

## Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*)

Karol Zapata<sup>(1)</sup>, Farid B. Cortes<sup>(2)</sup> y Benjamín A. Rojano<sup>(1)\*</sup>

Universidad Nacional de Colombia, (1) Laboratorio de Ciencia de Alimentos, Facultad de Ciencias, (2) Escuela de Procesos y Energía, Facultad de Minas, Sede Medellín, Medellín – Colombia  
(e-mail: kzapata@unal.edu.co; fbcortes@unal.edu.co; brojano@unal.edu.co)

\* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia:

*Recibido Abr. 03, 2013; Aceptado May. 27, 2013; Versión final recibida Jun. 07, 2013*

---

### Resumen

Se evaluó el contenido de compuestos polifenólicos tales como fenoles totales, flavonoides totales, taninos condensados y ácidos fenólicos, del fruto de la guayaba agria (*Psidium araca*). Estos compuestos determinan la capacidad antioxidante, propiedad que expresa la facilidad para atrapar especies reactivas de oxígeno como valor nutracéutico de la especie. La actividad antioxidante se determinó por diferentes metodologías tales como DPPH, ABTS, FRAP y ORAC. Los resultados son comparables con los de la guayaba común (*Psidium guajava*) y superiores a los reportados para frutas comunes como piña, sandía, maracuyá y melón. En conclusión, la guayaba agria es una fruta con un potencial antioxidante que puede ser manejado por diversas metodologías tecnológicas y obtener productos con alto valor agregado.

*Palabras clave: guayaba agria, actividad antioxidante, fenoles, poder nutracéutico*

## Polyphenols and Antioxidant Activity of Sour Guava Fruit (*Psidium araca*)

### Abstract

The content of polyphenol compounds such as total phenols, total flavonoids, condensed tannins and phenolic acids of the sour guava fruits (*Psidium araca*) was determined. These compounds determine the antioxidant capacity, property that expresses the facility for scavenging reactive oxygen species as nutraceutical value of the specie. The antioxidant activity of sour guava was determined by different methods such as DPPH, ABTS, FRAP and ORAC. The results are comparable with those found for common guava (*Psidium guajava*) and higher than those reported for common fruits such as pineapple, watermelon, passion fruit and melon. In conclusion, sour guava is a fruit with antioxidant potential, which can be handled by various technological methods to get high added-value products.

*Keywords: sour guava, antioxidant activity, phenols, nutraceutical power*

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de alimentos funcionales y nutraceuticos, son un reto para la ciencia y tecnología de los alimentos, y son las frutas las especies que cumplen con estas características. Las frutas como alimentos son fuente potencial de antioxidantes y aportan nutrientes como agua, carbohidratos, minerales y vitaminas necesarios en la dieta. El consumo elevado de frutas tiene un impacto positivo en la salud, debido a la presencia de metabolitos capaces de neutralizar especies reactivas del oxígeno (EROS) (Contreras-Calderón et al., 2010). Las EROS como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrogeno son altamente reactivas y reaccionan con estructuras biológicas vitales como el DNA y proteínas, cuando existe un desbalance entre la producción de EROS y los sistemas biológicos de captura, se producen patologías como cáncer, aterosclerosis, diabetes mellitus, hipertensión, entre otras (Fu et al., 2011). La vida sedentaria, la dieta desbalanceada, el tabaquismo, el alcoholismo, la exposición a los rayos ultravioleta, entre otros, son los principales factores implicados en el alto contenido de EROS en células somáticas (Murillo et al., 2007).

El interés en las propiedades antioxidantes de las frutas es reciente, algunos autores han evaluado la capacidad atrapadora de radicales libres y el contenido de fenoles de frutas tropicales como mora, mango de azúcar, guayaba, granadilla, fresa, maracuyá, uchuva, lulo, piña, mortiño entre otros (Atala et al., 2009; Contreras-Calderón et al., 2010; Lopera et al., 2013); sin embargo, especies nativas de la familia Mirtácea como la guayaba agria han sido poco estudiadas.

