



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estudio químico de las propiedades  
sensoriales y biofuncionales de la  
guayaba agria (*Psidium  
friedrichsthalianum* Nied.)**

**Carmen Tatiana Cuadrado Silva**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia

2016



# Estudio químico de las propiedades sensoriales y biofuncionales de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.)

**Carmen Tatiana Cuadrado Silva**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctora en Ciencias-Química**

**Directores:**

Dra. Coralia Osorio Roa

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia

Dra. María Ángeles del Pozo Bayón

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-Universidad Autónoma de Madrid)

**Línea de Investigación:**

Agroalimentaria

**Grupo de Investigación:**

Grupo de investigación Especies Vegetales como Fuente de Aroma, Pigmentos y

Compuestos Bioactivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2016



*A tí,  
hija mía  
que aún, sin ver tus ojos, ni tenerte en mis brazos  
has cambiado mi vida  
y me has acompañado en esta última etapa de un  
largo proceso*



# Agradecimientos

*Deseo expresar mis sinceros agradecimientos:*

❖ A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA por permitirme adelantar los estudios de Doctorado.

❖ Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS), por el apoyo económico recibido a través de la beca para doctorados nacionales, convocatoria 567 del año 2012 y el programa RIFRUTBIO - Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales (contrato N° 0459-2013) dentro del cual se encuentra enmarcado el presente trabajo.

❖ Al grupo de investigación “Especies Vegetales como Fuente de Aroma, Pigmentos y Compuestos Bioactivos” de la Universidad Nacional de Colombia, en cabeza de su directora la Dra. Coralia Osorio, por acogerme y permitirme adelantar el trabajo experimental en sus instalaciones. Especialmente a la Dra. Osorio por la dirección de ésta tesis, su dedicación, ejemplo, y permitir el desarrollo de mis ideas y potencialidades.

❖ Al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-Universidad Autónoma de Madrid), en cabeza de la Dra. María Victoria Moreno-Arribas por acogerme y permitirme realizar la estancia investigativa en sus instalaciones.

❖ A la Dra. María Ángeles del Pozo Bayón, por la codirección de ésta tesis, por su guía, apoyo, colaboración, consejos y sobre todo por su amistad.

❖ Al Profesor Dr. Yoshinori Fujimoto del Department of Chemistry and Materials Science, Institute of technology, Tokyo, por los análisis de RMN.

❖ A la profesora Dra. Diana Sinuco del departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia, por el apoyo en la evaluación sensorial.

❖ A la Dra. Carolina Cueva del CIAL (CSIC-Universidad Autónoma de Madrid), por su orientación en el diseño de los protocolos para la realización de las fermentaciones microbianas *in vitro*.

❖ Al Dr. Pedro Martín-Álvarez del CIAL (CSIC-Universidad Autónoma de Madrid) y a Diana Martín de la Universidad Nacional de Colombia, por la colaboración con los análisis estadísticos.

❖ A los chicos de AROMAS: Paola F., Natalia C., Alicia R., Danilo R., Katherine J., Diana M., Laura P., Juliana G., Johanna T., Elena B., Carolina R. y Camila M., por su colaboración, su compañía, y las notas de humor dentro y fuera del laboratorio.

❖ A las chicas del CIAL: Irene G., Ewa W., Adelaida E., Marta F., María P. y Amalia A., quienes fueron un gran apoyo lejos de mi hogar y por acogerme como a una más.

❖ A los profesores Oscar Osorno y Leonardo Castellanos que a pesar de no hacer parte de éste trabajo, siempre han contribuido a mi formación académica y personal, por su amistad y su apoyo incondicional.

❖ A mis amigas Juana, Ana-Catalina, Julie-Pauline, Ivón-Maritza y Ana-Patricia, por su amistad incondicional y acompañarme en los momentos más difíciles durante estos años.

❖ A mi esposo Edwar quien llegó a mi vida en el lugar y momento menos esperado, y se quedó para compartir nuestros caminos y sueños. Por estar en cada uno de los buenos y malos momentos durante el desarrollo de la tesis, por esto y mucho más te amo.

❖ Y sobre todo a mi madre Cecilia que a pesar de todos los azares de la vida, aún está conmigo, es el motor de mi vida, el mejor de mis ejemplos a seguir, y la fuerza que me impulsa a salir adelante y querer ser mejor cada día... No me alcanzan las palabras para agradecer por tanto.

❖ A Dios quien ha dispuesto todo según su voluntad y quien me sorprende cada día con nuevas alegrías.



## Resumen

Los frutos frescos de guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) se caracterizan por tener un aroma muy agradable e intenso, propiedad organoléptica que es uno de los principales atractivos para su consumo, al igual que su composición química enriquecida en compuestos fenólicos. Esta tesis de doctorado se enfocó hacia la caracterización química de los compuestos orgánicos asociados a las propiedades sensoriales y biofuncionales de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.).

En primer lugar se caracterizaron 18 compuestos orgánicos volátiles activos olfativamente, por medio de la aproximación sensórica, sobre el extracto SAFE (*Solvent-Assisted Flavour Evaporation*) de los frutos frescos de guayaba agria. Se identificaron ésteres alifáticos, compuestos alifáticos tipo C<sub>6</sub> y compuestos de tipo azufrado, como responsables de las notas olfativas frutal, dulce, verde, tropical, y azufrada, siendo los compuestos impacto del aroma: el butanoato de etilo, el hexanoato de etilo y el (Z)-3-hexenal. Los compuestos azufrados, disulfuro de dimetilo, 2-metilditiolano, metional, acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol y bis(metiltio)metano, se reportan por primera vez como compuestos activos olfativamente en *Psidium friedrichsthalianum* Nied. y responsables del sello característico del aroma de esta fruta. También se reporta por primera vez el rol del hexil- $\beta$ -D-glucopiranosido y el S-3-(1-hexanol)-L-cisteína, como precursores del 1-hexanol y 3-sulfanil-1-hexanol por hidrólisis enzimática, respectivamente.

Teniendo en cuenta estos resultados, y con la intención de profundizar en el impacto sensorial que los precursores de aroma podrían tener durante la ingestión de la fruta, se decidió evaluar el papel de la microbiota oral humana en la hidrólisis de los precursores y formación de las correspondientes moléculas odorantes. Para ello, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* con los dos extractos de precursores de aroma estudiados (glicósidos y conjugados de S-cisteína) que se incubaron en presencia de la microbiota aislada de la cavidad oral humana. Se encontró que las bacterias orales presentaban capacidad hidrolítica y eran responsables de la producción de 1-hexanol y del 3-sulfanil-

1-hexanol. También se determinaron otros compuestos volátiles provenientes del metabolismo de la microbiota oral, como el 1-butanol, el 3-metilbutanol, el ácido acético, el benzaldehído y el 4-etilbenzaldehído. Asimismo se comprobó que algunas bacterias de la cavidad oral en presencia de los extractos de precursores de aroma disminuyen su población, lo cual sugiere su potencial uso benéfico para contribuir a la salud bucal humana.

Adicionalmente, se analizaron las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos y con potencial efecto antioxidante frente al radical ABTS, obtenidas por partición con disolventes (éter etílico, acetato de etilo, butanol y agua), y posterior fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía sobre RP-18. Algunos de los compuestos identificados por HPLC-ESI/MS en la fracción de acetato de etilo, fueron el ácido elágico, la procianidina B1 y la procianidina B2. Adicionalmente, se identificaron el ácido abscísico y el ácido 4'-*O*-*D*-glucopiranosido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico por medio de HPLC-ESI/MS y RMN <sup>1</sup>H. Debido a la complejidad de las fracciones, se realizó un análisis metabolómico por UHPLC-Q/TOF/MS de las fracciones obtenidas con acetato de etilo (F.AcOEt) y butanol (F.BuOH), que permitió la identificación tentativa de 31 compuestos de tipo fenólico, por comparación con la base de datos Metlin. Así mismo, mediante el análisis por UPLC-ESI/TQ/MS/MS tándem, empleando 63 compuestos como patrones de referencia para el seguimiento de iones en modo de reacción múltiple (MRM), se cuantificaron 22 compuestos de tipo fenólico en las fracciones F.AcOEt y F.BuOH de guayaba agria. Con excepción del ácido elágico y el ácido 4'-*O*-*D*-glucopiranosido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico, todos los compuestos fenólicos se reportan por primera vez en este trabajo como constituyentes de la guayaba agria *Psidium friedrichsthalianum* Nied.

Por último, se realizó la fermentación *in vitro* de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos (F.AcOEt y F.BuOH) empleando la microbiota representativa del colon aislada a partir de heces humanas de tres voluntarios sanos. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la microbiota intestinal humana sobre las fracciones

de guayaba agria enriquecidas en compuestos fenólicos, contribuyendo así al estudio de su biodisponibilidad. Como resultado exclusivo de esta fermentación, empleando UPLC-ESI/TQ/MS/MS se identificaron los siguientes 12 compuestos fenólicos: el ácido gálico, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético, el ácido 3-O-metilgálico, la (+)-catequina, el ácido cafeico, el ácido vainillínico, el ácido 3-hidroxifenilacético, el ácido 3-(4-hidroxifenilpropanoico), el ácido 3-(3-hidroxifenilpropanoico), el ácido fenilacético, la hidroxifenil valerolactona, y el ácido hidroxifenil-4-hidroxicinámico. También se observó la desaparición completa de las procianidinas B1 y B2 por acción de la microbiota intestinal, sugiriendo su transformación en compuestos fenólicos de menor tamaño, los cuales son más fácilmente absorbibles en el intestino grueso. También, se comprobó que las fracciones F.AcOEt y F.BuOH promovían un aumento de la población de las bacterias lácticas que son benéficas para la salud y una disminución en los firmicutes (bacterias asociadas con problemas de obesidad), convirtiendo así a los frutos de guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied) en un alimento con efectos prebiótico.

**Palabras clave:** *Psidium friedrichsthalianum* Nied, compuestos activos olfativamente, compuestos azufrados, compuestos fenólicos, microbiota oral, microbiota intestinal

## Abstract

Fresh fruits of sour guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) are distinguished by a very pleasant and intense aroma. This organoleptic property is one of the main features for their consumption, as well as their chemical composition, phenolic compound-rich. The aim of this doctoral thesis was to chemical characterize organic compounds associated with the sensory and biofunctional properties of sour guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.).

First, eighteen odour-active volatiles compounds were characterized on the SAFE (Solvent Assisted Flavour Evaporation) extract, through the sensomics approach. Aliphatic esters, C<sub>6</sub> aliphatic compounds, and sulphur compounds were identified as responsible for the fruity, sweet, green, tropical, and sulphur odour notes, being the key aroma compounds: ethyl butanoate, ethyl hexanoate, and (Z)-3-hexenal. The sulphur compounds: dimethyl disulphide, 2-methyldithiolane, methional, 3-sulfanylhexyl acetate, 3-sulfanyl-1-hexanol, and bis(methylthio)methane, are reported here for the first time as odour active volatile compounds of *Psidium friedrichsthalianum* Nied., responsible for its characteristic aroma. It is also reported for the first time the role of hexyl  $\beta$ -D-glucopyranoside and S-3-(1-hexanol)-L-cysteine as precursors of the 1-hexanol and 3-sulfanyl-1-hexanol by enzymatic hydrolysis, respectively.

Based on these results, the role of the human oral microbiota on the hydrolysis of precursors and formation of odorant compounds, was studied with the aim to study the sensory impact of flavour precursors during the fruit ingestion. For this purpose, *in vitro* experiments were performed with both flavour precursor extracts (glycosides and S-cysteine derivatives) which were incubated with the microbiota isolated from human oral cavity. The bacteria hydrolytic ability and their effect on the 1-hexanol and 3-sulfanyl-1-hexanol release were confirmed. Other volatile compounds produced by the metabolism of oral microbiota were identified as: 1-butanol, 3-methylbutanol, acetic acid, benzaldehyde, and 4-ethylbenzaldehyde. The effect of flavour precursor extracts on the

growth inhibition of oral cavity bacteria was also noticed, such suggesting a potential beneficial use of these extracts to the human oral health.

Additionally, the phenolic-rich fractions obtained by solvent partition (ethyl ether, ethyl acetate, butanol, and water) and subsequent size exclusion and RP-18 chromatography, exhibiting antioxidant activity against ABTS free radical were analysed. Some the compounds identified by HPLC-ESI/MS from ethyl acetate fraction were: ellagic acid, procyanidin B1, and procyanidin B2. Also the abscisic acid, and 3,3',4-tri-*O*-methylellagic acid-4'-*O*-*D*-glucopyranoside, were identified by HPLC-ESI/MS, the and <sup>1</sup>H NMR. Due to the complexity of fractions, a UHPLC-Q/TOF/MS metabolomic analysis was performed on ethyl acetate (F.AcOEt), and butanol (F.BuOH) fractions, tentatively identifying 31 phenolic compounds, by comparison with the Metlin database. Likewise, a UPLC-ESI/TQ/MS/MS tandem analysis, by using 63 compounds as reference standards for monitoring ions on multiple reaction (MRM) mode, allows to quantify 22 phenolic compounds in the F.AcOEt and F. BuOH fractions from sour guava. All of the compounds with exception of ellagic acid, and 3,3',4-tri-*O*-methylellagic acid-4'-*O*-*D*-glucopyranoside, are reported for the first time in this work, as constituents of sour guava *Psidium friedrichsthalianum* Nied.

Finally, the *in vitro* fermentation of phenolic-rich fractions (F.AcOEt and F.BuOH) was performed by using the representative colonic microbiota isolated from human faeces of three healthy volunteers. The purpose of this experiment was to evaluate the effect of human colonic microbiota on the phenolic compounds of sour guava, such contributing to the study of their bioavailability. As result of this fermentation, by using the UPLC-ESI/TQ/MS/MS technique, twelve phenolic compounds were identified: gallic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3-*O*-metilgallic acid, (+)-catechin, caffeic acid, vanillic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, 3-(4-hydroxyphenylpropanoic) acid, 3-(3-hydroxyphenylpropanoic) acid, phenylacetic acid, hydroxyphenyl valerolactone, and hydroxyphenyl-4-hydroxyvaleric acid. The complete disappearance of procyanidins B1 and B2 by gut microbiota action was observed; this result suggests their transformation on smaller phenolic compounds which are more easily absorbed in the human colon.

Also, it was observed a growth-promoting effect of F.AcOEt and F.BuOH fractions on the population of lactic bacteria that are beneficial to health as well as a decrease in the obesity-related firmicutes bacteria population, such suggesting a role of sour guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied) fruits as food with prebiotic effects.

**Keywords:** *Psidium friedrichsthalianum* Nied., odour-active volatiles, sulphur compounds, phenolic compounds, oral microbiota, gut microbiota.

# Contenido

	PÁG.
AGRADECIMIENTOS .....	VII
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT .....	XIV
CONTENIDO .....	1
LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABLAS .....	7
ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	5
1.1. DINÁMICA DEL COMERCIO DE LAS FRUTAS.....	5
1.2. PROPIEDADES SENSORIALES DE LAS FRUTAS - EL <i>FLAVOUR</i> .....	6
1.2.1. <i>El aroma en las frutas</i> .....	7
1.2.1.1. Métodos de análisis para el estudio del aroma en alimentos.....	9
1.2.1.2. El aroma de algunas frutas nativas.....	14
1.2.2. <i>Compuestos azufrados en el aroma de alimentos</i> .....	16
1.2.3. <i>PRECURSORES DE AROMA NO VOLÁTILES</i> .....	17
1.2.3.1. Precursores de tipo glicosídico.....	17
1.2.3.2. Precursores de tioles de tipo S-cisteinilados.....	19
1.3. PROPIEDADES BIOFUNCIONALES DE LAS FRUTAS-COMPUESTOS FENÓLICOS.....	22
1.4. EFECTO DE LA MICROBIOTA ORAL HUMANA EN EL METABOLISMO DE COMPUESTOS PRECURSORES DE AROMA.....	29
1.5. EFECTO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA EN EL METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	32

1.6.	LA GUAYABA AGRIA <i>PSIDIUM FRIEDRICHSTHALIANUM</i> NIED. ....	38
<b>2.</b>	<b>EL AROMA DE LA GUAYABA AGRIA (<i>PSIDIUM FRIEDRICHSTHALIANUM</i> NIED.) Y SU GENERACIÓN A PARTIR DE PRECURSORES .....</b>	<b>43</b>
2.1.	GENERALIDADES.....	43
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	44
2.2.1.	<i>Generalidades, equipos</i> .....	44
2.2.2.	<i>Materiales y reactivos</i> .....	46
2.2.3.	<i>Material vegetal y caracterización</i> .....	47
2.2.4.	<i>Extracción de los compuestos volátiles</i> .....	47
2.2.5.	<i>Identificación de los compuestos activos olfativamente</i> .....	48
2.2.6.	<i>Aislamiento de compuestos azufrados por medio de gel de agarosa mercurada</i> .....	48
2.2.7.	<i>Cuantificación de los compuestos activos olfativamente</i> .....	49
2.2.8.	<i>Determinación del umbral de olor en agua del butanoato de linalilo</i> .....	50
2.2.9.	<i>Evaluación sensorial del aroma</i> .....	51
2.2.10.	<i>Análisis de volátiles enlazados glicosídicamente</i> .....	52
2.2.11.	<i>Análisis de volátiles enlazados a S-cisteína</i> .....	53
2.2.12.	<i>Análisis Estadístico</i> .....	54
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	54
2.3.1.	<i>Identificación de los compuestos volátiles activos olfativamente</i> .....	54
2.3.2.	<i>Cuantificación de los compuestos volátiles activos olfativamente y experimentos de recombinación de aroma</i> .....	57
2.3.3.	<i>Aislamiento de compuestos azufrados por medio de gel de agarosa mercurada</i> .....	61
2.3.4.	<i>Precursores de aroma no volátiles</i> .....	62
2.3.4.1.	<i>Precursores de tipo glicosídico</i> .....	63
2.3.4.2.	<i>Precursores conjugados a S-cisteína</i> .....	66
<b>3.</b>	<b>IMPACTO DE LA MICROBIOTA ORAL HUMANA SOBRE EXTRACTOS DE PRECURSORES DE AROMA (GLICOSIDADOS Y CISTEINILADOS) AISLADOS A PARTIR DE <i>PSIDIUM FRIEDRICHSTHALIANUM</i> NIED. EMPLEANDO CONDICIONES <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>71</b>
3.1.	GENERALIDADES.....	71

---

3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
3.2.1.	<i>Generalidades</i> .....	74
3.2.2.	<i>Preparación de las muestras de saliva</i> .....	74
3.2.3.	<i>Experimentos in vitro con los precursores de aroma</i> .....	75
3.2.4.	<i>Extracción de compuestos volátiles después de la incubación de los precursores con la microbiota oral por HS-MEFS</i> .....	77
3.2.5.	<i>Análisis por CG-EM de los compuestos volátiles producidos por la acción de la microbiota oral sobre los de precursores de aroma</i> .....	78
3.2.6.	<i>Recuento de microorganismos característicos de la cavidad oral humana</i> .....	79
3.2.7.	<i>Análisis estadístico</i> .....	79
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
3.3.1.	<i>Transformaciones microbianas de los compuestos precursores de aroma provenientes de P. friedrichsthalianum Nied.</i> .....	80
3.3.1.1.	<i>Impacto de la microbiota oral sobre los precursores glicosídicos</i> .....	80
3.3.1.2.	<i>Fermentación de precursores cisteinilados</i> .....	87
3.3.2.	<i>Efecto de extractos precursores de aroma sobre la microbiota oral humana</i> .....	91
3.3.2.1.	<i>Efecto de los precursores glicosídicos sobre la microbiota oral</i> .....	92
3.3.2.2.	<i>Efecto de los precursores cisteinilados sobre la microbiota oral</i> .....	94
4.	<b>CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA GUAYABA AGRIA (PSIDIUM FRIEDRICHSTHALIANUM NIED.) CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>97</b>
4.1.	GENERALIDADES.....	97
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	98
4.2.1.	<i>Materiales y Reactivos</i> .....	99
4.2.2.	<i>Extracción de los compuestos de tipo fenólico</i> .....	99
4.2.3.	<i>Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteous</i> .....	100
4.2.4.	<i>Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS</i> .....	101
4.2.5.	<i>Fraccionamiento del extracto enriquecido y purificación de compuestos fenólicos</i> .....	102
4.2.6.	<i>Análisis metabolómico por UHPLC Q/TOF MS de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos</i> .....	104

4.2.7.	<i>Análisis dirigidos por UPLC-ESI-TQ EM/EM a la determinación de compuestos de tipo fenólico .....</i>	105
4.2.8.	<i>Análisis estadístico.....</i>	108
4.3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	108
4.3.1.	<i>Identificación de los compuestos fenólicos por espectrometría de masas y/o RMN113</i>	
4.3.2.	<i>Análisis metabolómico de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos ....</i>	122
4.3.3.	<i>Análisis por UPLC-EM dirigidos a la determinación de compuestos de tipo fenólico</i>	126
5.	<b>IMPACTO DE LA MICROBIOTA FECAL HUMANA EN EL METABOLISMO DE FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN FENOLES AISLADAS A PARTIR DE <i>PSIDIUM FRIEDRICHSTHALIANUM</i> NIED. Y EFECTO DE ESTAS FRACCIONES EN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS REPRESENTATIVOS DE LA MICROBIOTA FECAL .....</b>	131
5.1.	<b>GENERALIDADES.....</b>	131
5.2.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	133
5.2.1.	<i>Materiales y Reactivos .....</i>	133
5.2.2.	<i>Preparación de las muestras fecales .....</i>	134
5.2.3.	<i>Fermentación <i>in vitro</i> con bacterias intestinales .....</i>	134
5.2.4.	<i>Recuento de microorganismos propios del intestino humano .....</i>	136
5.2.5.	<i>Análisis estadístico.....</i>	136
5.3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	137
5.3.1.	<i>Efecto de las fracciones enriquecidas en fenoles sobre la microbiota intestinal humana</i>	138
5.3.2.	<i>Metabolismo de los compuestos fenólicos provenientes de <i>P. friedrichsthalianum</i> Nied. por la microbiota intestinal .....</i>	142
6.	<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	151
7.	<b>PUBLICACIONES Y PARTICIPACION EN EVENTOS.....</b>	153
7.1.	<b>ARTÍCULOS CIENTÍFICOS .....</b>	153
7.2.	<b>PRESENTACIONES EN CONGRESOS .....</b>	153

---

7.3. PASANTÍA Y CURSOS .....	154
7.4. SOPORTES.....	154
<b>ANEXOS .....</b>	<b>167</b>
A. ANEXO: ESPECTROS DE MASAS OBTENIDOS MEDIANTE CG-EM PARA LOS COMPUESTOS IMPACTO DEL AROMA DE LOS FRUTOS DE LA GUAYABA AGRIA ( <i>PSIDIUM FRIEDRICHSTHALIANUM</i> NIED.) Y LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE LOS PRECURSORES ...	167
B. ANEXO: FORMATO UTILIZADO EN EL PANEL SENSORIAL REALIZADO PARA DETERMINAR EL UMBRAL DE OLOR EN AGUA DEL BUTANOATO DE LINALILO .....	169
C. ANEXO: FORMATO UTILIZADO EN EL PANEL SENSORIAL REALIZADO PARA LA EVALUACIÓN DE LOS RECOMBINADOS RESPECTO A LA FRUTA FRESCA .....	171
D. ANEXO: LINEALIDAD DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE AROMA, LOD Y LOQ <sup>131</sup>	173
E. ANEXO: RESULTADOS RMN <sup>1</sup> H PARA LOS COMPUESTOS 5 Y 6 .....	175
F. ANEXO: LINEALIDAD DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR UPLC-ESI-TQ EM/EM, LOD Y LOQ <sup>131</sup> .....	177
G. ANEXO: CROMATOGRAMAS CONSTRUIDOS A PARTIR DE CADA UNA DE LAS SEÑALES MRM SOBREPUESTAS PARA LAS FRACCIONES F. ACOEt (A) Y F. BUOH (B).....	179
H. ANEXO: CONCENTRACIONES DE MICROBIOTA LOG <sub>10</sub> UFC/ML EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN DE LAS MUESTRAS F.ACOEt, F.BUOH Y RAFTILINA (PREBIÓTICO).....	181
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>183</b>



# Lista de figuras

PÁG.

Figura 1. Perfiles de aroma de la gulupa en diferentes estados de madurez, madura, pintona y verde. <sup>21</sup> .....	9
Figura 2. Fotografía tomada al equipo para extracción de aroma asistida por disolvente (SAFE), en la extracción realizada a la guayaba agria.....	10
Figura 3. Estructuras químicas de algunos compuestos azufrados volátiles encontrados en alimentos.....	17
Figura 4. Ruta metabólica de la glutatona para los precursores cisteinilados del 3-sulfanil-1-hexanol.....	20
Figura 5. Estructuras químicas de los principales compuestos tipo fenólico encontradas en alimentos. <sup>63</sup> .....	23
Figura 6. Estructuras químicas de los compuestos daidzeina y genisteina. <sup>66</sup> .....	25
Figura 7. Estructuras químicas de los compuestos luteolina y quercetina.....	27
Figura 8. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos encontrados en la familia Myrtaceae. <sup>76,82</sup> .....	28
Figura 9. Microbiota representativa asociada al cuerpo humano.....	29
Figura 10. Interacciones entre los componentes de los alimentos funcionales y la microbiota intestinal. <sup>97</sup> .....	34
Figura 11. Ruta metabólica y metabolitos comunes obtenidos a partir de la degradación por microbiota intestinal de los compuestos fenólicos. Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico (1), floroglucinol (2), ácido 2-(3,4-dihidroxifenil)acético (3), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (4), pirogalol (5), catecol (6), fenol (7), resorcinol (8). <i>Pasos demostrados (líneas continuas), pasos hipotéticos (líneas discontinuas).</i> <sup>99</sup> .....	35
Figura 12. Metabolitos bacterianos obtenidos a partir del ácido elágico. Incremento del metabolismo involucra más lipofilicidad y absorción intestinal, y disminución de la actividad antioxidante. <sup>100</sup> .....	36

- Figura 13. Fotografía tomada a los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) provenientes de Montería, Córdoba, Colombia. .... 38
- Figura 14. Estructuras químicas de los compuestos identificados en los frutos *Psidium friedrichsthalianum* Nied. provenientes de Homestead, la Florida, USA. 1,5-dimetilcitrato (9), 1-*O-trans*-cinamoil- $\beta$ -D-glucopiranososa (10), ácido elágico (11), miricetina (12), sinapicaldehído 4-*O*- $\beta$ -D-glucopiranososa (13), ácido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico-4'-*O*-D-glucopiranosido (14), quercitrina (15), 1,3-*O*-diferuloilglicerol (16), y quercetina (17).<sup>11</sup> ..... 41
- Figura 15. Perfil cromatográfico correspondiente a los compuestos volátiles aislados por destilación SAFE de los frutos de guayaba agria en comparación con el AEDA. Los números de los picos corresponden a los números de compuestos de la tabla 3 en orden de elución en la columna FFAP. .... 55
- Figura 16. Determinación del factor de respuesta (FR) del hexanoato de etilo. [analito]=concentración del analito (hexanoato de etilo); [estándar]=concentración del estándar interno (cinamato de etilo);  $A_{\text{analito}}$ = área del analito;  $A_{\text{estándar}}$ = área del estándar interno. .... 58
- Figura 17. Perfil sensorial de aroma de los frutos de guayaba agria, y los recombinados con y sin los compuestos no cuantificables. .... 61
- Figura 18. Análisis por CG en columna FFAP de la fracción enriquecida en compuestos azufrados aislados de los frutos de guayaba agria obtenidos por aislamiento por cromatografía de afinidad sobre gel de agarosa mercurada. Los números corresponden con los usados en la Tabla 3. .... 62
- Figura 19. A. Perfil HPLC sobre columna KINETEX C<sub>18</sub> usando detector UV a  $\lambda$  254 nm. B. TIC. C. Espectro de masas obtenido por HPLC-MS ESI en modo positivo para el pico a 2,7 minutos. D. Análisis por CG sobre columna FFAP de los compuestos volátiles liberados tras la hidrólisis enzimática del extracto glicosídico de los frutos de guayaba agria. Fenol es el estándar interno para control de la hidrólisis. .... 64
- Figura 20. Propuesta de correlación biogénica de algunos compuestos volátiles activos olfativamente en la fruta g. agria (LOX: lipoxigenasa, HPL: hidroperóxido liasa,

---

AER: alquenalo oxidoreductasa, ADH: alcohol deshidrogenasa (Tomado de Osorio *et al*, 2010).<sup>118</sup> Los números corresponden a los usados en la Tabla 3..... 66

Figura 21. A) Análisis por HPLC-MS usando columna KINETEX C<sub>18</sub> y detector UV a  $\lambda$  254 nm de precursores cisteinilados de guayaba agria. B) TIC en modo de detección SIM siguiendo los iones  $m/z$  222, 220, 122 y 120. C) Análisis por CG sobre columna FFAP de los compuestos volátiles liberados tras la hidrólisis enzimática del extracto de precursores cisteinilados de los frutos de guayaba agria. D) Detección en modo SIM siguiendo los iones  $m/z$  55, 59, 77 y 101..... 67

Figura 22. Propuesta de correlación biogénica de algunos de los compuestos activos olfativamente encontrados en los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. Los números corresponden a los asignados en la Tabla 3 ..... 69

Figura 23. Cromatograma de gases obtenido para el producto de la fermentación con microbiota oral del estándar octil- $\beta$ -D-glucopiranosido y su respectivo espectro de masas, en columna DB-wax ..... 81

Figura 24. Cromatogramas obtenidos por CG-EM de la incubación en condiciones anaerobias del extracto glicosídico y la microbiota oral a 0h y 24h (A<sub>anaero</sub>), el blanco de extracto de glicósidos en incubación anaerobia a 24h (BA<sub>anaero</sub>) y el control negativo (medio de cultivo + saliva) (BM<sub>anaero</sub>) en incubación anaerobia a 24h. Los números de los picos corresponden a los números de compuestos de la Tabla 5 en orden de elución en la columna DB-WAX..... 84

Figura 25. Agrupación de los compuestos obtenidos en los ensayos según las condiciones de incubación (aerobia o anaerobia), mediante el análisis estadístico discriminante por método cuadrado ..... 85

Figura 26. Análisis de componentes principales (PCA) en donde se muestra la agrupación de los compuestos por experimento. A. Extracto glicosídico, BA. Blanco de extracto glicosídico, BM. Blanco de crecimiento bacteriano..... 86

Figura 27. PCA discriminante para cada una de las muestras a los diferentes tiempos de muestreo. A. Extracto glicosídico, BA. Blanco de extracto glicosídico, BM. Blanco de crecimiento bacteriano..... 87

- Figura 28. TIC obtenido de la incubación del estándar *S*-carboximetil-*L*-cisteína con microbiota oral a tiempo cero (trazo negro) y a 24h (trazo azul), modo SIM. \* Señal correspondiente al producto de hidrólisis..... 88
- Figura 29. Cromatograma obtenido por CG-EM para la fermentación anaerobia del extracto de precursores cisteinilados, y el TIC obtenido en modo SIM siguiendo los iones en *m/z* 55, 59, 73 y 101. Los números de los picos corresponden a los números de compuestos de la tabla 6 en orden de elución en la columna DB-WAX. El pico 17 fue identificado como el 3-sulfanil-1-hexanol..... 90
- Figura 30. PCA discriminante en donde se muestra la agrupación de los compuestos volátiles determinados, según el experimento ensayado: A. Extracto cisteinilado, BA. Blanco de extracto cisteinilado, BM. Blanco de crecimiento bacteriano..... 91
- Figura 31. Cambios en los grupos de poblaciones bacterianas durante la incubación del extracto glicosídico y el octil  $\beta$ -*D*-glucopiranosido, por acción de la microbiota oral humana..... 92
- Figura 32. Cambios en los grupos de poblaciones bacterianas características de la cavidad oral durante la incubación con el extracto de precursores cisteinilados y la *S*-carboximetil-*L*-cisteína..... 95
- Figura 33. Diagrama de flujo del esquema de fraccionamiento utilizado, para la caracterización de compuestos fenólicos en *Psidium friedrichsthalianum* Nied.103
- Figura 34. Análisis por HPLC-MS de las fracciones de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. usando columna  $C_{18}$  Shimadzu. A. Fracción de éter etílico, B. F.AcOEt, C. F.BuOH ..... 110
- Figura 35. Perfiles cromatográficos (HPLC-MS, columna  $C_{18}$  Shimadzu) obtenidos para las subfracciones provenientes del fraccionamiento de F.AcOEt sobre Toyopearl HW-40S (F.1. - F.4.)..... 113
- Figura 36. Perfil cromatográfico (HPLC-MS, columna  $C_{18}$  Shimadzu) de la fracción F. AcOEt2. 1) tokinolido B\*, 2) procianidina B1\*, 3) procianidina B2\*, 4) ácido elágico, (\*identificados tentativamente) ..... 114

---

Figura 37. Espectros de masas en modo positivo (A) y negativo (B) para el compuesto 1 (tokinolido B).....	114
Figura 38. Espectros de masas en modo positivo (A) y negativo (B) para el compuesto 2 (procianidina B1).....	115
Figura 39. Espectros de masas en modo positivo (A) y negativo (B) para el compuesto 3 (procianidina B2).....	116
Figura 40. Espectros de masas en modo positivo (A) y negativo (B) para el compuesto 4 (ácido elágico).....	116
Figura 41. A) Cromatograma (HPLC-MS, columna C <sub>18</sub> Shimadzu) correspondiente a la fracción F.2.3, el compuesto 5 corresponde al ácido 4'-O-D-glucopiranosido 3,3',4-tri-O-metilelágico. B) Espectros de masas en modo positivo (evento 1) y negativo (evento 2) para el compuesto 5.....	117
Figura 42. A) cromatograma correspondiente al compuesto 5 purificado, B) Espectro de masas en modo positivo, C) Espectro de masas en modo negativo, D) Espectro de RMN <sup>1</sup> H en DMSO deuterado (400 MHz) .....	118
Figura 43. A) Cromatograma obtenido para el compuesto 6 purificado (ácido abscísico), B) Espectro de masas en modo positivo, C) Espectro de masas en modo negativo, D) Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) .....	120
Figura 44. Estructuras correspondientes a los compuestos identificados en el fraccionamiento direccionado a compuestos de tipo fenólico. (1) tokinolido B*, (2) procianidina B1*, (3) procianidina B2*, (4) ácido elágico, (5) ácido 4'-O-D-glucopiranosido 3,3',4-tri-O-metilelágico, y (6) ácido abscísico, (*identificados tentativamente con base en su espectro de masas) .....	121
Figura 45. TICs obtenidos para las fracciones F.AcOEt (línea negra) y F.BuOH (línea roja), mediante el análisis UHPLC Q/TOF MS usando columna Agilent ZORBAX C <sub>8</sub> HD.....	123
Figura 46. TIC correspondiente al ion 305,0675 m/z abstraído del TIC completo (F.AcOEt línea rosa, F. BuOH línea negra), en el análisis UHPLC Q/TOF MS usando columna Agilent ZORBAX C <sub>8</sub> HD .....	123
Figura 47. Búsqueda en Metlin del ión 305,0675 m/z. <sup>140</sup> .....	124

- Figura 48. Diseño experimental para un voluntario, matraces A-F. A. Fermentación F.AcOEt, B. blanco sin suspensión fecal para F.AcOEt, C. Fermentación F.BuOH, D. blanco sin suspensión fecal para F.BuOH, E. Control positivo de crecimiento con el prebiótico raftilina, F. Control negativo inoculo fecal..... 135
- Figura 49. Recuentos iniciales de microbiota presente en cada individuo de estudio. A) individuo A, B) individuo B, C) individuo C. .... 139
- Figura 50. Cambios en los grupos de poblaciones bacterianas (promedio de los tres individuos) durante la fermentación de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos (F.AcOEt y F.BuOH) en un cultivo fecal a pH controlado. .... 140
- Figura 51. Evolución de algunos compuestos (Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido benzoico,  $\gamma$ -valerolactona, ácido hipúrico y ácido hidroxifenil-4-hidroxicinámico) durante el tiempo de fermentación con microbiota fecal (t=0h, 5h, 10h, 24h, 48h). Muestra A (F.AcOEt, trazo azul), muestra B (F.BuOH, trazo rojo), muestra BA (blanco F.AcOEt, trazo verde), muestra BB (blanco F. BuOH, trazo fucsia), muestra BB (blanco de crecimiento bacteriano, trazo negro) ..... 147
- Figura 52. Análisis estadístico por PCA teniendo en cuenta: 1) el tipo de muestra A: F.AcOEt, B: F.BuOH, BA: Blanco para F.AcOEt, BB: Blanco para F.BuOH, BM: Blanco crecimiento bacteriano. 2) El individuo de prueba, 1, 2 ó 3. 3) los tiempos de muestreo, t=0h, 5h, 10h, 24h y 48h..... 149

## Lista de tablas

	PÁG.
Tabla 1. Algunos compuestos biofuncionales en alimentos y su función fisiológica. <sup>97</sup> .....	33
Tabla 2. Parámetros cuantificados en la determinación de nutrientes de los frutos de <i>Psidium friedrichsthalianum</i> Nied. provenientes de Guatemala. <sup>13</sup> .....	40
Tabla 3. Compuestos volátiles activos olfativamente detectados en el extracto SAFE de los frutos de la guayaba agria ( <i>Psidium friedrichsthalianum</i> Nied.). Compuestos volátiles obtenidos por la hidrólisis enzimática y ácida de precursores glicosídicos y por S-cisteína conjugados. ....	56
Tabla 4. Resultados de la cuantificación de los compuestos volátiles activos olfativamente aislados a partir de los frutos de guayaba agria ( <i>Psidium friedrichsthalianum</i> Nied.).....	59
Tabla 5. Compuestos volátiles provenientes de la fermentación microbiana del extracto glicosídico de los frutos de la guayaba agria ( <i>Psidium friedrichsthalianum</i> Nied.) y el tiempo de incubación en el que se detectaron.....	82
Tabla 6. Compuestos volátiles determinados en los medios de cultivo incubados con extractos de precursores cisteinilados aislados de los frutos de la guayaba agria ( <i>Psidium friedrichsthalianum</i> Nied.) y en los controles respectivos (BA: sin microbiota oral y extractos cisteinilados y BM: con microbiota oral y sin extracto cisteinilado). La tabla muestra a su vez los tiempos en los que se determinaron la máxima concentración de compuestos volátiles.....	89
Tabla 7. Transiciones MRM para la detección de compuestos de tipo fenólico.....	106
Tabla 8. Cantidad aislada, cantidad de fenoles totales y actividad antioxidante frente a los radicales ABTS de las fracciones de <i>P. friedrichsthalianum</i> Nied. ....	111
Tabla 9. Listado de la caracterización tentativa realizada mediante metabolómica.....	124
Tabla 10. Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados mediante el análisis dirigido en (mg/g) de las fracciones de estudio .....	127
Tabla 11. Estadística descriptiva, análisis de ANOVA para la determinación de las variables relevantes en el estudio.....	143



# Abreviaturas

<b>ABREVIATURA</b>	<b>Término</b>
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ACN	Acetonitrilo
AED	Detector de emisión atómica
AEDA	<i>Aroma Extract Dilution Analysis</i>
CC	Cromatografía en columna
CG	Cromatografía de gases
CG-FID	Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización por llama
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CG-O	Cromatografía de gases acoplada a olfatometría
DAD	Detector de arreglo de diodos
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
ET	Equivalentes Trolox
FD	Factor de dilución
FID	Detector de ionización por llama
HS-MEFS	<i>Headspace</i> microextracción en fase sólida
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HPLC-DLS	<i>High-performance liquid chromatography coupled to dynamic light Scattering</i>
HPLC-MS	<i>High-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>
IE	Ionización por impacto electrónico
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
OAV	Valores de actividad de olor
PCR-DGGE	Reacción en cadena de la polimerasa - electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente
PFPD	Detector de fotometría de llama pulsada
RMN	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear
SAFE	<i>Solvent Assisted Flavour Extraction</i>
SIDA	<i>Stable Isotope Dilution Analysis</i>
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TQ MS	Espectrometría de masas con triple cuadrupolo
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV-Vis	Ultravioleta-visible



# Introducción

La América tropical (o neotrópico) es la zona del hemisferio occidental ubicada entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio. El área cubre una superficie de alrededor de 16,5 millones km<sup>2</sup>, aproximadamente el 11% de la superficie terrestre. Esta zona se caracteriza por tener una gran variedad de especies frutales nativas, de especial heterogeneidad dadas las características geográficas de la región.<sup>1</sup> Las frutas tropicales son apetecidas tanto en los mercados locales como en los internacionales debido a su valor nutricional, terapéutico y a sus propiedades sensoriales. Colombia aún tiene un gran número de especies frutales exóticas y nativas sin explorar, especies que tienen potencial para su aprovechamiento agroindustrial y para una comercialización a gran escala, lo cual depende de los estudios bioprospectivos que se realicen en este sentido. Adicionalmente, Colombia es uno de los principales productores de frutas tropicales a nivel mundial<sup>2</sup> y este renglón de la economía se constituye como una ventaja frente a acuerdos comerciales con otros países como por ejemplo el TLC (Tratado de Libre Comercio) con Estados Unidos.

Por tal motivo, en la producción frutícola de Colombia, se debe dar especial atención a las frutas exóticas y nativas con potencialidades biofuncionales. Dentro de las regiones del país que han sido priorizadas por el gobierno nacional como un ADR (Área de Desarrollo Rural) para su reconversión económica, principalmente en el sector agrícola, se encuentra la cuenca del Sinú.<sup>3</sup> A su vez, la agenda interna actual de productividad de los departamentos de Córdoba y Sucre,<sup>4,5</sup> le apunta a una reconversión productiva que le añada valor a su producción agropecuaria, ya que la oferta agroindustrial por fruta en la región Caribe se concentra principalmente en los departamentos de Atlántico, Magdalena y Cesar, y tanto Córdoba como Sucre se encuentran rezagadas en la actualidad.<sup>6</sup> Por consiguiente, la región de la cuenca del Sinú se propone ser líder en la producción limpia de frutas y hortalizas frescas y procesadas para exportación, ya que sus principales

fuentes de ingresos actuales son la ganadería, el turismo, las artesanías y la agricultura.<sup>7</sup>

En cuanto a la agricultura de la Cuenca del Sinú, los cultivos de coco, guayaba común, mango, papaya y patilla, son los más comunes, y en menor medida existe una vocación hacia el cultivo de los cítricos, guanábana, maracuyá, guayaba agria, níspero y zapote costeño.<sup>6</sup> Del anterior listado de cultivos, la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) es una fruta exótica, poco conocida en el resto del país, de la cual existen áreas productivas caseras a pequeña escala y algunos cultivos de mayor escala, con miras a incrementar e implementar la tecnificación de éste cultivo.

Hasta el último reporte presentado por el DANE en el año 2011 en Colombia existían 185.677 plantas de guayaba agria cultivadas de las cuales 133.546 se encontraban en edad productiva y su producción era de 563 Toneladas, de este total se tenía un autoconsumo correspondiente al 37,4% y el porcentaje restante cubría el mercado interno regional,<sup>8</sup> el cual estaba representado en el consumo del fruto en fresco (pulpa) principalmente y en menor proporción su utilización es la preparación de jugos, sorbetes, helados y mermeladas.<sup>9</sup> En éste orden de ideas, esta fruta actualmente es subutilizada a pesar que tiene grandes potenciales agroindustriales, debido a sus características físico-químicas, organolépticas y nutricionales.<sup>7</sup>

La guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) perteneciente a la familia Myrtaceae, tiene características organolépticas muy atractivas, entre ellas un *flavour*<sup>i,10</sup> muy agradable e intenso, el cual no se había caracterizado químicamente hasta el momento. Así mismo, hasta el momento se había reportado la presencia de compuestos de tipo fenólico (flavonoides y derivados del ácido elágico)<sup>11</sup> con propiedades antioxidantes. Existen limitados estudios acerca de la química de los frutos de esta especie (*Psidium*

---

<sup>i</sup> *Flavour*: Término del idioma inglés que no tiene equivalente en español, usado para definir la sensación simultánea causada por los sentidos trigeminal, del gusto y el olfato, cuando un alimento ingresa a la cavidad bucal, y que no tiene equivalente en español.

---

*friedrichsthalianum* Nied.) en la América Tropical<sup>11,12,13</sup> y aún menos en Colombia y/o en la cuenca del Sinú.<sup>7</sup> Así, el objetivo de esta tesis doctoral fue realizar la caracterización química de los compuestos orgánicos asociados a las propiedades sensoriales (aroma) y biofuncionales de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.). En este sentido, se caracterizaron los compuestos volátiles olfativamente activos y los compuestos fenólicos con actividad antioxidante, así mismo, se estudió el metabolismo que sufren tanto los compuestos precursores de aroma, como los de tipo fenólico dentro del organismo humano mediado por la microbiota propia del sistema digestivo (oral e intestinal, respectivamente). De este modo, se espera contribuir con el aprovechamiento integral de esta fruta promisoriosa e incentivar el cultivo y comercialización, favoreciendo la cuenca del Sinú que es una región deprimida por problemas sociales y con muchas posibilidades agrícolas.<sup>14</sup>



# 1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

En este capítulo se presenta la revisión bibliográfica relacionada con los conceptos generales que fueron necesarios para el desarrollo de esta tesis doctoral. En primer lugar se muestra la dinámica del comercio frutícola dentro y fuera del país, teniendo en cuenta la importancia de las frutas dentro de la economía Colombiana y en la nutrición, luego se presenta el *flavour* como una de las propiedades sensoriales de mayor importancia en la aceptación y consumo de las mismas. Otro factor importante en la comercialización de frutas es su valor nutricional que está dado tanto por compuestos dietarios básicos como el contenido de fibra, y azúcares, entre otros, como por el contenido de compuestos bioactivos, por tal razón en el tercer aparte de éste capítulo se hace referencia a los compuestos de tipo fenólico, cuya bioactividad ha sido ampliamente reconocida. Por último se aborda el metabolismo que sufren los compuestos precursores de aroma (de tipo no volátil) por acción de las bacterias presentes en la cavidad oral y el metabolismo que sufren los compuestos de tipo fenólico dentro del organismo humano mediado por la microbiota presente en el sistema digestivo, en ambos casos la acción que ejercen las bacterias sobre los diferentes tipos de compuestos metabolizables, permiten que haya una mayor biodisponibilidad de compuestos benéficos en el organismo humano.

## 1.1. DINÁMICA DEL COMERCIO DE LAS FRUTAS

En los últimos años, se ha evidenciado que el comercio mundial de frutas ha sido bastante dinámico. En Colombia entre los años 2010 y 2015, se observó un aumento de 1,6 en las exportaciones de frutas frescas hacia el exterior. Las exportaciones sumaron 58,3 millones de dólares y entre los principales productos de exportación se encontraron frutas tropicales (sin incluir el banano) como: uchuva, gulupa, aguacate, granadilla, piña, tomate de árbol, pitahaya, mango, limón Tahití y feijoa, en orden decreciente de cantidad de frutos tropicales exportados. Los principales mercados destino para las exportaciones en

este mismo periodo de tiempo fueron: Holanda, Alemania, Bélgica, Reino Unido, y Francia.<sup>15</sup> A pesar de las fluctuaciones del mercado, se concluye que la perspectiva de crecimiento de las exportaciones de Colombia es buena y bastante alentadora, dado que se evidencia mayor aprovechamiento de los acuerdos comerciales y las respectivas preferencias arancelarias; sin contar con que la oferta también se ha visto estimulada con los diferentes proyectos liderados por ASOHOFRUCOL en conjunto con entidades nacionales y regionales, los cuales buscan mejorar los índices de competitividad del sector. Es así como los productos exóticos colombianos (frutas y hortalizas) se encuentran entre las nuevas preferencias de los consumidores a nivel mundial que buscan productos novedosos, convenientes, inocuos y con alta calidad nutricional. Sus particulares propiedades organolépticas (diversidad de colores, sabores y sus aromas exóticos), resultan muy atractivos para los consumidores.

La guayaba agria *Psidium friedrichsthalianum* Nied. a pesar de encontrarse distribuida desde el sur de México hasta el norte de Sur América, no presenta reportes de exportaciones ni de comercialización, al parecer al igual que en Colombia la producción cubre por ahora solamente los mercados locales.

## **1.2. PROPIEDADES SENSORIALES DE LAS FRUTAS - EL FLAVOUR**

Las frutas hacen parte importante de la dieta humana no solo por su contenido de vitaminas, minerales y fibra, sino también por sus intensas y agradables propiedades sensoriales. Los constituyentes más característicos de una fruta, entre los cuales están los minerales, los pigmentos y los compuestos volátiles responsables del aroma se encuentran en pequeñas cantidades, ya que aproximadamente entre el 80-90% de las frutas es agua. Las propiedades sensoriales de las frutas, y en general de los alimentos, son las que brindan información acerca de su calidad y frescura (color y textura), y las que finalmente condicionan las decisiones de los consumidores, y la fidelidad de los mismos (aroma y sabor).

La asociación de las sensaciones percibidas simultáneamente por los sentidos olfativo y gustativo, combinado con la función del nervio trigeminal<sup>ii,16</sup> cuando un alimento entra a la boca, sumado a la respuesta del proceso cognitivo que de estas señales se realice, se denomina *flavour*.<sup>16,17</sup> Éstas se perciben cuando se estimulan las terminaciones nerviosas de la mucosa nasal, bucal y faringe (astringencia, picor, frescura, calor, pungencia, sabor metálico, etc). Entre conjunto de percepciones la más importante es el aroma, sin la cual es muy difícil identificar el *flavour* de un alimento, por éste motivo el estudio del *flavour* se ha concentrado en la búsqueda e identificación de los componentes volátiles responsables de ésta percepción sensorial. En la última década, se ha introducido el concepto de "*Molecular Sensory Approach*", con el cual se busca identificar la estructura química solo de aquellos compuestos activos que impresionan los órganos de los sentidos dándole mayor relevancia al análisis sensorial, simultáneo con el análisis instrumental. Éste concepto surge por la necesidad de identificar, clasificar, cuantificar y evaluar la contribución de los compuestos que son responsables del *flavour* característico en alimentos.<sup>18</sup> Así mismo, se ha introducido el término *sensómica* que hace referencia al trabajo secuencial (extracción de los compuestos volátiles, determinación de zonas olfativas, identificación de los compuestos activos olfativamente, determinación del umbral de olor, cuantificación, determinación de la contribución en el aroma, elaboración del recombinado y elaboración del perfil de las muestras) para la determinación de los compuestos activos olfativamente, con el fin de generar un banco de datos para diferenciar muestras de un mismo tipo (genotipo, variedades), o generar parámetros de procesamiento y condiciones de almacenamiento de alimentos.<sup>19</sup>

### 1.2.1. El aroma en las frutas

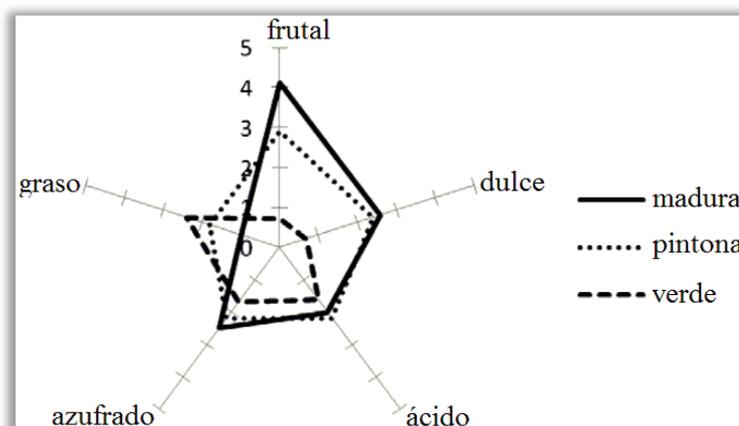
Desde el punto de vista químico, el aroma está constituido por compuestos orgánicos que

---

<sup>ii</sup> El nervio trigeminal tiene exclusivamente ramas sensitivas, siendo el responsable de la sensibilidad en la cara y de ciertas funciones motoras, tales como morder y masticar. También se encarga de transportar impulsos exteroceptivos, sensaciones táctiles, de propiocepción y dolor.

poseen bajos pesos moleculares (<250 u) y altas presiones de vapor (compuestos de alta volatilidad).<sup>10</sup> En las frutas, la mayoría de estos compuestos contienen cadenas de hidrocarburos alifáticos o sus derivados (ésteres, alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas, lactonas, y compuestos azufrados), y aunque todas ellas comparten en gran medida los mismos compuestos volátiles, su diferencia de aroma radica en la cantidad de cada uno de ellos.<sup>20</sup> Tradicionalmente se publicaban listados de centenares de compuestos volátiles, como los responsables del aroma; sin embargo, solo un número limitado de estos componentes pueden ser considerados como compuestos volátiles activos olfativamente (*odor-active volatiles*) por cuanto se encuentran en una concentración superior a su valor umbral de olor (*odor-threshold*), es decir en una concentración superior a la mínima necesaria para ser detectados por el sentido del olfato humano. Entre estos compuestos pueden existir algunos que por sí mismos recuerdan el aroma de la fruta o del alimento y se denominan compuestos impacto (*character impact aroma compounds* o *key aroma compounds*).<sup>10</sup> Ésta aproximación permite seleccionar solo los compuestos con actividad de olor (*odor-active volatiles*), es decir aquellos que son capaces de interactuar con las proteínas receptoras, a partir de la mezcla compleja de compuestos volátiles y así enfocar eficientemente los esfuerzos de identificación y cuantificación.

La detección de los componentes activos olfativamente en un alimento cuando entra a la boca puede hacerse mediante el sentido del olfato (ortonasal) o del gusto (retronasal), por tal motivo se hace importante realizar ensayos por separado para cada sentido con el fin de determinar la incidencia de dichos compuestos en las sensaciones independientes. Experimentos sensoriales descriptivos producen una descripción multivariada de estas percepciones que se pueden expresar en un diagrama de araña. Jiménez *et al* (2011)<sup>21</sup> estudiaron los cambios en el aroma que sufría la gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) durante los diferentes estados de maduración de los frutos, encontrando que en los frutos verdes predominaban las notas grasas y ácidas, y a medida que transcurría el proceso de maduración se desarrollaban notas frutales, dulces y azufradas, y las notas grasas disminuían su intensidad (Figura 1).<sup>21</sup>



**Figura 1.** Perfiles de aroma de la gulupa en diferentes estados de madurez, madura, pintona y verde.<sup>21</sup>

Los descriptores olfativos seleccionados para éste tipo de diagramas son percepciones causadas por compuestos volátiles cuando se dan respuestas quimiostéticas o de sabor de los compuestos no volátiles, obtenidas con el concepto de un panel entrenado. Por esta razón se puede decir que los compuestos responsables del *flavour* en alimentos son detectables si se experimentan individualmente, especialmente a las concentraciones que ellos se encuentran en el alimento. Por tal motivo, la cromatografía de gases acoplada a olfatometría (CG-O) puede detectar todos los compuestos que contribuyen al aroma si son apropiadamente extraídos, manipulados y separados.<sup>22</sup>

#### 1.2.1.1. Métodos de análisis para el estudio del aroma en alimentos

Para determinar qué compuestos orgánicos son responsables del aroma en un alimento, se puede utilizar el enfoque sensómico,<sup>23,19</sup> el cual consiste en identificar los compuestos olfativamente activos, en una serie de etapas sucesivas empleando procedimientos analíticos combinados con el análisis sensorial. En primer lugar se debe realizar la extracción de los compuestos volátiles, asegurando que el perfil olfativo del extracto sea muy similar al del alimento, para ello se utilizar una técnica de extracción que no excluya ningún componente durante el proceso; tampoco se debe alterar la estructura de los compuestos de aroma y se debe remover compuestos no volátiles de la matriz, que

pueden generar interferencias en el análisis posterior.<sup>24</sup> En respuesta a estas condiciones, Engel y colaboradores diseñaron un equipo de extracción que involucra la destilación a presión reducida de un extracto orgánico del alimento, con lo cual se elimina el calentamiento de la muestra o el disolvente y permite la obtención de extractos libres de sustancias no volátiles (Figura 2), este equipo que es conocido como SAFE (por sus siglas en inglés, *Solvent Assisted Flavour Extraction*).<sup>24</sup>



**Figura 2.** Fotografía tomada al equipo para extracción de aroma asistida por disolvente (SAFE), en la extracción realizada a la guayaba agria.

El equipo consta de un embudo de adición (4), un trampa fría (6) y una cabeza central (2) que sostiene 2 tubos de vidrio (11 y 12) equipados con una sección esmerilada (17), donde se ajustan herméticamente dos balones. El balón conectado a la salida del embudo de adición se coloca sobre un baño termostatado a 40 °C, mientras que el segundo balón conectado a la trampa fría, se coloca sobre un baño de nitrógeno líquido. La cabeza y los tubos de vidrio se encuentran completamente termostatados a 40 °C con agua que ingresa hasta el fondo de los tubos de vidrio mediante tubos de polietileno asegurando una temperatura homogénea en la trampa. El equipo se conecta por el extremo (18) a una

bomba de alto vacío ( $10^{-3}$  Pa). La destilación se inicia cuando desde el embudo de adición se dejan caer gotas que, debido a la presión se atomizan. Los volátiles y el disolvente, son transferidos por medio del tubo (3a) dentro de la cabeza de destilación (2). El destilado, a través del tubo (3b), entra en el balón donde el disolvente y los componentes volátiles son condensados debido al baño de nitrógeno líquido. De esta forma se obtiene un extracto incoloro, libre de componentes no volátiles y que usualmente posee el olor característico del alimento.<sup>24</sup>

La segunda etapa consiste en analizar el extracto de volátiles por cromatografía de gases con detección instrumental convencional (FID) y acoplado simultáneamente a un detector olfatométrico (CG-O), con el fin de detectar las zonas olfativamente activas permitiendo relacionar la percepción olfativa con la respuesta instrumental. La cromatografía de gases (CG) es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. Básicamente la separación de las sustancias se fundamenta en las diferencias de las constantes de distribución entre las dos fases (móvil y estacionaria). Los tiempos de retención son muy sensibles a los cambios (aún muy pequeños) de condiciones cromatográficas, por tal motivo son difícilmente reproducibles con alta exactitud. Para aumentar el grado de confiabilidad en la comparación de los datos de retención cromatográfica y permitir la identificación tentativa de los analitos el científico húngaro E. Kovats introdujo un sistema de índices de retención, llamados por su nombre “los índices de Kovats”, que se basan en la medición de tiempos de retención relativos con respecto a los de una serie homóloga de *n*-parafinas, corridas bajo las mismas condiciones cromatográficas experimentales. Se ha presumido que los índices de retención son independientes de la mayoría de condiciones experimentales (temperatura, flujo de gas de arrastre, dimensiones de la columna, etc), pero en realidad, estos dependen de la polaridad de la fase estacionaria, de la columna y de su temperatura.<sup>25</sup> La CG tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas y de otro lado su aplicación como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de una muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el índice de retención mencionado anteriormente, que es

único para cada compuesto. En aplicaciones cuantitativas, se utiliza el valor de las áreas de cada compuesto o sus alturas, las cuales son proporcionales a la concentración o cantidad presente de cada analito.<sup>26</sup>

La cromatografía de gases acoplada a olfatometría (CG-O) es una técnica basada en la evaluación sensorial de los compuestos eluidos a través de una columna cromatográfica, ésta evaluación del olor puede ser tanto cuantitativa como cualitativa. El detector olfatométrico, corresponde al sentido del olfato de una persona debidamente entrenada o en algunos casos se requiere de varias personas (equipo de evaluación). La evaluación cualitativa y cuantitativa del olor se lleva a cabo para cada analito que abandona la columna cromatográfica. Esto permite establecer si un compuesto es sensorialmente activo a una concentración dada (es decir, si aparece en la muestra a un nivel más alto que el umbral de detección sensorial) y la descripción de su olor, así como la determinación del tiempo de la actividad sensorial y la intensidad del mismo. La determinación del olor del analito es posible gracias a la presencia del puerto olfatométrico, conectado en paralelo a detectores convencionales, tales como detector de ionización de llama (FID) o un espectrómetro de masas (EM). El flujo de los compuestos eluidos después de que salen de la columna, se divide de tal manera que puedan alcanzar ambos detectores simultáneamente y ser comparables.<sup>27</sup>

Una vez establecidas las zonas olfativas en el perfil cromatográfico, se realizan los experimentos de dilución del extracto original en un factor de  $2^n$  para el análisis olfatométrico de cada dilución, con el fin de jerarquizar la potencia olfativa de cada una de las zonas olfativas. Esta metodología se conoce como AEDA (*Aroma Extract Dilution Assay*) y consiste en determinar la máxima dilución a la cual un compuesto es detectado olfativamente, expresada como un factor de dilución de aroma (FD). Este parámetro permite establecer la contribución individual de los diferentes compuestos presentes en el extracto al aroma total.<sup>28</sup>

Posteriormente, se deben cuantificar todos los compuestos activos olfativamente, para lo

cual se pueden utilizar diversas técnicas analíticas. El método convencionalmente usado en la cuantificación de compuestos del aroma, es la adición de un estándar interno de concentración conocida, el cual debe cumplir ciertos requisitos tales como: poseer propiedades físicas y químicas muy parecidas a las del analito, una respuesta analítica que no se solape con otras señales en el cromatograma, no debe estar presente en la muestra ni reaccionar químicamente con los demás componentes de la mezcla y su concentración debe ser similar a la de los compuestos a cuantificar. Entre las ventajas de esta metodología se tiene la de minimizar la influencia del procesamiento, ya que las posibles pérdidas de los analitos en la destilación y en el proceso de purificación ocurren igualmente en el estándar, por tanto no se afecta el resultado.

En este sentido, un derivado isotópico de cada compuesto es el estándar perfecto pues posee propiedades físicas y químicas idénticas al analito. Es por ello que en el método denominado SIDA (*Stable Isotopic Dilution Assay*) se emplean como estándares para cuantificación, compuestos deuterados o marcados con  $^{13}\text{C}$ , disponibles comercialmente o sintetizados en el laboratorio, con la condición que el marcado no sea intercambiado durante el procedimiento analítico. El proceso se combina con análisis por CG-EM en modo de ionización química (IQ), en el cual se relacionan los iones moleculares o principales iones fragmento del analito respecto a los del estándar adicionado y por comparación de áreas se realiza la cuantificación.<sup>29</sup>

Una vez identificados y cuantificados aquellos componentes con actividad olfativa en el aroma de un alimento, se busca estimar la importancia de cada componente en cuanto al aporte que hace a la percepción global. Patton y Josephson en 1957<sup>30</sup> propusieron estimar dicho aporte relacionando la concentración del analito en el aroma del alimento con su valor umbral de olor (*odor-threshold*), relación actualmente conocida como *Odor Activity Value* (OAV) o valor de actividad de aroma.<sup>16</sup>

Finalmente, con el fin de confirmar los resultados analíticos obtenidos a partir de los análisis cromatográficos y espectroscópicos durante la identificación y cuantificación de compuestos olfativamente activos, se llevan a cabo los ensayos de simulación del aroma,

mediante experimentos de recombinación y de omisión. En estos experimentos se evalúa sensorialmente si la mezcla sintética de los compuestos olfativamente activos identificados, en las cantidades determinadas analíticamente, presentan un perfil olfativo semejante al de la fruta fresca.<sup>23</sup> Los ensayos de recombinación radican en hacer mezclas de los compuestos que tengan un OAV superior a la unidad. La evaluación del perfil sensorial de este recombinado y su comparación con el perfil sensorial de la fruta fresca se realiza vía orthonasal por un panel entrenado. Los descriptores empleados son definidos por medio de disoluciones acuosas de compuestos referencia en concentraciones 100 veces mayor a sus respectivos valores de umbral. La similitud de los perfiles olfativos se evidencia mediante un diagrama de araña. Así mismo, los ensayos de omisión consisten en ir eliminando uno a uno los distintos componentes de una mezcla (conseguida a partir de pruebas de aromas que imitan al aroma original) con el objetivo de medir o verificar cuál es el efecto sensorial que la eliminación de un componente tiene sobre el aroma global.

#### **1.2.1.2. El aroma de algunas frutas nativas**

En nuestro grupo de investigación se ha aplicado la metodología mencionada anteriormente con éxito, en el estudio del aroma de algunas frutas nativas de Colombia como lo son uchuva (*Physalis peruviana* L.),<sup>31</sup> mora (*Rubus glaucus* Benth),<sup>32</sup> gulupa (*Passiflora edulis* Sims fo *edulis*),<sup>33</sup> lulo (*Solanum quitoense* Lam.)<sup>34</sup> y guayaba (*Psidium guajava* L.).<sup>35</sup> En ésta última fruta perteneciente a la familia Myrtaceae, se realizó el estudio con la guayaba variedad regional roja, de la cual se hicieron extractos enriquecidos con los compuestos volátiles por medio de la técnica SAFE y luego en ellos se evaluaron las áreas activas olfativamente utilizando AEDA. Los resultados de los experimentos de identificación en conjunto con los factores de dilución FD (rango 8 a 2048) revelaron que los compuestos volátiles: 4-metoxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, acetato de 3-sulfanilhexilo y 3-sulfanil-1-hexanol, seguidos por la 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona, el (*Z*)-3-hexenal, el *trans*-4,5-epoxi-

(*E*)-2-decenal, el alcohol cinámico, el butanoato de etilo, el hexanal, el metional y el acetato de cinamilo, contribuían significativamente al aroma de ésta fruta. También se detectó una nota frutal correspondiente a la mezcla diastomérica de los isómeros (*R*, *S*) y (*S*, *S*) del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo. Así mismo, se identificaron varios compuestos volátiles olfativamente activos por primera vez en guayaba, tales como, el acetato de 3-sulfanilhexilo, el 3-sulfanil-1-hexanol, la 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona, el *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal y el metional.<sup>35</sup>

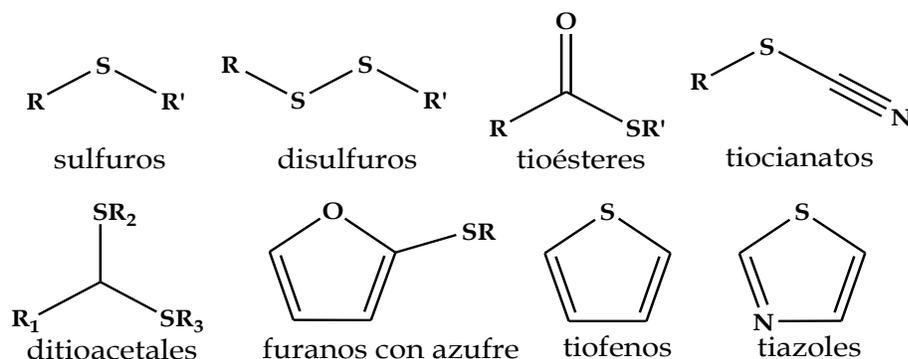
Los compuestos volátiles activos en el aroma de ésta fruta se cuantificaron usando la metodología SIDA, y luego con base en los datos cuantitativos y los valores de umbral de olor en agua, se calcularon los valores de actividad olfativa (OAV). Los compuestos con OAVs más altos presentaron notas olfativas descritas como verde-grasosa para el (*Z*)-3-hexenal y una nota frutal similar a la del fruto de la uva correspondiente al 3-sulfanil-1-hexanol, seguidos por el acetato de 3-sulfanilhexilo (grosella negra), hexanal (verde, graso), butanoato de etilo (frutal), acetaldehído (fresco, pungente), *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal (metálico), 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona (caramelo, dulce), alcohol cinámico (floral), (2*S*, 3*S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (frutal), acetato de cinamilo (floral), metional (papa cocida), y 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona (caramelo). Los ensayos de omisión del recombinado de aroma, revelaron que el (*Z*)-3-hexenal, el 3-sulfanil-1-hexanol, la 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, el acetato de 3-sulfanilhexilo, el hexanal, el butanoato de etilo, el acetato de cinamilo y el metional son los compuestos impacto en el aroma de la guayaba variedad regional roja.<sup>36</sup> Así mismo, se monitorearon cambios en las concentraciones de los compuestos olfativamente activos durante la maduración de los frutos aplicando la metodología SIDA. Los datos revelaron que tanto la concentración de los aldehídos C<sub>6</sub>, como la cantidad de compuestos azufrados (acetato de 3-sulfanilhexilo y 3-sulfanil-1-hexanol), disminuyen con la maduración, mientras que las concentraciones de los ésteres alifáticos y furanonas se incrementan durante éste proceso. Así, se dedujo que es relevante el estudio de los compuestos azufrados volátiles presentes en los frutos de esta familia.<sup>37</sup>

### 1.2.2. Compuestos azufrados en el aroma de alimentos

Los compuestos de tipo azufrado son una clase de compuestos volátiles importantes en el *flavour* de muchos alimentos (en ocasiones son los compuestos impacto del aroma), porque usualmente tienen bajos valores umbral de olor, característica que los hace detectables mediante olfatometría a pesar de encontrarse a nivel de trazas. La principal problemática que se presenta en el trabajo con compuestos azufrados radica en la tendencia de los compuestos de azufre reducido (por ejemplo, tioles) para oxidar, reorganizar o isomerizar en condiciones de calentamiento suave o durante la concentración, para el procesamiento o extracción en matrices alimenticias.<sup>38</sup> Así mismo, son compuestos difíciles de aislar y cuantificar por su baja concentración en alimentos, comparados con los altos niveles de carbohidratos, proteínas, lípidos y también otros volátiles.<sup>39</sup> Los compuestos azufrados también son importantes porque exhiben propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antibacterianas, antinematódicas y anticáncer, entre otras.<sup>40</sup> Son compuestos representativos del *flavour* de la especie *Allium* (ajo, cebolla, cebolleta), de la familia Cruciferae (coles de Bruselas, brócoli, col, coliflor), y en aromas generados térmicamente tales como carne asada, pollo, mariscos, café, pan, palomitas de maíz, nueces y chocolate. Han sido ampliamente estudiados en vinos<sup>41</sup> y recientemente se han estudiado en diversas frutas tropicales, tales como el maracuyá, guayaba, piña, melón, entre otras, en donde su presencia se relaciona con la descripción olfativa tropical.<sup>42</sup> Se encuentran como sulfuros, disulfuros, tioésteres, tiocianatos, ditioacetales, furanos sustituidos con azufre, tiofenos, tiazoles y otras formas de heterociclos (Figura 3).

Los compuestos azufrados han sido durante mucho tiempo el objeto de estudio de los químicos en el área de aromas, sin embargo se han presentado retos analíticos únicos de superar durante el proceso de aislamiento y la identificación. Por tal razón se han desarrollado técnicas de extracción selectivas para compuestos azufrados; en una de ellas la sal de sodio de pHMB (ácido *p*-hidroximercuribenzoico) se utiliza para extraer directamente tioles de muestras acuosas, ya que usualmente los complejos tiol-pHMB se cargan en una columna de intercambio aniónico, y los tioles volátiles son liberados

usando como eluyente una disolución de clorhidrato de *L*-cisteína monohidratada.<sup>43</sup> Los extractos de aroma también se pueden enriquecer en tioles por medio del gel de agarosa sustituido con acetato de *p*-aminofenil-mercurilo, el cual se desorbe con una disolución de ditiotreitól 10 mM.<sup>44</sup>



**Figura 3.** Estructuras químicas de algunos compuestos azufrados volátiles encontrados en alimentos.

La selección de los procedimientos de extracción de los compuestos azufrados depende del tipo de matriz y la volatilidad relativa de los compuestos de interés. Entre las técnicas utilizadas se encuentran la microextracción en fase sólida, y la extracción de aroma asistida por disolventes (SAFE).<sup>45</sup> Así mismo, las técnicas de detección que se emplean deben ser específicas, por ejemplo la fotometría de llama, quimioluminiscencia, fotometría de llama pulsada (PFPD), emisión atómica (AED) y dilución de isótopos.<sup>46</sup>

### 1.2.3. PRECURSORES DE AROMA NO VOLÁTILES

#### 1.2.3.1. Precursores de tipo glicosídico

Se ha logrado demostrar que un gran número de compuestos volátiles importantes en el aroma de las plantas y las frutas, se encuentran acumulados como conjugados no volátiles e inodoros. Estos conjugados han sido de gran interés en el área de aromas, ya que pueden ser considerados como precursores de compuestos activos olfativamente. Entre los conjugados más importantes como precursores de aroma, se encuentran los glicósidos,

los cuales están conformados por una unidad de azúcar unida directamente a la aglicona, como se conoce al compuesto que es liberado por acción enzimática. La unidad de azúcar, que usualmente es  $\beta$ -D-glucosa puede estar o no sustituida con una o más unidades adicionales de azúcar, como por ejemplo,  $\alpha$ -L-arabinofuranosa,  $\alpha$ -L-ramnopiranososa,  $\beta$ -D-apiofuranosa y  $\beta$ -D-glucosa.<sup>47</sup>

Éste tipo de precursores de compuestos volátiles han sido reportados en una gran variedad de frutas, entre las que se encuentran uvas, albaricoque, durazno, kiwi, papaya, maracuyá, piña, lulo y mango, entre otras. Se ha demostrado que la concentración de compuestos volátiles enlazados glicosídicamente respecto a sus formas libres, es entre 2 a 8 veces mayor.<sup>48</sup> Debido a que varios de los compuestos impacto en el aroma de las frutas han sido encontrados de forma glicosidada, el estudio de estos compuestos como precursores de aroma ha ido creciendo y se ha posicionado como una etapa importante en el estudio del aroma de las frutas. Recientemente en nuestro grupo de investigación se evaluó la presencia de precursores de aroma glicosidados en los frutos de la curuba (*Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey). El estudio se hizo por medio de la hidrólisis enzimática con una glucosidasa (emulsina) y el posterior análisis de los productos por CG-EM, así como el análisis por HPLC-MS de los glicósidos acetilados. Así, se identificó el (Z)-3-hexenil  $\beta$ -D-glucopiranosido y el linalil  $\beta$ -D-glucopiranosido como precursores de aroma en el fruto de *P. mollissima*.<sup>49</sup>

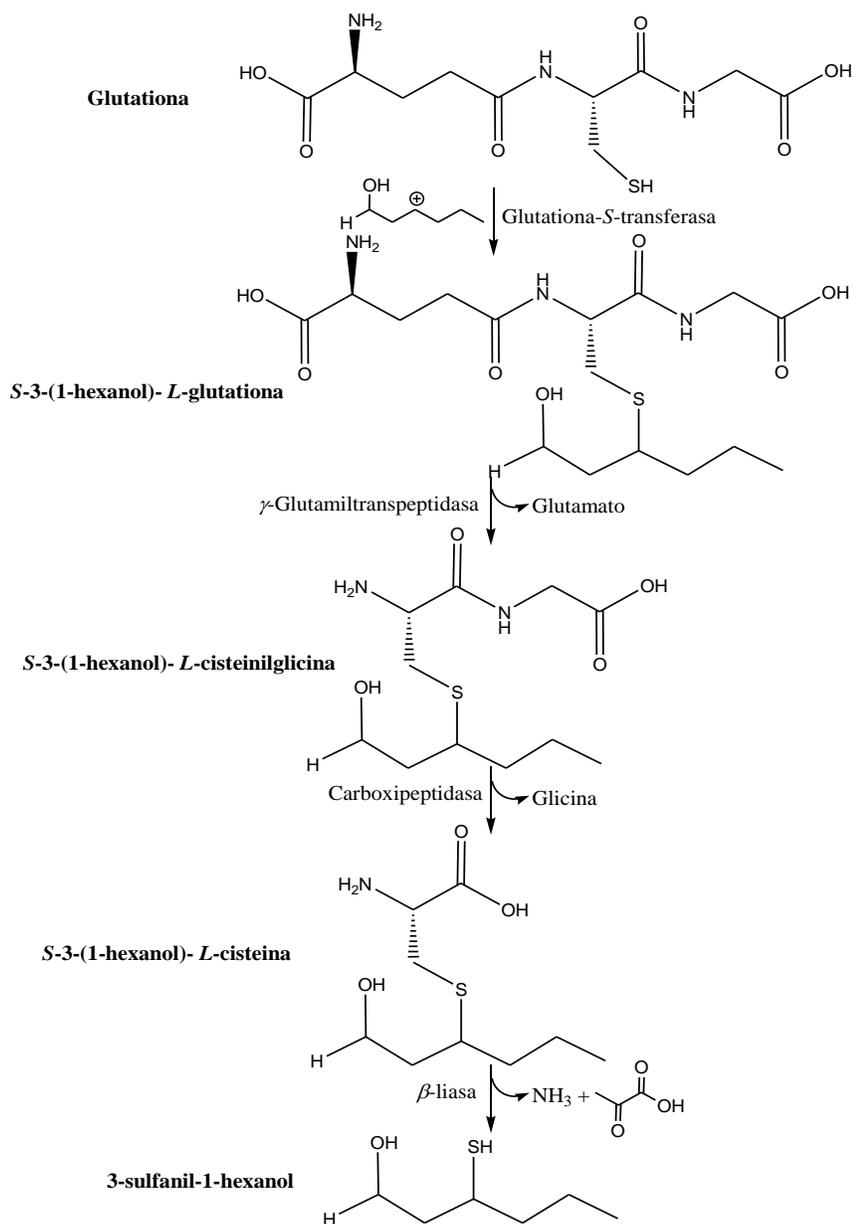
En alimentos derivados de las frutas también son importantes estos precursores. Un ejemplo de ello son los vinos cuyo aroma característico depende del tipo uvas y de sus compuestos volátiles, los cuales pueden estar presentes como glicósidos. Los precursores glicosídicos son un grupo de compuestos que generan el aroma durante la elaboración del vino o su almacenamiento (añejamiento) por hidrólisis ácida o enzimática, mediante la liberación de compuestos volátiles. Estos compuestos volátiles son principalmente los terpenos,  $C_{13}$  nor-isoprenoides, derivados bencénicos, fenoles volátiles y compuestos tipo  $C_6$ . Los compuestos mencionados pueden proporcionar importantes características de aroma al vino; por ejemplo, las notas florales de los terpenos que son características de

algunas variedades de uva.<sup>50</sup>

### 1.2.3.2. Precursores de tioles de tipo S-cisteinilados

Como se mencionó anteriormente algunos tioles contribuyen de manera significativa tanto en el aroma de algunas frutas (toronja, maracuyá y guayaba), como en el aroma de algunos vinos, especialmente en vinos blancos Sauvignon. En estos vinos se han encontrado los compuestos 3-mercaptohexanol (3MH), acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA), 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (4MMP), 4-mercapto-4-metil-2-pentanol (4MMPOH), y 3-mercapto-3-metil-1-butanol (3MMB), los cuales hacen parte de su *flavour*; de estos compuestos los más importantes son el 3MH y su acetato ya que tienen aromas frutales y un umbral de percepción muy bajo.<sup>51</sup>

Los vinos Sauvignon blancos han sido ampliamente estudiados, ya que desde un comienzo, al catar estos vinos se percibía un aroma frutal muy aromático que permanecía en boca durante 20 - 30 segundos, unos precursores desconocidos causaban este efecto, llamado también efecto retroaromático, cuya percepción olfativa se da de manera retronasal. El mismo efecto retroaromático se puede observar en el polvo de cebolla (de cultivos de *Allium cepa* L.), ají (cultivos de *Capsicum annuum* L.), y otras frutas y vegetales.<sup>52</sup> Tominaga y colaboradores descubrieron que los compuestos azufrados volátiles como el tiol (R/S)-3-sulfanil-1-hexanol son los compuestos impacto en el aroma del vino blanco Sauvignon.<sup>53</sup> Ellos encontraron que los precursores de estos compuestos azufrados son conjugados de S-cisteína, y son derivados de la ruta metabólica de la glutatióna (Figura 4).<sup>54</sup> Se ha estudiado la interacción de la saliva con estos precursores mediante ensayos *in vitro*, de aquí se evidenció que el precursor S-(R/S)-3-(1-hexanol)-L-cisteína, tras la hidrólisis enzimática produce el (R/S)-3-sulfanil-1-hexanol, S-propil-L-cisteína, forma 1-propanotiol y el S-(2-heptil)-L-cisteína es el precursor del 2-heptanotiol.<sup>52</sup>



**Figura 4.** Ruta metabólica de la glutatióna para los precursores cisteinilados del 3-sulfanil-1-hexanol.<sup>55</sup>

Se han desarrollado distintas metodologías para determinar la presencia de conjugados de S-cisteína de 3-mercaptohexanol en zumo de uvas. El primer método fue desarrollado por Peyrot des Gachons *et al.*,<sup>56</sup> quienes evaluaron los precursores cisteinil-3-mercaptohexanol, 4-S-cisteinil-4-metil-2-pentanona y 4-S-cisteinil-4-metil-2-pentanol, de manera indirecta por hidrólisis enzimática usando una columna de triptofanasa para

evaluar el porcentaje de tioles libres separados. Las muestras se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, usando estándares monodeuterados como estándares internos. Sin embargo, este procedimiento no fue específico para conjugados de S-cisteína, ya que se encontraron otros precursores dentro de los resultados. Luego Murat *et al.*,<sup>57</sup> desarrollaron un método para determinar cisteinil-3-mercaptohexanol directamente haciendo uso de la purificación mediante cromatografía de afinidad, usando un estándar interno marcado isotópicamente con <sup>15</sup>N y realizando el análisis mediante CG-EM.

Entre los diferentes precursores de compuestos azufrados de tipo conjugado a S-cisteína, se han desarrollado métodos específicos para el análisis del cisteinil-3-mercaptohexanol. En el método descrito por Thibon *et al.*,<sup>58</sup> se usó S-bencilcisteína como estándar interno, para determinar las concentraciones individuales de los diastereoisómeros de cisteinil-3-mercaptohexanol. La preparación de las muestras se basó en el método de Murat *et al.*,<sup>57</sup> en donde se aislaron los compuestos por cromatografía de afinidad pero se usó derivatización por perfluoroacilación. Luego los derivados se analizaron por CG usando EM tandem con una trampa de iones (CG-EM/EM). Un método similar fue desarrollado por Subileau *et al.*,<sup>51</sup> para cuantificar los diastereoisómeros sin separar de cisteinil-3-mercaptohexanol después de la purificación a través de una resina Dowex, usando D<sup>2</sup>-cisteinil-3-mercaptohexanol como estándar interno; el paso final fue la derivatización con cloformiato de etilo y posterior análisis por CG-EM. Luisier *et al.*,<sup>59</sup> también desarrollaron un método para cuantificar diastereoisómeros sin separar de cisteinil-3-mercaptohexanol usando D<sup>2</sup>-cisteinil-3-mercaptohexanol como estándar interno. Éste método consume menos tiempo de preparación de muestra, ya que la muestra se pasa a través de un cartucho de extracción en fase sólida, y a diferencia de los otros métodos las muestras se analizan por HPLC-MS, ya que es compatible con estos compuestos no volátiles, solubles en agua.<sup>59</sup> Capone *et al.*,<sup>60</sup> desarrollaron y validaron un método para el análisis individual de diastereoisómeros de 3-S-cisteinilhexan-1-ol y 3-S-glutathionilhexan-1-ol extraídos de zumo de uva y vino. El método usó análisis SIDA combinado con extracción en fase sólida y HPLC-MS/MS para la cuantificación. Todos los estudios anteriores reflejan los esfuerzos analíticos que se han realizado para lograr el aislamiento y caracterización del

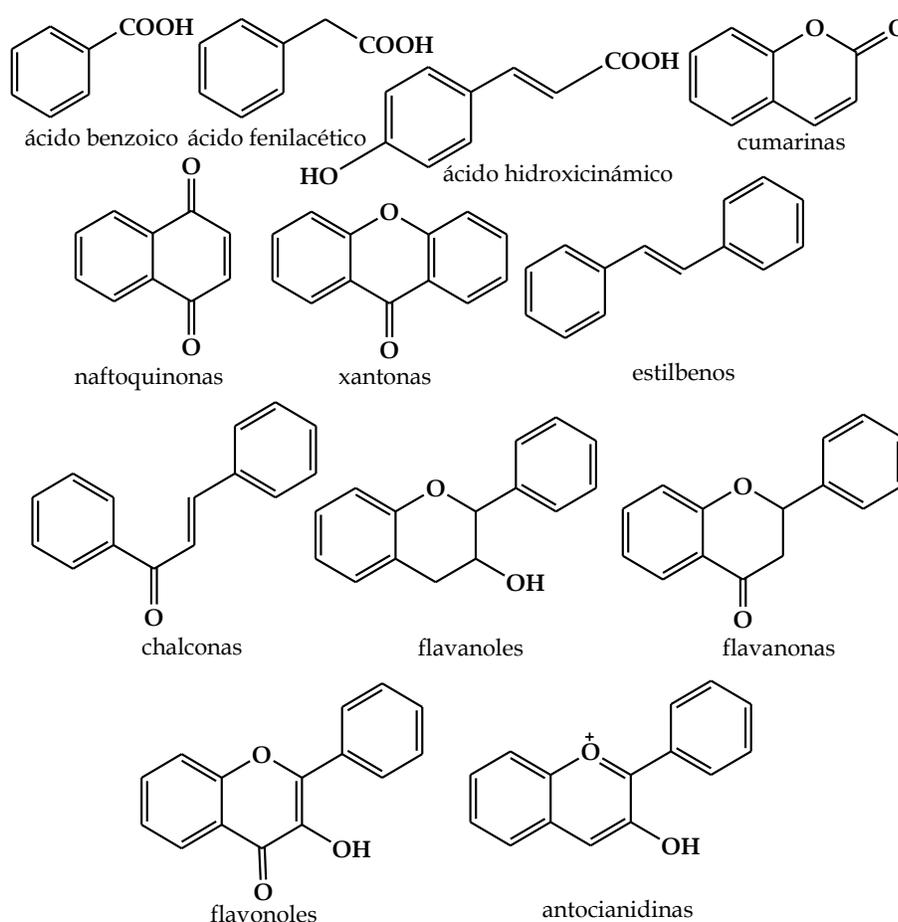
precursor cisteinil-3-mercaptohexanol, ya que el 3-mercapto-1-hexanol tiene una gran importancia olfativa en el aroma de muchos alimentos. Además el análisis químico de este tipo de compuestos representa una gran dificultad debido a su baja concentración y a su alta labilidad.

La importancia de trabajar con precursores de compuestos quirales volátiles, radica en que los enantiómeros de compuestos de aroma a menudo tienen diferentes propiedades sensoriales.<sup>61</sup> En algunos casos, una forma quiral puede exhibir un umbral de olor inferior en relación con su epímero. En otras situaciones, la nota olfativa puede cambiar entre las dos formas enantioméricas, o desplazar el carácter de olor a inodoro. En los compuestos azufrados volátiles que tienen quiralidad, se han realizado algunos estudios, por ejemplo, los estudios realizados en los enantiómeros del 3-sulfanil-1-hexanol y sus ésteres, que contribuyen al aroma y sabor de los frutos de maracuyá. Se determinó que los enantiómeros de los ésteres (*R*) tienen un aroma a fruta tropical, mientras que los enantiómeros (*S*) una nota azufrada y herbácea, en cambio los enantiómeros del 3-sulfanil-1-hexanol sin sustituir, no muestran una diferencia en sus características de aroma.<sup>61</sup>

### **1.3. PROPIEDADES BIOFUNCIONALES DE LAS FRUTAS- COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los compuestos bioactivos son componentes que tienen una actividad biológica dentro del organismo, que se traduce en beneficios para la salud. Numerosos estudios epidemiológicos realizados en muchos países indican que una dieta rica en frutas y vegetales, retrasan o reducen el riesgo de contraer varias enfermedades originadas por el estilo de vida, muchas de ellas enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, cáncer, u otras enfermedades como la artritis reumatoidea, enfermedades del hígado, cataratas y la enfermedad de Parkinson o Alzheimer, entre otras. Se cree que los compuestos responsables del efecto protector son fitoquímicos y las vitaminas C y E que tienen propiedades antioxidantes, al igual que los compuestos de tipo fenólico.<sup>62</sup>

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los más numerosos y representativos grupos de metabolitos secundarios de las plantas, son derivados de las rutas metabólicas de las pentosas fosfato, shikimato y fenilpropanoides. Entre los principales compuestos de tipo fenólico están los derivados del ácido benzoico, derivados del ácido fenilacético, derivados del ácido hidroxicinámico, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, chalconas, flavanoles, flavanonas, flavonoles y antocianidinas (Figura 5).<sup>63</sup>

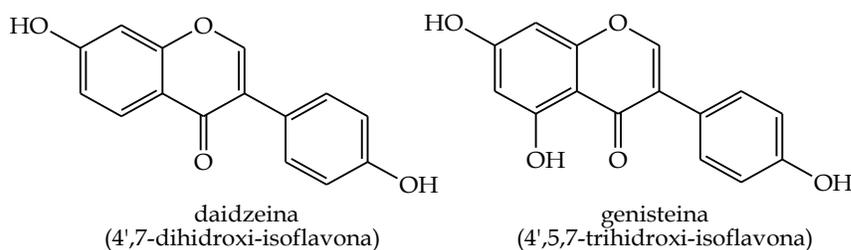


**Figura 5.** Estructuras químicas de los principales compuestos tipo fenólico encontradas en alimentos.<sup>63</sup>

Estos compuestos están presentes en la mayoría de vegetales y frutas de consumo humano. La relevancia de los compuestos fenólicos radica en su participación en diferentes procesos metabólicos como el crecimiento, la reproducción, la defensa contra

plagas y predadores y los procesos germinativos de las plantas, entre otros. También se ha comprobado sus propiedades como antialérgicos, antiarterogénicos, antiinflamatorios, antimicrobiales, antitrombóticos, antioxidantes, y efectos cardioprotectores y vasodilatorios, lo cual evidencia su potencial benéfico sobre la salud humana. Se ha postulado que los mecanismos moleculares que explican su actividad antioxidante son su habilidad como atrapadores de radicales libres, como donadores de hidrógeno, su potencial como agentes reductores, y/o agentes quelantes.<sup>64</sup> La interacción de los compuestos fenólicos con la microbiota humana, la biodisponibilidad y metabolismo en los humanos, los mecanismos de acción de estos metabolitos en diferentes modelos terapéuticos, y las nuevas metodologías para su estudio en la salud, son dianas que impulsan la caracterización de estos compuestos en alimentos y la búsqueda de alimentos con altos contenidos de ellos con una actividad biológica determinada (alimentos biofuncionales).<sup>65</sup> Los alimentos funcionales no tienen una definición formal hasta el momento. Generalmente, se considera que son aquellos alimentos, que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes activos biológicamente, que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Algunos de ellos son alimentos que como se mencionó anteriormente contienen determinado tipo de compuestos con actividad biológica, como fenoles, minerales y vitaminas; a otros alimentos se les han añadido cultivos vivos de microorganismos (los probióticos) que también son benéficos para la salud.

Se han realizado estudios referentes a la determinación de actividades biológicas relacionadas con distintas enfermedades que son de gran interés en la actualidad. Por ejemplo, los polifenoles genisteína y daidzeína (Figura 6) al igual que sus derivados glucuronidados y sulfatados tienen un efecto potente en procesos biológicos relacionados con la proteína de resistencia al cáncer de seno (ABCG2/BCRP), interviniendo en su transporte, el metabolismo y el de sus conjugados.<sup>66</sup>



**Figura 6.** Estructuras químicas de los compuestos daidzeina y genisteina.<sup>66</sup>

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica importante, que afecta hasta un 30% de la población adulta en la mayoría de los países. Se estima que 7,6 millones de muertes prematuras (alrededor del 13,5% del total mundial) son atribuibles a la presión arterial alta.<sup>67</sup> Entre los compuestos fenólicos que se han probado como antihipertensivos se encuentra el ácido clorogénico, el cual se encuentra en frutas y verduras, tales como, los granos de café, manzanas, peras, tomates, arándanos, cacahuates, y las berenjenas.<sup>68</sup> Se estima que los seres humanos consumen hasta 1 g de ácido clorogénico por día.<sup>69</sup> Estudios en ratas han indicado que el ácido clorogénico es hipotensor, ya que una sola ingestión de ácido clorogénico (30-600 mg/kg) redujo la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas. Cuando las ratas se alimentaron con dietas que contienen 0,5% de ácido clorogénico durante 8 semanas, el desarrollo de la hipertensión fue inhibida en comparación con el grupo de dieta de control. Además de su actividad anti-hipertensiva, el ácido clorogénico también posee actividad carcinostática, hipoglucémica, y antioxidante.<sup>70</sup>

Dentro de los compuestos con actividad antioxidante se encuentran tanto los tioles, como los compuestos de tipo fenólico que son agentes reductores.<sup>71</sup> En general, los compuestos con actividad antioxidante son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación<sup>iii</sup> de otras moléculas, y de concluir estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhibiendo otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos, sin afectar aquellos procesos biológicos que se encuentran señalizados por radicales libres. Los intermediarios

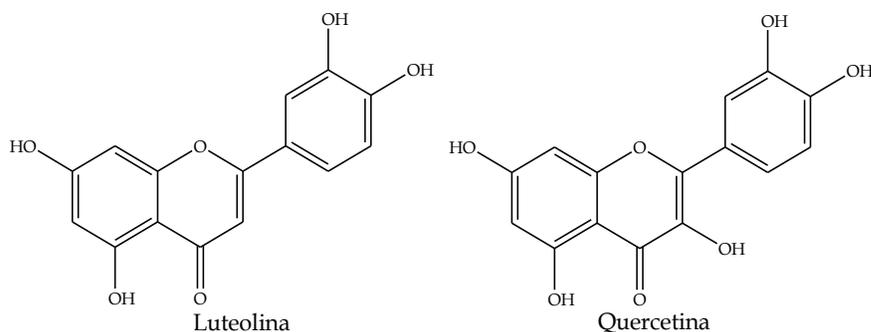
<sup>iii</sup> La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres (ROS) que inician reacciones en cadena que pueden generar daños en las células en sistemas biológicos.

tipo radical libre están involucrados en diversas alteraciones metabólicas que son responsables de diversas enfermedades (cáncer, procesos inflamatorios, cataratas, etc).<sup>72</sup>

Los antioxidantes tienen una larga historia de uso en la nutrición, salud y alimentación. La mayoría de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS; moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno) se consideran perjudiciales, lo que implica que la maximización de concentraciones de antioxidantes podría reducir al mínimo el riesgo de enfermedad crónica.<sup>73</sup> Sin embargo, a medida que se ha avanzado en el estudio de las defensas celulares y vías de señalización celular, el papel del estrés oxidativo, y el sistema de defensa que se elimina, se ha vuelto más complejo. Así mismo, el término "antioxidante" también se ha vuelto ambiguo, ya que tiene connotaciones diferentes para diferentes audiencias. Por ejemplo, para los bioquímicos y nutricionistas, el término a menudo sugiere un compuesto capaz de apagar los ROS generados metabólicamente. Para algunos científicos de alimentos, el término implica una sustancia con características funcionales (por ejemplo, retardar la oxidación), mientras que otros pueden entender el término como la descripción de los alimentos o sustancias con valores altos para las medidas *in vitro* de la capacidad de extinción de radicales, tales como el test ORAC. A pesar de estas discrepancias sigue siendo un tema de interés, ya que puede ser la clave para prevenir diversas enfermedades.<sup>74</sup>

En los compuestos de tipo fenólico se conoce que generalmente las agliconas son más efectivas como antioxidantes que los glicósidos correspondientes. Más allá de la misma presencia de moléculas de azúcar y el número total de unidades unidas al flavonoide, sus posiciones y estructuras también son importantes. Por ejemplo, las agliconas luteolina y quercetina (Figura 7) son más efectivas que los 3-, 4- y 7-O-glicósidos correspondientes, retardando la formación del hidroperóxido en la doble capa lipídica de las membranas. En un estudio realizado por Jaramillo *et al* en 2011,<sup>75</sup> se determinó cuales compuestos son los que contribuyen en mayor medida a la actividad antioxidante de la cáscara de los frutos del melón de olor (*Sicana odorifera*), encontrando que la quercetina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→6)- $\beta$ -D-glucopiranososa, quercetina-3-O-(6''-malonil)-glucopiranosido,

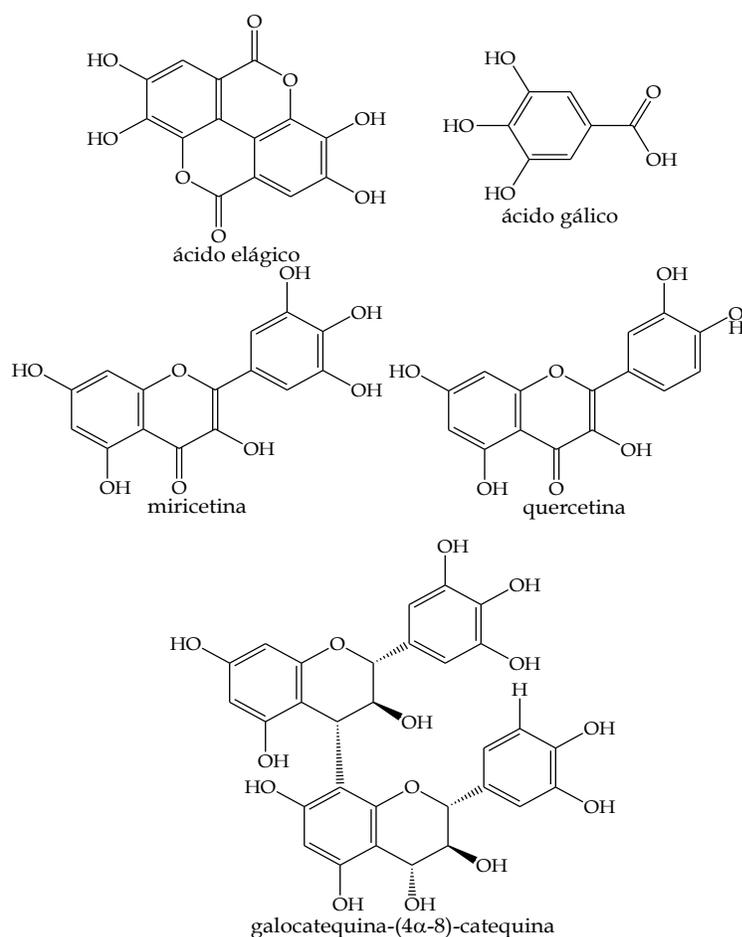
quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucopiranososa y quercetina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranososa-4'-O- $\beta$ -D-glucopiranososa, son los de mayor contribución. También se observó que la glicosidación simultánea en C-3 y C-4' de la quercetina, reducía la actividad antioxidante.<sup>75</sup>



**Figura 7.** Estructuras químicas de los compuestos luteolina y quercetina.

Se han realizado varios estudios relacionados con el contenido de compuestos fenólicos en frutos de la familia Myrtaceae. Entre ellos se encuentra el efectuado sobre dos especies, *Syzygium cumini* y *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*, en donde los compuestos se caracterizaron por HPLC-ESI/MS en modo tándem, mediante la comparación de los tiempos de retención con estándares y las fragmentaciones observadas en los espectros. La mayor cantidad de compuestos antioxidantes se encontró en *S. cumini*, los cuales se aislaron como una mezcla compleja de taninos hidrolizables (ácido gálico y ácido elágico libres y glicosidados con *D*-glucosa, quercetina, entre otros). En *C. nervosum* se encontraron trazas de malvidina 3-O-*p*-cumaroil glucósido; así mismo, los compuestos activos eran taninos hidrolizables derivados del ácido cafeoilquínico, ácido gálico y metoximetilgalato.<sup>76</sup> Del mismo modo, se han realizado varios estudios comparativos para determinar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en los frutos de la guayaba común *Psidium guajava*.<sup>77,78,79,80,81</sup> pero no se había publicado la identidad de éste tipo de compuestos. Hasta hace poco, Flores *et al* en 2015, caracterizaron 21 compuestos de tipo fenólico en guayaba, por medio de análisis por HPLC-PDA y HPLC-ESI/MS, y comparación con los estándares disponibles. Los compuestos encontrados en los frutos de *P. guajava* fueron: delfinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-glucósido, miricetina-3-O- $\beta$ -D-glucósido, miricetina-3-O-arabinósido, miricetina-3-O-xilósido,

quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosido (guajaverina), quercetina-3-O-arabinósido (avicularina), isoramnetina-3-O-glucósido, isoramnetina-3-O-galactósido, ácido absísico, quercetina, pinfaensina, galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-galocatecol, turpinionosido A, pedunculoso, galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-catequina, ácido guavenoico, ácido madecasico, y ácido asiático. Así mismo, en las hojas de la planta *P. guajava*, se han identificado taninos, flavonoides (quercetina) y ácido eláxico.<sup>82</sup> En la figura 8 se presentan algunas de las estructuras químicas de compuestos fenólicos encontrados en la familia Myrtaceae.



**Figura 8.** Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos encontrados en la familia Myrtaceae.<sup>76,82</sup>

## 1.4. EFECTO DE LA MICROBIOTA ORAL HUMANA EN EL METABOLISMO DE COMPUESTOS PRECURSORES DE AROMA

La microbiota humana es el conjunto de microorganismos presente en los diferentes ecosistemas del cuerpo humano. En su gran mayoría, estos microorganismos no son patógenos y forman parte de la denominada microbiota normal o flora nativa, la cual se encuentra localizada principalmente en: piel, boca, tracto respiratorio, tracto urinario y tracto gastrointestinal (Figura 9). Se estima que aproximadamente el 90% de las células dentro del cuerpo humano son de origen bacteriano, vírico o fúngico.<sup>83</sup> Sin embargo, hasta el momento, sólo se ha caracterizado una pequeña fracción de los microorganismos que componen la microbiota humana, presumiéndose que el “microbioma” podría superar en más de 100 veces al propio genoma humano; así mismo, se ha observado que la población microbiana es propia para cada individuo y existe mucha variabilidad entre individuos.<sup>84</sup>

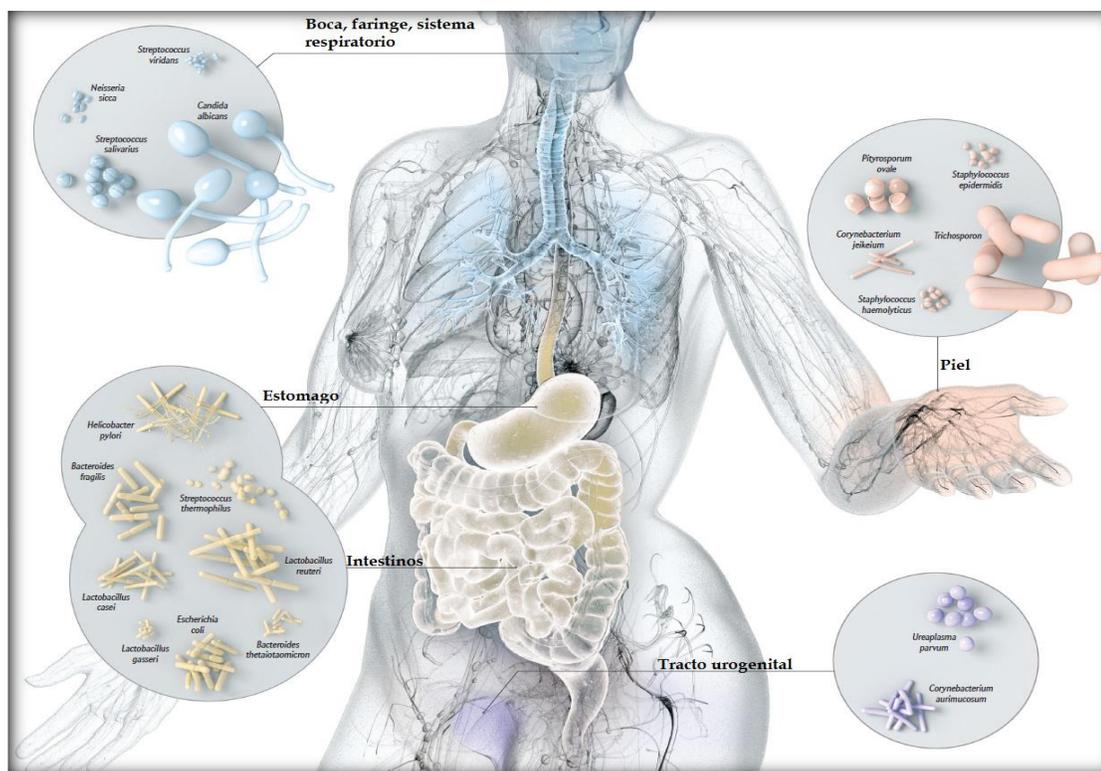


Figura 9. Microbiota representativa asociada al cuerpo humano.<sup>85</sup>

La interacción entre la microbiota normal y el ser humano en la mayoría de los casos es benéfica para ambos, ya que la microbiota participa en numerosos procesos fisiológicos esenciales para mantener la salud humana, como los procesos de digestión, de nutrición, entre otros.<sup>86</sup> Además la microbiota participa activamente en la defensa y protección frente a patógenos y en el desarrollo de la respuesta inmunológica humana.<sup>87</sup>

La cavidad oral es un ecosistema complejo en el cuál se han detectado más de 750 especies de bacterias distintas, estos microorganismos pueden estar presentes en la saliva o adheridos a la superficie oral, formando comunidades interespecies organizadas conocidas como biopelículas o *biofilms*, gran parte de las bacterias presentes en la cavidad oral no son cultivables.<sup>88</sup> La cantidad y composición de la microbiota oral varía a lo largo de la vida del individuo debido a varios factores como la dieta, la higiene oral, los hábitos de vida; así mismo, dentro de la cavidad oral, existen distintos microambientes con diversas características físicas y químicas que permiten el desarrollo de unas u otras especies, por esta razón, se caracterizan por tener una composición bacteriana distinta.<sup>89</sup> Cabe resaltar que el proceso de digestión de los alimentos se inicia en la boca con la masticación y allí, comienza la liberación de los distintos compuestos presentes en la matriz alimentaria. Ya en la boca, los compuestos liberados pueden empezar a degradarse debido a la actividad hidrolítica de la saliva o por la acción microbiana.

Estudios realizados en vinos, han demostrado la influencia de la saliva sobre la liberación del aroma, la cual no depende únicamente de la composición del vino (tanto los compuestos volátiles como no volátiles), sino que existen otros factores que pueden afectar aroma retronasal dependientes de parámetros fisiológicos humanos (microbiota oral, la composición de la saliva, mucosa oral, la temperatura, los cambios de volumen de aire en la cavidad de boca, etc.).<sup>90</sup> De hecho, se ha comprobado la capacidad de algunas bacterias anaeróbicas orales para hidrolizar compuestos no volátiles inodoros de tipo conjugado a S-cisteína de la cebolla, el ají y las uvas en sus respectivos tioles que son compuestos impacto del aroma.<sup>52</sup> En estudios *in vitro* con saliva humana han demostrado

el papel de las enzimas salivales ( $\beta$ -glucosidasas, esterasas, etc.) en la degradación de sustancias volátiles del aroma libre. Así, se determinó que el 2-furfuriltiol, 2-feniletanotiol, y 3-mercapto-3-metil-1-butanol, se redujeron de ~70 al 20% de sus concentraciones iniciales en un periodo de 10 minutos; así mismo, los esteres del vino también decrecen por acción de la saliva humana y sus carboxilesterasas.<sup>91,92,93</sup> Walle y colaboradores en el año 2005 evaluaron la degradación *in vitro* de glicósidos de flavonoides provenientes del vino, en sus correspondientes agliconas, por acción de la microbiota oral presente en la saliva de voluntarios sanos,<sup>94</sup> encontrando que la quercetina 4'-glucósido o la genistéina 7-glucósido cuando se incuban con la saliva humana, liberan la quercetina y la genistéina. Así mismo, en estudios adicionales se demostró que los conjugados de glucosa se hidrolizan rápidamente, en contraste con los conjugados con otros azúcares (rutina, quercetina, y naringina).

Los precursores del aroma de la uva son glicósidos inodoros que representan un depósito natural de potenciales moléculas olfativamente activas en los vinos. En el trabajo publicado por Muñoz-González y colaboradores en el año 2015,<sup>95</sup> se evaluó la capacidad de la microbiota oral humana para producir agliconas olfativamente activas del vino de uva a partir de los precursores glicosídicos inodoros aislados a partir de uvas blancas. Para ello, se siguieron dos enfoques metodológicos que implicaron el uso de bacterias orales típicas o toda la microbiota bucal aislada de la saliva humana. Las agliconas responsables del aroma fueron liberadas en los medios de cultivo y se aislaron y analizaron por HS-SPME-GC-MS. Los resultados mostraron la capacidad de las bacterias orales para hidrolizar los precursores glicosídicos del aroma de uva, la liberación de diferentes tipos de moléculas odorantes tipo terpenol (linalol, nerol, etc), derivados bencénicos (alcohol bencílico y alcohol  $\beta$ -fenetílico), y compuestos C<sub>6</sub> (1-hexanol y Z-3-hexenol). Además en este estudio se concluyó que la actividad hidrolítica parece ser dependiente de las bacterias, no a la saliva en sí y está sujeto a una gran variabilidad interindividual.<sup>95</sup>

Es importante resaltar que los estudios en este campo son limitados y novedosos, en parte por la disponibilidad de las bacterias cultivables, ya que a pesar que la microbiota oral es muy diversa y existen muchas comunidades bacterianas presentes, solo un número

limitado de ellas crecen sobre los medios de cultivo comerciales. Por tal motivo, Tian, *et al* en 2010,<sup>96</sup> desarrollaron un medio de cultivo al cual denominaron SHI, que se hizo combinando los ingredientes de varios medios de cultivo selectivos, que soportan distintas subpoblaciones de la comunidad microbiana oral original, derivada de la saliva humana. El análisis por PCR-DGGE, que es solo una de las técnicas de análisis de comunidades bacterianas, evidenció la presencia de alrededor de 40 géneros bacterianos diferente, los cuales se detectaron también en la saliva original. Las familias dominantes encontradas fueron: Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes. Por tal motivo, este medio de cultivo se ha venido usando en estudios como el de Muñoz-González mencionado anteriormente,<sup>95</sup> para asegurar que las condiciones *in vitro* sean lo más cercanas a las condiciones en la cavidad oral.

## 1.5. EFECTO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA EN EL METABOLISMO DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los componentes dietarios juegan un rol benéfico en la nutrición básica, lo cual es importante en el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos.<sup>iv</sup> Los prebióticos,<sup>v</sup> ácidos grasos poli-insaturados y compuestos fenólicos son los compuestos bioactivos que han sido caracterizados mayormente (Tabla 1). Sin embargo, la biodisponibilidad y efectos benéficos de los compuestos fenólicos dependen en gran medida de su transformación por los componentes de la microbiota intestinal.<sup>97</sup>

---

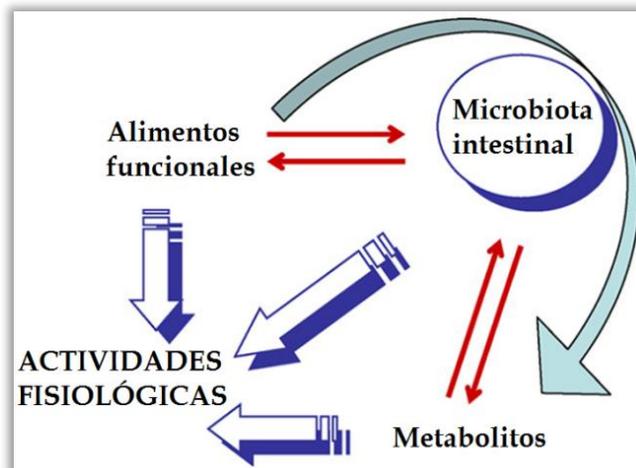
<sup>iv</sup> Nutraceutico hace referencia a aquellos alimentos que tienen un efecto benéfico sobre la salud humana. El término también puede aplicarse a compuestos químicos individuales presentes en comidas comunes.

<sup>v</sup> Los prebióticos son compuestos, que estimulan el crecimiento y actividad de una o varias cepas de bacterias benéficas en el colon, mejorando la salud humana.

**Tabla 1.** Algunos compuestos biofuncionales en alimentos y su función fisiológica.<sup>97</sup>

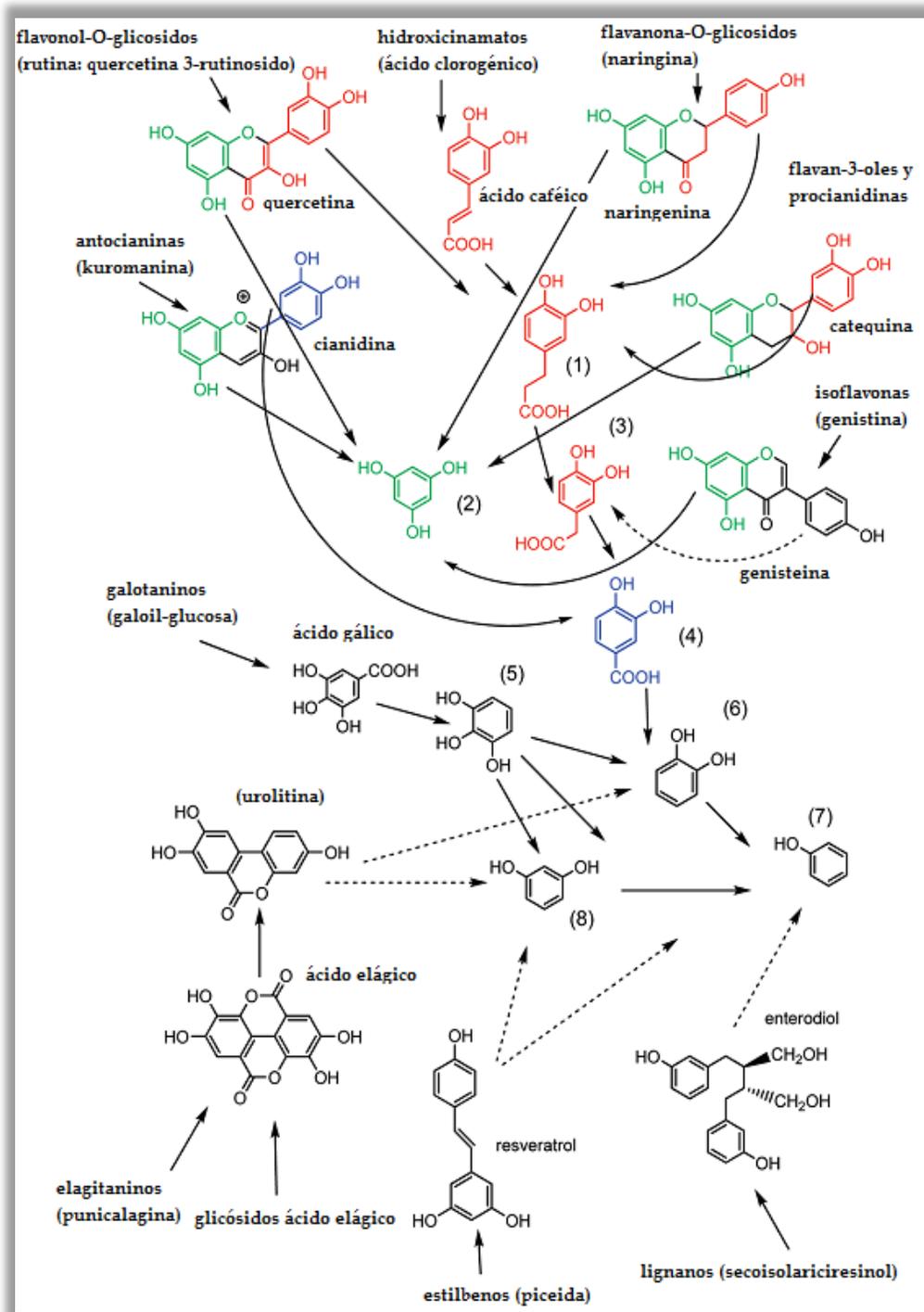
GRUPO DE COMPUESTOS		COMPUESTO	FUNCION FISIOLÓGICA
<b>Fenólicos</b>	Ácidos hidroxicinámicos	ácido <i>p</i> -cumárico	Bacteriostático o antimicrobiano
		Ácido caféico	Bacteriostático o antimicrobiano
<b>Flavonoides</b>	Flavonoles	Quercetina, 3-ramnosil quercetina	Regulación de la respuesta inflamatoria
		Camferol	Anti-inflamatorio
		Resveratrol	Efecto prebiótico, abolición de los factores de virulencia
	Flavanoles	Catequinas	Propiedades antimicrobianas
	Flavanonas	Hesperitina, naringenina	Anti-inflamatorio
	Isoflavonoides	Genisteina, daidzeina	Propiedades antiadhesivas
	Antocianidinas	Cianidina	Propiedades antimicrobianas
		Hidroxil-6 <i>H</i> -dibenzopiran-6-ona	Baja capacidad antioxidante

Algunos compuestos biofuncionales de tipo fenólico y sus productos metabólicos pueden inhibir bacterias patógenas, así como estimular el crecimiento de bacterias benéficas ejerciendo un efecto prebiótico. De éste modo, la microbiota intestinal tiene un propósito nutricional y a su vez es un factor que afecta la actividad biológica de otros compuestos alimenticios adquiridos oralmente (Figura 10).<sup>97</sup>



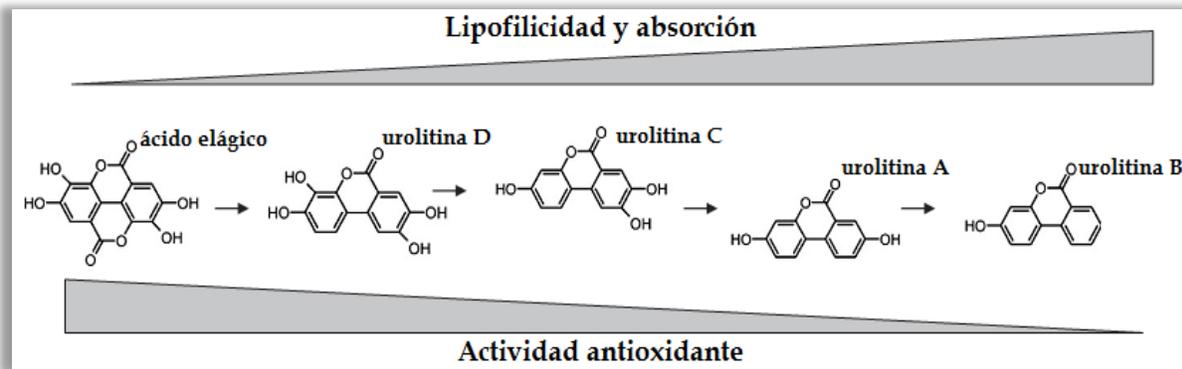
**Figura 10.** Interacciones entre los componentes de los alimentos funcionales y la microbiota intestinal.<sup>97</sup>

Se conoce que al ingerir algunas frutas o bebidas ricas en compuestos fenólicos, estos compuestos son transformados en ácidos fenólicos o estructuras lactónicas por la microbiota intestinal. El colon es el sitio donde se efectúa la fermentación microbiana y los metabolitos circulan en el plasma siendo secretados luego en la orina. Por ejemplo, el metabolismo microbiano de las antocianinas incluye la desconjugación y fisión del anillo. La cianidina es convertida a ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), la malvidina a ácido siríngico (ácido 3,4-dimetoxibenzoico), la peonidina a ácido vainílico (ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico) y la pelargonidina a ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 11).<sup>98</sup> Entre los compuestos fenólicos, los flavonoles son una clase de flavonoides que tienen el esqueleto 3-hidroxi-2-fenilcromen-4-ona, y son ampliamente degradados por la microbiota del colon, para producir compuestos fenólicos simples derivados de anillos A y B después de que el anillo C del flavonoide se ha roto. En este caso la descomposición del anillo en C se lleva a cabo en diferentes posiciones, dando lugar a un mayor número de compuestos fenólicos simples. Por lo tanto, la quercetina da ácido 2-(3,4-dihidroxifenil)acético, ácido 2-(3-hidroxifenil)acético, y ácido 3,4-dihidroxibenzoico del anillo B (Figura 11), mientras que el floroglucinol, ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico, y ácido 3-(3-hidroxifenil)propanoico son producidos a partir del anillo A.<sup>99</sup>



**Figura 11.** Ruta metabólica y metabolitos comunes obtenidos a partir de la degradación por microbiota intestinal de los compuestos fenólicos. Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico (1), floroglucinol (2), ácido 2-(3,4-dihidroxifenil)acético (3), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (4), pirogalol (5), catecol (6), fenol (7), resorcinol (8). Pasos demostrados (líneas continuas), pasos hipotéticos (líneas discontinuas).<sup>99</sup>

Se han realizado estudios sobre la metabolización en el intestino compuestos de tipo elagitanino y la liberación del ácido elágico bajo condiciones fisiológicas, mediante ensayos *in vivo* (con cerdos), y se ha encontrado que se produce urolitina D, urolitina C, urolitina A, y finalmente urolitina B; compuestos que se producen de manera consecutiva y en distintas partes del intestino. También se observó que estos metabolitos se absorben preferencialmente con el incremento de la lipofiliidad, aunque se observó una disminución proporcional de su actividad antioxidante (Figura 12), por lo tanto, las urolitinas se consideran como biomarcadores de exposición humana derivados de la dieta.<sup>100</sup>



**Figura 12.** Metabolitos bacterianos obtenidos a partir del ácido elágico. Incremento del metabolismo involucra más lipofiliidad y absorción intestinal, y disminución de la actividad antioxidante.<sup>100</sup>

Así mismo se conoce que frutos como las manzanas, peras, uvas, o el té verde, son ricos en polifenoles (particularmente flavonoles), los cuales pueden reducir significativamente el peso del cuerpo en personas obesas, como se explica a continuación. El metabolismo de los polifenoles por la microbiota involucra el rompimiento de enlaces glicosídicos. Los glicanos, que son el producto del rompimiento glicosídico, son necesarios para la supervivencia de la microbiota intestinal como una base nutricional. Entonces se tienen

dos puntos cruciales: El primero, los *firmicutes*<sup>vi</sup> poseen enzimas degradadoras de glicano al igual que los *bacteroidetes*; el segundo, los *firmicutes* son más reprimidos que los *bacteroidetes* por propiedades antimicrobianas de los compuestos fenólicos. La comunidad de *bacteroidetes* prevalece siguiendo una ingesta dietaria de polifenoles, a su vez prevalece con la fermentación de éstos a compuestos fenólicos, ya que los *bacteroidetes* tienen más enzimas glicano degradantes, por lo cual se puede pensar que este es un mecanismo mediante el cual los polifenoles alimenticios ejercen su efecto de disminución de peso.<sup>101</sup>

En el laboratorio se puede analizar el metabolismo de los compuestos fenólicos en el intestino, haciendo uso de UPLC-ESI/TQ/MS, teniendo en cuenta la metodología desarrollada por Sánchez-Patán y colaboradores en el 2011.<sup>102</sup> En este estudio, se consideraron un total de 47 compuestos fenólicos (entre ellos, ácidos hidroxifenilpropanoicos, hidroxifenilacéticos, hidroxicinámicos, hidroxibenzoicos, e hidroxifenilacéticos, junto con fenoles simples) para ser suministrados a voluntarios (humanos saludables). Los compuestos se suministraron en cápsulas a una concentración detectable por espectrometría de masas. La técnica requería recolectar las heces antes y después de la ingesta del suplemento de flavan-3-oles. Los resultados revelaron un incremento en los ácidos protocatecuico, siríngico, benzoico, *p*-cumárico, fenilpropanoico, 3-hidroxifenilacético, y 3-hidroxifenilpropanoico, lo cual está relacionado con la absorción y biodisponibilidad de estos compuestos. Otra opción experimental se basa en la fermentación de los compuestos con la microbiota presente en las heces de distintos individuos, realizando una incubación anaerobia para luego extraer los compuestos (extracción líquido-líquido) y evaluar por CG los compuestos que se producen luego de su metabolización (fermentación).<sup>103</sup>

---

<sup>vi</sup> Los *firmicutes* (del latín *firmus* = fuerte y *cutis* = piel en referencia a su gruesa pared celular) son una familia de bacterias, la mayoría de las cuales tienen una estructura celular Gram-positiva, pertenecen al grupo llamado de contenido guanina y citosina bajo, tienen forma de bacilo y a veces de coco. Muchos Firmicutes producen endosporas.

## 1.6. LA GUAYABA AGRIA *Psidium friedrichsthalianum* Nied.

La especie *Psidium friedrichsthalianum* Nied. también conocida como *Calyptrapsidium friedrichsthalianum* O. Berg., es una planta perteneciente a la familia Myrtaceae. La descripción que se ha dado a esta especie por la flora mesoamericana es: arbustos o árboles hasta 8 m; brotes jóvenes y flores diminutamente puberulentos, hojas elípticas o elíptico-oblongas las láminas 3-15 x 1,7-6 cm, 1,7-2,9 veces más largas que anchas, subcoriáceas a coriáceas, pardo-rojizas oscuro a verde-gris oscuro, con frecuencia ligeramente brillante; botones 10-20 mm, subglobosos a piriformes. Flores con el cáliz 6-8 mm, cerrado en el botón, partiéndose irregularmente en 2 o 3 partes en la antesis, pétalos cada 12 mm, elípticos. Frutos hasta 10x10 cm, globosos a piriformes; semillas de 4 a 8 mm de diámetro, con escueta en forma de "C", ligeramente angulares (Figura 13).



**Figura 13.** Fotografía tomada a los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) provenientes de Montería, Córdoba, Colombia.

La especie crece normalmente en altitudes que van desde el nivel del mar hasta 800 msnm; generalmente se encuentra a lo largo de los arroyos o en los bosques pantanosos, tanto en la costa como en el interior, también prolifera en los huertos familiares.<sup>104</sup> La

planta es sensible al frío y se muere por las heladas. *Psidium friedrichsthalianum* Nied. se encuentra distribuida desde el sur de México, pasando por toda Centro América hasta el oriente de Venezuela. Éste árbol crece naturalmente en Colombia (especialmente en la cuenca del Sinú, el Valle del Magdalena y Cauca).

Tanto en las áreas de distribución natural, como en algunos países que es reconocida *Psidium friedrichsthalianum* Nied. recibe distintos nombre locales:<sup>105</sup> Colombia (guayaba agria, guayaba coronilla), Costa Rica (Cas, cas ácida, cas ácido), Ecuador (guayaba del Choco), El Salvador (arrayán, arrayan), Francia (goyavier de Costa Rica, goyavier du Costa Rica), Alemania (cas, Kostarika-guave), Guatemala (guayaba ácida), Honduras (guayaba agria, guayaba de choco, guayaba de Costa Rica, guayaba de danto), México (guayaba montes), Nicaragua (guayaba), Panamá (guayaba agria, guayaba de agua).

En el departamento de Córdoba, la guayaba agria es una de las frutas de mayor consumo, por tal razón se han generado proyectos para organizar y tecnificar su cultivo,<sup>106</sup> aunque en el resto del país es subutilizada, principalmente porque es una fruta muy perecedera en condiciones de almacenamiento y transporte.<sup>6</sup> Los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. habitualmente se consumen en fresco (pulpa) o en jugos. Uno de los principales atractivos de la fruta fresca es el aroma que se caracteriza por ser muy agradable e intenso, y que recuerda a la guayaba común (*Psidium guajava*), pero con notas olfativas diferentes como son verde, terrosa, láctea, azufrada, y un descriptor de sabor característico que es el ácido,<sup>vii</sup> de donde se deriva su nombre común.

Los estudios químicos realizados sobre los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. son pocos. Entre ellos, se encuentra el estudio realizado para determinar los nutrientes de la fruta en Guatemala (Tabla 2), encontrando que los frutos son ricos en pectina.<sup>13</sup> Posteriormente, frutos maduros de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. recolectados en Cotorra y Tierra Alta, Córdoba, Colombia, se sometieron a una caracterización

---

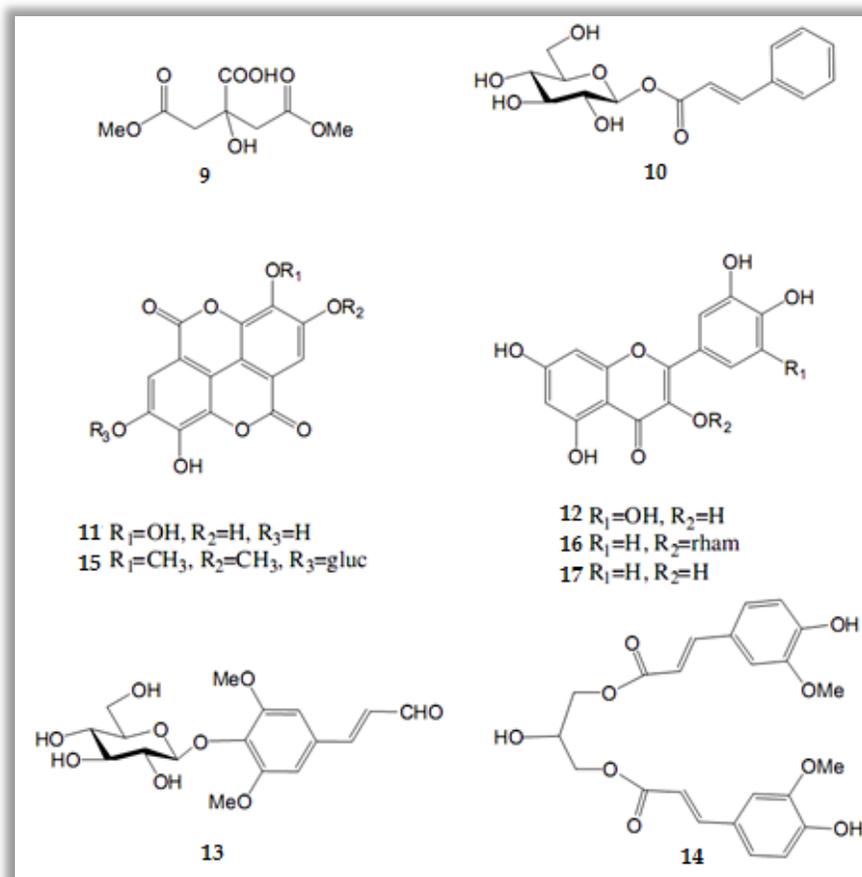
<sup>vii</sup> En la región del Sinú se relaciona la sensación ácida con el descriptor agrio, lo cual concuerda con su pH bajo y alto valor de acidez titulable

fisicoquímica, en el cual se determinó el pH (2,60), la acidez titulable (2,97 % de ácido cítrico), los sólidos solubles (9,46 °Brix) y el índice de Madurez (3,20).<sup>7</sup> En un estudio realizado por Pino *et al* en el año 2002,<sup>12</sup> se caracterizaron 173 compuestos volátiles de los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. recolectados en la Habana (Cuba), los cuales fueron aislados por extracción simultánea con disolventes orgánicos y destilación por arrastre con vapor (DES). Los componentes mayoritarios encontrados fueron: (*E*)- $\beta$ -cariofileno, *a*-terpineol, *a*-pineno, *a*-selineno,  $\beta$ -selineno,  $\delta$ -cadineno, 4,11-selinadieno, y *a*-copaeno. Entre la composición del extracto de volátiles, también se encontraron ésteres alifáticos y compuestos de tipo terpénico, sin embargo hasta la fecha no se han caracterizado los compuestos activos olfativamente.

**Tabla 2.** Parámetros cuantificados en la determinación de nutrientes de los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. provenientes de Guatemala.<sup>13</sup>

Parámetro cuantificado	Porcentaje (%)
<b>Humedad</b>	83,15
<b>Proteína</b>	0,78–0,88
<b>Carbohidratos</b>	5,75–6,75
<b>Grasa</b>	0,39–0,52
<b>Fibra</b>	7,90
<b>Ceniza</b>	0,80

Recientemente, se realizó un estudio sobre los compuestos no volátiles de fruta proveniente de la Florida (USA) presentes en las fracciones de acetato de etilo, hexano, cloroformo y *n*-butanol, de donde se caracterizaron algunos compuestos fenólicos por HPLC-MS, por comparación con estándares. Estos compuestos fueron: 1-*O*-*trans*-cinamoil- $\beta$ -D-glucopiranososa, ácido elágico, miricetina, quercitrina, y quercetina. También, se identificaron tentativamente teniendo en cuenta los fragmentos presentados en los espectros de masas, los compuestos: 1,5-dimetilcitrato, sinapicaldehído 4-*O*- $\beta$ -D-glucopiranososa, ácido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico-4'-*O*-D-glucopiranosido, y 1,3-*O*-diferuloilglicerol (Figura 14).<sup>11</sup>



**Figura 14.** Estructuras químicas de los compuestos identificados en los frutos *Psidium friedrichsthalianum* Nied. provenientes de Homestead, la Florida, USA. 1,5-dimetilcitrato (9), 1-*O*-*trans*-cinamoil- $\beta$ -D-glucopiranososa (10), ácido elágico (11), miricetina (12), sinapicaldehído 4-*O*- $\beta$ -D-glucopiranososa (13), ácido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico-4'-*O*-D-glucopiranosido (14), quercitrina (15), 1,3-*O*-diferuloilglicerol (16), y quercetina (17).<sup>11</sup>



## 2. EL AROMA DE LA GUAYABA AGRIA (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) Y SU GENERACIÓN A PARTIR DE PRECURSORES

### 2.1. GENERALIDADES

Sensorialmente, el aroma de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) tiene notas olfativas similares a la guayaba común (*Psidium guajava*), sin embargo la sensación predominante dentro de los panelistas entrenados que colaboraron en éste estudio es que la guayaba agria tiene un aroma más cítrico y fresco asociado a otras frutas tropicales, muy agradable, tanto que produce una alta salivación cuando se evalúan orthonasalmente los frutos frescos. También, se sometió la fruta a evaluación por diferentes personas (20 individuos) sin entrenamiento olfativo y que desconocían completamente la guayaba agria, interrogándolas acerca de que fruta o frutas se asemejaba el aroma que percibían, cuando se suministraba la fruta madura cortada en trozos en un recipiente cerrado. Las respuestas más comunes fueron: granadilla, maracuyá, lulo, guayaba con maracuyá, arazá, mango y piña. A pesar de que existe un estudio de la composición de compuestos volátiles en frutos recolectados en el Jardín Botánico Nacional cerca de la Habana, Cuba,<sup>12</sup> hasta la realización de ésta tesis no se había determinado cuales eran los compuestos responsables del aroma de los frutos frescos, por tal motivo en éste capítulo se presenta la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles olfativamente activos presentes en la fruta de *P. friedrichsthalianum*, los precursores de aroma de tipo glicosídico y los de tipo S-cisteína.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se describe a continuación fue utilizada para realizar el estudio del *flavour* de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.). Inicialmente se estableció la composición del extracto de volátiles libres de los frutos completos, haciendo especial énfasis en la caracterización de los compuestos de tipo azufrado, seguido de la determinación de los volátiles enlazados glicosídicamente y de los provenientes de derivados S-cisteinilados.

### 2.2.1. Generalidades, equipos

Los análisis por CG-O se realizaron en un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II (Hewlett-Packard, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizaron dos tipos de columnas capilares DB-FFAP y RTX-5 (cada una de 30 m × 0,32 mm d.i., 0.25µm; J&W Scientific, Chromatographie-Handel Müller, Fridolfing, Alemania, y Restek, USA, respectivamente). La temperatura programada para el horno se optimizó manteniéndolo durante 4 minutos a 40 °C e incrementando la temperatura 6 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 230 °C, la cual se mantuvo durante 5 minutos en el caso de la columna FFAP. Del mismo modo, para la columna RTX-5 la temperatura programada para el horno se optimizó manteniéndolo durante 1 minuto a 40 °C, luego se incrementó la temperatura 6 °C/min hasta alcanzar 130 °C, posteriormente 2 °C/min hasta 165 °C, y por último 14 °C/min hasta una temperatura de 300 °C, la cual se mantuvo durante 4 minutos. Las muestras se inyectaron en el puerto de inyección split/splitless a 300°C en modo split (1:9). En todos los casos se inyectó 1 µL de muestra, se empleó Helio (grado AP) como gas de arrastre a una velocidad de 1 mL/min. Al final de los capilares se conectó un divisor de cuarzo en forma de Y (Chromatographie Handel Mueller, Fridolfing, Alemania), que dividía el flujo en dos partes iguales, una para el FID (230 °C) y la otra para el puerto de olfacción (230 °C) que permitió obtener respuesta simultánea en los dos detectores.

Los análisis por CGAR-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases GC-17A Shimadzu acoplado a espectrómetro de masas QP-5050A Shimadzu (Shimadzu, Tokio, Japón), el cual operó en modo de ionización por impacto electrónico (IE) a 70 eV, se detectaron los iones positivos con masas entre 40 y 350 u. Las condiciones cromatográficas son las mismas que se mencionaron anteriormente para los análisis CG-O en ambas columnas, se utilizaron dos tipos de columnas capilares DB-FFAP y RTX-5. Se inyectó en todos los casos 1 µL de muestra, se empleó Helio (grado UAP) como gas de arrastre a una velocidad de 1 mL/min. Los datos se procesaron en el software Class 5000 v 2.2 MS-Workstation.

Los análisis de los precursores glicosídicos se realizaron por HPLC-MS en un cromatógrafo líquido LC-10AD SHIMADZU, equipado con un detector UV/Vis detector (SPD-10A), dos bombas (LC-10AD) y acoplado a espectrómetro de masas LCMS-2010 EV SHIMADZU (Shimadzu, Tokio, Japón). La inyección de la muestra se realizó dentro de una columna KINETEX C<sub>18</sub> 2,6 µm (150 × 2.0 mm d.i., Phenomenex®, USA). Se inyectaron 5 µL de una disolución de 5 mg en 100 µL de acetonitrilo/agua (1:1). Como fases móviles se utilizaron agua/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v, fase A) y acetonitrilo/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v, fase B), el flujo se fijó en 0,2 mL/min. Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal: Desde 0 % de B en 0-10 min, 0 a 15 % de B en 10-45 min, 15 a 50 % de B en 45-70 min, 50 a 100 % de B en 70-75 min, hasta 100 % de B en 75-80 min, por último se retorna las condiciones iniciales. El espectrómetro de masas operó en modo de ionización por electrospray (ESI) a 1,5 kV en modo positivo y negativo, simultáneamente: CDL, 300 °C; bloque a 240 °C; flujo de gas (N<sub>2</sub>) a 1.5 L/min; voltaje CDL, 150.0 kV; voltaje Q array RF 150 V; voltaje detector, 1.5 kV; se detectaron los iones positivos con masas entre 100 y 800 u. Los datos de UV and EM se adquirieron y procesaron usando el programa Shimadzu LCMS Solution.<sup>49</sup> Los análisis de los precursores cisteinilados se realizaron en el mismo equipo mencionado anteriormente y se mantuvieron las condiciones de operación. En este caso se utilizaron como fases móviles ácido fórmico/agua (0,1:99,9, v/v, fase A) y acetonitrilo/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v, fase B), el flujo se fijó en 0,3 mL/min. Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal que se inició con 10% de B,

se mantuvo durante 0,5 min, luego se aumentó a 30% de B en 8,4 min, a continuación se llevó a 90% de B en 2,1 min y por último se retornó a las condiciones iniciales. El espectrómetro de masas operó en modo de ionización por electrospray (ESI) a 1,5 kV en modo positivo y negativo: CDL, 300 °C; bloque a 240 °C; flujo de gas (N<sub>2</sub>) a 1.5 L/min; voltaje CDL, 150.0 kV; voltaje Q array RF 150 V; voltaje detector, 1.5 kV. Los análisis se realizaron en el modo SIM siguiendo los iones en  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup>= 222 y [M-1]<sup>-</sup>= 220 para detectar la 3-(1-hexanol)-L-cisteína y en  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup>= 122 y [M-1]<sup>-</sup>= 120 para detectar el fragmento de cisteína.<sup>107</sup> Los datos de UV and EM se adquirieron y procesaron usando el programa Shimadzu LCMS Solution.

### 2.2.2. Materiales y reactivos

Los siguientes reactivos: diclorometano, pentano, metanol, sulfato de sodio (anhidro), acetato de etilo, ácido cítrico, fosfato de sodio, disolución de amoníaco (25% p/p), hidrogeno fosfato de dipotasio, dihidrógeno fosfato de potasio, titriplex® III e hidróxido de sodio fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania). El fosfato de 5-piridoxal hidratado, el fenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, la emulsina ( $\beta$ -glucosidasa) y el ditiotreitolo fueron comprados a Sigma-Aldrich ((St. Louis, MO, USA) y la L-glutaciona a Fluka (Laramie, USA). Todos los disolventes se destilaron antes de su uso. El nitrógeno líquido fue obtenido de Linde (Bogotá, Colombia). Los siguientes estándares se adquirieron comercialmente y se utilizaron como referencia:  $\delta$ -dodecalactona (Merck, Darmstadt, Alemania); butanoato de etilo, 2-metil-3-pentanona, metional, (Z)-3-hexenal, 2-etil-3(5 o 6)-dimetilpirazina, 2-metil-1,3-ditioolano, butanoato de linalilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); linalol, 1-hexanol, E-2-pentenal, bis(metiltio)metano, 3-sulfanil-1-hexanol y el cinamato de etilo (Alfa Aesar, Heysham, UK), y la mezcla de n-alcanos (C<sub>10</sub>-C<sub>25</sub>) (Laboratorio Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania). El disulfuro de dimetilo, el hexanoato de etilo y el ácido 3-metilbutanoico, fueron generosamente suministrados por DISAROMAS S.A. (Bogotá, Colombia). El acetato de 3-sulfanilhexilo fue sintetizado en el laboratorio, de acuerdo a lo reportado en la literatura por Steinhaus *et al.* (2008).<sup>35</sup>

### 2.2.3. Material vegetal y caracterización

Los frutos de guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) se adquirieron en los mercados locales de Montería, Córdoba, Colombia. Para el estudio cualitativo y cuantitativo de los componentes activos olfativamente se utilizaron frutas en estado de madurez de consumo. Por tal razón se realizó su caracterización físico-química (pH, °Brix, y acidez titulable). El pH fue medido sobre los frutos macerados, utilizando un pHmetro Jenway (modelo 370, Essex, Inglaterra), el contenido de sólidos solubles totales fue medido directamente en la fruta con un refractómetro Atago (HRS-500, Tokio, Japón) los resultados fueron expresados como °Brix. La acidez titulable se determinó mediante el protocolo estándar (AOAC, 2006)<sup>108</sup> en donde 10 g de la fruta macerada se titulan con una disolución de NaOH 0,1 N. El resultado se expresó como porcentaje de ácido cítrico. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se sometieron a análisis estadístico para obtener el valor promedio y la desviación estándar. Un espécimen *voucher* se depositó en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, y se identificó bajo el código COL 566221.

### 2.2.4. Extracción de los compuestos volátiles

Los frutos maduros de guayaba agria (330 g) se homogenizaron con 150 mL de diclorometano, se agitaron continuamente en frío, luego 600 g de sulfato de sodio anhidro se adicionaron en pequeñas porciones, la mezcla se empacó dentro de una columna de vidrio y se hizo pasar 300 mL de diclorometano. Ésta fase orgánica se recolectó y se comprobó sensorialmente que exhibía las mismas características de aroma que los frutos frescos de guayaba agria. A continuación el extracto se sometió a destilación SAFE (*Solvent Assisted Flavour Evaporation*).<sup>24</sup> La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró hasta 1 mL utilizando una columna Vigreux (50 × 1 cm).

### 2.2.5. Identificación de los compuestos activos olfativamente

Se aplicó el método AEDA, en el cual, tres panelistas ubicaron las zonas activas olfativamente del extracto SAFE de guayaba agria, haciendo uso de la cromatografía de gases acoplada a olfatometría (CG-O). Luego, el extracto de aroma se diluyó paso a paso para obtener diluciones  $2^n$ , y cada disolución fue analizada por los panelistas mediante CG-O. La actividad olfativa de cada compuesto se expresó como el factor de dilución (FD), el cual se determinó como la dilución de mayor concentración a la que ese compuesto todavía se detecta mediante la comparación de todas las corridas.<sup>28</sup> Se realizó el promedio de los factores FD obtenidos por los tres panelistas.

Los índices de retención lineal fueron calculados de acuerdo al método de Kovats, utilizando una mezcla de parafinas normales  $C_{10}$ - $C_{25}$  como referencia externa. La identificación de compuestos volátiles se realizó de manera completa haciendo uso de los índices de retención, espectros de masas, y notas olfativas exhibidos por las disoluciones correspondientes a cada estándar (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 2.2.6. Aislamiento de compuestos azufrados por medio de gel de agarosa mercurada

Los análisis de CG-O evidenciaron la presencia de diversos compuestos de tipo azufrado los cuales no presentaron señal cromatográfica en CG-FID. Por esta razón el extracto de compuestos volátiles obtenido a partir de 370 g de fruta entera se concentró hasta 1 mL y los tioles se aislaron por cromatografía de afinidad sobre gel de agarosa mercurada. La muestra concentrada (0,5 mL) se aplicó sobre una columna de vidrio (2 cm x 0,5 cm d.i.) llena de gel de agarosa mercurada. Después de hacer un lavado con *n*-pentano/diclorometano (2:1 v/v, 50 mL), los tioles se eluyeron con ditiotreitól (10 mmol/L) en *n*-pentano/diclorometano (50 mL; 2:1 v/v). El ditiotreitól se eliminó por destilación SAFE y el destilado se concentró hasta 100  $\mu\text{L}$ . La fracción enriquecida de

compuestos azufrados se analizó por CG-O y CG-EM utilizando una columna DB-FFAP, las inyecciones en el GC-EM se realizaron en el modo *splitless* (1 min) en las condiciones expuestas en el numeral 2.2.1. También se analizaron los otros volátiles (fracción de compuestos no azufrados) y se compararon con el perfil obtenido para el extracto SAFE completo.

### 2.2.7. Cuantificación de los compuestos activos olfativamente

La cuantificación de los compuestos activos olfativamente de la guayaba agria se realizó por medio del método de estándar interno (IS), cuantificando solo aquellos compuestos que exhibieron un FD superior a 16. Así, se seleccionó como estándar interno el cinamato de etilo (50 µg), el cual se disolvió en el disolvente de extracción (100 mL), y se añadió a la pulpa de fruta homogenizada (250 g), usando el mismo procedimiento presentado para la obtención del extracto de compuestos volátiles (numeral 2.2.4.). Para determinar el factor de respuesta de cada uno de los compuestos volátiles, se construyeron curvas de calibración utilizando una serie de diluciones de concentraciones nominales variables que contenían cada analito (IS: analito, 1: 5 hasta 5: 1). En estas curvas se estableció que la pendiente era el factor de respuesta. Una cantidad idéntica de patrón interno se añadió a cada disolución y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes.<sup>109</sup> Todos los datos fueron obtenidos por triplicado. La concentración de cada analito se calculó por comparación de las señales obtenidas en CG-FID con el del estándar correspondiente, teniendo en cuenta el factor de respuesta relativa, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[ ]_X = \frac{A_X}{A_{IS}} * \frac{\mu\text{g IS}}{\text{kg fruta}} * \text{RF}^{-1}$$

Donde,  $[ ]_X$  es la concentración de analito en mg/kg de fruta,  $A_X$  es el área analito,  $A_{IS}$  es el área del estándar interno y RF es el factor de respuesta.

Con los datos de concentración y valor de umbral de olor de cada compuesto en agua se

calcularon los OAVs, con el fin de cuantificar el aporte real de cada compuesto al aroma de la fruta, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$OAV = \frac{[ ]_x}{\text{umbral de olor}}$$

Donde, [ ]<sub>x</sub> es la concentración de analito en mg/kg de fruta, y se utiliza el umbral reportado en la literatura o determinado en el laboratorio.

### **2.2.8. Determinación del umbral de olor en agua del butanoato de linalilo**

Para la determinación del umbral de olor del butanoato de linalilo, el cual no se encontró reportado en la literatura, se siguió el método (3AFC) 3-alternativas de elección forzada (ASTM E679).<sup>110</sup> Éste método utiliza tres muestras, en donde dos son los controles o blancos y la tercera contiene la sustancia a evaluar. Para tal fin, se reunieron 14 panelistas (12 mujeres) de la población general del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Las edades oscilaron entre 20 y 40 años (media = 29,29, SD = 7,37). Ninguno de los panelistas informó sufrir de disfunción olfativa, y las pruebas se realizaron por separado para cada panelista. Se evaluó el estándar de butanoato de linalilo (CAS: 78-36-4; pureza: ≥95%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y se utilizó agua filtrada como disolvente y como blanco de muestra. Se prepararon disoluciones del compuesto de concentración progresiva (factor de dilución igual a 3) siguiendo las instrucciones de la norma ASTM E679, evaluando concentraciones lo más cercanas posibles.<sup>110</sup> El ensayo se realizó teniendo en cuenta ocho grupos de 3AFC, en donde se usaron ocho concentraciones discretas del compuesto objetivo para cada ensayo. Alícuotas de 20 mL de cada concentración o de los blancos se colocaron en vasos de cuello cilíndrico (7 cm x 3,5 cm) con tapa y se evaluaron orthonasalmente. La estimación del umbral se realizó con base en la norma ASTM E679 de regla de parada (última reversa), el grupo de umbrales mejor estimados (BET) fue sometido a la media geométrica del umbral

individual. La estimación umbral de olor se expresó en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  agua.<sup>111,112</sup>

### **2.2.9. Evaluación sensorial del aroma**

Se realizó el perfil de aroma de los frutos de guayaba agria fresca con la ayuda de un panel entrenado (10 panelistas). Para esta evaluación los frutos cortados en trozos grandes (20 g) se colocaron en vasos de cuello cilíndrico (7 cm x 3,5 cm) con tapa y fueron evaluados de manera orthonasal por el panel. Los descriptores utilizados se determinaron en experimentos sensoriales preliminares. Cada descriptor utilizado se definió sobre la base de que el aroma de un compuesto de referencia se disuelve en agua a una concentración de 100 veces por encima del valor umbral respectivo. Las sustancias de referencia utilizadas en los experimentos fueron butanoato de etilo (frutal),  $\delta$ -dodecalactona (dulce), (Z)-3-hexenal (verde), ácido 3-metilbutanoico (rancio-fermentado), linalol (cítrico-floral) y acetato de 3-sulfanilhexilo (azufrado). Se pidió a los panelistas evaluar las intensidades de cada descriptor en las muestras presentadas en una escala no estructurada del 0 a 3, con 0 = no detectable, 0-1 = muy débil, 1 = débil, 1-2 = débil a moderado, 2 = moderado, 2-3 = moderado a fuerte, 3 = fuerte. Estos resultados se representaron en un diagrama de araña.

Posteriormente con los datos de cuantificación, se realizaron experimentos de recombinación, en donde cantidades apropiadas (20-100  $\mu\text{L}$ ) de las disoluciones *stock* acuosas o etanólicas de los compuestos volátiles estándar se mezclaron y se llevaron a volumen hasta 1 L de agua para obtener las mismas concentraciones determinadas en los frutos de guayaba agria. La concentración final de etanol se mantuvo por debajo de 1 g/L, es decir, por debajo del umbral de olor de etanol. El perfil global de aroma de cada modelo de mezcla se determinó de la misma manera como se ha descrito anteriormente para la fruta fresca.

### 2.2.10. Análisis de volátiles enlazados glicosídicamente

Los frutos maduros (975 g) se homogenizaron con 400 mL de agua y el pH se ajustó a 7 con NaOH 5N. A continuación, se centrifugó el homogenizado a 5000 rpm durante 1 hora desechando el sedimento. El sobrenadante (300 mL) se sometió a extracción en fase sólida sobre una columna empacada con Amberlita XAD-4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. 25 x 5 cm, 1,5 mL/min), se lavó con 10 litros de agua desionizada y luego la elución de los glicósidos se realizó con un litro de metanol. El disolvente se eliminó bajo vacío a 40 °C en rotavapor, se extrajo con éter dietílico para eliminar los volátiles residuales y se liofilizó para dar 4,0 g de extracto glicosídico crudo.

Para liberar los volátiles enlazados glicosídicamente, 50 mg de glicósidos de guayaba agria se disolvieron en 3 mL de una disolución buffer de fosfato-ácido cítrico (pH 5,0, 0,1 M). Luego, 100 g de una  $\beta$ -glucosidasa disponible comercialmente (emulsina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 100 mg de fenil- $\beta$ -D-glucopiranosido como patrón interno se añadieron a la disolución mencionada anteriormente, y la mezcla se incubó durante 24 h a 37 °C. Las agliconas liberadas se extrajeron exhaustivamente con acetato de etilo, luego, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentraron con nitrógeno. Finalmente, este extracto fue sometido a análisis por CG-O y GC-EM en columnas DB-FFAP y RTX-5 en las condiciones mencionadas en el numeral 2.2.1. Se realizaron dos blancos en las mismas condiciones mencionadas anteriormente (uno sin glicósidos y el otro sin enzima).

Para evaluar el efecto del pH y la temperatura durante la liberación de los compuestos volátiles, 50 mg de glicósidos de guayaba agria se disolvieron en 3 mL de una disolución buffer de fosfato-ácido cítrico (pH 3,3, 0,1 M), se añadió como patrón interno fenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (100  $\mu$ g), y toda la mezcla se colocó en una ampolla sellada durante 2 horas a 100 °C. Los productos volátiles se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a 1 mL mediante el uso de nitrógeno, y luego se analizaron mediante CG-EM.

### 2.2.11. Análisis de volátiles enlazados a S-cisteína

Los frutos maduros liofilizados (60 g de liofilizado) se mezclaron con agua (300 mL), etanol (80 mL) y ácido fórmico (2 mL), y la mezcla se homogenizó durante 3 minutos en un procesador de alimentos hasta obtener una suspensión, la cual se centrifugó a 4000 rpm durante 45 min a 5 °C. El sobrenadante (200 mL) se concentró bajo vacío a 30 °C hasta obtener un volumen de 50 mL, y este residuo se colocó sobre 60 g de resina Dowex® 50WX8 forma hidrogenada (200-400 mesh, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) empacada en una columna de vidrio. La columna se eluyó con agua hasta neutralidad (~100 mL) y después paso a paso se eluyó con porciones de 40 mL de amoníaco acuoso en concentraciones de 0,3, 0,6, 0,9, 1,5, 2,1, y 2,8 M. Las fracciones que eluyeron desde 0,9 M hasta 2,1 M de amoníaco se reunieron<sup>107</sup> (Fracción F2), y el amoníaco se eliminó en vacío para obtener 969,7 mg de extracto.

Para liberar los tioles enlazados a S-cisteína, se preparó una disolución buffer de fosfato de potasio (100 mM, pH 8) que contenía ácido etilendiaminotetraacético (1 mM), fosfato de 5-piridoxal (0,1 mM), y L-glutationa en forma reducida (1 mM). La apotriptofanasa (de *Escherichia coli*, actividad de 75-150 unidades/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se preparó antes de su uso (1 mg en 0,5 mL de buffer). Luego, se hizo una disolución de la fracción F2 obtenida anteriormente (200 mg) en 5 mL de buffer y se añadió 0,5 mL de la disolución de enzima. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 35 °C en un vial sellado de 20 mL para microextracción en fase sólida. Se hizo la extracción del espacio de cabeza del vial durante 5 min a 35 °C con una fibra DVB/CAR/PDMS de 2 cm de longitud (70 µm de espesor, Supelco). La desorción se realizó en el inyector del cromatógrafo de gases en modo *splitless* durante 5 min a 250 °C, utilizando la columna FFAP. Después de cada inyección la fibra se limpió durante 30 min para evitar cualquier efecto residual. Los análisis se realizaron en el modo SIM siguiendo los iones en  $m/z$  55, 59, 77 y 101, correspondientes al 3-sulfanil-1-hexanol. Experimentos blanco (uno sin precursores y el otro sin enzima) se realizaron en las mismas condiciones. La detección de los tioles con influencia en el aroma fue registrada mediante GC-O y el cálculo de los correspondientes

índices de retención.

### **2.2.12. Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos en la cuantificación fueron sometidos a análisis de varianza y test de Tukey ( $p < 0.05$ ) para determinar diferencias significativas, se calcularon promedios y desviación estándar teniendo en cuenta la norma ISO 3534-1.<sup>113</sup>

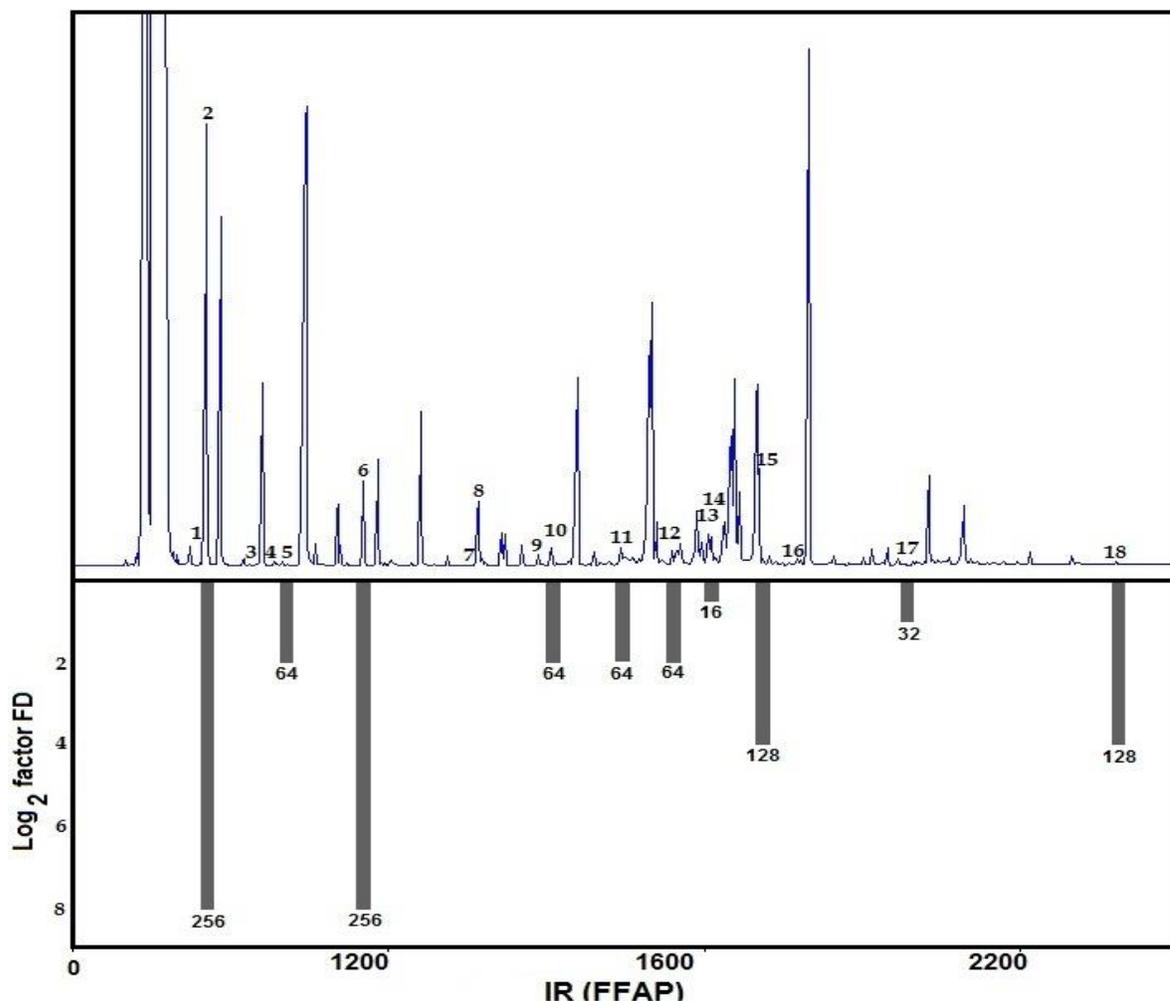
## **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos del estudio químico del aroma de los frutos de guayaba agria. Está dividido en cuatro secciones, la primera, la identificación de los compuestos volátiles activos olfativamente. La segunda sección, presenta la cuantificación de estos compuestos y los experimentos de recombinación, que validaron los resultados obtenidos. La tercera sección, corresponde al aislamiento del extracto enriquecido en tioles por medio de gel de agarosa mercurada, y en la cuarta sección, se presenta el estudio de los precursores de tipo glicosidado y cisteinilados, y los compuestos volátiles (del aroma) producidos a partir de su hidrólisis.

### **2.3.1. Identificación de los compuestos volátiles activos olfativamente**

Los parámetros de madurez para los frutos de guayaba agria utilizados en este estudio fueron: pH ( $2,67 \pm 0,06$ ), contenido de sólidos solubles ( $9,6 \pm 0,3$  °Brix) y acidez titulable expresada como porcentaje de ácido cítrico ( $2,75 \pm 0,08\%$ ). Se realizó un análisis sensorial para escoger el disolvente de extracción de los compuestos volátiles más apropiado. La evaluación del extracto obtenido con diclorometano mostró una mayor similitud del aroma con el de la fruta fresca que los obtenidos con pentano o éter etílico. Debido a la baja temperatura de extracción aplicada ( $40$  °C) y por el vacío utilizado, el método SAFE permitió obtener un extracto con características muy similares al de la fruta fresca. Con el

análisis AEDA se determinó la presencia de 18 compuestos volátiles activos olfativamente en el extracto SAFE de la fruta guayaba agria (Tabla 3, Figura 15), los cuales fueron los responsables de las notas olfativas frutal, dulce, verde, tropical, y azufrada, representativas del aroma de esta fruta.



**Figura 15.** Perfil cromatográfico correspondiente a los compuestos volátiles aislados por destilación SAFE de los frutos de guayaba agria en comparación con el AEDA. Los números de los picos corresponden a los números de compuestos de la tabla 3 en orden de elución en la columna FFAP.

Los compuestos volátiles con los valores más altos de factor de dilución FD fueron el butanoato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de 3-sulfanilhexilo y  $\delta$ -dodecalactona (Figura 15), éstos mismos compuestos fueron identificados como responsables de las

notas olfativas frutal, azufrada y dulce, respectivamente. Debido a que la técnica SAFE permite una extracción suave de los compuestos volátiles, por primera vez se detectaron algunos compuestos como constituyentes volátiles de los frutos de guayaba agria (*P. friedrichsthalianum* Nied.). Este es el caso de los compuestos azufrados: disulfuro de dimetilo, 2-metil-1,3-ditiolano, metional, acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol y bis(metiltio)metano, que son compuestos bastante lábiles y exhiben bajos valores umbrales de aroma (10-100 ppt).

**Tabla 3.** Compuestos volátiles activos olfativamente detectados en el extracto SAFE de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.). Compuestos volátiles obtenidos por la hidrólisis enzimática y ácida de precursores glicosídicos y por S-cisteína conjugados.

No. <sup>a</sup>	Compuesto <sup>b</sup>	Nota olfativa <sup>c</sup>	IK <sup>d</sup>		factor
			FFAP	RTX-5	FD <sup>e</sup>
1	2-metil-3-pentanona	Verde	1003	-	4
2	Butanoato de etilo	Frutal	1018	816	256
3	Disulfuro de dimetilo	cebolla	1091	818	4
4	(E)-2-pental	Fresa	1115	785	8
5	(Z)-3-hexenal	Verde	1124	799	64
6	Hexanoato de etilo	Frutal	1221	1005	256
7	2-metil-1,3-ditiolano	azufrado	1358	978	4
8	1-Hexanol <sup>f</sup>	Herbal, frutal	1368	850	4
9	2-etil-3(5 o 6) dimetilpirazina	Papa	1437	1033	4
10	Metional	Papa cocida	1454	926	64
11	Linalol	Floral, cítrico	1569	1130	64
12	Butanoato de linalilo	Dulce	1623	1464	64
13	Ácido 3-metilbutanoico	Rancio	1672	863	16
14	2-etil-3-etil-5-metilpirazina <sup>g</sup>	Terroso	1693	1196	8
15	Acetato de 3-sulfanilhexilo	Azufrado, sudor	1769	1255	128
16	3-sulfanil-1-hexanol <sup>h</sup>	Maracuyá	1856	1134	4
17	bis(metiltio)metano	Azufrado	2001	1396	32
18	δ-dodecalactona	Dulce	2432	1728	128

<sup>a</sup> Compuesto numerado de acuerdo al índice de retención sobre la columna FFAP

- b Compuesto identificado por comparación de sus índices de retención sobre las columnas FFAP y RTX-5, su espectro de masas y su nota olfativa, con respecto a los datos de los compuestos de referencia
- c Nota olfativa percibida en el puerto de olfacción durante el análisis CG-O
- d Índice de retención
- e Factor de dilución
- f Liberado del extracto glicosídico de la fruta por acción de la emulsina ( $\beta$ -glucosidasa)
- g Identificación tentativa basada únicamente en el índice de retención y el espectro de masas
- h Liberado de los conjugados de S-cisteína aislados de la fruta por acción de la  $\beta$ -liasa

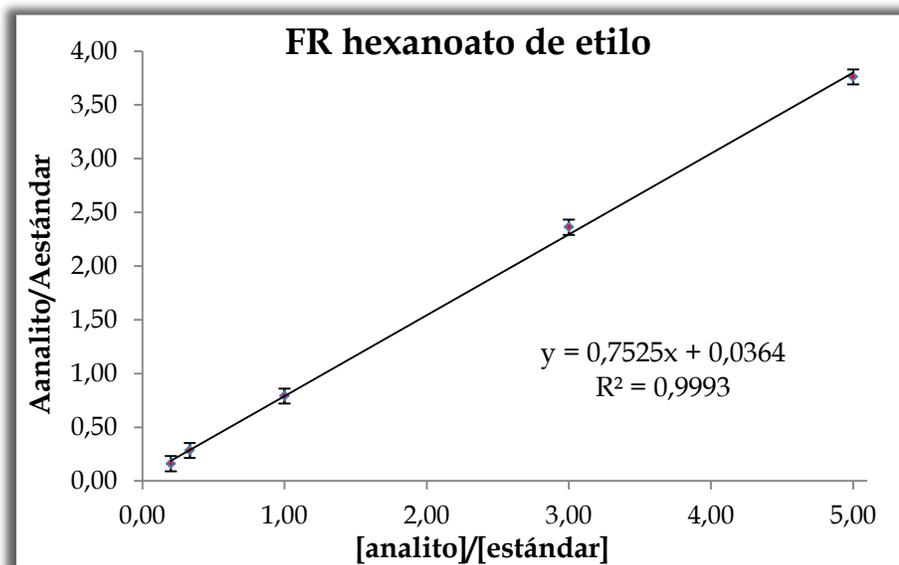
Algunos compuestos que se encuentran en los frutos de *P. friedrichsthalianum* Nied. se han reportado como compuestos volátiles activos olfativamente en otras frutas de la familia Myrtaceae; estos son: butanoato de etilo, hexanoato de etilo y linalol en *Campomanesia lineatifolia*,<sup>114</sup> hexanol, linalol y ácido 3-metilbutanoico en *Syzygium jambos*;<sup>115</sup> y butanoato de etilo, (Z)-3-hexenal, metional, linalol, acetato de 3-sulfanilhexilo y 3-sulfanil-1-hexanol en *Psidium guajava*.<sup>35</sup> Cabe señalar que *P. friedrichsthalianum* Nied. tiene los mismos compuestos de tipo azufrado que *P. guajava*, estos compuestos (metional, acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol) son responsables de la nota azufrada o nota tropical, descrita por los europeos. Estos ejemplos sugieren que las rutas metabólicas de  $\beta$ -oxidación/síntesis de *novο* de ácidos grasos de cadena lineal (producción de butanoato de etilo y hexanoato de etilo), la degradación oxidativa del ácido linoléico vía 13-lipoxigenasa (producción de hexanol y (Z)-3-hexenal) y la ruta metabólica de biosíntesis de terpenoides (producción de linalol), se encuentran altamente activadas para contribuir al *flavour* de frutos de la familia Myrtaceae.

### 2.3.2. Cuantificación de los compuestos volátiles activos olfativamente y experimentos de recombinación de aroma

Para los ensayos de cuantificación se seleccionó como estándar interno el cinamato de etilo, compuesto que no se encuentra dentro de la composición del aroma de la fruta y cuyo índice de retención no coincide con los compuestos cuantificados. Con el fin de controlar la liberación del (Z)-3-hexenal y la sobreexpresión de la nota verde, mencionada por Steinhaus *et al* en 2009 en la extracción del aroma de la guayaba (*Psidium guajava* L.),<sup>36</sup>

se realizó la extracción de los compuestos volátiles con trozos grandes de la fruta. Se cuantificaron aquellos compuestos que exhibieron un FD superior a 16, ya que en este rango de dilución se presume que se encuentran los compuestos que contribuyen principalmente al aroma de un alimento.<sup>10</sup> En el perfil cromatográfico del extracto SAFE (Figura 15) se observó que las zonas olfativas correspondientes a los compuestos metional, acetato de 3-sulfanilhexilo, bis(metiltio)metano y  $\delta$ -dodecalactona exhibían una fuerte percepción olfativa, pero no aparecía señal cuantificable.

Para la cuantificación, se determinaron los factores de respuesta para cada analito con respecto al estándar interno (cinamato de etilo), mediante la relación de las áreas en función la relación de la concentración del analito y el estándar interno. En la Figura 16, se expone como ejemplo la curva obtenida para la determinación del factor de respuesta del hexanoato de etilo y en la tabla 4 se presentan los valores inversos de los factores de respuesta determinados para cada uno de los compuestos respecto al estándar interno, con el coeficiente de correlación obtenido en cada curva.



**Figura 16.** Determinación del factor de respuesta (FR) del hexanoato de etilo. [analito]=concentración del analito (hexanoato de etilo); [estándar]=concentración del estándar interno (cinamato de etilo);  $A_{\text{analito}}$ = área del analito;  $A_{\text{estándar}}$ = área del estándar interno.

Otro ítem relevante en la cuantificación de los compuestos activos olfativamente, es el umbral de olor, que es particular para cada compuesto y a la matriz en que se encuentra. La relación entre el valor de la concentración y el umbral de olor se conoce como OAV y permite establecer si esta concentración supera la cantidad mínima necesaria para ser detectado por el olfato y por ende establecer su aporte real al aroma global de la fruta. Los valores de umbral de olor se tomaron de la literatura en su mayoría de Leffingwell & Associates (1991),<sup>116</sup> y en el caso del acetato de 3-sulfanilhexilo el valor fue tomado de Steinhaus *et al* (2009).<sup>36</sup> Para el butanoato de linalilo no se encontró ningún valor reportado en la literatura por tal razón se realizó su determinación para poder realizar el recombinado de aroma. El valor determinado en este trabajo mediante el método (3AFC) 3-alternativas de elección forzada (ASTM E679),<sup>110</sup> fue de 3,62 µg/kg agua y se reporta por primera vez, acá en este trabajo (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados de la cuantificación de los compuestos volátiles activos olfativamente aislados a partir de los frutos de guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.).

Compuesto <sup>a</sup>	factor FD <sup>b</sup>	1/FR <sup>c</sup>	Coefficiente de correlación (r <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	Conc ± SD (%CV) (µg/kg fruta fresca) <sup>e</sup>	Umbral de olor (µg/kg agua) <sup>f</sup>	OAV <sup>g</sup>
Butanoato de etilo	256	1,85	0,982	21414±212 (0,99)	1 [116]	21414
(Z)-3-hexenal	64	15,63	0,976	283 ±12 (4,33)	0,25 [116]	1132
Hexanoato de etilo	256	1,32	0,999	7574±138 (4,33)	1 [116]	7574
Metional	64	-	-	-	0,2 [116]	-
Linalol	64	1,06	0,998	433±14 (3,19)	6 [116]	72
Butanoato de linalilo	64	1,05	0,999	1236±22 (1,78)	3,62	341
Ácido 3-metilbutanoico	16	4,27	0,997	7781±254 (3,26)	120 [116]	65
Acetato de 3-sulfanilhexilo	128	-	-	-	0,029 [36]	-
bis(metil)metano	32	-	-	-	-	-
δ-dodecalactona	128	-	-	-	1000 [116]	-

a Compuestos volátiles activos olfativamente con FD>16

b Factor de dilución

c Inverso del factor de respuesta

d Coeficiente de correlación de la recta de calibración para la determinación del FR

e Concentración determinada por el método de estándar interno

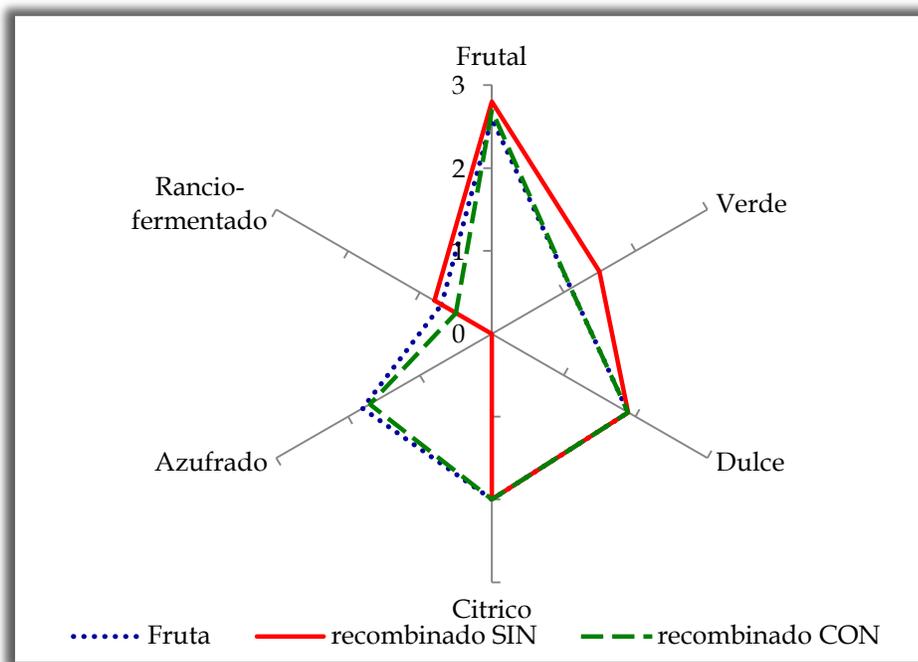
f Umbral de olor reportado para los compuestos

g OAV

---

- no determinado

Teniendo en cuenta que tanto los compuestos azufrados como la  $\delta$ -dodecalactona no presentaron señal cromatográfica medible, estos compuestos no se pudieron cuantificar y por ende no se pudieron incluir en el recombinedo de aroma (Recombinedo SIN, Figura 17). Por tal motivo cuando se hizo la evaluación sensorial con el panel, los panelistas describieron el aroma como poco parecido a la fruta, sintético, con notas verdes y dulces sobreexpresadas, lo cual es evidente en el diagrama de araña (Figura 17). Teniendo en cuenta estas apreciaciones, se decidió adicionar los compuestos azufrados y la  $\delta$ -dodecalactona, al recombinedo ya que exhibieron factores de dilución apreciables (metional FD:64, acetato de 3-sulfanilhexilo FD:128, bis(metiltio)metano FD:32,  $\delta$ -dodecalactona FD:128). La cantidad añadida se calculó con base en el valor umbral de olor de cada compuesto. Cuando este recombinedo (recombinedo CON, Figura 17) se presentó ante el panel, el resultado fue que el aroma percibido era fresco, natural y con el cuerpo o aroma característico de la fruta, la sensación de un aroma sintético desapareció y se describió el aroma como el de una fruta tropical. En el diagrama de araña, se evidenció un cambio notorio en las componentes de las notas azufradas y verdes, con respecto al primer recombinedo, y una mayor similitud con el perfil determinado para la fruta fresca. Con este experimento se comprobó la importancia de los compuestos azufrados en el aroma de los frutos de *P. friedrichsthalianum* Nied., y se dedujo que son compuestos impacto de su aroma

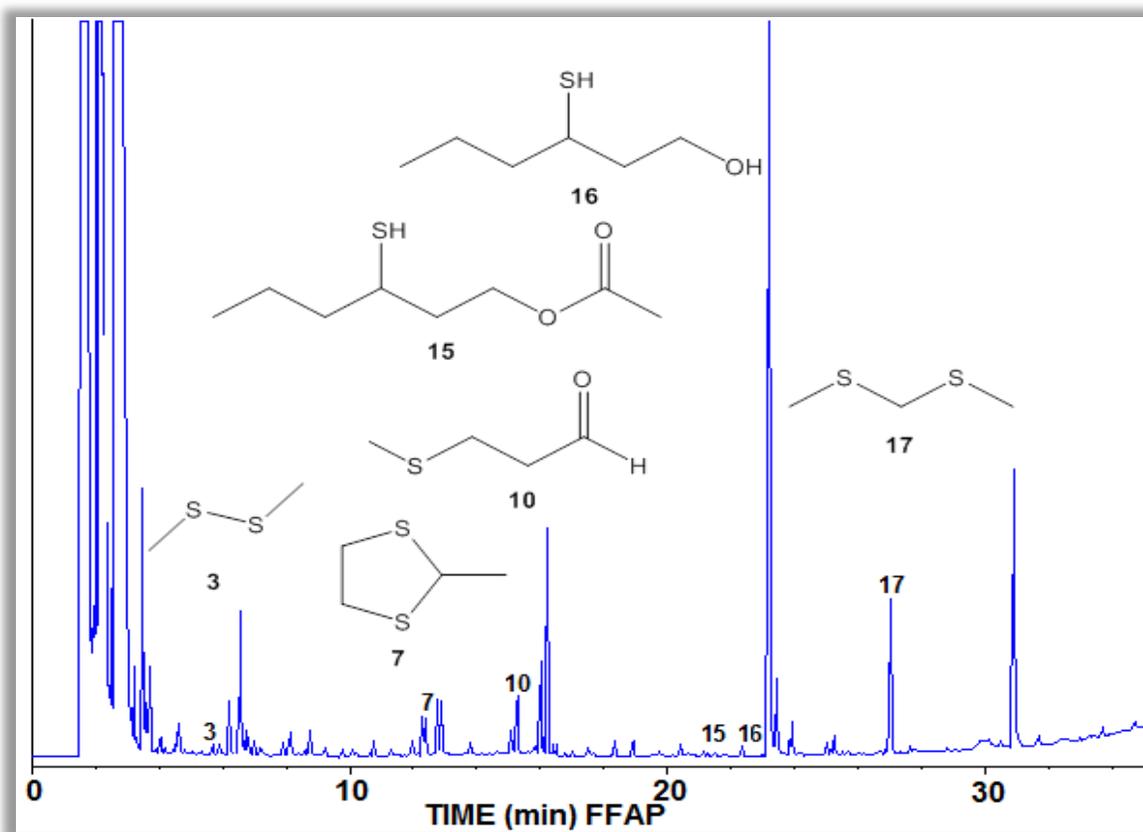


**Figura 17.** Perfil sensorial de aroma de los frutos de guayaba agria, y los recombinados con y sin los compuestos no cuantificables.

### 2.3.3. Aislamiento de compuestos azufrados por medio de gel de agarosa mercurada

Los compuestos azufrados son compuestos de alto impacto en el *flavour*, ya que se unen fuertemente a los receptores olfativos. Los tioles tienen umbrales de olor considerablemente más bajos que sus alcoholes análogos, y con base en los resultados del análisis sensorial presentado en el numeral 2.3.2. se encontró que son compuestos importantes para caracterizar como una parte esencial del aroma de los frutos de *P. friedrichsthalianum* Nied. La extracción selectiva de compuestos azufrados permitió comprobar la presencia de los compuestos detectados por olfatometría, de los cuales no había una señal cromatográfica medible, y así mismo permitió corroborar su identidad. Los compuestos disulfuro de dimetilo, 2-metil-1,3-ditiolano, metional, acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol y bis(metil)metano se encontraron dentro del extracto enriquecido de tioles (Figura 18). Estos compuestos han sido reportados como

relevantes en el aroma de frutas como la guayaba (*Psidium guajava*), el maracuyá (*Passiflora edulis*), la uva (*Vitis vinifera*), y alimentos procesados como el vino en el que han sido ampliamente estudiados.<sup>42</sup>



**Figura 18.** Análisis por CG en columna FFAP de la fracción enriquecida en compuestos azufrados aislados de los frutos de guayaba agria obtenidos por aislamiento por cromatografía de afinidad sobre gel de agarosa mercurada. Los números corresponden con los usados en la Tabla 3

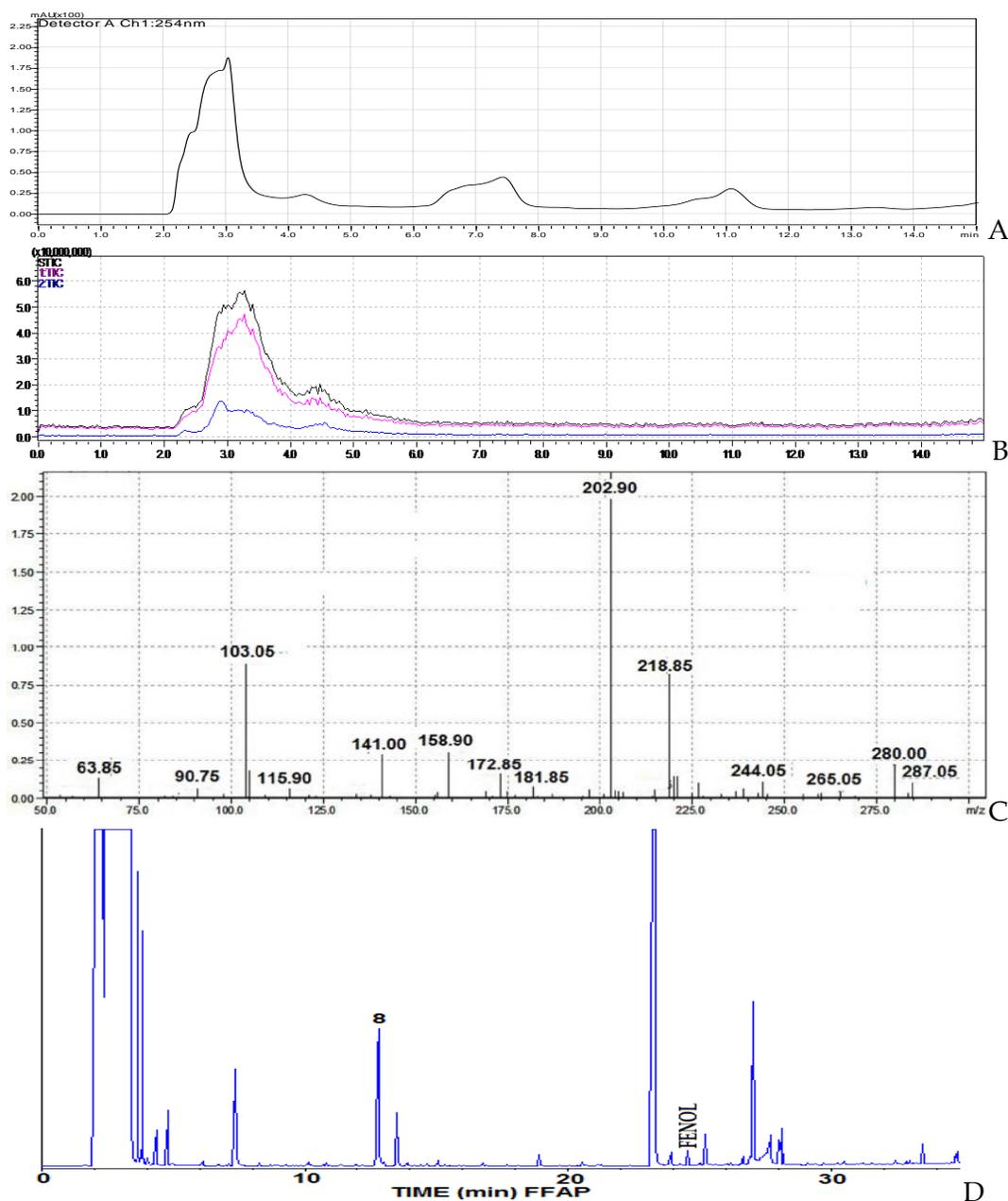
#### 2.3.4. Precursores de aroma no volátiles

Muchos compuestos de aroma, especialmente en frutas y verduras, son los productos secundarios de diferentes vías metabólicas. Todas las frutas comparten una proporción muy alta de los mismos compuestos volátiles. La mayoría de los componentes volátiles en las frutas contienen cadenas de hidrocarburos alifáticos, o sus derivados (ésteres,

alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas, lactonas). Estos constituyentes pueden generarse durante el proceso de la maduración, a partir de dos rutas metabólicas diferentes: ácidos grasos (descrito en el metabolismo de  $\beta$ -oxidación de los lípidos) y aminoácidos (descrito en el metabolismo de los aminoácidos). Después de generados, algunos de ellos pueden enlazarse como glicósidos, con el fin de almacenarse o transportarse a otros órganos de la planta.

#### **2.3.4.1. Precursores de tipo glicosídico**

El extracto de precursores glicosídicos se analizó por HPLC-MS en modo positivo, con el fin de confirmar la identidad de los glicósidos, en éste análisis se encontró un compuesto con tiempo de retención 2,7 minutos, el cual exhibió iones en  $m/z$  265  $[M+H]^+$ , 287  $[M+Na]^+$ , y el 103  $[aglicona+H]^+$  correspondiente al ion fragmento de la aglicona protonada, estos iones corresponden al hexil- $\beta$ -D-glucopiranosido. Cuando se realizó la hidrólisis enzimática del extracto de precursores glicosídicos, se analizó el hidrolizado por CG-EM obteniendo un pico que coincidió por índice de retención (1368 en FFAP) y el espectro de masas con el del estándar correspondiente al 1-hexanol (Figura 19).

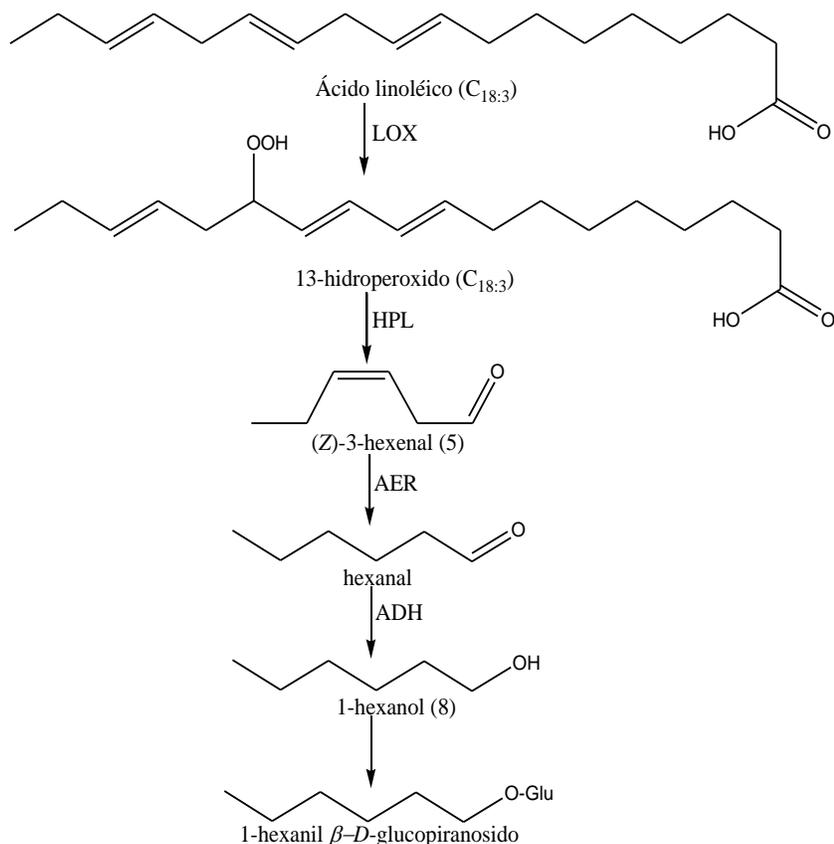


**Figura 19.** A. Perfil HPLC sobre columna KINETEX  $C_{18}$  usando detector UV a  $\lambda$  254 nm. B. TIC. C. Espectro de masas obtenido por HPLC-MS ESI en modo positivo para el pico a 2,7 minutos. D. Análisis por CG sobre columna FFAP de los compuestos volátiles liberados tras la hidrólisis enzimática del extracto glicosídico de los frutos de guayaba agria. Fenol es el estándar interno para control de la hidrólisis.

Así, en éste estudio se evidenció la presencia de compuestos volátiles tipo alifático  $C_6$  como compuestos activos olfativamente de los frutos de la guayaba agria (*P. friedrichsthalianum* Nied.). Se ha reportado que este tipo de compuestos se producen a

partir de la degradación oxidativa enzimática del ácido linoleico por la ruta metabólica 13-lipoxigenasa (LOXs),<sup>117</sup> la cual ocurre naturalmente en el proceso de maduración de las frutas. La lipoxigenasa existe en múltiples formas y convierte el ácido linoleico en los hidroperóxidos, estos se descomponen para dar aldehídos, alcoholes y ésteres (por lo general con la ayuda de otras enzimas liasas-hidroperóxido, alcohol deshidrogenasas, isomerasas y esterasas).<sup>20</sup>

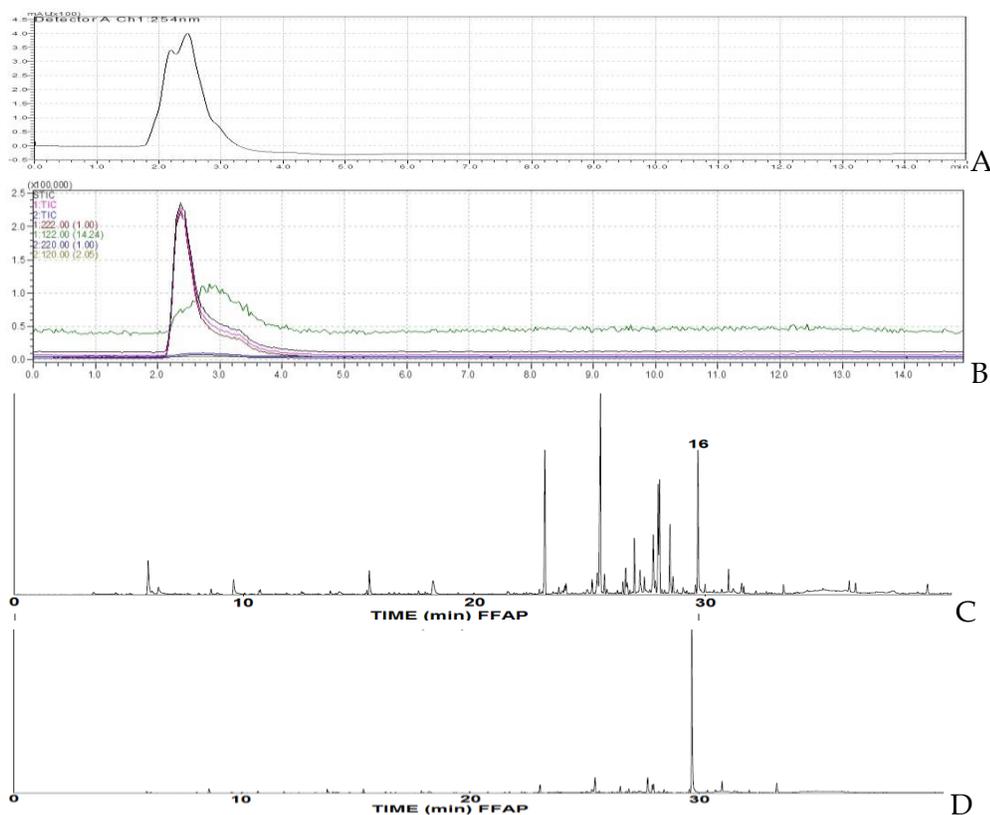
La vía de la hidroperóxido liasa (HPL) de la ruta 13-LOX dirige la formación de C<sub>12</sub> ω-ceto-ácidos grasos y aldehídos C<sub>6</sub>, tales como (*Z*)-3-hexenal y hexanal, y sus respectivos derivados uno de ellos el hexanol, responsable de la nota olfativa verde.<sup>118</sup> Teniendo en cuenta estos aspectos se propone en la Figura 20, la correlación biogénica de algunos compuestos volátiles activos olfativamente en la fruta guayaba agria. Los otros picos que aparecen en la Figura 19D corresponden con compuestos de tipo terpenol o ácidos (entre ellos, el ácido butanoico y el ácido hexanoico), los cuales no se mencionan ya que no hacen parte de los compuestos volátiles activos olfativamente, en los cuales se enfocó este estudio. Por otro lado, se observó que en la hidrólisis ácida no se liberó el 1-hexanol, ni ningún otro compuesto activo olfativamente (en general solo se observan compuestos de tipo ácido), tal como ocurrió a partir de la hidrólisis de tipo enzimática.



**Figura 20.** Propuesta de correlación biogénica de algunos compuestos volátiles activos olfativamente en la fruta g. agria (LOX: lipoxigenasa, HPL: hidropéroxido liasa, AER: alquenalexidorreductasa, ADH: alcohol deshidrogenasa (Tomado de Osorio *et al*, 2010).<sup>118</sup> Los números corresponden a los usados en la Tabla 3

#### 2.3.4.2. Precursores conjugados a S-cisteína

Los precursores de volátiles enlazados a S-cisteína se analizaron por HPLC-MS. Se observó un pico cromatográfico a una longitud de onda de  $\lambda$  254 nm en un tiempo de retención de 2,4 minutos, que corresponde también con el TIC en modo SIM siguiendo los iones en  $m/z$   $[M+1]^+=222$ ,  $[M-1]^-=220$  correspondientes al 3-(1-hexanol)-L-cisteína y  $[M+1]^+=122$ ,  $[M-1]^-=120$  para seguir el fragmento de la cisteína. Cuando se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de los precursores cisteinilados y se realizó el seguimiento por CG-EM se obtuvo un pico que correspondió con el índice de retención y el espectro de masas con el 3-sulfanil-1-hexanol (Figura 21).



**Figura 21.** A) Análisis por HPLC-MS usando columna KINETEX C<sub>18</sub> y detector UV a  $\lambda$  254 nm de precursores cisteinilados de guayaba agria. B) TIC en modo de detección SIM siguiendo los iones  $m/z$  222, 220, 122 y 120. C) Análisis por CG sobre columna FFAP de los compuestos volátiles liberados tras la hidrólisis enzimática del extracto de precursores cisteinilados de los frutos de guayaba agria. D) Detección en modo SIM siguiendo los iones  $m/z$  55, 59, 77 y 101.

En la figura 21C se observó que los otros picos que aparecen corresponden a compuestos de tipo terpeno ( $\alpha$ -copaeno, cariofileno,  $\alpha$ -selineno, entre otros), los cuales no son relevantes en éste estudio, ya que no fueron activos olfativamente.

Los conjugados a S-cisteína son una fuente importante de compuestos azufrados volátiles, y hasta el momento se han estudiado como precursores en algunas plantas, como por ejemplo, el maracuyá, ají, cebolla y en vinos.<sup>52</sup> Si bien es cierto no solo se encuentran en los alimentos anteriormente enunciados, los  $\gamma$ -glutamyl-S-conjugados se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, particularmente en las familias

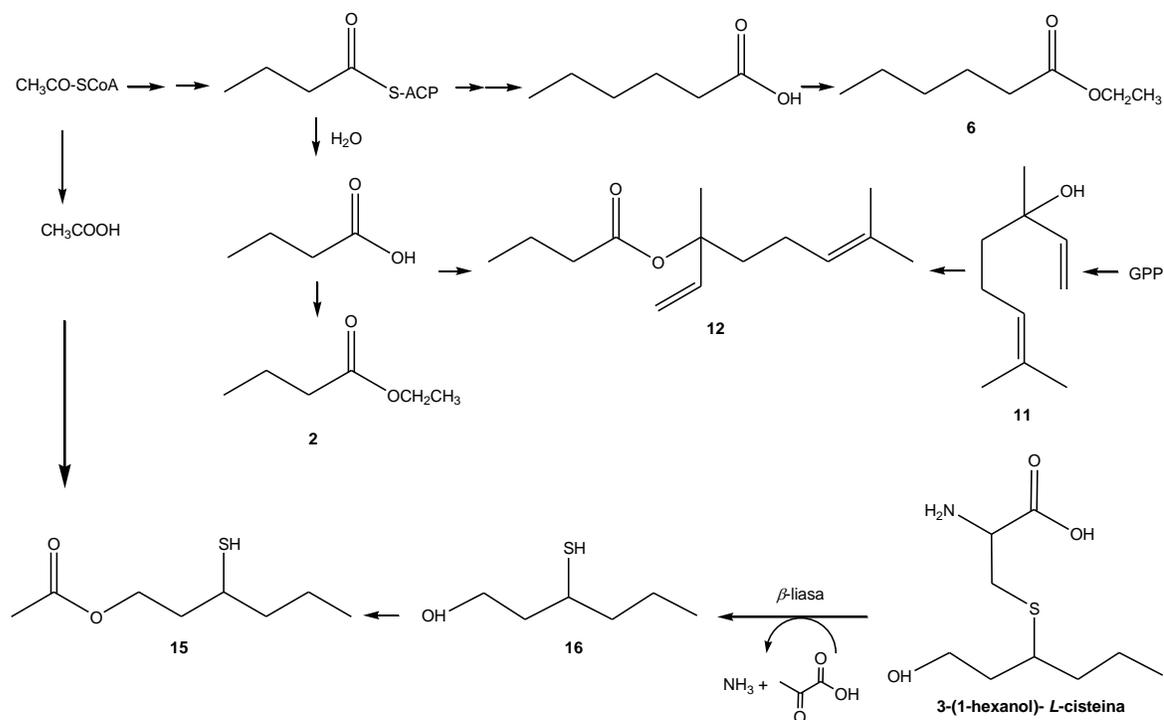
Leguminaceae y Alliaceae.<sup>119</sup> La ruta metabólica que siguen dichos precursores es la ruta de la glutatona, que además de tener un papel central en la catálisis de reacciones de metabolismo de los aminoácidos y la producción de H<sub>2</sub>S, contribuyen a la formación de volátiles azufrados a partir de precursores conjugados a S-cisteína. Las enzimas vinculadas a estos procesos son: las C-S liasas, tales como allinasa, cistationina  $\beta$ -liasa, alilcisteína  $\beta$ -liasa y la cisteína conjugada a  $\beta$ -liasa. Generalmente, los conjugados a cisteína de compuestos aromáticos sirven como sustratos para estas enzimas, mientras que las enzimas extraídas a partir de bacterias utilizan un amplio rango de sustratos. Ellas pueden catalizar la reacción de  $\alpha,\beta$ -eliminación de varios derivados de cisteína, tales como S-alquilo, S-arilo y otros.<sup>55</sup>

La glutatona es un tripéptido endógeno, que desempeña un papel clave en la protección de las células a través de dos mecanismos enzimáticos; la glutatona peroxidasa que elimina hidroperóxido por reducción con la forma reducida de la glutatona, y la glutatona S-transferasa que elimina xenobióticos o compuestos potencialmente tóxicos de la célula por conjugación. Las glutatonas S-transferasas están presentes en los tejidos animales, donde catalizan el ataque nucleofílico de la glutatona tiolato, con un centro electrofílico generalmente sobre una sustancia xenobiótica hidrofóbica (o endógena). El tioéter resultante (S-3-(1-hexanol)-L-glutatona) es el sustrato para las  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasas, que eliminan el residuo glutamato para dar (S-3-(1-hexanol)-L-cisteinilglicina). A continuación varias enzimas, incluyendo aminopeptidasas, peptidasas o carboxipeptidasas, pueden romper el enlace peptídico del conjugado Cis-Gli-S para liberar glicina. Por último, el conjugado *cis*-S (S-3-(1-hexanol)-L-cisteína) puede romperse por acción de las  $\beta$ -liasas o se excreta bajo su forma mercapturato.<sup>55</sup>

Con los resultados obtenidos en este estudio, se puede pensar que la biosíntesis de los compuestos responsables del aroma en los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied., se encuentra relacionada básicamente con la activación de tres rutas metabólicas: La ruta metabólica de los ácidos grasos de cadena lineal ( $\beta$ -oxidación), a partir del cual se producen ácidos grasos de cadena par (acético, butanoico, hexanoico, etc), los cuales pueden condensar y formar

su generación a partir de precursores

ésteres (butanoato de etilo y hexanoato de etilo); la ruta de los terpenos en la cual a partir del geranyl pirofosfato, se puede obtener linalol y butanoato de linalilo; y la ruta metabólica de la glutatona de donde se obtienen el 3-sulfanil-1-hexanol y el acetato de 3-sulfanilhexilo, al combinarse con la ruta de  $\beta$ -oxidación (Figura 22).



**Figura 22.** Propuesta de correlación biogénica de algunos de los compuestos activos olfativamente encontrados en los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. Los números corresponden a los asignados en la Tabla 3

En conclusión, por medio de la aproximación sensórica, la técnica de AEDA permitió definir que los compuestos butanoato de etilo y hexanoato de etilo tienen el mayor valor de FD. Todos los compuestos cuantificados reportaron OAV superiores a la unidad, indicando que son compuestos de alto impacto en el aroma de la guayaba agria. También, se demostró la relevancia en el aroma los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied., de los ésteres alifáticos, compuestos  $\text{C}_6$  y compuestos de tipo azufrado. Los compuestos azufrados, disulfuro de dimetilo, 2-metilditilano, metional, acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol y bis(metiltio)metano, se reportan por primera vez como compuestos activos olfativamente y como constituyentes de los frutos de *Psidium friedrichsthalianum*

Nied. También se reporta por primera vez el rol de los glicósidos y conjugados de S-cisteína, como precursores del 1-hexanol y 3-sulfanil-1-hexanol (Compuestos con actividad olfativa).

### **3. IMPACTO DE LA MICROBIOTA ORAL HUMANA SOBRE EXTRACTOS DE PRECURSORES DE AROMA (GLICOSIDADOS Y CISTEINILADOS) AISLADOS A PARTIR DE *Psidium friedrichsthalianum* Nied. EMPLEANDO CONDICIONES *IN VITRO***

#### **3.1. GENERALIDADES**

Como se mencionó en el capítulo anterior, los precursores de aroma tanto glicosidados como cisteinilados, son compuestos importantes en el *flavour* de los alimentos, ya que permiten una liberación controlada de compuestos volátiles por acción enzimática y/o del pH, potenciando así algunas notas olfativas que se van a percibir de manera retronasal y/o ortonasal.<sup>55</sup> Si bien, la hidrólisis ácida o enzimática son procedimientos conocidos para liberar las moléculas odorantes contenidas en los precursores aromáticos, la posible liberación de estas moléculas durante la ingestión de los alimentos y propiciada por las enzimas de la saliva o de la microbiota oral son mucho menos conocidos. De hecho, todos los alimentos, líquidos o sólidos experimentan un pasaje y un procesamiento en la cavidad oral, más o menos intenso, dependiendo de la estructura y composición del alimento, en el que el aroma original inicialmente presente en el alimento se puede modificar.

Durante el procesamiento oral de los alimentos, se dan fenómenos mecánicos que producen la desestructuración del alimento (como la masticación), fenómenos químicos como la dilución de aroma debido a la fase acuosa de la saliva, cambios en el pH de los alimentos, hidratación, interacción con las sales, proteínas y enzimas presentes en el alimento, o adsorción de aromas a la mucosa oral entre otros.<sup>120</sup> Todos estos procesos, pueden producir cambios en la composición volátil del alimento, que pueden implicar, la

reducción en la liberación de algunos compuestos, la degradación de otros, o incluso pueden implicar la hidrólisis de precursores aromáticos presentes en el alimento. Relacionado con este último proceso, se ha comprobado que la compleja microbiota de la cavidad oral podría ser capaz de hidrolizar y liberar compuestos odorantes a partir de precursores glicosídicos presentes en la uva. El impacto de la saliva en la composición aromática del vino, ha sido evaluada por Muñoz-González *et al* en 2014.<sup>90</sup> En este trabajo, los autores emplearon condiciones de espacio de cabeza estático y dinámico. Ambas metodologías se aplicaron a vinos blancos, tintos y sintéticos de distinta composición no volátiles, desaromatizados y posteriormente reconstituidos a la misma concentración de etanol. Los vinos se aromatizaron posteriormente con una mezcla de 45 compuestos de aroma (ésteres, terpenos, alcoholes, ácidos grasos, entre otros). A todos los vinos, se añadieron dos tipos de saliva (humana y artificial) y agua en las muestras control. Los resultados mostraron un efecto significativo de la saliva sobre la liberación del aroma, la cual depende del tipo de saliva (diferencias entre humana y artificial) y la matriz del vino usando condiciones de espacio de cabeza estático. Los vinos tintos se vieron más afectados por la adición de saliva humana que los vinos blancos y sintéticos, lo que provocó una reducción en la liberación de aroma para la mayoría de los compuestos del aroma ensayados, independientemente de su estructura química. Este fenómeno se pudo deber a la interacción con proteínas de la saliva humana del tipo PRP (proteínas ricas en prolina), y a la formación de complejos del tipo glicoproteínas - polifenoles - polisacáridos presentes en el vino.

Por otro lado, el efecto de las bacterias propias de la cavidad oral en la hidrólisis de precursores de aroma tanto glicosidados como cisteinilados ha sido poco estudiado. El estudio realizado por Muñoz-González<sup>95</sup> *et al* en 2015 demostró la capacidad de la microbiota oral humana para producir agliconas activas olfativamente (terpenos, derivados bencénicos y compuestos C<sub>6</sub>) del vino a partir de los precursores glicosídicos de la uva, cuya actividad hidrolítica parece ser dependiente de las bacterias presentes en la saliva, ya que no se produce cuando la saliva está libre de microorganismos (saliva esterilizada). En el estudio realizado por Starkenmann *et al* en 2008<sup>52</sup> se demostró también

que la *S*-(*R/S*)-3-(1-hexanol)-*L*-cisteína se transforma en el tiol libre ((*R/S*)-3-sulfanil-1-hexanol) por la acción de bacterias anaerobias presentes en la saliva cruda. Toda esta información subraya la importancia de considerar a la microbiota oral, como un importante factor fisiológico que puede estar implicado en la transformación de la composición aromática de los alimentos, y por tanto modificar la percepción sensorial del aroma. Teniendo en cuenta que en los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. se identificaron tanto precursores glicosidados como cisteinilados, resulta de especial interés determinar el papel de la microbiota oral, en la generación de las moléculas odorantes asociadas. Por tanto en este estudio se emplearon condiciones *in vitro*, para evaluar tanto la acción hidrolítica de la microbiota oral sobre este tipo de precursores de la guayaba agria, así como el impacto que estos compuestos tienen en el crecimiento de los microorganismos, que puede expandir la aplicación de estos extractos más allá de sus propiedades odorantes, para el control del crecimiento de microorganismos indeseables de la cavidad oral.

### 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se describe a continuación fue utilizada en el estudio de la capacidad hidrolítica de la microbiota propia de la cavidad oral humana sobre precursores del aroma (glicosídicos y cisteinilados) aislados a partir de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) empleando condiciones *in vitro*. Para ello, se seleccionaron tres individuos donantes de saliva, que se procesó para su empleo en los experimentos *in vitro*, los cuales se realizaron en tubos falcon, con medio de cultivo SHI selectivo para la microbiota oral humana, y empleando condiciones que asemejaban el medio ambiente de la cavidad oral. Las incubaciones se realizaron en condiciones aerobias, y anaerobias con el fin de comparar qué tipo de microbiota es la que produce la mayor hidrólisis de los precursores. Posteriormente, se tomaron muestras de los ensayos a distintos tiempos, para evaluar los productos de degradación metabólica microbiana por medio de CG-EM.

Por último, se realizaron los recuentos de microorganismos para conocer el efecto de los precursores sobre la microbiota oral. Los resultados se sometieron a distintos tratamientos estadísticos.

### 3.2.1. Generalidades

Los disolventes y reactivos: diclorometano, pentano, metanol, fosfato de sodio, cloruro de sodio, disolución de amoníaco (25% p/p), e hidróxido de sodio fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Peptona proteasa, urea, mucina (Tipo III), NAM (ácido *N*-acetilmurámico) fueron comprados a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). La sangre de cordero desfibrilada fue suministrada por a Dismolab (Madrid, España). El agua pura fue obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bdford, MA, USA). Todos los disolventes fueron destilados previamente a su uso. Los siguientes compuestos se adquirieron comercialmente y se utilizaron como referencia: Octil  $\beta$ -*D*-glucopiranosido, *S*-carboximetil-*L*-cisteína, y 3-octanol provenientes de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania); 3-sulfanil-1-hexanol Alfa Aesar (Heysham, UK). Los medios de crecimiento bacteriológicos fueron adquiridos a Oxoid Ltda. (Basingstoke, Hants, UK). La esterilización de los medios de cultivo y de los materiales e instrumentos para microbiología se llevó a cabo en un autoclave (marca: BMT, modelo: Sterivap hp il, Brno-República Checa) a 121 °C por 15 minutos.

### 3.2.2. Preparación de las muestras de saliva

Las muestras de saliva estimulada se recolectaron de tres individuos diferentes (mujeres) de 27, 32 y 42 años. Todos los voluntarios se encontraban en buen estado de salud, eran no fumadores y no habían consumido antibióticos en los últimos 6 meses previos al estudio. Las muestras se recolectaron en el sitio, el día del experimento y se usaron inmediatamente. Previo a la recolección de las muestras los individuos se sometieron a limpieza oral y no comieron, ni bebieron nada 1 hora antes de la toma de la saliva.

*Para los experimentos in vitro con los precursores glicosídicos:* Se recolectaron 15 mL de saliva por cada individuo, se homogenizaron y se mezclaron, luego se centrifugaron a 4500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Luego, el sobrenadante se diluyó 1:5 (v/v) con medio SHI, se homogenizó y el homogenizado se dividió en dos partes, una de ellas, se incubó a 37 °C toda la noche en condiciones aerobias y la otra parte se incubó toda la noche a 37 °C en condiciones anaerobias.<sup>95</sup>

*Para los experimentos in vitro con los precursores cisteinilados:* Se siguió un procedimiento similar al anterior recalculando las cantidades y empleando aquellas en las que se observó mayor hidrólisis. Se recolectaron 6 mL de saliva por cada individuo, se homogenizaron y se mezclaron, luego se centrifugaron a 4500 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se diluyó 1:5 (v/v) con medio SHI, se homogenizó y se incubó toda la noche a 37 °C en condiciones anaerobias, que son las condiciones en las que se comprobó que se producía mayor cantidad de compuestos volátiles.

### **3.2.3. Experimentos *in vitro* con los precursores de aroma**

Se utilizaron los extractos de precursores glicosídicos y de precursores cisteinilados descritos en los numerales 2.2.10 y 2.2.11, respectivamente.

*Para los experimentos con precursores glicosídicos:* En tubos falcon estériles (50 mL) se colocaron 12 mL de saliva (anaerobia ó aerobia) con medio SHI estéril (peptona proteosa (10g/L) (Difco), peptona tripticasa (5g/L) (Difco), extracto de levadura (5g/L) (Difco), KCl (2,5g/L), sacarosa (5g/L), hemina (5mg/L), vitamina K (1mg/1µL), urea (60mg/L), arginina (0,174g/L), mucina (tipo III) (2,5g/L), sangre de cordero desfibrilada al 5% (50mL/L), NAM (ácido *N*-acetilmurámico) (10mg/L) y agua destilada)<sup>96</sup>. El extracto de precursores glicosídicos se adicionó para alcanzar una concentración final de 2000 mg/L.

---

Se realizaron dos experimentos de control diferentes: (A) incubaciones de la microbiota oral en el medio, pero sin los precursores glicosídicos, para controlar los compuestos derivados de metabolismo basal; (B) incubaciones de los extractos glicosídicos en el medio pero sin microbiota oral, para monitorear los cambios debidos a la transformación química no microbiana de los compuestos precursores y/o del medio empleado. Así mismo se hizo un control positivo de hidrólisis (medio + bacterias orales + octil- $\beta$ -D-glucopiranosido (20 mg/L)), empleando un glucósido comercial cuya hidrólisis libera el compuesto 1-octanol.<sup>95</sup>

Todos los cultivos se llevaron a cabo en condiciones anaerobias a 32 °C durante un período de 72 h, con agitación constante a 140 rpm. Los ensayos se realizaron por duplicado. Para la saliva activada a condiciones aerobias, se realizó el mismo procedimiento (realizando la incubación de manera aerobia), también por duplicado. Durante el tiempo mencionado, se recogieron muestras en cuatro tiempos diferentes (0, 2, 24 y 72 h, representativos del crecimiento bacteriano en sus diferentes fases de crecimiento) en frascos de vidrio usados para HS-MEFS, de 20 mL de volumen. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que se utilizaron para el análisis de compuestos volátiles por CG-EM. Así mismo, se tomaron muestras en tubos eppendorf estériles (1,5 mL) en los tiempos señalados y se almacenaron con glicerol al 40% (1:1) a -70 °C hasta que se utilizaron para realizar los recuentos de microorganismos sobre placas de medios generales y selectivos.

*Para los experimentos con precursores cisteinilados:* Se siguió el mismo protocolo diseñado para los experimentos con precursores glicosídicos, con algunas modificaciones. El experimento sólo se realizó en condiciones anaerobias, el estándar utilizado como control de la hidrólisis fue S-carboximetil-L-cisteina (20 mg/L), y solamente se tomaron muestras en dos puntos a lo largo del tiempo (0 y 24 horas) (sin hidrolizar e hidrolizado), tanto en las muestras como en los controles. El periodo de incubación fue de 24 horas, ya que previamente se comprobó que ya se había producido la hidrólisis.

#### **3.2.4. Extracción de compuestos volátiles después de la incubación de los precursores con la microbiota oral por HS-MEFS**

*Para los experimentos in vitro con precursores glicosídicos:* El procedimiento se adaptó del descrito por Muñoz-González *et al.*<sup>95</sup> Al momento de realizar el procedimiento, los viales almacenados a -20 °C se descongelaron, y a los 2 mL de muestra se les adicionaron 40 µL de una disolución de estándar interno (3-octanol 10 mg/L) y 0,5 g de NaCl, en los respectivos viales. La extracción se realizó automáticamente en el puerto MPS agitador-incubador a 35 °C, provisto con una fibra DVB/CAR/PDMS de 2 cm de longitud (Supelco, Bellefonte, PA). Las muestras se incubaron previamente durante 10 minutos a 35 °C y la extracción se realizó en el *headspace* del vial por 5 minutos a 35 °C. La desorción se realizó en el inyector del cromatografo de gases (Agilent 6890N, Agilent Palo Alto, CA) en modo *splitless* por 90 segundos a 270 °C. Después de cada inyección la fibra se limpió durante 10 minutos para eliminar cualquier volátil residual. Para cuantificar los compuestos se utilizó el método de estándar interno.

*Para los experimentos in vitro con precursores cisteinilados:* Se realizó el mismo procedimiento anterior, sin la adición de ningún estándar. También se ajustaron las condiciones del puerto MPS, se disminuyó la temperatura a 30 °C, las muestras se incubaron previamente por 5 minutos y la extracción en el vial se realizó solamente por 4 minutos. La desorción se realizó durante 120 segundos, la temperatura del inyector del cromatógrafo se mantuvo a 250 °C. Después de cada inyección la fibra se limpió durante 25 minutos, para eliminar cualquier volátil residual. Para cuantificar los compuestos se utilizó el método de estándar externo, usando como referencia 3-sulfanil-1-hexanol (Alfa Aesar, Heysham, UK).

### 3.2.5. Análisis por CG-EM de los compuestos volátiles producidos por la acción de la microbiota oral sobre los de precursores de aroma

*Para los experimentos in vitro con precursores glicosídicos:* Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973N (Agilent Palo Alto, CA), el cual operó en modo de ionización por impacto electrónico (IE) a 70 eV y se detectaron los iones positivos con masas entre 40 y 800 u. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: se utilizó una columna capilar DB-WAX (60 m, 0,250 mm, 0,50  $\mu$ m, Agilent, USA), la temperatura programada para el horno se optimizó manteniéndolo durante 5 minutos a 40 °C e incrementando la temperatura 4 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 240 °C, la cual se mantuvo durante 20 minutos. La temperatura del inyector se mantuvo a 270 °C y la fuente de iones a 230 °C durante los análisis. En todos los casos se hicieron las inyecciones en modo *splitless*, empleando como gas de arrastre Helio (grado UAP) a una velocidad de 1 mL/min. Los datos se procesaron en el software ChemStation de Agilent. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los índices de retención y los espectros de masas de los compuestos con los reportados en la librería de espectros de masas NIST 2.0.

*Para los experimentos in vitro con los precursores cisteinilados:* Los análisis por CGAR-EM se realizaron en el mismo equipo mencionado anteriormente, usando las mismas condiciones de trabajo pero con la temperatura del inyector en 250°C. Se monitorearon los iones en modo SCAN detectando los iones positivos entre 40 y 800 u y de manera simultánea en modo SIM siguiendo los iones  $m/z$  55, 59, 73 y 101, característicos del 3-sulfanil-1-hexanol.

### **3.2.6. Recuento de microorganismos característicos de la cavidad oral humana**

Las muestras almacenadas en glicerol fueron diluidas de forma seriada, usando solución fisiológica. El número de unidades formadoras de colonia totales (UFC/mL), y de cada tipo de bacterias, se cuantificaron mediante el recuento de colonias tras la siembra directa en *spot* de las diluciones en placas de cuatro tipos de medios: (TSB-Agar (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para aerobios totales, Wilkins-Chalgren agar (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para anaerobios totales, TBS-Agar modificado con 0,3% de extracto de levadura (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para *Streptococcus*, BHI-Agar modificado con 1% de caseína, 0,5% de glucosa y 0,5% de extracto de levadura (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para *Actinomyces*. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h en anaerobiosis (Bactron anaeróbico / Cámara Ambiental, SHELLAB, Cornelius, OR, EEUU), a excepción de las placas de TSB-Agar que se incubaron en condiciones aerobias.

### **3.2.7. Análisis estadístico**

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizaron los siguientes métodos estadísticos: el Análisis de Componentes Principales (PCA) para examinar la relación entre las variables analizadas y diferenciar grupos de datos en función de dichas variables; el test paramétrico de la t-Student para evaluar las diferencias entre los resultados obtenidos antes y después de los distintos tratamientos aplicados; el Análisis de la Varianza (ANOVA), y el posterior test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) para comparar los valores medios de las variables en los distintos grupos. Para el procesamiento estadístico de los datos y la realización de gráficas se utilizaron los siguientes programas: RWIZARD para Windows, versión 1.1 y Microsoft Office EXCEL para Windows, versión 2010 (Microsoft, 2010, <http://office.microsoft.com>).

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de los experimentos *in vitro*, para evaluar el impacto de la microbiota oral sobre los extractos precursores de aroma. Se encuentra dividido en 2 secciones, en la primera sección se presentan los resultados de las transformaciones microbianas sobre los precursores de aroma provenientes de *Psidium friedrichsthalianum* Nied., y en la segunda sección se presentan los resultados del efecto de los precursores de aroma sobre la microbiota oral humana.

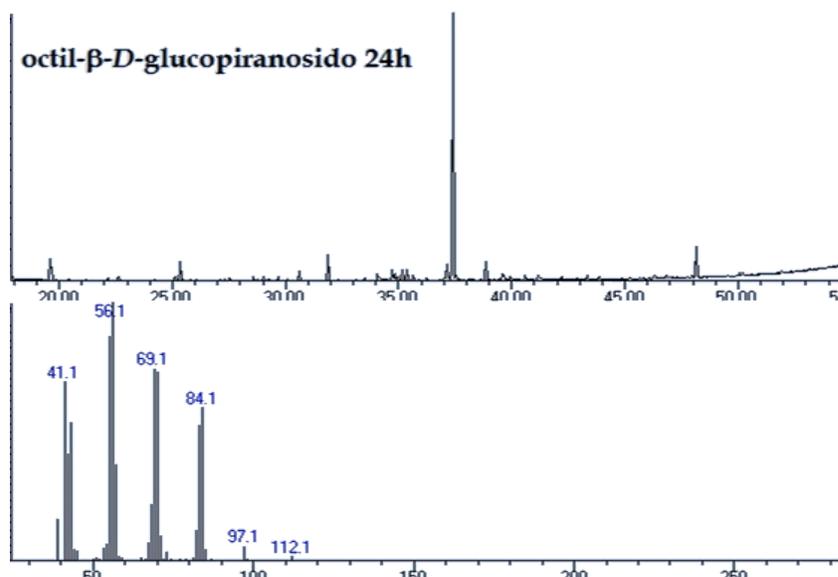
#### 3.3.1. Transformaciones microbianas de los compuestos precursores de aroma provenientes de *P. friedrichsthalianum* Nied.

##### 3.3.1.1. Impacto de la microbiota oral sobre los precursores glicosídicos

La capacidad que tienen las bacterias propias de la cavidad oral para hidrolizar los precursores de tipo glicosídico se evaluó en experimentos *in vitro*. Para este fin, se eliminaron variables como la diversidad de la microbiota propia de cada individuo, mezclando las muestras de saliva de los tres individuos participantes. Se realizó un diseño experimental al azar 4X2 ajustando, los tiempos de toma de muestra a cuatro que son representativos de la muestra sin fermentar (0h), en sus etapas iniciales de fermentación (2h), en el tiempo de hidrólisis (24h) y post-hidrólisis (72h), y evaluando las condiciones del crecimiento microbiano: aeróbicas y anaeróbicas. Todo esto con el fin de generar un patrón de condiciones para este tipo de experimentos. En este experimento se empleó exclusivamente la microbiota aislada de la saliva cruda, que se ha demostrado ser la responsable de la hidrólisis enzimática.<sup>95</sup>

Para comprobar que las bacterias de la cavidad oral hidrolizan precursores de tipo glicosídico en las condiciones establecidas, se utilizó el estándar octil- $\beta$ -D-glucopiranosido, el cual se incubó junto con las bacterias en las mismas condiciones de los

otros experimentos (numeral 3.2.3.). La hidrólisis de este compuesto liberó 1-octanol. Al evaluar por CG-EM las muestras recolectadas a los tiempos señalados, se detectó la aparición de una señal cromatográfica (IK= 1599) en las muestras incubadas a condiciones anaeróbicas a 24 horas, que por su espectro de masas se corresponde con el 1-octanol (PM= 130 u, Figura 23). En este espectro se observó un ión en  $m/z$  112 correspondiente a la pérdida de agua en alcoholes primarios  $[M-H_2O]^+$  y las respectivas pérdidas correspondientes a la cadena alifática. Con este mismo IK, pero en condiciones aerobias se obtuvo el mismo pico, pero con una menor intensidad. De esta manera se pudo comprobar que la microbiota oral aislada de la saliva humana es capaz de hidrolizar precursores de tipo glicosídico liberando la respectiva aglicona odorante, tal como se había reportado previamente en precursores glicosídicos de la uva por Muñoz-González *et al.*<sup>95</sup>



**Figura 23.** Cromatograma de gases obtenido para el producto de la fermentación con microbiota oral del estándar octil-β-D-glucopiranosido y su respectivo espectro de masas, en columna DB-wax

Además de la hidrólisis del precursor glicosídico de referencia, en las muestras incubadas con los precursores glicosídicos aislados de la guayaba, por medio del análisis por CG-EM se detectaron 15 compuestos volátiles tras la incubación con el extracto de precursores

glicosídicos, los cuales provienen tanto de la hidrólisis del precursor, como del propio metabolismo microbiano (Tabla 5).

**Tabla 5.** Compuestos volátiles provenientes de la fermentación microbiana del extracto glicosídico de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) y el tiempo de incubación en el que se detectaron

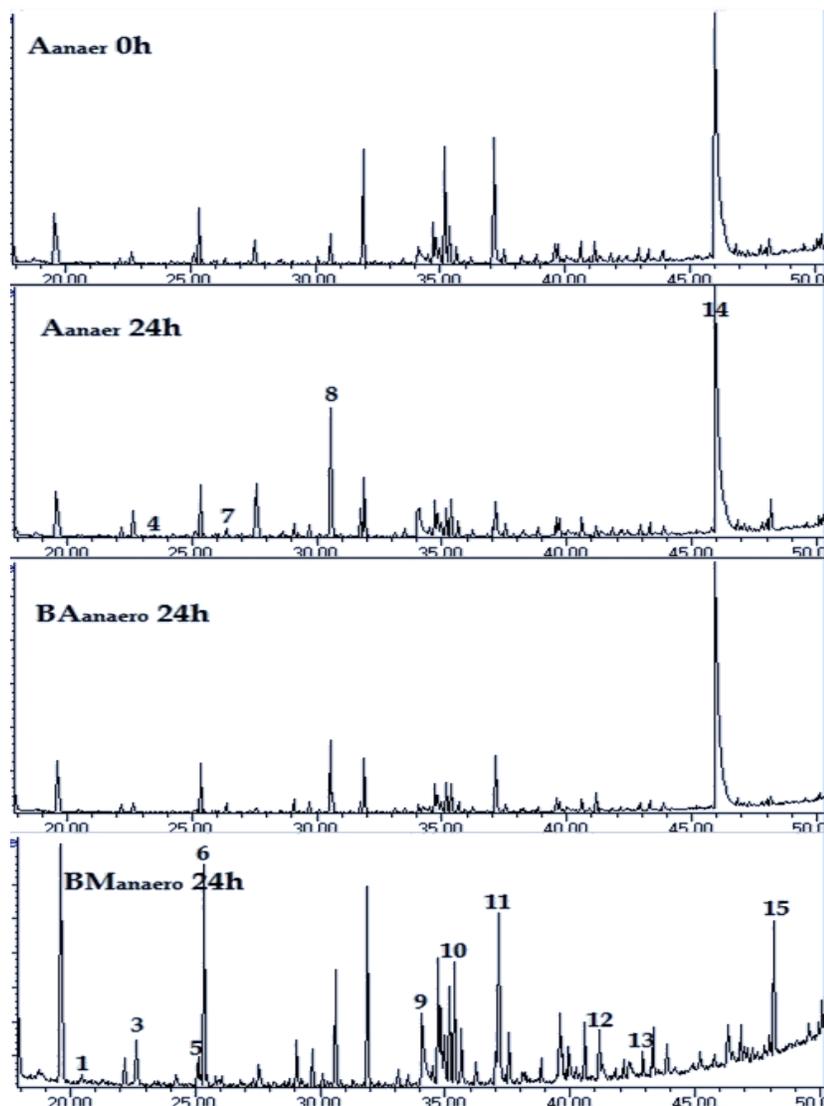
No. <sup>a</sup>	IK DB- WAX <sup>b</sup>	Compuesto <sup>c</sup>	A <sub>aer</sub> <sup>d</sup>	BA <sub>aer</sub> <sup>e</sup>	BM <sub>aer</sub> <sup>f</sup>	A <sub>anaer</sub> <sup>g</sup>	BA <sub>anaer</sub> <sup>h</sup>	BM <sub>anaer</sub> <sup>i</sup>
1	1121	2-metil-1-propanol	0h, 2h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	24h	2h, 24h, 72h
2	1159	Acetato de isoamilo	24h, 72h	-	24h, 72h	-	-	-
3	1176	1-butanol	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h
4	1197	2-hexanol	24h, 72h	-	24h, 72h	24h, 72h	-	-
5	1241	3-metil-1-butanol	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h
6	1250	4-metil-2-heptanona	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	2h, 24h, 72h
7	1274	Hexanoato de etilo <sup>j</sup>	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 72h	-	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	-
8	1390	1-hexanol <sup>j</sup>	24h	24h, 72h	-	24h, 72h	-	-
9	1429	Ácido acético	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 24h, 72h
10	1494	2-etil-1-hexanol	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h
11	1529	Benzaldehído	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h
12	1591	4-butoxi-1-butanol	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h
13	1599	4-etilbenzaldehído	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h	0h, 2h, 24h, 72h
14	1747	Ácido hexanoico	0h, 2h, 24h	24h, 72h	2h	0h, 2h, 24h, 72h	2h, 24h, 72h	-
15	1786	Ácido fenilacético	-	0h, 72h	24h, 72h	-	24h	0h, 2h, 24h

<sup>a</sup> Compuestos enumerado de acuerdo con el orden de elución columna DB-WAX

- b Índice de retención
- c Compuesto identificado por el análisis de su espectro de masas
- d Fermentación aerobia del extracto de glicósidos
- e Blanco extracto de glicósidos en incubación aerobia
- f Control negativo (medio de cultivo + saliva) en incubación aerobia
- g Fermentación anaerobia del extracto de glicósidos
- h Blanco extracto de glicósidos en incubación anaerobia
- i Control negativo (medio de cultivo + saliva) en incubación anaerobia
- j Compuesto activo olfativamente en guayaba agria
- No detectado

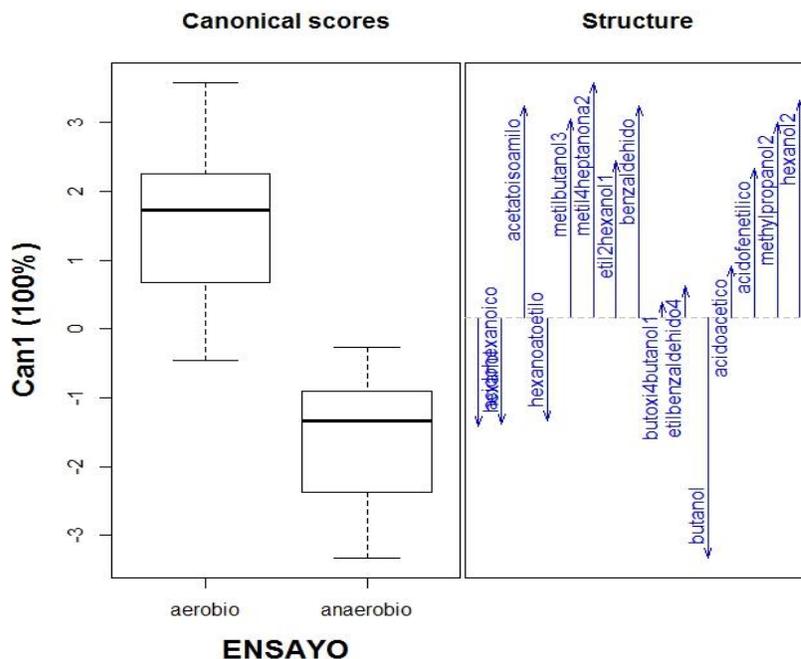
Los compuestos volátiles identificados y asociados al metabolismo de la microbiota oral, en condiciones de incubación aerobia y anaerobia fueron los siguientes: 2-metilpropanol, 1-butanol, 3-metilbutanol, 4-metil-2-heptanona, ácido acético, 2-etil-1-hexanol, benzaldehído, 4-butoxibutanol, 4-etilbenzaldehído; el acetato de isoamilo es propio de la microbiota, pero solo se produjo en condiciones aerobias. Así mismo, el ácido fenilacético aparece en el blanco de extracto glicosídico (sin microbiota oral) y en el control negativo (sin precursores aromáticos y sólo con la microbiota oral), pero no aparece en la incubaciones de los glicósidos con la microbiota oral. También se observaron compuestos volátiles propios del extracto, y presentes en el mismo sin hidrolizar, como el hexanoato de etilo que fue identificado y cuantificado como compuesto activo olfativamente en el capítulo 2, y el ácido hexanoico, el cual se había observado ya en extracto SAFE de la fruta, pero no se incluyó dentro de los compuestos identificados, ya que no fue activo olfativamente.

Uno de los compuestos que se identificó como provenientes de la hidrólisis por la microbiota oral, fue el 1-hexanol, que es el mismo compuesto que se determinó por hidrólisis enzimática en el capítulo 2. Se observó que la concentración de este compuesto fue de mayor intensidad en condiciones anaerobias que en condiciones aerobias, además en condiciones aerobias se hidroliza el blanco del extracto glicosídico (sin microbiota oral, ni saliva), donde no debería observarse hidrólisis. También se observó la aparición del 2-hexanol tras la incubación del extracto con la microbiota oral. Este compuesto no se había detectado anteriormente, pero presenta una señal cromatográfica muy baja (Figura 24).



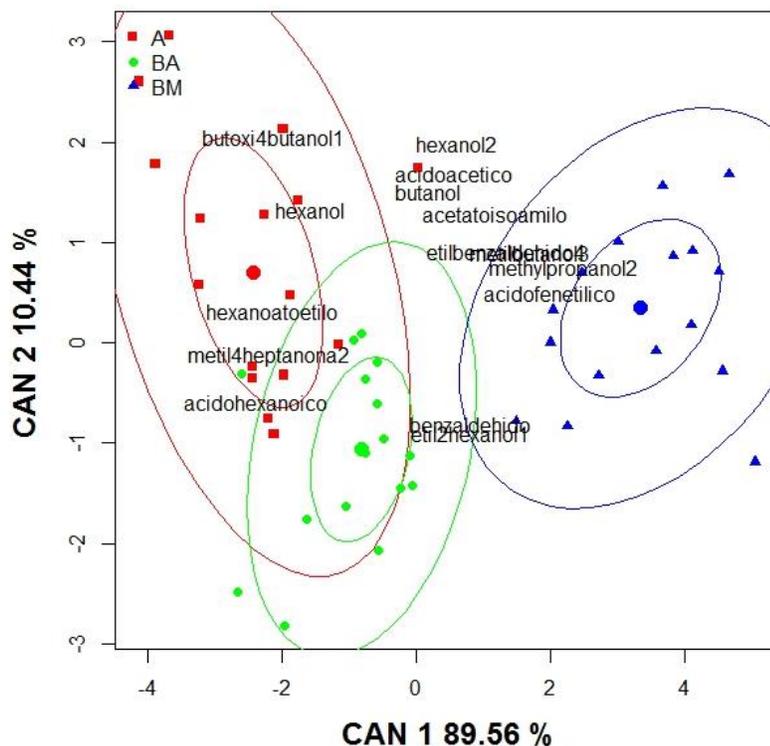
**Figura 24.** Cromatogramas obtenidos por CG-EM de la incubación en condiciones anaerobias del extracto glicosídico y la microbiota oral a 0h y 24h (A<sub>anaero</sub>), el blanco de extracto de glicósidos en incubación anaerobia a 24h (BA<sub>anaero</sub>) y el control negativo (medio de cultivo + saliva) (BM<sub>anaero</sub>) en incubación anaerobia a 24h. Los números de los picos corresponden a los números de compuestos de la Tabla 5 en orden de elución en la columna DB-WAX.

Como se mencionó anteriormente, se da una mejor hidrólisis en medio anaerobio que en medio aerobio, esto se corrobora por la agrupación estadística, donde se observa que el compuesto 1-hexanol obtenido por la hidrólisis de los precursores glicosídicos se encuentra en mayor proporción en la fermentación anaeróbica (Figura 25).



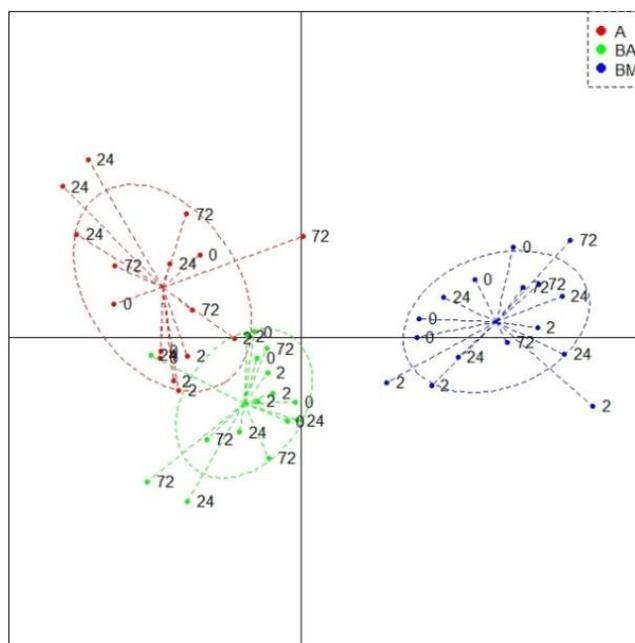
**Figura 25.** Agrupación de los compuestos obtenidos en los ensayos según las condiciones de incubación (aerobia o anaerobia), mediante el análisis estadístico discriminante por método cuadrado

Por otro lado, se observó la agrupación de los compuestos volátiles generados según el tipo de muestra (extracto glicosídico, blanco de muestra sin el extracto glicosídico, y blanco de muestra sin microbiota oral). Como se puede observar en la Figura 26, se evidencia que el 1-hexanol, el ácido hexanoico y el hexanoato de etilo, entre otros, se agrupan en la componente propia del extracto glicosídico y de su fermentación. En cambio, compuestos como el ácido fenilacético y el 2-metilpropanol, entre otros, se agrupan dentro del conjunto de datos propios de la microbiota oral. También se evidencia que no hay una serie de compuestos propios para el blanco del extracto glicosídico, ya que se encuentran compartiendo las componentes con las otras variables (Figura 26).



**Figura 26.** Análisis de componentes principales (PCA) en donde se muestra la agrupación de los compuestos por experimento. A. Extracto glicosídico, BA. Blanco de extracto glicosídico, BM. Blanco de crecimiento bacteriano

Al hacer el análisis por PCA discriminante se observa que las muestras de un mismo tipo de experimento (extracto glicosídico y sus blancos) se agrupan según el tipo de muestra, pero no se observa un efecto significativo del tiempo de incubación (Figura 27). Esto indica que la composición de los medios se mantiene a lo largo de los tiempos de incubación ensayados. También se observó que la producción de compuestos volátiles es mayor a las 24 h.

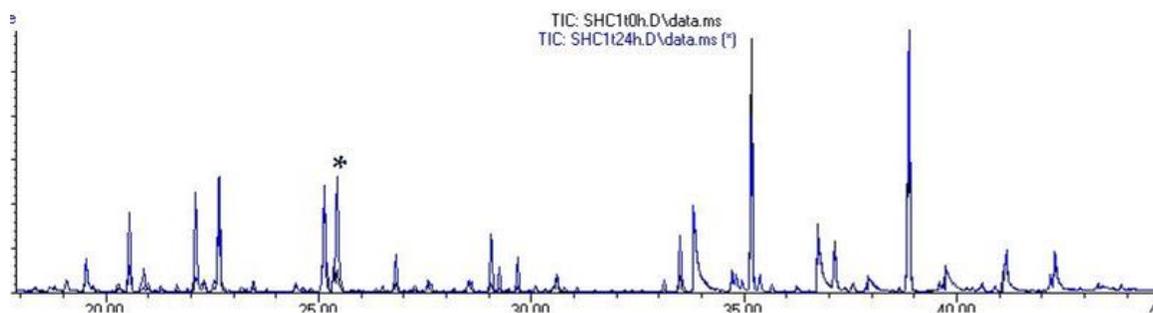


**Figura 27.** PCA discriminante para cada una de las muestras a los diferentes tiempos de muestreo. A. Extracto glicosídico, BA. Blanco de extracto glicosídico, BM. Blanco de crecimiento bacteriano.

### 3.3.1.2. Fermentación de precursores cisteinilados

Los experimentos con los precursores cisteinilados se realizaron teniendo en cuenta las condiciones establecidas en el numeral 3.3.1.1., incubación anaerobia y solo dos tiempos de recolección de muestra (sin fermentar (0h) y fermentada (24h)). Debido a las bajas concentraciones en que se encuentran los compuestos azufrados volátiles que se pueden generar tras la fermentación, la detección en los análisis por CG-EM se realizó en modo SIM, siguiendo los iones  $m/z$  55, 59, 73 y 101, para el 3-sulfanil-1-hexanol. Así mismo, para evitar interferencias en el estudio, no se realizó la cuantificación por el método de estándar interno, ya que disminuía la sensibilidad de la detección y dificultaba el análisis de las muestras. Para comprobar la capacidad de las bacterias de la cavidad oral de hidrolizar precursores de tipo cisteinilado en las condiciones establecidas, se utilizó el estándar *S*-carboximetil-*L*-cisteína, que al ser evaluado por CG-EM tras su fermentación, mostró una señal cromatográfica ( $IK= 1249$ ), la cual no se aprecia a tiempo 0h (Figura 28).

Ésta señal no corresponde a ninguna de las señales correspondientes a los compuestos provenientes de la microbiota oral, por lo tanto corresponde al producto de hidrólisis de la *S*-carboximetil-*L*-cisteína (ácido 3-mercaptopropanoico). De esta manera se pudo corroborar que la microbiota oral hidroliza precursores de tipo cisteinilado y las compuestos azufrados volátiles se pueden identificar por CG-EM, como habían mencionado Starkenmann *et al.*<sup>52</sup>



**Figura 28.** TIC obtenido de la incubación del estándar *S*-carboximetil-*L*-cisteína con microbiota oral a tiempo cero (trazo negro) y a 24h (trazo azul), modo SIM. \* Señal correspondiente al producto de hidrólisis

Tras la incubación del extracto de precursores cisteinilados con la microbiota oral y, por medio del análisis por CG-EM se detectaron 11 compuestos volátiles, los cuales provienen tanto de la muestra (precursores), como del propio metabolismo microbiano (Tabla 6).

Como puede comprobarse en la Tabla 6, se encontraron compuestos asociados al metabolismo de la microbiota oral: isobutanol, 1-butanol, 3-metilbutanol, ácido acético, benzaldehído, 4-etilbenzaldehído, los cuales (excepto el isobutanol) se detectaron también en la microbiota oral del ensayo con los precursores glicosídicos, ambos resultados se correlacionan entre sí, ya que los individuos de prueba para ambos ensayos fueron los mismos. También se detectó el ácido 2-metilpropanoico en los blancos de ensayo pero solo tras 24h de incubación. De otro lado se observaron compuestos propios del extracto, como el ácido butanoico y hexanoico los cuales se habían determinado previamente en el extracto SAFE de la fruta, pero no se incluyeron dentro de los compuestos identificados,

ya que no fueron activos olfativamente, y el ácido 3-metilbutanoico que hace parte de los compuestos activos olfativamente identificados y cuantificados descritos en el capítulo 2.

**Tabla 6.** Compuestos volátiles determinados en los medios de cultivo incubados con extractos de precursores cisteinilados aislados de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) y en los controles respectivos (BA: sin microbiota oral y extractos cisteinilados y BM: con microbiota oral y sin extracto cisteinilado). La tabla muestra a su vez los tiempos en los que se determinaron la máxima concentración de compuestos volátiles.

No. <sup>a</sup>	IK DB-WAX <sup>b</sup>	Compuesto <sup>c</sup>	A <sup>d</sup>	BA <sup>e</sup>	BM <sup>f</sup>
16	1124	isobutanol	0h, 24h	0h, 24h	0h, 24h
3	1177	1-butanol	0h, 24h	0h, 24h	0h, 24h
5	1241	3-metilbutanol	0h, 24h	0h, 24h	0h, 24h
17	1429	3-sulfanil-1-hexanol <sup>g</sup>	24h	-	-
9	1486	Ácido acético	0h, 24h	0h, 24h	0h, 24h
11	1590	benzaldehído	0h, 24h	0h, 24h	0h, 24h
18	1614	Acido 2-metilpropanoico	-	24h	24h
19	1674	Ácido butanoico	0h, 24h	0h, 24h	-
20	1722	Ácido 3-metilbutanoico	0h, 24h	-	-
13	1786	4-etilbenzaldehído	0h, 24h	0h, 24h	0h, 24h
14	1903	ácido hexanoico	0h, 24h	0h, 24h	-

<sup>a</sup> Compuesto numerado de acuerdo al orden de elución columna DB-WAX, teniendo en cuenta la numeración utilizada en la Tabla 5

<sup>b</sup> Índice de retención

<sup>c</sup> Compuesto identificado por el análisis de su espectro de masas

<sup>d</sup> Fermentación anaerobia del extracto cisteinilado

<sup>e</sup> Blanco extracto cisteinilado en incubación anaerobia (sin microbiota oral)

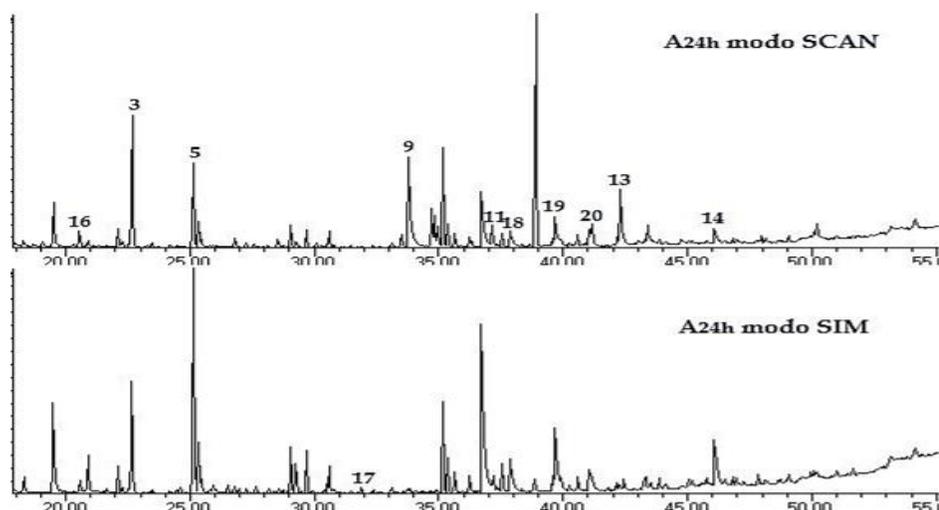
<sup>f</sup> Control negativo (medio de cultivo + saliva) en incubación anaerobia

<sup>g</sup> Compuesto activo olfativamente en guayaba agria

- No detectado

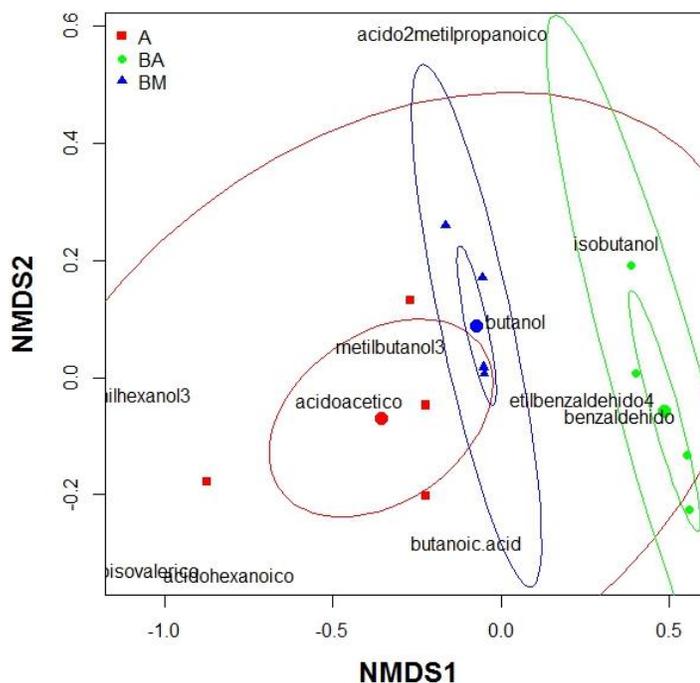
El único compuesto que se identificó como producto de la incubación del extracto de precursores cisteinilados con la microbiota oral fue el 3-sulfanil-1-hexanol, proveniente de la 3-(1-hexanol)-L-cisteína. Éste es el mismo compuesto volátil que se determinó por hidrólisis enzimática de estos mismos precursores en el capítulo 2. A pesar de los

esfuerzos realizados para aumentar la sensibilidad de la detección y realizarla en modo SIM, la señal cromatográfica para éste compuesto fue muy baja (Figura 29). No obstante, la presencia de otros compuestos azufrados, productos de la hidrólisis de la microbiota oral sobre precursores cisteinilados no se descarta, siendo necesario en futuros trabajos, el empleo de estrategias analíticas adicionales, que permitan la detección de este tipo de compuestos, que presentan una gran dificultad de detección por su rápida degradación y su baja concentración en las muestras del estudio.



**Figura 29.** Cromatograma obtenido por CG-EM para la fermentación anaerobia del extracto de precursores cisteinilados, y el TIC obtenido en modo SIM siguiendo los iones en  $m/z$  55, 59, 73 y 101. Los números de los picos corresponden a los números de compuestos de la tabla 6 en orden de elución en la columna DB-WAX. El pico 17 fue identificado como el 3-sulfanil-1-hexanol

No obstante, haciendo uso de las herramientas estadísticas, se observó la agrupación de los compuestos por tipo de muestra tras la fermentación, y se evidenció que el 3-sulfanilhexanol, el ácido butanoico y el ácido 3-metilbutanoico (ácido isovalérico) entre otros compuestos son propios del extracto cisteinilado y de su fermentación, en cambio compuestos como el 3-metilbutanol y el ácido acético son propios de la microbiota oral, lo cual se corrobora con lo mencionado anteriormente (Figura 30).



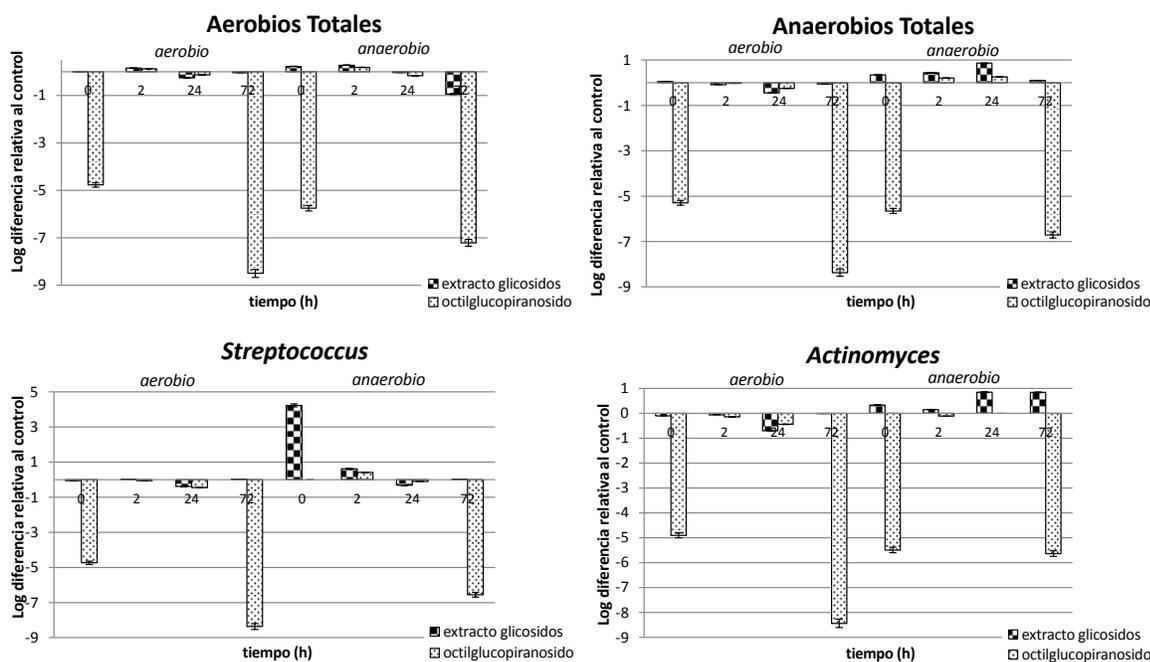
**Figura 30.** PCA discriminante en donde se muestra la agrupación de los compuestos volátiles determinados, según el experimento ensayado: A. Extracto cisteinilado, BA. Blanco de extracto cisteinilado, BM. Blanco de crecimiento bacteriano

### 3.3.2. Efecto de extractos precursores de aroma sobre la microbiota oral humana

En éste estudio se determinó la evolución de la composición microbiana a lo largo del tiempo de incubación. Para este estudio se mezclaron las salivas de los tres individuos participantes y así poder obtener una muestra representativa de bacterias propias de la cavidad oral. Los recuentos se realizaron sobre las bacterias aerobias totales, bacterias anaerobias totales, *Streptococcus* y *Actinomyces*. Se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC) y luego log UFC/mL. Otra condición que se tuvo en cuenta para realizar los estudios fue la utilización del medio SHI que asegura el crecimiento de una mayor población de bacterias orales cultivables, ya que es un medio específico para este tipo de microorganismos y muy rico en nutrientes.<sup>96</sup>

### 3.3.2.1. Efecto de los precursores glicosídicos sobre la microbiota oral

Las muestras utilizadas en el ensayo fueron el extracto de precursores glicosídicos y el estándar octil  $\beta$ -D-glucopiranosido, que se usó como referencia de la hidrólisis, y se hicieron blancos de cultivo incubando únicamente las bacterias procedentes de la cavidad oral de los individuos con el medio de cultivo respectivo. Para visualizar el comportamiento presentado por las bacterias en las dos condiciones de crecimiento (aerobiosis y anaerobiosis), se realizaron las gráficas del logaritmo de la diferencia relativa al control de las bacterias con respecto al tiempo de incubación (Figura 31).



**Figura 31.** Cambios en los grupos de poblaciones bacterianas durante la incubación del extracto glicosídico y el octil  $\beta$ -D-glucopiranosido, por acción de la microbiota oral humana.

En los recuentos de las bacterias aerobias totales, el extracto glicosídico, no provocó un aumento en la población durante el tiempo de incubación tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Por otro lado, el octil  $\beta$ -D-glucopiranosido produjo una disminución en la población bacteriana. Este comportamiento se determinó también para el resto de bacterias evaluadas en condiciones aerobias (anaerobios totales, *Streptococcus* y

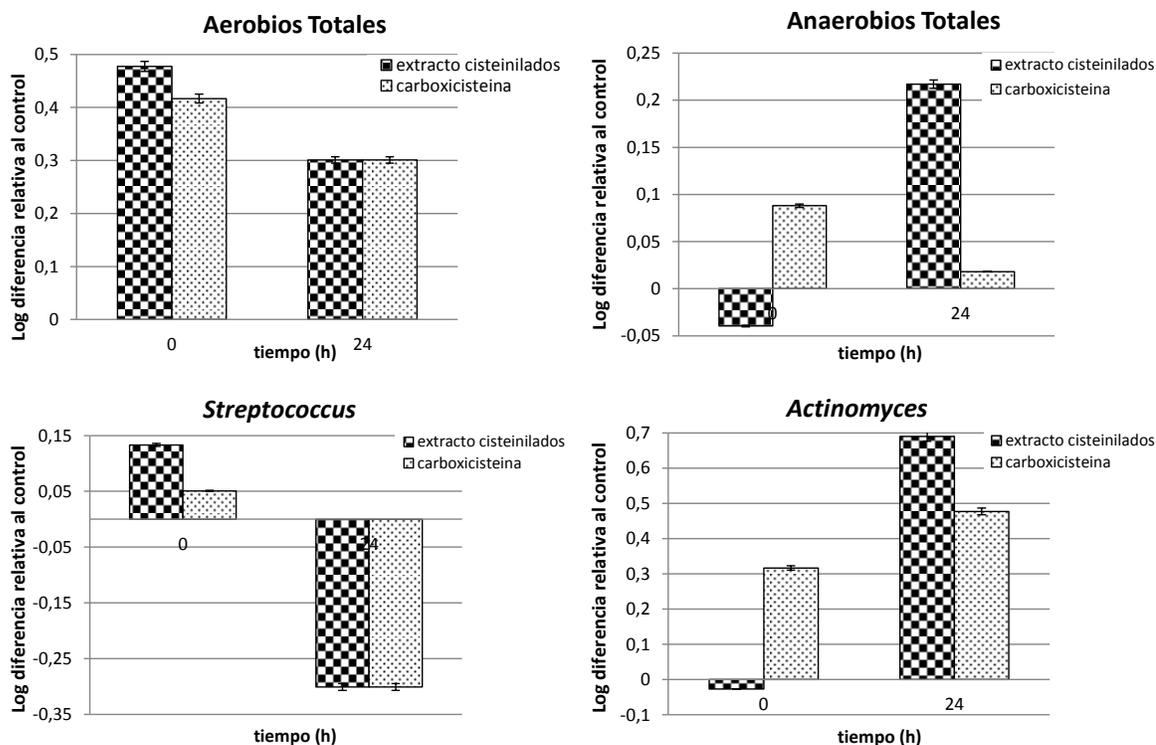
*Actinomyces*). Por el contrario, en condiciones anaerobias, el extracto glicosídico, produjo un aumento en los recuentos de las bacterias anaerobias totales y *Actinomyces* con respecto al control de crecimiento durante el tiempo de incubación. Este comportamiento, es contrario al observado para los *Streptococcus* en donde se observa una disminución de la población con el tiempo de incubación. En el caso del estándar octil  $\beta$ -D-glucopiranosido en condiciones anaerobias, en todos los recuentos bacterianos se evidenció una disminución significativa de la población bacteriana comparada con el control de crecimiento.

Estos resultados indican una disminución del crecimiento de las bacterias de la cavidad oral humana en presencia de los precursores glicosídicos. Aunque en este estudio la composición de microbiota no se caracterizó por medio de técnicas moleculares, las condiciones de crecimiento empleadas y la utilización de medios de cultivo específicos para bacterias propias de la cavidad oral, podrían ser representativos de especies bacterianas aerobias totales de la cavidad oral, como como: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, o dentro de los anaerobios totales: *Granulicatella adiascens*, *Veillonella dispar* y *Fusobacterium nucleatum*. Además dentro de los *Streptococcus*: *Streptococcus sanguinis*, es la especie más representativa de la cavidad oral, mientras que entre los Actinomicetos, el *Actinomyces naeslundii* es uno de los más representativos.<sup>95</sup> Es conocido que el género *Streptococcus* es un grupo de bacterias formado por cocos gram-positivos pertenecientes la familia firmicutes y al grupo de las bacterias ácido lácticas. Dependiendo de la especie, algunos se han relacionado con algunas enfermedades de la cavidad oral y vías respiratorias, como amigdalitis, neumonía y caries dental, entre otras. El género *Actinomyces* corresponde a bacterias del tipo gram-positivo. Algunas especies son anaerobias, mientras que otras son anaerobias facultativas. Muchos *Actinomyces* son patógenos oportunistas de los seres humanos y de otros mamíferos, particularmente en la cavidad bucal; en algunos casos, estas bacterias pueden causar actinomicosis, una enfermedad caracterizada por la formación de abscesos en la boca, los pulmones, o el aparato gastrointestinal.

Por las razones expuestas, el consumo de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.), se podría asociar con un efecto benéfico para la salud oral, ya que los precursores glicosídicos que presentan pueden reducir el crecimiento de algunas de ellas, evitando así la incidencia de algunas enfermedades relacionadas con la microbiota oral. Sin embargo, se sabe que éste tipo de bacterias se adaptan fácilmente y pueden recolonizar superficies limpias en la boca en pocos minutos, debido a la formación de biopelículas sobre los dientes, dentro de los primeros colonizadores de la biopelícula dental se encuentran los *Streptococcus* y *Actinomyces*.<sup>121</sup>

### **3.3.2.2. Efecto de los precursores cisteinilados sobre la microbiota oral**

Para este ensayo se utilizaron como muestras el extracto de precursores cisteinilados y el estándar *S*-carboximetil-*L*-cisteína. Al igual que en el ensayo anterior (numeral 3.3.2.1.) se hicieron blancos de cultivo incubando únicamente las bacterias procedentes de la cavidad oral de los individuos con el medio de cultivo respectivo. Como se mencionó anteriormente en este ensayo la incubación se realizó solamente en condiciones anaerobias y solo se tomaron muestras a dos tiempos ( $t=0$ , y  $t=24h$ ). Luego con base en la cuantificación de la microbiota se realizaron gráficas del logaritmo de la diferencia relativa al control de crecimiento de las bacterias con respecto al tiempo de cada incubación (Figura 32).



**Figura 32.** Cambios en los grupos de poblaciones bacterianas características de la cavidad oral durante la incubación con el extracto de precursores cisteinilados y la S-carboximetil-L-cisteína.

En general se observó que el extracto de compuestos cisteinilados, produce una disminución de la cantidad de bacterias aerobias totales y *Streptococcus* con el tiempo de incubación; así mismo, la cantidad de bacterias anaerobias totales y *Actinomyces* aumentó con el tiempo en presencia del extracto. De otro lado, el estándar S-carboximetil-L-cisteína produjo una disminución de la cantidad de bacterias aerobias totales, anaerobias totales y *Streptococcus* con el tiempo; no obstante se observó que, la cantidad de bacterias del género *Actinomyces* aumentaba con el tiempo. Esto indica que la presencia de precursores de tipo S-cisteína inhibe el crecimiento solo de algunos tipos de bacterias. La inhibición de los *Streptococcus* podría ser responsable de una disminución en la población de *Actinomyces*, ya que la formación de biopelículas requiere en algunos casos de interacciones cooperativas entre bacterias para que la biopelícula se estratifique. Es por ello, que la inhibición de las primeras etapas de la formación de la biopelícula, podría

evitar su completa formación y así disminuir por ejemplo, la incidencia de algunas enfermedades de la cavidad bucal o de otro tipo que han sido relacionadas con este tipo de mecanismos.<sup>122</sup>

En conclusión, la microbiana oral humana es capaz de hidrolizar los extractos de precursores glicosidados y cisteinilados aislados a partir de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.), dando origen a compuestos volátiles activos olfativamente, como el 1-hexanol y el 3-sulfanil-1-hexanol respectivamente. Ambos resultados coinciden con los obtenidos al realizar la hidrólisis enzimática de dichos precursores (numeral 2.3.4.), lo que corrobora la acción hidrolítica de las bacterias presentes en la cavidad oral humana. Por otro lado, se ha comprobado que la microbiota oral, puede producir compuestos volátiles resultantes de su propio metabolismo, como el: 1-butanol, 3-metilbutanol, ácido acético, benzaldehído y 4-etilbenzaldehído, que se determinaron tanto en los ensayos realizados con los precursores glicosídicos como los cisteinilados. Por otro lado, se ha comprobado que los extractos de precursores obtenidos de la guayaba agria son capaces de disminuir el crecimiento de algunos tipos de bacterias de la cavidad oral que se han relacionado con diferentes enfermedades del tracto buco-respiratorio. Este efecto, puede ser considerado por tanto, como beneficioso para la salud humana.

## 4. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA GUAYABA AGRIA (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

### 4.1. GENERALIDADES

El género *Psidium* consta de aproximadamente 150 especies y sólo cerca de veinte de ellas tienen frutos que son consumidos comúnmente. La especie más cultivada es la guayaba común (*Psidium guajava* L.), y otras especies cultivadas son la guayaba fresa (*Psidium cattleianum* Sabine), la guayaba del Brasil (*Psidium guineense* Sw.), y el CAS o guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.).<sup>123</sup> La guayaba común (*P. guajava*) a menudo se incluye dentro de la categoría de las súper frutas (se caracterizan por tener un elevado contenido en compuestos bioactivos).<sup>124</sup> La revisión bibliográfica de ésta especie reveló que las hojas y los frutos de esta planta tienen actividad antioxidante, antimicrobiana, antialérgica, entre otras, que en su mayoría se deben a la presencia de compuestos de tipo fenólico y se encuentra relacionada con la prevención de diversas enfermedades.<sup>125,82</sup> Así mismo, el extracto metanólico y las fracciones obtenidas por partición de los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied., se evaluaron como antioxidantes y como tratamiento a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la cual se valoró pensando en sus propiedades anti-inflamatorias relacionadas con la actividad inhibitoria de la interleuquina-8 (IL-8) y de la matriz metaloproteinasa-1 (MMP-1). Con estos ensayos se evidenció que la fracción enriquecida en compuestos fenólicos tenía actividad inhibitoria contra la producción de IL-8 y de expresión MMP-1, con una actividad potente en ambos ensayos (100 µg/mL) y una actividad antioxidante promisorias.<sup>11</sup> Con la anterior información, se manifestó la importancia de profundizar en la caracterización de los compuestos de tipo fenólico en los frutos del género *Psidium* como posibles compuestos

bioactivos y éste estudio en particular, se enfocó en realizar la caracterización de los compuestos fenólicos obtenidos a partir de los frutos completos de *P. friedrichsthalianum* Nied. mediante el uso de distintas técnicas analíticas.

Los compuestos de tipo fenólico, se han caracterizado usando diversas técnicas espectroscópicas como UV-Vis, espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear, también se han usado técnicas cromatográficas como la separación por HPLC acoplada a distintos detectores HPLC-UV-Vis, HPLC-MS, HPLC-ELSD. Recientemente haciendo uso de los avances tecnológicos y el aumento de sensibilidad de los equipos se ha cambiado el aprovechamiento de los mismos. Es así, como la ciencia metabolómica se diseñó para identificar y cuantificar todos los metabolitos en un sistema biológico, en menor tiempo y sin purificarlos, contribuyendo así al entendimiento de interacciones moleculares complejas en de sistemas biológicos, observando un panorama general con un menor tiempo. Con este enfoque, en principio se estudia la muestra compleja sin purificar, utilizando usualmente HPLC-MS, equipado con un detector de masas de alta sensibilidad. Por tal motivo los equipos más utilizados en este tipo de estudios son los que emplean cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) que permiten seguir iones, y atraparlos para volverlos a fragmentar, entre otras ventajas que ofrecen.<sup>126</sup> Este fue uno de los enfoques que se usó para la caracterización de los compuestos de tipo fenólico en *P. friedrichsthalianum* Nied.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se describe a continuación se enfocó en el aislamiento y la elucidación estructural de los compuestos de tipo fenólico con actividad antioxidante *in vitro*, los cuales se aislaron a partir de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.). Para tal fin, se realizó la extracción de los compuestos no volátiles mediante una extracción con disolvente polar, y luego éste extracto se sometió a partición líquido-líquido. A continuación se llevó a cabo el fraccionamiento, la purificación e identificación, de algunos compuestos de interés provenientes de fracciones

activas al ensayo de actividad antioxidante ABTS. Así mismo, se realizó un análisis metabolómico, con el propósito de hacer un perfil de composición más completo de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos, en vista de la dificultad presentada en la caracterización de los compuestos, por la complejidad del extracto. Por último, con el fin de profundizar en la caracterización, se realizó un estudio direccionado por UPLC-ESI-TQ EM/EM tándem a la caracterización y cuantificación de este tipo de compuestos.

#### **4.2.1. Materiales y Reactivos**

Los disolventes utilizados fueron: acetonitrilo grado HPLC-MS de LabScan (Sowinskiego, Polonia), ácido fórmico de Sharlau (Barcelona, España) y agua tipo HPLC Milli-Q WatersMillipore (Milford, Massachusetts, Estados Unidos). Los disolventes tipo análisis (EMSURE®) se adquirieron a Merck (Darmstadt, Alemania), estos son: acetonitrilo, cloroformo, metanol, acetona, éter etílico, acetato de etilo y 1-butanol. Los 63 estándares utilizados para los estudios dirigidos por UPLC-ESI-TQ EM/EM, fueron adquiridos en distintas casas comerciales: Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Extrasynthèse (Genay, Francia), Phytolab (Vestenbergsgreuth, Alemania).

#### **4.2.2. Extracción de los compuestos de tipo fenólico**

Éste trabajo se realizó con el mismo material vegetal utilizado en el capítulo 2. Su caracterización fisicoquímica se reportó en el numeral 2.3.1.

Frutos completos de guayaba agria (2416,0 g) se cortaron en trozos y se liofilizaron para obtener 544,5 g de fruta seca. Se tomaron 387,9 g de la fruta liofilizada para la extracción exhaustiva con 3 volúmenes de 500 mL de acetona:agua (7:3), por triplicado. Los extractos se reunieron y se eliminó el disolvente orgánico en rotavapor hasta un volumen de un litro para luego realizar particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo, y butanol, quedando como residual la fracción acuosa, de acuerdo con el procedimiento reportado

por Isaza *et al* en 2004.<sup>127</sup> Para cada una de las extracciones se usaron 300 mL de cada disolvente por triplicado. El disolvente de todas las fracciones se eliminó por destilación a presión reducida en rotavapor y posterior liofilización, obteniendo 6,9 g de la fracción de éter etílico, 5,9 g de F.AcOEt, 29,1 g de F.BuOH, y 200,8 g de la fracción acuosa. Cada una de estas fracciones se analizó mediante HPLC-MS, y se le determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteous y la actividad antioxidante por el método ABTS.

Los análisis de las fracciones mediante la técnica HPLC-MS, se realizaron en un cromatografo líquido LC-10AD SHIMADZU acoplado a espectrómetro de masas LCMS-2010 EV SHIMADZU. La inyección de las muestras se realizó en un inyector rheodyne con *loop* de 5  $\mu$ L. Se utilizó una columna C<sub>18</sub> Shimadzu 5 $\mu$ m 110A con dimensiones de 50 x 4,6 mm. Como fase móvil se utilizaron ACN/ácido fórmico 0,1% y ácido fórmico/H<sub>2</sub>O 0,1%. Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal, el cual inició con ACN al 5% hasta llegar al 60% en 27 minutos, el flujo se fijó en 0,4 mL/min. Los compuestos eluidos se monitorearon a las longitudes de onda  $\lambda$  280 y 370 nm. El espectrómetro de masas operó en modo de ionización por electrospray (ESI) a 1,5 kV (modos positivo y negativo, simultáneo), CDL a 300 °C, bloque a 240 °C, flujo de gas (N<sub>2</sub>) a 1.5 L/min, voltaje CDL a 150.0 kV, voltaje Q array RF 150 V, voltaje del detector 1.5 kV, y se detectaron los iones positivos y negativos con masas entre 50 y 1000 u.

#### **4.2.3. Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteous**

Los fenoles totales se determinaron mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteous usando el ácido gálico (Merck, Damstadt, Alemania) como material de referencia.<sup>128</sup> Para ello se preparó una disolución patrón de ácido gálico 15,6 mg en 25 mL de metanol. También, se preparó una disolución del reactivo de Folin Ciocalteous (Merck, Damstadt, Alemania), por medio de una dilución 1:10 del reactivo comercial en agua destilada; el reactivo se protegió de la luz y se colocó en refrigeración hasta su uso.

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, en viales protegidos de la luz, se hicieron las diluciones necesarias con agua destilada para la preparación de la curva de calibración (0.073, 0.15, 0.22, 0.29 y 0.37 mM). Así mismo, se prepararon disoluciones (en agua, o mezclas MeOH:agua) de cada una de las fracciones de concentración conocida, ajustando al rango de absorbancia medido en la curva de calibración. Para cada medida, en una celda de 1 mL, se colocaron 100  $\mu$ L de muestra o estándar, 0,5 mL de la disolución Folin y después de 4 minutos se detuvo la reacción por la adición de 400  $\mu$ L de disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10%. Luego, se dejaron las muestras en reposo por 2 horas a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Por último se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway 7305 (Burlington, USA) a  $\lambda$  760 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado, y el contenido de fenoles totales se expresó en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/ 100 g de fruta.

#### 4.2.4. Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

Éste método se basa en la habilidad de los compuestos para capturar el catión radical ABTS<sup>•+</sup>. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el método desarrollado por Re, *et al.*<sup>129</sup> El catión radical ABTS<sup>•+</sup> se produjo por la reacción entre el ABTS (7mM) en agua y persulfato de potasio (2,45 mM) en 10 mL de agua destilada, manteniendo la disolución en la oscuridad a temperatura ambiente por 12 horas (disolución stock). Luego esta disolución se diluyó en metanol para obtener la disolución de trabajo (0,18 mM), agitando vigorosamente durante 10 minutos, teniendo la precaución que la absorbancia fuera de  $0,7 \pm 0,2$  a  $\lambda$  734 nm. Se prepararon disoluciones patrón de Trolox (Fluka, Chemie GmbH, Steinheim, Suiza) en etanol en concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 2 mM. Para la determinación de la actividad antioxidante, a 1 mL de la disolución de trabajo se le adicionaron 10  $\mu$ L de cada muestra y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway 7305 (Burlington, USA) a  $\lambda$  734 nm exactamente a los 6 minutos. Se interpolaron los datos en la curva y se expresaron como TEAC (*Trolox-equivalent*

*Antioxidante Capacity*). El valor TEAC se definió como mmoles de equivalentes de trolox por Kg de fruta fresca. Se usó ácido ascórbico (Merck, Damstadt, Alemania) como compuesto de referencia positiva. Los ensayos se realizaron por triplicado.

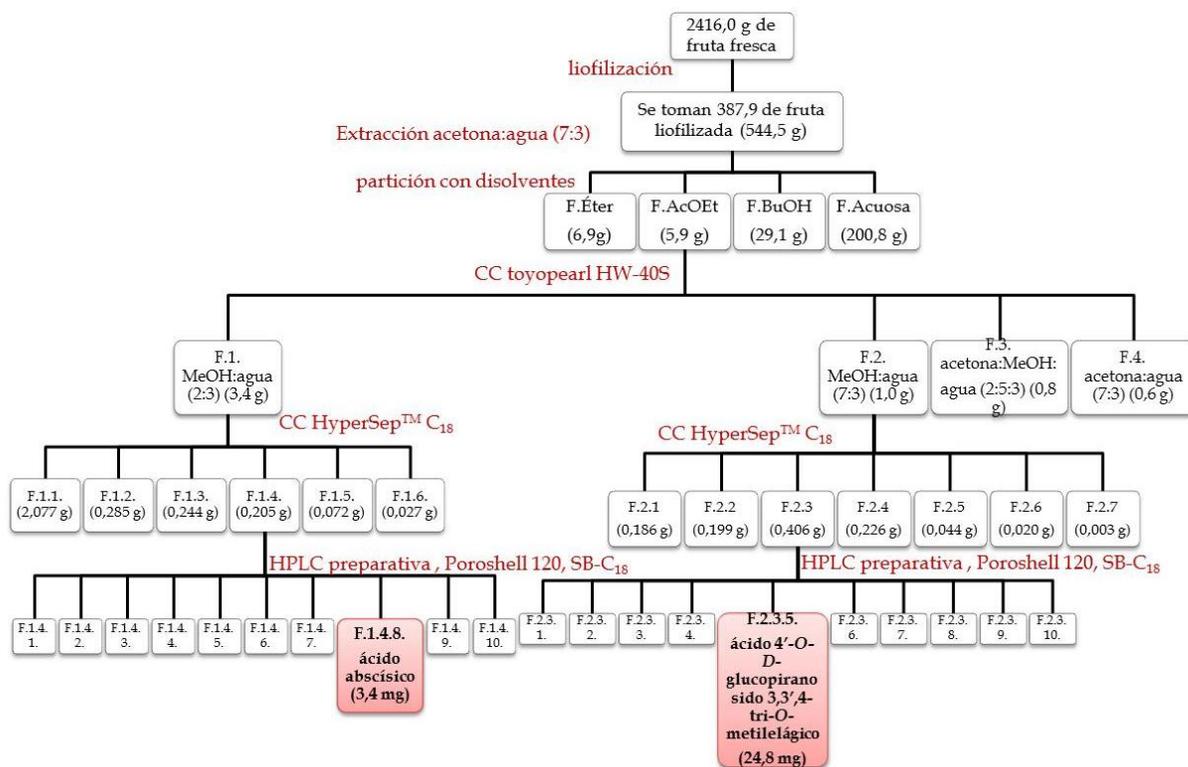
#### **4.2.5. Fraccionamiento del extracto enriquecido y purificación de compuestos fenólicos**

La fracción obtenida por partición con acetato de etilo (F.AcOEt), se fraccionó por cromatografía líquida de exclusión por tamaño, utilizando como fase estacionaria Toyopearl HW-40S (Tosoh, Filadelfia, USA, tamaño de partícula 30µm, tamaño de poro 50Å, límite de exclusión 10.000 Da, rango de pH 2-13), adoptando el procedimiento publicado por Isaza *et al* en 2004.<sup>127</sup> Para ello, la fracción de AcOEt (5,9 g) fue fraccionada por CC (11,5x3 cm, con una altura de fase de 3 cm), empleando un gradiente discontinuo de polaridad para obtener 4 fracciones (F1 a F4). Así, la fracción F1 se eluyó con MeOH:agua (2:3) (3410 mg), la fracción F2 con MeOH:agua (7:3) (1001 mg), la fracción F3 con acetona:MeOH:agua (2:5:3) (824 mg), y por último la fracción F4 con acetona:agua (7:3) (600 mg). Se usaron 100 mL de cada mezcla de disolventes para la elución de las fracciones, los cuales se eliminaron por destilación a presión reducida en rotavapor y posterior liofilización. Todas las fracciones se analizaron mediante HPLC-MS para observar su perfil cromatográfico y posible identidad de los compuestos presentes en cada fracción, y se determinó su actividad antioxidante con el ensayo ABTS. Con base en estos resultados, se escogieron las fracciones F1 (3,0 g) y F2 (1,0 g), que exhibían mayor actividad antioxidante, para ser separadas mediante CC al vacío sobre RP-18.

El fraccionamiento de F1 y F2 (Figura 33) se realizó mediante cromatografía en columna (CC) al vacío utilizando cartuchos HyperSep™ C<sub>18</sub> (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos, tamaño de partícula 40-60 µm, 1 g peso del lecho, volumen de columna de 6 mL). Se empleó un gradiente discontinuo de polaridad (agua, MeOH:agua (1:4), MeOH:agua (2:3), MeOH:agua (3:2), MeOH:agua (4:1), MeOH, acetona), obteniendo 6 y 7 fracciones respectivamente (F1.1 - F1.6 y F2.1.- F2.7.). Todas las

fracciones se analizaron mediante HPLC-MS y se determinó su actividad antioxidante por el ensayo ABTS.

La fracción F.2.3. (50 mg) se fraccionó por HPLC preparativa, en un equipo HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Se utilizó una columna Agilent, Poroshell 120, SB-C<sub>18</sub>, 2,7 μm de dimensiones 4,6 x 150 mm. Se empleó un inyector rheodyne con *loop* de 20 μL. Como fase móvil se utilizaron ACN/ácido fórmico 0,1% y ácido fórmico/H<sub>2</sub>O 0,1%. Las muestras fueron eluidas en modo isocrático con ACN al 25% en 25 minutos, el flujo se fijó en 0,5 mL/min, y los compuestos se monitorearon a λ 280 y 370 nm. Se obtuvieron 10 fracciones (F.2.3.1. - F.2.3.10.) en orden de menor a mayor tiempo de elución. En la fracción F.2.3.5. se recuperó el compuesto 5 (24,8 mg).



**Figura 33.** Diagrama de flujo del esquema de fraccionamiento utilizado, para la caracterización de compuestos fenólicos en *Psidium friedrichsthalianum* Nied.

La fracción F.1.4. (50 mg) también fue separada por HPLC preparativa, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, se obtuvieron 10 fracciones (F.1.4.1. a F.1.4.10.) en orden de menor a mayor tiempo de elución. En la fracción F.1.4.8. se obtuvo el compuesto **6** (3,4 mg). Los compuestos puros se analizaron por HPLC-MS y RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mono- y bidimensionales, para elucidar su estructura. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker DRX500 de 500 MHz y Bruker Avance 400 de 400 MHz, empleando como disolventes:  $\text{CD}_3\text{OD}$  con grado de deuteración 99,8% y  $\text{DMSO-d}_6$  con grado de deuteración 99,9%. Los resultados fueron procesados y analizados con el software MestReNova 8.1.

#### **4.2.6. Análisis metabolómico por UHPLC Q/TOF MS de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos**

Se realizó un análisis metabolómico mediante UHPLC Q/TOF MS para caracterizar los compuestos presentes en las fracciones de AcOEt y BuOH (fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos), ya que al intentar separar los compuestos se evidenció un alto grado de complejidad. El análisis metabolómico se llevó a cabo en un UHPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q/TOF MS) Agilent 6540 equipado con una interfaz ortogonal ESI (Agilent Jet Stream, AJS). El instrumento se controló mediante el software Mass Hunter Workstation 4.0 (MH) de Agilent. Los parámetros del espectrómetro de masas que se utilizaron fueron los siguientes: tensión capilar, 4000 V; presión nebulizador, 40 psi; velocidad de flujo de gas de secado, 10 L/min; temperatura del gas, 350 °C; tensión skimmer, 45V; voltaje de fragmentador, 110V. Los espectros de masas TOF de masa exacta se registraron en todo el rango de 50 a 1100  $m/z$  a 1,5 espectros/s en modo de ionización negativa. La calibración de masa interna del instrumento se llevó a cabo utilizando una fuente de AJS ESI con una calibración automatizada propio del sistema.

Se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra en un inyector rheodyne con *loop* de 5  $\mu\text{L}$ . Se utilizó una columna Agilent ZORBAX  $\text{C}_8$  HD de rápida resolución (2,1 x 100 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ), la cual

se mantuvo a 40 °C y un flujo de 0,5 mL/min. La elución se realizó utilizando ácido fórmico 0,01% en agua (disolvente A) y ácido fórmico 0,01% en acetonitrilo (disolvente B), con el siguiente gradiente de elución: 0-30% de B entre 0-7 min, de 30-100% de B entre 7 - 11 min y 100% de B entre 11 a 14 min. Después del análisis, la columna se deja equilibrar durante 7 min usando la composición de disolvente inicial. Cada muestra se analizó por duplicado.

Todos los datos UHPLC-MS fueron extraídos y convertidos al formato (mzXML) de intercambio de EM utilizando el programa Trapper de código abierto versión 4.3.0.<sup>130</sup> El procesamiento de los datos se realizó utilizando el software MZmine (versión 2.7.2) para obtener una lista de los picos con sus tiempos de retención y la masa exacta ( $m/z$ ).

La asignación de fórmulas moleculares de los compuestos se llevó a cabo, haciendo coincidir la masa exacta obtenida con la publicada en las bases de datos seleccionadas: KEGG, HMDB y Metlin, dentro de una ventana de exactitud de masa de 50 ppm. El algoritmo generador de fórmula molecular incluido en el software MassHunter (Agilent) se utilizó para apoyar la fórmula molecular generada por el software y el compuesto propuesto por búsqueda en base de datos de metabolitos en términos de error de masas (ppm).

#### **4.2.7. Análisis dirigidos por UPLC-ESI-TQ EM/EM a la determinación de compuestos de tipo fenólico**

Se realizó un estudio dirigido hacia la detección, identificación y cuantificación de compuestos de tipo fenólico mediante la técnica UPLC-ESI-TQ EM/EM, en donde se analizaron las fracciones de AcOEt y BuOH, que fueron las fracciones que presentan mayor contenido de compuestos de tipo fenólico. Para los análisis por UPLC-ESI-TQ EM/EM dirigidos a compuestos de tipo fenólico, se utilizó un equipo Waters Aquity UPLC (Waters, Milford, MA, EEUU), compuesto por una bomba binaria, una fuente de ionización por electronebulización (ESI) y un espectrómetro de masas de triple

cuadrupolo (TQ EM/EM) como detector. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna Waters UPLC BEH-C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.7 μm), operando a una temperatura de trabajo de 40 °C y un flujo de 0.5 mL/min. Como fase móvil se utilizó: A) ácido fórmico/agua (0.1%, v/v) y B) acetonitrilo/ácido fórmico (0.1%, v/v). El gradiente de elución utilizado fue: 0 min, 0.1%B; 1.5 min, 0.1%B; 11.17 min, 16.3%B; 11.5 min, 18.4%B; 14.1 min, 99.9%B; 15.6 min, 0.1%B. En un tiempo total de 18 minutos.

Los parámetros de inyección fueron: volumen de inyección, 2 μL; y temperatura de conservación de las muestras, 10 °C. Los parámetros de detección utilizados para el EM fueron: voltaje del capilar, 3kV; temperatura de la fuente, 130 °C; temperatura de desolvatación, 400 °C; flujo de gas de desolvatación (N<sub>2</sub>), 750 L/h; flujo de gas de cono (N<sub>2</sub>), 60 L/h; fuente de ionización, en modo negativo (ESI<sup>-</sup>). La detección se realizó en modo de reacción múltiple (MRM), y los parámetros de MRM se ajustaron utilizando 63 estándares en su mayoría de tipo fenólico o productos de degradación de los mismos. Las transiciones MRM usadas para la detección de los compuestos se encuentran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Transiciones MRM para la detección de compuestos de tipo fenólico.<sup>131</sup>

compuesto <sup>a</sup>	Fórmula molecular <sup>b</sup>	Peso molecular (u) <sup>c</sup>	Transición MRM <sup>d</sup>
Ácido 3,4-dihidroxi-mandélico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	184,04	183 > 137
Floroglucinol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126,11	125 > 83
Ácido 4-hidroxi-mandélico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168,15	167 > 123
Pirogalol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126,11	125 > 79
Ácido gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170,12	169 > 125
Ácido 3-hidroxi-mandélico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168,15	167 > 121
Ácido Protocatéquico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154,12	153 > 109
γ-valerolactona	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	100,12	101 > 55
Ácido 3-hidroxi-4-metoxi-mandélico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198,17	197 > 137
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-mandélico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198,17	197 > 137
Ácido 4-hidroxihipurico	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	195,17	194 > 100
Catecol/pirocatecol	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	110,10	109 > 81
Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168,15	167 > 123
Ácido 3-O-metilgálico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	184,15	183 > 168

*(Psidium friedrichsthalianum* Nied.) con actividad antioxidante

Ácido 4-hidroxibenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138,12	137 > 93
Ácido 4-O-metilgálico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	184,15	183 > 168
Ácido mandélico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	151 > 107
Tirosol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138,16	137 > 106
Procianidina B1	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	578,52	577>289
Ácido 4-hidroxifenilacético	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	151 > 107
(+)-Catequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,26	289 > 245
Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	182,17	181 > 137
Ácido hipúrico	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	179,17	178 > 134
Ácido ftálico	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	166,14	165 > 121
Ácido vainillínico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168,14	167 > 152
Ácido caféico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180,16	179 > 135
Ácido 3-hidroxibenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138,12	137 > 93
Ácido 3-hidroxifenilacético	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	151 > 107
Procianidina B2	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	578,52	577>289
Ácido siríngico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198,17	197 > 182
Ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	182,17	181 > 137
(-)-Epicatequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,27	289 > 245
4-metilcatecol	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	124,13	123 > 108
Ácido 3-(4-hidroxifenilpropanoico)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166,17	165 > 121
Ácido <i>p</i> -cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164,05	163 > 119
Ácido 3-(3-hidroxifenil propanoico)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166,17	165 > 121
Ácido ferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194,18	193 > 134
Ácido <i>m</i> -cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164,05	163 > 119
Ácido 3,4-dimetoxibenzoico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	182,17	181 > 107
Ácido isoferúlico	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194,18	193 > 134
Ácido benzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122,12	121 > 77
Ácido 3,4-dimetoxifenilacético	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	196,20	195 > 136
Ácido fenilacético	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	136,15	135 > 91
Ácido salicílico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138,12	137 > 93
5-(3',4')-dihidroxifenil- $\gamma$ -valerolactona	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	208,21	207 > 163
Ácido 3,5-dihidroxibenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154,12	153 > 109
1-(3,5)-Dihidroxifenil-2-propanol	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	168,19	291 > 247
Ácido hidroxifenil-4-hidroxisalicílico	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	210,09	209 > 147
Hidroxifenilvalerolactona	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	192,21	191 > 147
Ácido trimetoxibenzoico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	212,20	211 > 167
Ácido metil-4-fenilvalerico	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	192,12	193 > 175
Resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228,25	227 > 185
Procianidina A2	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	576,51	575 > 449

Ácido 4-metoxifenilacético	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166,17	165 > 106
Ácido 4-metoxibenzoico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	151 > 107
4-etilcatecol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138,16	137 > 122
Ácido 3-metoxibenzoico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	151 > 107
Ácido 3-(3,4-dimetoxifenil propanoico)	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	210,23	209 > 150
Ácido fenilpropanoico	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	150,17	149 > 105
Ácido trimetoxicinámico	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	238,24	237 > 103
Ácido cinámico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	148,16	147 > 103
Ácido elágico	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	302,20	301 > 145

- <sup>a</sup> Estándares utilizados para ajustar las transiciones MRM y realizar el análisis UPLC-ESI-TQ EM/EM tándem
- <sup>b</sup> Fórmula molecular
- <sup>c</sup> Peso molecular en unidades de masa
- <sup>d</sup> Iones seguidos para la transición MRM

Para la cuantificación, los datos se recogieron en el modo de reacción múltiple (MRM), siguiendo la transición de los iones padre y producto específicos para cada compuesto, y usando curvas de calibración externas a concentraciones de µg/mL. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software Masslynx (Waters, Milford, MA, EEUU).<sup>102</sup> Todas las inyecciones se realizaron por duplicado.

#### 4.2.8. Análisis estadístico

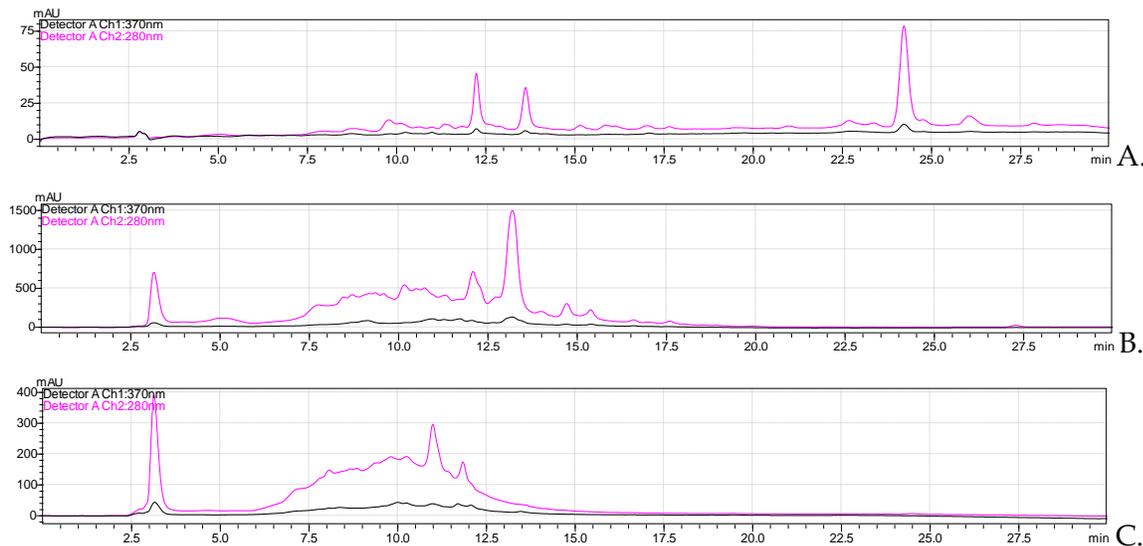
Los resultados obtenidos en la cuantificación de los compuestos fenólicos, la determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteous y la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS, fueron sometidos a análisis de varianza y test de Tukey ( $p < 0.05$ ) para determinar diferencias significativas, se calcularon promedios y desviación estándar teniendo en cuenta la norma ISO 3534-1.<sup>113</sup>

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para la caracterización de los compuestos fenólicos con actividad antioxidante *in vitro* presentes en el extracto no volátil de los frutos de guayaba agria.

Todo el proceso de fraccionamiento del extracto polar de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) se hizo de manera dirigida mediante la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteous y por los resultados del ensayo de actividad antioxidante de ABTS. Durante los ensayos preliminares se compararon diversas técnicas de extracción y separación: extracción con MeOH, extracción con EtOH, fraccionamiento por RP-18, fraccionamiento por Amberlita XAD-4 y fraccionamiento por Toyopearl HW-40S, y se encontró que los porcentajes de recuperación en los fraccionamientos eran muy bajos, además no se obtenían buenas separaciones de compuestos por polaridad que facilitara la obtención de compuestos puros. Por tal motivo, se adaptó la técnica publicada por Isaza *et al*,<sup>127</sup> en la cual se lograba enriquecer al menos una de las fracciones en compuestos de tipo fenólico, además presentaba un proceso de purificación para las subfracciones que permitía obtener un buen porcentaje de recuperación, al realizar este fraccionamiento inicial solo en medio líquido.

Por lo tanto, se realizaron particiones líquido-líquido usando disolventes en orden creciente de polaridad. De éste procedimiento se obtuvieron 4 fracciones gruesas, en su orden de polaridad éter etílico (6,9 g), acetato de etilo (5,9 g), *n*-butanol (29,1 g) y agua (200,8 g). En masa la fracción mayoritaria fue la fracción acuosa que corresponde al 82,7% del extracto en peso seco o al 11,7% en peso de frutos completos frescos. Para corroborar la separación de los compuestos en cada fracción, cada una de ellas se analizó mediante HPLC-MS, encontrando similitudes entre las fracciones de F.AcOEt y F.BuOH, como se observa en la Figura 34. Los perfiles de las fracciones de acetato de etilo y butanol sugieren la presencia de estructuras poliméricas.



**Figura 34.** Análisis por HPLC-MS de las fracciones de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. usando columna  $C_{18}$  Shimadzu. A. Fracción de éter etílico, B. F.AcOEt, C. F.BuOH

A su vez, con el fin de determinar cuál de las fracciones tiene la mayor cantidad de compuestos de tipo fenólico, se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteous. Después de realizar la curva de calibración con el estándar de ácido gálico ( $y = 0,0933x + 0,0319$ ;  $R^2=0,9904$ ), se determinó la cantidad de fenoles totales expresada como mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g fruta: F.acuosa ( $92,32 \pm 0,02$ ), F.BuOH ( $71,95 \pm 0,05$ ), F.AcOEt ( $138,08 \pm 0,07$ ) y F.éter ( $25,94 \pm 0,05$ ). Con estos resultados se evidenció que la fracción con mayor contenido de compuestos de tipo fenólico era la fracción F.AcOEt, la cual también fue la más activa en el ensayo ABTS (Tabla 8).

Al comparar los valores obtenidos en el ensayo de Folin para las fracciones gruesas de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.), con relación a los valores obtenidos para la cuantificación de fenoles totales realizado por la misma técnica en otras frutas, se tiene que el contenido de fenoles totales de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) es similar a extractos de la guayaba roja (fruta completa) cuyo contenido de fenoles varía de 130,4 a 322,56 mg GAE/100 g fruta.<sup>132</sup> Si se compara con otras frutas como las fresas ( $330 \pm 4$  mg GAE/100 g FW), frambuesas ( $228 \pm 6$  mg GAE/100 g FW), manzanas ( $48 \pm 1$  mg GAE/100 g FW), y tomates ( $30 \pm 1$  mg GAE/100 g FW),<sup>133</sup> se puede decir que

la guayaba agria tiene un contenido de compuestos fenólicos bastante alto para ser estudiado. Así mismo, frutas como los arándanos (315 mg GAE/100 g FW), la cereza “sweet bing” (80 mg GAE /100 g FW), la uva negra (372 mg GAE /100 g FW), el durazno blanco con cáscara (98 mg GAE /100 g FW) y el durazno blanco sin cáscara (46 mg GAE /100 g FW) consideradas como “superfrutas”,<sup>134</sup> tienen contenidos de compuestos fenólicos comparables con los encontrados para la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.).

**Tabla 8.** Cantidad aislada, cantidad de fenoles totales y actividad antioxidante frente a los radicales ABTS de las fracciones de *P. friedrichsthalianum* Nied.

muestra	Cantidad aislada (g)	Cantidad de fenoles totales (mg GAE/100 g fruta ± SD)	Actividad antioxidante (mM ET/Kg fruta ± SD)
F. éter etílico	6,9	25,94 ± 0,05	0,16 ± 0,09
F. AcOEt	5,9	138,08 ± 0,07	0,85 ± 0,05
F. BuOH	29,1	71,95 ± 0,05	0,14 ± 0,01
F. acuosa	200,8	92,32 ± 0,02	0,02 ± 0,00
F. AcOEt 1	3,409	-	2,08 ± 0,11
F. AcOEt 2	1,001	-	10,99 ± 1,09
F. AcOEt 3	0,824	-	0,66 ± 0,01
F. AcOEt 4	0,600	-	0,40 ± 0,21
F.1.1.	2,077	-	2,76 ± 0,46
F.1.2.	0,285	-	2,70 ± 0,07
F.1.3.	0,244	-	2,15 ± 0,33
F.1.4.	0,205	-	1,31 ± 0,10
F.1.5.	0,072	-	2,37 ± 0,66
F.1.6.	0,027	-	2,48 ± 0,00
F.2.1.	0,186	-	3,19 ± 0,13
F.2.2.	0,199	-	0,22 ± 0,01
F.2.3.	0,406	-	4,76 ± 0,22
F.2.4.	0,226	-	3,09 ± 0,15
F.2.5.	0,044	-	3,14 ± 0,04
F.2.6.	0,020	-	2,76 ± 0,35
F.2.7.	0,003	-	2,84 ± 0,46

- No determinado

La actividad antioxidante de las fracciones y subfracciones enriquecidas con compuestos fenólicos se midió frente al radical libre ABTS. La medida de la actividad antioxidante durante el proceso de fraccionamiento, permite confirmar la contribución relativa de los

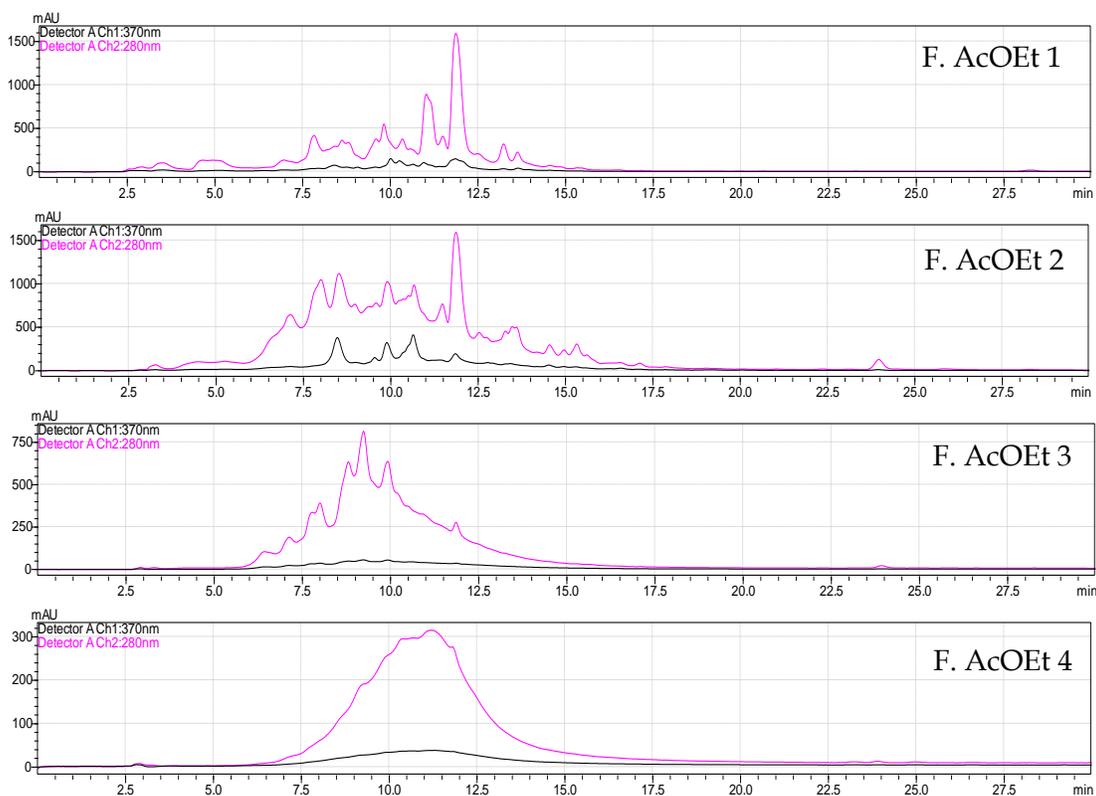
diferentes compuestos presentes en cada una de las subfracciones aisladas a dicha actividad, como se observa en la Tabla 8.

De los resultados obtenidos en el ensayo, se puede deducir que la fracción con mayor actividad antioxidante fue la fracción de acetato de etilo ( $0,85 \pm 0,05$  mM ET/Kg fruta fresca). Esta fracción también resultó activa en los ensayos antioxidantes (ABTS y DPPH) realizados en el estudio de Flores y colaboradores,<sup>11</sup> a pesar de que los protocolos de extracción y fraccionamiento fueron diferentes.

Teniendo en cuenta la actividad antioxidante de la fracción F.AcOEt, se realizó su fraccionamiento sobre Toyopearl HW-40C, obteniendo 4 subfracciones. La fracción F.2. fue la que presentó mayor actividad ( $10,99 \pm 1,09$  mM ET/Kg fruta fresca). Al evaluar, las subfracciones obtenidas mediante la separación por RP-18 de las fracciones F.1 y F.2., se encontró que la fracción F.2.3 ( $4,76 \pm 0,22$  mM ET/Kg fruta fresca) era la más activa. En el caso de las subfracciones de F.1., no se observaron diferencias entre los valores de actividad encontrada, pero se destacan F.1.1. y F.1.2. ( $2,76 \pm 0,46$  y  $2,70 \pm 0,07$  mM ET/Kg fruta fresca, respectivamente). También se evidenció al fraccionar F.AcOEt mediante la separación por Toyopearl HW-40C aumenta significativamente la capacidad antioxidante, aunque al realizar pasos posteriores de purificación disminuye el valor con respecto a esta fracción (F.2.). Esta disminución en la actividad antioxidante, sugiere que hay efectos sinérgicos entre los compuestos.

El análisis por HPLC-MS puso en evidencia la verdadera complejidad de la fracción F.AcOEt, ya que se esperaba obtener perfiles cromatográficos bien definidos con picos resueltos, pero en su lugar se obtuvo compuestos agrupados por zonas, pero aún sin resolver. Las fracciones F.1. y F.2., contenían compuestos fenólicos de bajo a mediano peso molecular ( $\sim 100$  a  $\sim 500$  u.), mientras que F.3. y F.4. sugieren la presencia de estructuras poliméricas ( $\sim 600$  a  $>900$  u.) (Figura 35).

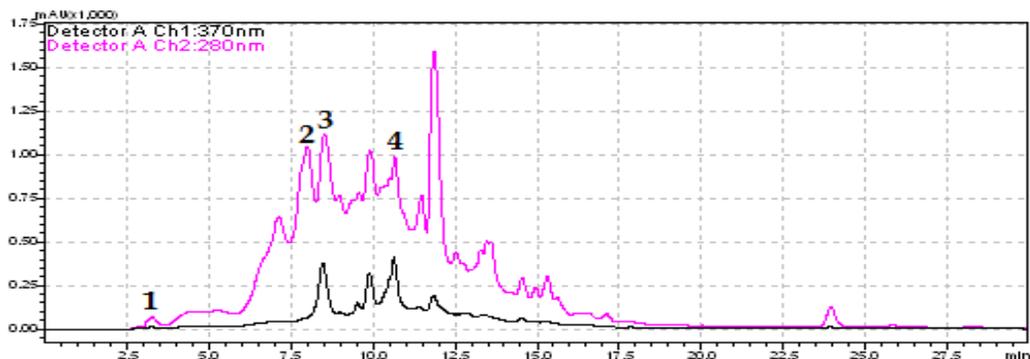
(*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) con actividad antioxidante



**Figura 35.** Perfiles cromatográficos (HPLC-MS, columna  $C_{18}$  Shimadzu) obtenidos para las subfracciones provenientes del fraccionamiento de F.AcOEt sobre Toyopearl HW-40S (F.1. - F.4.)

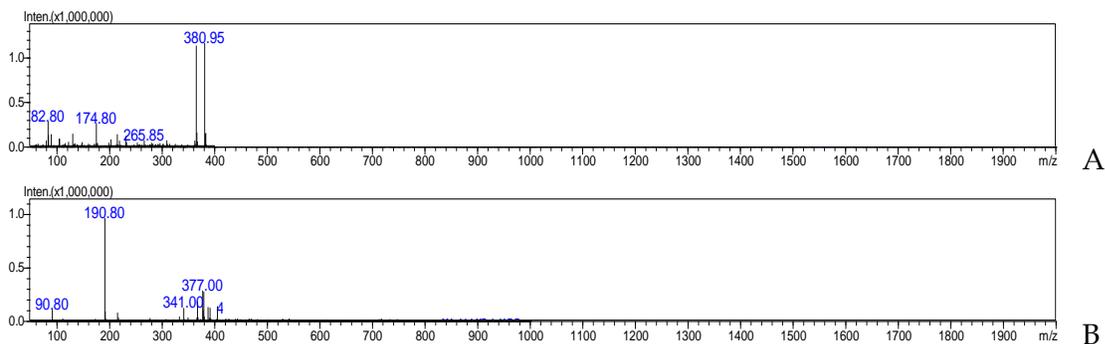
#### 4.3.1. Identificación de los compuestos fenólicos por espectrometría de masas y/o RMN

Con el fin de identificar los compuestos presentes en la fracción F.AcOEt, ésta se sometió a separaciones sucesivas mediante diferentes técnicas cromatográficas, como se mencionó anteriormente (ver metodología 4.2.5.). Teniendo en cuenta las características de F.2. (actividad y posible composición), se analizaron los resultados obtenidos por HPLC-ESI/MS, encontrando cuatro compuestos identificables por su espectro de masas.



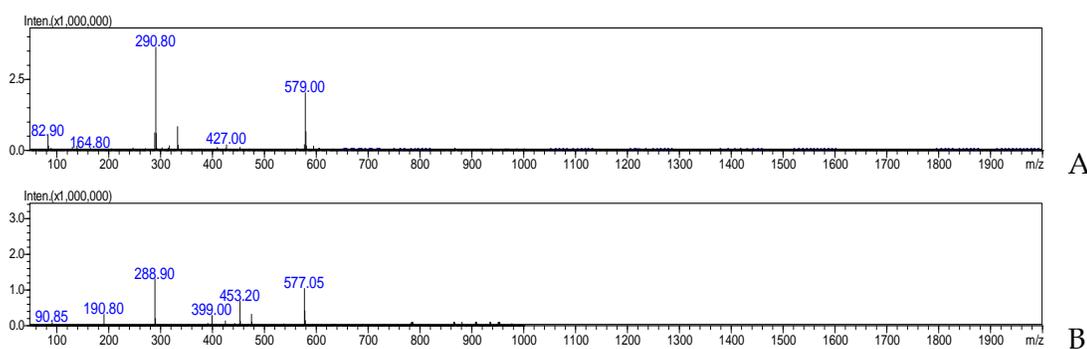
**Figura 36.** Perfil cromatográfico (HPLC-MS, columna  $C_{18}$  Shimadzu) de la fracción F. AcOEt2. 1) tokinolido B\*, 2) procianidina B1\*, 3) procianidina B2\*, 4) ácido elágico, (\*identificados tentativamente)

**Compuesto 1:** En el análisis por HPLC-ESI/MS se encontró un compuesto correspondiente a un tiempo de retención de 2,8 minutos, el cual exhibió un ión pseudomolecular  $[M+H]^+$  en modo positivo a  $m/z$  381, así mismo se observó un ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  en modo negativo a  $m/z$  379, sugiriendo un peso molecular de 380 u. (Figura 37). Estos mismos iones fueron reportados por Wang *et al.*,<sup>135</sup> para el tokinolido B identificado como uno de los constituyentes de las plantas *Rhizoma Chuanxiong* y *Radix Angelicae Sinensis*, la cuales hacen parte de la composición de las tabletas de Jitai usadas en la medicina tradicional China. Así, el compuesto 1 se identificó tentativamente como el tokinolido B.



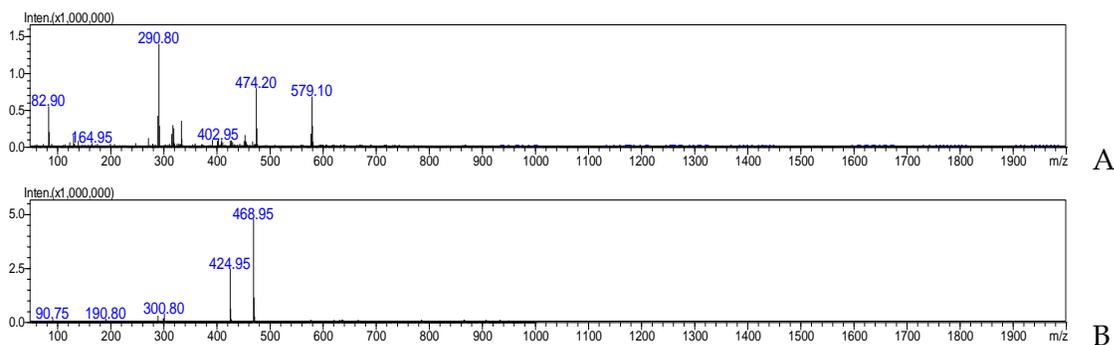
**Figura 37.** Espectros de masas en modo positivo (A) y negativo (B) para el compuesto 1 (tokinolido B)

**Compuesto 2:** En el análisis por HPLC-ESI/MS se encontró un compuesto correspondiente a un tiempo de retención de 8,0 minutos, el cual exhibió un ión pseudomolecular  $[M+H]^+$  en modo positivo a  $m/z$  579, así mismo se observó un ión en modo pseudomolecular en modo negativo correspondiente a  $m/z$  577  $[M-H]^-$ , sugiriendo un peso molecular de 578 u. (Figura 38). También, se observaron iones en modo positivo correspondientes a  $m/z$  291, y en modo negativo a  $m/z$  289, los cuales corresponden a un monómero de catequina (peso molecular de 290 u.). Estos mismos iones y fragmentos fueron reportados por Li y colaboradores para las procianidinas B1 y B2.<sup>136</sup>



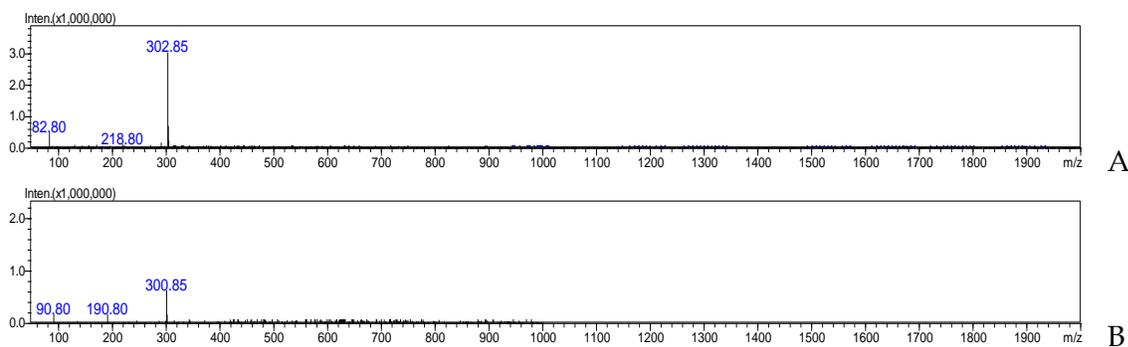
**Figura 38.** Espectros de masas en modo positivo (A) y negativo (B) para el compuesto 2 (procianidina B1)

**Compuesto 3:** En el análisis por HPLC-ESI/MS se encontró un compuesto correspondiente a un tiempo de retención de 8,7 minutos, el cual exhibió un ión pseudomolecular  $[M+H]^+$  en modo positivo a  $m/z$  579 (Figura 39). Así mismo, se observó un ión en modo positivo a  $m/z$  291, correspondiente a un monómero de catequina, según lo publicado por Li, *et al.*<sup>136</sup> Estos mismos iones se presentaron en el compuesto 2, en modo positivo, por lo que éste compuesto puede ser una procianidina. Teniendo en cuenta la diferencia en los espectros de masas en modo negativo para ambos compuestos y su orden de elución, el compuesto 2 corresponde tentativamente a la procianidina B1 y el compuesto 3 a la procianidina B2.



**Figura 39.** Espectros de masas en modo positivo (A) y negativo (B) para el compuesto **3** (procianidina B2)

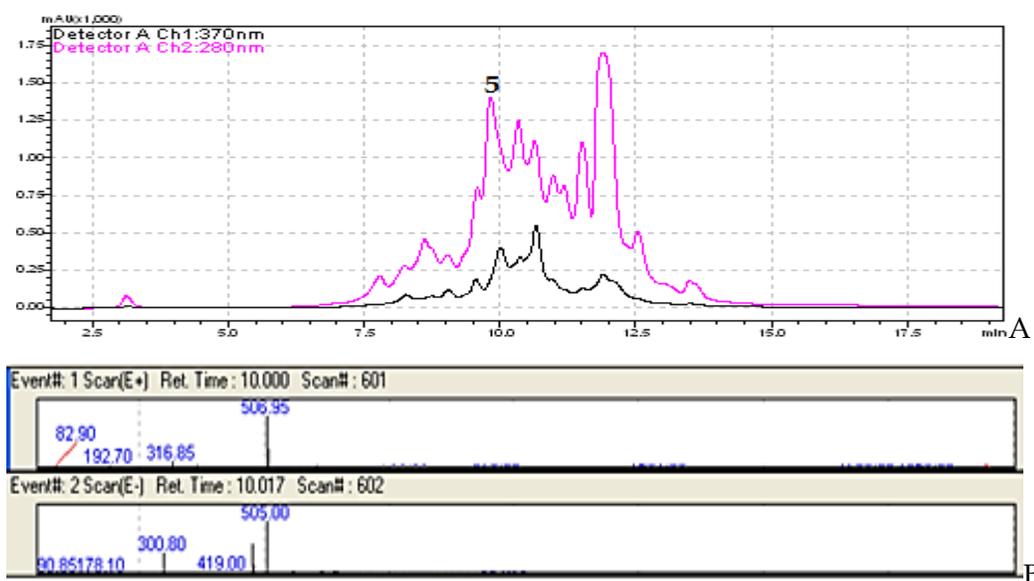
**Compuesto 4:** En el análisis por HPLC-ESI/MS se encontró un compuesto correspondiente a un tiempo de retención de 10,6 minutos, el cual exhibió un ión pseudomolecular  $[M+H]^+$  en modo positivo a  $m/z$  303, así mismo se observó un ión pseudomolecular en modo negativo a  $m/z$  301  $[M-H]^-$ , sugiriendo un peso molecular de 302 u (Figura 40). Estos espectros de masas y la elución del compuesto en tiempo de retención igual al estándar ácido elágico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), el cual se inyectó a las mismas condiciones utilizadas para los análisis, permitieron identificar el compuesto **4** como el ácido elágico.



**Figura 40.** Espectros de masas en modo positivo (A) y negativo (B) para el compuesto **4** (ácido elágico)

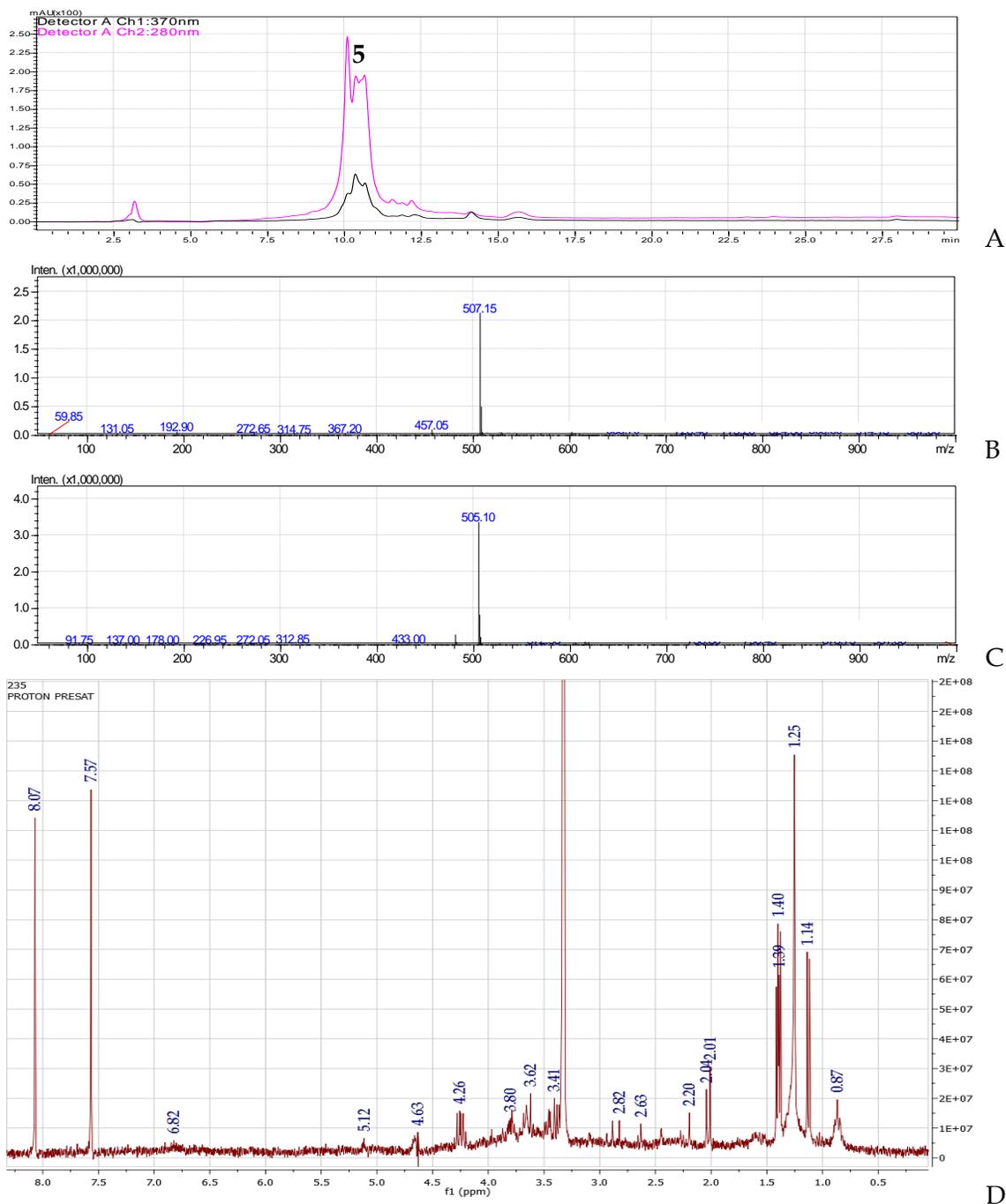
Teniendo en cuenta estos análisis, se decidió realizar la purificación de esta fracción (F. AcOEt<sub>2</sub>) mediante CC al vacío sobre RP-18, obteniendo 7 fracciones (F2.1. - F2.7.), siendo la fracción F.2.3 la de mayor actividad antioxidante. Todas las fracciones obtenidas por RP-18 se evaluaron por HPLC-MS, y en el perfil de la fracción F.2.3. se encontró una señal

en 10 minutos (compuesto 5), la cual tiene un ión pseudomolecular en modo positivo a  $m/z$  507  $[M+H]^+$ , así mismo se observó un ión en modo pseudomolecular en modo negativo a  $m/z$  505  $[M-H]^-$ , sugiriendo un peso molecular de 506 u. (Figura 41). También se observó un ión en modo negativo a  $m/z$  301, correspondiente al ácido elágico, estos iones corresponden a los asignados por Flores *et al*<sup>11</sup> para el compuesto ácido 4'-*O-D*-glucopiranosido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico el cual había sido identificado tentativamente en frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied.



**Figura 41.** A) Cromatograma (HPLC-MS, columna  $C_{18}$  Shimadzu) correspondiente a la fracción F.2.3, el compuesto 5 corresponde al ácido 4'-*O-D*-glucopiranosido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico. B) Espectros de masas en modo positivo (evento 1) y negativo (evento 2) para el compuesto 5

Con el fin de corroborar la identidad de éste compuesto y de intentar aislar otros la fracción F.2.3 se separó mediante HPLC preparativa, obteniendo 10 fracciones (F.2.3.1. a F.2.3.10.). de la fracción F.2.3.5 se recuperó un compuesto que corresponde a un aceite de color amarillo (masa: 24,8 mg), este presenta una señal cromatográfica en 10 minutos, la cual tiene un ión pseudomolecular en modo positivo a  $m/z$  507  $[M+H]^+$ , así mismo se observó un ión en modo pseudomolecular en modo negativo a  $m/z$  505  $[M-H]^-$ , y que corresponde con el compuesto 5 (Figura 42).



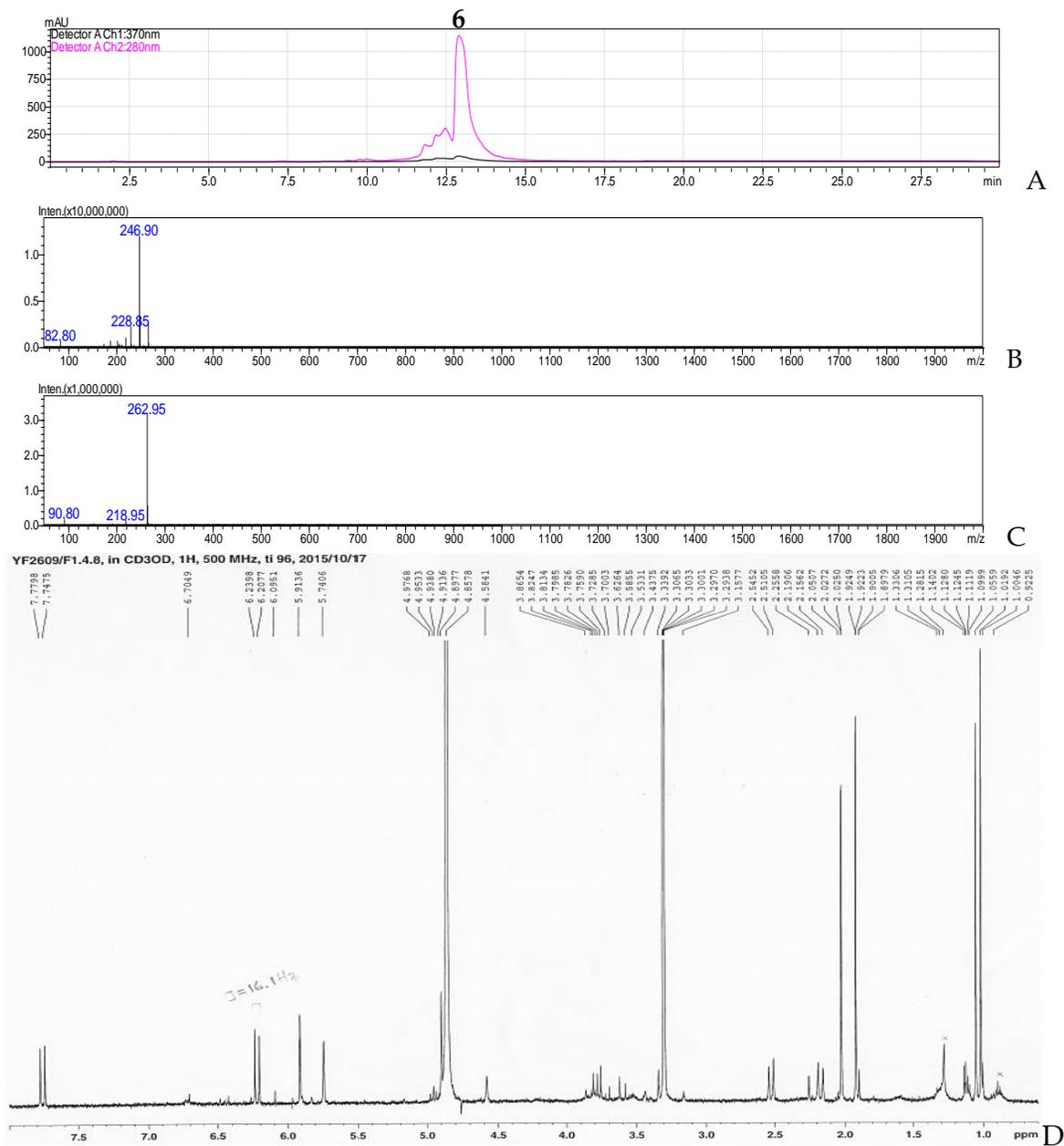
**Figura 42.** A) cromatograma correspondiente al compuesto 5 purificado, B) Espectro de masas en modo positivo, C) Espectro de masas en modo negativo, D) Espectro de RMN <sup>1</sup>H en DMSO deuterado (400 MHz)

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 42D), presentó señales que integraron para 22 protones, en las que se evidenciaron señales de protones sp<sup>2</sup>  $\delta$ = 4,63 (1H, s, H-2''), para el protón del

grupo hidroxilo que está sobre la unidad de azúcar en la posición  $\alpha$  al protón anomérico,  $\delta= 5,12$  (1H, s, H-1'') para el protón anomérico; así mismo se observó una señal de protones  $sp^3$  de tipo metilo  $\delta= 3,40$  (9H, s, H-8, H-8' y H-9) correspondiente a los grupos metoxilo sobre el anillo aromático del núcleo del ácido elágico en las posiciones 3, 3' y 4. Una serie de multipletes de 3,42 - 4,26 (9H, m, H-3'' a H-6'') correspondientes a los protones de la unidad de glucosa y a los protones de los grupos hidroxilo, y señales para protones  $sp$  de tipo aromático en  $\delta= 7,57$  (1H, s, H-5') y 8,07 (1H, s, H-5). Dichos desplazamientos corroboran la identidad del compuesto **5** (ácido 4'-O-D-glucopiranosido 3,3',4-tri-O-metilelágico), del cual no se había reportado su espectro de RMN  $^1H$ , hasta el momento.

La fracción F.1. también fue separada (ver numeral 4.2.5.), hasta obtener la fracción F.1.4.8. (compuesto 6, masa: 3,4 mg) que corresponde a un aceite de color amarillo, el cual fue sometido a análisis espectrométrico y espectroscópico para su identificación. En el espectro de masas obtenido por HPLC-MS, se observó un ión pseudomolecular en modo positivo a  $m/z$  247  $[M+H-H_2O]^+$ , así mismo se observó un ión pseudomolecular en modo negativo a  $m/z$  263  $[M-H]^-$ ; sugiriendo un peso molecular de 264 u. (Figura 43).

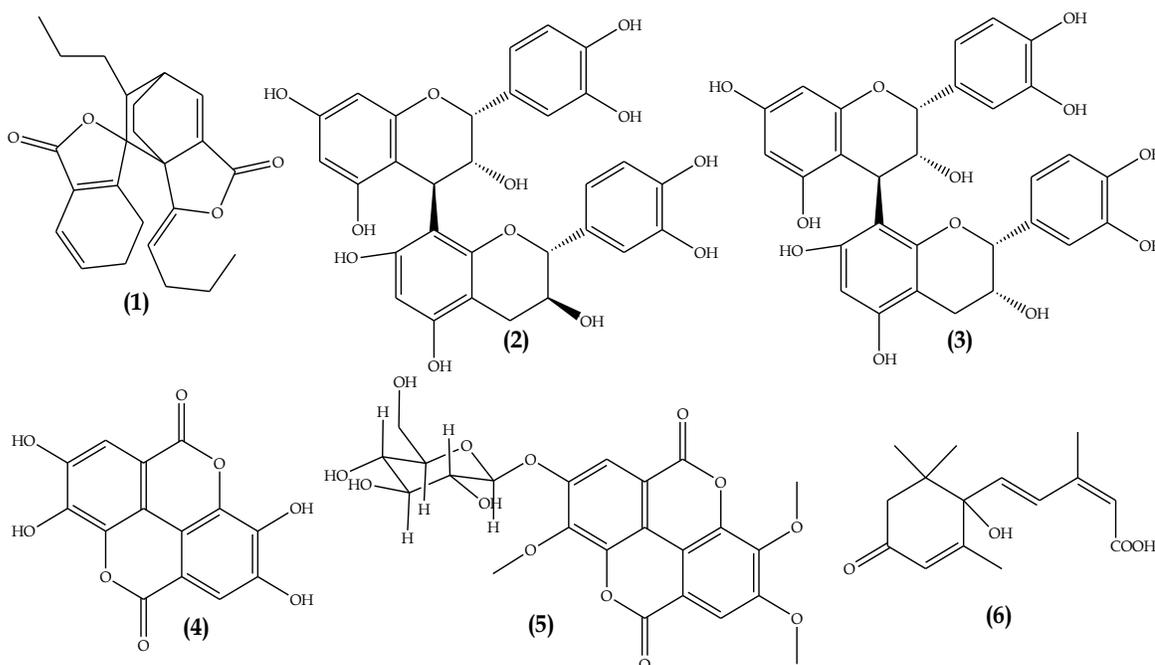
El espectro de RMN  $^1H$  (Figura 43D), presentó señales que integraron para 18 protones, en las que se evidenciaron señales de protones  $sp^2$   $\delta= 5,74$  (1H, br.s, H-2), 5,91 (1H, br.s, H-3'), 6,22 (1H, d,  $J=16,1$  Hz, H-5), 7,76 (1H, d,  $J=16,1$  Hz, H-4), así mismo se observaron señales para protones  $sp^3$  de tipo metileno  $\delta= 2,17$  (1H, d,  $J=17,2$  Hz, H-5'), 2,53 (1H, d,  $J=17,2$  Hz, H-5') y para protones  $sp^3$  de tipo metilo  $\delta= 1,02$  (3H, s, H-9'), 1,10 (3H, s, H-8'), 1,92 (3H, s, H-7'), 2,03 (3H, s, H-6).



**Figura 43.** A) Cromatograma obtenido para el compuesto 6 purificado (ácido abscísico), B) Espectro de masas en modo positivo, C) Espectro de masas en modo negativo, D) Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

A partir de los datos presentados anteriormente y la búsqueda en la literatura,<sup>137</sup> se identificó el compuesto 6 como el ácido abscísico (Figura 44). Éste compuesto es la primera vez que se aísla y se reporta como un componente de los frutos de la guayaba

agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.), pero recientemente se encontró en los frutos de la guayaba común (*Psidium guajava*) como parte de la composición antioxidante.<sup>82</sup>



**Figura 44.** Estructuras correspondientes a los compuestos identificados en el fraccionamiento direccionado a compuestos de tipo fenólico. (1) tokinolido B\*, (2) procianidina B1\*, (3) procianidina B2\*, (4) ácido elágico, (5) ácido 4'-O-D-glucopiranosido 3,3',4-tri-O-metileláxico, y (6) ácido abscísico, (\*identificados tentativamente con base en su espectro de masas)

El ácido abscísico (ABA) es un compuesto que ha sido ampliamente estudiado tanto en frutas como en vegetales, ya que participa en la regulación de muchos procesos fisiológicos de las plantas, es considerado como un inhibidor de crecimiento de la planta y por lo tanto se utiliza como retardante de crecimiento en cultivo de tejidos vegetales (solo como fuente exógena), pero el ABA endógeno actúa como un factor de control de germinación y la latencia en los embriones somáticos. El ABA se requiere para el control "fino" del crecimiento y desarrollo en condiciones normales sin estrés. Es especialmente importante en procesos que suceden en la semilla, como son la dormición y la maduración del embrión. La dormición de la semilla permite retrasar su germinación hasta que las condiciones del medio circundante son las óptimas para la supervivencia de la siguiente generación. El contenido en ABA de las semillas es generalmente bajo

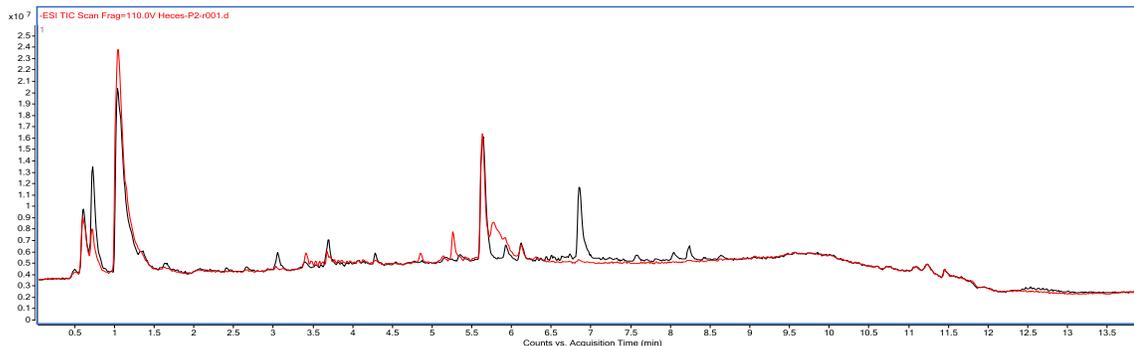
durante las etapas tempranas de la embriogénesis y alcanza máximos hacia la mitad del proceso para descender de nuevo posteriormente.<sup>138</sup>

El papel del ABA en los mecanismos de tolerancia a estrés abiótico de la planta ha sido extensamente estudiado debido a que limita de manera importante la productividad de cultivos de importancia agronómica. El estrés abiótico con mayor incidencia es el déficit hídrico, condición ambiental relativamente frecuente en algunas zonas del planeta. La sequía no es el único estrés abiótico que ocasiona un déficit hídrico para la planta, sino que otro tipo de estreses abióticos como la congelación o las altas temperaturas también conllevan en última instancia un déficit hídrico. El ABA ayuda a combatir el estrés hídrico por varios frentes. Cuando existe un estrés hídrico, los niveles de ABA en la planta se incrementan. El ABA es capaz de inducir el cierre de estomas para minimizar así las pérdidas de agua por transpiración. El cierre de estomas se lleva a cabo mediante cambios en el potencial de membrana y el flujo de iones.<sup>139</sup>

#### **4.3.2. Análisis metabolómico de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos**

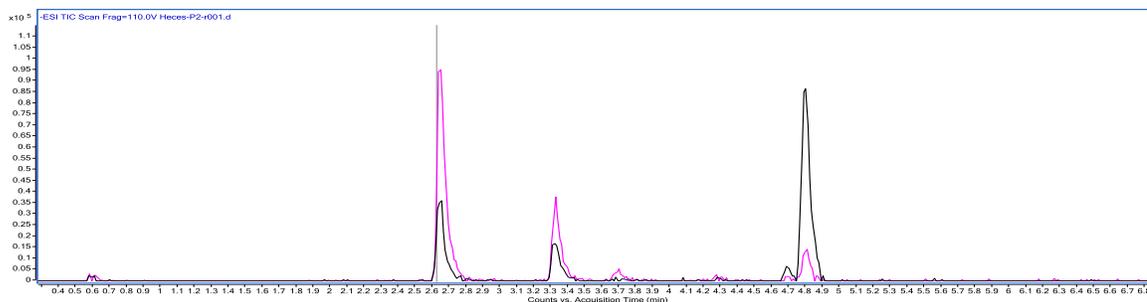
Se realizó un estudio metabolómico para las fracciones de AcOEt y BuOH con el fin de avanzar en la identificación de los compuestos fenólicos y a su vez establecer diferencias entre las dos fracciones las cuales se encuentran directamente relacionadas con su actividad y biodisponibilidad. Se escogieron las dos fracciones ya que mostraron similitud en su perfil cromatográfico, a pesar de sus diferencias en el contenido de fenoles y su diferencia en actividad antioxidante. Para ello, las muestras se analizaron mediante UHPLC-ESI-TOF MS, obteniendo el perfil cromatográfico presentado en la Figura 45.

(*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) con actividad antioxidante



**Figura 45.** TICs obtenidos para las fracciones F.ACOEt (línea negra) y F.BuOH (línea roja), mediante el análisis UHPLC Q/TOF MS usando columna Agilent ZORBAX C<sub>8</sub> HD

Si bien es evidente que a simple vista no hay diferencias significativas en los perfiles de ambas fracciones, más allá de la concentración aparente de un par de picos, sobre la línea base los compuestos que estaban a más baja concentración, mostraron diferencias. Al hacer un barrido sobre todo el cromatograma se evidencian masas características que muestran la diferenciación de composición entre ambas fracciones, por tal motivo se sustrajeron aquellos iones que presentaron diferencias en cantidad en las fracciones F.ACOEt y F.BuOH. Por ejemplo, al sustraer el ion 305,0675  $m/z$  (Figura 46), se observaron 3 picos a diferente tiempo de retención, los cuales pueden corresponder a isómeros estructurales; de dicha sustracción, también se puede deducir que los 2 primeros picos son más abundantes en la fracción F.ACOEt y el tercer pico es más abundante en la fracción F.BuOH, como se muestra a continuación.



**Figura 46.** TIC correspondiente al ion 305,0675  $m/z$  abstraído del TIC completo (F.ACOEt línea rosa, F. BuOH línea negra), en el análisis UHPLC Q/TOF MS usando columna Agilent ZORBAX C<sub>8</sub> HD

Un ion de 305,0675  $m/z$ , según la búsqueda en la base de datos Metlin puede corresponder con una fórmula molecular  $C_{15}H_8O_6$ , teniendo en cuenta el cálculo  $[M+H-Na]^-$ : 305,0068, ésta fórmula molecular a su vez puede pertenecer a diversas fórmulas estructurales, dentro de ellas se encuentran la Riccionidina A, ácido rheico, entre otros, tal y como se observa en la Figura 47.<sup>140</sup> Siguiendo como metodología sistemática para el estudio metabolómico los pasos mencionados anteriormente, se procedió a realizar el

m/z	[M+Na-2H] <sup>-</sup> m/z	M	Identificación	Fórmula	CAS
47212	305,0068	284,0321	Riccionidin A	$C_{15}H_8O_6$	478-43-3
2411	305,0068	284,0321	Rhein	$C_{15}H_8O_6$	478-43-3
71599	304,9931	245,9793	Eudistomin N	$C_{11}H_7BrN_2$	59444-69-8
48343	305,0068	284,0321	Repensol3,7,9-Trihydroxycoumestan	$C_{15}H_8O_6$	

Figura 47. Búsqueda en Metlin del ión 305,0675  $m/z$ .<sup>140</sup>

mismo procedimiento haciendo un barrido sobre todo el cromatograma comparando ambas fracciones, para así generar un listado con fórmulas moleculares,  $m/z$ , e identificación tentativa, cuyos resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Listado de la caracterización tentativa realizada mediante metabolómica.

Masa experimental $m/z$	$\Delta$ ppm	Asignación masa y espectro	Fórmula molecular	Identificación tentativa	Fracción mayoritaria
305,0675	22	284,0321 $[M+Na-2H]^-$	$C_{15}H_8O_6$	Ácido rheico	*
301,0018	3	302,0063 $[M-H]^-$	$C_{14}H_6O_8$	Ácido elágico	F.AcOEt
225,0614	7	204,0270 $[M+Na-2H]^-$	$C_7H_8O_7$	Ácido daucico	F.AcOEt

*(Psidium friedrichsthalianum* Nied.) con actividad antioxidante

367,1067	37	330,0376 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	Ácido 2,3-di-O-metilelagico, ácido 2,8-di-O-metilelagico	F.BuOH
383,0783	5	348,0329 [M+Cl] <sup>-</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>12</sub>	Dímero del ácido dehidro-L-(+)-ascórbico	*
333,0616	5	296,0532 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	ácido <i>cis</i> -Cutarico	F.AcOEt
395,0407	5	358,0536 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>11</sub>	2-galoil-1,4-galactarolactona metil éster, 5-metoxigaloil-1,4-galactarolactona	*
341,1098	20	304,0583 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Pentahidroxiflavanona	F.AcOEt
377,30861	18	340,0583 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	7-metoxi-5,6:3',4'-bis(metilendioxi)flavona,	F.AcOEt
439,0782	16	402,0587 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	Shoyuflavona B	F.AcOEt
533,1724	4	496,0489 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>15</sub>	3,5-di-O-galoil-1,4-galactarolactona	F.AcOEt
515,1617	45	478,0747 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	Quercetina 3'-O-glucuronido	F.AcOEt
295,1037	5	260,0321 [M+Cl] <sup>-</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Urolitina D	F.BuOH
323,1353 <sup>♦</sup>	11	286,0477 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	kaempferol	*
359,0981	48	322,0689 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	Galocatequina-4-β-ol	F.BuOH
293,1250	23	256,0583 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Ácido piscidico	F.BuOH
289,0720	40	268,0372 [M+Na-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	Cumestrol	F.AcOEt
325,0934	36	288,0634 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2,6,7,4'-tetrahidroxi-isoflavanona	F.BuOH
391,1257	18	354,0587 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	Ácido 2-O- <i>p</i> -cumaroilhidroxicitrico	F.BuOH
401,0872	17	364,0583 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Dehidropachyrrhizona	*
321,1192	5	300,0270 [M+Na-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Ácido emodico	F.BuOH
307,1400	4	270,0528 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Resokaempferol	F.BuOH
497,1298	25	460,0642 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>16</sub> O <sub>12</sub>	Rheina glucuronido	*
247,0825	5	210,0528 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Ácido 5-hidroxiferulico	F.BuOH
505,0989	36	470,0121 [M+Cl] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	Dilactona del ácido sanguisorbico	F.AcOEt
355,1034	20	334,0325	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub>	3,5,6,7,2',3',4'-	F.AcOEt

		[M+Na-2H] <sup>-</sup>		Heptahidroxiflavona	
309,1563	5	272,0532 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	Ácido fukiico ó Ácido (2R,3S)-2-(3,4- dihidroxibenzil)-2,3- dihidroxisuccinico	*
417,2126	12	382,0359 [M+Cl] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub> S	hesperetina 3'-O-sulfato	F.BuOH
509,0940	25	474,0434 [M+Cl] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>14</sub> O <sub>13</sub>	Ácido <i>m</i> -Trigalico	F.AcOEt
349,1504	9	312,0481 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	ácido caftarico	F.AcOEt
375,2017	33	338,0638 [M+K-2H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	acido 2-O-Acetil- <i>trans</i> - cutarico	F.AcOEt

\* Detectado en cantidades iguales y/o varios picos

♦ pico mayoritario en el TIC

En este análisis se detectaron 31 compuestos principalmente de tipo fenólico, 14 de ellos se encuentran en la fracción F.AcOEt, 10 en la fracción F.BuOH y los 7 restantes se encuentran en común en ambas fracciones. Los compuestos en su mayoría tienen fórmulas moleculares que se corresponden con ácidos fenólicos, así mismo se determinó la presencia de derivados del ácido ferúlico, el cual se ha encontrado en guayaba común (*P. guajava*)<sup>141</sup> y derivados del ácido elágico que también se han encontrado en guayaba común (*P. guajava*)<sup>141</sup> y en la misma guayaba agria (*P. friedrichsthalianum* Nied.).<sup>11</sup>

#### 4.3.3. Análisis por UPLC-EM dirigidos a la determinación de compuestos de tipo fenólico

Los análisis dirigidos se realizaron teniendo en cuenta una gama variada de compuestos de tipo fenólico y otros productos metabólicos (flavan-3-oles, derivados del ácido fenilpropanoico, derivados del ácido fenilacético, derivados del ácido benzoico y otros ácidos, derivados de valerolactonas, derivados del ácido valérico, y otro tipo de compuestos aromáticos), con miras a la caracterización de las fracciones y facilitar a futuro la evaluación de sus productos de degradación metabólica por acción de la microbiota intestinal humana.

(*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) con actividad antioxidante

Mediante el análisis UPLC-ESI-TQ EM/EM dirigido a la determinación de compuestos de tipo fenólicos, se identificaron y cuantificaron 22 compuestos de tipo fenólico en la fracción F.AcOEt, estos son: ácido 4-hidroximandélico, ácido gálico, pirogalol, ácido protocatéquico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido 3-O-metilgálico, ácido hidroxibenzoico,  $\gamma$ -valerolactona, (+)-catequina, ácido caféico, ácido vainillínico, ácido siringico, (-)-epicatequina, ácido benzoico, ácido isoferúlico, ácido ferúlico, ácido fenilacético, ácido ftálico, procianidina B1, procianidina B2, procianidina A2 y ácido elágico (Tabla 10).

**Tabla 10.** Cuantificación de los compuestos fenólicos identificados mediante el análisis dirigido en (mg/g) de las fracciones de estudio

COMPUESTO	F.AcOEt	F.BuOH
Ácido 4-hidroximandélico	0,092 ± 0,001	0,331 ± 0,007
Ácido gálico	0,693 ± 0,010	0,548 ± 0,004
Pirogalol	0,059 ± 0,008	-
Ácido protocatéquico	0,081 ± 0,006	0,094 ± 0,002
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	0,001 ± 0,000	-
Ácido 3-O-metilgálico	0,007 ± 0,001	-
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,002 ± 0,000	0,007 ± 0,001
$\gamma$ -valerolactona	0,024 ± 0,014	-
(+)-Catequina	17,952 ± 1,404	32,783 ± 6,370
Ácido caféico	0,020 ± 0,005	0,068 ± 0,015
Ácido vainillínico	0,204 ± 0,005	-
Ácido siringico	0,040 ± 0,010	0,090 ± 0,021
(-)-Epicatequina	9,525 ± 1,581	17,538 ± 0,805
Ácido benzoico	0,276 ± 0,029	-
Ácido isoferúlico	0,020 ± 0,007	0,055 ± 0,017
Ácido ferúlico	0,021 ± 0,002	0,055 ± 0,007
Ácido fenilacético	1,087 ± 0,088	-
Ácido ftálico	0,023 ± 0,002	-
Procianidina B1	14,149 ± 1,454	50,922 ± 6,417
Procianidina B2	10,820 ± 1,122	34,820 ± 5,480
Procianidina A2	0,049 ± 0,002	0,145 ± 0,017
Ácido elágico	4,755 ± 0,105	7,210 ± 0,047

- No detectado

Así mismo se identificaron y cuantificaron 14 compuestos de tipo fenólico en la fracción F. BuOH, estos son: ácido 4-hidroximandélico, ácido galico, ácido protocatequico, ácido 4-hidroxibenzoico, (+)-catequina, ácido caféico, ácido siríngico, (-)-epicatequina, ácido isoferulico, ácido ferúlico, procianidina B1, procianidina B2, procianidina A2 y ácido elágico. Todos estos compuestos excepto el ácido elágico se reportan por primera vez en éste trabajo como constituyentes de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.). Así mismo, con estos resultados se confirma la identificación tentativa de los compuestos **2** y **3**, realizada en la sección 4.3.1.

En la tabla 10 se evidencia que el compuesto mayoritario en la fracción de AcOEt es la (+)-catequina y para la fracción de BuOH la procianidina B1. También se evidencia que la fracción de AcOEt, es su mayoría se compone de ácidos fenólicos, esto también se observó en el estudio metabolómico. Además, cuando se comparan los resultados obtenidos en el análisis metabolómico, con éste estudio el único compuesto que se encuentra en común es el ácido elágico que se encuentra en mayor proporción en la fracción F.AcOEt, y que ha sido ya reportado en estudios previos.<sup>11</sup>

En conclusión, se identificaron, algunos compuestos de interés provenientes de las fracciones activas al ensayo de actividad antioxidante ABTS, dentro de ellos el ácido elágico, procianidina B1 y procianidina B2. Siguiendo el esquema de fraccionamiento, se aisló y purificó por HPLC semipreparativo el ácido 4'-*O-D*-glucopiranosido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico y el ácido abscísico, cuya identidad se confirmó por RMN <sup>1</sup>H. Así mismo, se obtuvo un perfil más amplio de composición por medio del análisis metabolómico UHPLC-Q TOF/MS identificando tentativamente 31 compuestos de tipo fenólico, dentro de los cuales se encuentra el ácido elágico. Por último, mediante el análisis en tándem UPLC-ESI/TQ/EM/EM usando como referencia 63 compuestos, se encontraron 22 compuestos los cuales fueron cuantificados, entre ellos el ácido elágico, ácido gálico, ácido caféico, procianidina B1 y procianidina B2. Todos los compuestos excepto el ácido elágico y ácido 4'-*O-D*-glucopiranosido 3,3',4-tri-*O*-metilelágico se reportan por primera

vez en este trabajo, como constituyentes de la guayaba agria *Psidium friedrichsthalianum* Nied.



## **5. IMPACTO DE LA MICROBIOTA FECAL HUMANA EN EL METABOLISMO DE FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN FENOLES AISLADAS A PARTIR DE *Psidium friedrichsthalianum* Nied. Y EFECTO DE ESTAS FRACCIONES EN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS REPRESENTATIVOS DE LA MICROBIOTA FECAL**

### **5.1. GENERALIDADES**

Entre la población bacteriana asociada al cuerpo humano, el tracto gastrointestinal alberga el ecosistema más complejo y numeroso, la microbiota intestinal.<sup>142</sup> Las cuatro familias bacterianas dominantes en el intestino de una persona adulta son Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria.<sup>143</sup> Dichas bacterias son tanto cuantitativa, como cualitativamente diferentes en cada individuo, ya que su composición depende de diversos factores como la edad, el ambiente y la dieta.<sup>144</sup> La investigación en éste campo se ha convertido en un eje primordial de trabajo en ciencias de la alimentación, ya que el conocimiento de los componentes de la dieta que son capaces de modificar la composición de la microbiota humana y el metabolismo que sufren los compuestos ingeridos por la acción microbiana, es fundamental para permitir establecer estrategias de alimentación que, contribuyan a la prevención de ciertas enfermedades mediante la modulación de la microbiota intestinal y su actividad metabólica. Son numerosos los estudios que apuntan a los compuestos fenólicos como uno de los grupos de componentes alimentarios que pueden afectar significativamente a la colonización y a la composición de la microbiota intestinal.<sup>145</sup>

En los últimos tiempos se han realizado estudios para conocer tanto la composición de la microbiota intestinal, como su efecto sobre los compuestos de tipo fenólico. En su gran mayoría, dichos estudios se basan en el análisis de las heces, como fuente representativa de la microbiota intestinal, ya que su recolección es relativamente sencilla y no invasiva. En distintos trabajos se ha demostrado que la comunidad bacteriana presente en las heces, parece ser similar y representativa de las comunidades bacterianas presentes en el colon.<sup>143,146</sup> Así mismo, se han desarrollado diversos modelos para la simulación de las condiciones del tracto gastrointestinal humano y de su aplicación para el estudio de la digestión y biodisponibilidad de los componentes de la dieta.<sup>147</sup> Los sistemas modelo más sencillos son las fermentaciones estáticas en discontinuo. Se trata de pequeños reactores en serie inoculados con suspensiones de material intestinal sellados y mantenidos bajo condiciones anaerobias, y a temperatura fisiológica. Este tipo de modelos se ha utilizado principalmente para evaluar la estabilidad de los componentes de la dieta bajo condiciones fisiológicas y en presencia de la microbiota intestinal.

Adicionalmente, se conoce que muchos de los polifenoles ingeridos a través de la dieta son absorbidos en el intestino delgado en muy baja proporción. Se estima que aproximadamente el 90-95% de los polifenoles de la dieta no son absorbidos en el intestino delgado y que, por tanto, se acumulan en el colon.<sup>148</sup> Una vez en el colon, los polifenoles pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal dando lugar a una serie de compuestos fenólicos y no fenólicos, que pueden ser de nuevo absorbidos, aumentando su biodisponibilidad y los efectos benéficos para la salud.

Por las razones mencionadas anteriormente y siendo los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied. ricos en compuestos de tipo fenólico con actividad antioxidante, como se reportó en el capítulo 4 de éste estudio, se decidió realizar un experimento de fermentación *in vitro*, utilizando inóculos fecales de tres voluntarios sanos en presencia y ausencia de las fracciones de estudio (F.AcOEt y F.BuOH). Se siguieron los cambios en la composición debidos al metabolismo microbiano, mediante un análisis dirigido por

UPLC-ESI/TQ/EM/EM, y los cambios en los principales grupos de bacterias se determinaron por recuento en placa con medios selectivos.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se describe a continuación fue utilizada en el estudio de la fermentación *in vitro* de fracciones enriquecidas en fenoles aisladas a partir de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.). Inicialmente se seleccionaron los individuos donantes de las muestras intestinales y se acondicionaron las heces para su uso dentro de la fermentación, la cual se llevó a cabo en modo discontinuo en un medio de cultivo selectivo para la microbiota que habita la región distal del intestino grueso humano y en condiciones que asemejan dicho ambiente. A continuación se recolectaron las muestras de la fermentación a cinco tiempos y se evaluaron los productos de degradación metabólica microbiana. Por último, se realizaron los recuentos de microorganismos para conocer el efecto de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos ensayados sobre la microbiota. Todos los resultados se sometieron a distintos ensayos estadísticos, que permitieron observar las diferencias, y/o agrupaciones entre los distintos metabolitos generados a partir de las fracciones fenólicas ensayadas, microorganismos y permitió evaluar el comportamiento microbiano durante la fermentación de las fracciones del estudio.

### 5.2.1. Materiales y Reactivos

Se utilizó: acetonitrilo grado HPLC de LabScan (Sowinskiego, Polonia), ácido fórmico de Sharlau (Barcelona, España) y agua tipo HPLC Milli-Q WatersMillipore (Estados Unidos). Se utilizaron los 63 estándares mencionados en el numeral 4.2.1. Los medios de crecimiento bacteriológicos fueron adquiridos a Oxoid Ltda. (Basingstoke, Hants, UK).

Los filtros de membrana Isopore (0.22  $\mu\text{m}$ ) fueron adquiridos a Millipore Corp. (Watford, Hertfordshire, UK). La esterilización de los medios de cultivo y de los materiales e instrumentos para microbiología se llevó a cabo en un autoclave (marca: BMT, modelo: Sterivap hp il, Brno-República Checa) a 121 °C por 15 minutos.

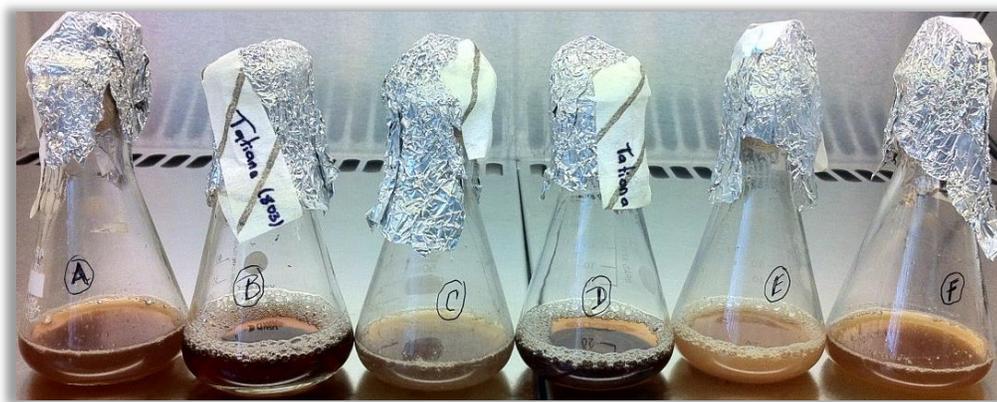
### 5.2.2. Preparación de las muestras fecales

Las muestras fecales se recolectaron de tres individuos diferentes (mujeres) de 27, 32 y 42 años. Todos los voluntarios se encontraban en buen estado de salud, peso normal, no eran fumadores y no habían consumido antibióticos en los 6 meses previos al estudio. Las muestras se recolectaron en el sitio, el día del experimento y se usaron inmediatamente. Las muestras fueron diluidas 1:10 (p/v) con buffer fosfato incubado previamente en anaerobiosis (0,1 M; pH 7.0) y se homogenizaron en un Stomacher a velocidad máxima por 2 minutos, dando como resultado suspensiones intestinales para cada individuo (Las muestras intestinales no se agruparon), las cuales se usaron para inocular los matraces para cultivos en modo discontinuo.

### 5.2.3. Fermentación *in vitro* con bacterias intestinales

Diferentes matraces para la fermentación de cultivos en discontinuo (50 mL de volumen, un recipiente por tratamiento para cada grupo) se esterilizaron y se llenaron con 22 mL de medio nutritivo "*Colon Nutrient Medium*"<sup>149</sup> (agua peptonada (2 g/L), extracto de levadura (2 g/L), NaCl (0.1 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.04 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.04 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (2 g/L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.01 g/L), CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.01 g/L), Tween 80 (2 mL/L), hemina (50 mg/L), vitamina K (10  $\mu\text{L/L}$ ), L-cisteina (0.5 g/L), sales biliares (0.5 g/L) y agua destilada). El pH basal del medio se ajustó a 7,0 y se esterilizó antes de la disposición en los matraces. El medio se dejó toda la noche en la cabina de anaerobiosis con N<sub>2</sub> libre de O<sub>2</sub> (15 mL/min). Antes de la adición de las suspensiones intestinales, la temperatura del medio nutriente se fijó a 32 °C y el pH se mantuvo en 6,8, con el fin de imitar las

condiciones de la región distal del intestino grueso humano (anaeróbico; 37 °C; pH sobre 6,8). Los matraces se inocularon con 2,5 mL de suspensión fecal (1/10 p/v) y las fracciones F.AcOEt y F.BuOH (obtenidas de los frutos de *P. friedrichsthalianum* Nied., según se describió en el numeral 4.2.2) se adicionaron por separado para alcanzar una concentración final de 600 mg/L (Figura 48). Se realizaron dos experimentos de control diferentes: (A) incubaciones de la microbiota intestinal en medio, pero sin las fracciones F.AcOEt y F.BuOH, con el fin de controlar los metabolitos derivados de metabolismo basal; y (B) las incubaciones de las fracciones F.AcOEt y F.BuOH en el medio pero sin microbiota intestinal, para monitorear los cambios debidos a la transformación química no microbiana de compuestos precursores del sustrato. Así mismo, se hizo un control positivo de crecimiento bacteriano usando un compuesto prebiótico (raftilina) que promueve el desarrollo de la microbiota intestinal.



**Figura 48.** Diseño experimental para un voluntario, matraces A-F. A. Fermentación F.AcOEt, B. blanco sin suspensión fecal para F.AcOEt, C. Fermentación F.BuOH, D. blanco sin suspensión fecal para F.BuOH, E. Control positivo de crecimiento con el prebiótico raftilina, F. Control negativo inoculo fecal.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en condiciones anaerobias durante un período de 48 h, con agitación constante de 140 rpm. Durante el tiempo mencionado, se recogieron muestras en cinco tiempos diferentes (0, 5, 10, 24 y 48 h) en tubos Eppendorf estériles (1,5

mL). Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta realizar los análisis dirigidos para la determinación de compuestos de tipo fenólico y sus productos de degradación metabólica por UPLCAD-ESI/TQ/MS/MS, siguiendo la metodología descrita en el numeral 4.2.7. Antes de la inyección, las muestras se descongelaron, se centrifugaron (10000g, 4 °C, 10 min), se filtraron a través de membranas isopore de 0,22 µm, y finalmente se diluyeron (1:1, v/v) con una mezcla de acetonitrilo/agua (2:3, v/v). Así mismo, se tomaron muestras en tubos Eppendorf estériles (1,5 mL) a los tiempos señalados y se almacenaron con glicerol al 40% (1:1 v/v) a -70 °C hasta que se necesitaron para realizar los recuentos de microorganismos sobre placas de medios generales y selectivos.

#### **5.2.4. Recuento de microorganismos propios del intestino humano**

Las muestras almacenadas en glicerol fueron diluidas de forma seriada, usando solución fisiológica. El número de unidades formadoras de colonias totales (UFC/mL), y de cada tipo de bacterias, se cuantificaron mediante el recuento de colonias tras la siembra directa en *spot* de las diluciones en placas de cuatro tipos de medios selectivos: (MacConkey agar (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para Enterobacteriaceae, MRS pH 5,4 (Pronadisa, Madrid, España) para bacterias lácticas, BBL manitol salt agar (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para *Staphylococcus aureus* y medio Enterococos (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para Enterococcus. Y medios no selectivos: TSA (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para aerobios totales y Wilkins-Chalgren agar (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) para anaerobios totales. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h en anaerobiosis (Bactron anaeróbico / Cámara Ambiental, SHELLAB, Cornelius, OR, EEUU), a excepción de las placas de TSA y BBL manitol salt agar que se incubaron en condiciones aerobias.

#### **5.2.5. Análisis estadístico**

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizaron los siguientes métodos estadísticos: el Análisis de Componentes Principales (PCA) para examinar la relación

entre las variables analizadas y diferenciar grupos de datos en función de dichas variables. El test paramétrico de la t-Student para datos relacionados, para evaluar las diferencias entre los resultados antes y después de los distintos tratamientos aplicados. El Análisis de la Varianza (ANOVA), y el posterior test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) para comparar los valores medios de las variables en los distintos grupos. Para el procesamiento estadístico de los datos y la realización de gráficas se utilizaron los siguientes programas: STATISTICA para Windows, versión 7.1 (StatSoft Inc., 2005, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)) y Microsoft Office EXCEL para Windows, versión 2010 (Microsoft, 2010, <http://office.microsoft.com>).

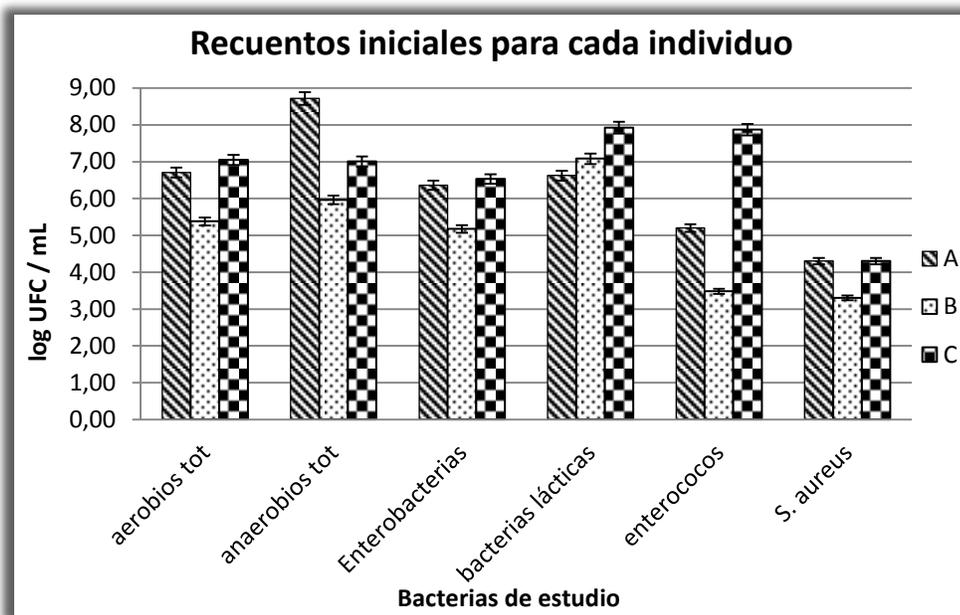
### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para la fermentación *in vitro* de las fracciones enriquecidas en fenoles (F.ACOEt y F.BuOH) por acción de la microbiota intestinal humana. Se encuentra dividido en 2 secciones, en la primera sección se presenta el efecto de las fracciones enriquecidas en fenoles (F.ACOEt y F.BuOH) sobre la microbiota intestinal humana, en ella se observa la microbiota para cada uno de los individuos y los cambios en la microbiota tras la fermentación con los compuestos de tipo fenólico y un compuesto prebiótico (raftilina). Por último se presentan las transformaciones microbianas de los compuestos fenólicos provenientes de *P. friedrichsthalianum* Nied., en esta sección se diferencian los compuestos provenientes de las muestras, los que son provenientes de la microbiota y aquellos que sufren transformaciones por el metabolismo bacteriano.

### 5.3.1. Efecto de las fracciones enriquecidas en fenoles sobre la microbiota intestinal humana

En éste estudio se evaluó la transformación de la composición microbiana a lo largo del tiempo de fermentación, realizando los recuentos de microorganismos para cada uno de los individuos de forma independiente, en cada uno de los ensayos. Las bacterias que se tuvieron en cuenta son representativas de las bacterias cultivables de la región distal del intestino grueso humano, a saber: bacterias aerobias totales, bacterias anaerobias totales, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, bacterias lácticas y *Staphylococcus aureus*, que son solo un pequeño grupo de bacterias representativas dentro de las 1.000 a 1.150 especies de bacterias prevalentes descritas. De estas, en cada individuo por lo menos existen 160 especies cultivables.<sup>150</sup>

En primer lugar se realizaron los recuentos de la microbiota presente en las heces de cada individuo de estudio, para conocer la diferencia entre los individuos. De la gráfica (Figura 49) se puede resaltar que no existen diferencias marcadas entre los tres individuos a pesar de tener dietas y edades diferentes. El individuo C es el que presenta mayor cantidad de población bacteriana en las diferentes bacterias de estudio, excepto en la cantidad total de bacterias anaerobias de quien el individuo A presenta una mayor población. En todos los individuos se detectó la presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus*, que es un agente patogénico ubicuo considerado como parte de la microbiota normal, en baja proporción con respecto a las demás bacterias de estudio. Así mismo, se evidenció la presencia de bacterias lácticas en una alta población; estas bacterias son importantes en el organismo humano, ya que son benéficas para la salud, se complementan con las bacterias presentes en nuestra flora intestinal y contribuyen al buen funcionamiento del aparato digestivo. Es ideal que en la dieta los alimentos que se consuman aumenten su población (alimentos prebióticos).<sup>151</sup>

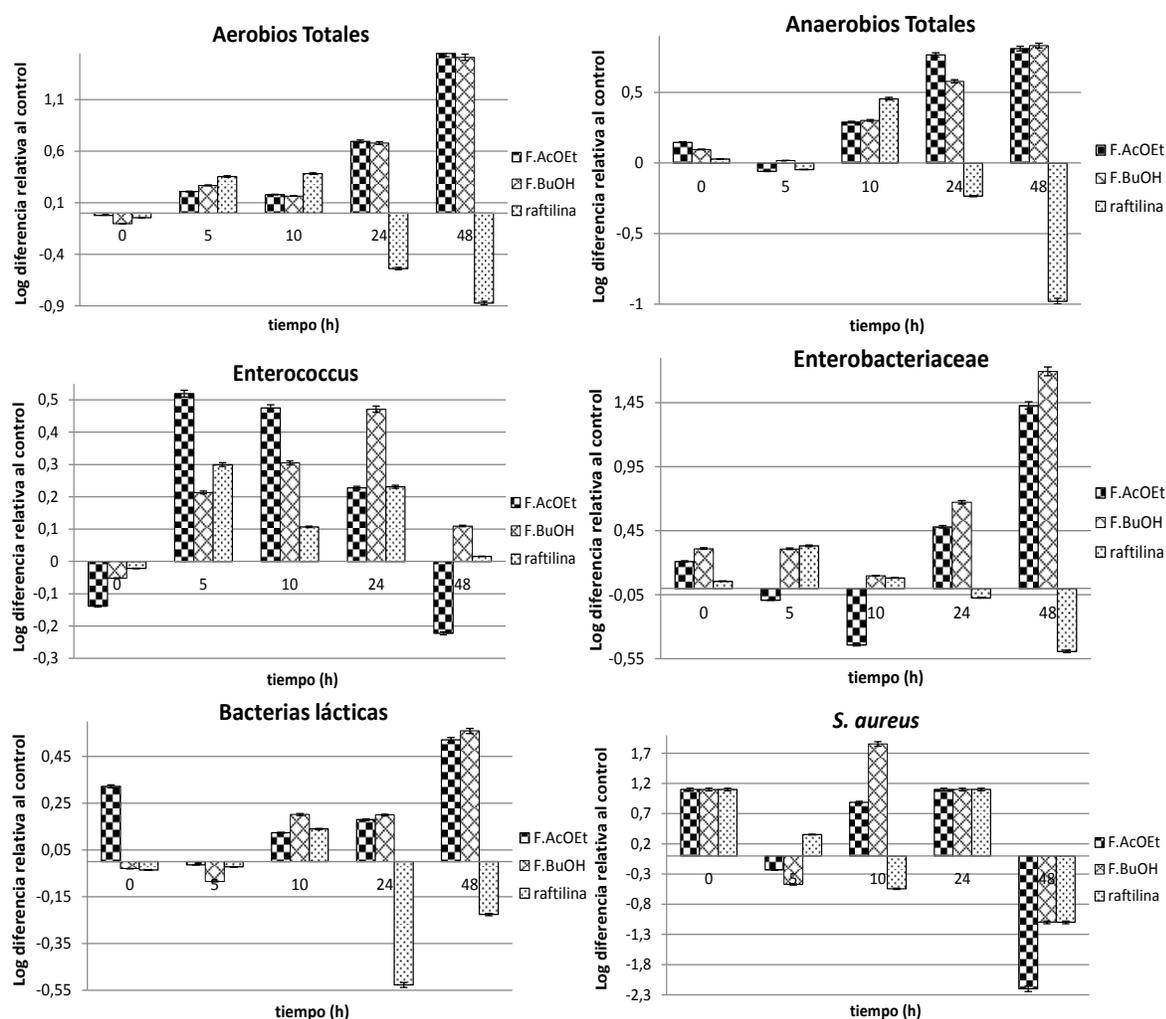


**Figura 49.** Recuentos iniciales de microbiota presente en cada individuo de estudio. A) individuo A, B) individuo B, C) individuo C.

Teniendo en cuenta las poblaciones obtenidas y los ensayos realizados por separado para cada individuo, se decidió observar las tendencias de comportamiento general agrupando los individuos con sus réplicas para cada tiempo y cada tipo de bacteria. Las muestras que se usaron para el ensayo fueron las fracciones enriquecidas en fenoles F.AcOEt y F.BuOH, y caracterizadas en el capítulo 4; también se usó la rafilina que es un compuesto que actúa como prebiótico y se hicieron blancos de cultivo incubando únicamente las bacterias procedentes de las heces de los individuos con el medio de cultivo respectivo.

Para visualizar el comportamiento presentado por las bacterias en cada sistema, se realizaron gráficas del logaritmo de la diferencia relativa al control de las bacterias con respecto al tiempo de cada fermentación, con base en la cuantificación de la microbiota (Figura 50). En los recuentos de las bacterias aerobias totales se evidencia un aumento en la población a través del tiempo en las fermentaciones con F.AcOEt y F.BuOH, con

diferencia a la raftilina que hace que aumente la población hasta las 10h y luego es menor que la población control. Éste mismo comportamiento se observa en los recuentos para las bacterias anaerobias totales. Por otro lado, el comportamiento de los *Enterococcus* para cada muestra es diferente. Para F.AcOEt la población crece hasta las 5h y luego empieza a disminuir. En cambio, para F.BuOH aumenta gradualmente hasta 24h y disminuye a las 48h, comportamiento similar al presentado por la raftilina. Los *Enterococcus* se encuentran particularmente en el colon y son bacterias patógenas fuera de su entorno.



**Figura 50.** Cambios en los grupos de poblaciones bacterianas (promedio de los tres individuos) durante la fermentación de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos (F.AcOEt y F.BuOH) en un cultivo fecal a pH controlado.

Las Enterobacterias en los sistemas suplementados con la fracción F.AcOEt crecen menos que el control las 10 primeras horas, luego aumentan significativamente; así mismo las Enterobacterias en los sistemas suplementados con F.BuOH crecen un poco más que en el control hasta las 10h, en el tiempo restante aumenta significativamente su crecimiento. En los sistemas con raftilina, este grupo de bacterias crecen poco hasta las 10h y a partir de entonces empiezan a decrecer con respecto al control durante el tiempo restante del ensayo.

La evolución de las bacterias lácticas en las fracciones F.AcOEt y F.BuOH también se observa en la figura 50. Este grupo de bacterias, crecen paulatinamente hasta las 48h donde se aprecia un aumento significativo con respecto al control. Por otro lado, en las fermentaciones con el prebiótico (ratilina) no se observa un aumento significativo con respecto al control de crecimiento y de las 24 horas en adelante disminuye la población. Las bacterias lácticas en el cuerpo humano se encuentran particularmente en el colon, se han asociado con importantes beneficios para la salud, y contribuyen al buen funcionamiento del aparato digestivo, por tal razón es relevante el hecho que en los dos sistemas suplementados con las fracciones fenólicas F.AcOEt y F.BuOH promuevan un aumento en la población de estas bacterias. Por último, el recuento de *S. aureus* muestra que el crecimiento de estas bacterias en los sistemas suplementados con F.AcOEt es cercana al control y disminuye a las 48h, al igual que se observó para F.BuOH y la raftilina. Este tipo de bacterias se encuentran particularmente en el colon, son agentes patogénicos ubicuos considerados como parte de la microbiota normal, sin embargo cuando aumenta su población o se encuentran por fuera de su entorno pueden generar enfermedades graves, por tal motivo es importante mantener la población de *S. aureus* controlada.

En general, como conclusiones de esta parte del estudio, se ha comprobado que las fracciones F.AcOEt y F.BuOH enriquecidas en compuestos fenólicos actúan como

prebióticos, ya que promueven un aumento de la población de Enterobacterias y bacterias lácticas que favorecen el proceso de digestión y la absorción de nutrientes de los residuos alimenticios que llegan al colon. Por otro lado, se ha comprobado también, que estas fracciones disminuyen la población de *Staphylococcus aureus* que en grandes cantidades es patógeno. Así mismo, cuando se realizó la comparación de la población bacteriana característica de cada individuo, no mostró una diferencia significativa en la población de firmicutes, ya que los voluntarios participantes en el estudio presentaban un peso normal para su talla. Los firmicutes son una familia que abarca un amplio rango de bacterias a la cual pertenecen tanto los Enterococcus, como el *Staphylococcus aureus*. Este tipo de bacterias son importantes, ya que la presencia y abundancia de firmicutes se ha relacionado con la obesidad, en algunos estudios, se ha determinado que hay una mayor población de estas bacterias en personas obesas.<sup>152</sup> En los ensayos realizados con las fracciones F.AcOEt y F.BuOH provenientes de la guayaba agria, tampoco se evidencia un aumento de éste tipo de bacterias durante el tiempo de incubación. Estos resultados indican que el consumo de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.), podría tener efectos positivos para la salud por favorecer el crecimiento de una microbiota intestinal benéfica (efecto prebiótico) y disminuir la población de firmicutes, lo cual puede prevenir la obesidad.

### **5.3.2. Metabolismo de los compuestos fenólicos provenientes de *P. friedrichsthalianum* Nied. por la microbiota intestinal**

Además del efecto de las fracciones fenólicas de la guayaba agria sobre las poblaciones microbianas representativas de microbiota intestinal, el efecto que estos grupos microbianos ejercen sobre los compuestos fenólicos es de gran interés para establecer la bioactividad de este grupo de compuestos tras su ingestión. Por medio de este ensayo se detectaron 25 compuestos fenólicos, que no sólo provienen del metabolismos de estos compuestos por la microbiota intestinal, sino que algunos están presentes originalmente en la guayaba agria, y otros son producidos por la microbiota propia de los individuos a

partir de otras fuentes precursoras de fenoles procedentes de la propia dieta de los individuos. Éstos compuestos se detallan en la tabla 11.

**Tabla 11.** Estadística descriptiva, análisis de ANOVA para la determinación de las variables relevantes en el estudio

Compuesto <sup>a</sup>	N válido <sup>b</sup>	Promedio <sup>c</sup>	Desviación estándar <sup>d</sup>	Mínimo <sup>e</sup>	Máximo <sup>f</sup>	Tiempos <sup>g</sup>	Tipo <sup>h</sup>	Interacción <sup>i</sup>	Fuente <sup>j</sup>
Ac. gálico	150	0.014	0.071	0.00	0.527	*	*	*	fermentación
Ac. protocatequico	150	0.004	0.007	0.00	0.039	*	*	*	Microbiota
Ac. 3,4-dihidroxifenilacetico	150	0.000	0.002	0.00	0.011	*			fermentación
Ac. 3-O-metilgalico	150	0.000	0.001	0.00	0.006	*	*	*	fermentación
Ac. 4-hidroxibenzoico	150	0.021	0.014	0.01	0.065	*	*	*	Microbiota
γ-valerolactona	150	0.007	0.016	0.00	0.097	*	*	*	microbiota
(+)-catequina	150	0.000	0.002	0.00	0.019	*	*		fermentación
Ac. 4-hidroxifenilacetico	150	0.487	1.177	0.00	7.249	*	*	*	Microbiota
Ac. hipúrico	150	0.020	0.015	0.00	0.048	*	*	*	microbiota
Ac. caféico	150	0.000	0.001	0.00	0.006	*	*	*	fermentación
Ac. vainillinico	150	0.016	0.066	0.00	0.297			*	fermentación
Ac. 3-hidroxifenilacetico	150	0.001	0.003	0.00	0.026	*	*		fermentación
Ac. siringico	150	0.009	0.013	0.00	0.037	*	*	*	F.AcOEt y F.BuOH
Ac. 3-(4-hidroxifenil propanoico)	150	0.441	1.911	0.00	14.690	*	*		fermentación
Ac. 3-(3-hidroxifenil propanoico)	150	0.064	0.122	0.00	0.778	*	*	*	fermentación
Ac. benzoico	150	0.096	0.119	0.00	0.313	*	*	*	microbiota
Ac. isoferulico	150	0.001	0.004	0.00	0.027	*	*	*	F.AcOEt y

									F.BuOH
<b>Ac. ferulico</b>	150	0.002	0.007	0.00	0.035	*	*	*	F.AcOEt y F.BuOH
<b>Ac. fenilacetico</b>	150	3.962	7.201	0.00	28.005	*	*	*	Microbiota
<b>hidroxifenil valerolactona</b>	150	0.004	0.013	0.00	0.079	*	*	*	fermentación
<b>Ac. Fenilpropanoico</b>	150	3.006	7.303	0.00	38.294	*	*	*	Microbiota
<b>Ac. hidroxifenil-4- hidroxivalerico</b>	150	0.056	0.157	0.00	1.216	*	*	*	fermentación
<b>Ac. ftálico</b>	150	0.014	0.006	0.00	0.031		*		microbiota
<b>Procianidina B1</b>	150	0.002	0.013	0.00	0.121	*	*	*	F.AcOEt y F.BuOH
<b>Procianidina B2</b>	150	0.003	0.016	0.00	0.088		*		F.AcOEt y F.BuOH

- a Compuesto identificado por el análisis dirigido en UPLC-ESI-TQ EM/EM  
b Cantidad de datos evaluados por ANOVA  
c Promedio de los valores de concentración para cada uno de los compuestos (usando todos los tiempos, todos los individuos y todas las muestras)  
d Desviación estándar del valor promedio  
e Valor mínimo tenido en cuenta en el promedio  
f Valor máximo tenido en cuenta en el promedio  
g Variable tiempo de fermentación y su relevancia en la prueba ANOVA  
h Variable tipo de muestra y su relevancia en la prueba ANOVA  
i Variable interacción y su relevancia en la prueba ANOVA  
j Fuente de origen del compuesto  
\* Se considera una variable estadísticamente relevante por ANOVA

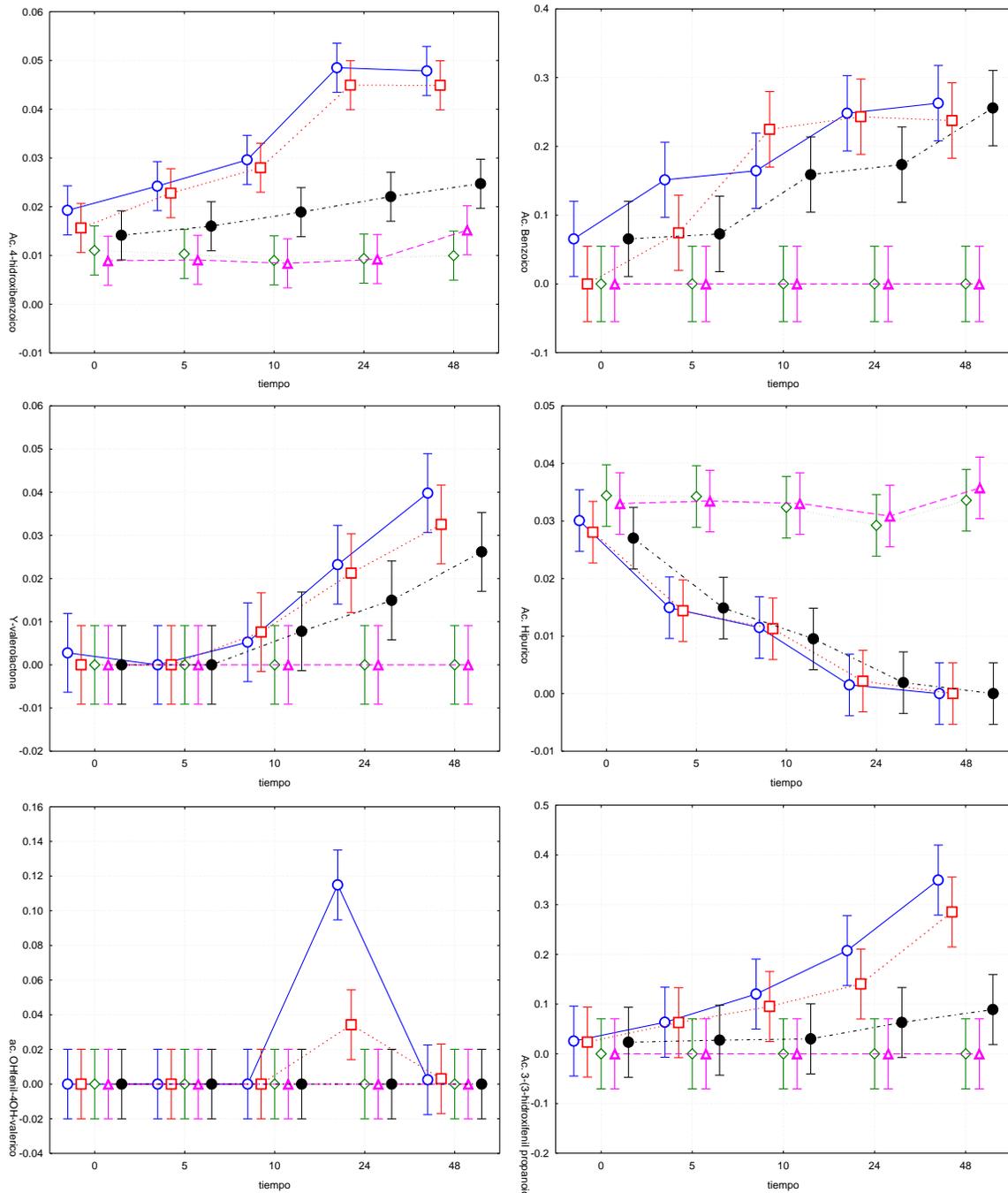
Su cuantificación se realizó teniendo en cuenta la calibración externa, con los datos obtenidos de todos los individuos y todos los tiempos de muestreo para el ensayo. Se hizo además, el análisis de ANOVA para determinar el impacto de los principales factores del estudio (tiempo, tipo de extracto ensayado e interacción). Se encontró que el tiempo de fermentación es una variable estadística significativa para la mayoría de los compuestos fenólicos identificados (variables del estudio), excepto para el ácido ftálico y la procianidina B2, cuyos cambios dependen solamente del tipo de muestra (su fuente de origen). La variable tipo de muestra es relevante para la mayoría de los compuestos identificados, excepto para el ácido 3,4-dihidroxifenilacético cuyos cambios dependen solamente del tiempo de incubación, y el ácido vainillínico que depende solamente de la

interacción. La variable interacción no influye en los compuestos mencionados anteriormente, ni en la (+)-catequina, ácido 3-hidroxifenilacético, y ácido 3-(4-hidroxifenilpropanoico).

A partir de gráficas de concentración de los 25 compuestos encontrados en función del tiempo para cada uno de los ensayos de fermentación *in vitro* de las fracciones con sus respectivos controles, se determinó el tipo de fuente de donde proviene cada compuesto (Tabla 11). Así que, por acción de la incubación de las bacterias intestinales en condiciones anaerobias con las fracciones F.AcOEt y F.BuOH se obtuvieron 11 compuestos fenólicos: ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido 3-*O*-metilgálico, (+)-catequina, ácido caféico, ácido dihidroxibenzoico, ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 3-(4-hidroxifenilpropanoico), ácido 3-(3-hidroxifenilpropanoico), hidroxifenilvalerolactona, y ácido hidroxifenil-4-hidroxivalerico. Dentro de esta serie de compuestos se encuentran algunos que son propios de las muestras de guayaba agria (ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido 3-*O*-metilgálico, (+)-catequina, ácido caféico y ácido dihidroxibenzoico), que aumentan en presencia de las bacterias y que pueden ser mayormente absorbidos por el intestino humano. También se observó la aparición de compuestos de metabolismo a partir de la incubación *in vitro* de las fracciones con la microbiota intestinal, diferentes a los presentes en la guayaba agria: ácido 3-hidroxifenilacético, ácido 3-(4-hidroxifenilpropanoico), ácido 3-(3-hidroxifenilpropanoico), hidroxifenilvalerolactona, y ácido hidroxifenil-4-hidroxivalerico.

Así mismo, se encontraron compuestos propios de la microbiota: ácido 4-hidroxifenilacético, ácido hipúrico y ácido fenilpropanoico. Y los compuestos propios de las fracciones F.AcOEt y F.BuOH: ácido siríngico, ácido isoferúlico, ácido ferúlico, procianidina B1 y procianidina B2, los cuales se degradaron completamente durante el tiempo del ensayo. Es decir que por la acción hidrolítica de las bacterias, compuestos fenólicos de un tamaño mayor se transformaron en compuestos de pequeño tamaño.

También se observaron las tendencias en el tiempo de fermentación, algunas de ellas se presentan en la Figura 51. En general los blancos de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos para los ensayos, no cambian su concentración a lo largo del tiempo. Para el ácido 4-hidroxibenzoico,  $\gamma$ -valerolactona y ácido benzoico, se observa un comportamiento similar entre ellos, éstos compuestos aumentan a medida que transcurre el tiempo de incubación, al mismo tiempo que aumenta el control de crecimiento microbiano, lo cual indica que estos compuestos son propios de la microbiota intestinal; en el caso del ácido benzoico éste compuesto hace parte de la composición de las fracciones de *Psidium friedrichsthalianum* Nied., se evidencia un aumento en su concentración debido a la cantidad presente en las bacterias y a la misma fermentación. El comportamiento de la gráfica del ácido hipúrico dista del mencionado para los otros compuestos, se evidencia una disminución en la concentración a medida que transcurre el tiempo de incubación, al mismo tiempo que disminuye el control de crecimiento microbiano, esto indica que es un compuesto cuyo origen es bacteriano y que disminuye a medida que ocurre la fermentación. Por último, el ácido hidroxifenil-4-hidroxicinámico aparece a las 48 horas de incubación, en los ensayos que contienen F.AcOEt y F.BuOH, lo cual indica que es un producto del metabolismo ejercido por la microbiota sobre estas fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos.

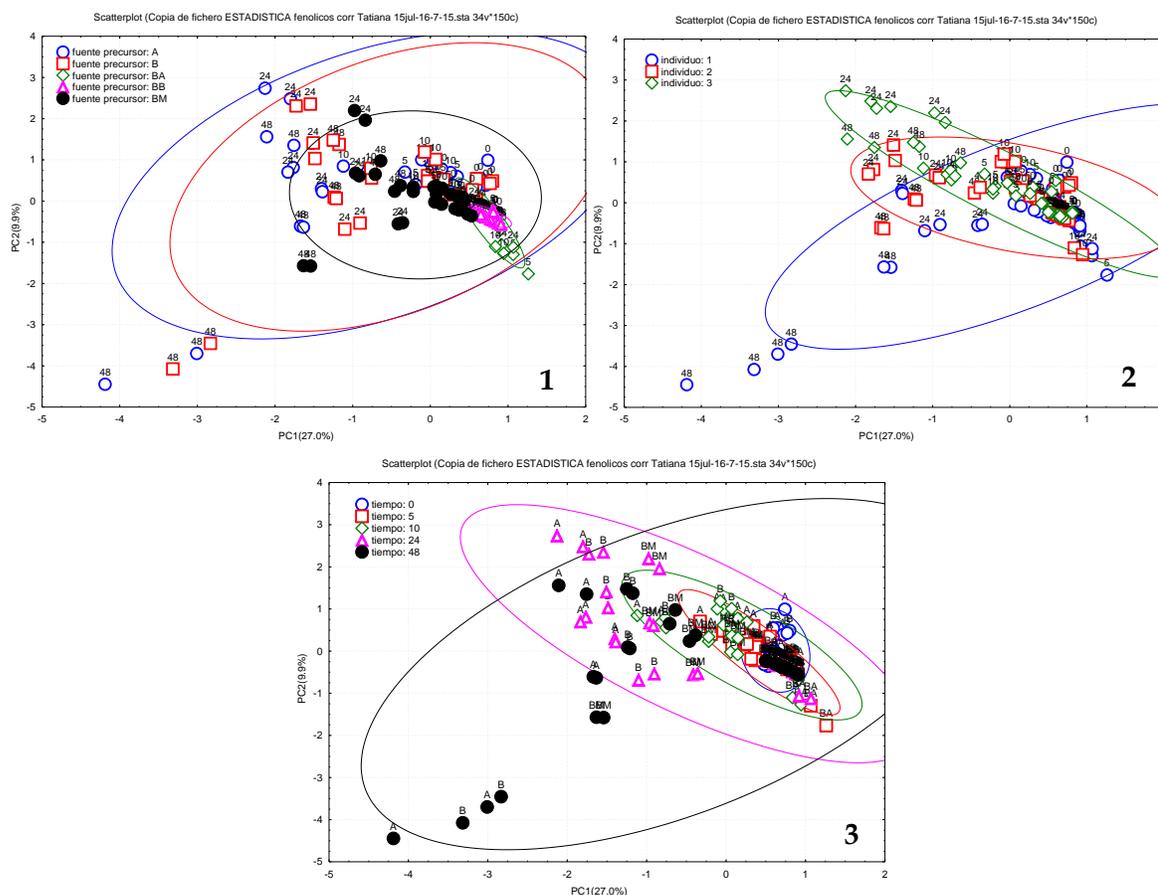


**Figura 51.** Evolución de algunos compuestos (Ácido 4-hidroxibenzoico, ácido benzoico,  $\gamma$ -valerolactona, ácido hipúrico y ácido hidroxifenil-4-hidroxi-valérico) durante el tiempo de fermentación con microbiota fecal (t=0h, 5h, 10h, 24h, 48h). Muestra A (F.ACOEt, trazo azul),

muestra B (F.BuOH, trazo rojo), muestra BA (blanco F.AcOEt, trazo verde), muestra BB (blanco F. BuOH, trazo fucsia), muestra BB (blanco de crecimiento bacteriano, trazo negro)

Para realizar éste análisis se incluyeron las variables fuente precursora, individuo, tiempo, y las concentraciones de los 25 compuestos en todos los ensayos y sus respectivas réplicas. En la figura 52-1 se aprecia la distribución de los datos por el tipo de muestra a medida que transcurre el tiempo de incubación. Se observa que en el tiempo 0h todas las muestras sin importar su tipo se encuentran en el mismo sector. A medida que el tiempo transcurre las muestras se van separando, este efecto se observa debido a la transformación de los compuestos presentes en F.AcOEt y F.BuOH por acción de la microbiota. En cambio los blancos del ensayo siguen muy cercanos al grupo de 0h, ya que como es de esperarse, no se produce la transformación de los compuestos fenólicos presentes en ausencia de las bacterias o en las muestras sin las fracciones F.AcOEt y F.BuOH. En general, el comportamiento que se aprecia en la fermentación de ambas fracciones por acción de la microbiota intestinal es muy similar, sólo se diferencian los blancos y controles, a pesar de su diferencia en composición y en la actividad antioxidante *in vitro*, determinadas en el capítulo 4.

En la figura 52-2 se muestra la agrupación de datos presentada por los individuos donantes de la microbiota intestinal en función del tiempo de fermentación. Se aprecia que la microbiota intestinal de los tres individuos se comporta de manera diferente a medida que transcurre el tiempo del ensayo. Estas diferencias son más manifiestas en el caso del individuo 1 (valores muy altos y negativos de PC1) lo que puede ser debido principalmente a las diferencias interindividuales dadas por la genética, alimentación, condiciones ambientales, estrés, entre otros.



**Figura 52.** Análisis estadístico por PCA teniendo en cuenta: **1)** el tipo de muestra A: F.AcOEt, B: F.BuOH, BA: Blanco para F.AcOEt, BB: Blanco para F.BuOH, BM: Blanco crecimiento bacteriano. **2)** El individuo de prueba, 1, 2 ó 3. **3)** los tiempos de muestreo, t=0h, 5h, 10h, 24h y 48h.

En la figura 52-3 se correlacionan los tiempos de ensayo con el tipo de muestra utilizada en cada ensayo, se evidencia que el tiempo en que hay una mayor variación es 48 h, ya que a este tiempo las bacterias ya han metabolizado los compuestos presentes en el ensayo. Las muestras que se ven más afectadas por el tiempo son F.AcOEt y F.BuOH, que son las muestras que contienen los compuestos de tipo fenólico susceptibles a la acción hidrolítica de las bacterias intestinales. También se observó que a menor tiempo menor dispersión de los datos sin importar la muestra de origen, lo cual es esperable ya que todavía no se observan compuestos del metabolismo fenólico.

En conclusión, la fermentación por parte de la microbiota intestinal de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos (F.AcOEt y F.BuOH) aislados a partir de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) dio origen a 12 compuestos fenólicos, algunos de ellos se encuentran dentro de la composición inicial de las fracciones de la guayaba agria, y otros aparecen por la acción metabólica de las bacterias sobre las fracciones, estos compuestos son: ácido 3-hidroxifenilacético, ácido, 3-(4-hidroxifenilpropanoico), ácido 3-(3-hidroxifenilpropanoico, hidroxifenilvalerolactona, y ácido hidroxifenil-4-hidroxicinámico. En general, estos compuestos son de pequeño tamaño, por lo que son más fácilmente absorbibles en el intestino grueso, o ejercer una acción directamente en el colon, también pueden ser transportados para ejercer su actividad sobre los órganos que lo requieran, entre ellas la actividad antioxidante. Así mismo, se observó que las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos (F.AcOEt y F.BuOH) de la guayaba agria producen un aumento de las bacterias lácticas que son benéficas para la salud y convierten a los frutos de guayaba agria en un alimento con potencial efecto prebiótico. Además, la disminución del grupo de bacterias firmicutes indica un posible efecto de la guayaba para prevenir problemas de obesidad.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

❖ La aproximación sensórica para la caracterización de los compuestos volátiles activos olfativamente permitió identificar 18 compuestos, destacándose los compuestos de tipo azufrado disulfuro de dimetilo, 2-metilditiolano, metional, acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol y bis(metiltio)metano, los cuales se reportan por primera vez como compuestos activos olfativamente en *Psidium friedrichsthalianum* Nied.

❖ Se determinó por primera vez el rol de precursores de aroma (glicósidos y conjugados de S-cisteína), como precursores del 1-hexanol y 3-sulfanil-1-hexanol, mediante hidrólisis enzimática y fermentaciones con microbiota oral humana en condiciones anaerobias.

❖ Se demostró que la microbiota oral humana puede hidrolizar precursores glicosídicos y cisteinilados provenientes de *Psidium friedrichsthalianum* Nied., liberando compuestos activos olfativamente. Así mismo, se observó que los extractos de precursores de aroma disminuyen la población de bacterias orales (*Streptococcus* y *Actinomyces*) que son los primeros colonizadores en la formación de biopelículas dentales.

❖ Se identificaron, algunos compuestos de tipo fenólico en los frutos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied., mediante diversas técnicas: HPLC-MS, UPLC-ESI/TQ/MS/MS en tándem, UHPLC-Q/TOF/MS (para el análisis metabolómico), RMN <sup>1</sup>H. Encontrando compuestos en las fracciones con actividad antioxidante en el ensayo ABTS, algunos de ellos: ácido abscísico, ácido elágico, procianidina B1, procianidina B2, ácido gálico, ácido caféico, y ácido 4'-O-D-glucopiranosido 3,3',4-tri-O-metilelágico. Todos los compuestos excepto el ácido elágico y ácido 4'-O-D-glucopiranosido 3,3',4-tri-O-metilelágico se reportan por primera vez en esta tesis.

❖ Las bacterias fecales humanas en fermentaciones *in vitro* de las fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos de *Psidium friedrichsthalianum* Nied., tienen un efecto hidrolítico. A su vez, en las fermentaciones microbianas se observó un aumento de las bacterias lácticas y una disminución en los firmicutes, dicho resultado tiene un efecto positivo sobre la salud de los consumidores de la fruta o sus productos alimenticios derivados.

## 7. PUBLICACIONES Y PARTICIPACION EN EVENTOS

### 7.1. Artículos científicos

1. C. T. Cuadrado-Silva, M. A. Pozo-Bayón, C. Osorio. Identification of aroma compounds and precursors of sour guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) following a sensomics approach. *Eur. Food Res. Tech.* En prensa, DOI: 10.1007/s00217-016-2716-y 2016.
2. C. T. Cuadrado-Silva, M. A. Pozo-Bayón, C. Osorio. Targeted Metabolomic Analysis of Polyphenols with Antioxidant Activity in Sour Guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) Fruit. *Molecules*. Sometido
3. C. T. Cuadrado-Silva, M. A. Pozo-Bayón, C. Osorio. In vitro fermentation of *Psidium friedrichsthalianum* Nied. phenolic fractions by human gut microbiota. *J. Agric. Food Chem.* Manuscrito en preparación.
4. C. T. Cuadrado-Silva, M. A. Pozo-Bayón, C. Osorio. Ability of human oral microbiota to produce odourant compounds from *Psidium friedrichsthalianum* Nied. S-cysteine conjugates and glycosidic precursors. *Food Chem.* Manuscrito en preparación.

### 7.2. Presentaciones en Congresos

1. C. T. Cuadrado-Silva, M. A. Pozo-Bayón, C. Osorio. Chemical studies on *Psidium friedrichsthalianum* Nied. fruit flavour and their precursors. Presentación oral. XXV

SILAE CONGRESS Italo-Latinoamerican Society of Ethnomedicine. Septiembre 11-15, 2016. Modena - Italy.

### **7.3. Pasantía y cursos**

1. Pasantía en los laboratorios del Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, del CIAL perteneciente al CSIC y a la Universidad Autónoma de Madrid (España). Marzo-Septiembre de 2015.
2. Curso: «Tendencias actuales de la investigación en enología». Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL). CSIC y Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España. Abril de 2015.
3. Seminarios: “Fundamentos, nuevas tecnologías y extracción en fase sólida”, “nueva instrumentación cromatográfica”, “cromatografía y extracción con fluidos supercríticos-tecnologías nuevas para los desafíos en el laboratorio” y “espectrometría de masas, fundamentos, innovaciones, tecnologías y sus aplicaciones”. Waters. Bogotá D.C. Colombia. Julio de 2014.
4. Curso: « Procesamiento de Aromas para Alimentos». Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. Diciembre de 2013.

### **7.4. Soportes**

Author's personal copy

Eur Food Res Technol  
DOI 10.1007/s00217-016-2716-y

ORIGINAL PAPER

## Identification of aroma compounds and precursors of sour guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) following a sensomics approach

Carmen Tatiana Cuadrado-Silva<sup>1</sup> · María Ángeles Pozo-Bayón<sup>2</sup> · Coralia Osorio<sup>1</sup>Received: 11 March 2016 / Revised: 3 May 2016 / Accepted: 19 May 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** In this work, a sensomics approach was followed to determine the chemical constituents responsible for sour guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) aroma. The odour-active volatiles were isolated by solvent-assisted flavour evaporation (SAFE) with dichloromethane. By application of the aroma extract dilution analysis (AEDA), ethyl butanoate and ethyl hexanoate, 3-sulphanylhexyl acetate (sulphury), and  $\delta$ -dodecalactone (fruity) were identified with the highest flavour dilution factors among the 18 odour-active compounds. Quantitative measurements performed with the internal standard method allowed to calculate the odour activity values and revealed the important role of ethyl butanoate, (Z)-3-hexenal, and ethyl hexanoate as key aroma compounds in this fruit. The sulphur compounds, dimethyl disulphide, 2-methyl-1,3-dithiolane, methional, 3-sulphanylhexyl acetate, 3-sulphanyl-1-hexanol, and bis(methylthio)methane, are reported here as sensory relevant odorants to the flavour of this fruit. The role of hexyl- $\beta$ -L-glucopyranoside and 3-(1-hexanol)-L-cysteine as precursors of hexanol, and 3-sulphanyl hexanol, respectively, was demonstrated by enzymatic hydrolysis of corresponding precursor mixtures.

**Keywords** Myrtaceae · Odour-active volatiles · Glycosidic aroma precursors · Cysteine-S-conjugates · AEDA

✉ Coralia Osorio  
cosorior@unal.edu.co

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá AA 14490, Colombia

<sup>2</sup> Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera, 9, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

### Abbreviations

AEDA	Aroma extract dilution analysis
ESI	Electrospray ionisation
FD	Flavour dilution factor
FID	Flame ionisation detector
GC	Gas chromatography
GC-MS	Gas chromatography coupled to mass spectrometry
GC-O	Gas chromatography coupled to olfactometry
LC-MS	Liquid chromatography coupled to mass spectrometry
OAV	Odour activity value
SAFE	Solvent-assisted flavour extraction
SDE	Simultaneous steam distillation solvent extraction
SPE	Solid-phase extraction
SIM	Selected ion monitoring

### Introduction

Tropical fruits are mostly considered exotic because they are not yet commonly found in global markets, but have the potential to do so in view of their appearance, taste, and textural and nutritional quality parameters [1]. Additionally, the characteristic flavour of exotic fruits is one of the most attractive attributes to consumers [2]. Colombia has a large number of native unexplored fruit species, most of them exhibit a potential for their commercialisation at a large scale, which depends on performing adequate bio-prospecting studies.

“Guayaba agria” or sour guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) is a plant belonging to the Myrtaceae family [3], which grows naturally from southern Mexico to northern South America. It is also known as Cas guava or

Author's personal copy

Eur Food Res Technol

Costa Rican Guava. The fruit is consumed fresh (pulp), or it is used to prepare juices and sorbets, and exhibits a pleasant and intense aroma that resembles that of common guava (*Psidium guajava*) but with acid and sour notes. Until now, there is only one study that reports the volatile composition of this fruit [4]. In that work, the volatile extract of fruit pulp was isolated by simultaneous steam distillation solvent extraction (SDE) with diethyl ether. After GC–MS analyses, 173 volatile compounds were characterised, being the major constituents: (*E*)- $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -selinene,  $\beta$ -selinene,  $\delta$ -cadinene, 4,11-selinadiene, and  $\alpha$ -copaene. They were sensorially characterised by sniffing GC; however, there is no any study regarding the odour-active volatiles of this fruit.

Recently, the odour-active volatiles of common pink and white-fleshed guavas (*P. guajava* L, var. Regional roja and Regional blanca, respectively) were identified [5, 6], being the 3-sulphanylhexyl acetate and 3-sulphanyl-1-hexanol reported as key aroma compounds in both varieties of this fruit. Volatile sulphur compounds are important odorants because they usually exhibit low odour thresholds. The role of cysteine and cysteine-*S*-conjugates as precursor of these compounds has been reported in many plants such as, onion, passion fruit, bitter orange, asparagus, and bell pepper, among others [7]. Glycosides are another important type or aroma precursors in fruits [8], which are seen as a valuable source of natural flavours or for the enhancement of fruit-specific flavours [9].

Thus, the aim of this work was to apply combined analytical and sensory tools (sensomics approach) [10] to identify and quantify the odour-active volatiles of *P. friedrichsthalianum* fruit and to determine the role of glycosides and cysteine-*S*-conjugates as aroma precursors in this fruit.

## Materials and methods

### Fruits

Ripe fruits were acquired in local markets of Montería, Córdoba, Colombia, and they were selected according to their ripeness qualities. Titratable acidity was determined by standard procedures [11] using 10 g of pulp, by triplicate, and the results expressed as percentage of citric acid. The pH of the pulp was determined by using a Jenway pH meter (model 370, Essex, England). Total soluble solids were determined with an Atago refractometer (HRS-500, Tokyo, Japan), and the results were expressed as °Brix. A voucher specimen (COL 566221) was deposited at the Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.

### Chemicals

Dichloromethane, pentane, methanol, sodium sulphate (anhydrous), ethyl acetate, citric acid, sodium phosphate, ammonia (solution 25 % w/w), di-potassium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, Titriplex® III, and sodium hydroxide were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Pyridoxal 5'-phosphate-hydrate, dithiothreitol, phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, and emulsin ( $\beta$ -glucosidase) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and L-glutathione from Fluka (Laramie, USA). All solvents were freshly distilled prior to use. Liquid nitrogen was obtained from Linde (Munich, Germany).

The following compounds were commercially obtained from the sources given in parentheses and used as reference odorants:  $\delta$ -dodecalactone (Merck, Darmstadt, Germany); 2-methyl-3-pentanone, ethyl butanoate, (Z)-3-hexenal, 2-methyl-1,3-dithiolane, 2-ethyl-3(5 or 6)-dimethylpyrazine, methional, linalyl butyrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); *E*-2-pentenal, hexanol, linalool, bis(methylthio)methane, and 3-sulphanyl-1-hexanol (Alfa Aesar, Heysham, UK), and *n*-alkane mix (C<sub>10</sub>–C<sub>25</sub>) (Laboratory Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany). Dimethyl disulphide, ethyl hexanoate, and 3-methyl butanoic acid were generously supplied by DISAROMAS SA (Bogotá, Colombia). 3-Sulphanylhexyl acetate was synthesised in the laboratory according to the procedure reported by Steinhaus et al. [5].

### Isolation of volatile extract

Whole fruit (330 g) was homogenised using a commercial stainless steel blender. Dichloromethane (150 mL) was added to the puree, and then, with continuous stirring and cooling, anhydrous sodium sulphate (600 g) was added in small amounts. The mixture was filtered through defatted cotton wool, and the sodium sulphate/fruit powder obtained was washed with 300 mL of dichloromethane. The combined organic phases, exhibiting the characteristic aroma of *P. friedrichsthalianum* fruit, were extracted with SAFE distillation [12]. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated to 1 mL distilling off the solvent by means of a Vigreux column (50 × 1 cm).

### Gas chromatography–FID and gas chromatography olfactometry (GC–O)

The GC–O analyses were performed in a gas chromatograph HP 5890 Series II (Hewlett-Packard, USA) equipped with an FID. Two capillary columns, DB-FFAP and RTX-5 (each 30 m × 0,32 mm i.d., 0,25  $\mu$ m film thickness; J&W Scientific, Chromatographie Handel Müller, Fridolfing,

Germany, and Restek, USA, respectively) were used. The oven temperature for DB-FFAP column was programed from 40 °C (after 4 min) until 230 °C at 6 °C/min and finally held for 5 min. For the RTX-5, column oven temperature was programed from 40 °C (after 1 min) to 130 °C at 6 °C/min, then at 2 °C/min until 165 °C, then at 14 °C/min until 300 °C, and finally held for 4 min. The samples were injected in a split/splitless injection port at 300 °C in split mode (1:9), using Helium as carrier gas at 1.0 mL/min. The end of the capillaries were connected to a deactivated Y-shaped glass splitter (Chromatographie Handel Mueller, Fridolfing, Germany), which divides the effluent into two equal parts, one for FID (230 or 300 °C) and the other for a heated sniffing port (230 or 300 °C), by using deactivated fused silica capillaries of the same length.

#### Aroma extract dilution analysis (AEDA)

Three panellists identified the odour-active zones of *P. friedrichsthalianum* fruit SAFE extract. For that purpose, this aroma extract was stepwise diluted to obtain dilutions of 2<sup>n</sup>, and each solution was analysed by GC–O [13]. The odour activity of each compound, expressed as flavour dilution factor (FD), was determined as the greatest dilution at which that compound was still detected by comparing all of the runs [14]. The FD factors obtained by three panellists were averaged.

#### Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

GC–MS analyses were performed on QP 5050 mass selective detector coupled to a Shimadzu GC17A gas chromatograph (Shimadzu, Tokyo, Japan), under the same chromatographic conditions as it was mentioned above for GC analyses in DB-FFAP column. MS data were recorded in a mass range 40–350 u, with electron energy of 70 eV and processed by Class 5000 v 2.2 MS-Workstation software.

#### Selective enrichment of volatile thiols

The volatile extract, obtained from 370 g of whole fruit in the same way as it was before described, was concentrated to 1 mL, and the thiols were isolated by affinity chromatography on mercurated agarose gel [15]. The concentrated sample (0.5 mL) was applied onto a glass column (2 cm × 0.5 cm i.d.) filled with mercurated agarose gel. After flushing the material with *n*-pentane/dichloromethane (50 mL; 2:1 v/v), the thiols were eluted with dithiothreitol (10 mmol/L) in *n*-pentane/dichloromethane (50 mL; 2:1 v/v). Dithiothreitol was removed by SAFE distillation, and the distillate was concentrated to 100 µL. The thiol-rich fraction was analysed by GC–O and GC–MS using a DB-FFAP column in the above-mentioned conditions but on

splitless mode. Also, the other non-sulphur compound fraction was analysed and compared with the profile obtained for the whole SAFE extract.

#### Identification

Linear retention indexes were calculated according to the Kovats method using a mixture of normal paraffin C<sub>10</sub>–C<sub>25</sub> as external references. The identification of volatile compounds was completed by comparison of their retention indexes (in two columns), mass spectra, and odour notes with those exhibited by standard solutions of volatiles (50 µg/mL), if they are available.

#### Quantitation of key aroma compounds

Quantitative analyses of *P. friedrichsthalianum* odour-active volatiles exhibiting dilution factor higher than 16 were performed by internal standard (IS) method. For this purpose, ethyl cinnamate (98 %, 50 µg, Alfa Aesar, Heysham, UK) was selected as internal standard, dissolved in the extraction solvent (100 mL), and added to homogenised fruit (250 g) before extraction by SAFE distillation. To determine the response factor for each volatile compound, calibration lines were constructed using a series of solutions of varying nominal concentrations containing each analyte (IS/analyte, 1:5 until 5:1), where the slope was assumed as the response factor. An identical amount of internal standard was added to each solution, and the corresponding chromatograms obtained [16]. All data were obtained by triplicate. The concentration of each analyte was calculated by comparison of GC-FID signals with those of standards, taking into account the relative response factor, according to the following equation:

$$[X] = \frac{A_x}{A_{\text{istd}}} \times \frac{\mu\text{gIS}}{\text{kg fruit}} \times \text{RF}^{-1}$$

where [X] is the analyte concentration in mg/kg fruit, A<sub>X</sub> is the analyte area, A<sub>istd</sub> is the internal standard area, and RF is the response factor.

#### Determination of odour threshold of linalyl butyrate

The orthonasal odour threshold of linalyl butyrate (CAS number: 78-36-4; purity: ≥95 %; Sigma-Aldrich) was determined using a panel of 14 judges (12 females) recruited from the Chemistry Department of Universidad Nacional de Colombia. Ages were ranged from 20 to 40 years (mean 29.29, SD = 7.37), and none of the judges reported olfactory dysfunction. The ASTM procedure was followed for the determination of odour thresholds by the method of limits with an ascending concentration series using three-alternative forced-choice (3AFC) judgements

Author's personal copy

Eur Food Res Technol

at each concentration step [17]. It consists of a series of 3AFC presentations, each containing one target sample and two blank samples. In order to allow a testing series of eight 3AFC presentations, eight discrete concentration steps of the target odorant with a constant dilution factor of three per step throughout the scale were made. For each 3AFC trial, 20-mL aliquots of each concentration were separately placed into cylindrical ground neck glasses (7 cm × 3.5 cm) with lids and were orthonasally evaluated. In addition, two blank presentations in which filtered water was used as solvent were also evaluated. For each 3AFC presentation, the judge is required to identify the sample with the target odorant or to discriminate the sample that is different from the other two. The threshold estimation was based on the stopping rule (last reversal), and the group best-estimate thresholds (BETs) was the geometric average of individual BETs. The estimated odour threshold was expressed in concentration units ( $\mu\text{g/L}$ ) [18, 19].

#### Glycosidically bound volatiles

Ripe fruits (975 g) were homogenised with water adjusting pH to 7 with NaOH (5 N) and centrifuged (10,000g, 5 °C, 1 h). The supernatant (300 mL) was applied onto an Amberlite XAD-4 glass column (25 × 5 cm, 1.5 mL/min) [20]. The resin was rinsed with 5 litres of deionised water, and elution of glycosides was performed with 1 L of methanol. Methanol fraction was concentrated to dryness under vacuum at 40 °C, extracted with ethyl acetate to remove residual volatiles and lyophilised to obtain 4.0 g of crude glycosides.

To release glucosidically bound volatiles, 50 mg of *P. friedrichsthalianum* glycosides were dissolved in 3 mL of citric acid–phosphate buffer solution (pH 5.0, 0.1 M). Then, 100  $\mu\text{g}$  of a commercially available  $\beta$ -glucosidase (emulsin, Sigma-Aldrich) and phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (100  $\mu\text{g}$ ) as internal standard were added to the above-mentioned solution, and the mixture was incubated over 24 h at 37 °C. The liberated aglycons were successively extracted with ethyl acetate, dried over anhydrous sodium sulphate, and concentrated to 0.2 mL with nitrogen. Then, this extract was analysed by GC–O and GC–MS analyses in DB-FFAP and RTX-5 columns, under above-mentioned conditions. Blank experiments were performed in the same conditions, one without glycosides and the other without enzyme. To evaluate the effect of pH and temperature during volatile release, 50 mg of *P. friedrichsthalianum* glycosides were dissolved in 3 mL of citric acid–phosphate buffer solution (pH 3.3, 0.1 M), and placed in a sealed ampule for 2 h at 100 °C. The volatile products were extracted with ethyl acetate, dried over anhydrous sodium and concentrated to 0.2 mL by using nitrogen, and then, analysed by GC–MS.

#### Analysis of cysteine-S-conjugates

The freeze-dried fruit (60 g) was homogenised with water (300 mL), ethanol (80 mL), and formic acid (2 mL), and processed in a commercial stainless steel blender to obtain a slurry (2–3 min). The emulsion was centrifuged (10,000g, 5 °C, 45 min), and the clear supernatant was concentrated up to 50 mL under vacuum at 30 °C and loaded on a Dowex 50WX8 (hydrogen form, Sigma-Aldrich) column (6 × 9.5 cm). The column was rinsed with water to neutrality and then stepwise eluted with 40-mL portions of aqueous ammonia (0.3, 0.6, 0.9, 1.5, 2.1, and 2.8 M). Fractions eluted with 0.9 M to 2.1 M ammonia solutions were pooled together. Ammonia was removed under vacuum, and the extracts were lyophilised to give 970 mg of extract [21], part of which was used for enzymatic treatment.

To release free thiols from cysteine-S-conjugates, a buffered solution of potassium phosphate (100 mM, pH 8) containing ethylenediaminetetraacetic acid (1 mM), pyridoxal 5-phosphate (0.1 mM), and L-glutathione in reduced form (1 mM) was prepared. Apotryptophanase (from *Escherichia coli*, activity 75–150 units/mg, Sigma-Aldrich) was freshly prepared (1 mg in 0.5 mL of buffer). A solution of the cysteine-S-conjugates (200 mg) in the buffer (5 mL) was prepared. The enzyme (0.5 mL) was added to the solution, and the mixture was incubated for 30 min at 35 °C in a sealed 20-mL solid-phase microextraction vial [21]. Blank experiments were performed in the same conditions, one without precursors and the other without enzyme.

The volatile thiols were collected on the headspace of the vial for 5 min at 35 °C with a DVB/CAR/PDMS fibre (70  $\mu\text{m}$  thickness, Supelco) and then directly injected (desorption time was set at 5 min at 250 °C) into an QP 5050 GC–MS (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a FFAP fused silica column and operating in splitless mode, using the above-mentioned temperature program. The occurrence of thiols was searched with the MS in SIM mode (ion fragments at  $m/z$  55, 59, 77, and 101).

#### LC/ESI-MS analyses

Characterisation of the crude glycosidic mixture was done by LC–MS using a Shimadzu LCMS-2010 System (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a UV/Vis detector (SPD-10A) and two pumps (LC-10AD) coupled online with a MS-2010 mass spectrometer. UV and MS data were acquired and processed using Shimadzu LCMS Solution software. The equipment also included an online DGU-14A degasser and a Rheodyne injection valve with a 5- $\mu\text{L}$  loop. A Kinetex C<sub>18</sub> 2.6- $\mu\text{m}$  column (150 × 2.0 mm i.d., Phenomenex®, USA) was used. The solvent system was a mixture of water/formic acid (99.9:0.1, v/v, solvent A)

and acetonitrile/formic acid (99.9:0.1, v/v, solvent B), and the flow rate was 0.2 mL/min. The linear gradient used was set up as follows: from 0 % B at 0–10 min, 0–15 % B at 10–45 min, 15–50 % B at 45–70 min, 50–100 % B at 70–75 min, 100 % B at 75–80 min, and then return to initial conditions. The electrospray ionisation (ESI) probe was operated in positive scan mode: CDL, 300 °C; block at 240 °C; flow gas (N<sub>2</sub>) at 1.5 L/min; CDL voltage, 150.0 kV; Q array voltage RF 150 V; detector voltage, 1.5 kV; and scan range *m/z* 100–800. Prior to injection (volume of 100 µL), all samples were filtered through a 0.45-µm Milipore membrane filter [8].

The cysteine-S-conjugates were also analysed by LC-MS in the above-described conditions, but with a different solvent gradient. The gradient profile started at 10 % of B at 0.5 min, increased to 30 % of B in 8.4 min, and then to 90 % of B in 2.1 min. The flow rate was 0.3 mL/min. In this case, the analyses were performed in SIM mode using the ion fragments *m/z* 222, 220, 122, and 120 [21].

### Sensory analyses

The aroma profile of *P. friedrichsthalianum* fruit was evaluated by ten trained panellists from the Universidad Nacional de Colombia. Sensory experiments were performed at 20 ± 1 °C in a sensory room with single cabins. Homogenised fruit pulp (20 g) was placed into cylindrical glass vessels (7 cm × 3.5 cm) which were closed with glass lids. The assessors were asked to orthonasally evaluate the intensity of six descriptive sensory attributes from the overall aroma of the fruit on a non-structural scale from 0 to 3, with 0 = not detectable, 1.5 = weak, 3 = strong [22]. The aroma descriptors were compared with aqueous solutions of the following reference odorants: ethyl butanoate (fruity), δ-dodecalactone (sweet), (Z)-3-hexenal (green), 3-methyl butanoic acid (rancid-fermented), linalool (citrus-flowery), and 3-sulphanylhexyl acetate (sulphury). The concentrations of the reference odorant solutions were 100 times higher than the respective concentration of odour threshold. Before the analysis, panellists were trained not only in the recognition of descriptors, but also in the handling of intensity scales. Finally, the data were analysed by variance and regression analysis, and average values were compared using Tukey's test with a probability  $p \leq 0.05$ . These results were plotted in a spider web diagram. All samples were evaluated in two replicate sessions.

For recombination experiments, appropriate amounts (20–100 µL) of aqueous or ethanolic stock solutions of the odorants (those exhibiting OAV >1) were mixed and made up to 1 L with water to yield the same concentrations as determined in *P. friedrichsthalianum* fruits. Final ethanol concentration was kept below 1 g/L, that is, below the odour threshold of ethanol. A second recombined mixture

was prepared as it was already explained, but including methional, 3-sulphanylhexyl acetate, δ-dodecalactone, and bis(methylthio)methane in an equivalent amount to their threshold value. The overall aroma profile of both model mixtures was determined in the same way as described above for the fresh fruit.

### Results and discussion

*Psidium friedrichsthalianum* fruits exhibit an intense and pleasant aroma, similar to that happens with the common guava (*P. guajava*). However, the volatile compounds responsible for the typical *P. friedrichsthalianum* aroma remained unknown. In order to gain insight into the chemical compounds impacting its aroma characteristic, fruits were selected according to their ripeness, based on the values of the following parameters: pH (2.67 ± 0.06), soluble solid content (9.6 ± 0.3°Brix), and titratable acidity expressed as citric acid percentage (2.75 ± 0.08 %). Dichloromethane was selected as solvent for volatile extraction because the odour evaluation of this extract showed greater similarity to the fruit flavour in comparison with those exhibited by pentane or diethyl ether.

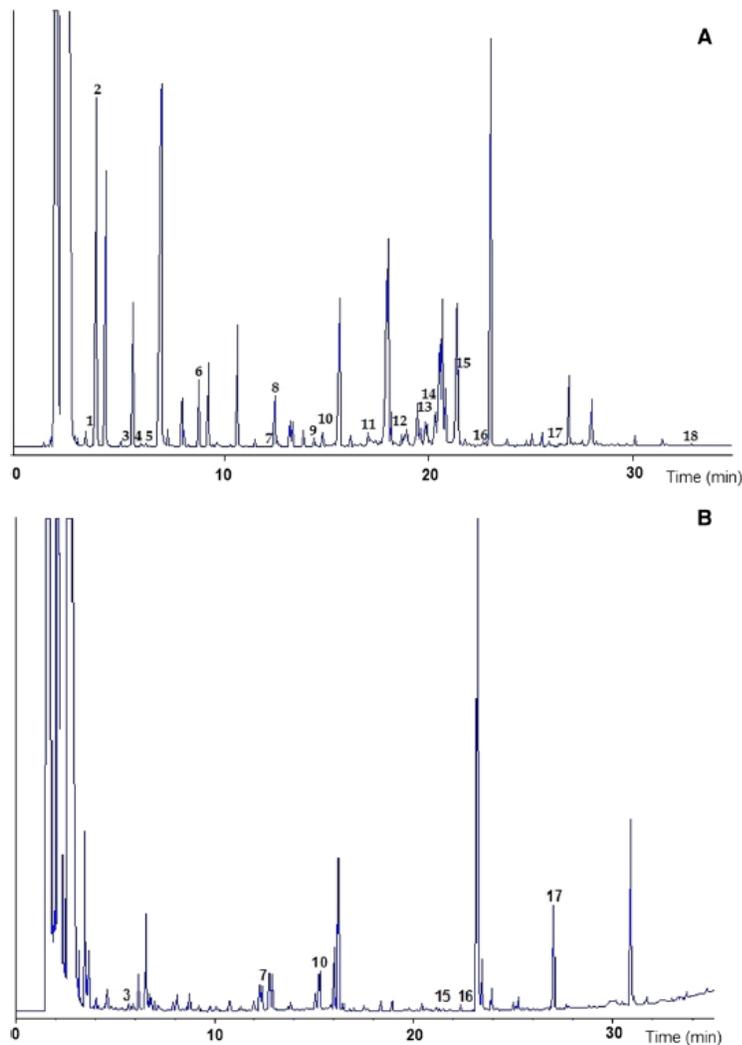
AEDA analysis of SAFE extract of the whole fruits (without seeds) revealed 18 odour-active volatile compounds (Fig. 1a), as responsible for fruity, sweet, green, citrus, sulphury, and rancid-fermented odour notes exhibited by *P. friedrichsthalianum* fruits. The volatile compounds with the highest FD values were ethyl butyrate, ethyl hexanoate, 3-sulphanylhexyl acetate, and δ-dodecalactone (Table 1). In this work, some compounds were detected for the first time as volatile constituents of *P. friedrichsthalianum* fruit because SAFE distillation of the extract under high vacuum at ambient temperature is a gentle approach for the isolation of food volatiles. This is the case of sulphur compounds, dimethyl disulphide, 2-methyl 1,3-dithiolane, methional, 3-sulphanylhexyl acetate, 3-sulphanyl-1-hexanol, and bis(methylthio)methane, which are thermally labile and exhibit low odour thresholds. During GC analyses of the SAFE extract, these compounds did not show any analytical signal, but their presence was detected by GC-O. Thus, the isolation of a thiol-enriched SAFE extract allowed confirming their presence as odour-active volatiles (Fig. 1b).

A number of the odour-active volatiles found in fruits of *P. friedrichsthalianum* have also been reported as odour-active compounds in other fruits belonging to the Myrtaceae family: ethyl butanoate, ethyl hexanoate, hexanol, and linalool in *Campomanesia lineatifolia* [23]; hexanol, linalool, and 3-methyl butanoic acid in *Syzygium jambos* [24]; and ethyl butanoate, (Z)-3-hexenal, methional, linalool, 3-sulphanylhexyl acetate, and 3-sulphanyl-1-hexanol

Author's personal copy

Eur Food Res Technol

**Fig. 1** GC analyses on DB-FFAP column of volatile compounds from *P. friedrichsthalianum* fruit obtained by, **a** SAFE extract, **b** SAFE extract and selective enrichment of volatile thiols. *Peak numbers* correspond to the compound numbers in Table 1



in *P. guajava* [6, 25]. These examples suggested that the catabolism of straight-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation (production of ethyl butanoate and ethyl hexanoate), the enzymatic oxidative degradation of linolenic acid via 13-lipoxygenase (production of hexanol and (*Z*)-3-hexenal), and terpenoid biosynthetic pathway (production of linalool and linalyl butyrate) are highly activated contributing to the flavour of Myrtaceae fruits (Fig. 2).

The role of glycosides as aroma precursors in *P. friedrichsthalianum* fruit was also studied. Thus, a glycosidic extract was obtained by SPE over Amberlite XAD-4 resin. First, the glucosidically bound volatiles were release from

glycosidic mixture by hydrolysis using a commercial glucosidase. The obtained extract was analysed by GC-MS, and among several volatiles, only hexanol (562.4 mg/kg fruit) was identified as odour-active volatile released from glycosidic precursors, suggesting the presence of hexyl- $\beta$ -D-glucopyranoside in this extract. This result was further confirmed by LC-ESI/MS analysis of the glycosidic mixture. The ESI-MS spectrum in positive mode of the compound, with retention time of 2.7 min (Fig. 3), showed and adduct ion at  $m/z$  287  $[M + Na]^+$ , the pseudomolecular ion  $m/z$  265  $[M + H]^+$ , as well as the ion at  $m/z$  103 corresponding to the protonated aglycone [hexanol +  $H$ ] $^+$ .

Author's personal copy

Eur Food Res Technol

**Table 1** Odour-active volatiles detected in SAFE extract from *Psidium friedrichsthalianum* fruit

No. <sup>a</sup>	Compound <sup>b</sup>	Odour description <sup>c</sup>	RI <sup>d</sup>		FD <sup>e</sup>	Response factor	Conc ± SD (% CV) (µg/kg fresh fruit) <sup>f</sup>	Odour threshold (µg/kg water)	OAV <sup>g</sup>
			FFAP	RTX-5					
1	2-Methyl-3-pentanone	Green	1003	–	4	–	–	–	–
2	Ethyl butanoate	Fruity	1018	816	256	0.541	21,414 ± 212 (0.99)	1 <sup>k</sup>	21,414
3	Dimethyl disulphide	Onion	1091	818	4	–	–	–	–
4	( <i>E</i> )-2-Pentenal	Strawberry	1115	785	8	–	–	–	–
5	( <i>Z</i> )-3-Hexenal	Green	1124	799	64	0.064	283 ± 12 (4.33)	0.25 <sup>k</sup>	1132
6	Ethyl hexanoate	Fruity	1221	1005	256	0.758	7574 ± 138 (4.33)	1 <sup>k</sup>	7574
7	2-Methyl-1,3-dithiolane	Sulphury	1358	978	4	–	–	–	–
8	Hexanol <sup>h</sup>	Herbal, fruity	1368	850	4	–	–	–	–
9	2-Ethyl-3(5 or 6)-dimethyl pyrazine	Potato-like	1437	1033	4	–	–	–	–
10	Methional	Cooked potato	1454	926	64	–	–	0.2 <sup>k</sup>	–
11	Linalool	Flowery, citrus	1569	1130	64	0.943	433 ± 14 (3.19)	6 <sup>k</sup>	72
12	Linalyl butyrate	Sweet	1623	1464	64	0.952	1236 ± 22 (1.78)	3.62	341
13	3-Methyl butanoic acid	Rancid	1672	863	16	0.234	7781 ± 254 (3.26)	120 <sup>k</sup>	65
14	2-Ethenyl-3-ethyl-5-methylpyrazine <sup>i</sup>	Earthy	1693	1196	8	–	–	–	–
15	3-Sulphanylhexyl acetate	Sweat, sulphury	1769	1255	128	–	–	0.029 <sup>j</sup>	–
16	3-Sulphanyl-1-hexanol <sup>j</sup>	Passion fruit-like	1856	1134	4	–	–	–	–
17	bis(Methylthio) methane	Sulphury	2001	1396	32	–	–	–	–
18	δ-Dodecalactone	Sweet	2432	1728	128	–	–	1000 <sup>k</sup>	–

<sup>a</sup> Odorants were numbered according to their retention time on FFAP column<sup>b</sup> Odorants were identified by comparing their retention indices on the FFAP and DB-5 column, their mass spectra, and their odour notes with respective data of reference compounds<sup>c</sup> Odour note as perceived at the sniffing port during GC–O analysis<sup>d</sup> Retention index<sup>e</sup> Flavour dilution factor<sup>f</sup> All data are the mean of three measurements ± standard deviation. In all of the cases, correlation coefficient was higher than 0.975<sup>g</sup> OAV odour activity value, concentration divided by odour threshold<sup>h</sup> Released from glycosidic extract of the fruit with emulsin (β-glucosidase)<sup>i</sup> Tentatively identified based only on its retention index and mass spectrum<sup>j</sup> Released from cysteine-*S*-conjugates by enzymatic hydrolysis<sup>k</sup> Leffingwell [27]<sup>l</sup> Steinhaus et al. [25]

– Not determined

Hexyl-β-D-glucopyranoside could be biosynthesised after hexanol is generated by lipoxygenase pathway [8]. Interestingly, hexanol was not released when the hydrolysis was performed at pH of the fruit without the enzyme.

For quantitative analysis, ethyl cinnamate was selected as the internal standard, and the aroma potency of each individual odorant was correlated with the respective odour

threshold value in water (OAV value) (Table 1). The odour threshold for linalyl butyrate was determined because it was not reported in the literature. Based on OAVs, ethyl butanoate, (*Z*)-3-hexenal, and ethyl hexanoate were identified for the first time as key aroma compounds in *P. friedrichsthalianum* fruits. It was not possible to evaluate the contribution of sulphur compounds, 3-sulphanylhexyl

Author's personal copy

Eur Food Res Technol

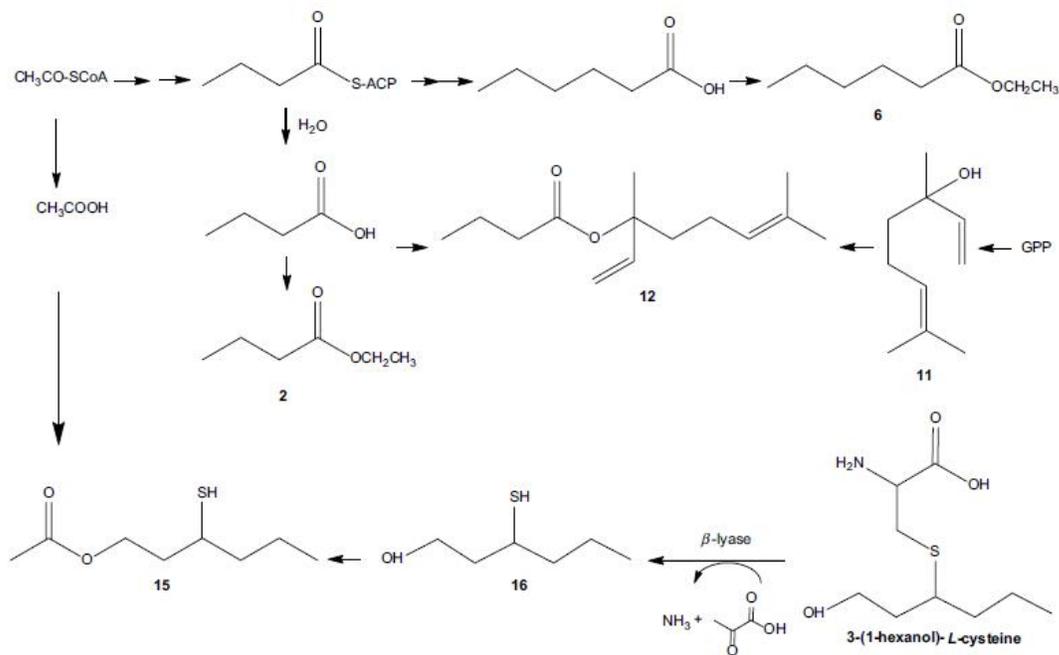


Fig. 2 Proposed biogenic correlation of some odour-active volatiles in *P. friedrichsthalianum* fruit (compound numbers correspond to those described in Table 1) and the precursor 3-(1-hexanol)-L-cysteine. CoA coenzyme A, ACP acyl carrier protein, GPP geranyl pyrophosphate

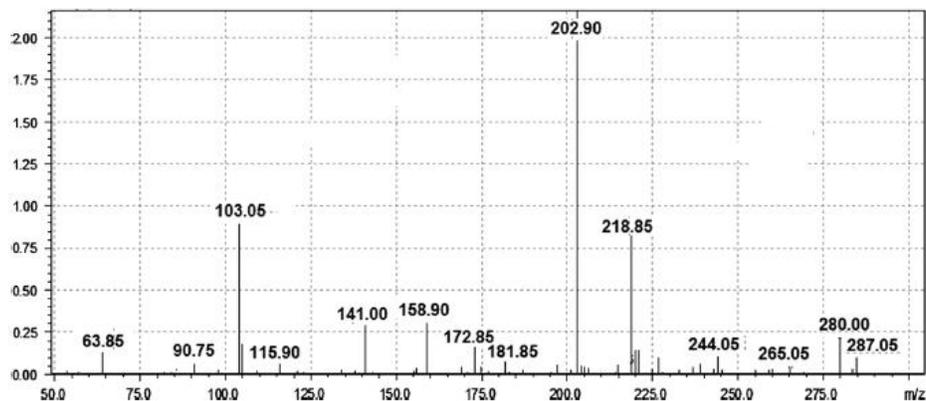


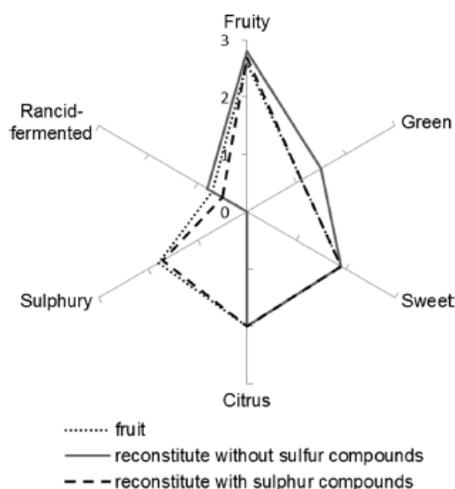
Fig. 3 EIMS of hexyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, detected in the glycosidic extract of *P. friedrichsthalianum* fruit

acetate, methional, and bis(methylthio)methane, as well as of  $\delta$ -dodecalactone because of the lack of instrumental signal using GC-FID during quantitative analyses.

To confirm the quantitation of odour-active volatiles, aroma reconstitutes were prepared by using commercial standards in the concentration determined by the

Author's personal copy

Eur Food Res Technol



**Fig. 4** Comparative aroma sensory profiles of *P. friedrichsthalianum* fruit and aroma recombined mixtures without and with sulphur compounds

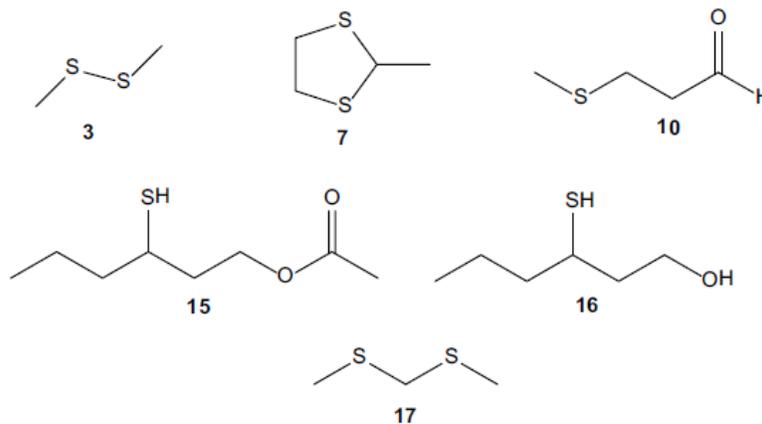
quantitative analyses. This extract was sensory evaluated by a trained panel in comparison with the fruit puree (Fig. 4). The panellists described the orthonasal aroma as synthetic (no natural) with little resemblance to the fruit, being the green and rancid-fermented odour notes over-expressed. Considering these appreciations, a second reconstituted aroma mixture was prepared including the sulphur compounds in a concentration equal to their threshold values. When this reconstituted aroma mixture was presented to

the panel, the result was a good resemblance between the original flavour of the fresh fruit and the new recombined aroma mixture. The synthetic impression disappeared, the whole aroma was modulated, and the characteristic tropical aroma was detected. The intensity of sulphury and green note, was the main difference among the two recombined mixtures. These results are very relevant showing that sulphur compounds (Fig. 5) are key aroma compounds in this fruit, giving a distinctive sign to the *P. friedrichsthalianum* fruit aroma.

With the aim to find the precursors of sulphur volatiles, the cysteine-*S*-conjugates were obtained and the volatile compounds released by enzymatic hydrolysis were analysed by GC and GC-MS. Only 3-sulphanyl-1-hexanol was detected in this analysis. Then, the cysteine-*S*-conjugate extract was analysed by HPLC-MS, finding a peak at retention time of 2.4 min, in which the following ions were selected for SIM mode detection: 222 [M + 1] and 220 [M - 1] to detect the 3-(1-hexanol)-L-cysteine residue, and 122 [M + 1], and 120 [M - 1] to measure the cysteine fragment. Thus, the presence of 3-(1-hexanol)-L-cysteine was confirmed in this fruit. The role of this compound as precursor of 3-sulphanyl-1-hexanol in Sauvignon blanc grape has been already published elsewhere [7, 26]. Thus, it could be also suggested a relationship with the straight-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation biogenetic pathway to produce 3-sulphanylhexyl acetate (Fig. 2).

In conclusion, the relevance of aliphatic esters,  $C_6$  compounds, and sulphur compounds as odour-active volatiles of *P. friedrichsthalianum* fruit was demonstrated through the correlation between fruit and reconstituted aroma during sensory analysis. Additionally, the role of glycosides

**Fig. 5** Sulphur volatile compounds identified as odour-active in *P. friedrichsthalianum* fruit (compound numbers correspond to those described in Table 1)



Author's personal copy

Eur Food Res Technol

and cysteine-*S*-conjugates as aroma precursors of hexanol and 3-sulphanyl-1-hexanol, respectively, was also reported for the first time in this fruit.

**Acknowledgments** Financial support from Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Contract No. 0459–2013, Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-RIFRUTBIO, and DIB (División de Investigación-Sede Bogotá)-Universidad Nacional de Colombia is gratefully acknowledged. C. T. Cuadrado-Silva thanks financial support of a scholarship from Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS). Dr. Diana Sinuco from Department of Chemistry is thanked for helping with sensory evaluations and for tuning the GC-MS equipment.

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Compliance with ethics requirements** This article does not contain any studies with human or animal subjects.

## References

1. Fernandes FAN, Rodrigues S, Law C, Mujumdar AS (2011) Food Bioprocess Technol 4:163–185
2. Lasekan O, Abbas KA (2012) Crit Rev Food Sci 52:726–735
3. Lim TK (2012) Edible medicinal and non-medicinal plants, volume 3, fruits. Springer, New York, pp 681–683
4. Pino JA, Marbot R, Vazquez C (2002) J Agric Food Chem 50:6023–6026
5. Steinhaus M, Sinuco D, Polster J, Osorio C, Schieberle P (2008) J Agric Food Chem 56:4120–4127
6. Sinuco DC, Steinhaus M, Schieberle P, Osorio C (2010) Eur Food Res Technol 230:859–864
7. Starkenmann C, Troccaz M, Howell K (2008) Flavour Fragr J 23:369–381
8. Conde-Martínez N, Sinuco DC, Osorio C (2014) Food Chem 157:356–363
9. Winterhalter P, Knapp H, Straubinger M (1999) In: Teranishi R, Wick EL, Hornstein I (eds) Flavor chemistry: thirty years of progress. Springer, New York, pp 255–266
10. Hofmann T, Schieberle P (2014) In: Taylor AJ, Mottram DS (eds) Flavour science. Proceedings of the XIV weurman flavour research symposium. Context Products Ltd, Leicestershire, pp 3–18
11. AOAC (2006) Official methods of analysis of AOAC international, 18th edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg
12. Engel W, Bahr W, Schieberle P (1999) Eur Food Res Technol 209:237–241
13. Schieberle P (1995) In: Gaonkar AG (ed) Characterization of food: emerging methods. Elsevier, Amsterdam, pp 403–431
14. Grosch W (1994) Flavour Fragr J 9:147–158
15. Steinhaus M, Wilhelm W, Schieberle P (2007) Eur Food Res Technol 226:45–55
16. IOFI, Working Group on Methods of Analysis (2011) Flavour Fragr J 26:297–299
17. American Society of Testing and Materials (ASTM), Standard E679-04 (2005) In: ASTM Book of Standards, American Society of Testing and Materials, West Conshohocken, vol 15.08, pp 38–44
18. Czerny M, Christlbauer M, Christlbauer M, Fisher A, Granvogl M, Hammer M, Hartl C, Moran Hernandez N, Schieberle P (2008) Eur Food Res Technol 228:265–273
19. Peng M, Jaeger SR, Hautus MJ (2012) Food Qual Prefer 25:95–104
20. Osorio C, Duque C, Fujimoto Y (2000) Phytochemistry 53:97–100
21. Starkenmann C, Niclass Y (2011) J Agric Food Chem 59:3358–3365
22. Lawless HT, Heymann H (2010) Sensory evaluation of foods: principles and practices, 2nd edn. Springer, New York
23. Osorio C, Alarcon M, Moreno C, Bonilla A, Barrios J, Garzón C, Duque C (2006) J Agric Food Chem 54:509–516
24. Guedes CM, Pinto AB, Moreira RFA, De Maria CAB (2004) Eur Food Res Technol 219:460–464
25. Steinhaus M, Sinuco DC, Polster J, Osorio C, Schieberle P (2009) J Agric Food Chem 57:2882–2888
26. Tominaga T, Murat M-L, Dubourdieu D (1998) J Agric Food Chem 46:1044–1048
27. Leffingwell & Associates (1991) GRAS flavor chemicals-detection thresholds. Perfum Flavor 16:1–19

ENG

## Chemical Studies on *Psidium friedrichsthalianum* Nied. Fruit Flavour and their Precursors

Cuadrado, C. T.<sup>1</sup>; Del Pozo-Bayón, M.<sup>2</sup>; Osorio, C.<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, AA 14490, Bogotá, Colombia<sup>2</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera, 9, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

\*cosorior@unal.edu.co

### Introduction

The Myrtaceae family comprises woody trees and shrubs containing a variety of oils which release characteristic odours. Centres of diversity for the family are the west tropics (mainly South America), Australia, and tropical Asia. There are four genera of interest which produce edible fruit: *Psidium*, *Eugenia*, *Syzygium*, and *Feijoa*. Among them, “guayaba agria” or sour guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) grows naturally from southern Mexico to northern South America. The fruit is consumed fresh (pulp) or it is used to prepared juices and sorbets, and exhibits a pleasant and intense aroma. Until now, there is only one study that reports the volatile composition of this fruit [1], however no any sensory analysis was performed before to identify the odour-active volatiles.

### Method

The odour-active volatiles of whole fruits were isolated by Solvent Assisted Flavour Evaporation (SAFE) of dichloromethane extract. GC-O and GCMS analyses allow identifying all volatile organic compounds relevant to the flavour of this fruit, by comparison with standards. A thiol-rich fraction was obtained by affinity chromatography on mercurated agarose gel [2]. The glycosidic-rich fraction was isolated by selective adsorption on Amberlite XAD-4 glass column and methanol elution [3]. Glycosidically bound volatiles were released by enzymatic hydrolysis with a  $\beta$ -glucosidase (emulsin, Sigma-Aldrich) and analysed also by GCMS. Based on the presence of sulphur volatile compounds, the cysteine-S-conjugates were isolated by using a Dowex 50WX8 resin and eluting with ammonia [4]. The identity of glucosides and cysteine-S-conjugates were elucidated from their analyses by HPLC-ESI/MS.

### Results / Discussion / Conclusion

GC-O and GC-MS analyses of *P. friedrichsthalianum* fruit SAFE extract allow identifying ethyl butanoate, (Z)-3-hexenal, and ethyl hexanoate as key aroma compounds of this fruit. Other relevant odorants to the overall aroma were the sulphur compounds: dimethyl disulfide, 2-methyl 1,3-dithiolane, methional, 3-sulfanylhexyl acetate, 3-sulfanyl-1-hexanol, and bis(methylthio)methane, as well as,  $\delta$ -dodecalactone. Sulphur compounds were reported here for first time as odour-active volatiles in this fruit and based on sensory experiments, they could be considered the responsible for the characteristic flavour of this fruit. Hexyl  $\beta$ -D-glucopyranoside was identified as aroma precursor after HPLC-ESI/MS analyses of the glycosidic mixture and GCMS analyses of enzymatically released volatiles with a glucosidase. The role of hexyl- $\beta$ -D-glucopyranoside and 3-(1-hexanol)-L-cysteine as precursors of hexanol, and 3-sulfanyl hexanol, respectively, was demonstrated by enzymatic hydrolysis of corresponding precursor mixtures. In conclusion, the relevance of aliphatic esters, C<sub>6</sub>-compounds, and sulphur compounds as odour-active volatiles of *P. friedrichsthalianum* fruit was demonstrated in this study through the correlation of analytical data and sensory analyses.

**Acknowledgements.** Authors greatly appreciate the financial support provided by Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contract No. 0459 – 2013, Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-RIFRUTBIO.

### Bibliographic References

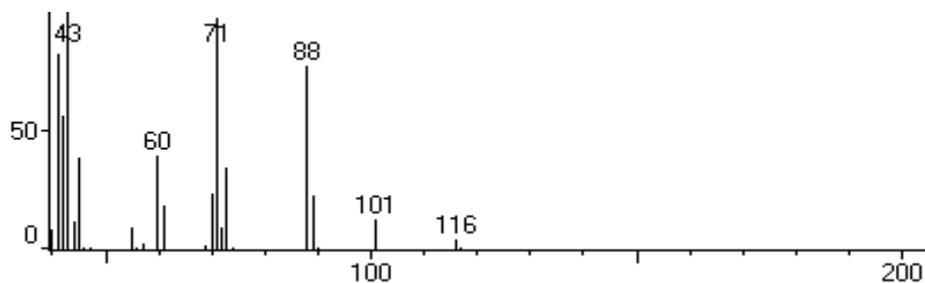
1. Pino, J.A., Marbot, R., Vazquez, C. (2002) *J. Agric. Food. Chem.*, 50: 6023–6026.
2. Steinhaus, M., Wilhelm, W., Schieberle, P. (2007) *Eur. Food Res. Tech.*, 226: 45–55.
3. Mayorga, H., Duque, C., Knapp, H., Winterhalter, P. (2002) *Phytochemistry*, 59: 439-445.
4. Starkenmann, C., Niclass, Y. (2011) *J. Agric. Food Chem.*, 59: 3358–3365



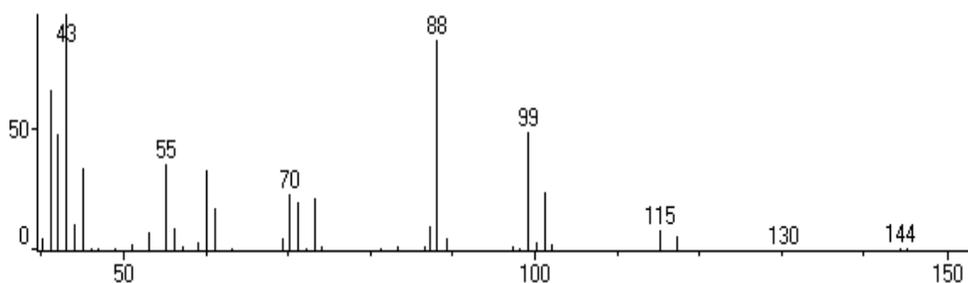
## Anexos

### A. Anexo: Espectros de masas obtenidos mediante CG-EM para los compuestos impacto del aroma de los frutos de la guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) y los productos de hidrólisis de los precursores

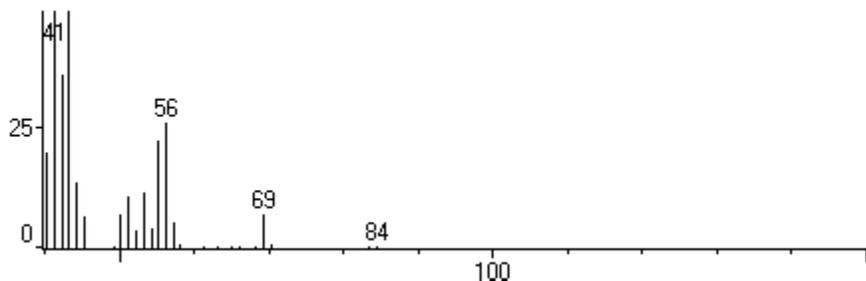
Butanoato de etilo (IK = 1018)



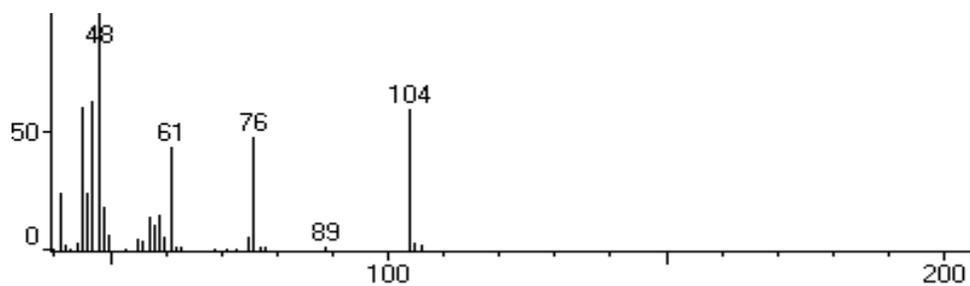
Hexanoato de etilo (IK = 1221)



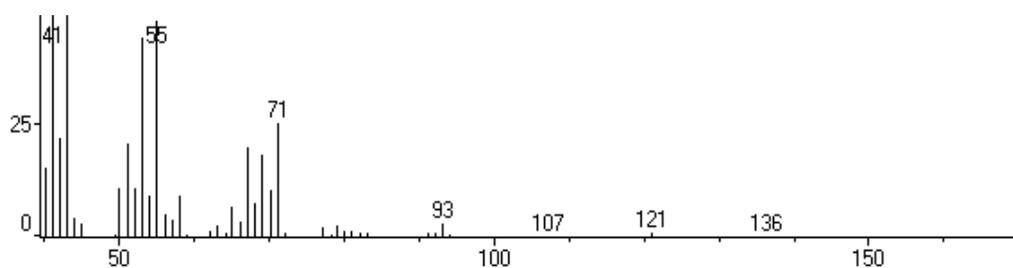
1-hexanol (IK = 1368)



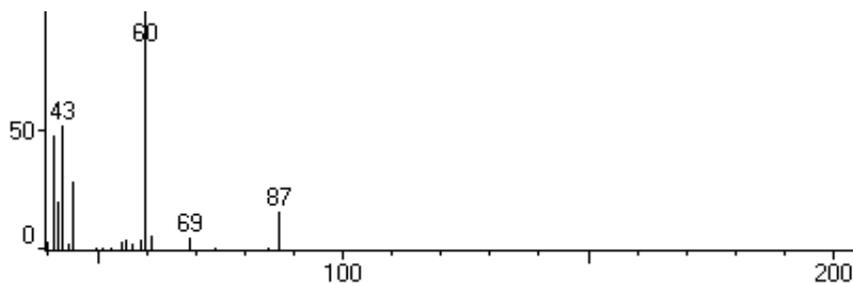
Metional (IK = 1454)



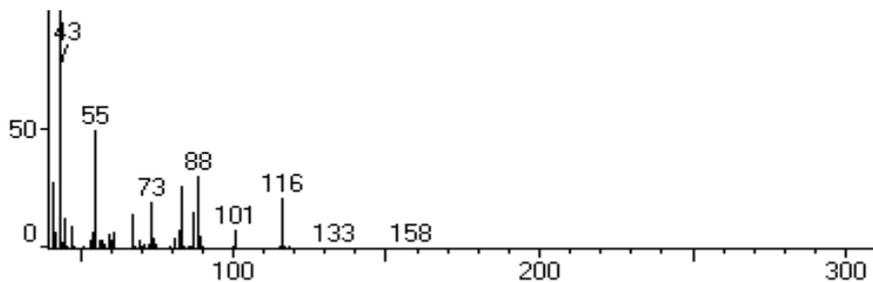
Linalol (IK = 1569)



Ácido 3-metilbutanoico (IK = 1672)



Acetato de 3-sulfanilhexilo (IK = 1769)



## **B. Anexo: Formato utilizado en el panel sensorial realizado para determinar el umbral de olor en agua del butanoato de linalilo**

### **PRUEBA TRIANGULAR Umbral de olor del Butanoato de linalilo**

NOMBRE \_\_\_\_\_ FECHA \_\_\_\_\_

En las disoluciones presentadas hay dos disoluciones blanco y una con la muestra (Butanoato de linalilo). En cualquier caso que usted detecte una diferencia entre las disoluciones presentadas por favor marque con una X el número de la disolución con percepción olfativa diferente. Debe realizar la prueba en orden consecutivo: grupo 1, grupo 2, etc.

Grupo 1	397	280	786
Grupo 2	123	789	456
Grupo 3	478	956	328
Grupo 4	634	821	584
Grupo 5	433	376	244
Grupo 6	387	174	293
Grupo 7	803	707	909
Grupo 8	544	101	272

Muchas Gracias por su colaboración



# C. Anexo: Formato utilizado en el panel sensorial realizado para la evaluación de los recombinados respecto a la fruta fresca

## PERFIL DE AROMA DE LA GUAYABA AGRIA (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) TROZOS DE FRUTA -vs- RECOMBINADO

Nombre del panelista: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

1. Por favor evalúe las intensidades de los siguientes atributos de aroma de manera ortonasal. Por favor use la siguiente escala:

0: no detectable      0-1: muy débil      1: débil      1-2: débil a moderado  
2: moderado      2-3: moderado a fuerte      3: fuerte

Por favor use las disoluciones suministradas como referencia de los atributos individuales de aroma. Añada atributos propios de olor, si es necesario.

Nota olfativa	Intensidad		
	Fruta	recombinado	Recombinado (con adición de azufrados)
frutal (butanoato de etilo)			
verde (Z-3-hexenal)			
dulce ( $\delta$ -dodecalactona)			
Citrico, floral (linalol)			
azufrado (acetato de 3-sulfanilhexilo)			
Rancio-fermentado (Ácido 3-metilbutanoico)			

2. Por favor calificar la similitud general del aroma percibido en las tres muestras. Por favor utilice la escala descrita anteriormente.

Similitud general: \_\_\_\_\_

3. Por favor, describa la diferencia (si la hay) en sus propias palabras.



## D. Anexo: Linealidad del método de cuantificación de aroma, LOD y LOQ

Compuesto	Rango lineal (µg/L)	Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Butanoato de etilo	535 - 2805	y = 0,207x - 0,1107	0,9982	2,7	8,92
(Z)-3-hexenal	107 - 1924	y = 0,0289x - 0,0031	0,9494	13,7	45,6
Hexanoato de etilo	545 - 2892	y = 0,3196x - 0,1743	0,9968	3,5	11,6
Metional	-	-	-	-	-
Linalol	590 - 3177	y = 0,4446x - 0,2625	0,9899	6,07	20,22
Butanoato de linalilo	500 - 2053	y = 0,3798x - 0,1899	0,9871	7,0	23,3
Ácido 3-metilbutanoico	695 - 3190	y = 0,0962x - 0,0669	0,9966	3,9	13,1
Acetato de 3-sulfanilhexilo	-	-	-	-	-
bis(metiltio)metano	-	-	-	-	-
δ-dodecalactona	-	-	-	-	-



## E.Anexo: Resultados RMN <sup>1</sup>H para los compuestos 5 y 6

<b>Compuesto 5</b>			<b>Compuesto 6</b>		
ácido 4'-O-D-glucopiranosido 3,3',4-tri-O-metileláxico			ácido abscísico		
posición	asignación	<sup>1</sup> H (δ <sub>H</sub> (ppm), mult, J en Hz)	posición	asignación	<sup>1</sup> H (δ <sub>H</sub> (ppm), mult, J en Hz)
1	q C <sub>ar</sub>	-	1	COOH	-
2	q C <sub>ar</sub>	-	2	C=CH-COOH	5,74, br.s
3	q C <sub>ar</sub>	-	3	q C	-
4	q C <sub>ar</sub>	-	4	(OH)C-CH=CH	7,76, d, J=16,1
5	CH <sub>ar</sub>	8,07, s	5	(OH)C-CH=CH	6,22, d, J=16,1
6	q C <sub>ar</sub>	-	6	CH <sub>3</sub>	2,03, s
7	q (C=O)-O	-	1'	q C	-
8	CH <sub>3</sub>	3,40, s	2'	q C	-
9	CH <sub>3</sub>	3,40, s	3'	C=CH-C=O	5,91, br.s
1'	q C <sub>ar</sub>	-	4'	q C	-
2'	q C <sub>ar</sub>	-	5'	C-CH <sub>2</sub> -C=O	2,17, d, J=17,2; 2,53, d, J=17,2
3'	q C <sub>ar</sub>	-	6'	q C	-
4'	q C <sub>ar</sub>	-	7'	CH <sub>3</sub>	1,92, s
5'	CH <sub>ar</sub>	7,57, s	8'	CH <sub>3</sub>	1,10, s
6'	q C <sub>ar</sub>	-	9'	CH <sub>3</sub>	1,02, s
7'	q (C=O)-O	-			
8'	CH <sub>3</sub>	1,25, s			
1''	(OH)CH-CH-O	5,12, s			
2''	(OH)CH-CH-O	4,63, s			
3''	CH(OH) azúcar	3,42-4,26, m			
4''	CH(OH) azúcar	3,42-4,26, m			
5''	CH(OH) azúcar	3,42-4,26, m			
6''	CH <sub>2</sub> (OH) azúcar	3,42-4,26, m			

- No presenta señal

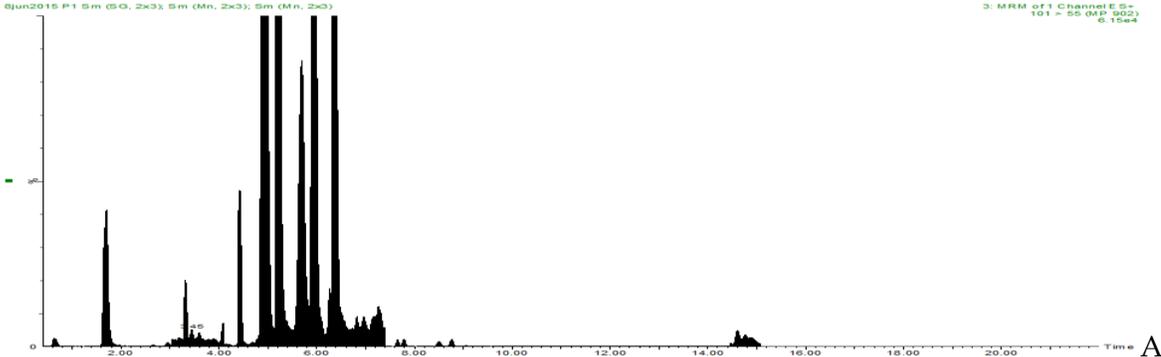


## F.Anexo: Linealidad del método de cuantificación de compuestos fenólicos por UPLC-ESI-TQ EM/EM, LOD y LOQ<sup>131</sup>

Compuesto	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Rango lineal (µg/mL)	Calibración Externa			Exact. (%)	Precis (%RS D)
				a	b	r <sup>2</sup>		
Ácido 3,4-dihidroxi-mandélico	0.049	0.098	12.5-0.391	-98.6	868	0.999	97.6	3.53
Floroglucinol	0.098	0.195	12.5-0.391	-4.04	229	0.999	97.7	1.78
Ácido 4-hidroxi-mandélico	0.098	0.196	6.25-0.195	13.2	297	0.999	103	4.46
Pirogalol	0.024	0.049	1.563-0.049	-9.86	1001	0.998	98.2	9.02
Ácido gálico	0.012	0.025	3.125-0.049	-13.2	2714	0.999	97.1	1.23
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-mandélico	0.011	0.025	6.25-0.195	266	2347	0.999	94.3	1.08
Ácido 3-hidroxi-mandélico	0.007	0.013	12.5-0.195	512	4057	0.999	82.2	3.14
Ácido protocatéquico	0.006	0.012	3.125-0.024	30.0	6738	0.999	100	6.72
γ-valerolactona	0.040	0.098	1.563-0.049	15.9	2526	0.999	99.3	0.685
Ácido 3-hidroxi-4-metoxi-mandélico	0.007	0.015	1.563-0.012	1.71	3259	0.999	100	9.43
Ácido 4-hidroxihipúrico	0.005	0.012	0.781-0.012	-20.7	6686	0.999	96.3	2.39
Catecol/Pirocatecol	0.050	0.098	12.5-0.781	133	373	0.998	95.9	5.93
Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético	0.003	0.007	1.563-0.006	19.2	4755	0.999	101	0.00
Ácido 3-O-metilgálico	0.007	0.016	1.563-0.012	-20.1	4418	0.999	106	8.55
Ácido 4-hidroxi-benzoico	0.012	0.025	1.563-0.049	29.7	12406	0.9997	98.5	4.72
Ácido 4-O-metilgálico	0.001	0.003	1.563-0.024	62.0	12884	0.999	94.9	7.39
Ácido mandélico	0.012	0.035	3.125-0.049	53.6	4783	0.999	98.9	1.79
Tirosol	7.00	12.53	364.8-12.5	-5.92	3.53	0.994	114	3.21
Procianidina B1	0.050	0.100	25.00-0.195	-160	1592	0.998	95.3	18.5
Ácido 4-hidroxi-fenilacético	0.049	0.100	3.125-0.195	-29.6	808	0.999	99.6	3.25
(+)-catequina	0.012	0.024	6.25-0.049	59.7	2497	0.999	96.9	2.27
Ácido 3-(3,4-dihidroxi-fenil)propanoico	0.020	0.049	1.563-0.049	66.1	2538	0.998	106	0.464
Ácido hipúrico	0.005	0.012	0.781-0.012	-9.89	5950	0.999	98.6	0.664
Ácido ftálico	0.012	0.025	3.125-0.024	-69.4	14207	0.999	95.4	0.000
Ácido dihidroxi-benzoico	0.050	0.098	50.00-0.391	-210	761	0.998	95.2	5.39
Ácido cafeico	0.024	0.049	3.125-0.049	-10.3	13865	0.999	96.3	4.00
Ácido 3-hidroxi-benzoico	0.024	0.048	1.563-0.049	43.7	3573	0.999	107	6.38
Ácido 3-hidroxi-fenilacético	0.012	0.030	6.25-0.049	131	2101	0.999	98.2	0.602

Procianidina B2	0.030	0.060	25.00-0.391	-114	1671	0.999	99.4	8.12
Ácido siríngico	0.012	0.030	1.563-0.098	-18.7	1139	0.997	105	5.74
Ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético	0.035	0.097	6.25-0.098	31.1	2184	0.999	102	6.03
(-)-epicatequina	0.018	0.049	3.125-0.049	-13.8	2572	0.999	95.9	4.87
4-metilcatecol	0.049	0.195	6.25-0.195	-8.30	502	0.998	101	2.48
Ac. 3-(4-hidroxifenil)propanoico	0.770	1.580	25-0.781	-45.8	152	0.999	105	1.54
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.001	0.003	3.125-0.098	667	16861	0.999	97.9	1.10
Ácido 3-(3-hidroxifenil)propanoico	0.012	0.028	1.563-0.024	8.50	9322	0.999	101	1.97
Ácido ferúlico	0.006	0.012	3.125-0.024	-48.6	4392	0.998	95.7	0.644
Ácido <i>m</i> -cumárico	0.006	0.012	6.25-0.098	846	12678	0.999	99.9	5.23
Ácido 3,4-dimetoxibenzoico	0.380	0.770	25.00-1.563	-155	128	0.995	83.9	6.73
Ácido isoferúlico	0.024	0.049	0.781-0.049	9.39	954	0.999	94.9	3.03
Ácido benzoico	0.090	0.200	12.5-0.391	-46.4	298	0.998	93.7	10.7
Ácido 3,4-dimetoxifenilacético	0.010	0.025	3.125-0.049	0.760	2407	0.999	95.1	0.534
Ácido fenilacético	0.390	0.780	25.00-0.781	-38.6	87.5	0.999	104	2.98
Ácido salicílico	0.006	0.015	0.781-0.012	189	39774	0.999	103	2.82
Procianidina A2	0.006	0.024	3.125-0.049	-18.0	1876	0.999	90.8	2.29
Ácido 4-metoxi-fenilacético	0.190	0.500	100.00-3.125	-414	206	0.999	98.8	6.61
Ácido 4-metoxibenzoico	1.550	3.100	364.8-12.50	-3558	242	0.999	101	2.11
Ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico	0.024	0.049	0.781-0.024	19.6	2920	0.999	96.5	3.59
4-etilcatecol	0.005	0.012	3.125-0.012	21.9	6546	0.999	101	3.61
Ácido 3-metoxibenzoico	0.090	0.190	25.00-0.391	-103	892	0.999	107	0.158
Ácido 3-(3,4-dimetoxifenil)propanoico	0.048	0.097	25.00-0.195	-14.3	620	0.999	103	1.53
Ácido fenilpropanoico	1.560	3.120	364.8-6.25	-1.56	115	0.999	86.4	2.25
ácido elágico	0.268	0.521	6.25-0.391	145.6	77	0.995	98.4	3.90

**G. Anexo: Cromatogramas contruidos a partir de cada una de las señales MRM sobrepuestas para las fracciones F. AcOEt (A) y F. BuOH (B).**





**H. Anexo: Concentraciones de microbiota  $\log_{10}$  UFC/mL en función del tiempo de fermentación de las muestras F.AcOEt, F.BuOH y raftilina (prebiótico).**

Bacteria	Tiempo (h)	F.AcOEt	F.BuOH	Raftilina	Blanco crecimiento
<b>Aerobios totales</b>	0	5,41±0,89	5,33±0,95	5,39±0,83	5,43±0,77
	5	6,25±1,12	6,30±1,34	6,39±1,22	6,04±1,40
	10	7,95±0,16	7,94±0,13	8,15±0,55	7,77±0,25
	24	8,22±0,54	8,20±0,51	6,99±2,12	7,52±0,48
	48	8,23±0,57	8,19±0,52	5,81±1,07	6,68±0,96
<b>Anaerobios totales</b>	0	6,78±0,53	6,73±0,50	6,67±0,40	6,64±0,42
	5	7,01±0,46	7,08±0,49	7,02±0,65	7,07±0,54
	10	8,10±0,31	8,11±0,27	8,26±0,63	7,81±0,29
	24	8,45±0,88	8,26±0,62	7,45±1,54	7,68±0,56
	48	8,19±0,45	8,21±0,52	6,40±0,69	7,38±0,40
<b>Enterobacteriaceae</b>	0	4,72±0,72	4,82±0,78	4,57±0,35	4,51±0,66
	5	5,84±0,36	6,24±0,05	6,26±0,28	5,93±0,24
	10	6,04±0,33	6,58±0,37	6,56±0,69	6,48±0,20
	24	7,33±0,23	7,52±0,36	6,78±0,34	6,85±0,63
	48	7,22±0,67	7,48±0,20	5,30±0,13	5,79±1,53
<b>Enterococcus</b>	0	4,34±1,05	4,43±1,07	4,46±1,29	4,48±1,27
	5	5,61±1,05	5,31±0,79	5,39±0,73	5,09±0,70
	10	5,65±0,81	5,48±0,61	5,28±1,10	5,17±0,53
	24	4,72±0,48	4,97±1,06	4,73±0,34	4,49±0,67
	48	4,82±0,61	5,15±0,53	5,06±1,45	5,04±1,05

<b>Bacterias lácticas</b>	0	5,66±0,14	5,31±0,64	5,30±0,70	5,34±0,71
	5	6,05±0,56	5,98±0,58	6,04±0,61	6,06±0,54
	10	6,15±0,44	6,23±0,50	6,16±0,46	6,02±0,58
	24	6,13±0,44	6,15±0,52	5,42±1,03	5,95±0,46
	48	5,84±0,68	5,87±0,54	5,09±1,22	5,31±0,82
<b><i>S. aureus</i></b>	0	2,20±1,70	2,20±1,70	2,20±1,70	1,10±1,70
	5	2,76±2,19	2,52±2,00	3,35±2,64	2,99±2,55
	10	2,53±2,01	3,50±0,31	1,10±1,70	1,65±2,55
	24	2,20±1,70	2,20±1,70	2,20±1,70	1,10±1,70
	48	0,00±0,00	1,10±1,70	1,10±1,70	2,20±1,70

# Bibliografía

- <sup>1</sup> M. Rufino, M. S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J. **2010**. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. 121. 996–1002.
- <sup>2</sup> Informe frutas exóticas, mermeladas y frutas deshidratadas, PROEXPORT Colombia 2010. <http://www.proexport.com.co>. Consultado Abril 2016.
- <sup>3</sup> INCODER y Ministerio de agricultura y desarrollo rural (MADR). Áreas de desarrollo rural (ADR). Dossier de prensa. Agosto 1 de 2011. Urabá (Antioquia).
- <sup>4</sup> Agenda interna para la productividad y la competitividad. Departamento de Córdoba, 2006-2010.  
<http://www.incoder.gov.co/documentos/Estrategia%20de%20Desarrollo%20Rural/Partiles%20Territoriales/ADR%20Sur%20del%20Cesar/Otra%20Informacion/Agenda%20Interna%20Cordoba.pdf>. Consultado Abril de 2016.
- <sup>5</sup> Agenda interna para la productividad y la competitividad. Departamento de Sucre, 2006-2010.  
<http://www.incoder.gov.co/documentos/Estrategia%20de%20Desarrollo%20Rural/Partiles%20Territoriales/ADR%20Sur%20del%20Cesar/Otra%20Informacion/Sucre-copia%20impresi%C3%B3n.pdf>. Consultado Abril de 2016.
- <sup>6</sup> Plan frutícola Nacional. Desarrollo de la fruticultura en Córdoba 2006. [http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca\\_105\\_Plan%20Nal%20frur-cordoba.pdf](http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_105_Plan%20Nal%20frur-cordoba.pdf). Consultado Abril de 2016.
- <sup>7</sup> Villalba, M., Yepes, I. M., Arrázola, I. G. **2006**. Caracterización fisicoquímica de frutas de la zona del Sinú para su agroindustrialización. *Temas agrarios*. 11. 15-23.
- <sup>8</sup> Encuesta nacional agropecuaria ENA-2011, DANE. [http://apps.who.int/fctc/reporting/party\\_reports/colombia\\_annex7\\_national\\_agricultural\\_survey.pdf](http://apps.who.int/fctc/reporting/party_reports/colombia_annex7_national_agricultural_survey.pdf). Consultado Abril de 2016.

- 
- <sup>9</sup> Guayaba agria-Concurso expediciones botánicas Siglo XXI, Herbario virtual. [http://aplicaciones2.colombiaaprende.edu.co/concursos/expediciones\\_botanicas/ver\\_herbarios\\_p.php?id=663&id\\_p=3664](http://aplicaciones2.colombiaaprende.edu.co/concursos/expediciones_botanicas/ver_herbarios_p.php?id=663&id_p=3664). Consultado Abril de 2016.
- <sup>10</sup> Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. **2009**. *Food Chemistry*. Berlin: Springer. 4 ,Edition. p. 1070.
- <sup>11</sup> Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S-B., Whalen, K., Dabo, A. J., Reynertson, K. A., Foronjy, R. F., D'Armiento, J.M., Kennelly, E. J. **2013**. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chemistry*. 141. 889–895.
- <sup>12</sup> Pino, J. A. Marbot, R., Vazquez, C. **2002**. Characterization of volatiles in Costa Rican guava [*Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu] fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 6023–6026.
- <sup>13</sup> Morton, J. F. **1987**. Costa Rican Guava. En: Morton, J. F. *Fruits of Warm Climates*. Miami: Julia F. Morton. p 365.
- <sup>14</sup> Ortega Montes, J. E., Puello Alcocer, E.C., Valencia Jiménez, N. N. **2014**. Pobreza rural y políticas neoliberales: un caso por resolver en Montería-Córdoba (Colombia). *Investigación & desarrollo*. 22, 239-261.
- <sup>15</sup> Dinámica de exportación de frutas frescas. [http://www.larepublica.co/empresas-de-ue-interesadas-en-las-frutas-colombianas\\_347346](http://www.larepublica.co/empresas-de-ue-interesadas-en-las-frutas-colombianas_347346). Consultado Abril de 2016.
- <sup>16</sup> Reineccius. G. **2006**. Flavor Formation in Fruits and Vegetables. En: *Flavor Chemistry and Technology*. CRC Press, Taylor and Francis Group: Boca Raton. pp.73-101.
- <sup>17</sup> Holley, A. **2006**. Processing information about flavour. En: Voilley, A., Etievant, P. *Flavour in Food*. Cambridge, England: CRC. Pp. 36-54.
- <sup>18</sup> Schmiech, L., Uemura, D., Hofmann T. **2008**. Reinvestigation of the bitter compounds in carrots (*Daucus carota* L.) by using a molecular sensory science approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 10252-10260.

- <sup>19</sup> Hofmann, T., Schieberle, P. **2015**. Elucidation of the chemosensory code of foods by means of a sensomics approach. En: *Flavour Science - Proceedings of the XIV Weurman Flavour Research Symposium* (Taylor, A.J., Mottram, D.S.), Context Products, ISBN: 9781899043705, pp. 3-12.
- <sup>20</sup> Fisher, C., Scott, T. **1997**. *Food Flavours. Biology and Chemistry*. Cambridge: The royal society of chemistry. Pp. 2-55.
- <sup>21</sup> Jiménez, A. M., Sierra, C. A., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L. Heredia, F. J., Osorio, C. **2011**. Physicochemical characterization of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*. 44. 1912-1918.
- <sup>22</sup> Mayol, A. R., Acree, T. E. **2001**. Advances in gas chromatography-olfactometry. En: Leland, J. V., Schieberle, P., Buettner, A. Acree, T. E. *Gas Chromatography- Olfactometry the State of the Art*. Washington, USA: American Chemical Society. Pp. 1-8.
- <sup>23</sup> Grosch, W. **2001**. Evaluation of the key odorants of foods by dilution in experiments, aroma models and omission. Review. *Chemical Senses*. 26. 533-545.
- <sup>24</sup> Engel, W., Bahr, W., Schieberle, P. **1999**. Solvent assisted flavor evaporation-a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *European Food Research and Technology*. 209. 237-241.
- <sup>25</sup> Stashenko, H. E., Martínez, J. R. **2010**. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*. 2. 28-46.
- <sup>26</sup> Skoog, D. A., Holler, F. J. Nieman, T. A. **2001**. *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid: España: Mc Graw Hill, Quinta Edición. Pp. 759-773.
- <sup>27</sup> Plutowska, B., Wardencki, W. **2008**. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages-A review. *Food Chemistry*. 107. 449-463.
- <sup>28</sup> Grosch, W. **1994**. Review, determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour and*

---

*Fragrance Journal*. 9. 147-158.

- <sup>29</sup> Schieberle, P. **1995**. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. En: *Characterization of Food: Emerging Methods*. A.G. Gaonkar Ed., Elsevier, Amsterdam. p. 403-443.
- <sup>30</sup> Patton, S., Josephson, D.V. **1957**. A method for determining significance of volatile flavor compounds in foods. *Food Research*. 22. 316.
- <sup>31</sup> Gutiérrez, D., Sinuco, D. C., Osorio, C. **2010**. Caracterización de los compuestos volátiles activos olfativamente en uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Química*. 39. 389-399.
- <sup>32</sup> Sinuco, D. C., Steinhaus, M., Osorio, C., Schieberle, P. **2013**. Quantitation of the odour-active compounds in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) fruit using the molecular sensory approach. *European Food Research and Technology*. 236. 373-378.
- <sup>33</sup> Conde-Martínez, N., Jiménez, A., Steinhaus, M., Schieberle, P., Sinuco, D., Osorio, C. **2013**. Key aroma volatile compounds of gulupa (*Passiflora edulis* Sims fo *edulis*) fruit. *European Food Research and Technology*. 236. 1085-1091.
- <sup>34</sup> Forero, D. P., Orrego, C. E., Peterson, D. G., Osorio, C. **2015**. Chemical and sensory comparison of fresh and dried lulo (*Solanum quitoense* Lam.) fruit aroma. *Food Chemistry*. 169. 85-91.
- <sup>35</sup> Steinhaus, M., Sinuco, D., Polster, J., Osorio, C., Schieberle, P. **2008**. Characterization of the aroma-active compounds in pink guava (*Psidium guajava* L.) by application of the aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 4120-4127.
- <sup>36</sup> Steinhaus, M., Sinuco, D., Polster, J., Osorio, C., Schieberle, P. **2009**. Characterization of the key aroma compounds in pink guava (*Psidium guajava* L.) by means of aroma re-engineering experiments and omission tests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57. 2882-2888.
- <sup>37</sup> Sinuco, D. C., Steinhaus, M., Schieberle, P., Osorio, C. **2010**. Changes in odour-active

- compounds of two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during ripening. *European Food Research and Technology*. 230. 859–864.
- <sup>38</sup> Block, E., Calvey, E. M. **1994**. En: Sulfur compounds in foods; Mussinan, C. J., Keelan, M. E., Eds.; ACS Symposium Series 564; American Chemical Society: Washington, DC. pp 63–79.
- <sup>39</sup> Blank, I. **2002**. Sensory relevance of volatile organic sulfur compounds in food. En: Reineccius, G. A., Reineccius, T. A. *Heteroatomic Aroma Compounds.*, Washington, USA: American chemical society. Pp. 25-53.
- <sup>40</sup> Jacob, C. **2006**. A Scent therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Natural Products Report*. 23. 851-863.
- <sup>41</sup> Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Cavelier, F. **2011**. Varietal thiols in wine: Discovery, analysis and applications. *Chemical Reviews*. 111. 7355-7376.
- <sup>42</sup> McGorin, R. J. **2011**. The significance of volatile sulfur compounds in food flavors, an overview. En: Qian, et al. *Volatile Sulfur Compounds in Food*. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC. Pp 1-31
- <sup>43</sup> Vermeulen, C., Lejeune, I., Tran, T. T. H., and Collin, S. **2006**. Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. 5061-5068.
- <sup>44</sup> Naef, R., Velluz, A., Jaquier, A. **2008**. New volatile sulfur-containing constituents in a simultaneous distillation–extraction extract of red bell peppers (*Capsicum annuum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 517–527.
- <sup>45</sup> Marsili, R. **2002**. Ed. *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*; Marcel Dekker: New York.
- <sup>46</sup> Rouseff. R. L. **2002**. Analytical methods to determinate volatile sulfur compounds in foods and beverages. En: Reineccius, G. A., Reineccius, T. A. *Heteroatomic Aroma Compounds*. Washington, USA: American Chemical Society. Pp. 25-53.
- <sup>47</sup> Winterhalter, P., Knapp, H., Straubinger, M. **1999**. Water soluble aroma precursors. Analysis, structure and reactivity. En: Teranishi, R., Wick, E. L., Hornstein, I. *Flavor Chemistry. Thirty Years of Progress*. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum

Publishers. Pp. 255-264.

- <sup>48</sup> Maicas, S., Mateo, J. J. **2005**. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67, 322-335.
- <sup>49</sup> Conde-Martínez, N., Sinuco, D. C., Osorio, C. **2014**. Chemical studies on curuba (*Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey) fruit flavor. *Food Chemistry*. 157. 356-363.
- <sup>50</sup> Baumes, R. **2009**. Wine aroma precursors. En: Moreno-Arribas, M.V., Polo, C. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York, USA: Springer. Pp. 251-274.
- <sup>51</sup> Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J. M., Degryse E. **2008**. New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon blanc wines: cys-3MH and (E)-hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 9230-9235.
- <sup>52</sup> Starkenmann, C., Le Calvé, B., Niclass, Y., Cayeux, I., Beccucci, S., Troccaz, M. **2008**. Olfactory perception of cysteine-S-conjugates from fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 9575-9580.
- <sup>53</sup> Tominaga, T., Furrer, A., Robert, H., Dubourdieu, D. **1998**. Identification of a new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*. 13. 159-162.
- <sup>54</sup> Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D. **1998**. A new type of flavor precursor in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46. 5215-5219.
- <sup>55</sup> Starkenmann, C., Troccaz, M., Howell, K. **2008**. The role of cysteine and cysteine-S conjugates as odour precursors in the flavour and fragrance industry *Flavour and Fragrance Journal*. 23. 369-381.
- <sup>56</sup> Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., Dubourdieu, D. **2000**. Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc grapes by assaying S-cysteine

- conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48. 3387–3391.
- <sup>57</sup> Murat, M. L., Tominaga, T., Dubourdieu, D. **2001**. Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49. 5412–5417.
- <sup>58</sup> Thibon, C., Shinkaruk, S., Tominaga, T., Bennetau, B., Dubourdieu, D. **2008**. Analysis of the diastereoisomers of the cysteinylated aroma precursor of 3-sulfanylhexanol in *Vitis vinifera* grape must by gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1183. 150–157.
- <sup>59</sup> Luisier, J.-L., Buettner, H., Völker, S., Rausis, T., Frey, U. **2008**. Quantification of cysteine S-conjugate of 3-sulfanylhexan-1-ol in must and wine of petite arvine vine by stable isotope dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56. 2883–2887.
- <sup>60</sup> Capone, D. L., Sefton, M. A., Hayasaka, Y., Jeffery, D. W. **2010**. Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS: Resolution and quantitation of diastereomers of 3-S-cysteinylhexan-1-ol and 3-S-glutathionylhexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58. 1390–1395.
- <sup>61</sup> Bentley, R. **2006**. The nose as a stereochemist. enantiomers and odor. *Chemical Reviews*. 106. 4099–4112.
- <sup>62</sup> Szajdek, A., Borowska, E. J. **2008**. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods Human Nutrition*. 63. 147–156.
- <sup>63</sup> Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J. N., Xu, Z., Finley, J. W. **2012**. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60. 6658–6677.
- <sup>64</sup> Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. **2006**. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99. 191–203.
- <sup>65</sup> Tomas-Barberan, F. A., Andres-Lacueva, C. **2012**. Polyphenols and health: current state

- and progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60. 8773–8775.
- <sup>66</sup> Álvarez, A. I., Vallejo, F., Barrera, B., Merino, G., Prieto, J. G., Tomás-Barberán, F., Espín, J. C. **2011**. Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzeinin breast cancer resistance protein 1 knockout mice. *Drug Metabolism and Disposition*. 39. 2008–2012.
- <sup>67</sup> Lawes, C. M. M., Horn, S. V., Rodgers, A. **2008**. Global burden of blood-pressure-related disease. *The Lancet*. 371. 1513–1518.
- <sup>68</sup> Hernández, M., Rodríguez, E., Díaz, C. **2007**. Free hydroxycinnamic acids, lycopene, and color parameters in tomato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55. 8604–8615.
- <sup>69</sup> Suzuki, A., Yamamoto, N., Jokura, H., Yamamoto, M., Fujii, A., Tokimitsu, I., Saito, I. **2006**. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 24. 1065–1073.
- <sup>70</sup> Chen, Z. Y., Peng, Ch., Jiao, R., Wong, Y. M., Yang N., Huang, Y. **2009**. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57. 4485–4499.
- <sup>71</sup> Gülçin, I. **2012**. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 86. 345–391.
- <sup>72</sup> Miguel, M. G. **2010**. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 25. 291–312.
- <sup>73</sup> Harman, D. **1956**. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *The Journal of Gerontology*. 11. 298–300.
- <sup>74</sup> Finley, J. W., Kong, A. N., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., Lei, X. G. **2011**. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59. 6837–6846.
- <sup>75</sup> Jaramillo, K., Dawid, C., Hofmann, T., Fujimoto, Y., Osorio, C. **2011**. Identification of

- antioxidative flavonols and anthocyanins in *Sicana odorifera* fruit peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59. 975–983.
- <sup>76</sup> Nuengchamnong, N., Ingkaninan, K. **2009**. On-line characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family Myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *LWT-Food Science and Technology*. 42. 297–302.
- <sup>77</sup> Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., Saura-Calixto, F. **2001**. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49. 5489–5493
- <sup>78</sup> Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. **2006**. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19. 669–675.
- <sup>79</sup> Alothman, M., Bhat, R., Karim, A. A. **2009**. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. 115. 785–788.
- <sup>80</sup> Thuaytong, W., Anprung, P. **2011**. Bioactive compounds and prebiotic activity in Thailand-grown red and white guava fruit (*Psidium guajava* L.). *Food Science and Technology International*. 17. 205–208.
- <sup>81</sup> Shruthi, S. D., Roshan, A., Timilsina, S. S., Sunita, S. **2013**. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* linn. (Myrtaceae). *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 3. 162–168.
- <sup>82</sup> Flores, G., Wu, S. B., Negrin, A., Kennelly, E. J. **2015**. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry*. 170. 327–335.
- <sup>83</sup> Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., Gordon, J. I. **2007**. The human microbiome project. *Nature*. 449. 804–10.

- 
- <sup>84</sup> Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., Versalovic, J. **2009**. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*. 55. 856-66.
- <sup>85</sup> Microbial locator map of the body. <http://www.nature.com/scientificamerican/journal/v306/n6/images/scientificamerican0612-36-I4.jpg> Consultado Abril de 2016.
- <sup>86</sup> Maukonen, J., Saarela, M. **2014**. Human gut microbiota: does diet matter? Proceedings of the Nutrition Society. 1-14.
- <sup>87</sup> O'Hara, A. M., Shanahan, F. **2007**. Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 5. 274-84.
- <sup>88</sup> Jenkinson, H. F., Lamont, R. J. **2005**. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*. 13. 589-95.
- <sup>89</sup> Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E. **2005**. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*. 43. 5721-32.
- <sup>90</sup> Muñoz-González, C., Feron, G., Guichard, E., Rodríguez-Bencomo, J., Álvarez, P. M., Moreno-Arribas, M., Pozo-Bayón, M. A. **2014**. Understanding the role of saliva on aroma release from wine by using static and dynamic headspace conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62. 8274-8288.
- <sup>91</sup> Buettner, A. **2002**. Influence of human salivary enzymes on odorant concentration changes occurring in vivo. 1. Esters and thiols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 3283-3289.
- <sup>92</sup> Buettner, A. **2002**. Influence of human saliva on odorant concentrations. 2. Aldehydes, alcohols, 3-alkyl-2-methoxypyrazines, methoxyphenols, and 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 7105-7110.
- <sup>93</sup> Lasekan, O. **2013**. A comparative analysis of the influence of human salivary enzymes on odorant concentration in three palm wines. *Molecules*. 18. 11809-11823.

- <sup>94</sup> Walle, T., Browning, A. M., Steed, L. L., Reed, S. G., Walle, U.K. **2005**. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *Journal of Nutrition*. 135. 48-52.
- <sup>95</sup> Muñoz-González, C., Cueva, C., Pozo-Bayón, M. A., Moreno-Arribas, M. V. **2015**. Ability of human oral microbiota to produce wine odorant aglycones from odourless grape glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*. 187. 112-119.
- <sup>96</sup> Tian, Y., He, X., Torralba, M., Yooseph, S., Nelson, K. E., Lux, R., McLean, J. S., Yu, G., Shi, W. **2010**. Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities. *Molecular Oral Microbiology*. 25. 357-367.
- <sup>97</sup> Laparra, J. M., Sanz, Y. **2010**. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*. 61. 219-225.
- <sup>98</sup> Aura, A-M. **2008**. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemical Review*. 7. 407-429.
- <sup>99</sup> Selma, M. V., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A. **2009**. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57. 6485-6501.
- <sup>100</sup> Landete, J. M. **2011**. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*. 44. 1150-1160.
- <sup>101</sup> Rastmanesh, R. **2011**. High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. *Chemico-Biological Interactions*. 189. 1-8.
- <sup>102</sup> Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B. **2011**. Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 5. 2241-2247.
- <sup>103</sup> Muñoz-González, C., Rodríguez-Bencomo, J. J., Cueva, C., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.A. **2012**. Feasibility and application of liquid-liquid extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of phenolic acids from polyphenols degraded by human

- faecal microbiota. *Food Chemistry*. 133. 526-535.
- <sup>104</sup> Mitra, S. K., Irenaeus, T. K. S., Gurung, M. R., Pathak, P. K. **2012**. Taxonomy and importance of Myrtaceae. *Acta Horticulturae*. 959. 23-34.
- <sup>105</sup> Lim, T. K. **2012**. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Volume 3, fruits. Netherlands: Springer. Pp 681-683.
- <sup>106</sup> Proceso de Revisión y Ajuste al - POT 2002-2015. <http://cdim.esap.edu.co/BancoMedios/Documentos%20PDF/monteriacordobapot2002-2015-2.pdf>. Consultado Abril de 2016.
- <sup>107</sup> Starkenmann, C., Niclass, Y. **2011**. New cysteine-S-conjugate precursors of volatile sulfur compounds in bell peppers (*Capsicum annuum* L. Cultivar). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 3358-3365.
- <sup>108</sup> AOAC **2006**. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed. Gaithersburg, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- <sup>109</sup> IOFI, working group on methods of analysis. **2011**. *Flavour and Fragrance Journal*, 297-299.
- <sup>110</sup> American Society of Testing and Materials Standard E679-04. **2005**. En: *ASTM Book of Standards; American Society of Testing and Materials*. West Conshohocken, PA; Vol. 15.08, pp 38-44.
- <sup>111</sup> Czerny, M., Christlbauer, M., Christlbauer, M., Fisher, A., Granvogl, M., Hammer, M., Hartl, C., Moran Hernandez, N., Schieberle, P. **2008**. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *European Food Research and Technology*. 228. 265-273.
- <sup>112</sup> Peng, M., Jaeger, S. R., Hautus, M. J. **2012**. Determining odour detection thresholds: Incorporating a method-independent definition into the implementation of ASTM E679. *Food Quality and Preference*. 25, 95-104.

- <sup>113</sup> ISO 3534-1. **2006**. *Statistics. Vocabulary and Symbols*. Part 1: Probability and general statistical terms. Geneva, Switzerland: ISO.
- <sup>114</sup> Osorio, C., Alarcon, M., Moreno, C., Bonilla, A., Barrios, J., Garzón, C., Duque, C. **2006**. Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. 509-516.
- <sup>115</sup> Guedes, C. M., Pinto, A. B., Moreira, R. F. A., De Maria, C. A. B. **2004**. Study of the aroma compounds of rose apple (*Syzygium jambos* Alston) fruit from Brazil. *European Food Research and Technology*. 219. 460-464.
- <sup>116</sup> Leffingwell & Associates. **1991**. GRAS flavor chemicals-detection thresholds. *Perfumer & flavorist*. 16. 1-19.
- <sup>117</sup> Matsui, K. **2006**. Green leaf volatiles: Hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 9. 274 - 280.
- <sup>118</sup> Osorio, S., Muñoz, C., Valpuesta, V. **2010**. Physiology and biochemistry of fruit flavours. En: *Handbook of Fruit and Vegetable Flavours*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. Pp 25-43.
- <sup>119</sup> Kasai, T., Larsen, P. O. **1980**. Chemistry and biochemistry of  $\gamma$ -glutamyl derivatives from plants including mushrooms (*Basidiomycetes*). En: *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Vienna. Pp. 173-285.
- <sup>120</sup> Esteban-Fernández, A., Rocha-Alcubilla, N., Muñoz-González, C., Moreno-Arribas, M. V., Pozo-Bayón, M. A. **2016**. Intra-oral adsorption and release of aroma compounds following in-mouth wine exposure. *Food Chemistry*. 205. 280-288.
- <sup>121</sup> Li, J., Helmerhorst, E. J., Leone, C. W., Troxler, R. F., Yaskell, T., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Oppenheim, F. G. **2004**. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of Applied Microbiology*. 97. 1311-1318.
- <sup>122</sup> Demuth. D. R., Lamont, R. J. **2006**. Quorum sensing and cell-to cell communication in the dental biofilm. En: Demuth. D. R., Lamont, R. J. *Bacterial Cell-to-Cell Communication*.

- Role in Virulence and Pathogenesis*. Cambridge university press. New York, USA. Pp. 175-197.
- <sup>123</sup> Mani, A., Mishra, R., Thomas, G. **2011**. Elucidation of diversity among *Psidium* species using morphological and SPAR methods. *Journal of Phytology*. 3. 53-61.
- <sup>124</sup> Sanda, K. A., Grema, H. A., Geidman, Y. A., Bukar-Kolo, Y. M. **2011**. Pharmacological aspects of *Psidium guajava*: An update. *International Journal of Pharmacology*. 7. 316-324.
- <sup>125</sup> Gutierrez, R. M., Mitchell, S., Solis, R. V. **2008**. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 117. 1-27.
- <sup>126</sup> Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez A. **2010**. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in metanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*. 71. 1848-1864.
- <sup>127</sup> Isaza, J. H., Ito, H., Yoshida, T. **2004**. Oligomeric hidrolizable tannins from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry*. 65. 359-367.
- <sup>128</sup> Singleton, V. L., Rossi, J. A. **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16. 144-158.
- <sup>129</sup> Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. **1999**. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26. 1231-1237.
- <sup>130</sup> Programa Trapper de código abierto versión 4.3.0  
<http://tools.proteomecenter.org/wiki/index.php?title=Software:trapper> Consultado Abril de 2016
- <sup>131</sup> Gall, E. **2015**. Análisis de metabolitos tras la ingestión de alimentos ricos en polifenoles. Trabajo de fin de grado en química, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

- <sup>132</sup> Espinal, M., Olaya, J., Restrepo, P., Silva, K., Parada, F. **2010**. La guayaba, fuente de fenoles con actividad antioxidante. En: Morales, A. L., Melgarejo, L. M. *Desarrollo de Productos Funcionales Promisorios a Partir de la Guayaba (Psidium guajava L.) para el Fortalecimiento de la Cadena Productiva*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Pp. 179-182.
- <sup>133</sup> Proteggente, A., Pannala, S. A., Paganga, G., Buren, L. V., Wagner, E., Wiseman, S., De Put, F. V., Dacombe, C., Rice-Evans, C. A. **2002**. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radicals Research*. 36. 217-233.
- <sup>134</sup> Medina, M. B. **2011**. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods*. 3. 79-87.
- <sup>135</sup> Wang, W., Liu, L., Wang, L., Hu, Y., Zhang, W., Liu, R. **2012**. Structural characterization and identification of major constituents in jitai tablets by high-performance liquid chromatography/diode-array detection coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Molecules*. 17. 10470-10493
- <sup>136</sup> Li, H. J., Deinzer, M. L. **2007**. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Analytical Chemistry*. 79. 1739-1748.
- <sup>137</sup> Hirai, N., Yoshida, R., Todoroki, Y., Ohigashi, H. **2000**. Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 64. 1448-1458.
- <sup>138</sup> Rai, M. K., Shekhawat, N. S., Harish, