

Caracterización de compuestos bioactivos en hojas de guayaba (*Psidium guajava*) como un potencial de valor agregado en botánicos tropicales

por

Lizmar Pérez Pérez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Ciencia y Tecnología de Alimentos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
2011

Aprobado por:

Félix Román, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

María L. Plaza, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Lynette Orellana, PhD
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

David Padilla, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, PhD
Directora del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava*) is a botanical plant that has been used for a long time as a ceremonial and / or medicinal plant. However, chemical and biological activity of this plant is hidden and very few reported studies used an analytical method, purification and analysis techniques to characterize the components of this medicinal plant. This plant has the potential to function as a therapeutic agent that can protect our body from disorders such as cancer and chronic heart disease among others. It is highly recognized that fruits, vegetables, tea and many natural products are rich in polyphenolic compounds with nutraceutical, antioxidants and antimicrobials benefits. For this reason the objectives of this study were to: 1) identify and quantify the presence quercetin, rutin, gallic acid and ellagic acid in mature lyophilized guava (*Psidium guajava*) leaves using LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) analysis, 2) quantify the total phenols using Folin Ciocalteu spectrophotometric methodology and 3) measure the antioxidant activity of the extracts tested with ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) methodology. LC-MS analysis identified the following compounds in the analyzed fourteen clones: gallic acid, ellagic acid, quercetin. The average concentration of the compounds identified was: 0.07 ± 0.02 mg/g gallic acid, 3.76 ± 0.12 mg/g ellagic acid and quercetin 0.25 ± 0.08 mg/g. Rutin was not identified in any of the analyzed clones. The average total amount of phenols found for the fourteen clones tested was 107.6 ± 5.3 mg/g GAE (Gallic Acid Equivalent) for the methanolic phase and 2.6 ± 0.3 mg/g GAE for aqueous phase. The average antioxidant activity found for the fourteen clones of guava was 0.73 ± 0.10 μ molTE (Trolox Equivalent) / g in the aqueous phase and 38.01 ± 15.23 μ molTE methanolic phase.

RESUMEN

La guayaba (*Psidium guajava*) es una planta botánica que ha sido utilizada por mucho tiempo como planta ceremonial y/o medicinal. No obstante, la actividad química y biológica de esta planta permanece oculta y son muy pocos los estudios reportados que usen un modo analítico, purificación o técnicas de análisis para caracterizar los componentes de esta planta medicinal. Esta planta tiene el potencial de funcionar como agente terapéutico que puede proteger nuestro cuerpo de desordenes como cáncer y enfermedades crónicas del corazón entre otras. Es altamente reconocido que las frutas, vegetales, té y muchos productos naturales son ricos en compuestos polifenólicos, con beneficios nutraceuticos, antioxidantes y antimicrobiales con su consumo. Por esta razón los objetivos de este estudio fueron: 1) identificar y cuantificar la presencia de quercetina, rutina, ácido gálico y ácido elágico en hojas maduras liofilizadas de guayaba (*Psidium guajava*) utilizando el método de análisis LC-MS (Cromatografía Líquida – Espectrómetro de Masa), 2) cuantificar los fenoles totales mediante la metodología espectrofotométrica Folin Ciocalteu, 3) medir la actividad antioxidante en los extractos mediante la metodología ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno). Se identificaron los siguientes compuestos: ácido gálico, ácido elágico y quercetina mediante LC-MS. La concentración promedio de los compuestos identificados fue: ácido gálico 0.07 ± 0.02 mg/g, ácido elágico 3.76 ± 0.12 mg/g y quercetina 0.25 ± 0.08 mg/g. Rutina no fue identificada en ninguno de los clones analizados. La cantidad de fenoles totales promedio encontrada para los catorce clones analizados fue de 107.6 ± 5.3 mg/g GAE (Equivalente a Ácido Gálico) en la fase metanólica y 2.6 ± 0.3 mg/g GAE

en la fase acuosa. La actividad antioxidante promedio encontrada para los catorce clones de guayaba fue de $0.73 \pm 0.10 \mu\text{molTE}$ (Trolox Equivalent)/g en la fase acuosa y $38.01 \pm 15.23 \mu\text{mol TE}$ en la fase metanólica.

A mi Señor Jesucristo por que todo se lo debo a Él; Te Amo...

A mis padres Restituto Pérez y Luz M. Pérez, mis ángeles
guardianes...

A mis hermanas: Evelyn, Lucinés, Lisandra, Lenimar y Licelys...

A mis sobrinos: Rebeca, Abdel, Ismael, Pamela, Daylanis,
Hannahlynn e Ian Kaleb, mis tesoros...

A todos mis compañeros de ALFSEC en especial Luis Álamo, Sonia Bayron, y a la Dra. María Plaza mis Aarón y Hur en la batalla contra Amalec. Éxodo 17:12 Y las manos de Moisés se cansaban; por lo que tomaron una piedra, y la pusieron debajo de él, y se sentó sobre ella; y Aarón y Hur sostenían sus manos, el uno de un lado y el otro de otro; así hubo en sus manos firmeza hasta que se puso el sol.....

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de mis estudios graduados en la Universidad de Puerto Rico, varias personas e instituciones colaboraron directa o indirectamente con mi investigación. Sin su ayuda hubiese sido imposible finalizar mi trabajo. Por este motivo, deseo dar honor a quien honor merecen y reconocer su ayuda.

Primeramente a mi Dios, por que él es mi fortaleza y toda sabiduría proviene de Él. A mis familiares, por todo su apoyo y amor. Le doy gracias a la presidenta de mi comité, la Dra. Lynette Orellana por darme la oportunidad de realizar esta investigación; por su ayuda y comprensión. Al Dr. Felix Román miembro del comité, por su gran colaboración, orientación y respaldo. A la Dra. María L. Plaza miembro del comité por su gran ayuda, facilitación de instrumentación, orientación, apoyo y las palabras me faltan para describir lo agradecida que estoy. A la Dra. Edna Negrón directora del programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos; por su esmero y preocupación en mi tesis. Al Dr. Fernando Pérez, quien fue parte de mis madrugadas al laboratorio. Al Agro. Rubén Vélez, y la Estación Experimental de Juana Díaz, que colaboraron con la disponibilidad de las muestras. Al personal docente de CITA: Profa. Rivera, Dra. Chávez y Dr. Latorre, quienes siempre me orientaron, aclararon mis dudas y/o estuvieron pendientes al avance de la investigación. A la Dra. Linda Beaver y Dr. Ernesto Riquelme por su ayuda en el diseño experimental y análisis estadístico. Al proyecto TSTAR ZTS33 por el financiamiento de la investigación.

A mis compañeros de laboratorio Luis Álamo, Sonia Bayron, José López, Miguel A Florián, Diana Sánchez, Abigail Padilla y Misael Viruet, que de una u otra forma fueron mis colaboradores. A todos mis amigos de CITA en especial a Luis E Ruiz, Luisenrique Molina, Aimé Montero, Lurdes Siberio, Minerva Rivera, María T. Sarmiento, Luz A. Florián, Gustavo Charry, Jorge Santiago y Yaritza Ramos. A Bessie, Lany y Gloria muchas gracias por su paciencia. Al personal del departamento de química en especial Luis de preparaciones y a Gregori de materiales. A las profesoras Verónica Sánchez e Ivelisse Padilla que fueron parte de mi formación como profesional. A los Doctores Enrique Meléndez y Morell facilitadores de instrumentación. A mis mentores de USDA FSIS: M.S. Olga Morales, Dra. Mildred Betancourt, M.S. Vicki Rubac, Jodie Patranella, Dr. Shanon Beaumont, Dr. Adam Tittor, Estela Alba y Alfred Dubose por su gran apoyo, amistad, enseñanzas y estar conmigo en momentos difíciles.

Tabla de Contenido

ABSTRACT.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	VI
TABLA DE CONTENIDO	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE ILUSTRACIONES	XI
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 MOTIVACIÓN	3
1.2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.2.1 <i>Los Polifenoles</i>	<i>4</i>
1.2.2 <i>El Cultivo de la Guayaba Generalidades:</i>	<i>8</i>
1.2.3 <i>Producción de Guayaba en Puerto Rico</i>	<i>11</i>
1.2.4 <i>El Uso y/o Propiedades de las Hojas de Guayaba</i>	<i>12</i>
1.2.5 <i>Las Hojas de Guayaba y sus Compuestos</i>	<i>13</i>
1.2.6 <i>Métodos de Análisis Reportados para la Identificación y Cuantificación de Polifenoles</i>	<i>20</i>
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1 COLECCIÓN DE LA HOJA DE PSIDIUM GUAJAVA (GUAYABA)	22
2.2 PROCESO DE SECADO, PULVERIZADO Y ALMACENAMIENTO PREVIO AL ANÁLISIS.....	25
2.3 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES EN LA HOJA DE GUAYABA MEDIANTE PROCESO DE INFUSIÓN	26
2.3.1 <i>Estudios Preliminares: Selección de Temperatura de Extracción</i>	<i>26</i>
2.3.2 <i>Estudios Preliminares: Selección del Tiempo de Extracción</i>	<i>27</i>
2.3.3 <i>Estudios Preliminares: Selección de Porcentaje de Alcohol en la Extracción en Fase Sólida (SPE).....</i>	<i>27</i>
2.4 CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN LA HOJA DE GUAYABA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASA (LC-MS)	28
2.5 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES EN LA HOJA DE LA GUAYABA.....	30
2.6 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA HOJA DE LA GUAYABA	31
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
3 DATOS Y RESULTADOS	33
3.1 PRUEBAS PRELIMINARES PARA SELECCIÓN DE TIEMPO, TEMPERATURA Y % DE METANOL	33

3.2	CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN LA HOJA DE GUAYABA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASA (LC-MS)	35
3.3	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES EN LA HOJA DE LA GUAYABA	47
3.4	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA HOJA DE LA GUAYABA.....	50
4	CONCLUSIONES.....	54
5	RECOMENDACIONES	56
6	REFERENCIAS.....	57
	APÉNDICE A: REVISIÓN DE LITERATURA	64
	APÉNDICE B: ANÁLISIS DE LA VARIANZA	69
	APÉNDICE C: CURVAS DE CALIBRACIÓN	74
	APÉNDICE D: LA GUAYABA	78
	APÉNDICE E: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	81

Lista de Tablas

Tablas	Página
Tabla 1: Ingreso Bruto de Guayaba	12
Tabla 2: Resultados de Cuantificación para Ácido Gálico mediante LC-MS	43
Tabla 3: Cuantificación de Rutina	45
Tabla 4 Concentraciones (mg/g) de Fenoles Totales en Extracto Acuoso	47
Tabla 5: Fenoles Totales en Té Verde, Té Negro y Noni	49
Tabla 6: Concentraciones de Fenoles Totales en Extractos Metanólicos	49
Tabla 7: Valores ORAC para diferentes extractos de té	53
Tabla 8: Métodos de Extracción y Análisis de Polifenoles Mediante Cromatografía Líquida	64
Tabla 9: Métodos de Análisis de Fenoles Totales	65
Tabla 10: Métodos de Secado	66
Tabla 11: Referencia de Métodos para medir la Actividad Antioxidante	67
Tabla 12: Frutas Elaboradas proceso de cómputos de consumo percapita	79

Lista de Ilustraciones

Ilustraciones	Página
Ilustración 1: Árbol de Guayaba Estación Experimental Juana Díaz	8
Ilustración 2: Estructura Molecular de Quercetina	14
Ilustración 3: Quercetina.....	16
Ilustración 4: Estructura Molecular de Rutina	16
Ilustración 5: Rutina.....	17
Ilustración 6: Estructura Molecular de Ácido Elágico.....	18
Ilustración 7: Ácido Elágico	19
Ilustración 8: Estructura Molecular de Ácido Gálico	19
Ilustración 9: Ácido Gálico.....	20
Ilustración 10: Mapa del Predio de Guayaba en la Estación Experimental de Juana Díaz	23
Ilustración 11: Mapa con la Selección de Muestras.....	24
Ilustración 12: Proceso de Liofilización	26
Ilustración 13: Proceso de Extracción en Fase Sólida	28
Ilustración 14: Formación de Color de la Curva de Calibración de Fenoles	31
Ilustración 15: Concentraciones de Fenoles Totales en Extractos Tratados a Diferentes Temperaturas de Extracción	34
Ilustración 16: Concentración de Fenoles Totales en Extractos Tratados a Diferentes Tiempo de Extracción	34
Ilustración 17: Concentración Promedio de Fenoles Totales en Extractos Tratados a Diferentes % de Metanol en SPE.....	35
Ilustración 18: Cromatogramas Total de Iones y Arreglo de Diodos para Extractos de Guayaba en Fase Metanólica	36
Ilustración 19: Minuto 11 al 23 del Cromatograma Total de Iones y Arreglo de Diodo en Fase Metanólica del Extracto de Guayaba.....	37
Ilustración 20: Minuto 1 al 9 del Cromatograma Total de Iones y Arreglo de Diodo en Fase Metanólica de Extracto de Guayaba	38
Ilustración 21: Cromatograma Total de Iones y Arreglo de Diodo en Fase Acuosa de Extracto de Guayaba.....	39
Ilustración 22: Cromatograma Total de Iones y Arreglo de Diodo de los Estándares; Ácido Gálico, Rutina, Ácido Elágico, Quercetina y el Estándar Interno Flavona	40
Ilustración 23: Espectro UV Obtenido para Ácido Gálico	41
Ilustración 24: Espectro UV Obtenido para Rutina	41
Ilustración 25: Espectro UV Obtenido para Ácido Elágico.....	42
Ilustración 26: Espectro UV Obtenido para Quercetina	42
Ilustración 27: Variabilidad en la Concentración de Ácido Elágico en Clones de Psidium guajava	44
Ilustración 28: Variabilidad en la Concentración de Quercetina en Clones de Guayaba	46

Ilustración 29: Variabilidad en la Concentración de Fenoles Totales en Clones de <i>Psidium</i> guajava en extracto Acuoso	48
Ilustración 30: Variabilidad en la Concentración de Fenoles Totales en Extracto Metanólico de Clones de <i>Psidium guajava</i>	50
Ilustración 31: Variabilidad en la actividad antioxidante en extractos de guayaba en la fase acuosa.....	51
Ilustración 32: Variabilidad en la actividad antioxidante en extractos de guayaba en la fase metanólica	52
Ilustración 33: Curva de Calibración de Ácido Gálico para la Cuantificación de Fenoles Totales.....	74
Ilustración 34: Curva de Calibración Promedio de Ácido Gálico	74
Ilustración 35: Curva de Calibración Promedio de Rutina	75
Ilustración 36: Curva de Calibración Promedio de Ácido Elágico.....	75
Ilustración 37: Curva de Calibración Promedio de Quercetina	76
Ilustración 38: Curva de Calibración Promedio de Ácido Elágico en concentraciones de 20 a 100 ppm	76
Ilustración 39: Curva de Calibración de Trolox en el Análisis de Actividad Antioxidante .	77
Ilustración 40: Clasificación macroscópica de la guayaba	78
Ilustración 41: La fruta con más antioxidantes	80

1 INTRODUCCIÓN

Según estadísticas del CDC (Center for Disease Control) las enfermedades cardíacas y los derrames cerebrales son, respectivamente, la primera y tercera causas principales de muerte en los Estados Unidos. Más de 61 millones de estadounidenses padecen de algún tipo de enfermedad cardiovascular. En adición más de 2,600 estadounidenses mueren todos los días a causa de las enfermedades cardíacas; representando un promedio de 1 muerte cada 33 segundos (2004). Por otro lado a excepción de algunos tipos de cáncer de piel (el cual mundialmente suma cerca del 50% entre cánceres), el cáncer de mama en los Estados Unidos y en Puerto Rico es el cáncer más común en las mujeres, independientemente de su raza o del grupo étnico al que pertenezcan y la principal causa de muerte por cáncer en hispanas (CDC, 2007).

Hoy día se sugiere consumir cinco porciones de frutas y/o vegetales al día. Diversos estudios demuestran que el consumo de éstas, ayudan en la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares. Este efecto benéfico en las frutas y vegetales es atribuido principalmente a la presencia de sustancias antioxidantes entre éstos: la vitamina C, los carotenoides, la vitamina E y los polifenoles. Los antioxidantes son cualquier sustancia que reduce el daño oxidativo (daño debido al oxígeno) como la causada por los radicales libres (http://www.emedicinehealth.com/fda_overview/glossary_em.htm) además, se encuentran en nuestro organismo y en numerosos alimentos. Estos tienen una función reguladora y protectora en el metabolismo del cuerpo humano. Su función principal es su actividad antirradical, neutralizando la acción oxidante de los radicales libres.

Para el año 2004-2005 un equipo de investigación formado por científicos de cuatro universidades (Florida, Hawaii, Puerto Rico y Guam) unieron esfuerzos para analizar plantas tropicales y / o sub-tropicales en Estados Unidos, sus territorios en el Caribe y la Cuenca del Pacífico. Entre estos botánicos fueron seleccionados las frutas: ilex, mamaki, noni y la guayaba con el propósito de explorar sus propiedades bioactivas e impulsarlas como una fuente de ingresos potencial para las regiones tropicales y subtropicales. Es por esa razón que la meta de este trabajo fue trabajar, en específico, con la guayaba como parte de este proyecto. La guayaba es una fruta comúnmente consumida en Puerto Rico. En específico decidimos enfocarnos en las hojas de este árbol ya que, aunque no se consume su hoja como té, contrario a otras naciones que sí lo consumen, las hojas de guayaba son consideradas una fuente natural y rica en sustancias antioxidantes.

Los objetivos generales de la investigación fueron:

1. Identificar y cuantificar el contenido de compuestos antioxidantes presentes en la hoja de guayaba (*Psidium guajava*). Para alcanzar este objetivo principal se:
 - Evaluó y optimizó la extracción en fase sólida de los compuestos antioxidantes
 - Identificó y cuantificó quercitina, rutina, ácido elágico y ácido gálico por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masa
2. Cuantificar compuestos fenólicos solubles en hojas de guayaba (*Psidium guajava*) con metodología de Folin-Ciocalteu.

3. Evaluar la actividad antioxidante en hojas de guayaba (*Psidium guajava*) utilizando la metodología de ORAC.

1.1 Motivación

Las plantas botánicas han sido utilizadas por mucho tiempo como plantas ceremoniales y/o medicinales. No obstante, la actividad química y biológica de estas plantas permanecen ocultas y son muy pocos los estudios reportados que usen un método analítico, purificación o técnicas de análisis para caracterizar los componentes de estas plantas medicinales. De acuerdo a la revisión literaria de análisis de composición polifenólica en guayaba, la misma promete ser candidata para investigación dada sus propiedades alimenticias, farmacéuticas y nutraceuticas. En adición, esta planta tiene el potencial de funcionar como agente terapéutico que puede proteger nuestro cuerpo de desórdenes relacionados a tumores, cáncer y enfermedades crónicas del corazón (Pérez- Gutiérrez et al., 2008). Es altamente reconocido que las frutas, vegetales, té y muchos productos naturales son ricos en compuestos polifenólicos, con beneficios nutraceuticos, antioxidantes y antimicrobiales con su consumo.

Un alimento nutraceutico es aquel que provee beneficios médicos o a la salud, incluyendo prevención y/o tratamiento de enfermedades (Kalra, 2003). Los alimentos nutraceuticos se dividen en tres grupos: nutrientes (azúcares y las grasas), compuestos químicos (fibras, antioxidantes, carotenos, ácidos grasos Omega3) y probióticos (microorganismos benéficos) (Agramonte-Saba C., 2010). Los antioxidantes son un conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales y

otros compuestos vegetales y enzimas, que bloquean el efecto dañino de los radicales libres. El término antioxidante significa que impide la oxidación perjudicial de otras sustancias químicas, producidas en las reacciones metabólicas o producidas por los factores exógenos como las radiaciones ionizantes. Algunas sustancias antioxidantes son: vitamina C, vitamina E, β -caroteno, flavonoides, selenio, zinc, licopeno, cobre, enzimas como la glutathion peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa entre otras (Venereo, 2002). Muchos antioxidantes son utilizados como aditivos conservantes en los alimentos.

Nuestra meta es poder informar a los consumidores, agricultores y procesadores información acerca de la caracterización de compuestos bioactivos en té de hojas de guayaba que pueden promover medios de medicina alternativa, desarrollo de productos con valor agregado y además podrían tener un impacto a la economía de nuestra región.

1.2 Revisión de Literatura

1.2.1 Los Polifenoles

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos sustituyentes hidroxilos proveen a estos compuestos de diversas propiedades entre estas; la capacidad antioxidante. Se clasifican como: ácidos fenólicos (que incluyen los derivados de ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico), flavonoides (flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonoles y flavan-3-ols), antocianinas (acilglucósidos y glucósidos de antocianidinas) y antocianidinas, cumarinas, estilbenos, taninos hidrolizables y condensados, lignanos, ligninos

(Stalikas, 2007), catequinas y teaflavinas, charconas, antraquinonas y otros (Sakakibara et al., 2003). Los flavanoles son metabolitos secundarios producto de la biosíntesis de las rutas fenilpropanoide y flavonoides. Muchos estudios se han realizado pero la información referente a los genes de expresión y los métodos de regulación en su síntesis aún permanece oculta.

El rol de los ácidos fenólicos y flavonoides en las plantas se ha asociado con diversas funciones incluyendo: absorción de nutrientes, síntesis de proteínas, actividad enzimática, fotosíntesis, componentes estructurales, alopátia, colorante natural (ayuda en la polinización a los insectos), astringente como método de defensa contra insectos dañinos y proteger a la planta de radiación UV del sol por su propiedad de absorción de luz UV. Además actúan como catalizadores en la fase de luz de la fotosíntesis y / o como reguladores de los canales iónicos que participan en la fosforilación, actuando como protectores de estrés sobre la células removiendo especies reactivas de oxígeno producidas en el sistema de transporte de electrones. (Stalikas, 2007). Esta capacidad antioxidante o valor biológico explica su abundancia en tejidos vegetales, en particular en los sometidos a más estrés oxidativo y daño por radicales libres como el derivado de la exposición a la luz solar (Leighton, 2000).

Los compuestos polifenólicos son en su mayoría potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales que se encuentran en frutas y verduras, principalmente, manzanas, cebollas, en bebidas como té y vino (Leighton et al., 1997). Sin embargo, en las frutas se encuentran las concentraciones más altas de los antioxidantes polifenólicos; por ejemplo el vino tinto, el té, el arándano y la uva de mesa se promueven

mucho como alimentos que previenen la arterosclerosis y el cáncer, por su alto contenido de compuestos polifenólicos. En las regiones tropicales no es costumbre el cultivo de la uva ni el arándano, pero existen muchas variedades de frutas las cuales poseen una gran actividad antioxidante y que se consumen directamente como jugo o son utilizados en la elaboración de vino (Murillo, 2002). Los organismos animales tienen la capacidad de utilizar estos fitoquímicos presentes en los alimentos. Los extractos crudos de frutas, hierbas, vegetales, cereales y otros materiales de plantas ricos en polifenoles son cada vez de mayor interés en la industria de alimentos por que éstos retardan la degradación oxidativa de lípidos. De este modo mejoran la calidad y valor nutricional de los alimentos, esto gracias a la presencia de compuestos antimicrobiales y antioxidantes (Javanmardi et al, 2003).

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía, liberan radicales libres. Esto es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos de defensa contra estas especies. El proceso en que la célula obtiene energía es a través del transporte de electrones (que se conserva como energía de enlace ATP). El transporte de electrones desde un sustrato orgánico hasta un aceptador de electrones: el O₂ molecular, se realiza mediante el mecanismo de la cadena respiratoria mitocondrial. Este O₂ se reduce hasta llegar a agua (H₂O) como producto final. El 95% de O₂ sigue esta vía (cadena respiratoria mitocondrial) de oxidación completa, pero 2-5% restante del O₂ pasa a formar los llamados radicales libres (RL). Estos RL son formados constantemente en el cuerpo humano como metabolitos secundarios y estudios revelan que están envueltos en enfermedades humanas tales como: cáncer, envejecimiento, arterosclerosis, y la diabetes. El sistema

buscará entrar en balance con estas especies de RL por medio de antioxidantes y enzimas. Llegar al balance puede causar daño o muerte celular lo cual es el inicio de las enfermedades antes descritas (Chen y Yen, 2006).

Entre los mecanismos de defensa contra los RL y su toxicidad que nuestro cuerpo posee se encuentran: las enzimas superóxido dismutasa, catalasa-peroxidasa y glutatión peroxidasa. Además, existe una segunda línea de defensa que funciona cuando los sistemas enzimáticos antioxidantes quedan a capacidad. Estos sistemas se denominan captadores de RL y son capaces de frenar las reacciones de oxidación de los cuales forman parte: ácido ascórbico (vitamina C) en el citoplasma, el betacaroteno (vitamina A) y alfatocoferol (vitamina E) en la membrana celular (De Rosa, 1998). Estas vitaminas se denominan como antioxidantes y se define como cualquier sustancia que en concentraciones normales posee una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interacciones con un radical libre. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes produce efectos tóxicos, ya que la producción de RL es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis (Kuskoski et al., 2005). De las numerosas clasificaciones de los antioxidantes se encuentra la que los divide en:

- Exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria.
- Endógenos que son sintetizados por la célula.

Entre los primeros se encuentra la vitamina E, la vitamina C, el β caroteno, flavonoides y licopeno, entre otros. Estos antioxidantes exógenos son encontrados en

alimentos y por esa razón uno de los objetivos de este trabajo es analizar el té de guayaba como una fuente natural rica en sustancias antioxidantes.



Ilustración 1: Árbol de Guayaba Estación Experimental Juana Díaz

1.2.2 El Cultivo de la Guayaba Generalidades:

- Nombre científico: *Psidium guajava*
- Nombre Común: Guayaba
- Origen: América Tropical
- Familia: Myrtaceae
- Genero: Psidium
- Especie: guajava

- Distribución: La guayaba se ha naturalizado prácticamente en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo.

La guayaba es un arbusto siempre verde que puede alcanzar de 5 a 6 metros de altura en promedio, si se maneja adecuadamente con podas no sobrepasa los 3 m (FAO, 2006) aunque, datos científicos reportan alturas entre 10 a 15 metros (Portillo, 2001). Para el desarrollo de este cultivo se recomienda un rango de temperatura óptima entre 23°C y 28°C añadiendo el factor riego o distribución pluvial equitativamente (1000 y los 3800 mm de lluvia anual (según downloads.camagro.com/CultivoDelGuayaba_MAG_CR.doc.) especialmente durante las fases de brotación, floración y desarrollo de frutos. Los suelos recomendados son los del tipo areno-arcilloso, profundos, bien drenados, con buen contenido de materia orgánica (FAO, 2006) y con un pH entre 6 y 7, aunque se conoce de cultivos en pH de 4.5 hasta 8.2 (downloads.camagro.com/CultivoDelGuayaba_MAG_CR.doc). El tallo cuando está tierno es anguloso (FAO, 2006), puede medir hasta 20 cm de diámetro recubierto por una corteza de color marrón grisáceo que se desprende en delgadas escamas (Portillo, 2001). El árbol posee ramas cuadrangulares, sus flores nacen en las ramas más jóvenes, solitarias o en pequeños grupos 1 a 3 por nudo y tiene gran cantidad de estambres más un solo pistilo (FAO, 2006). Las flores son blancas, axilares, de unos 2.5 cm de diámetro y florecen sobre pedúnculos delgados en las axilas de hojas recién formadas (Portillo, 2001). La autopolinización es posible pero la polinización por insectos produce mayores rendimientos (Malo et al, 2005).

Los frutos los hay redondeados y ovalados (forma pera) según la variedad. El color de la pulpa y la cáscara dependen de la variedad: blanca, rosada o rojiza “criolla”. La madurez se observa en la cáscara cuando alcanzan un color verde amarillento, o amarillo rosado (FAO, 2006). El peso varía entre una onza y una libra. Los frutos pueden variar desde poseer una cáscara delgada que rodea una pulpa firme con numerosas semillas hasta poseer una cáscara gruesa y una pulpa blanda con pocas semillas. El sabor varía de dulce hasta altamente ácido y posee un aroma característico que va desde ser fuerte y penetrante hasta suave y agradable (Malo et al., 2005).

Las hojas del árbol son simples, coriáceas, opuestas, de oblongo-elípticas a ovadas, enteras, entre 7-15 cm de longitud y 4-6 cm de ancho. El envés pubescente posee pelos finos y suaves y nervaduras prominentes en el reverso con entre 10 a 20 pares de nervios laterales (Portillo, 2001) y son de color verde pálido. Las hojas son fragantes cuando se estrujan (FAO, 2006). Algunas de las mejores variedades que se cultivan en Estados Unidos son: 'Supreme' (pulpa blanca), 'Ruby' (pulpa roja), 'Blitch y 'Patillo" (pulpa rosada), 'Miami Red', 'Miami White' y 'Red Indian'. Los mejores híbridos son 'Ruby x Supreme' y 'Webber x Supreme' (Malo et al., 2005).

Entre las plagas que afecta el cultivo de la guayaba se destacan los siguientes insectos: la cochinilla, los pulgones, hormigas y la más perjudicial, la mosca frutera. Las dos enfermedades de mayor importancia son el Tizón y la antracnosis (downloads.camagro.com/CultivoDelGuayaba_MAG_CR.doc.).

La producción y explotación comercial de la guayaba está muy extendida en numerosos países de América, Asia y África. Los principales países productores de guayaba en el mundo son: Pakistán, Egipto, México, Bangladesh, Estados Unidos, Brasil, Colombia, Malasia, Tailandia, Perú, Sudáfrica, Venezuela, Indonesia y República Dominicana (ASERCA, 1996). Pakistán, es el principal productor y Brasil, con una producción de 250,000 toneladas se ubica en el segundo lugar mundial entre los productores de guayaba identificados y con rendimientos muy superiores a los obtenidos en México y otros países productores. Se estima que la participación de Hawaii, que es la principal zona productora, en la producción total estadounidense es cercana al 65%, Florida aporta un 25% y el resto se produce en California.

1.2.3 Producción de Guayaba en Puerto Rico

En Puerto Rico actualmente uno de los sembradíos a nivel comercial se encuentra en la Estación Experimental de Juana Díaz. El cultivo produce durante todo el año, pero tiene un pico de producción durante los meses de septiembre y octubre esto asociado a la precipitación pluvial. La producción anual promedio es de 6738.6lbs (comunicación personal con el Agro. Rubén Vélez). De acuerdo al Departamento de Agricultura de Puerto Rico (año 2009-2010), el aporte económico de la producción de guayaba fue de 61,000 dólares con una producción total de 73,500lbs de guayaba fresca con un aumento gradual desde 2007 (ver tabla 1). Además para el año 2010 se procesaron bajo pulpa y pasta de

guayaba la cantidad de 5,421 quintales (542,100lbs) (Departamento de Agricultura de Puerto Rico, año 2009-2010; ver tabla 12 en el apéndice D).

Tabla 1: Ingreso Bruto de Guayaba

INGRESO BRUTO DE GUAYABA

2000/01 - 2009/10*

AÑO	CANTIDAD (QUINTAL)	PRECIO (\$/QQ.)	VALOR (\$'000)
2000/01	341	30.24	10
2001/02	308	31.89	10
2002/03	239	33.63	8
2003/04	241	33.97	8
2004/05	62	41.43	3
2005/06	359	74.94	27
2006/07	363	75.70	27
2007/08	344	78.09	27
2008/09	515	80.76	42
2009/10*	735	83.65	61

* Cifra Preliminar

1.2.4 El Uso y/o Propiedades de las Hojas de Guayaba

La guayaba es usada en la medicina tradicional como agente hipoglicémico, antidiarreico, astringente (Rodríguez y Quintero, 1997), anti-inflamatorio, agente hemostático, además en el tratamiento de la disentería y la gastroenteritis (Huang y Zhang, 2004). Se reporta que la hoja de guayaba puede prevenir el cáncer, enfermedades del corazón, esclerosis arterial, trombosis, catarata e inhibición del envejecimiento (Qian y Nihorimbere, 2004). El extracto acuoso de las hojas de guayaba es utilizado para aliviar los síntomas de la diarrea aguda que son: descargas frecuentes, calambres intestinales,

flatulencia y distensión abdominal (Rivera-Arce et al., 2003). Estos extractos también son utilizados para tratar convulsiones, epilepsia, cólera, insomnio y tiene un efecto hipnótico (Belemtougri et al., 2006). Otros estudios reportan su uso en el tratamiento de la hipertensión y la obesidad (Sohafy et al., 2009). Estudios en la hoja de guayaba han demostrado actividad anti-tos, antimicrobial, propiedades narcóticas, antioxidantes (Belemtougri et al., 2006) (ver ilustración 41 en el apéndice D), hepatoprotectora (Sohafy et al., 2009), antipirético, y bio-antimutagénico. Es por ello que las infusiones de hojas de guayaba tiene un gran potencial de ser utilizados como una bebida funcional (Chen y Yen, 2006).

1.2.5 Las Hojas de Guayaba y sus Compuestos

Las hojas de guayaba contienen una numerosa cantidad de compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos son agentes fitoquímicos que inhiben la reacción de peroxidación en nuestro cuerpo. Sus hojas son excepcionalmente altas en flavonoides glicosídicos y quercetina, que puede afectar la actividad del músculo no estriado. Estudios previos han identificado varios compuestos como los son: el ácido gálico, ferúlico (Chen y Yen, 2006), ácido tánico, ácido procatecuico, ácido cafeíco, rutina tri-hidratada, quercetina di-hidratada (Qian y Nihorimbere, 2004), guaijaverina (quercetina-3-O- α -L-arabinosa), isoquercetina (quercetina-3-O- β -D-glucósido), hiperina (quercetina O- β -D-galactósido), quercitrina (quercetina-3-O- β -L-ramnosido) y “aviculatin” (quercetina-3-O-“gentobioside”) (Rivera et al., 2003), miricetina, luteonina, kaempferol, apigenina (Vargas et al., 2006), “morin-3-O-lyxoside”, morin-3-O-arabinosa (Arima y Danno, 2002), epicatequina, naringenina (Hsieh et

al., 2007), ácido elágico (Masuda et al., 2003), kaempferol-glucósido y ácido clorogénico (Liang et al., 2005). La aislación, identificación y cuantificación de los compuestos antioxidantes son de gran importancia para su aplicación como nuevos aditivos de alimentos (Masuda et al., 2003). Los compuestos seleccionados para realizar la investigación fueron: ácido gálico, rutina, (Chen y Yen, 2006) quercetina (Lakhanpal y Kumar, 2007) y ácido elágico (Tabata et al., 2008), los cuales estudios previos identifican como potentes agentes antioxidantes.

1.2.5.1 Quercetina

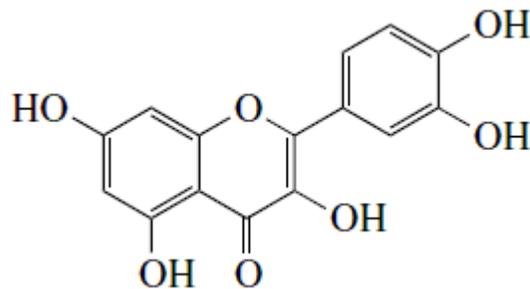


Ilustración 2: Estructura Molecular de Quercetina

Extraído de Zenkevich, et al., 2005

La quercetina pertenece a la familia de pigmentos llamado flavonoides en la clase llamada los flavonoles y consiste de tres (3) anillos con cinco (5) grupos hidroxilo. La quercetina sólida posee un color amarillo intenso (ver ilustración 3) con un peso molecular de 302.24g/mol. Cuando éste forma glucósidos, el enlace glucosídico es normalmente localizado en la posición 3 ó 7 y los carbohidratos pueden ser: L-ramnosa, D-glucosa, gluco-ramnosa, galactosa o arabinosa (Lakhanpal y Rai, 2007). Esta es soluble en acetona, ácido acético y pirimidina, levemente soluble en agua caliente e insoluble en agua fría

(<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924781>). La quercetina se encuentra en abundancia en los siguientes alimentos: cebollas, brócoli, manzanas, bayas y té (Lakhanpal y Rai, 2007). En los extractos de hoja de guayaba los componentes principales son los derivados de quercetina los cuales son hidrolizados en el cuerpo. Algunos derivados de quercetina presentes en la hoja de la guayaba son: quercetina, avicularina, guaijaverina, isoquercetina, hiperina, quercitrina, quercetina 3-O-“gentiobioside”, quercetina 4'-glucurónido (Sohafy et al., 2009) y rutina (Qian y Nihorimbere, 2004). La quercetina posee propiedades antioxidantes, antibacterial, antiinflamatoria, anti-tumor (Huang y Zhang, 2004), espasmolítica (aliviar espasmos), inhibe los movimientos intestinales, reduce la permeabilidad capilar en la cavidad abdominal y es considerado un anti-viral (Sohafy et al., 2009). Estudios sugieren que la quercetina, es el agente anticáncer más potente en el hombre y que contribuye a la prevención de arteriosclerosis (Miean y Mohamed, 2001). Además, es utilizada para tratar enfermedades de los ojos y desordenes alérgicos (Lakhanpal y Rai, 2007). La ingesta promedio diaria en los Estados Unidos provee entre 15 a 40mg de quercetina, niveles altos son considerados >33mg/diarios los cuales son asociados a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Larson et al., 2010).



Ilustración 3: Quercetina

1.2.5.2 Rutina

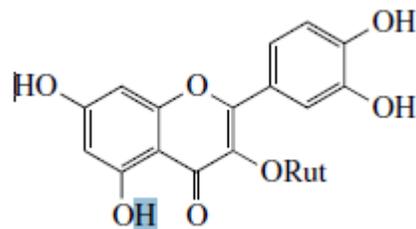


Ilustración 4: Estructura Molecular de Rutina

Extraído de Zenkevich, et al., 2005

La rutina es un flavonide que pertenece al grupo de los flavonoles. En su estructura se encuentra como aglicona la quercetina y el disacárido rutinosa. Este compuesto tiene un peso molecular de 610.51g/mol y posee un color amarillo claro (ver ilustración 5). La rutina tiene una solubilidad de 2g/l en agua, además es soluble en piridina, solventes formamida y alcalinos. Es ligeramente soluble en etanol, acetona y acetato de etilo. Además es

prácticamente insoluble en cloroformo, éter y solventes no-polares (http://www.bimsifram.fr/rutin/msds_for_rutin.htm). Se encuentra en diversas frutas y vegetales tales como: cítricos, la cáscara de la manzana, uvas blancas, *Eugenia aggregata* (cereza del Río Grande), hojas de tabaco y té negro. Su presencia en hojas de guayaba fue revelada por Hsieh y colaboradores (2007). Rutina fue el flavonol mayoritario encontrado por González y colaboradores (2010) en su investigación en hojas y botones *C. spinosa* (alcaparra) a los cuales indica como potentes antioxidantes por la presencia del flavonol. Otras propiedades que se le atribuyen son: antialérgica, antibacteriana, antiviral, antifúngica y anticarcinogénica (Payán-Gómez S. et al., 2010).



Ilustración 5: Rutina

1.2.5.3 Ácido Elágico

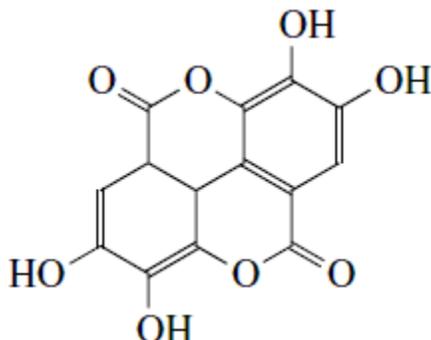


Ilustración 6: Estructura Molecular de Ácido Elágico

Extraído de Zenkevich, et al., 2005

El ácido elágico es un dímero de ácido gálico con un peso molecular de 302.2g/mol de color marrón (ver ilustración 7). Es altamente termoestable debido a los cuatro anillos de la molécula, lo que representa dominancia lipofílica. Los cuatros grupos fenólicos y los dos representantes de lactonas representan la zona hidrofílica. Estas propiedades del ácido elágico resultan en una alta insolubilidad en agua. No obstante es soluble en metanol, ácido, etanol y sulfóxido dimetilo (Aguilera-Carbo et al., 2008). Algunos alimentos ricos en ácido elágico son: frambuesa roja, fresas, arándanos agrios, uvas, moras, arándanos, cereza, granada, manzanas y nueces (Turcotte, 2009). Se ha reportado que ácido elágico tiene actividad antioxidante y antiviral y provee protección del cáncer del colón, del pulmón y del esófago (Mullen et al., 2003). El ácido elágico es utilizado en cremas, perfumes y otros productos cosméticos que tienen efectos beneficiosos sobre la piel; sin embargo, en la industria de alimentos este compuesto no ha sido utilizado (Aguilera-Carbo et al., 2008).



Ilustración 7: Ácido Elágico

1.2.5.4 Ácido Gálico

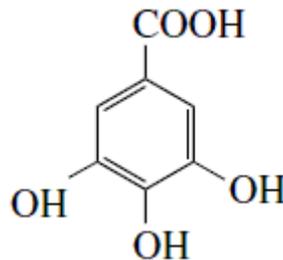


Ilustración 8: Estructura Molecular de Ácido Gálico

Extraído de Zenkevich, et al., 2005

El ácido gálico o ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, $C_6H_2(OH)_3CO_2H$, es un ácido fenólico cristalino incoloro (ver Ilustración 9). Tiene un peso molecular de 170.12 g/mol y es soluble en agua. Diversos estudios lo han identificado en nueces, hojas de té, corteza de roble, hojas de guayaba y muchas otras plantas, ya sea en su forma libre y/o como parte de taninos. La molécula de ácido gálico tiene tres grupos hidroxilo y un grupo de ácido carboxílico. Se le atribuyen propiedades antioxidantes (Chen y Yen, 2007), anti-

carcinogénicas, anti-mutagénicas, anti-inflamatoria (Soong y Barlow, 2006) y antiangiogénica (reducir la formación de nuevos vasos sanguíneos) (Liu et al., 2005).



Ilustración 9: Ácido Gálico

1.2.6 Métodos de Análisis Reportados para la Identificación y Cuantificación de Polifenoles

Son diversos los métodos utilizados para identificar y/o cuantificar compuestos en plantas, frutas y/o vegetales. Se inicia desde la colecta de la muestra, secado, extracción, e instrumentación para su cuantificación como: electroforesis capilar, detección espectrofotométrica, cromatografía de capa fina (Sohafy S. M. et al., 2009 y Rodríguez y Quintero, 1997), cromatografía de gas (Huang y Zhang, 2004), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) (ver tabla 8 en apéndice A) siendo esta última la más empleada para la identificación y/o cuantificación en la guayaba. En la aplicación de HPLC se pudo identificar como fase móvil más común la mezcla de agua con pH ácido (2.4 donde mayor estabilidad se reporta para los compuestos fenólicos) y metanol o acetonitrilo usualmente empleando gradientes. Como fase estacionaria se reporta el uso de columnas C-18 o variante. Los detectores reportados para evaluar los compuestos fenólicos son:

fluorescencia, electroquímico, UV-Vis, arreglo de diodo y espectrómetro de masas (LC-MS) siendo los últimos tres los más reportados en la guayaba (ver tabla 8 en apéndice A). Entre éstas se resalta LC-MS como la técnica que permite una mayor identificación definida y una determinación cuantitativa de los compuestos que no son resueltos totalmente mediante cromatografía (Ardrey, 2003).

Algunas técnicas de extracción que preceden al análisis reportado incluyen: infusión, sólido-líquido a temperatura ambiente, maceración, agitación, sonicación y extracción por reflujo; utilizando como solvente agua >95° o agua/alcohol acidulado (ver tabla 8 en apéndice A). La técnica más utilizada para cuantificación total de fenoles es la espectrofotométrica usando el método de Folin Ciocalteu, pero también se reporta la lectura de fenoles totales directa a una longitud de onda de 280nm (ver tabla 9 en apéndice A). Respecto a los tratamientos para preservación previo a la extracción, se reporta mayormente el secado del material según los siguientes métodos: sombra, horno y liofilización (ver tabla 10 en apéndice A). El tercer análisis realizado fue la medición de actividad antioxidante para el cual utilizan técnicas como: DPPH, ABTS y ORAC. Siendo ORAC considerado por muchos como el método preferible debido a su importancia biológica de la eficacia antioxidante in vivo. El ensayo mide el grado de inhibición del peroxi radical la oxidación inducida por los compuestos de interés en un entorno químico. Valores se reportan como equivalentes de Trolox e incluye tanto el tiempo de inhibición y la extensión de la inhibición de la oxidación (Haytowitz y Bhagwat, 2010) (ver tabla 11 en el apéndice A).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Colección de la hoja de *Psidium guajava* (guayaba)

La colección de las muestras fue realizada en las instalaciones de la Estación Experimental en Juana Díaz. La finca de 283 cuerdas está localizada 18.02 grados N, 66.32 grados E en la zona ecológica de los llanos costeros del sur con una elevación de 67.8 pies sobre el nivel del mar. Los suelos predominantes son: San Antón, Fraternidad y Aguilita pero la siembra de guayaba esta localizada en suelos tipo San Antón (Vélez et al., 2003). La precipitación pluvial promedio anual es de 32 pulgadas, el mes más lluvioso es septiembre y el más seco es marzo. La temperatura oscila entre 84.6°F máxima y 67.6 °F mínima. El tipo de riego es por goteo y aéreo además, el cultivo de guayaba se abona dos veces al año. El predio H-94-B Fortuna a cargo del Agrónomo Rubén Vélez fue sembrado en febrero del 1998 y podado en febrero del 2010. El predio está sembrado en tres bloques en cada bloque se encuentra una representación al azar de los catorce clones. Cada bloque contiene cuatro filas de árboles ver Ilustración 10.

MAPA DE GUAYABAS																	
H-94-B FORTUNA																	
90	90	203	203	203	203	190	190	190	7	7	199	199	169	167	167	155	155
90	73	57-7-19	Q-241	G-447	R-264	57-1-28	57-10-137	57-8-163	57-1-42	57-2-95	57-4-30	M-184	G-864	R-258	57-6-71	219	219
73	73	57-7-19	Q-241	G-447	R-264	57-1-28	57-10-137	57-8-163	57-1-42	57-2-95	57-4-30	M-184	G-864	R-258	57-6-71	174	174
187	187	57-7-19	Q-241	G-447	R-264	57-1-28	57-10-137	57-8-163	57-1-42	57-2-95	57-4-30	M-184	G-864	R-258	57-6-71	257	257
210	187	57-7-19	Q-241	G-447	R-264	57-1-28	57-10-137	57-8-163	57-1-42	57-2-95	57-4-30	M-184	G-864	R-258	57-6-71	255	255
210	210	M-184	57-10-137	57-7-19	R-258	57-6-71	G-447	57-2-95	Q-241	57-8-163	G-864	57-1-28	57-4-30	57-1-42	R-264	255	255
43	43	M-184	57-10-137	57-7-19	R-258	57-6-71	G-447	57-2-95	Q-241	57-8-163	G-864	57-1-28	57-4-30	57-1-42	R-264	183	183
268	43	M-184	57-10-137	57-7-19	R-258	57-6-71	G-447	57-2-95	Q-241	57-8-163	G-864	57-1-28	57-4-30	57-1-42	R-264	183	183
268	268	M-184	57-10-137	57-7-19	R-258	57-6-71	G-447	57-2-95	Q-241	57-8-163	G-864	57-1-28	57-4-30	57-1-42	R-264	129	129
24	24	Q-241	57-8-163	57-1-42	M-184	57-10-137	57-1-28	G-864	R-258	G-447	R-264	57-2-95	57-6-71	57-4-30	27-7-19	129	129
67	24	Q-241	57-8-163	57-1-42	M-184	57-10-137	57-1-28	G-864	R-258	G-447	R-264	57-2-95	57-6-71	57-4-30	27-7-19	199	199
67	67	Q-241	57-8-163	57-1-42	M-184	57-10-137	57-1-28	G-864	R-258	G-447	R-264	57-2-95	57-6-71	57-4-30	27-7-19	199	199
258	258	Q-241	57-8-163	57-1-42	M-184	57-10-137	57-1-28	G-864	R-258	G-447	R-264	57-2-95	57-6-71	57-4-30	27-7-19	14	199
258	253	253	253	46	46	46	39	39	39	26	26	256	256	244	244	14	14

< NORTE

RUBEN VELEZ COLON

SIEMBRA EXPERIMENTO 11 DE FEBRERO DEL 1998

Ilustración 10: Mapa del Predio de Guayaba en la Estación Experimental de Juana Díaz

Se cosecharon un total de treinta y tres muestras (33) al azar de catorce (14) clones (ver Ilustración 11). El muestreo se realizó de la siguiente forma, se tomaron dos (2) bloques al azar y de cada bloque se tomó un árbol al azar de cada clon para un total de veintiocho muestras. Cinco (5) muestras adicionales fueron colectadas para evaluar la diferencia en contenido fenólico, según variaba el día de colección. Los clones analizados fueron: 57-7-19, Q-241, G-447, R264, 57-1-28, 57-10-137, 57-8-165, 57-1-42, 57-2-95, 57-4-30, M-184, G-

864, R-258, y 57-6-71. Cada muestra constó de treinta (30) hojas adultas de un solo árbol seleccionado al azar. Para seleccionar hojas adultas se utilizó la clasificación microscópica reportada por Nantitanon y colaboradores (2010) (ver ilustración 40 en el apéndice D). Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno con cierre e identificadas y transportadas al laboratorio sobre hielo para bajar la temperatura de campo. Luego fueron lavadas con agua potable para la remoción de particulado.

MAPA DE GUAYABAS																	
H-54-B FORTUNA																	
90	90	203	203	203	203	190	190	180	7	7	199	199	169	167	167	155	155
90	73	57-7-19	Q-241	G-447	R-264	57-1-28	57-10-137	57-8-163	57-1-42	57-2-95	57-4-30	M-184	G-864	R-258	57-6-71	219	219
73	73	57-7-19	Q-241	G-447	R-264	57-1-28	57-10-137	57-8-163	57-1-42	57-2-95	57-4-30	M-184	G-864	R-258	57-6-71	174	174
187	187	57-7-19	Q-241	G-447	R-264	57-1-28	57-10-137	57-8-163	57-1-42	57-2-95	57-4-30	M-184	G-864	R-258	57-6-71	257	257
210	187	57-7-19	Q-241	G-447	R-264	57-1-28	57-10-137	57-8-163	57-1-42	57-2-95	57-4-30	M-184	G-864	R-258	57-6-71	255	255
210	210	★ M-184	57-10-137	57-7-19	R-258	★ 57-8-71	G-447	57-2-95	Q-241	★ 57-8-163	G-864	★ 57-1-28	★ 57-4-30	57-1-42	R-264	255	255
43	43	M-184	57-10-137	57-7-19	★ R-258	57-6-71	G-447	57-2-95	Q-241	57-8-163	G-864	57-1-28	57-4-30	57-1-42	R-264	183	183
258	43	M-184	57-10-137	★ 57-7-19	R-258	57-6-71	G-447	★ 57-8-163	Q-241	57-8-163	G-864	57-1-28	57-4-30	★ 57-1-42	★ R-264	183	183
268	268	M-184	★ 57-10-137	57-7-19	R-258	57-6-71	★ G-447	57-2-95	★ Q-241	57-8-163	★ G-864	57-1-28	57-4-30	57-1-42	R-264	129	129
24	24	★ Q-241	57-8-163	★ 57-1-42	M-184	57-10-137	★ 57-1-28	G-864	R-258	★ G-447	R-264	57-2-95	57-6-71	57-4-30	★ 27-7-19	129	129
67	24	Q-241	57-8-163	57-1-42	M-184	★ 57-10-137	57-1-28	★ G-864	R-258	G-447	R-264	★ 57-2-95	★ 57-6-71	★ 57-4-30	27-7-19	199	199
67	67	Q-241	57-8-163	57-1-42	M-184	57-10-137	57-1-28	G-864	★ R-258	G-447	R-264	57-2-95	57-6-71	57-4-30	27-7-19	199	199
258	258	Q-241	★ 57-8-163	57-1-42	M-★	57-10-137	57-1-28	G-864	R-258	G-447	★ R-264	57-2-95	57-6-71	57-4-30	27-7-19	14	199
258	253	253	253	46	46	46	39	39	39	26	26	256	256	244	244	14	14

Ilustración 11: Mapa con la Selección de Muestras

2.2 Proceso de secado, pulverizado y almacenamiento previo al análisis

El proceso de secado, pulverizado y almacenamiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de química del programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Recinto Universitario de Mayagüez. Las muestras fueron congeladas a -80°C en un ultracongelador Isotemp® Basic durante treinta (30) minutos previo a ser liofilizadas en un Thermo Savant durante dieciocho (18) horas (ver Ilustración 12). Posterior al secado las hojas fueron pulverizadas en un molino Glen Milles tipo C 11-1 y almacenadas en un desecador a 4°C previo a su extracción y análisis.



Ilustración 12: Proceso de Liofilización

2.3 Extracción de polifenoles en la hoja de guayaba mediante proceso de infusión

2.3.1 Estudios Preliminares: Selección de Temperatura de Extracción

Se evaluó el rendimiento de extracción en base a temperatura de extracción y tiempo de extracción. El primer parámetro evaluado fue la temperatura de extracción. El método empleado fue el siguiente: se calentaron 237.00ml (8 onzas) de agua destilada en una plancha para extracción Thermolyne Cimarec 2 durante 5 min variando las temperaturas desde 30°C

hasta 90°C en intervalos de 20 grados y se mezcló con 2.0000 g de muestra pesados en una balanza analítica Adventure TM modelo Ohaus con agitación leve continua. Las muestras fueron filtradas al vacío en un embudo Büchner con papel filtro Whatman no.1. Luego las muestras fueron envasadas y congeladas a -20.0°C previo a los análisis. El filtrado descongelado fue diluído con agua para el análisis de fenoles totales según la sección 2.5.

2.3.2 Estudios Preliminares: Selección del Tiempo de Extracción

El segundo parámetro evaluado fue el tiempo de extracción, para ello 2.0000g de muestra en 237.00ml (~8 onzas) de agua destilada fueron extraídos a un rango de tiempo de 2 a 10 minutos con mediciones en intervalos de 2 minutos mantenidos a una temperatura de 90°C. Los extractos fueron filtrados y analizados según lo previamente descrito en la sección 2.3.1.

2.3.3 Estudios Preliminares: Selección de Porcentaje de Alcohol en la Extracción en Fase Sólida (SPE)

El tercer parámetro evaluado fue la selección de porcentaje de alcohol para la extracción en fase sólida. Posterior a la infusión se utilizó extracción de fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) como método de limpieza de la muestra. Se utilizó una cámara Supelco Vesipre DL con cartuchos Supelco ENVI Super Clean C18 (ver Ilustración 13) los cuales se acondicionaron y se emplearon de la siguiente forma: 2.00 ml de metanol al 0.1% ácido fórmico seguido de 2.00ml de agua al 0.1% ácido fórmico como fase de acondicionamiento. Se adicionaron 2.00ml de la muestra al cartucho luego la muestra fue lavada con 2.00ml de agua 0.1% ácido fórmico y se evaluaron 3 porcentajes de alcohol para la extracción de los

compuestos polifenólicos de interés. Los porcentajes evaluados fueron: 50%, 70% y 100% de metanol al 0.1% de ácido fórmico. El extracto purificado se filtró utilizando un filtro Millex®-HP PES 0.45µm y una jeringuilla BD 5ml. Los extractos fueron filtrados y analizados según lo previamente descrito en la sección 2.3.1.



Ilustración 13: Proceso de Extracción en Fase Sólida

2.4 Cuantificación e Identificación de Polifenoles en la Hoja de Guayaba Mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento Acoplado a un Espectrómetro de Masa (LC-MS)

La cuantificación e identificación de polifenoles en la hoja de la guayaba fue realizado en las instalaciones Centro de Innovación Tecnológica Agro-Industrial del Recinto Universitario de Mayagüez laboratorio 220 a cargo de la Dra. María Plaza. La cuantificación

e identificación de polifenoles en la hoja de guayaba se realizó en un HPLC Agilent 1260 Infinity binario equipado con un inyector automático, un detector de arreglo de diodo y un espectrómetro de masas 6410 triplecuadrupolo, con un sistema operativo Mass Hunter versión 0.0301. La fase estacionaria utilizada fue una columna Zorbax Elipse Agilent 150 x 4.6 (mm) con un tamaño de partícula de 5µm. La fase móvil consistió de los siguientes solventes: agua:acetonitrilo (95:5) 0.1% ácido fórmico (A) y acetonitrilo al 0.1% ácido fórmico (B). Todos los solventes fueron grado HPLC filtrados por filtro 0.45µm (I.C.E. 450®) y comprados a Fisher exceptuando el agua destilada que fue desionizada. El flujo se mantuvo a 0.8ml/min y la temperatura de la columna a 30°C. El volumen de inyección fue de 5 µl. La separación de los compuestos fue realizada por gradiente estructurado de la siguiente forma: 0min - 0%B; 5min - 25%B; 10min - 30%B; 20min - 50%B; 21min- 100%B; 25min - 100%B, 25.10min - 0%B. El detector de arreglo de diodo se analizó en un rango de onda 190 a 400nm. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: temperatura del gas 325°C, flujo del gas 13L/min, nebulizador 60psi, capilaridad positiva 4000V y capilaridad negativa 3500V. Para realizar las curvas se utilizaron estándares de ácido gálico (Fisher), ácido elágico hidratado, rutina hidratada 95% y quercetina dihidratada (Sigma Aldrich). La mezcla de estándares “stock” se realizó pesando 0.0100g de cada estándar y se transfirieron a una volumétrica ámbar de 100ml y se añadió metanol hasta la marca de calibración. Luego para disolver se sonicaron durante 30min en un ultra-sonicador Branson 3510 esto para realizar “stock” de 100ppm. Del stock se realizaron diluciones a 100, 80, 60, 40, 25, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2, 1 y 0.5ppm y se añadió un estándar interno (flavona) a una

concentración de 3.5ppm a cada punto de la curva y a cada muestra. Las muestras y estándares fueron analizados en triplicado. Los resultados fueron expresados en mg/g peso seco.

2.5 Cuantificación de Fenoles Totales en la Hoja de la Guayaba

La cuantificación de polifenoles totales en la hoja de guayaba fue realizada mediante el método de colorimetría Folin-Ciocalteu según Talcott y colaboradores (2000). Se utilizó un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 8. La curva de calibración (ver ilustración 33 en el apéndice C) fue realizada disolviendo 0.5000 g de ácido gálico en 10.0ml de etanol luego se diluyó hasta 100.00ml con agua (5g/litro). Luego se diluyó 0.01, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 ml a 10.0ml con agua destilada para crear estándares con concentraciones de 5, 200, 400, 600, 800 y 1000ppm GAE (ver ilustración 14). La solución de carbonato de sodio 1N fue preparada pesando 50.0000g de carbonato de sodio anhidro y fue disuelto en 80.00ml de agua hasta ebullición. Luego se enfrió y se dejó reposar 24hrs a temperatura ambiente. Se añadió agua hasta llegar a 940ml y se filtró al vacío con papel de filtro Whatman no 1. El reactivo Folin 2.0N, fue diluído 1 en 8 partes para obtener una concentración 0.25N. La metodología realizada fue la siguiente: se colocó 100µl del estándar, muestra diluída (1/2) o blanco en un tubo de ensayo. Luego se añadió 1.00ml del reactivo Folin 0.25N se mezclaron e incubaron 3 min. a temperatura ambiente. Después se añadió 1.00 ml de la solución de carbonato de sodio 1N se mezclaron y se esperó 7min. Se añadió 7.00ml de agua destilada, se mezclaron y se incubó 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se transfirieron 2 ml a

celda de cuarzo de 1 cm³ y se midió la absorbancia a 726 nm en el espectrofotómetro. Cada muestra fue analizada en triplicado. Los valores fueron reportados como equivalentes de ácido gálico (GAE) usando unidades de mg/g.

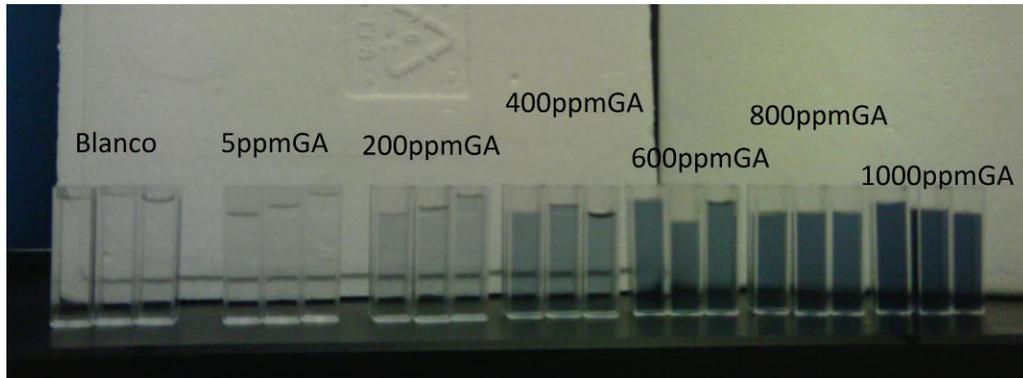


Ilustración 14: Formación de Color de la Curva de Calibración de Fenoles

2.6 Análisis de la actividad antioxidante en la hoja de la guayaba

El análisis de la actividad antioxidante en la hoja de la guayaba fue realizado usando el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) según Huang y colaboradores (2005). Para este procedimiento se utilizó un fluorómetro fmax Molecular Devices con excitación a 485nm y emisión a 538nm con el software Ascent versión 2.6. Este ensayo consiste en el monitoreo de la inhibición del descenso de la fluoresceína en presencia de un peroxi-radical. Para llevar a cabo el ensayo se prepararon las siguientes soluciones: amortiguador de fosfato, fluoresceína, radical AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) y Trolox (utilizado como estándar durante el procedimiento). El amortiguador de fosfato se obtuvo pesando 21.4400g de K₂HPO₄ y 10.6500g de NaH₂PO₄ que luego se disolvió en 2000ml de agua destilada. Como “stock” para la curva de

calibración se pesó 0.0125g de Trolox y se transfirieron a una volumétrica de 250ml a la cual se le añadió el amortiguador de fosfato (concentración de 200 μ M) hasta la marca de calibración. Para realizar la curva de calibración (ver ilustración 39 en el apéndice C) se prepararon diluciones seriadas para obtener concentraciones finales entre 0.781 a 50 μ MTE (Trolox Equivalent). La fluoresceína fue preparada a una concentración de 74,763nM para luego ser diluida a 747.63nM, transfiriendo 1.00ml de la solución concentrada a una volumétrica de 100ml aforando con “buffer” de fosfato. El radical AAPH fue preparado al momento de realizar la prueba pesando 0.9000g en 10.00ml de amortiguador de fosfato. El ensayo se realizó a una temperatura de 37 °C durante 70min. En cada celda de la placa se vertieron 50 μ l de trolox ó blanco ó muestra, 100 μ l de fluoresceína 747.63nM y 50 μ l del radical AAPH. Las muestras fueron analizadas en triplicado.

2.7 Análisis Estadístico

La colección de las muestras se hizo siguiendo un diseño en bloques completamente aleatorizado. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat versión 2011e[®] utilizando la prueba estadística Tukey $p \leq 0.05$. Las tablas presentadas fueron realizadas en el software Microsoft Office Excel versión 2003[®].

3 Datos y Resultados

3.1 Pruebas Preliminares para Selección de Tiempo, Temperatura y % de Metanol

Las resultados obtenidos fueron los siguientes: en la selección de temperatura las extracciones a 90°C resultaron con una mayor cantidad de fenoles totales obteniendo una concentración promedio de 119.0 ± 2.6 mg/g GAE (ver ilustración 15). No se esperaría un aumento con el aumento a temperaturas mayores de 90°C ya que según Akowuah (2009) para temperaturas de extracción se comienza la degradación de fenoles a los 60°C. Mientras que la evaluación del tiempo de extracción con 8 minutos resultó ser efectivo ya que a los 10 min los resultados para fenoles totales (107.5 ± 2.0 mg/g GAE y 110.2 ± 4.8 mg/g GAE respectivamente) fueron similares (ver ilustración 16). En adición para tiempo de extracción de fenoles mediante infusión 7min resulta ser óptimo (<http://www.coffee-tea.co.uk/infusion-benefits.php>). El mayor porcentaje de metanol (en este caso un 100%) utilizado en la fase de limpieza de extracción en fase sólida resultó con mayor efectividad para extraer los compuestos fenólicos arrojando una cantidad promedio de fenoles totales de 125.1 ± 2.7 mg/g GAE (ver ilustración 17) el cual fue seleccionado aun que no presentara diferencias significativas respecto al 70% de metanol debido a la dificultad de solubilidad de compuestos de interés. Estudios previos reportan valores como: 166mg/g GAE-483mg/g GAE (Chen y Yen, 2006) y 80.28mg/g GAE-136.02mg/g GAE (Nantitanon et al., 2010). Estos valores van acorde con los obtenidos en esta investigación.

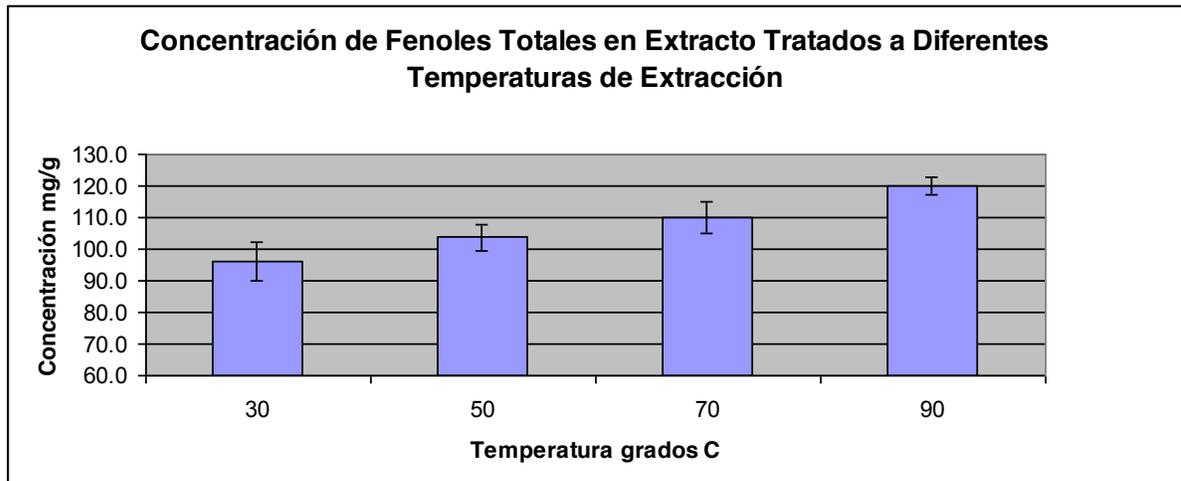


Ilustración 15: Concentraciones de Fenoles Totales en Extractos Tratados a Diferentes Temperaturas de Extracción

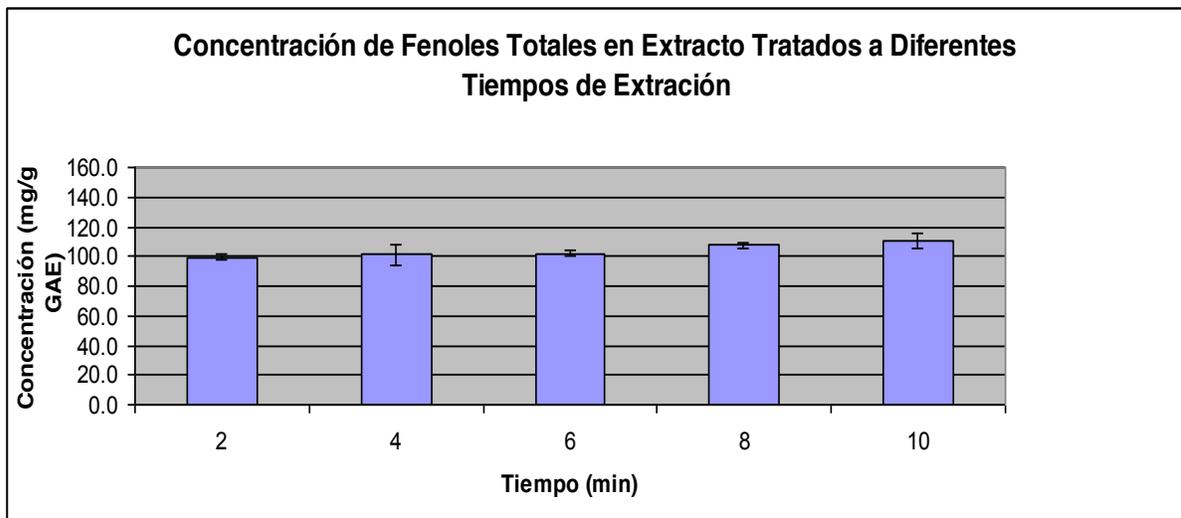


Ilustración 16: Concentración de Fenoles Totales en Extractos Tratados a Diferentes Tiempo de Extracción

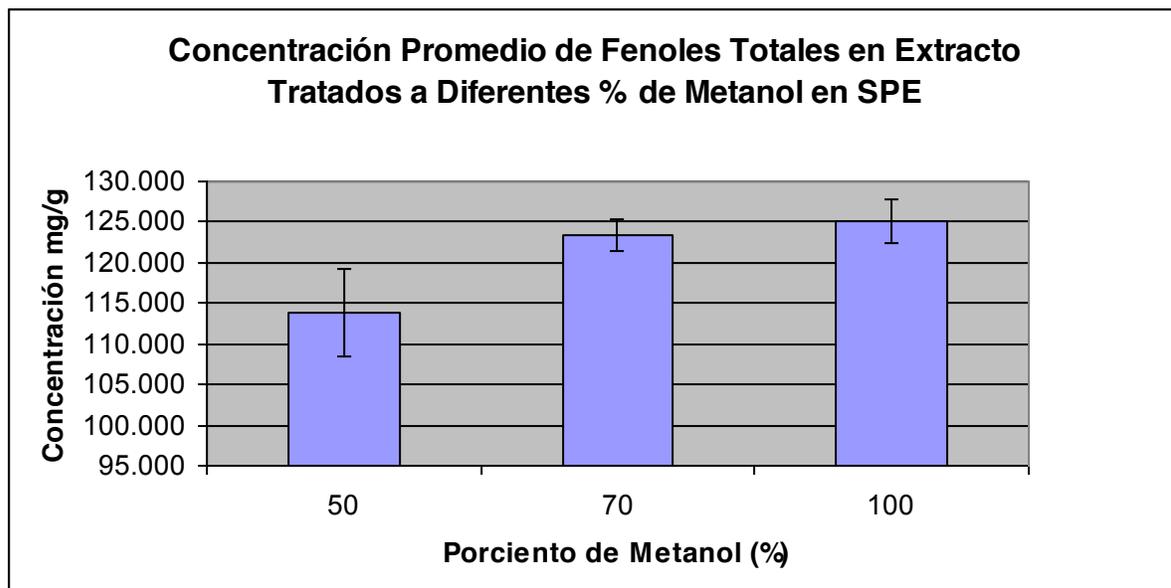


Ilustración 17: Concentración Promedio de Fenoles Totales en Extractos Tratados a Diferentes % de Metanol en SPE

3.2 Cuantificación e Identificación de Polifenoles en la Hoja de Guayaba Mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento Acoplado a un Espectrómetro de Masa (LC-MS)

Como resultado gráfico en la evaluación del té de guayaba en la fase metanólica se obtuvo la presencia de los siguientes compuestos: ácido gálico, ácido elágico y quercetina con tiempos de retención de 4.086min, 7.794min y 12.050 min (ver ilustración 18) identificados tanto en el cromatograma total de iones (TIC) como en el de arreglo de diodo (DAD). Estos tiempos de retención coincidieron con los obtenidos en la curva de los estándares (ver ilustración 22).

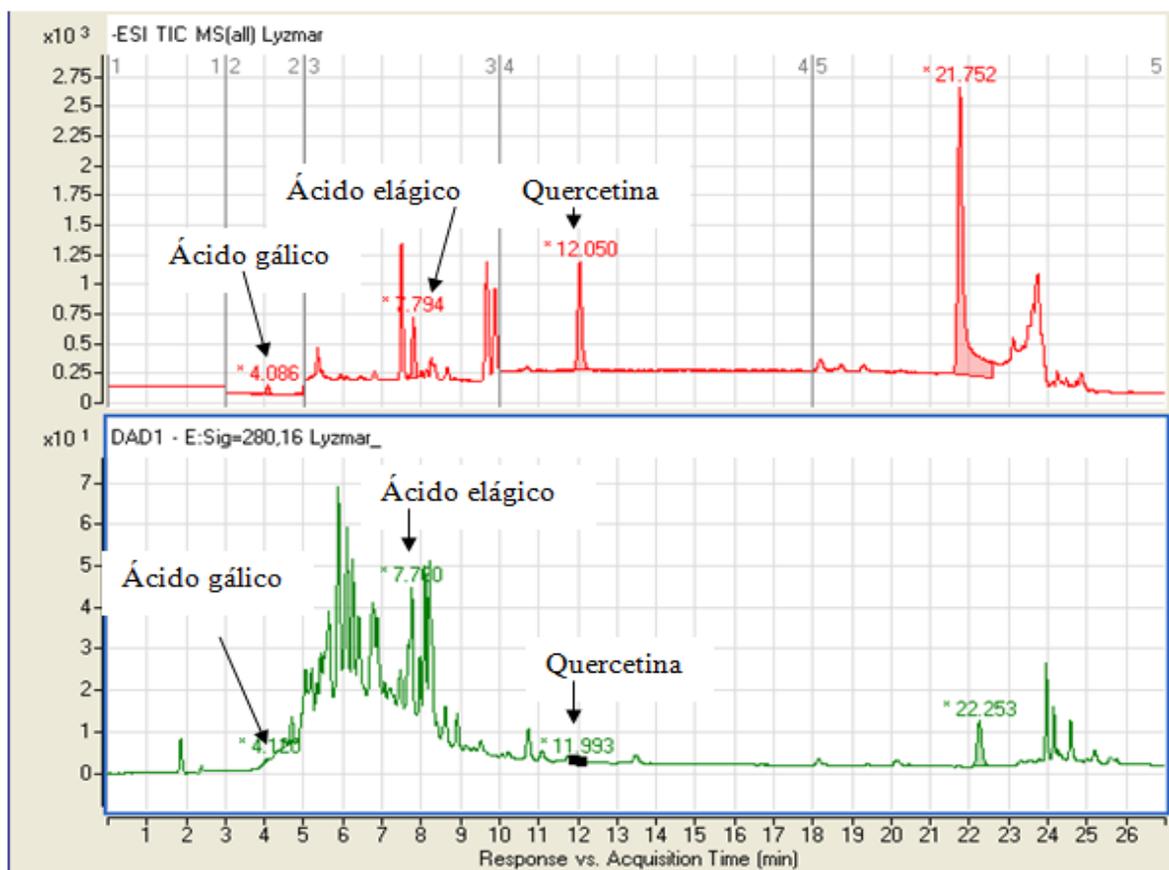


Ilustración 18: Cromatogramas Total de Iones y Arreglo de Diodos para Extractos de Guayaba en Fase Metanólica

La Ilustración 19 muestra la identificación de uno de los picos de interés; quercetina en la fase metanólica de los extractos con un tiempo de retención de 12.091min. La identificación inicial de este compuesto se obtuvo por el tiempo de retención de la curva de calibración de los estándares (ver ilustración 22)

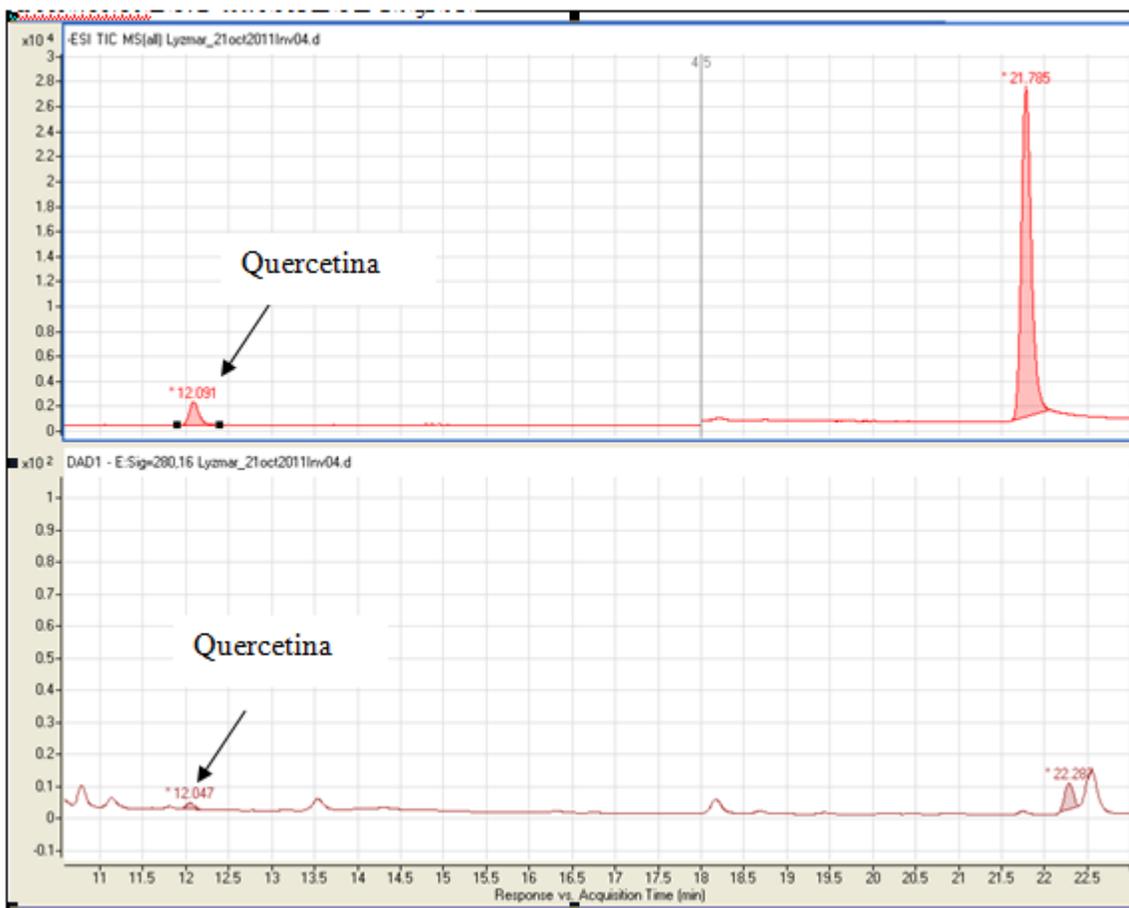


Ilustración 19: Minuto 11 al 23 del Cromatograma Total de Iones y Arreglo de Diodo en Fase Metanólica del Extracto de Guayaba

Los cromatogramas (ver ilustración 20) muestran la identificación de otros dos compuestos ácido gálico y ácido elágico en la fase metanólica con tiempos de retención de 4.086 min y 7.794 min respectivamente acorde con los picos identificados en los cromatogramas de los estándares puros (ver ilustración 22).

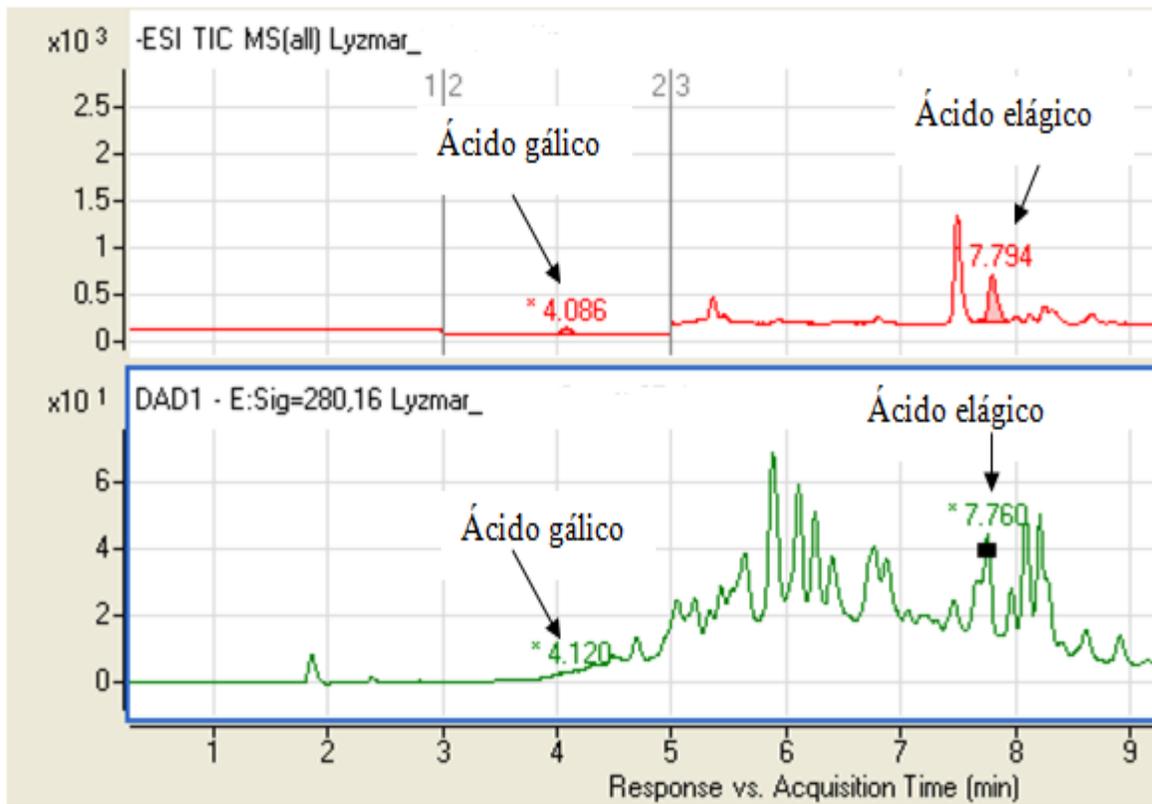


Ilustración 20: Minuto 1 al 9 del Cromatograma Total de Iones y Arreglo de Diodo en Fase Metanólica de Extracto de Guayaba

El análisis de la fase acuosa reportó solo la presencia de ácido gálico como se observa en la ilustración 21 con un tiempo de retención de 4.146 minuto.

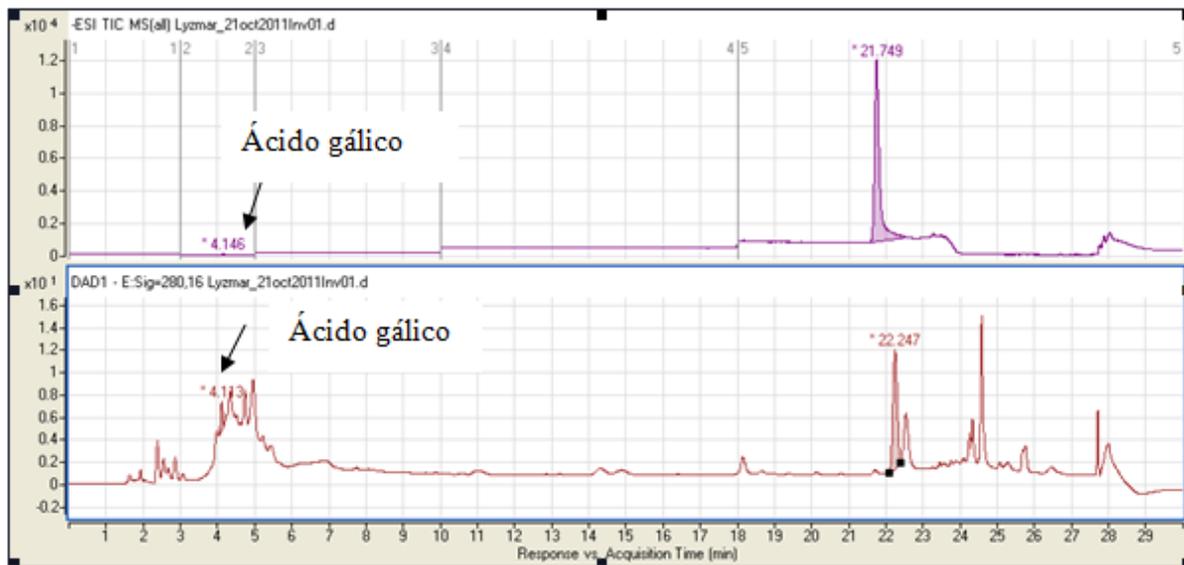


Ilustración 21: Cromatograma Total de Iones y Arreglo de Diodo en Fase Acuosa de Extracto de Guayaba

El análisis de identificación y cuantificación se realizó en base a las curvas obtenidas (ver ilustraciones 34 a la 38 en el apéndice C) y tiempos de retención que se muestran en la ilustración 22. Los tiempos de retención para los estándares de ácido gálico, rutina, ácido elágico y quercetina fueron los siguientes respectivamente: 4.131 ± 0.011 min, 7.412 ± 0.006 min, 7.826 ± 0.008 min y 12.131 ± 0.019 min. Estos tiempos fueron utilizados para la identificación preliminar de los compuestos en cada muestra. En adición los espectros de ilustraciones 23-26 se utilizaron como método de confirmación en el proceso de identificación de los compuestos.

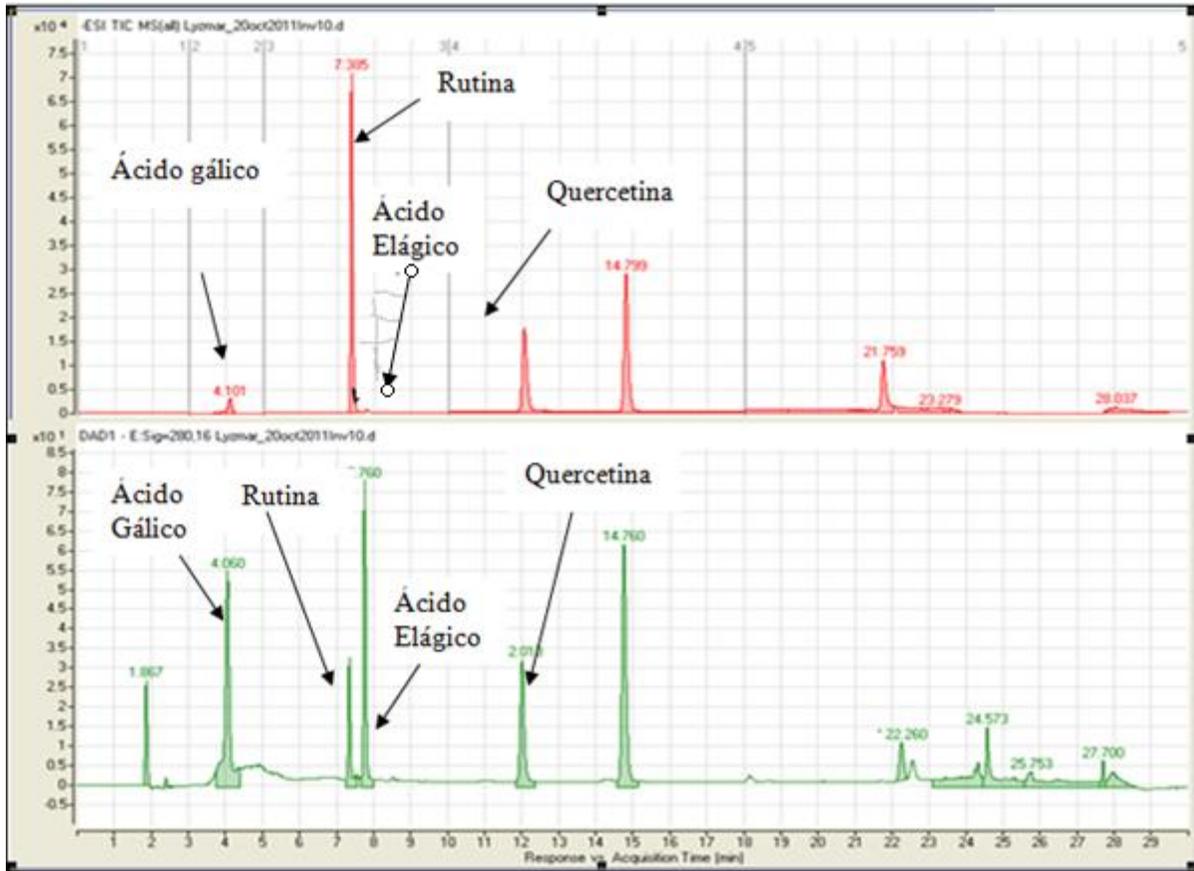


Ilustración 22: Cromatograma Total de Iones y Arreglo de Diodo de los Estándares; Ácido Gálico, Rutina, Ácido Elágico, Quercetina y el Estándar Interno Flavona

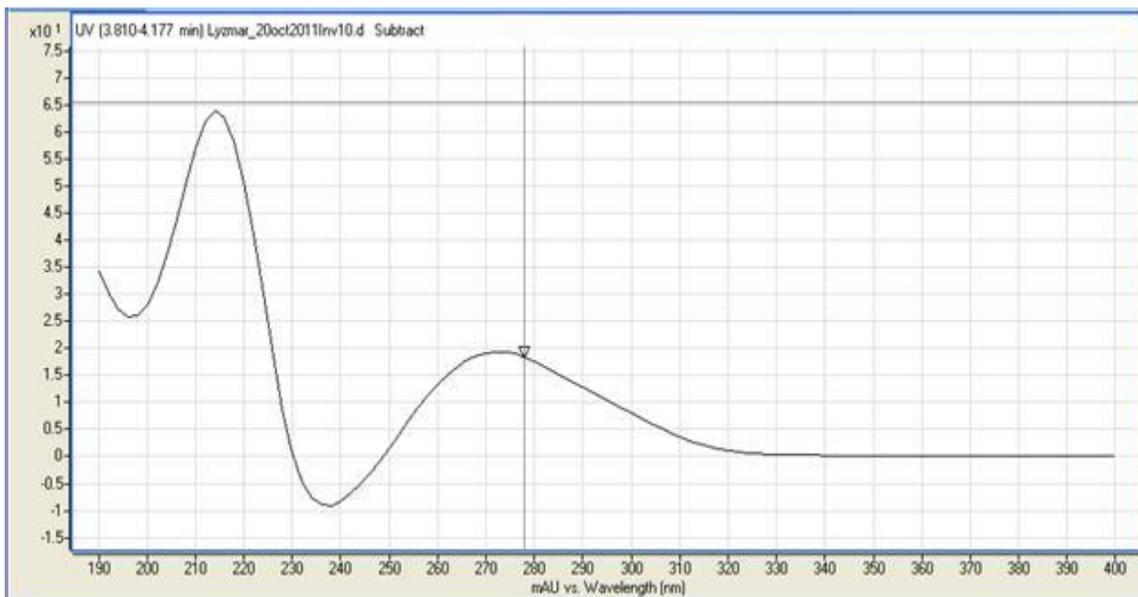


Ilustración 23: Espectro UV Obtenido para Ácido Gálico

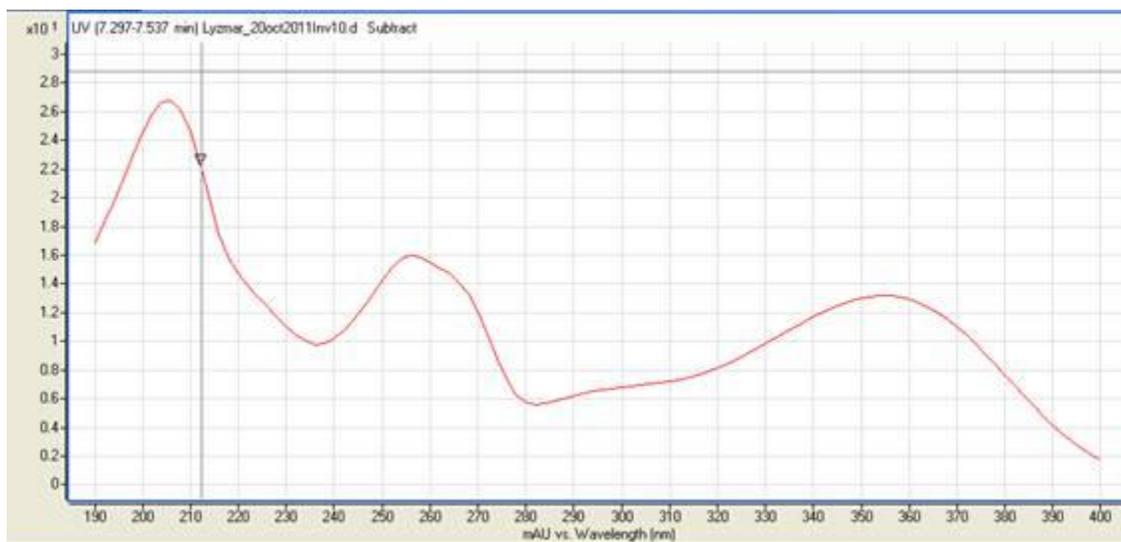


Ilustración 24: Espectro UV Obtenido para Rutina

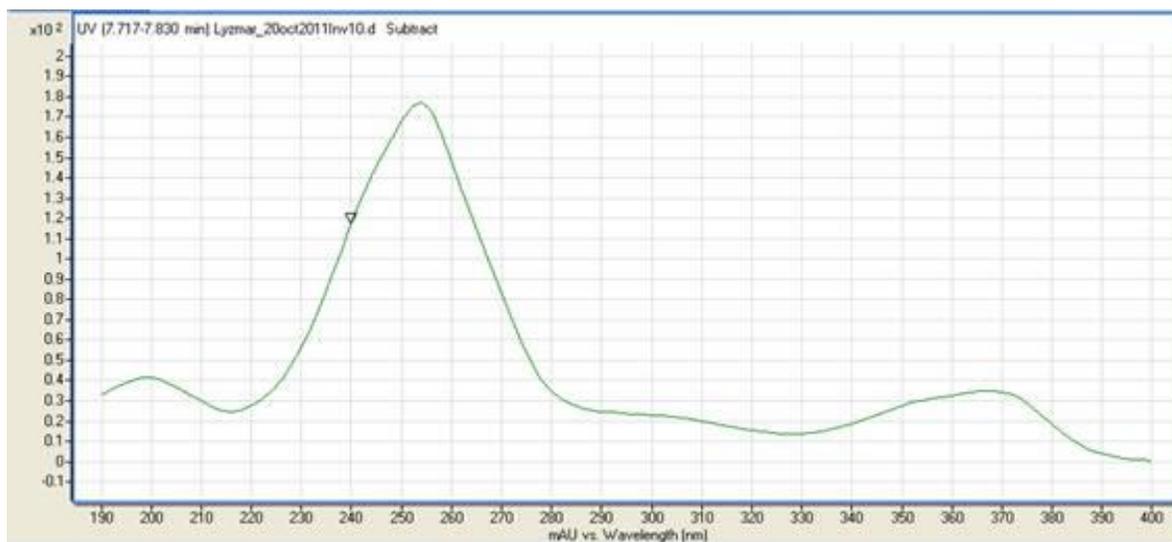


Ilustración 25: Espectro UV Obtenido para Ácido Eláxico

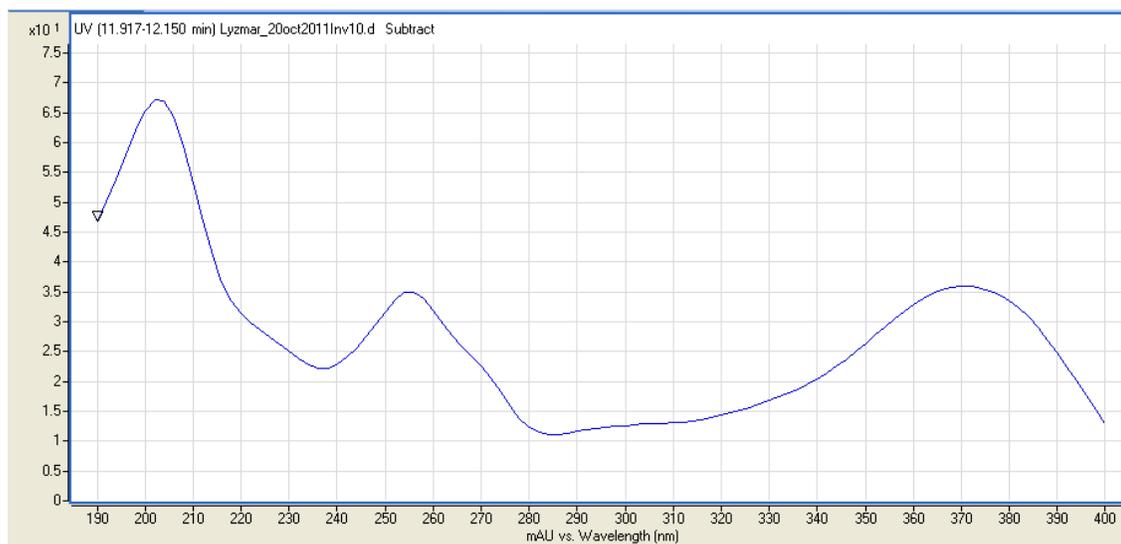


Ilustración 26: Espectro UV Obtenido para Quercetina

Tabla 2: Resultados de Cuantificación para Ácido Gálico mediante LC-MS

Clon de <i>Psidium guajava</i>	Concentración de ácido gálico (mg/g)
57-8-163	0.04
G-864	0.04
Q-241	0.05
57-10-137	0.06
57-4-30	0.06
57-6-71	0.06
57-1-28	0.06
57-7-19	0.07
57-1-42	0.07
G-447	0.08
R-258	0.08
R-264	0.09
57-2-95	0.09
M-184	0.10

La tabla 2 muestra los valores estimados de ácido gálico. Estos valores se reportan como estimados ya que el método utilizado demuestra un límite de cuantificación mayor a los valores obtenidos pero dentro de los límites de detección. El promedio obtenido para el cultivar fue de 0.07 ± 0.02 mg/g. El clon que promedio mayor concentración fue M-184 con un valor de 0.10 ± 0.04 mg/g respectivamente (ver apéndice de varianza # 5). Esta variabilidad continúa su tendencia en los otros análisis realizados. El valor promedio máximo obtenido en este experimento fue de 0.10 mg/g lo cual está por debajo de los valores reportados. Según estudios previos de Chen y Yen, 2006 estos identificaron y cuantificaron ácido gálico en hojas y fruta seca de guayaba. Los valores van en un rango de 0.266 mg/g hasta 1.621 mg/g. Por otro lado Nantitanon y colaboradores (2010) reportaron valores entre 0.93 mg/g y 2.43 mg/g dependiendo del solvente de extracción. Esta diferencia en valores puede ser

debido a varios factores entre estos: técnica de extracción, material genético, condiciones climáticas, la fertilización, la posición de la hoja entre otras (Vargas-Alvares et al., 2006, Mamati et al 2006 y Ojeda, 2007).

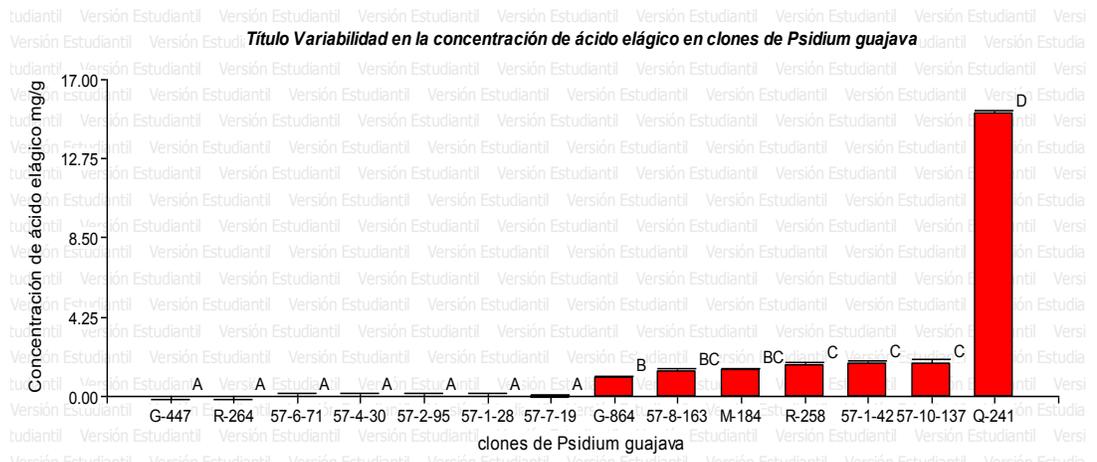


Ilustración 27: Variabilidad en la Concentración de Ácido Elálgico en Clones de Psidium guajava

En la cuantificación de ácido elálgico se pudo observar mayor variabilidad (ver ilustración 27) por muestra en un rango promedio que va de no detectados hasta $15.18 \pm 1.13 \text{mg/g}$ y un promedio total de $3.76 \pm 0.12 \text{mg/g}$. El clon con mayor cuantificación en esta ocasión fue Q-241 con un valor de $15.18 \pm 1.13 \text{mg/g}$. La concentración promedio obtenida en los clones de guayaba en este estudio fue de $3.76 \pm 0.12 \text{mg/g}$ de ácido elálgico lo cual está acorde a lo reportado en literatura. En un estudio realizado por Nantitanon y colaboradores (2010) se reportaron valores que van desde 2.61mg/g hasta 17.51mg/g dependiendo el solvente de extracción. Otros estudios solo identifican la presencia del compuesto en las hojas de guayaba como Masuda y colaboradores (2003). La variabilidad entre los clones puede deberse a factores como: irrigación, fertilización, iluminación, condiciones atmosféricas, estrés del árbol, factores genético, entre otros.

Tabla 3: Cuantificación de Rutina

Clon de <i>Psidium guajava</i>	Concentración de Rutina (mg/g)
57-8-163	ND
G-864	ND
Q-241	ND
57-10-137	ND
57-4-30	ND
57-6-71	ND
57-1-28	ND
57-7-19	ND
57-1-42	ND
G-447	ND
R-258	ND
R-264	ND
57-2-95	ND
M-184	ND

La tabla 3 muestra los clones en los cuales no se detectó o identificó el polifenol rutina. Quian y Nihorimbere, 2004 solo identifican el compuesto como presente en la hoja de la guayaba no lo cuantificaron. Sin embargo Liang y colaboradores (2005) no encontraron rutina en extractos de hoja de guayaba.

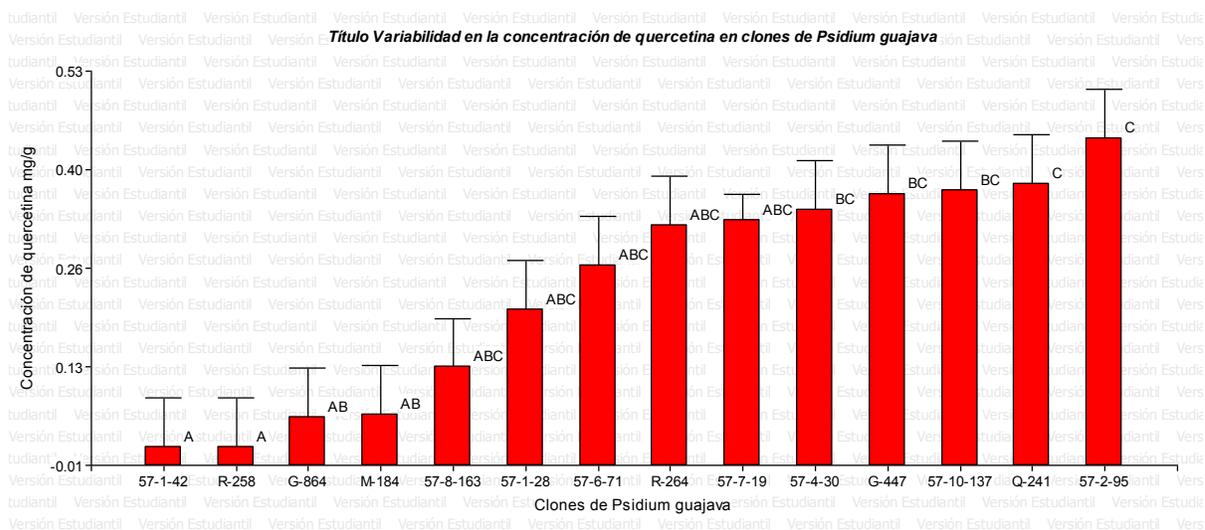


Ilustración 28: Variabilidad en la Concentración de Quercetina en Clones de Guayaba

La ilustración 28 nos muestra que el contenido de quercetina varió según el clon analizado (ver análisis de varianza # 4 en el apéndice B). El promedio total para el compuesto fue de $0.25 \pm 0.08 \text{ mg/g}$. Las muestras que mostraron mayores valores fueron Q-241 y 57-2-95 con valores promedios de $0.38 \pm 0.06 \text{ mg/g}$ y $0.44 \pm 0.11 \text{ mg/g}$. La concentración máxima obtenida en los clones de guayaba en este estudio fue de 0.44 mg/g , representando valores cercanos a los publicados en estudios previos. Algunos valores reportados en la literatura incluyen: 11.07 mg/g - 12.25 mg/g (Nantitanon et al., 2010), 1.236 mg/g (Vargas –Álvarez et al., 2006), 1.09 mg/g (Toyoda et al., 1997) y 0.13 mg/g (Arima y Danno, 2002) en la hoja de la guayaba. Los compuestos pueden variar dependiendo del nivel de estrés de los clones, la irrigación, terreno (Vargas-Álvarez et al. 2006), condiciones atmosféricas y/o técnicas experimentales.

3.3 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES EN LA HOJA DE LA GUAYABA

La concentración de fenoles totales en la hoja de la guayaba recuperados de la fase acuosa de limpieza reportó un promedio de $2.6 \pm 0.3 \text{ mg/gGAE}$ (ver tabla 4). La muestra que resultó con la mayor concentración de fenoles en la fase acuosa fue el clon M-184 que reportó una media de $3.89 \pm 0.35 \text{ mg/gGAE}$. Por otro lado la muestra que menor cantidad de fenoles obtuvo fue la 57-7-19 con una media de $1.79 \pm 0.46 \text{ mg/gGAE}$ (ver ilustración 29).

Tabla 4 Concentraciones (mg/g) de Fenoles Totales en Extracto Acuoso

Muestra	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5	Concentración 6	Concentración 7	Concentración 8	Concentración 9	Concentración Promedio	DV
Q-241	2.8	2.9	2.7	2.8	2.8	2.5	3.3	3.6	2.3	2.9	0.4
57-4-30	1.6	1.6	1.6	2.0	2.4	2.1	2.1	2.0	2.0	2.0	0.3
Q-241	2.9	2.5	2.5	2.4	2.4	2.4	2.7	2.7	2.8	2.6	0.2
57-6-71	4.0	4.4	3.5	3.3	2.3	2.5	2.3	2.1	2.3	3.0	0.8
57-10-137	2.9	2.8	2.9	4.1	4.1	4.3	3.7	3.7	3.9	3.6	0.6
G-864	3.3	3.5	3.9	3.6	3.2	3.3	3.3	3.5	3.3	3.4	0.2
57-7-19	2.3	2.3	2.3	1.9	2.0	1.8	2.0	2.0	2.0	2.1	0.2
G-864	2.8	2.8	2.8	2.9	2.8	2.9	2.7	2.7	2.5	2.8	0.1
R-258	3.6	3.5	3.5	3.2	3.3	2.8	2.5	2.5	2.5	3.1	0.4
57-1-28	2.3	2.3	2.3	2.9	3.3	3.5	2.1	2.1	2.1	2.6	0.5
R-264	3.1	2.5	2.8	2.3	2.4	2.3	2.3	2.3	2.4	2.5	0.3
M-184	3.9	4.0	3.9	3.7	3.9	4.6	4.4	4.3	4.3	4.1	0.3
57-4-30	2.5	2.5	2.8	2.7	2.7	2.7	2.9	3.1	3.1	2.8	0.2
R-264	2.1	2.1	2.4	2.1	2.1	2.1	2.4	2.4	2.3	2.2	0.1
57-2-95	2.7	2.8	2.4	2.3	2.3	2.1	2.1	2.1	2.3	2.4	0.2
57-1-28	2.5	2.7	2.8	3.1	3.2	2.8	2.9	2.8	2.9	2.9	0.2
57-1-42	3.1	2.5	2.7	2.8	2.5	2.5	2.9	2.9	2.8	2.8	0.2
57-8-163	3.5	3.7	3.5	3.5	3.5	3.5	3.6	3.3	4.1	3.6	0.2
G-447	3.7	4.1	3.7	3.3	2.7	3.2	3.7	4.3	3.9	3.6	0.5
57-8-163	4.1	4.0	2.8	3.3	3.3	3.1	3.2	2.8	2.9	3.3	0.5
57-6-71	2.3	2.1	2.3	2.3	2.9	2.3	2.4	2.3	2.3	2.4	0.2
M-184	3.6	3.6	4.0	4.3	3.3	3.6	3.6	3.6	3.6	3.7	0.3
R-258	2.7	2.8	2.9	2.8	2.9	2.8	2.8	2.8	2.9	2.8	0.1
57-10-137	3.2	3.3	3.3	2.9	2.8	2.9	2.8	2.7	2.9	3.0	0.2
G-447	2.2	2.3	2.2	2.3	2.0	2.0	2.0	1.9	1.9	2.1	0.1
57-1-42	2.2	2.0	2.2	2.3	2.0	2.0	2.3	1.9	1.9	2.1	0.1
57-2-95	1.6	2.4	1.5	1.9	2.4	1.9	1.8	1.8	2.2	2.0	0.3
57-7-19	3.0	2.2	2.2	2.4	2.2	2.3	2.0	1.9	1.8	2.2	0.3
57-7-19	1.5	1.5	1.5	1.8	2.0	2.2	1.6	1.8	2.3	1.8	0.3
57-7-19	2.0	2.3	2.2	1.4	1.5	1.4	1.0	1.0	1.3	1.6	0.5
57-7-19	1.5	1.3	1.4	1.5	1.4	1.1	1.1	1.3	1.4	1.3	0.1
57-7-19	1.6	1.4	1.6	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4	1.5	1.4	0.1
57-7-19	1.8	1.8	1.8	1.5	1.8	1.9	2.8	3.1	2.4	2.1	0.6
promedio total										2.6	0.3

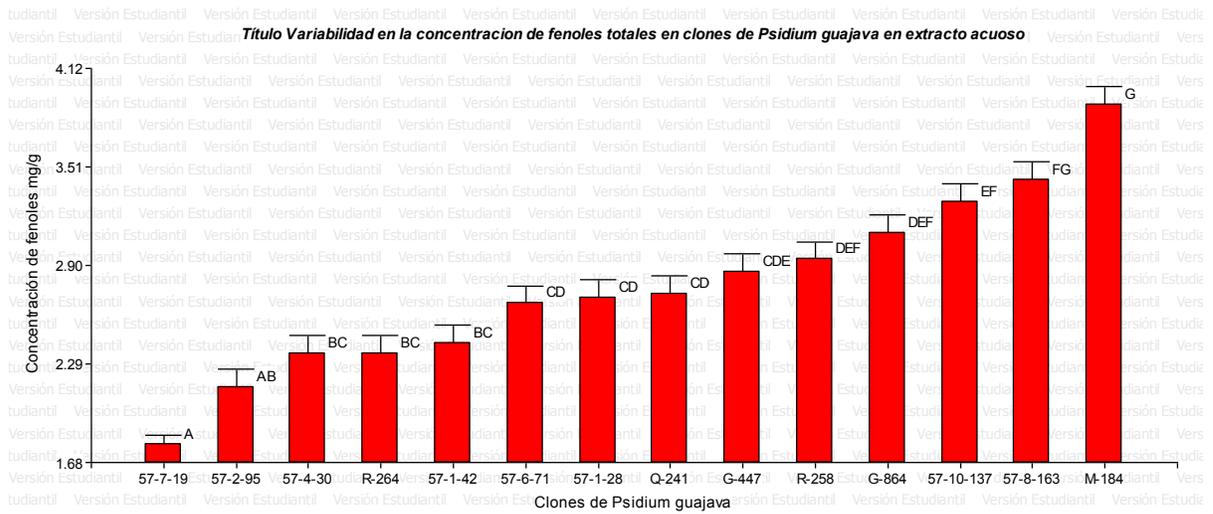


Ilustración 29: Variabilidad en la Concentración de Fenoles Totales en Clones de *Psidium guajava* en extracto Acuoso

La variabilidad de las muestras en la fase metanólica también fue significativa (ver ilustración 30). Además se puede ver que la tendencia de la muestra M-184 como la muestra con mayor contenido de compuestos fenólicos. En esta ocasión la muestra arrojó un contenido total de fenoles promedio de $118.4 \pm 5.7 \text{ mg/g GAE}$ (ver análisis de varianza 2 en apéndice B). La concentración promedio total de las muestras fue de $107.6 \pm 5.3 \text{ mg/g GAE}$ (ver tabla 6). Estudios realizados reportan los siguientes valores: $166 \text{ mg/g GAE} - 483 \text{ mg/g GAE}$ (Chen y Yen, 2006) y $80.28 \text{ GAE} - 136.02 \text{ mg/g GAE}$ (Nantitanon et al., 2010). Por lo tanto, podemos concluir que los valores obtenidos en los análisis realizados a las extracciones de hojas de guayaba en los clones analizados van acorde a la literatura citada. Estos valores en comparación con las hojas de noni son mayores pero, respecto al té verde y negro menores aunque ciertas variedades cuantifican igual o menor que la hoja de la guayaba (ver tabla 5).

Tabla 5: Fenoles Totales en Té Verde, Té Negro y Noni

Muestra	Fenoles Totales mg/gGAE	Referencia
Ahmad té verde	196	Hajimahmoodi et al 2008
Avicen té verde	30	Hajimahmoodi et al 2008
Camellia té verde	108	Hajimahmoodi et al 2008
Chinas té verde	160	Hajimahmoodi et al 2008
Armaghane té verde	91	Hajimahmoodi et al 2008
Té negro	80.5-134.9	Khokhar y Magnusdottir, 2002
hojas jovenes de noni	14.6	Yang et al.,2011
hojas adulta de noni	16.1	Yang et al.,2011
hojas maduras de noni	15	Yang et al.,2011

Tabla 6: Concentraciones de Fenoles Totales en Extractos Metanólicos

Muestra	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5	Concentración 6	Concentración 7	Concentración 8	Concentración 9	Concentración Promedio	DV
Q-241	108.8	100.6	99.1	120.1	111.4	110.1	110.7	104.3	107.0	108.0	6.3
57-4-30	114.1	108.5	106.7	109.6	107.2	109.9	114.9	108.8	109.6	109.9	2.8
Q-241	113.5	110.7	107.0	114.1	105.9	105.4	92.0	93.5	92.0	103.8	9.0
57-6-71	96.7	101.2	99.9	83.8	80.6	78.0	97.0	100.4	96.4	92.7	9.2
57-10-137	111.2	109.6	108.8	109.3	105.9	107.0	105.6	101.4	102.8	106.8	3.3
G-864	132.5	135.9	128.6	102.8	106.7	106.2	102.5	100.1	102.0	113.0	14.7
57-7-19	105.4	104.6	103.3	104.6	106.7	100.1	99.3	102.2	105.4	103.5	2.5
G-864	102.0	99.6	103.5	98.8	99.6	96.2	99.9	99.9	97.0	99.6	2.3
R-258	85.9	81.2	80.6	103.0	107.2	108.0	104.1	105.1	104.9	97.8	11.6
57-1-28	108.5	107.5	101.7	106.4	103.3	103.5	110.4	110.9	112.5	107.2	3.8
R-264	113.0	112.0	116.2	113.5	114.1	113.3	109.6	103.5	96.4	110.2	6.3
M-184	118.6	112.8	108.5	120.7	112.0	114.3	117.5	113.8	110.9	114.3	3.9
57-4-30	122.0	120.9	118.0	122.5	114.6	115.4	121.1	113.4	110.0	117.5	4.4
R-264	111.8	112.1	106.3	103.1	108.4	106.8	101.8	100.8	98.4	105.5	4.8
57-2-95	110.3	102.6	97.6	113.4	111.6	111.8	106.8	101.8	106.0	106.9	5.4
57-1-28	103.4	110.5	117.1	103.1	104.2	103.4	104.2	97.9	101.3	105.0	5.6
57-1-42	95.0	97.1	95.0	82.9	100.8	106.0	103.4	96.6	94.5	96.8	6.6
57-8-163	120.3	116.1	114.5	120.3	115.5	112.9	123.4	129.7	125.8	119.8	5.7
G-447	98.1	99.2	97.6	110.3	100.0	106.6	93.9	93.4	100.3	99.9	5.5
57-8-163	108.7	107.6	110.5	106.8	107.4	106.0	101.3	108.2	108.4	107.2	2.6
57-6-71	114.2	110.8	118.2	105.5	107.4	103.4	114.2	105.8	114.7	110.5	5.1
M-184	124.2	131.3	123.4	120.2	123.6	121.5	121.2	119.4	116.7	122.4	4.1
R-258	99.6	97.2	96.2	107.0	101.5	101.5	104.9	104.1	104.9	101.9	3.7
57-10-137	136.5	135.2	132.0	125.7	124.1	126.2	112.5	110.2	110.4	123.6	10.4
G-447	114.6	116.2	117.8	115.7	113.8	110.9	116.2	111.7	117.8	115.0	2.4
57-1-42	98.3	93.0	95.9	98.3	95.9	98.3	94.6	97.5	98.8	96.8	2.0
57-2-95	110.7	117.3	118.8	108.8	112.5	111.7	98.6	99.6	103.6	109.1	7.2
57-7-19 Dia 1	107.8	111.5	112.0	111.7	112.8	109.4	113.0	114.1	117.5	112.2	2.8
57-7-19 Dia 2	96.2	95.1	98.6	115.4	113.8	115.7	109.4	105.4	110.7	106.7	8.2
57-7-19 Dia 3	98.8	96.5	101.2	98.8	107.3	110.2	106.2	105.1	102.0	102.9	4.6
57-7-19 Dia 4	106.7	100.4	108.8	107.8	106.2	105.7	104.6	116.5	109.6	107.4	4.3
57-7-19 Dia 5	107.8	115.9	112.3	108.8	109.6	110.4	112.8	108.3	112.8	111.0	2.7
57-7-19 Dia 6	106.7	104.6	104.9	104.4	102.0	107.0	106.7	105.7	104.4	105.1	1.6
concentración promedio total										107.6	5.3

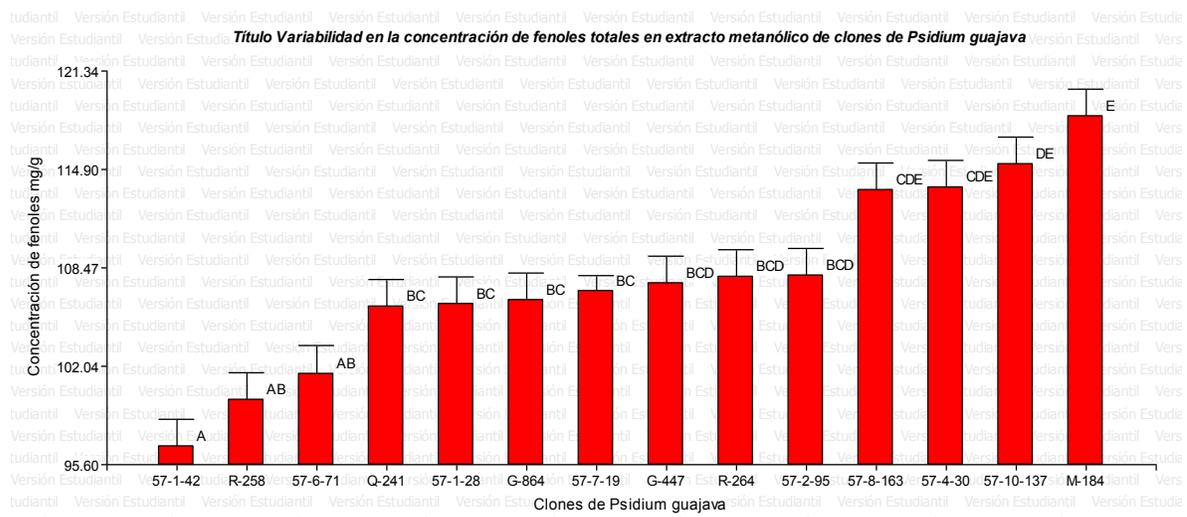


Ilustración 30: Variabilidad en la Concentración de Fenoles Totales en Extracto Metanólico de Clones de *Psidium guajava*

3.4 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA HOJA DE LA GUAYABA

La actividad antioxidante en la hoja de la guayaba recuperada de la fase acuosa de limpieza reportó un promedio de $0.73 \pm 0.10 \mu\text{molTE/g}$ existiendo diferencias significativas entre los clones analizados (ver ilustración 31 y análisis de varianza #6 en el apéndice B). Las muestras que resultaron con la mayor actividad antioxidante en la fase acuosa fueron los clones M-184 y 57-10-137 que reportaron medias de $0.83 \pm 0.16 \mu\text{molTE/g}$ y $0.83 \pm 0.18 \mu\text{molTE/g}$, respectivamente. Por otro lado, la muestra que menor actividad antioxidante obtuvo fue el clon 57-4-30 con una media de $0.60 \pm 0.15 \mu\text{molTE/g}$.

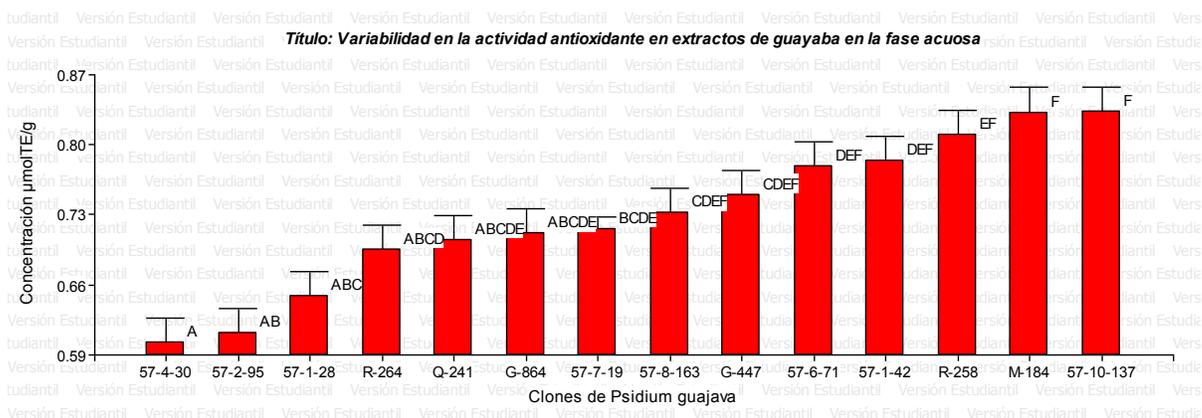


Ilustración 31: Variabilidad en la actividad antioxidante en extractos de guayaba en la fase acuosa

La actividad antioxidante en la hoja de la guayaba recuperada de la fase metanólica reportó un promedio de $38.01 \pm 15.23 \mu\text{molTE/g}$. La muestra que resultó con la mayor actividad antioxidante en la fase metanólica fue el clon 57-8-163 que reportó medias de $53.41 \pm 12.14 \mu\text{molTE/g}$. Por otro lado, la muestra que menor cantidad de actividad antioxidante obtuvo fue el clon M-184 con una media de $22.92 \pm 4.96 \mu\text{molTE/g}$ (ver ilustración 32 y análisis de varianza #7 en el apéndice B). Esta variabilidad entre muestra puede deberse a factores ya antes mencionados como: la técnica de extracción, genética, condiciones climáticas, etc. En adición a esto la variabilidad presentada en la cuantificación de los compuestos antioxidantes: ácido gálico, rutina, ácido elágico y quercetina por LC-MS juega un papel importante, ya que la presencia de estos y otros compuestos presentes en la muestra define la capacidad antioxidante de cada clon. Como mencionado anteriormente, el clon M-184 resultó ser el clon con mayor cantidad de ácido gálico y compuestos fenólicos, sin embargo presentó la menor capacidad antioxidante.

No todos los compuestos fenólicos poseen capacidad antioxidante, esto podría explicar entonces la variabilidad en los resultados observados entre la prueba de fenoles totales y la prueba de ORAC para el clon M-184. Por otro lado la capacidad antioxidante promedio obtenida para los clones de guayaba resultó ser menor en comparación con algunos extractos de té analizados por Henning y colaboradores (2003) (ver tabla 7). Si comparamos el resultado de ORAC para el clon 57-8-163 con otras veintinueve plantas aromáticas analizadas por Zheng y Wang (2001) (ver tabla 13 en el apéndice E) encontramos que nuestros valores son similares a otros extractos analizados por estos investigadores ($36.57\mu\text{molTE/g}$ peso fresco).

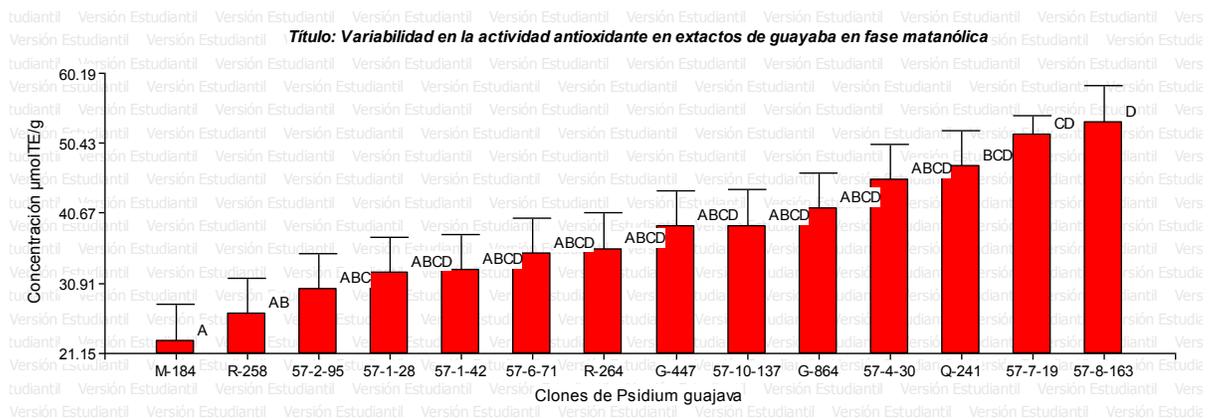


Ilustración 32: Variabilidad en la actividad antioxidante en extractos de guayaba en la fase metanólica

Tabla 7: Valores ORAC para diferentes extractos de té

Marca del té	$\mu\text{mol/g}$
Green Tea Supplementb	3461
Celestial Seasonings Authentic Green Tea	1686
Bigelow Green Tea	1477
Uncle Lee's Green Tea	1477
Lipton Black Tea	1372
Salada Green Tea Earl Green	1250
Lipton Green Tea	1239
Wissotzky Earl Grey	1205
Bigelow English Tea Time	1189
Bigelow Darjeeling Blend	1079
Sweet Touch NEE Black Tea	967
Twinnings English Breakfast Tea	845
Celestial Seasonings Decaf	935
Mandarin Orange	
Twinning Irish Breakfast	811
Snapple Peach Ice Teac	790
Stash Premium Green Tea Decaf	765
Bigelow Constant Comment	757
Twinnings Earl Grey Black Tea	728
Bigelow Constant Comment Decaf	618
Lipton Lemon Ice Teac	609
Bigelow English Tea Time Decaf	507

Extraído de: Henning et al., 2003

4 Conclusiones

- Se logró identificar y cuantificar los compuestos ácido gálico, ácido elágico, y quercetina en extractos de té de guayaba acorde a la literatura, lo que permitió cumplir con uno de nuestros objetivos la identificación y cuantificación de estos en el té de guayaba para los catorce clones analizados.
- Se encontraron diferencias entre las cuantificación encontradas de estos compuestos y resultados reportados en la literatura que podría ser debido a la técnica de extracción. En adición la biosíntesis de los compuestos polifenólicos pueden variar por factores como: genotipos, cambios estacionales, edades y daños de la hoja, sitios de ubicación, material genético, incidencia de luz, características edáficas, irrigación (Vargas- Álvarez et al., 2006), restricciones o estrés de diversa índole, grado de inducción de la infección, de la fertilización nitrogenada, temperatura (Ojeda, 2007) y madures de la hoja (Mamati et al., 2006).
- La cantidad de fenoles totales en la infusión de guayaba concuerda con la literatura citada lo cual representa una recuperación de fenoles hábiles para el consumo; representando así, la infusión de guayaba una fuente alterna como fuente de antioxidantes en adición a las frutas y vegetales.
- La actividad antioxidante en la hoja de la guayaba recuperada de la fase acuosa reportó un promedio de $0.73 \pm 0.10 \mu\text{mol TE/g}$ en la fase acuosa y $38.01 \pm 15.23 \mu\text{mol TE}$ en la fase metanólica. En ambos extracto se observó diferencias significativas en

los clones analizados que esta ligada a la variabilidad en el contenido de compuestos fenólicos y la actividad de esos compuestos fenólicos.

- La identificación y cuantificación de compuestos polifenólicos en la infusión de catorce clones de guayaba podría impactar el área agroindustrial del país proveyendo: una opción para la comercialización del té ya sea en su estado sólido o la innovación del producto listo para el consumo, elección del mejor clon para infusiones de guayaba y la utilización de material orgánico (hojas maduras y residuos de poda) que se consideran desechos.

5 Recomendaciones

- Se recomienda el uso del Clon 57-8-163 para propósitos de producción de hojas para infusiones de guayaba ya que fue el clon que mayor actividad antioxidante.
- Evaluar la actividad antimicrobiológica de estos compuestos en la infusión de guayaba podría revelar su poder contra diversos organismos patogénicos; lo cual es de gran interés en la industria de alimentos.

6 REFERENCIAS

- Agramonte-Saba C. 2010. Alimentos Nutraceuticos. A tu Salud Magazine. Recuperado el día 7 de diciembre de 2011. Tomado del sitio Web: <http://claudiaagramonte.blogspot.com/2010/05/alimentos-nutraceuticos.html>
- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. a, Favela-Torres, E., y Aguilar, C. N. 2008. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(2), 189-99. doi:10.1007/s00253-007-1276-2
- Aiyegoro, O. a, y Okoh, A. I. 2009. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*. *International journal of molecular sciences*, 10(11), 4990-5001. doi:10.3390/ijms10114990
- Akowuah G. A., Mariam A. y Chin J.H. 2009. The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. *Phcog Mag*, 5(17), 81-85.
- Alonso-Salces, R. M., Barranco, A., Corta, E., Berrueta, L. a, Gallo, B., & Vicente, F. 2005. A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues Comparison with pressurised liquid extraction. *Talanta*, 65(3), 654-62. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.051
- Al-Reza, S. M., Bajpai, V. K., y Kang, S. C. 2009. Antioxidant and antilisterial effect of seed essential oil and organic extracts from *Zizyphus jujuba*. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(9), 2374-80. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.fct.2009.06.033
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). 1996. La Guayaba* Mercado Mundial de la Guayaba 1996 Ubicación de México. Tomado del sitio Web: <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/modelos/Cadenas/guayaba/mercint.pdf>
- Ardrey R.A. 2003. *Liquid Chromatography –Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd., 471pp.
- Arima, H., y Danno, G.-ichi. 2002. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(8), 1727-30. Recuperado del sitio Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353635>
- Belemtougri, R. G., Constantin, B., Cognard, C., Raymond, G., y Sawadogo, L. 2006. Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells in primary culture. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 7(1), 56-63. doi:10.1631/jzus.2006.B0056

- BimSiframGroup. MSDS (material safety data sheet) for rutin. Recuperado el día 10 de diciembre de 2011. Tomado del sitio Web: http://www.bimsifram.fr/rutin/msds_for_rutin.htm
- CDC. 2007. Cáncer. Recuperado el día 6 de diciembre del 2011. Tomado del sitio Web: <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/dpcp/data/women.htm>
- CDC. 2004. Toques de luz: El tabaquismo entre adultos: enfermedades coronarias y accidentes cerebrovasculares. Recuperado el día 1ro de abril del 2008. Tomado del sitio Web: http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/2004/highlights/espanol/heart_disease/
- Chen, H.-Y., y Yen, G.-C. 2006. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*, 101(2), 686-694. doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.047
- Coffee and Tea Co uk. Longer Infusion Time Increases Black Tea Benefits. Recuperado el día 7 de diciembre de 2011. Tomado del sitio Web: <http://www.coffee-tea.co.uk/infusion-benefits.php>
- De Rosa, J.F. 1998. Estado Actual de la Terapéutica Antioxidante: Oxidación y Antioxidación. *Rev Fed Arg Cardiol* 27: 496-498.
- Departamento de Agricultura de Puerto Rico. 2009-2010. Distribución del Valor de la Producción Agrícola 2009/10 en Orden de Importancia Económica. Recuperado el día 6 de diciembre de 2011. Tomado del sitio Web: <http://www2.pr.gov/agencias/Agricultura/estadisticas/Documents/Estadisticas/Distribucion%20del%20Valor%20de%20la%20Produccion%20Agricola%202009-10%20en%20Orden%20Importancia%20Economica.pdf>
- Dopico-García, M. S., Valentão, P., Guerra, L., Andrade, P. B., y Seabra, R. M. 2007. Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white “Vinho Verde” grapes. *Analytica chimica acta*, 583(1), 15-22. doi:10.1016/j.aca.2006.09.056
- FAO, 2006. Tomado del sitio web: <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ae620s/Pfrescos/GUAYABA.HTM>
- FDA Overview Glossary of Terms. Antioxidant. Recuperado el día 6 de diciembre de 2011. Tomado del sitio Web: http://www.emedicinehealth.com/fda_overview/glossary_em.htm
- González, E.A., Coria-Cayupán, Y.S., y Nazareno M.A. 2010. Efecto de distintos tratamientos de conservación en la actividad antirradicalaria de alcaparras (*Capparis*

- spinosa L.) cultivadas en Santiago del Estero, Argentina. *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.* 1(1):047-057.
- Hajimahmoodi, M., Hanifeh, M., Oveisi, M. R., Sadeghi, N., & Jannat, B. 2008. Determination Of Total Antioxidant Capacity Of Green Teas By The Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay. *Food Chemistry*, 5(3), 167-172.
- Harris, C. S., Burt, A. J., Saleem, A., Le, P. M. A. I., Martineau, L. C., Haddad, P. S., Bennett, S. A. L., y Arnason J. T. 2007. A Single HPLC-PAD-APCI / MS Method for the Quantitative Comparison of Phenolic Compounds Found in Leaf , Stem , Root and Fruit Extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochemical Analysis*, 169(January), 161-169. doi:10.1002/pca.970
- Haytowitz D. B. y Bhagwat S. 2010. USDA Database for the Oxygen Radical. Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. Recuperado el día 7 de diciembre de 2011. Tomado del sitio web: http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/ORAC/ORAC_R2.pdf
- Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. a, Go, V. L. W., y Heber, D. 2003. Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutrition and cancer*, 45(2), 226-35. doi:10.1207/S15327914NC4502_13
- Hsieh, C.-L., Huang, C.-N., Lin, Y.-C., y Peng, R. Y. 2007. Molecular action mechanism against apoptosis by aqueous extract from guava budding leaves elucidated with human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8523-33. doi:10.1021/jf071858b
- Huang D., Boxin O. y Prior R.L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856
- Huang, J., y Zhang, Z. 2004. Microwave-assisted extraction of quercetin and acid degradation of its glycosides in *Psidium guajava* leaves. *Analytical sciences* : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry, 20(2), 395-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055975>
- Javanmardi, J. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83(4), 547-550. doi:10.1016/S0308-8146(03)00151-1
- Kalra, E. K. 2003. Nutraceutical--definition and introduction. *AAPS pharmSci*, 5(3), E25. doi:10.1208/ps050325
- Khokhar S. y Magnusdottir S. G. M. 2002. Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (3), 565–570

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726-732. doi:10.1590/S0101-20612005000400016
- Lakhanpal, P., y Rai, D. K. 2007. Quercetin □ : A Versatile Flavonoid. *Knowledge Creation Diffusion Utilization*, 2(2).
- Larson, A. J., Symons, J. D., y Jalili, T. 2010. Quercetin: A Treatment for Hypertension?—A Review of Efficacy and Mechanisms. *Pharmaceuticals*, 3(1), 237-250.
- Leighton F., Urquiaga I. y Diez M. 1997. Propiedades Antioxidantes Del Vino y sus Componentes. Recuperado el día 1 de octubre del 2007. Tomado del sitio Web: <http://www.google.com/search?q=cache:XX4ebXGkypoJ:www.bio.puc.cl/vinsalud/publica/oiv.doc>
- Leighton, F. 2000. Polifenoles Vegetales, Ciencia y Bienestar. *Biol. Res.*, vol.33, no.2, p.6-6. ISSN 0716-9760.
- Liang, Q., Qian, H., y Yao, W. 2005. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)*. doi:10.1255/ejms.710
- Liu, Z., Schwimer, J., Liu, D., Greenway, F. L., Anthony, C. T., y Woltering, E. a. 2005. Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 3909-15. doi:10.1021/jf048585u
- Mahattanatawee, K., Manthey, J. A., Luzio, G., Talcott, Stephen T, Goodner, K., y Baldwin, E. A. 2006. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(19), 7355-63. doi:10.1021/jf060566s
- Malo S.E., Campbell C.W., Balerdi C.F., y Crane J.H. 2005. La Guayaba en Florida (UF/IUFAS). HS1033 Fecha de primera publicación: 1994. Repasado Octubre 30, 2005, 1-3pp
- Mamati, G. E., Liang, Y., & Lu, J. 2006. Expression of basic genes involved in tea polyphenol synthesis in relation to accumulation of catechins and total tea polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 459-464. doi:10.1002/jsfa.2368
- Masuda, T., Inaba, Y., Maekawa, T., Takeda, Y., Yamaguchi, H., Nakamoto, K., Kuninaga, H., Nishizato, S., y Nonaka, A. 2003. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of

- antiradical plant constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(7), 1831-8. doi:10.1021/jf026112m
- Miean, K. H., y Mohamed, S. 2001. Apigenin Content of Edible Tropical Plants. *Screening*, 3106-3112.
- Mullen, W., Yokota, T., Lean, M., y Crozier, A. 2003. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSn. *Phytochemistry*, 64(2), 617-624. doi:10.1016/S0031-9422(03)00281-4
- Murillo E. 2002. Actividad Antioxidante de Bebidas de Frutas y de Te Comercializadas en Costa Rica. Recuperado el día 10 de Octubre de 2010. Tomado del sitio web: http://fifco.com/estudio_antioxidantes.htm
- Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., y Okonogi, S. 2010. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1095-1103. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.lwt.2010.02.015
- Ojeda H. 2007. Los compuestos fenólicos de la uva. *Revista Enologia* N4, 1-11pp
- Payán-Gómez, S.A., Flores-Holguín, N., Pérez-Hernández, A., Piñón-Miramontes, M. y Glossman-Mitnik, D. 2010. Computational molecular characterization of the flavonoid rutin. *Chemistry Central Journal*, 4:12
- Pérez-Gutiérrez R. M., Mitchell S. y Vargas Solis R. 2008. Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(1), 1-27
- Portillo A. 2001. Plantas Medicinales y Drogas Vegetales Guayabo Psidium guajava L. (Mirtáceas) Unidad de Farmacología y Farmacognosia. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona OFFARM, 191-192pp
- Qian, H., y Nihorimbere, V. 2004. Antioxidant power of phytochemicals from Psidium guajava leaf. *Journal of Zhejiang University. Science*, 5(6), 676-83. Recuperado del sitio Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15101101>
- Rajkumar, V., Guha, G., Kumar, R. A., y Mathew, L. 2010. Evaluation of Antioxidant Activities of *Bergenia ciliata* Rhizome. *Methods*, 1, 38-48.
- Rivera-Arce, E., Gattuso, M., y Lozoya, X. 2003. Anatomical Identity Parameters of the Crude Drug *Psidium guajavae* folium. *Pharmaceutical Biology*, 41(7), 516-521. doi:10.1080/13880200308951346
- Rodríguez, L.E. y Quintero, R. 1997. Estudio Farmacognóstico y Valoración del Extracto Fluido Obtenido de las Hojas de *Psidium guajava* (Guayaba). *Rev. Cubana Med*, 2(2-3), 26-29.

- Rosales-Arce, V. Psidium guajava L familia Myrtaceae. Recuperado el día 26 de enero de 2010. Tomado del sitio Web: downloads.camagro.com/CultivoDelGuayaba_MAG_CR.doc.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., y Kanazawa, K. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 571-81. doi:10.1021/jf020926l
- Samee, W., y Vorarat, S. 2007. Simultaneous Determination of Gallic acid , Catechin , Rutin , Ellagic Acid and Quercetin in Flower Extracts of Michelia alba , Caesalpinia pulcherrima and Nelumbo nucifera by HPLC. *Science*, 2(2), 131-137.
- Saracini, E., Tattini, M., Traversi, M. L., Vincieri, F. F., y Pinelli, P. 2005. Simultaneous LC-DAD and LC-MS Determination of Ellagitannins, Flavonoid Glycosides, and Acyl-Glycosyl Flavonoids in Cistus salvifolius L. Leaves. *Chromatographia*, 62(5-6), 245-249. doi:10.1365/s10337-005-0623-7
- Sciencelab. Material Safety Data Sheet Quercetin Dihydrate MSDS. Recuperado el dia 10 de diciembre 2011. Tomado del sitio Web: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924781>
- Seeram, N. P., Lee, R., Scheuller, H. S., y Heber, D. 2006. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry*, 97(1), 1-11. doi:10.1016/j.foodchem.2005.02.047
- Sohafy, S. M. E., Metwalli, A. M., Harraz, F. M., y Omar, A. A. 2009. PHCOG MAG .: Research Article Quantification of flavonoids of Psidium guajava L . preparations by Planar Chromatography (HPTLC). *Online*, 4(17), 61-66.
- Soong, Y., y Barlow, P. 2006. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (Dimocarpus longan Lour.) seed and mango (Mangifera indica L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97(3), 524-530. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.033
- Spigno, G., y De Faveri, D. M. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 210-217. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.01.006
- Stalikas, C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-95. doi:10.1002/jssc.200700261
- Tabata, H., Katsube, T., Tsuma, T., Ohta, Y., Imawaka, N., & Utsumi, T. 2008. Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, Mallotus japonicus. *Food Chemistry*, 109(1), 64-71. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.017

- Talcott, S T, Howard, L. R., y Brenes, C. H. 2000. Antioxidant changes and sensory properties of carrot puree processed with and without periderm tissue. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(4), 1315-21. Recuperado del sitio Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775391>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneroszevallos, L., y Hawkinsbyrne, D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
- Toyoda, M., Tanaka, K., Hoshino, K., Akiyama, H., Tanimura, A., y Saito, Y. 1997. Profiles of Potentially Antiallergic Flavonoids in 27 Kinds of Health Tea and Green Tea Infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2561-2564. doi:10.1021/jf970024y
- Turcotte M. 2009. Foods That Have Ellagic Acid. Recuperado el día 10 de diciembre de 2011. Tomado del sitio Web: <http://www.livestrong.com/article/70095-foods-ellagic-acid/>
- Vargas-Álvarez D., Soto-Hernández M., González-Hernández V.A., Engleman E.M., y Martínez-Galarza A. 2006. Cinética de Acumulación y Distribución de Flavonoides en Guayaba (*Psidium guajava* L.) *Agrociencias*,40:109-115.
- Vélez-Colón, R., S.A. Henríquez y R. Macchiavelli. 2003. Preliminary evaluation of guava (*Psidium guajava*) genotypes on the south coast of Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 87(3-4):149.
- Venereo Gutierrez, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil*, 31(2), 126-13
- Yang, J., Gadi, R., y Thomson, T. 2011. Antioxidant capacity, total phenols, and ascorbic acid content of noni (*Morinda citrifolia*) fruits and leaves at various stages of maturity, *Micronesica*: 41(2), 167-176
- Zenkevich, I. G., Kochetova, M. V., Larionov, O. G., y Revina, A. A. 2005. Retention Indices As the Best Reproducible Chromatographic Parameters for the Characterization of Phenolic Compounds in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 60(7), 655-667. doi:10.1007/s10809-005-0155-1
- Zheng, W., y Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5165-70.

APÉNDICE A: REVISIÓN DE LITERATURA

Tabla 8: Métodos de Extracción y Análisis de Polifenoles Mediante Cromatografía Líquida

Muestra	Análisis	Extracción	Solvente Extracción	Fase Móvil	Fase Estacionaria	Método Análisis	Detector	Referencia
hojas de guayaba	ác. gálico y ác. ferúlico	20g/500ml de agua hirviendo por 5min	agua hirviendo	[A] 0.2 M NaH ₂ PO ₄ ajustado a un pH 3.0 con ácido fosfórico y luego diluido con agua destilada hasta 500ml (6/50 ml/L NaH ₂ PO ₄ : metanol/acetnitrilo (30/20/50, v/v/v))	columna LiChrospher RP-18 (250 mm × 4 mm) i.d., 5 µm	Flujo: 1ml/min isocrático 100% A, durante 6 min; gradiente: 100% a 32% A en 8 min isocrático 32% A, durante 6 min gradiente: 92% a 82% A en 35 min gradiente: 82% a 62% A en 10 min isocrático 62% A, durante 15 min gradiente: 62% a 0% A en 10 min isocrático 0% A, durante 10 min	UV-Vis longitud de onda: 285nm	Chen et al., 2007
guayaba: Corteza Hoja joven Hoja madura Hoja senescente Botón floral Flor Fruto	miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol y apigenina	0.25 g/25 mL de HCl 1.2 M en metanol acuoso a 50%. Posteriormente se hidrolizó durante 2 h a 98 °C en refluxo.	HCl 1.2M en metanol acuoso a 50%	metanol agua acidulada con ácido trifluoroacético	columna hypersil ODS de 125 mm X 4mm y 5 µm	Flujo de 1.5 ml/min, gradiente: isocrático 35:65 metanol-agua, se usó agua acidulada a pH 2.5 con ácido trifluoroacético	DAD longitud de onda: 365 nm,	Vargas-Avarez et al., 2005
hojas de guayaba	guajarinina, quercetina, morin-3-O-α-L-xylopyranoside morin-3-O-α-L-arabopyranoside	130g(1.31x3) 90% metanol a temperatura ambiente eliminación de solvente restauraron el residuo en agua la suspensión fue extraída con n-hexano y cloroformo la fase acuosa fue extraída con acetato de etilo eliminación de solvente disolver en 400ml metanol se le añadió 350ml cloroformo y 170ml de agua al metanol se recupero la fracción superior amarilla pálida se concentro y fue disuelta en metanol acuoso 25% con 0.1% de ácido trifluoroacético	metanol al 90%	metanol al 50% y 0.1% ácido trifluoroacético	columna cosmosil 5C18-MS 10 x 250mm	Flujo 2.0ml/min	APCI MS	Anima et al., 2002
hojas de guayaba	ác. gálico, catequina, epicatequina, rutina, quercetina, naringenina y kaempferol	1parte de hoja por 10 partes de agua destilada refujo a 100°C durante 30 min. el proceso de refujo fue repetido 3 veces combinado los extractos y liofilizados	agua destilada	A: 1.5% ácido acético glacial B: acetnitrilo	columna Luna 5 µm C18(2) 250 × 4.6 mm, columna de seguridad C18 (ODS) 4 × 3.0 mm i.d.	Flujo: 1 mL/min volumen de inyección 20µl gradiente A/B (40/60) de 0 a 20 min, A/B (15/85) de 21 a 35min A/B (30/70) de 35 a 45 min	DAD arreglo de diodo 285nm	Hsieh et al., 2007
hojas de guayaba tallos de Citrus depressa y Hypericum chinense	ácido eláico	30g/250ml etanol al 99% durante 6 días a temperatura ambiente, concentrado. 25mg residuo disuelto en 2ml de metanol y pasado por SPE Sep-Pak Plus C18 cartridge lavado con 1 mL de metanol y 1 mL de acetnitrilo y el volumen final es de 4ml	etanol 99%	A: 0.1% H ₃ PO ₄ B: acetnitrilo	columna: ODS-80Ts (150 x 4.6 mm i.d.)	Flujo: 0.5ml/min gradiente: 10% B a 20%B en 20 min 20%B a 100% B en 70 min	UV-8011 longitud de onda: 254nm	Masuda et al., 2003
hojas de guayaba	ác. gálico, quercetina, ácido procatechuico, ácido clorogénico, ácido cafeico, kaempferol, ácido ferúlico	100g/300ml alcohol agua (8:1 v/v) durante 2hrs a 50°C en un agitador	alcohol agua (8:1)	A: 0.5% ácido fórmico B: metanol 80%	columna Dikma HPLC ODS (250 x 4.6mm, 5µm)	Flujo: 1 mL/min volumen de inyección 20µl isocrático: 100%A, 0-5min gradiente: 100%-0%A, 5-50min isocrático: 80%A, 50-60min	UV-largo de onda: 280nm ESI-MS flujo LC a 0.3ml/min y T a 35°C nitrógeno como gas nebulizador y cargador presión nebulizador:18psi, T gas 300°C flujo del gas 4.2L/min.T:120°C rango m/z:250-1000m/z	Liang et al., 2003
té de guayaba	miricetina, quercetina y kaempferol	5g/200ml agua destilada hirviendo aproximadamente >95 °C durante 5min con agitación leve	agua destilada >95 °C	0.5% H ₃ PO ₄ /MeOH (1/1, v/v);	pre columna Inertsil ODS-3 (C18, 4.0 x10mm, 5 µm) columna: Inertsil ODS-3 (C18, 4.5 x 250 mm, 5 µm)	Flujo: 1 mL/min. volumen de inyección 20µl temperatura de la columna: 40°C isocrático	UV largo de onda: 349nm	Toyoda et al., 1997
hojas de guayaba	ác. gálico, quercetina y ácido eláico	cuatro extracciones evaluadas 1. maceración a temperatura ambiente sin agitación durante 24 horas repetido 3 veces 2. maceración a temperatura ambiente con agitación de 200 rpm durante 24 horas repetido 3 veces 3. ultrasonicación a temperatura ambiente durante 10 min repetido 3 veces 4. extracción Soxhlet con etanol a temperatura de ebullición durante 4 horas.	agua caliente etanol acetato de etilo	A: ácido acético agua (2:98, v/v) B: ácido acético agua (0.5:99.5, v/v) con acetnitrilo (50:50, v/v)	columna Zorbax SB-C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm)	Flujo: 1ml/min volumen de inyección 20µl gradiente: a razón de B a A 0 a 1 min (0:100-5:95, v/v), 1 a 15 min (5:95-10:90, v/v), 15 a 35 min (10:90-35:65, v/v), 35 a 40 min (35:65-40:60, v/v), 40 a 55 min (40:60-55:45, v/v), 55 to 65 min (55:45-80:20, v/v) isocrático 65 a 70 min (55:45-80:20, v/v) 70 a 80 min (80:20-100:0, v/v)	UV largo de onda: 280nm	Nantanon et al., 2010
floras de Michelia alba, Casalpinia pulcherrima y Nelumbo nucifera	ác. gálico, quercetina, ácido eláico, quercetina y catequina y rutina.	sonicación 30 min repetido dos veces a una razón total de 2g/100ml	etanol 95%	A: agua:ácido acético (25:1) B: Metanol	columna Luna C18 (4.6mm x 250mm, 5 µm)	Flujo: 1ml/min volumen de inyección no lo indica gradiente: A a B 1-4min 50% B 4-14min 50%-80%B	UV largo de onda: 280nm	Samee et al., 2007
hojas, raíces, tallo y fruta de Vaccinium angustifolium Ait. (Lowbush blueberry)	isómero de ácido clorogénico procianidina B1, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogénico, procianidina B2, procianidina, quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-galactósido, quercetina 3-O-ramnósido, quercetina 3-O-rutinosido (rutin), arabinósido 3-O-arabósido, quercetina hexósido, quercetina pentósido, Kaempferol-3-O-rutinosido, quercetina	Las hojas fueron preservadas en etanol 95% luego filtradas, molidas y reextrahidas 3 veces con etanol a temperatura ambiente por 7hrs. Las cuatro fases recolectadas fueron combinadas y secadas en un rotavapor a 40°C y liofilizadas	Etanol 95%	A: agua:ácido trifluoroacético (0.05%) pH 3.4 B: metanol	Columna TMC ODS-AM (100 × 2 mm i.d., 3 µm)	T de la columna: 50°C Flujo: 0.3ml/min inyección: 1µl Gradiente: 0-5min isocrático 9%B, 5-7min 8-13%B, 7-21min 13-30%B, 21-24min 30-60%B, 24-26min 60-100%B, 26-28min isocrático 100%B PAD: monotereosido a 327nm, 280nm y 520nm MS: modo positivo y negativo, para la ionización negativa las condiciones fueron: flujo del gas 6.0L/min, presión del nebulizador 60psi, temperatura del gas 350°C, temperatura de vaporizador 400°C, voltaje capilar -3000V, modo de rastreo 100-800 amu, voltaje de fragmentación 160V	PAD y APCTMS	Harris et al., 2007

Tabla 9: Métodos de Análisis de Fenoles Totales

Muestra	Método extracción	Solvente	Método FT	Referencia
hojas secas de guayaba	20 g hervir en 500ml solvente durante 5 min.	agua	Extracto (100 µl) fueron añadido a 2 ml de 2% Na ₂ CO ₃ . Después de 2 min, se añadió a la mezcla (100 µl) 50% del reactivo Folin-Ciocalteu dejar reposar durante 30 min. Absorbancia fue medida a 750 nm en un espectrofotómetro y comparada con las curvas de ac. gálico y (+)-catequina.	Chen et al., 2006
planta secas <i>O. basilicum</i>	250mg/10ml solvente. Agitación 1 hora en oscuridad y centrifugado a 5400g por 10min. 1ml del sobrenadante fue centrifugado para secarlo a 45 °C. Cada muestra fue disuelta en 1ml de acetona previo a los análisis.	acetona 80%	Fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu adaptado por Lister y Wilson 2001. A 50µl de cada muestra, 2.5 ml reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1/10 y 2ml de Na ₂ CO ₃ (7.5%w/v) fueron añadidos e incubados a 45 °C durante 15min. La absorbancia fue medida a 765nm. Resultados expresados como mg equivalente a ac. gálico/ gr. de peso seco (mgGAE/g dw)	Javanmardi et al., 2003
hojas secas de guayaba	no menciona	H ₂ O/dalcohol etílico 50% (1:10)	Se realiza acorde al método Singleton y Rossi modificado por Hoff y Singleton usando reactivo Folin-Ciocalteu y determinar la absorbancia a 765nm. Los resultados expresados como equivalentes a ac. gálico (GAE)	Qian et al., 2004
pulpa de mora, uva, fresa, acerola, piña, mango, graviola, açai, guayaba, cupuaçu y parcha	100g se disuelven en 250ml de solvente y se diluye con etanol y agua Milli-Q. centrifugadas a 14000rpm durante 15min	agua Milli-Q	Folin Ciocalteu como reactivo una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfomolibdico en medio básico que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de Wolframio (W6O23) y Molibdeno (Mo8O23). La absorbancia de color azul desarrollado se mide a 765nm y los resultados se expresan en mg de ac. gálico por 100g de pulpa de fruto	Kuskoski et al., 2005
fruta guayaba	3 g S en 25ml de solvente homogenizado a 4°C por 12 horas luego centrifugado a 15,000 rpm durante 20min. Colectar sobrenadante extracto fue disuelto con 20ml de diclorometano y homogenizado para medir la actividad antioxidante en diclorometano	metanol	1. Mediante el método Folin-Ciocalteu adaptado por Swain y Hills 2. 150µL de extracto, 2400 µL de agua nanopura y 150 µL de reactivo Folin-Ciocalteu 0.25N fueron combinados en un frasco/ampolleta de plástico y mezclar bien usando un Vortex 3. Permitir reaccionar la mezcla durante 3min luego añadir 300 µL de solución 1N Na ₂ CO ₃ mezclar bien 4. Encubar la soln. a temp. ambiente (23 °C en oscuridad durante 2 horas 5. Medir la absorbancia a 725nm en un espectrofotómetro y expresar los resultados como equivalente ac. gálico(GAE; mg/100g masa fresca) usando una curva estándar (0.0-1mg/ml) de ac. gálico	Thaipong et al., 2006
té negro	1. Preparación convencional de infusión: 150ml de agua hirviendo fueron vertidas a 1.5g de polvo de tea y luego dejar a diferentes tiempos (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 segundos) previo al filtrado. 2. MAE: poder de microondas desde 100 a 900W. 1.5g de polvo de té en un "beaker" y se le añadió 150ml de agua destilada. El "beaker" fue expuesto a diferentes poder de microondas (450, 600 y 900W) a tiempos seleccionados (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210s). Al finalizar la exposición de calor el "beaker" es dejado durante 1min en el microondas para estabilizar la temperature y se tomo la T en el centro de la mezcla con un termómetro de mercurio para la investigación de la influencia de la razón solvente:sólido en MAE la extracción se condujo de la siguiente forma: 600W durante 120s, variando la razón agua:te desde 10-200ml/g y manteniendo la masa de te en 1.5g. reposar 1min luego del calentamiento. Filtrar y analizar.	agua hirviendo	1. Folin-Ciocalteu (Ribeau-Gayon et al 2000) 2. lectura directa de absorbancia a 280nm (Ribeau-Gayon et al 2000). Proceso rápido basado en la absorbancia del anillo aromático. La mayoría de los fenoles tiene su máximo de absorción a 280nm	Spigno et al., 2009
frutas: guayaba roja y blanca, carambola, pitaya roja y blanca, mamey sapota, sapodilla, papaya verde y madura lychee, longan, mango verde y maduro	20g de pulpa de fruta fueron homogenizados con 80ml de metanol (100%) en una licuadora (Waring commercial) durante 1 min y luego se filtro con papel de filtro Whatman no1. El residuo fue re-extraído y filtrado, luego los extractos fueron combinados y concentrados a un volumen de 40ml usando un rotavapor bajo vacío parcial a 40°C	metanol 100%	Fue realizado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu descrito por Selappan et al.	Mahattanatawee et al., 2006
semillas <i>Zizyphus jujuba</i>	100g de muestras usando diferentes solventes en forma individual a temperatura ambiente. Luego rotavapor	hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol	1. Fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu adaptado por Lister y Wilson 2001 2. Primero se utiliza ácido gálico como estándar para realizar curva de calibración 3. Diferentes concentraciones de la muestra fueron preparadas en metanol 80% 4. 100µl de la muestra fue disuelto en 500 µl (dilución 1/10) del reactivo Folin-Ciocalteu y 1000 µl de agua destilada 5. La solución fue mezclada e incubada a temperatura ambiente durante 1min 6. Luego de 1min 1500 µl de una solución de carbonato de sodio al 20% fue añadida 7. La mezcla final fue agitada y luego encubada por 2 horas en oscuridad a temp. ambiente. 8. La absorbancia de las muestras fue medida a 760nm en un espectrofotómetro 9. Resultados expresados como µg equivalentes a ácido gálico por mg peso muestra seca	Al-Reza et al., 2009
<i>B. ciliata</i> rizomas	50 g de polvo de rizoma fueron extraído usando metanol y agua como solventes en un aparato Soxhlet. La relación polvo: solvente fue mantenida 1:6. el extracto obtenido fue evaporado a secado a 40°C en presión reducida en un rotavapor (metanol:337 mbar y agua 71mbar). El extracto seco fue pesado y se determino constituyente de solvente y almacenado en un desecador al vacío	metanol y agua	1. Fue determinado por el método descrito por Lister y Wilson (2001) 2. 50µg, 100µg, 150µg, 200µg y 250µg de extracto fueron llevados hasta 0.5ml con agua destilada 3. 2.5ml de reactivo Folin-Ciocalteu (dilución 1:10) y 2ml de solución carbonato de sodio (7.5%w/v) fueron añadidos y los tubos se incubaron a 45°C durante 15min 4. La absorbancia fue leída a 765nm usando un espectrofotómetro UV-VIS Cary50 5. Ac. gálico fue usado como estándar y resultados expresados como equivalentes de ac. gálico en µg	Rajkumar et al., 2010
<i>Helichrysum pedunculatum</i> hojas	Polvo de hojas (200g) fueron extraídos agua destilada estéril (5.5L) en "shaker" durante 48 horas, filtrado, Congelación del filtrado a -40°C y secado durante 48 horas usando un liofilizador para un rendimiento de 30g de extracto seco	agua destilada estéril	1. Fue determinado con reactivo Folin Ciocalteu usando el método de Spanos, G.A.; Wrolstad, R.E. modificado por Lister, E.; Wilson, P. 2. A 0.5 ml de cada muestra (tres replicas) de solución de extracto de planta (1mg/ml) fue reconstituido en agua) se le añadió 2.5 ml de 10% reactivo Folin Ciocalteu y 2ml de Na ₂ CO ₃ (2%w/v). La mezcla fue incubada a 45°C con agitación durante 15min. La absorbancia de la mezcla fue medida a 765nm y el resultado fue expresado como miligramos de ácido gálico (0-0.5mg/ml) disueltos en agua.	Aiyegoro et al., 2009
hojas de guayaba	sonicación durante 10 min repetido 3 veces	etanol agua caliente acetato de etilo	1. Fue determinado con reactivo Folin Ciocalteu usando el método de Sato et al (1996) 2. El extracto crudo se diluyó en etanol para obtener una concentración de 0.2mg/ml 3. Se mezcló 20 µl de esta solución con 45µl del reactivo Folin Ciocalteu 4. Se dejó reposar durante 3 min. 5. Se añadió 135µl de una solución de carbonato de sodio al 2g/100ml 6. Se dejó en reposo durante 2 horas a temperatura ambiente. 7. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 750nm. Realizado en triplicado 8. Se realizó la curva de calibración usando ácido gálico desde 0 a 40mg/ml 9. Se expresó el contenido total de fenoles de la muestra como equivalentes a ácido gálico (GAE) para 1.0g de extracto.	Nantitanon et al., 2010
puré de zanahorias	muestras se trozaron se trataron para blanqueado calentando a diferentes tiempos 2 y 20 min se hicieron puré con 50ml de agua y luego se desairearon al vacío durante 40min. Luego para la extracción de fenoles usaron 50g del puré 100ml de metanol acidificado con HCl (1000:1) durante 1min. Se filtraron y se limpio el residuo con 25 ml de metanol por 3 ocasiones, se rotavaporo y se restauró en 25 ml de agua.	agua, metanol	Fue determinado por el método descrito por Howard et al. (1996)	Talcott et al., 2000