La familia Mirtaceae posee alrededor de 131 géneros y unas 4620 especies, el género *Psidium* es uno de los más encontrados en Colombia. La especie *Psidium araca*, conocida comúnmente como guayaba agria son frutos ampliamente distribuido en regiones tropicales como Panamá, Brasil, Perú, Ecuador, y Colombia, donde se localizan principalmente en la región Caribe, y se consume directamente la fruta o como jugo. Se encuentran reportes fisicoquímicos del fruto de guayaba agria (Lara et al., 2007); pero existen pocas investigaciones sobre la presencia de compuestos bioactivos como los compuestos polifenólicos. Los compuestos polifenólicos en las frutas aportan un mayor potencial antioxidante, asociado a diversas propiedades farmacológicas relacionadas con enfermedades producidas por especies reactivas de oxígeno, inductoras de leucemia y cáncer de colon, entre otras (Szliszka y Krol, 2013; Wang et al., 2012). Por ejemplo, los taninos condensados, flavonoides, ácidos fenólicos como el clorogénico, cumárico y elágico presentes en muchos frutos son capaces de atrapar radicales libres causantes del estrés oxidativo, y reducir la probabilidad de padecer enfermedades crónicas. Los polifenoles en general presentes en frutas poseen además propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, antimicrobianas y antineoplásicas (Ruxton et al., 2006; Groh et al., 2013).

El conocimiento de las propiedades antioxidantes de la guayaba agria incrementará su consumo, abrirá un renglón de la economía local y permitirá que el fruto compita internacionalmente con otras frutas de alto valor nutraceutico. Este trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad antioxidante del fruto de Guayaba agria por técnicas espectrofotométricas como DPPH, ABTS y FRAP y técnicas fluorimétricas como ORAC, Ensayo DCFH y Ensayo ácido Tereftálico, así como determinar el contenido de flavonoides, taninos condensados y ácidos fenólicos, metabolitos directamente relacionados con la actividad antioxidante. Para ahondar en el conocimiento del fruto y para verificar si constituye una potencial fuente nutraceutica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Reactivos ensayos antioxidantes*

Radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), metanol, fosfato ácido de sodio, radical libre 2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), persulfato de potasio, tricloruro de hierro, cloruro de trifeniltetrazolio (TPTZ), ácido acético, ácido ascórbico, fluoresceína, 2,2'-Azinobis (2-amidinopropano) diclorhidrato (AAPH), reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, ácido gálico, Nitrito de Sodio, Tricloruro de Aluminio, Hidróxido de Sodio, Catequina, ácido sulfúrico, vainillina, estándares de ácido elágico, ácido clorogénico y ácido p-coumárico alta pureza  $\geq 95\%$ , todos estos obtenidos de Sigma Aldrich (Colombia). El agua usada en los experimentos es grado HPLC. Todos los experimentos espectrofotométricos se realizaron en un Lector de Placas Multiskan Spectrum UV-Vis Marca Thermo Scientific, Finlandia. La intensidad de fluorescencia medida en el ensayo ORAC fue realizada en un Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-55, Beaconfield, U.K. Los estudios cromatográficos por HPLC se hicieron en un cromatógrafo líquido Shimadzu, LC-20AD, equipado con un auto inyector SIL-20A /HT, un módulo de comunicación CBM-20A y un detector con arreglo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, calibrado a 280 nm.

### Material Vegetal.

El material vegetal (Fig. 1) fue colectado en Montería (Córdoba, Colombia), en febrero de 2012. Un ejemplar de muestra se depositó en el Laboratorio de Ciencia de los Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.



Fig. 1 Fruta Guayaba Agria *Psidium araca*

### Caracterización química del fruto de Guayaba Agria *Psidium araca*

Humedad: Termogravimetría a 103°C (Basado en ISO 6496)

Azúcares totales: Espectrofotometría método de Dubois, 1956

Proteínas: Kjeldahl (Basado en NTC 4657)

Cenizas: Método AOAC 942.05, Cap. 4, P. 5

Minerales: Espectrofotometría de Absorción Atómica (basado en NTC 5151) para minerales como hierro, cobre, sodio, potasio, magnesio, manganeso, zinc y calcio. Espectrofotometría UV –VIS para fósforo.

### Preparación de extractos para medir la actividad antioxidante y metabolitos

Los extractos fueron obtenidos de acuerdo al método modificado de Kuskoski *et al.*, 2005 como se describe a continuación: 30 g de la fruta (completa) fueron homogenizados con 50 ml de agua destilada en Ultra-Turrax Brand: IKA-WERK®. El extracto fue centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a Temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y se filtro en papel Wathman No 4, esta solución fue denominada como solución de trabajo y almacenada a 4°C hasta realizar las pruebas.

