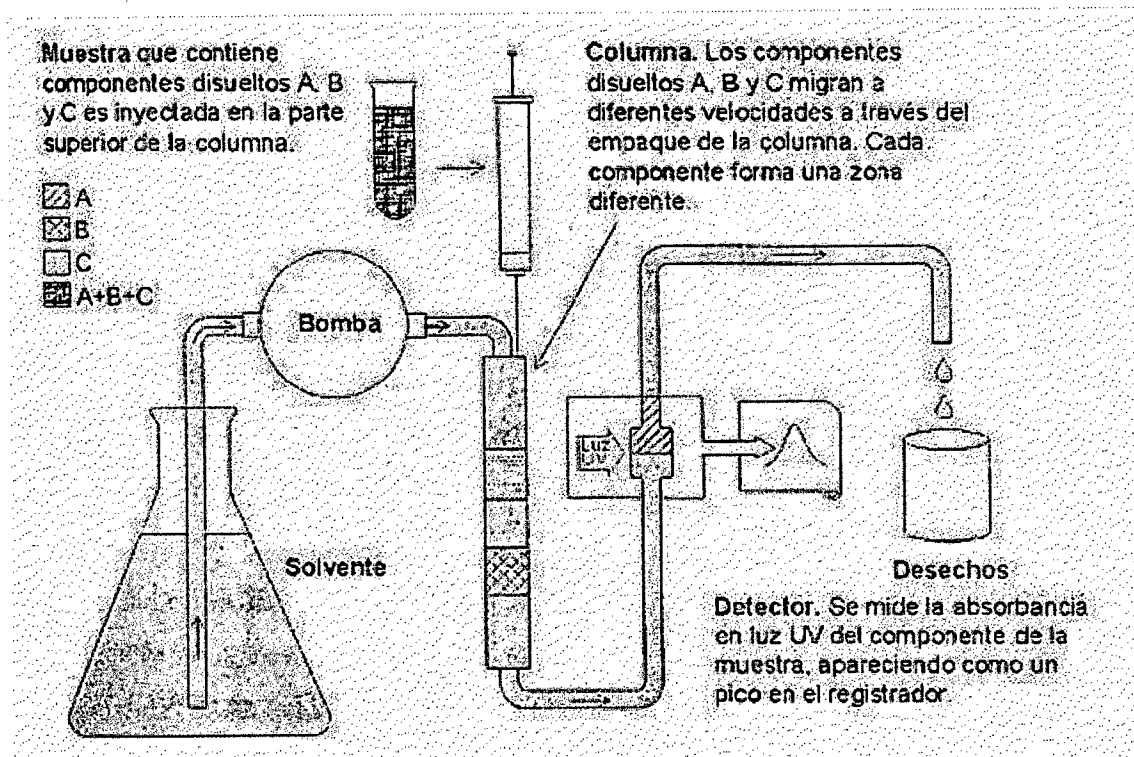


Figura 3. Diagrama de un sistema de HPLC en el cual los componentes de la mezcla A, B y C son separados. (Kenkel 1992).

Handwritten signature

V MATERIALES Y METODOS

5.1 MATERIALES Y REACTIVOS

a) MATERIALES

Crisoles

Bureta

Pipeta

Placas Petri

Tubos de ensayo

Matraz

Papel de filtro

Balón de Kjeldalh

Cartucho de celulosa

Embudo de separación

soporte universal

vasos de precipitado

pipetas volumétricos

lunas de reloj

pinzas para bureta

frascos de vidrio

crisoles de porcelana

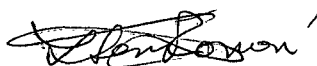
b) REACTIVOS

Solución de ácido clorhídrico

Solución de hidróxido de calcio

Solución de ácido sulfúrico

Hexano



Éter de petróleo

Acetona

Metanol

Solución de sulfato de cobre

Solución de sulfato de potasio

Solución de Iodato de potasio

Solución de Ioduro de potasio

Solución de tiosulfato de sodio

Solución de almidón

DPPH (1,1 difenil -2- picril-hidrazilo)

ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Persulfato de potasio de grado analítico

Carbonato de sodio anhidro

(+) – ácido ascórbico para análisis

Ácido metafosfórico

Ácido acético glacial

Ácido cítrico

Etanol

Hidroquinona

5.2 EQUIPOS

Mufla

Desecador

Estufa

Balanza analítica

Equipo de destilación

Equipo Soxhlet



Espectrofotómetro

Balanza analítica marca Mettler

Potenciómetro

Equipo de absorción atómica

5.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.3.1 MATERIA PRIMA

La guayaba (*Psidium guajava* L.), que es la materia prima de investigación proviene de los valles andinos del Perú.

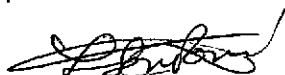
5.3.2 METODO

Para la obtención de la muestra de guayaba en el laboratorio se optaron los pasos siguientes:

- Selección de los frutos de guayaba sanos y sin magulladuras
- Lavado de los frutos de guayaba con agua destilada.
- Licuado del fruto de guayaba
- Filtrado
- Homogenizado con agitador magnético por 15 minutos.
- Centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm
- Extracto libre de precipitados

5.3.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE GUAYABA

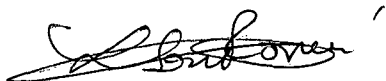
Para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante con los métodos DPPH y ABTS: se pesó 2,5g de muestra y se agregó 12,5mL de metanol, se homogenizó durante 15 minutos con agitador magnético y se almacenó durante 24 horas a 4°C en oscuridad, luego se procedió a centrifugar el homogenizado durante 20 minutos a 5000 rpm, el sobrenadante se guardó para análisis posteriores y el precipitado se eliminó.



Para los ensayos según el método DPPH, se tomó alícuotas del extracto obtenido igual a 150mL:

Para los ensayos según el método ABTS se tomó 50mL.

- **Ensayo y determinación de la actividad antioxidante (A A) por el método DPPH (Murillo et al 2007)**
- Se prepara solución del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidroziolo (DPPH[•]) de 20mg/L en metanol grado analítico.
- En tres tubos de ensayo se agregan 0,25mL del extracto a evaluar
- Se homogeniza y se incuba en oscuridad por 30 minutos.
- Se mide la absorbancia de la solución en el espectrómetro a 515 nm (A_{extracto})
- Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona a una concentración de 1000 µg/mL; como control negativo ($A_{\text{control (-)}}$) se tomó el sistema de disolución correspondiente.
- Ambos controles se midieron siguiendo el mismo protocolo usado para los extractos; además se mide el control fotométrico preparado a partir de 1,25mL de metanol para descartar la absorbancia de este solvente.
- El blanco de los extractos fue preparado a partir de 0,25mL de extracto y 1mL de metanol, esta solución fue medida a 515 nm de longitud de onda.
- **Ensayo y determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS^{•+} (Mathew et al. 2005)**
- Se prepara solución del reactivo ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotrazolin-6-sulfónico) pesando 77,6mg y disolviendo en 20mL de agua destilada para obtener una concentración de 7mM.
- Se prepara una solución de persulfato de potasio de concentración 2,45mM.
- Se agrega la solución de persulfato de potasio al reactivo ABTS^{•+}, se homogeniza y se incuba por 16 horas a temperatura ambiente.