Tabla 10: Métodos de Secado

Muestra	Métodos de secado	Molido	Referencia
hojas secas de guayaba	hojas frescas fueron secadas a 40°C durante 12 hrs en un horno	pedazos de 0.5cm2	Chen et al., 2006
planta secas <i>O. basilicum</i>	secado aire forzado a 32°C durante 15 días	no especifica	Javanmardi et al., 2003
hojas de <i>Helichrysum pedunculatum</i>	secado con aire a 30°C	pulverizado no especifica	Aiyegoro et al., 2009
Corteza, botones, hojas, flores y frutos de guayaba	se secó en estufa con aire forzado (Precisión 17 GCA Corp.) a 60° por 72 h	no especifica	Vargas-Alvarez et al., 2006
hojas de <i>Psidium guajava</i> y <i>Diospyros mespiliformis</i>	secado en sombra	no especifica	Belemtougri et al., 2006
hojas de guayaba	secado en sombra	diferentes tamizado y el mas efectivo 40-60 mesh	Huang et al., 2004
hojas de guayaba	mediante diferentes técnicas sombra (23.7 días), sol (24.2 días) y estufa a 30°C (19.5 días)	no especifica	Rodríguez et al., 1997
hojas de guayaba	secador con circulación de aire a 60°C durante 12hrs	no especifica	Masuda et al., 2003
62 plantas tropicales diferentes órganos de las plantas	secado al horno a 40°C	no especifica	Miean et al., 2001
flores <i>M. alba</i> , <i>C. pulcherrima</i> and <i>N. nucifera</i>	secado a 60 °C	no especifica	Samee et al., 2007
uvas blancas	liofilizadas no especifica cuanto tiempo	no especifica si fue molido	Dopico-García et al., 2007
fresas	liofilizadas no especifica cuanto tiempo	no especifica	Seeram et al., 2006
hojas de <i>Cistus salvifolius</i>	liofilizadas no especifica cuanto tiempo	no especifica si fue molido	Saracini et al., 2005
pulpa manzana	liofilizadas no especifica cuanto tiempo	no especifica	Alonso-Salces et al., 2005
hojas de guayaba	se escaldó con agua hirviendo por 30 s; luego sumergir en agua con hielo durante 15min el secado a 50°C durante 20 horas	pulverizado no especifica	Nantitanon et al., 2010

Tabla 11: Referencia de Métodos para medir la Actividad Antioxidante

Muestra	Método Extracción	Solvente	Método AA	Referencia
hojas secas de guayaba	20 g hervir en 500ml solvente durante 5 min.	agua	ABTS donde 30 µM H ₂ O ₂ y extracto fueron añadidos a 0.1 M medio "buffer" de fosfato (pH 6.0) que contiene 0.02% ABTS y 6 unidades de peroxidasa. La absorbancia fue medida a 414 nm luego de una incubación durante 15 min a 37°C	Chen et al., 2006
planta secas O. basilicum	250mg de muestra:10ml solvente. Agitación. 1hora en oscuridad y centrifugado a 5400g por 10min. 1ml del sobrenadante fue centrifugado para secarlo a 45 °C. Cada muestra fue disuelta en 1ml de acetona previo a los análisis.	acetona 80%	Usaron el método ABTS de Miller y Rice-Evans (1996) modificado por Lister y Wilson (2001).	Javanmardi et al., 2003
hojas secas de guayaba	no menciona	H2O ditalcohol etílico 50% (1:10)	Fue realizado usando el radical estable DPPH Brand Williams et al 1995.	Qian et al., 2004
pulpa de mora, uva, fresa, acerola, piña, açai, guayaba, mango, graviola, cupuaçu y parcha	100g muestra se disuelven en 250ml de solvente y se diluye con etanol y agua Milli-Q. centrifugadas a 14000rpm durante 15min	agua Milli-Q	ABTS 1. Según RE <i>et al.</i> y descrita por KUSKOSKI <i>et al.</i> el radical ABTS+ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM, concentración final) incubado @ (±25°C) y en la oscuridad durante 16 h. 2. ABTS+ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 (±0.1) a 754 nm 3. Las muestras filtradas se diluyen con etanol hasta una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 µL de la muestra 4. A 980 µL de dilución del radical ABTS+ determinar la A 754 a 30°C, se añade 20 µL de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la A754 pasado 1 minuto. 5. medir absorbancia de forma consecutiva transcurridos 7 minutos. 6. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 µM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). DPPH Según Brand-Williamson et al., 1995 con modificaciones el método descrito por KIM et al., 2002 se mide reducción de la absorbancia a 515 nm del radical DPPH+ por antioxidantes donde radical DPPH+ 100 µM (3.9 mL) disuelto en metanol al 80%, a la longitud de onda de 517 nm. Se añade 0.1 mL de la muestra o patrón. la mezcla se homogeneiza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizan antes de añadir la muestra (A0) y pasados los 30 y 60 minutos (A1). Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (µM/g de muestra peso fresco)	Kuskoski et al., 2005
fruta: guayaba	3 g muestra en 25ml de solvente homogenizado a 4°C por 12 horas luego centrifugado a 15,000 rpm durante 20min. Colectar sobrenadante extracto fue disuelto con 20ml de diclorometano y homogenizado para medir la actividad antioxidante en diclorometano	metanol	ABTS 1. según Armao et al 2001 con algunas modificaciones 2. La solución stock incluye las soluciones 7.4mM ABTS.+ y 2.6mM persulfato de potasio. Mezcla en cantidades iguales y dejar que reaccione durante 12 horas a temperatura ambiente en oscuridad. 3. diluir la soln mezclando 1ml en 60 ml de metanol para obtener A de 1.1±0.02 a 734nm 4. 150µl de extracto de fruta se permitieron reaccionar con 2850µl de la solución ABTS durante 2 horas en oscuridad. 5. Medir absorbancia a 734nm 6. Curva estándar 25-600 µM Trolox DPPH según Brand-Williams et al. (1995) con modificaciones ORAC Acorde a Prior et al., 2003 el análisis fue conducido en un amortiguador de fosfato pH 7.4 a 37°C. El radical de peróxido fue generado usando 2, 2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride. Fluoresceín fue usado sustrato. Las condiciones de fluorescencia fueron las siguientes: excitación 485nm y emisión a 520nm. La curva fue lineal entre 0 a 50µM de Trolox y los resultados fueron expresados como µM TE/g masa fresca.	Thaipong et al., 2006
té negro	1. Preparación convencional de infusión: 150ml de agua hirviendo fueron vertidas a 1.5g de polvo de té y luego dejar a diferentes tiempos (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 segundos) previo al filtrado. 2. MAE: poder de microondas desde 100 a 900W. 1.5g de polvo de tea en un "beaker" y se le añadió 150ml de agua destilada. El "beaker" fue expuesto a diferentes poder de microondas (450, 600 y 900W) a tiempos seleccionados (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210s). Al finalizar la exposición de calor el "beaker" es dejado durante 1min en el microondas para estabilizar la temperatura. Para la investigación de la influencia de la razón solvente/sólido en MAE la extracción se condujo de la siguiente forma: 600W durante 120s, variando la razón agua/té desde 10-200ml/g y manteniendo la masa de té en 1.5g. reposar 1min luego del calentamiento. Filtrar y analizar.	agua hirviendo	1. Re et al 1999 basado en la habilidad del antioxidante en interactuar con el radical ABTS disminuyendo su absorbancia a 734nm	Spigno et al., 2009
Kaempferol, ácido ascórbico α-tocoferol, cianidina, glutatión, ácido úrico, Trolox y jugo de china	1. Trolox (2.5 mM) fue preparado en etanol o 5 mM "buffer" de fosfato salino, pH 7.4, (PBS), para ser usado como solución stock del estándar 2. Solns "stock" de los flavonoides fueron disueltas en etanol y luego diluida en etanol para introducir las al sistema de ensayo en concentraciones dentro del rango de actividad de la prueba (1.5µM a 15 µM concentración final) 3. Antocianidinas fueron diluidas en etanol acidulado pH 1.3 para una concentración de 0.5 mM. 4. Acido Ascórbico y ácido úrico fueron preparados como soluciones "stock" en agua 18 MΩ para una concentración de 5 mM, 5. α-tocoferol en etanol a 2 mM.	etanol etanol acidulado pH 1.3 agua 18 MΩ	1. ABTS fue disuelto en agua a una concentración de 7mM 2. Radical cation ABTS.+ es producido mediante la reacción de la solución "stock" ABTS con 2.45mM Persulfato de Potasio (concentración final) y permitir la mezcla permanezca en oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16horas antes de usarse. 3. El radical ABTS.+ fue diluido en etanol hasta dar una lectura de absorbancia de 0.70(±2) a 734nm y equilibrado a 30°C. 4. Diluir las soluciones "stock" de fenoles antes descritas en etanol 5. Después 10 µl de cada dilución dentro de la prueba produce entre 20%-80% de inhibición de la absorbancia del blanco 6. Luego adicione 1.0ml de la solución diluida de ABTS.+(A734nm=0.700±.020) a 10 µl de compuesto antioxidante o estándar Trolox (concentración final 0-15 µM) en etanol 7. La absorbancia fue leída a 30°C exactamente y 1min después de mezclar y hasta 6min	Re et al., 1998

frutas: guayaba roja y blanca, carambola, pitaya roja y blanca mamey sapote, nispero, papaya verde y madura lichi, longan,	20g de pulpa de fruta fueron homogenizados con 80ml de metanol (100%) en una licuadora durante 1 min y luego se filtro. El residuo fue re-extraído y filtrado, luego los extractos fueron combinados y concentrados a un volumen de 40ml usando un rotavapor bajo vacío parcial a 40°C	metanol 100%	DPPH según Manthey, 2004 con algunas modificaciones. La reducción en la absorbancia fue monitoreada a 517nm a 0min y cada 5min hasta que la reacción alcance la meseta. La cuantificación fue usando el estándar ácido gálico. La actividad antirradical fue expresada como µgGAE/g peso fresco. ORAC Según descrita por Talcott et al., 2003 los resultados fueron expresados como equivalentes µM Trolox/g peso fresco	Mahattanatawee et al., 2006
semillas de <i>Z. jujuba</i>	100 g de semillas fueron extraídos con hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol en forma separada a temperatura ambiente y luego se evaporó el solvente usando rotavaporador	hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol	DPPH Acorde a Archana et al., 2005. A varias concentraciones de los extractos se le añadió 2.9ml de una solución melanólica de DPPH al 0.004%. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente se monitorio la absorbancia a 517nm. Los antioxidantes sintéticos L-ácido ascórbico y butilato hidroxianisól (BHA) fueron usados como control positivo	Al-Reza et al., 2009
<i>B. ciliata</i> rizomas	50 g de polvo de rizoma fueron extraído usando metanol y agua como solventes en un aparato Soxhlet. La relación polvo: solvente fue mantenida 1:6. el extracto obtenido fue evaporado a secado a 40°C en presión reducida en un rotavapor (metanol:337 mbar y agua 71mbar). El extracto seco fue pesado y se determino constituyente de solvente y almacenado en un desecador al vacío	metanol y agua	DPPH Descrito por Blois (1958). 20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg y 100 µg de los extractos fueron puestos en tubos y se llevaron a 0.5ml con los solventes respectivos. 3ml de solución etanólica DPPH al 0.1mM fue añadido a cada tubo y se incubo en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia fue monitoreada a 517nm	Rajkumar et al., 2010
<i>Helichrysum pedunculatum</i> hojas	Polvo de hojas (200g) fueron extraídos agua destilada estéril (5.5L) en "shaker" durante 48 horas, filtrado. Congelación del filtrado a -40°C y secado durante 48 horas usando un liofilizador para un rendimiento de 30g de extracto seco	agua destilada estéril	ABTS 1. Según Re et al., 1999 2. La solución fue preparada mezclando dos soluciones "stock" de 7mM solución ABTS y 2.4mM solución persulfato de sodio en cantidades iguales y permitir reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente en oscuridad. 3. La solución resultante luego fue diluida mezclando 1ml de solución ABTS+ seguido por la medición de la absorbancia a 734nm luego de 7min DPPH El método de Lijana-Pathiana y Shahidi 2005 fue utilizado para determinar capacidad antioxidante A 1 mL de 0.135 mM DPPH preparado en metanol fue mezclado con 1.0ml de extracto acuoso en un rango de 0.2-0.8 mg/mL. La mezcla fue agitada y dejada en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia fue monitoreada a 517nm.	Aiyegoro et al., 2009
hojas de guayaba	sonicación durante 10 min repetido 3 veces	etanol acetato de etilo agua caliente	1. Radical libre ABTS fue disuelto en etanol hasta obtener absorbancia de 0.7±0.1 a 750nm 2. El extracto crudo fue disuelto con etanol hasta obtener 20 a 80% de inhibición de la absorbancia del blanco. 3. Se añadió 20µl de la muestra diluida a 180µl de la solución diluida del radical ABTS. 4. Reposar la muestra durante 5min a temperatura ambiente. 5. Analizar la muestra en un espectrofotómetro a un largo de onda de 750nm. 6. Las mediciones fueron realizadas en triplicado. 7. Para realizar la curva de calibración se utilizó el estándar Trolox disuelto en etanol a una concentración final desde 0 a 50 µM.	Nantitanon et al., 2010
<i>Eugenia aggregata</i> , <i>E. brasiliensis</i> , <i>E. luschnathiana</i> , <i>E. reinwardiana</i> , <i>Myrciaria cauliflora</i> , <i>M. vexator</i> , <i>Syzygium curmii</i> , <i>S. curranii</i> , <i>S. jambos</i> , <i>S. javanicum</i> , <i>S. malaccense</i> , <i>S. samarangense</i> y <i>S. samarangense</i> var. <i>Taiwan pink</i>	10g de la fruta seca fueron homogenizados con 200ml de metanol con ácido fórmico (9:1) y sonicados por 1hr, se centrifugaron y se reextrajeron 2 veces más. Los extractos se combinaron se concentraron en un rotavapor hasta 100ml, luego se dividieron en alícuotas de 2-4ml se congelaron y luego se secaron luego fue suspendida en agua 1-2ml y una fase de limpieza con SPE.	metanol con ácido fórmico (9:1)	DPPH Se realizó en triplicado usando 400µM DPPH según (Yang et al., 2003). Ácido gálico fue usado como control positivo.	Reynertson et al., 2008
39 diferentes hierbas y especias	2g de muestra fueron extraídas con 15ml de "buffer" de fosfato 75mM pH 7.0 usando un homogenizador durante 1min. Luego fueron centrifugadas a 20000g por 20min.	"buffer" de fosfato 75mM pH 7.0	ORAC Fue realizado según el método de Cao y colaboradores y modificado por Wang y Lin. la mezcla de la reacción contiene 1.7ml de 75mM "buffer" de fosfato (pH=7.0), 100µl de (R)-Phycocerythrin R-PE (3.4mg/l), 100 µl de 320 nM de AAPH y 100 µl de muestra. Trolox es usado como antioxidante estándar. La fluorescencia de R-PE fue determinada y registrada cada a un largo de onda de excitación de 540nm y 570nm para emisión	Zheng et al., 2001
hojas y frutas de: mora frambuesa roja, frambuesa negra y fresas	2g de muestras fueron extraídas con 15ml de "buffer" de fosfato 75mM (pH 7.0) usando un homogenizador y centrifugado a 20000g a 4 °C por 30 min.	"buffer" de fosfato 75mM pH 7.0	ORAC Según Cao et al., 1993 la mezcla de la reacción contiene 1.7ml de 75mM "buffer" de fosfato (pH=7.0), 100µl de (R)-Phycocerythrin R-PE (3.4mg/l), 100 µl de 320 nM de AAPH y 100 µl de muestra. La fluorescencia de R-PE fue determinada y registrada cada a un largo de onda de excitación de 540nm y 570nm para emisión. El "buffer" de fosfato fue usado como blanco y 1µl de Trolox como estándar durante cada corrida. El R-PE, "buffer" de fosfato y las muestras fueron pre incubadas a 37 °C por 15 min.	Wang et al., 2000
18 diferente té verde y negro y 2 marcas de té helado	1.5-2.4 g de muestra fueron extraídos con 100ml de agua destilada deionizada hirviendo	agua destilada deionizada hirviendo	ORAC desarrollado acorde a Cao y Prior En la mezcla final 0.2ml, β-PE (3.39 mg/l) fue usado como indicador de captador de radicales libres y AAPH (8 mM) fue usado como un generador de radicales a 37°C. Trolox (10 µM) fue usado como estándar de control. El descenso en la fluorescencia de PE fue determinada leyendo la fluorescencia (excitación 535nm, emisión 595nm) cada 2min durante 70min. Se calculó por el área bajo la curva (AUC) (AUCmuestra – AUC"buffer")/(AUCTrolox – AUC"buffer") x factor de la dilución x concentración inicial Trolox (µM).	Henning et al., 2003
fruta y hojas de arándanos	A 10g de muestra se le añadieron 10ml de acetonitrilo al 4% ácido acético y homogenizada en una licuadora por 2min. 5ml de solvente fueron usado para lavar la licuadora y mezclarlo con el homogenizado. La mezcla fue dejada a temperatura ambiente con agitación cada 3 min por al menos 30min y luego centrifugadas a 5000g por 15min a 4 °C.	acetonitrilo al 4% ácido acético	ORAC Según Cao et al., 1995 volumen final del ensayo 0.4ml, R-PE (16.7nM) usado como marcador, AAPH (4mM) como generador de radicales, Trolox (1.0µM) como estándar de control. El analizador fue programado para leer la fluorescencia de R-PE cada 2mm luego de la adición de AAPH.	Ehlenfeldt et al., 2001

APÉNDICE B: ANÁLISIS DE LA VARIANZA

1. Análisis de varianza para la concentración de fenoles totales en fase acuosa de extractos de la hoja de guayaba

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración de fenoles m..	297	0.63	0.61	18.03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	107.12	13	8.24	37.11	<0.0001
Clones de Psidium guajava	107.12	13	8.24	37.11	<0.0001
Error	62.84	283	0.22		
Total	169.96	296			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.50498

Error: 0.2221 gl: 283

Clones de Psidium guajava	Mediasn	E.E.								
57-7-19	1.79	63	0.06	A						
57-2-95	2.14	18	0.11	A	B					
57-4-30	2.36	18	0.11		B	C				
R-264	2.36	18	0.11		B	C				
57-1-42	2.42	18	0.11		B	C				
57-6-71	2.66	18	0.11			C	D			
57-1-28	2.70	18	0.11			C	D			
Q-241	2.72	18	0.11			C	D			
G-447	2.86	18	0.11			C	D	E		
R-258	2.93	18	0.11				D	E	F	
G-864	3.10	18	0.11				D	E	F	
57-10-137	3.29	18	0.11					E	F	
57-8-163	3.43	18	0.11						F	G
M-184	3.89	18	0.11							G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

2. Análisis de varianza para la concentración de fenoles totales en fase metanólica de extractos de la hoja de guayaba

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración de fenoles m..	297	0.34	0.31	7.11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8450.34	13	650.03	11.12	<0.0001
Clones de Psidium guajava	8450.34	13	650.03	11.12	<0.0001
Error	16543.25	283	58.46		
Total	24993.59	296			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=8.19332

Error: 58.4567 gl: 283

Clones de Psidium guajava	Medias	n	E.E.					
57-1-42	96.77	18	1.80	A				
R-258	99.83	18	1.80	A	B			
57-6-71	101.57	18	1.80	A	B			
Q-241	105.90	18	1.80		B	C		
57-1-28	106.10	18	1.80		B	C		
G-864	106.32	18	1.80		B	C		
57-7-19	106.97	63	0.96		B	C		
G-447	107.45	18	1.80		B	C	D	
R-264	107.84	18	1.80		B	C	D	
57-2-95	107.97	18	1.80		B	C	D	
57-8-163	113.52	18	1.80			C	D	E
57-4-30	113.73	18	1.80			C	D	E
57-10-137	115.24	18	1.80				D	E
M-184	118.37	18	1.80					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

3. Cuantificación de Ácido Eláxico

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración de ácido elá..	93	0.99	0.99	21.39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1253.57	13	96.43	993.18	<0.0001
clones de Psidium guajava	1253.57	13	96.43	993.18	<0.0001
Error	7.67	79	0.10		
Total	1261.24	92			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.62550

Error: 0.0971 gl: 79

clones de Psidium guajava	Medias	n	E.E.			
G-447	0.00	6	0.13	A		
R-264	0.00	6	0.13	A		
57-6-71	0.00	6	0.13	A		
57-4-30	0.00	6	0.13	A		
57-2-95	0.00	6	0.13	A		
57-1-28	0.00	6	0.13	A		
57-7-19	0.00	21	0.07	A		
G-864	0.98	6	0.13		B	
57-8-163	1.35	3	0.18		B	C
M-184	1.39	6	0.13		B	C
R-258	1.69	6	0.13			C

57-1-42	1.78	6	0.13	C
57-10-137	1.78	3	0.18	C
Q-241	15.18	6	0.13	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

4. Cuantificación de Quercetina

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración de quercetin..	99	0.45	0.36	65.48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.86	13	0.14	5.31	<0.0001
Clones de Psidium guajava	1.86	13	0.14	5.31	<0.0001
Error	2.29	85	0.03		
Total	4.15	98			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.31288

Error: 0.0269 gl: 85

Clones de Psidium guajava	Medias	n	E.E.			
57-1-42	0.02	6	0.07	A		
R-258	0.02	6	0.07	A		
G-864	0.06	6	0.07	A	B	
M-184	0.06	6	0.07	A	B	
57-8-163	0.13	6	0.07	A	B	C
57-1-28	0.21	6	0.07	A	B	C
57-6-71	0.27	6	0.07	A	B	C
R-264	0.32	6	0.07	A	B	C
57-7-19	0.33	21	0.04	A	B	C
57-4-30	0.34	6	0.07		B	C
G-447	0.37	6	0.07		B	C
57-10-137	0.37	6	0.07		B	C
Q-241	0.38	6	0.07			C
57-2-95	0.44	6	0.07			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

5. Variabilidad en la cuantificación de Ácido gálico

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración de ácido gál..	99	0.40	0.30	33.84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.03	13	2.1E-03	4.27	<0.0001
Clon de Psidium guajava	0.03	13	2.1E-03	4.27	<0.0001
Error	0.04	85	4.9E-04		
Total	0.07	98			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04234

Error: 0.0005 gl: 85

Clon de Psidium guajava	Medias	n	E.E.

G-864	0.04	6	0.01	A		
57-8-163	0.04	6	0.01	A		
Q-241	0.05	6	0.01	A	B	
57-7-19	0.06	21	4.8E-03	A	B	
57-1-28	0.06	6	0.01	A	B	
57-4-30	0.06	6	0.01	A	B	
57-10-137	0.06	6	0.01	A	B	C
57-6-71	0.07	6	0.01	A	B	C
G-447	0.07	6	0.01	A	B	C
57-1-42	0.08	6	0.01	A	B	C
R-258	0.08	6	0.01	A	B	C
R-264	0.09	6	0.01		B	C
57-2-95	0.09	6	0.01		B	C
M-184	0.10	6	0.01			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

6. Análisis de varianza para la actividad antioxidante en fase acuosa de extractos de guayaba

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración μ MTE/g	297	0.30	0.26	14.56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.33	13	0.10	9.17	<0.0001
Clones de Psidium guajava	1.33	13	0.10	9.17	<0.0001
Error	3.15	283	0.01		
Total	4.48	296			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.11314

Error: 0.0111 gl: 283

Clones de Psidium guajava	Mediasn	E.E.							
57-4-30	0.60	18	0.02	A					
57-2-95	0.61	18	0.02	A	B				
57-1-28	0.65	18	0.02	A	B	C			
R-264	0.69	18	0.02	A	B	C	D		
Q-241	0.70	18	0.02	A	B	C	D	E	
G-864	0.71	18	0.02	A	B	C	D	E	
57-7-19	0.71	63	0.01		B	C	D	E	
57-8-163	0.73	18	0.02			C	D	E	F
G-447	0.75	18	0.02			C	D	E	F
57-6-71	0.78	18	0.02				D	E	F
57-1-42	0.78	18	0.02				D	E	F
R-258	0.81	18	0.02					E	F

M-184	0.83	18	0.02	F
57-10-137	0.83	18	0.02	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

7. Análisis de varianza para la actividad antioxidante en fase metanólica de extractos de guayaba

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Concentración μ MTE/g	295	0.17	0.13	52.93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	25982.38	13	1998.64	4.43	<0.0001
Clones de Psidium guajava	25982.38	13	1998.64	4.43	<0.0001
Error	126904.62	281	451.62		
Total	152887.01	294			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=22.86658

Error: 451.6179 gl: 281

Clones de Psidium guajava	Medias	n	E.E.				
M-184	22.92	17	5.15	A			
R-258	26.61	18	5.01	A	B		
57-2-95	30.13	18	5.01	A	B	C	
57-1-28	32.41	18	5.01	A	B	C	D
57-1-42	32.70	18	5.01	A	B	C	D
57-6-71	35.08	18	5.01	A	B	C	D
R-264	35.68	17	5.15	A	B	C	D
G-447	38.84	18	5.01	A	B	C	D
57-10-137	38.93	18	5.01	A	B	C	D
G-864	41.26	18	5.01	A	B	C	D
57-4-30	45.28	18	5.01	A	B	C	D
Q-241	47.19	18	5.01		B	C	D
57-7-19	51.65	63	2.68			C	D
57-8-163	53.41	18	5.01				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

APÉNDICE C: CURVAS DE CALIBRACIÓN

Cuantificación de Fenoles Totales

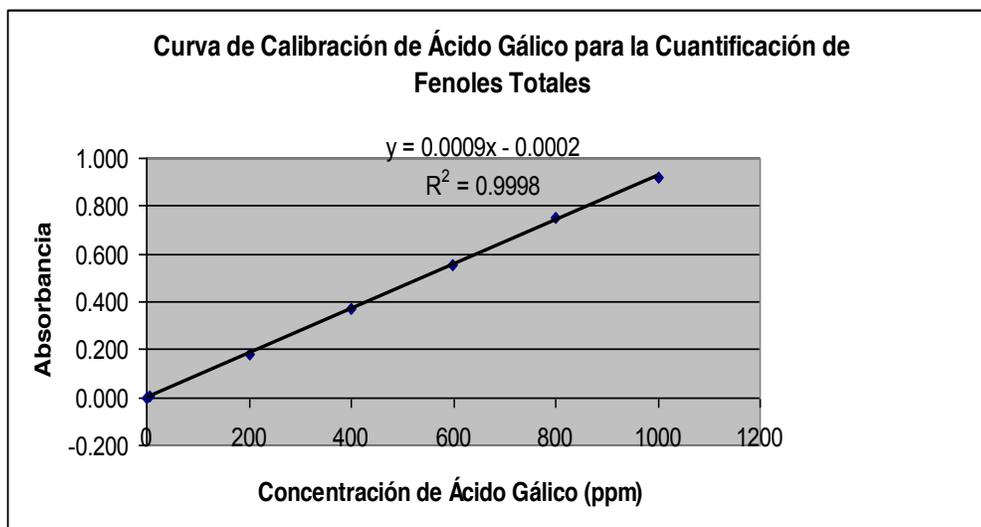


Ilustración 33: Curva de Calibración de Ácido Gálico para la Cuantificación de Fenoles Totales

Curva de Calibración para LC-MS

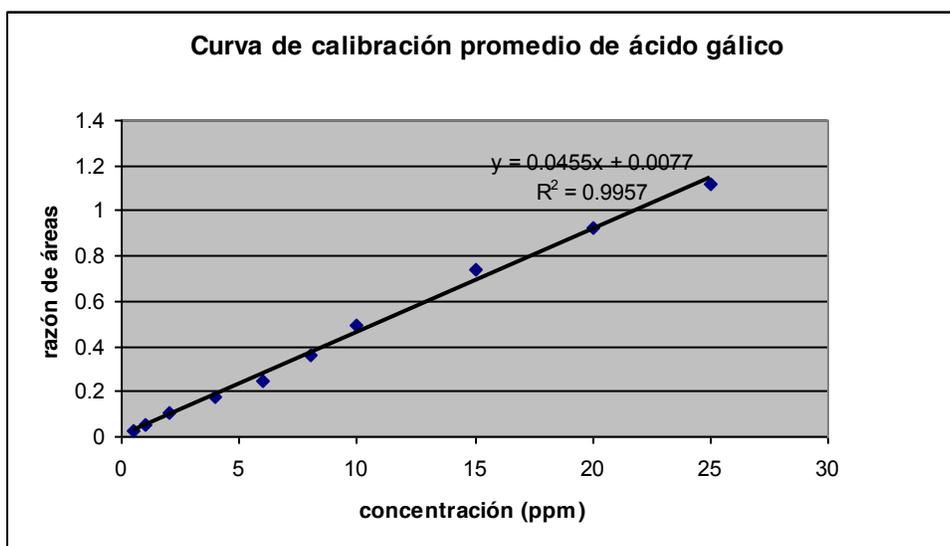


Ilustración 34: Curva de Calibración Promedio de Ácido Gálico

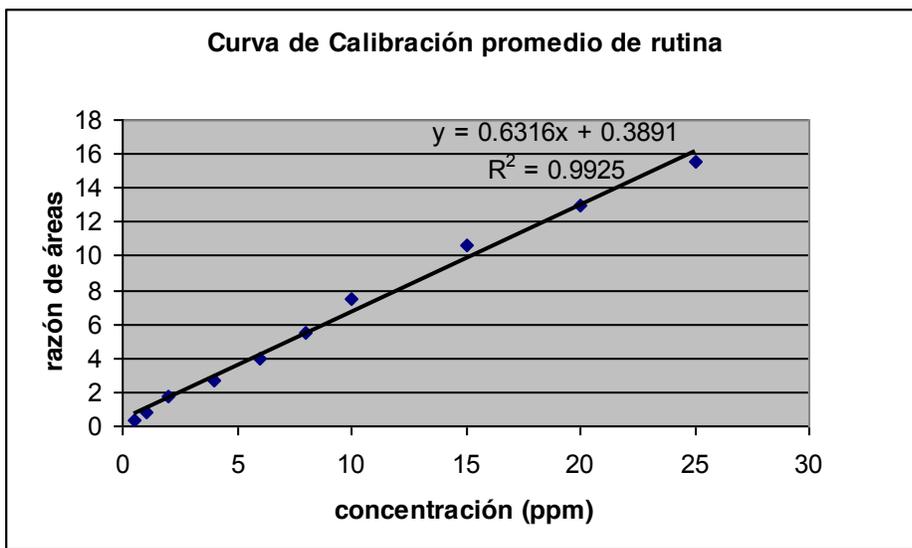


Ilustración 35: Curva de Calibración Promedio de Rutina

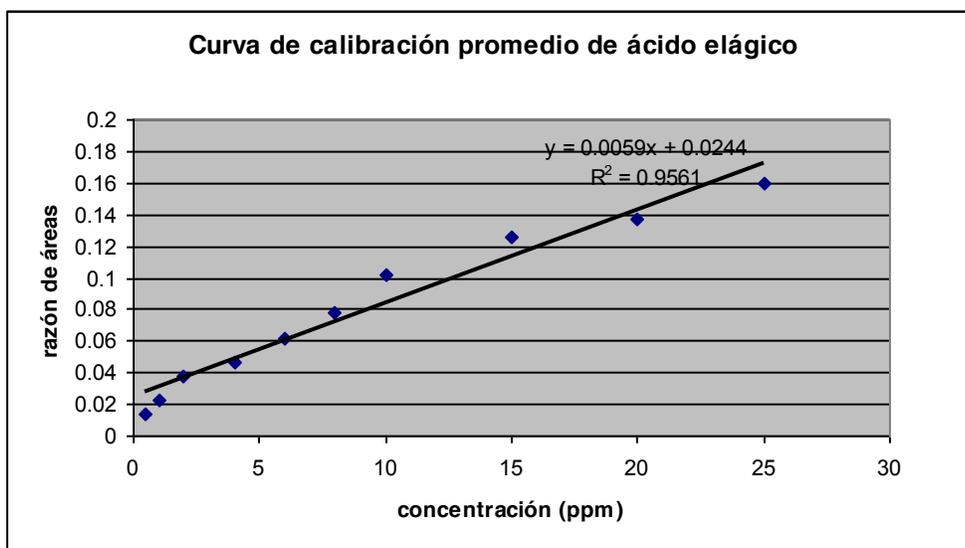


Ilustración 36: Curva de Calibración Promedio de Ácido Elágico

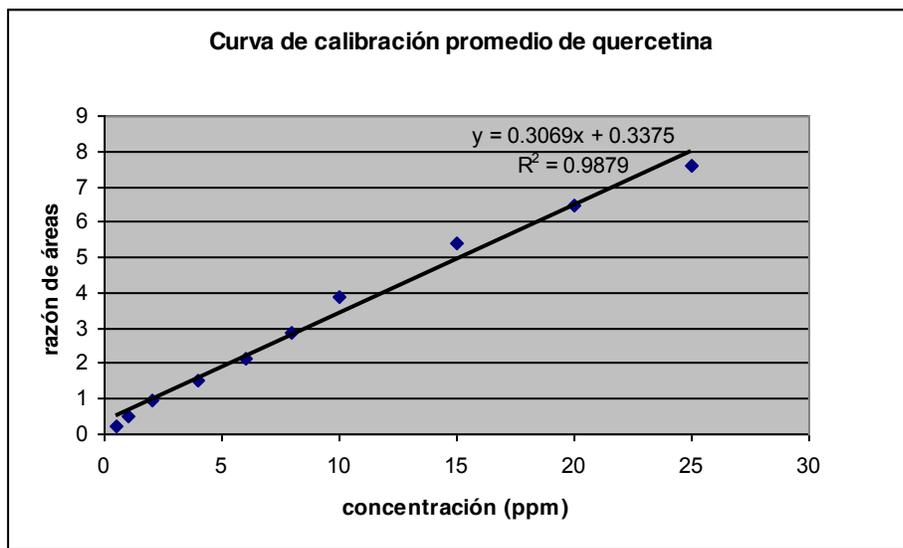


Ilustración 37: Curva de Calibración Promedio de Quercetina

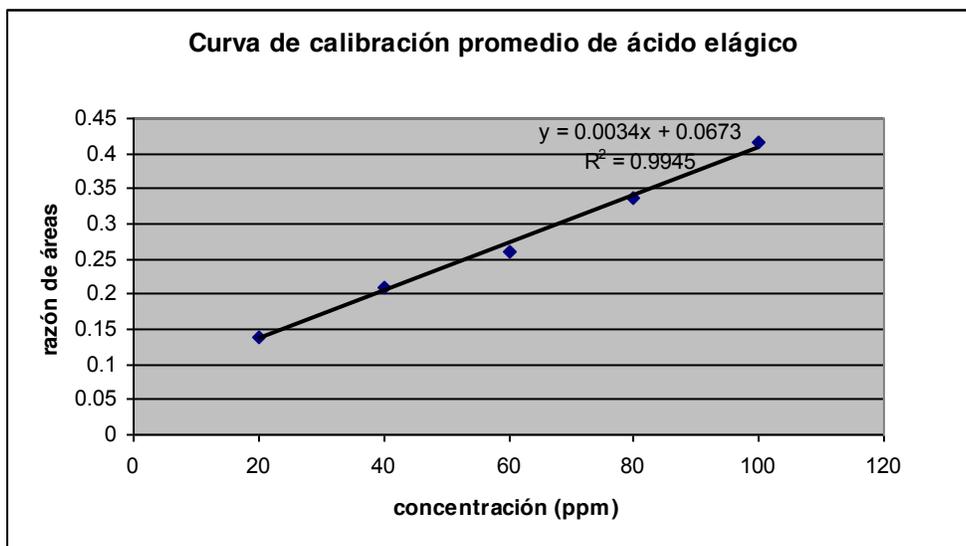


Ilustración 38: Curva de Calibración Promedio de Ácido Elágico en concentraciones de 20 a 100 ppm

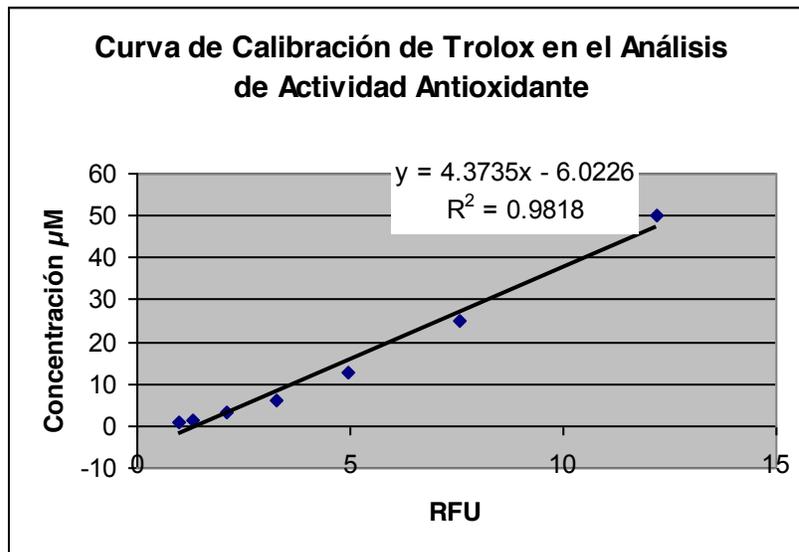


Ilustración 39: Curva de Calibración de Trolox en el Análisis de Actividad Antioxidante

APÉNDICE D: LA GUAYABA

1. Clasificación microscópica de la guayaba



Ilustración 40: Clasificación macroscópica de la guayaba

Extraído de Nantitanon et al., 2010

2. Frutas elaboradas: proceso de cómputos de consumo per/capita
Tabla 12: Frutas Elaboradas proceso de cómputos de consumo percapita

ESTADO LIBRE ASOCIADO DE PUERTO RICO
 DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA
 OFICINA DE ESTADISTICAS AGRICOLAS

18-61F3 FRUTAS ELABORADAS: PROCESO DE COMPUTOS DE CONSUMO PER\CAPITA (PESO EN LA FINCA).
PASTA Y PULPA DE GUAYABA (PESO EN LA FINCA), 1975...

AÑO FISCAL	PROD. LOCAL (QQ)	IMPORTADA (QQ)	EXPORTADA (QQ)	IMPORTACION NETA (QQ)	DISPONIBLE PARA CONSUMO (QQ)	POBLACION (MILES)	CONSUMO PER CAPITA (LIBRAS)	PER/CAPITA		PORCIENTO PROD/LOCAL DEL CONSUMO
								PROD. LOCAL	IMPORTACION NETA	
								(Lbs)		
1981	0	15,784	0	15,784	15,784	3,229	0.49	0.00	0.49	0.00
1982	0	15,383	0	15,383	15,383	3,257	0.47	0.00	0.47	0.00
1983	0	16,487	0	16,487	16,487	3,286	0.50	0.00	0.50	0.00
1984	0	15,964	0	15,964	15,964	3,317	0.48	0.00	0.48	0.00
1985	0	20,336	0	20,336	20,336	3,349	0.61	0.00	0.61	0.00
1986	0	29,268	0	29,268	29,268	3,382	0.87	0.00	0.87	0.00
1987	0	17,686	0	17,686	17,686	3,417	0.52	0.00	0.52	0.00
1988	0	23,702	0	23,702	23,702	3,454	0.69	0.00	0.69	0.00
1989	0	22,868	0	22,868	22,868	3,492	0.65	0.00	0.65	0.00
1990	0	12,276	0	12,276	12,276	3,528	0.35	0.00	0.35	0.00
1991	0	14,562	0	14,562	14,562	3,551	0.41	0.00	0.41	0.00
1992	0	13,573	0	13,573	13,573	3,575	0.38	0.00	0.38	0.00
1993	0	9,305	0	9,305	9,305	3,600	0.26	0.00	0.26	0.00
1994	0	8,226	0	8,226	8,226	3,627	0.23	0.00	0.23	0.00
1995	0	8,305	0	8,305	8,305	3,655	0.23	0.00	0.23	0.00
1996	0	4,446	0	4,446	4,446	3,685	0.12	0.00	0.12	0.00
1997	0	6,719	0	6,719	6,719	3,716	0.18	0.00	0.18	0.00
1998	0	8,501	0	8,501	8,501	3,781	0.22	0.00	0.22	0.00
1999	0	7,160	0	7,160	7,160	3,800	0.19	0.00	0.19	0.00
2000	0	9,278	0	9,278	9,278	3,809	0.24	0.00	0.24	0.00
2001	0	11,413	0	11,413	11,413	3,832	0.30	0.00	0.30	0.00
2002	0	5,592	0	5,592	5,592	3,856	0.15	0.00	0.15	0.00
2003	0	5,744	0	5,744	5,744	3,881	0.15	0.00	0.15	0.00
2004	0	6,328	0	6,328	6,328	3,905	0.16	0.00	0.16	0.00
2005	0	8,100	0	8,100	8,100	3,930	0.21	0.00	0.21	0.00
2006	0	7,379	0	7,379	7,379	3,948	0.19	0.00	0.19	0.00
2007	0	8,076	0	8,076	8,076	3,966	0.20	0.00	0.20	0.00
2008	0	5,182	0	5,182	5,182	3,985	0.13	0.00	0.13	0.00
2009	0	5,168	0	5,168	5,168	4,003	0.13	0.00	0.13	0.00
2010*	0	5,421	0	5,421	5,421	4,003	0.14	0.00	0.14	0.00

Fuente: Departamento de Agricultura, Oficina de Estadísticas Agrícolas

31 de agosto de 2011

* Preliminar

población sin revisar

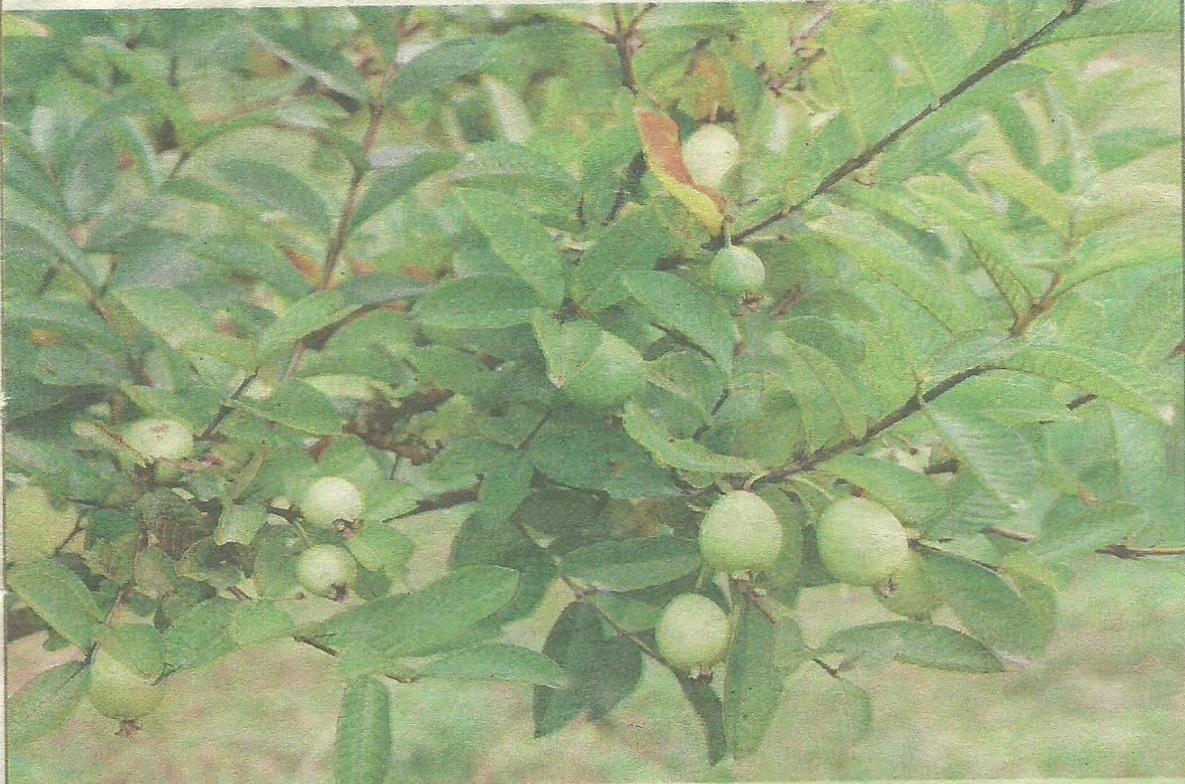
PAGINA - 3

el 0 el prod local significa que no tenemos los mecanismos para medirla

3. Reporte Documental del periódico El Nuevo Día

07
EL NUEVO DÍA
domingo, 23 de octubre de 2011

ciencia



La fruta con más antioxidantes

No es ni la uva ni la manzana, sino la guayaba. Un estudio realizado por el Instituto de Investigaciones de Hyderabad, en la India, ha llegado a la conclusión de que en cada 100 gramos de guayabas hay alrededor de 500 miligramos de sustancias antioxidantes. Esa proporción supera hasta en tres veces a la existente en uvas, ciruelas, manzanas, naranjas, granadas, papayas, piñas y otras frutas de reconocidos valores en la lucha del organismo contra los llamados radicales libres, causantes de daños celulares responsables de fenómenos como el envejecimiento. En definitiva, la guayaba tiene propiedades antioxidantes superiores a las de todas las demás frutas.

Ilustración 41: La fruta con más antioxidantes

APÉNDICE E: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Tabla 13: Actividad antioxidante (mediante el método de ORAC) en extractos de plantas aromáticas

Table 1. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity (ORAC) in Various Herbal Extracts^a

common name	botanical name	type	total phenolic ^b (mg of GAE/g of fresh weight)	ORAC ^c (μ mol of TE/ g of fresh weight)
balsam pear	<i>Momordica charantia</i>	medicinal	0.43 ± 0.08	3.43 ± 0.11
creeping thyme	<i>Thymus praecox</i> ssp. <i>arcticus</i>	medicinal	1.81 ± 0.04	13.40 ± 0.12
feverfew	<i>Tanacetum parthenium</i>	medicinal	0.87 ± 0.06	10.07 ± 0.15
garden sage	<i>Salvia officinalis</i>	medicinal	1.34 ± 0.09	13.28 ± 0.40
garden thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	medicinal	2.13 ± 0.11	19.49 ± 0.21
Madagascar periwinkle	<i>Catharanthus roseus</i>	medicinal	2.85 ± 0.11	22.30 ± 0.54
maidenhair tree	<i>Ginkgo biloba</i>	medicinal	1.57 ± 0.05	13.18 ± 0.24
peppermint	<i>Mentha</i> × <i>piperita</i>	medicinal	2.26 ± 0.16	15.84 ± 0.42
Saint John's wort	<i>Hypericum perforatum</i>	medicinal	2.78 ± 0.12	16.77 ± 0.22
sweet wormwood	<i>Artemisia annua</i>	medicinal	1.54 ± 0.06	15.69 ± 0.37
true aloe	<i>Aloe vera</i>	medicinal	0.23 ± 0.00	1.88 ± 0.05
valerian	<i>Valerian officinalis</i>	medicinal	1.78 ± 0.12	15.82 ± 0.61
caraway	<i>Carum carvi</i>	culinary	1.05 ± 0.00	10.65 ± 0.29
chives	<i>Allium schoenoprasum</i>	culinary	1.05 ± 0.05	9.15 ± 0.28
cuban oregano	<i>Plectranthus amboinicus</i>	culinary	0.34 ± 0.00	4.71 ± 0.14
dandelion	<i>Taraxacum officinale</i>	culinary	0.26 ± 0.02	2.35 ± 0.14
dill	<i>Anethum graveolens</i>	culinary	3.12 ± 0.06	29.12 ± 0.29
English lavender	<i>Lavandula angustifolia</i>	culinary	1.50 ± 0.13	16.20 ± 0.11
fennel	<i>Foeniculum vulgare</i>	culinary	0.68 ± 0.00	5.88 ± 0.09
Greek mountain oregano	<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>	culinary	11.80 ± 0.60	64.71 ± 1.05
hard sweet marjoram	<i>Origanum</i> × <i>majoricum</i>	culinary	11.65 ± 0.29	71.64 ± 1.25
lemon balm	<i>Melissa officinalis</i>	culinary	1.26 ± 0.04	9.54 ± 0.23
lemon thyme	<i>Thymus</i> × <i>citriodorus</i>	culinary	1.78 ± 0.03	13.28 ± 0.33
lemon verbena	<i>Aloysia triphylla</i>	culinary	1.55 ± 0.10	17.38 ± 0.35
lovage	<i>Levisticum officinale</i>	culinary	2.63 ± 0.05	21.54 ± 0.35
Mexican oregano	<i>Poliomintha longiflora</i>	culinary	17.51 ± 0.22	92.18 ± 0.72
orange mint	<i>Mentha aquatica</i>	culinary	2.26 ± 0.10	19.80 ± 0.43
parsley	<i>Petroselinum crispum</i>	culinary	1.12 ± 0.01	11.03 ± 0.13
pineapple sage	<i>Salvia elegans</i>	culinary	1.31 ± 0.08	11.55 ± 0.42
purple amaranth	<i>Amaranthus cruentus</i>	culinary	3.41 ± 0.11	28.92 ± 0.21
rose geranium	<i>Pelargonium graveolens</i>	culinary	7.34 ± 0.36	38.75 ± 0.61
rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	culinary	2.19 ± 0.15	19.15 ± 0.63
salad burnet	<i>Sanguisorba minor</i>	culinary	0.99 ± 0.07	8.33 ± 0.13
society garlic	<i>Tulbaghia violacea</i>	culinary	1.03 ± 0.10	7.50 ± 0.60
spearmint	<i>Mentha spicata</i>	culinary	0.94 ± 0.15	8.10 ± 0.26
sweet basil	<i>Ocimum basilicum</i>	culinary	2.23 ± 0.15	14.27 ± 0.45
sweet bay	<i>Laurus nobilis</i>	culinary	4.02 ± 0.90	31.70 ± 0.97
Vietnamese coriander	<i>Polygonum odoratum</i>	culinary	3.09 ± 0.12	22.30 ± 0.68
winter savory	<i>Satureja montana</i>	culinary	3.16 ± 0.02	26.34 ± 0.17
LSD _{0.05}			0.27	0.79

^a Data expressed as mean ± SEM. ^b Data expressed as milligrams of gallic acid (GAE) equivalents per gram of fresh weight. ^c Data expressed as micromoles of Trolox equivalents per gram of fresh weight.

Extraído de: Zheng y Wang, 2001