### Determinación de compuestos fenólicos

#### Fenoles totales

La determinación de fenoles se realizó por el método colorimétrico de Follin-Ciocalteu diseñado por Singleton *et al.*, 1965, 50 uL de muestra fueron adicionados a 125 uL del reactivo de Folin, y 400 uL de carbonato de Sodio 7.1% (p/v), ajustando con agua destilada hasta 1000 uL, se realizó la lectura espectrofotométrica a 760 nm y se comparó con la curva patrón usando como estándar ácido gálico (fenol). Los resultados fueron expresados como mg de Ácido gálico Equivalente / 100g de fruta fresca.

#### Flavonoides

La determinación de flavonoides se realizó siguiendo el método colorimétrico diseñado por Marinova *et al.*, 2005 con algunas modificaciones. 100 uL de muestra fueron mezclados con 30 uL de NaNO<sub>2</sub> al 5% (p/v), 30 uL de AlCl<sub>3</sub> 10 % (p/v), 200 uL de NaOH a 1M y ajustados con agua destilada hasta un volumen final de 1000 uL, se realizó la lectura espectrofotométrica a 510 nm y se comparó con la curva patrón usando como estándar (+)-catequina. Los resultados fueron expresados como mg de Catequina Equivalente / 100g de fruta fresca.

#### Taninos condensados

Este método colorimétrico se fundamenta en la reacción de los taninos condensados con vainillina bajo condiciones ácidas como lo diseñó Hagerman *et al.*, 1989. 230 uL de muestra fueron adicionados a 670 uL de una solución de vainillina recién preparada (1 g/100 ml) en ácido sulfúrico al 70%. La mezcla se incubó a 20°C durante 15 min y se realizó la lectura espectrofotométrica a 500 nm y se comparó con la curva patrón usando como estándar (+)-catequina. Los resultados fueron expresados como mg de Catequina Equivalente / 100g de fruta fresca.

### Ácidos fenólicos

Ácido elágico, ácido clorogénico y ácido p-Coumárico. El contenido de ácido elágico, ácido clorogénico y ácido p-Coumárico para la muestra, se determinó mediante análisis por HPLC, según el protocolo modificado de Kelebek et al., 2009. El extracto acuoso se filtró (tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ ) y se hicieron diluciones en agua supra-pura, antes de la inyección al cromatógrafo. Se utilizó un cromatógrafo líquido (Shimadzu, LC-20AD), equipado con un auto inyector SIL-20A /HT, un módulo de comunicación CBM-20A y un detector con arreglo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, calibrado a 280 nm. La cuantificación de los ácidos se llevó a cabo en una columna C-18 ultra acuosa cuyas dimensiones son 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro. Como fase móvil se utilizó metanol (A) acidulado con ácido fórmico al 0.1% (B). La razón de flujo de la fase móvil fue 1,0 mL/min, 25 °C y condiciones isocráticas. El espectro UV-visible es recorrido de 200 a 600 nm para todos los picos; la identificación y cuantificación de los compuestos se hace con curvas de calibración para cada uno de los ácidos fenólicos.

### Evaluación de la Capacidad Antioxidante por el método del DPPH

Se empleó el método de Brand-Williams *et al.*, 1995 con algunas modificaciones, 10  $\mu\text{L}$  de muestra fueron adicionados a 990  $\mu\text{L}$  de una solución metanólica de DPPH, y se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH, por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 30 min de reacción a una longitud de onda de 517 nm, y se comparó el valor con la curva de referencia construida con Trolox como patrón primario, los resultados fueron expresados como valores TEAC (umol Trolox Equivalente / 100 g fruta fresca)

### Evaluación de la Capacidad Antioxidante por el método del radical catiónico ABTS<sup>+</sup>

Se empleó el método de Re *et al.*, 1999 con algunas modificaciones, 10  $\mu\text{L}$  de muestra fueron adicionados a 990  $\mu\text{L}$  de una solución de ABTS<sup>+</sup>, y se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar el radical catiónico ABTS<sup>+</sup>, por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 30 min de reacción, a una longitud de onda de 732 nm. El valor de absorbancia se comparó con la curva de referencia construida con Trolox como patrón primario, y los resultados fueron expresados como valores TEAC (umol Trolox / 100 g fruta fresca)

### Evaluación del poder reductor por el método de FRAP

Este método evalúa el poder reductor de una muestra en base a su capacidad para reducir el hierro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) acomplejado con 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) a su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm, según lo diseñó Benzie *et al.*, 1996. 50  $\mu\text{L}$  de muestra, fueron adicionados a 900  $\mu\text{L}$  de una solución de FRAP (Buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), TPTZ,  $\text{FeCl}_3$ , en relación 10:1:1), luego de 30 minutos de reacción se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm, este valor se comparó con la curva de referencia construida con ácido ascórbico como patrón primario, y los resultados fueron expresados como AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity: mg de ácido ascórbico / 100 g fruta fresca).

### Ensayo ORAC

Este método evalúa la capacidad de una muestra para atrapar radicales peroxilos ( $\text{ROO}^\circ$ ), responsables de la decoloración de la sonda fluorescente. Se empleó el método descrito por Prior *et al.*, 2005 y Romero *et al.*, 2010. 30  $\mu\text{L}$  de la muestra fueron adicionados a 21  $\mu\text{L}$  de fluoresceína  $1 \times 10^{-2}$  M en PBS (75 mM), 2,899  $\mu\text{L}$  de PBS (75 mM), y 50  $\mu\text{L}$  de AAPH 0,6 M en PBS (75 mM), se controló la temperatura a 37°C y el pH 7,4 respectivamente. Las lecturas se realizaron a una  $\lambda$  de excitación 493 nm y *slit* de excitación 10,  $\lambda$  de emisión 515 nm y *slit* de emisión 15, con atenuador del 1% y sin placa atenuadora. El efecto protector del antioxidante es calculado usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco (reacción en ausencia de la muestra) y la muestra, y se comparó contra la curva del patrón primario Trolox. Los resultados se expresaron como umol equivalentes de Trolox / 100 gramos de Fruta fresca de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$ORAC = \frac{AUC - AUC^0}{AUC_{Trolox} - AUC^0} f Trolox \quad (1)$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra,  $AUC^0$  área bajo la curva para el control,  $AUC_{Trolox}$  área bajo la curva para el Trolox,  $f$  es el factor de dilución de los extractos.

Ensayo DCFH evaluación de la capacidad atraparadora de ERO's y ERN's

Se empleó el método descrito por Martín-Romero, 2008. La sonda no fluorescente 2,7 diclorodihidrofluoresceína (DCFH), reacciona con especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERO's y ERN's) generadas por el azo compuesto, 2,2'-diazobis (2- amidinopropano dihydrocloruro) (AAPH) en medio acuoso y forma el compuesto 2,7 diclorofluoresceína (DCF) fluorescente. Los antioxidantes de las muestras capturan los radicales libres y reducen la fluorescencia emitida gracias a la disminución del DCF formado. Para llevar a cabo la reacción se mezclaron 50 µL de una solución de AAPH 0.3 M, 50 µL de una solución etanólica de 2,7-diclorofluoresceína diacetato 2.4mM, 2850 µL de buffer fosfato 75 mM - pH 7.4 y 50 µL de la muestra a evaluar. Se leyó la intensidad de fluorescencia emitida durante los primeros 10 minutos y se comparó con la intensidad emitida en ausencia de la muestra. ( $\lambda$  excitación: 326 nm, una  $\lambda$  emisión: 432 nm y 10nm de slit). Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox o TEAC (mg equivalentes de trolox / 100 g de muestra) mediante la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones de TROLOX®

#### Ensayo ácido Tereftálico

Se empleó el método descrito por Yang y Guo, 2001. Los radicales hidroxilos son generados por el sistema Fe<sup>2+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El mecanismo se lleva a cabo en tres etapas: en la primera se da la oxidación de la dupla Fe<sup>2+</sup>-EDTA con oxígeno molecular para formar Fe<sup>3+</sup>-EDTA y el radical superóxido; en la segunda, el radical superóxido en presencia de hidrógeno es dismutado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; y en la última etapa, el Fe(II)-EDTA cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta •OH. Luego de ser generados, los radicales hidroxilos reaccionan con el ácido tereftálico para formar un producto monohidroxilado altamente fluorescente, el ácido 2-hidroxitereftalato. La capacidad del antioxidante para atrapar los radicales hidroxilos hace que disminuya la cantidad del producto 2-hidroxitereftalato, lo cual es evidenciado en la disminución de la intensidad de fluorescencia emitida. Para llevar a cabo la reacción se mezclaron 300 µL de una solución de tereftalato de sodio 1x10<sup>-4</sup> M, 2420 µL de buffer fosfato 0.2 M - pH 7.4, 100 µL de la muestra a evaluar, 90 µL de una solución de EDTA 1x10<sup>-2</sup> M y finalmente 90 µL de una solución de Fe +2 1x10<sup>-2</sup> M. La mezcla se dejó reposar durante 6 minutos con aireación constante a temperatura ambiente, y se leyó la intensidad emitida en presencia y ausencia de la muestra ( $\lambda$  excitación: 326 nm, una  $\lambda$  emisión: 432 nm y 10nm de slit). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de DMSO/100 g de muestra, mediante la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones de DMSO.

#### Análisis estadísticos.

Todos los experimentos se realizaron por cuatuplicado. Las regresiones fueron calculadas con un nivel de significancia del 95% (p<0.05), usando el programa Statgraphics Plus versión 5.0 (StatisticalGraphics Corp., Rockville, MD).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización química. En la Tabla 1 se muestra la composición química de la guayaba agria. Los valores reportados en su gran mayoría coinciden con los encontrados por Lara et al 2007.

Tabla. 1 Composición química de la Guayaba Agria (resultados expresados en base húmeda).

Parámetros	Contenido	Método
% Humedad	86,00	Termogravimetría a 103°C (Basado en ISO 6496)
% Cenizas	0,672	Método AOAC 942.05, Cap. 4, P. 5
% Fibra	4,292	Método Weende 962.09/90 de la AOAC
% Grasa	0,15	Método AOAC 920.39/90
% Carbohidratos	4,90	Espectrofotometría método de Dubois, 1956
% Proteínas	1,050	Kjeldahl (Basado en NTC 4657)
% Fosforo	0,024	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)
% Calcio	0,015	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)
% Potasio	0,262	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)
mg de Mg en 100g	10,976	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)
mg de Na en 100g	4,284	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)
mg de Fe en 100g	0,994	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)
mg de Zn en 100g	0,017	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)
mg de Cu en 100g	0,126	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)
mg de Mn en 100g	0,070	Espectrofotometría A. A. (Basado en NTC 5151)

*Metabolitos Secundarios*

Polifenoles. El contenido de flavonoides, taninos condensados, fenoles totales y ácidos fenólicos de la guayaba agria se presentan en las Tabla 2 y 3; estos metabolitos secundarios con estructuras polifenólicas, los cuales determinan la actividad antioxidante de las frutas debido a su capacidad para donar electrones y protones y neutralizar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Tabla 2: Contenido de flavonoides, taninos condensados y fenoles totales de *Psidium araca*.

Fenoles Totales	Taninos Condensados	Flavonoides
mg Ácido Gálico Equivalente / 100 g fruta fresca	mg Catequina Equivalente / 100g de fruta fresca	mg Catequina Equivalente / 100g de fruta fresca
385,39 ± 9	502,73 ± 42,50	133,73 ± 1,12

El contenido de fenoles para la guayaba agria fue mayor a los reportados para la guayaba común y superior al contenido reportado para frutas de alta ingesta como la granadilla, la papaya y la manzana (Fu et al., 2011; Contreras – Calderón et al., 2010). Los taninos condensados, proantocianidinas y procianidinas son polímeros formados por unidades de flavan-3-ol (catequina, epicatequina, antocianinas) y se caracterizan por conferirle astringencia a los frutos; son además uno de los principales metabolitos antioxidantes de productos como el té y el cacao donde su contenido puede llegar hasta el 35% de los polifenoles totales. Los contenidos son menores que los encontrados para curuba, té, cacao y algunos arándanos (White et al., 2010, Rojano et al., 2012). Los taninos condensados de la guayaba agria constituyen el 42,6% de los polifenoles totales de este estudio; y puede ser la razón del gran sabor astringente del fruto.

Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en las plantas. Su estructura básica (Flaván) consta de dos grupos fenilos unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado, esta combinación C6-C3-C6 es llamada con frecuencia esqueleto difenil-propano, determinante en su reactividad química (Manach et al., 2004). Los flavonoides poseen un alto poder atrapador de radicales libres, además tienen actividad antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana y coadyuvante en la disminución del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares (Middleton et al., 2000). Para la guayaba agria el contenido de flavonoides fue superior a los reportados para muchas frutas de consumo frecuente como la pera, la manzana, la mora, la frambuesa, la fresa entre otras, y vegetales como la cebolla, el tomate y la zanahoria. Algunos estudios confirman que el género *Psidium* se caracteriza por un alto contenido de flavonoides como la miricetina y apigenina (Sanda et al., 2011).

Los ácidos fenólicos que tienen interés terapéutico son todos aquellos derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico como el cafeico, ferúlico, p-cumárico, elágico; los cuales poseen gran habilidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno. Los ácidos fenólicos encontrados en la guayaba agria son presentados en la Tabla 3, se destaca el alto contenido de ácido elágico. Resultados similares se han encontrado en otras especies del género *Psidium* (Gutierrez et al., 2008). Algunos autores afirman que el ácido elágico tiene como función detectar y restaurar células carentes del gen P53, gen encargado de la apoptosis y del control de la proliferación celular responsable del cáncer; en general los ácidos fenólicos poseen actividad anticancerígena (Wiseman, 2008; World Health Organisation).

Tabla 3. Contenido de ácidos fenólicos en *Psidium araca* determinados por HPLC.

Ácido Elágico	Ácido P-Cumárico	Ácido Clorogénico
mg Ácido Elágico/ 100g de fruta fresca	mg Ácido P-Cumárico/ 100 g fruta fresca	mg de Ácido Clorogénico / 100g de fruta fresca
52,86	27,43	8,42

*Determinación de la capacidad antioxidante*

La actividad antioxidante de un alimento es la expresión de los diferentes componentes polifenólicos, los cuales emplean diferentes mecanismos de acción para neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ERO's). La medida de la capacidad antioxidante de las frutas ha tenido mucha relevancia en los últimos años, porque se puede conocer la resistencia a la oxidación de un producto, la contribución cuantitativa de sustancias antioxidantes aportadas por la fruta para estabilizar un alimento rico en grasas o aceites y la

actividad antioxidante producida por la fruta en el organismo al momento de consumirla (Zulueta et al., 2009). La capacidad antioxidante del extracto acuoso de guayaba agria fue evaluada mediante los métodos espectrofotométricos DPPH, ABTS y FRAP, los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Capacidad antioxidante total (DPPH, ABTS, FRAP y ORAC) de *Psidium araca*

DPPH	ABTS	FRAP
$\mu\text{mol Trolox Equivalente} / 100 \text{ g de fruta fresca}$	$\mu\text{mol Trolox Equivalente} / 100 \text{ g de fruta fresca}$	$\text{mg Ácido Ascórbico Equivalente} / 100 \text{ g de fruta fresca}$
1177,89 $\pm$ 67,18	6679,92 $\pm$ 125,37	623,98 $\pm$ 6,25

Los valores DPPH fueron menores en comparación a los valores ABTS, la diferencia sugiere que los compuestos antioxidante presentes en la fracción evaluada de guayaba agria son altamente hidrofílicos los cuales son más sensibles a la técnica ABTS. El valor ABTS para el extracto acuoso de guayaba fue mayor a los reportados para otras especies del género *Psidium*, entre ellas la guayaba brasilera (*Psidium guineense*) la guayaba común (*Psidium guajava*). El poder reductor medido por el método FRAP es similar al reportado para la guayaba común (*Psidium guajava*), y mucho mayor que otros frutos tropicales como: piña, sandía, maracuyá, melón, tomate de árbol, lulo entre otros (Contreras-Calderon et al., 2010; Fu et al., 2011; Botero et al., 2007)

Las metodologías espectrofotométricas convencionales son una herramienta sencilla y económica; sin embargo, las técnicas espectrofluorimétricas han tenido gran implementación en los últimos años debido a su alta sensibilidad y precisión. El método ORAC mide la habilidad de los polifenoles para atrapar los radicales peróxilos generados in situ, a través de un mecanismo de transferencia de protones HAT (Hydrogen Atom Transfer) y es la técnica más usada para medir el potencial antioxidante total de alimentos y suplementos nutricionales (Wu et al., 2004). En este estudio además se evalúa la capacidad de los extractos acuosos de Guayaba agria para atrapar especies reactivas del oxígeno y nitrógeno total (EROS y ERNS totales) y radical hidroxilo (OH) mediante métodos fluorimétricos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Capacidad atrapadora de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno de *Psidium araca*.

ORAC Radicales peroxilos	Ensayo DCFH Radicales EROS Y ERNS	Ensayo Ácido Tereftálico Radicales hidroxilos
$\mu\text{mol Trolox Equivalente} / 100\text{g de fruta fresca}$	$\mu\text{mol Trolox Equivalente} / 100\text{g de fruta seca}$	$\mu\text{mol DMSO Equivalente} / 100\text{g de fruta seca}$
10333,4 $\pm$ 145,14	6679,92 $\pm$ 125,37	623,98 $\pm$ 6,25

El valor ORAC encontrado para la guayaba agria es más alto que la mayoría de granos, legumbres y frutas, incluidos muchos berries como mortiño (*Vaccinium meridionale*), fresas, uvas, arándanos; y superado solamente por fracciones seleccionadas de extractos de acai (*Euterpe Oleraceae*), algunas especies como orégano seco (*Origanum vulgare*), cúrcuma (*Curcuma longa*), y por algunas flores de plantas de la familia Anacardiaceae (Kang et al., 2010; Schinella et al., 2010). Los requerimientos de ingesta diaria en valores ORAC son aproximadamente entre 3000 y 5000 ORAC's/día, es decir el consumo de un fruto de aproximadamente 100 g de guayaba agria, aportarían la dosis diaria recomendada representando una verdadera fuente nutraceutica.

La actividad atrapadora de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se determinó siguiendo el método descrito por Martín-Romero con algunas modificaciones. Los valores de TEAC para la guayaba agria fueron 52357,90  $\mu\text{mol de Trolox} / 100 \text{ g de fruta seca}$ , superiores a los reportados para la Curuba (28297  $\mu\text{mol de Trolox} / 100 \text{ g de pulpa seca}$ ), sin embargo no se pueden comparar con los de otras frutas por falta de información (Rojano et al., 2012). Los resultados de la capacidad atrapadora de radicales hidroxilos se expresan como equivalentes de DMSO, el cual es una especie altamente reconocida como atrapador de radicales hidroxilo y usado como patrón de referencia en muchos trabajos con técnicas espectrofotométricas (Schinella et al., 2000). Los valores para la guayaba agria fueron 253605,96  $\mu\text{mol de DMSO} / 100 \text{ g de fruta seca}$ , muy superiores a los reportados para la curuba (23 086,1  $\mu\text{mol de DMSO} / 100 \text{ g de pulpa seca}$ ) es de notar que es un valor bastante considerable como una expresión bioactiva.

## CONCLUSION

En conclusión la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles de la guayaba agria son superiores a los reportados para muchas frutas de alta ingesta en américa y el caribe, como la granadilla, la papaya, la manzana, algunos arándanos, la pera, la mora, la frambuesa, la fresa, la piña, la sandía, el maracuyá, el melón, el tomate de árbol, el lulo entre otras, y vegetales como la cebolla, el tomate y la zanahoria. De igual manera, la ingesta de 100g del fruto de Guayaba agria suple los requerimientos diarios de valores ORAC's recomendados por el Departamento Federal de Agricultura de Norteamérica, para mantener un adecuado equilibrio oxidativo. La guayaba agria tiene una alta capacidad atrapadora de especies radicalarias de oxígeno como: peróxilos (ROO•), radicales hidroxilos (OH•). En general la guayaba agria es una fruta con alto potencial nutraceutico aportado por el contenido de polifenoles y reflejada por su actividad antioxidante; con estos resultados se puede promover una mayor ingesta del fruto, permitir además el desarrollo agroindustrial en Colombia y formular otros productos con alto valor agregado a partir de la aplicación de nuevas tecnologías.

## REFERENCIAS

- Atala, E., L. Vásquez, H. Speisky, E. Lissi y C. López-Alarcón, Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology, *Food Chemistry*: 113 (1), 331–335 (2009).
- Benzie, I.F.F. y J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*: 239 (1), 70–76 (1996).
- Botero, M.L., S.C. Ricaurte, C.E. Monsalve y B. Rojano, Capacidad reductora de 15 frutas tropicales, *Scientia Et Technica*: 33 (1), 294-296 (2007).
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*: 28 (1), 25-30 (1995).
- Contreras - Calderon, J., L. Calderon, E. Guerra y B. Garcia, Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia, *Food Research International*: 44 (7), 2047-2053 (2010).
- Fu, L., B.T. Xu, R.Y. Gan, Y. Zhang, E.Q. Xia y H.B. Li, Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits, *Food Chemistry*: 129 (2): 345-350 (2011).
- Groh I.A., Chen, Ch., Lüske, C., Cartus, A.T. y M. Esselen. Plant Polyphenols and Oxidative Metabolites of the Herbal Alkenylbenzene Methyleugenol Suppress Histone Deacetylase Activity in Human Colon Carcinoma Cells. *Journal of Nutrition and Metabolism*: Article ID 821082, 1-10 (2013).
- Gutierrez, R.M., Mitchell, S., y R.V. Solis, *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*: 117 (1), 1–27 (2008).
- Hagerman, A.E. y L.G. Butler, Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin, *Journal Chemistry Ecology*: 15 (6), 1795-1810 (1989).
- Kang, J., Z. Li, T. Wu, G.S. Jensen, A.G. Schauss y X. Wu, Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.), *Food Chemistry*: 122 (3), 610–617 (2010).
- Kelebek, H., S. Selli, A. Canbas y T. Cabaroglu, HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kosan, *Microchemical Journal*: 91 (2), 187-92 (2009).
- Kuskoski, M.E., A.G. Asuero, A.M. Troncoso, J. Mancini-Filho y R. Fett, Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*: 25 (4), 726-732 (2005).
- Lara, C.L., Nerio, S. y L. E. Oviedo, Evaluación fisicoquímica y bromatológica de la guayaba agria (*Psidium araca*) en dos estados de maduración, *Temas agrarios*: 12 (1), 13 – 21 (2007).



- Lopera, Y.E., Fantinelli, J., González-Arbeláez, L.F., Rojano, B., Ríos, J.L., Schinella, G. y S. Moscam. Antioxidant Activity and Cardioprotective Effect of a Non-Alcoholic Extract of *Vaccinium meridionale* Swartz During Ischemia-Reperfusion in Rat. *Evid Based Compl Alt*: 2013, 1 – 10 (2013)
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy y L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*: 79 (5), 727-747 (2004).
- Marinova, D., F. Ribarova y M. Atanassova, Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*: 40 (3), 255-260 (2005).
- Martín-Romero, F.J, Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes, *Reproductive BioMedicine Online*: 17(5), 652-661 (2008).
- Middleton, E.J.R., C. Kandaswami y T. Theoharidesl, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacological Reviews*: 52 (4), 673–751 (2000).
- Murillo, E., Lombo, O., Tique, M. y J.J. Mendez, Potencial Antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms (FABACEAE), *Información Tecnológica*: 18 (6), 65-74 (2007).
- Prior, R.L., X. Wu y K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal Agriculture Food Chemistry*: 53 (10), 4290–4302 (2005).
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radicals in Biology and Medicine*: 26 (9/10), 1231–1237 (1999).
- Rojano, B.A., K. Zapata y F.B. Cortes, Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba), *Revista Cubana de Plantas Medicinales*: 17 (4), 408-419 (2012).
- Romero, M., B. Rojano, J. Mella-Raipán, C.D. Pessoa-Mahana, E. Lissi y C. López-Alarcón, Antioxidant capacity of pure compounds and complex mixtures evaluated by the ORAC-Pyrogallol Red Assay in the Presence of Triton X-100 Micelles, *Molecules*: 15 (9), 6152-6167 (2010).
- Ruxton, C., Gardner, E. y D. Walker, Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence. International. *Journal of Food Science and Nutrition*: 57(3), 249-72 (2006).
- Sanda, K.A., Grema, H.A., Geidman, Y.A. y Y.M. Bukar-Kolo, Pharmacological aspects of *Psidium guajava*: An update. *International Journal of Pharmacology*: 7(3), 316–324 (2011).
- Schinella, G. y otros 6 autores, Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate), *Food Research International*: 42 (10), 1403–1409 (2010).
- Schinella, G., G. Troiani, V. Dávila, P.M. Buschiazzo y H.A. Tournier, Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*, *Biochemical Biophysical Research Communications*: 269 (2), 357-360 (2000).
- Singleton, V.L. y J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*: 16 (3), 144–158 (1965).
- Szliszka, E. y W. Krol, Polyphenols Isolated from Propolis Augment TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: Article ID 731940, 1-10 (2013).
- Wang T.T, Schoene, N.W., Milner, J.A. y Y.S. Kim, Broccoli-derived phytochemicals indole-3-carbinol and 3,30-diindolylmethane exerts concentration-dependent pleiotropic effects on prostate cancer cells: Comparison with other cancer preventive phytochemicals, *Mol Carcinog*: 51, 244–256 (2012).
- White, B.L., L.R. Howard y R.L. Prior, Proximate and Polyphenolic Characterization of Cranberry Pomace, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 58 (7), 4030–4036 (2010).
- Wiseman, M, The Second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Expert Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective, *Proceedings of the Nutrition Society*: 67, 253–256 (2008).

WHO, World Health Organisation), World Cancer Report, International Agency for 405 Research on Cancer, Lyon, (2008).

Wu, X., G.R. Beecher, J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt y R.L. Prior, Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 52 (12), 4026-4037 (2004).

Yang, X.F. y X.Q. Guo, Fe(II)EDTA chelate-induced aromatic hydroxylation of terephthalate as a new method for the evaluation of hydroxyl radical-scavenging ability, *The analyst*: 126(6), 928-932 (2001).

Zulueta, A., M.J. Esteve y A. Frígola, ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food Chemistry*: 114 (1), 310–316 (2009).