- Se diluye la solución de ABTS⁺ en etanol absoluto hasta una absorbancia de $0,7 \pm (0,02)$ a 732 nm.
- Como control positivo se tomó una solución de hidroquinona 1000ug/mL; como control negativo (A control (-)) se usó el sistema de disolución correspondiente.
- Ambos controles se midieron siguiendo el mismo protocolo utilizado en la medición del extracto.
- Adicional a esto se midió el control fotométrico preparado a partir de 2mL de etanol – agua (1:1) para descartar la absorbancia del solvente en las mediciones.
- El blanco de los extractos se preparó a partir de 50μL del extracto y 1450μL de la mezcla agua-etanol (1:2). Esta solución fue medida a 732 nm de longitud de onda ($A_{\text{blanco extracto}}$).
- Se adiciona 50 μL de la solución de extracto a las concentraciones de 10, 50, 100, 250 y 500 μg/mL en tres tubos de ensayo.
- Agregar 1450 μL de solución ABTS⁺ preparada previamente a los tres tubos que contienen el extracto a evaluar.
- Se homogeniza y se deja reaccionar por 30 minutos en oscuridad.
- Medir la absorbancia de las soluciones a 732 nm de longitud de onda.

La capacidad captadora de radicales libres (% de actividad antioxidante) se calculará con la misma ecuación para el ensayo DPPH y es la siguiente:

$$\% \text{ Actividad Antioxidante (A A)} = \left[\frac{A_{\text{control(-)}} - (A_{\text{extracto}} - A_{\text{blanco extracto}})}{A_{\text{control (-)}}} \right] \times 100$$

Donde:

A_{extracto} :	Absorbancia de los extractos.
$A_{\text{blanco extracto}}$:	Absorbancia del blanco de los extractos.
$A_{\text{control (-)}}$:	Absorbancia del control negativo.

El porcentaje de actividad antioxidante a diferentes concentraciones Trolox.



Concentración Trolox (μM)	% A A
1	0
2	0,80
4	3,35
8	6,02
16	14,85
32	28,91

5.3.4 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA

5.3.4.1 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Según el método AOAC Official Method 930.04:1995 (The Association of Official Analytical Chemist) y AOAC Official Method 920.36:1995.

5.3.4.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Según el método AOAC Official Method 930.05:1995 y AOAC Official Method 920.09:1995

5.3.4.3 DETERMINACIÓN DE FIBRA BRUTA

Según el método AOAC Official Method 930.10:1995 (The Association of Official Analytical Chemist) y AOAC Official Method 920.09:1995

5.3.4.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Según el método AOAC Official Method 984.13:1995 (The Association of Official Analytical Chemist)

5.3.4.5 DETERMINACIÓN DE GRASAS

Según el método AOAC Official Method 930.09:1995 (The Association of Official Analytical Chemist) conocido como método Soxhlet.



5.3.4.6 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

El término carbohidratos total es definido por Agriculture Handbook del USDA, Composición de los Alimentos (1975), como el valor obtenido restando de 100 la suma del contenido de humedad, cenizas, proteína y grasas.

5.3.5 ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL PRODUCTO OBTENIDO: EXTRACTO DE GUAYABA

5.3.5.1 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

En un crisol previamente pesado se introduce 3.0 g de extracto de guayaba durante 80 minutos, luego se transfiere a un frasco desecador, hasta temperatura ambiente y se pesa inmediatamente obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso del residuo (g)} \times 100 \text{ de muestra}}{\text{Peso de la muestra en (g)}}$$

5.3.5.2 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Se pesa 3.0 g de extracto de guayaba en un crisol de porcelana y luego se coloca en una mufla a una temperatura de 600°C, durante 2 horas, transcurrido el tiempo se transfiere a un frasco desecador hasta temperatura ambiente y se pesa de inmediato, obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso del residuo (g)} \times 100 \text{ de muestra}}{\text{Peso de la muestra en (g)}}$$

L. S. R. R. R.

5.3.5.3 DETERMINACIÓN DE FIBRA BRUTA

Se pesa 3.0 g de extracto de guayaba y se transfiere a un matraz y se agrega 200 mL de solución de ácido sulfúrico al 1,25 % en peso y se hierve durante 30 minutos, se filtra y se lava con agua destilada. Al residuo obtenido se añade 200 mL de solución de hidróxido de sodio al 1,25 % en peso hirviéndose por 30 minutos, se filtra al vacío, lavando con agua destilada hasta eliminar la reacción alcalina. El residuo obtenido se incinera en la mufla a 600°C durante 1 hora, y una vez enfriado en el frasco desecador a temperatura ambiente, se pesa; obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{W_1 \text{ (g)} - W_2 \text{ (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

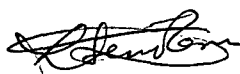
Donde: W_1 = Peso de fibra + minerales
 W_2 = Peso residuo incinerado

5.3.5.4 DETERMINACION DE PROTEINAS

Se pesa 4.0 g de extracto de guayaba y se introduce en un balón Kjeldhal y se agrega 1.0 g de sulfato de cobre anhidro, más 15,0 g de sulfato de potasio, más 25 mL de solución de ácido sulfúrico concentrado.

Se calienta el balón hasta ebullición, hasta la aparición de vapores blancos, se agita suavemente y continua el calentamiento por 90 minutos. Se enfría y se agrega 200 mL de agua destilada y se añade 100 mL de una solución de hidróxido de sodio 0,1N.

Se conecta el balón al bulbo del refrigerante que este sumergido en 50 mL



de solución de ácido clorhídrico 0,1N, se calienta hasta ebullición y se obtiene 150 mL de destilado.

Se titula el destilado con solución de ácido clorhídrico 0,1N, usando anaranjado de metilo como indicador, obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\text{mLHCl gastados} \times 0,0014 \times 6,25 \times 100}{\text{Peso de muestra}}$$

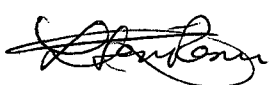
5.3.5.5 DETERMINACION DE GRASAS

Se pesa 6.0 g de extracto de guayaba y se coloca en un depósito dentro de un cartucho de celulosa que sirve como filtro; se extrae durante 4 horas en un extractor Soxhlet y luego se destila para recuperar el solvente (hexano), obteniéndose la siguiente equivalencia:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{\text{Peso de grasa (g)} \times 100}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

5.3.5.6 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

El término carbohidrato total es definido por Agriculture Handbook de USDA, Composición de los Alimentos (1975), como el valor obtenido restando de 100, la suma del contenido de humedad, cenizas, proteína y grasas.



5.3.6 DETERMINACION DEL ACIDO ASCORBICO

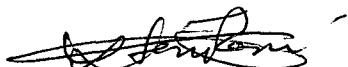
Se ha seguido el método de valoración por retroceso propuesto por Ruiz, H. Javier 2001 y consiste en los pasos siguientes:

- Se miden 3 mL del extracto de guayaba y se coloca en un matraz erlenmeyer.
- Se añade 20 mL de solución de iodato de potasio 0,01 M, más 20 mL de ioduro de potasio 0,01 M, más 3 mL de ácido clorhídrico concentrado, más solución de almidón recientemente preparado.
- Se valora el iodo presente en el matraz con solución de tiosulfato de sodio 0,01M.

5.3.7 EXTRACCION DE LOS CAROTENOIDES

Para extracción de los carotenoides se ha seguido la tecnología propuesta por Safo-Katanga (1984), modificada por Bedoya (1999) y consiste en los pasos siguientes:

- Se pesaron 5 g de extracto de guayaba
- Se adicionó 5 mL de éter de petróleo y 5 mL de acetona
- Se homogenizó durante 10 minutos
- Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos
- Se extrajo la fase etérea
- Se reextrae el residuo con 5 mL de éter de petróleo y 5 mL de acetona
- Se homogenizó durante 5 minutos
- Se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos
- Se extrajo la fase etérea y se mezcló con la anterior
- Se completó a volumen final a 15 mL con éter de petróleo y se leyó inmediatamente en el espectrofotómetro



5.3.7.1 CUANTIFICACION DE LOS CAROTENOIDES POR EL METODO COLORIMETRICO

Para la cuantificación de los carotenoides se ha usado el espectrofotómetro de ultravioleta-visible y consiste en los pasos siguientes:

- Fijar absorbancia para una longitud de onda de 450 nm
- Medir blanco usando éter de petróleo como referencia
- Medir absorbancia de la muestra
- Calcular el contenido de carotenoides usando la formula siguiente

$$\mu\text{g/g} = (A \times \text{Volumen final} \times 10^4) / (A_{1\text{cm}-1\%}) \times \text{peso de muestra}$$

Donde:

- $\mu\text{g/g}$ = Microgramos de carotenoides / gramo de muestra
- A= Absorbancia a 450 mm
- Volumen final. = Volumen en mL de la solución antes de la lectura.
- $A_{1\text{cm}-1\%}$ = Coeficiente de absorbancia del β - caroteno en éter de petróleo = 2592
- Peso de la muestra en gramos.
- Comparar el espectro de la muestra con el espectro del estándar β -caroteno puro



VI RESULTADOS

6.1 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA

Los resultados obtenidos del estudio de la materia prima: La guayaba (*Psidium guajava* L.) son:

CUADRO N° 1

Composición de La guayaba (*Psidium guajava* L.)

CONCEPTO	PROMEDIO % EN PESO
Humedad	76,90
Cenizas	0,35
Fibra bruta	6,80
Proteínas	1,10
Lípidos	0,41
Carbohidratos	14,44

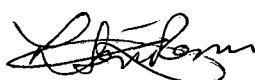
Fuente: Datos experimentales.

6.2 CONTENIDO DE ACIDO ASCORBICO O VITAMINA C EN LA GUAYABA (*PSIDIUM GUAJAVA* L.)

Cuadro N° 1

COMPONENTE	CONTENIDO
Acido ascórbico mg/100g	125,00

Fuente: Datos experimentales.



6.3 CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LA GUAYABA (PSIDIUM GUAJAVA L.)

Cuadro N° 1

COMPONENTE	CONTENIDO
Carotenoides mg/100g	2,48

Fuente: Datos experimentales.

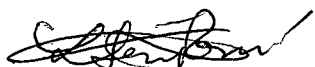
6.4 COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA GUAYABA (PSIDIUM GUAJAVA L.)

COMPONENTE	CONTENIDO
Acido ascórbico o vitamina C (mg/100 g)	125,00
Carotenoides totales (mg β caroteno /100 g)	2,48
Compuestos fenolicos (mg Acido Clorogenico /100 g)	83,50
Capacidad Antioxidante (μ g eq trolox /100 g)	DPPH 258,95
	ABTS (lipofílica) 279,60
	ABTS (hidrofílica) 293,80

Fuente : Datos experimentales

VII DISCUSIÓN

- El fruto de la guayaba (*Psidium guajava* L.), tiene forma redonda o en forma de pera.
- En el ítem 8.1 cuadro N°1 del apéndice se observa el tamaño promedio del fruto de la guayaba, entre 6 – 10 cm de longitud, 3 – 5 cm de ancho, con un peso promedio de 40 g.
- En el ítem 8.2, cuadro N° 1 se observa las características físicas de la guayaba, el pH es ácido con un valor de 4,1; y presenta contenido de sólidos solubles alto.
- En el ítem 8.3, cuadro N° 1 los valores para el calcio es de 17,00 mg/100 g; fósforo 31,00 mg/100 g y magnesio 12,50 mg/100 g; son valores altos para un fruto considerándose una fuente de minerales muy importante.
- En el ítem 5.1, cuadro N° 1 se presenta los resultados de la composición de la guayaba en el cual el contenido de agua es alto, posee una característica cítrica y tiene bajo contenido de proteínas y grasas.
- En el ítem 5.2, cuadro N° 1 se presenta el contenido de ácido ascórbico o vitamina C, donde se observa que la guayaba es una excelente fuente de la mencionada vitamina.
- En el ítem 5.3, cuadro N° 1 se presenta el contenido de carotenos, cuyo valor es 2,48 mg/100 g, que es elevado y su capacidad antioxidante está directamente relacionada con el contenido de pigmentos de la guayaba.
- En el ítem 5.4, Cuadro N° 1 se presenta un resumen de los compuestos bioactivos de la guayaba, en lo que se refiere al ácido ascórbico o vitamina C, carotenoides totales, compuestos fenólicos, presentando una alta capacidad antioxidante con el método DPPH y ABTS, siendo el segundo método (ABTS) el que cuantifica la capacidad antioxidante de compuestos

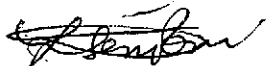


hidrofílicos (ácido ascórbico y compuestos fenólicos) y compuestos lipofílicos (carotenoides), dado que la capacidad antioxidante total de la guayaba es la sumatoria de la capacidad antioxidante en la fase hidrofílica y fase lipofílica.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Bonan'.

VIII REFERENCIALES

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST OFFICIAL METHODS OF ANÁLISIS
2. AUROMA, O.E. 2003. Methodological considerations for charactering potential antioxidant actions of bioactive components in plant food. Mutation research, 523-24:9-20.
3. BADOI DERGAL, Salvador. 2006. Química de Alimentos. 4º Edición. PEARSON EDUCACIÓN, México.
4. BRACK EGG, Antonio. Diccionario enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo 1999.
5. BRAND – WILLIAMS, W.;CUVELIER, M. AND BERSET, C. 1995. “Use of free radical method to evaluate antioxidant activity”. Lebensm Wiss Technology. 28.25 – 30.
6. BRAVO, L. 1998. Polyphenols: chamistry, dietary sources, metabolism and nutritional significanec. Nutrition Reviews, 56 (11): 317-33.
7. BRITTON, G. 1995. UV/visible spectroscopy. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H., eds Carotenoids Basel,, BirkhauserVerlag.
8. CASTRO, R. y L. SUAREZ 2002. Recuperación de colorantes a partir de desechos agroindustriales de naranja (citrus sinensis L.) Variedad Valencia, a nivel piloto – Venezuela.
9. CEREZAL, P.T. MARRERO y R.M. PIÑERA. 1994. Fuentes de carotenoides a partir de residuos de naranja. Estudio Preliminar. LA HABANA.
10. CRAFT, N.E. 1992. Carotenoid reversed-phase high-performance liquid chromatography methods; reference compendium.



11. DAVIES, B.H. 1979. Carotenoids. In: Goodwin, T.W., ed. Chemistry and Biochemistry of Pigments. 2 ed. London, Academic Press.
12. DEUTSCH, MJ. 1990. Vitamins and other nutrients. In: Helrich, K., ed. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15 ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists.
13. DITTRICH, K. y LEITZMANN,C. “Los alimentos Bioactivos. Guía de los alimentos que curan y protegen de las enfermedades.” Editorial Integral Barcelona. España 1998.
14. DURAN, M. y M.J. MORENO ALVAREZ 2000. Evaluación de algunas mezclas de solvente en la extracción de carotenoides de tamarillo (CyphomandrabetaceaeSendt). Venezuela.
15. FELLOWS, Peter. Tecnología del Proceso de Alimentos. Editorial Acribia S.A. España 1984.
16. HART, Leslie; FISHER Harry. Análisis Moderno de los Alimentos.
17. INDECOPI, Norma Técnica para alimentos 1974.
18. JIMENEZ-ESCRIG, A; RINCON, M; PULIDO, R; SAURA-CALIXTO, F. 2001. Guava fruit (Psidium guajaca L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. Journal of Agriculturaol and food chemistry, 49 (11): 5849-53
19. KING, A. and YOUNG, G. “Characteristics and Occurance of Phenolic Phytochemicals”. J. Am. Diet. Assoc. 99(2): 213-218 February 1999.
20. LUXIMON – RAMMA, A; BAHORUM, T. and CROZIER, A. 2003 – “Antioxidant actions and phenolic and vitamina C contents of common Mauritian exotic fruits”. Journal of the science of food and agriculture.83. 496 – 502.



21. MORENO-ALVAREZ, M.J.,C. GOMEZ, J. MENDOZA y D. BELEN. 1999. Carotenoides totales en cáscara de naranja (Citrus sinensis L. variedad Valencia) Revista Unellez de Ciencia y Tecnología. Venezuela.
22. PADILLA, Saúl. Manejo Agroforestal Andino. Proyecto FAO / Holanda. Desarrollo participativo los Andes 1992.
23. PEREZ-JIMENEZ, J. SAURA-CALIXTO, F. 2006. Effect of solvente and certain food constituens on different antioxidant capacity assays. Food Reserercg International, 39:791-800.
24. PULIDO, R, HERNANDEZ-GARCÍA, R, SAURA-CALIXTO F. "Contribution of beverages to the intake of lipophilie and hydrophilic antioxidants in the spanish diet". European Journal of Chemical Nutrition, 57 (2003 127-32).
25. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1993. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: Charalambous, G., ed. Shelf-Life Studies of Foods and Beverages; Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects, Amsterdam, Elsevier.
26. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. et al. 1988. Assessment of provitamin A determination by open column– visible absorption spectrophotometry.
27. SWAIN, F. AND HOWARD, L. 1999. "The phenolic constituents of prunus domesticus". Journal of the Science of Food and agriculture. 10.63 – 68.



IX APÉNDICE

9.1 CUADRO N° 1: CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA GUAYABA

Longitud (cm)	Ancho (cm)	Peso promedio /fruto (g)
8 ... 10	3 ... 5	40

Fuente: Elaboración propia.

9.2 CUADRO N° 1: MEDICION DE GRADOS BRUX Y pH DE LA GUAYABA

Nombre común	Nombre científico	Brix	pH
Guayaba	Psidium guajava L.	14,6	4,1

Fuente: Elaboración propia.

9.3 CUADRO N° 1: CONTENIDO DE MINERALES (mg/100g) EN LA GUAYABA

Calcio	Fósforo	Magnesio
17,00	31,00	12,50

Fuente: Elaboración propia.



ANEXO N° 01
CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS

CATEGORIA / FAMILIA	SUBCLASES		COLOR	ALIMENTO
Terpenos Carotenoides Limonoides	Carotenoides Carotenos Xantófilos	Carotenos: α y β caroteno y el licopeno	Responsable del color naranja El color rojo se debe el licopeno	Zanahoria Cebada, pimiento Tomate, rábano
		Santófilas: como la zeaxantina, cantaxantina y la criptoxantina	El color amarillo, verde se deben a su luteína y a la zeaxantina	Espinacas, guisante Palta, lechuga
	Limonoides	d-limoneno, pineno, eucaliptol		
Fenoles: incluye a los flavonoides y sus sub-grupos, antocianidinas, cetequinas, ácido gálico, isoflavonas	Flavonoides	Falvonas, isoflavonas	color naranja claro	Melocotón papaya naranja guayaba
		Genisteina y daidzeina		cebollas repollo berenjena
		Antocianidinas	azul / morado	
		Catequinas y ácido gálicos		
Tioles: contiene asufre	Glucosinolatos	Incluye los isocianatos y el sulforafano	Verde	Brócoli Col de Bruselas nabo, repollo
	Súlfidos Alílicos: Estos compuestos son liberados cuando son cortados.		Blanco	Ajo, cebollas puerros, cebollin
	Indoles: Compuestos nitrogenados			

FUENTE: Sainz, T. Drago, M. Lopez, M (2006) Componente bioactivos de los alimentos funcionales de origen vegetal. Mexico: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, Vol 37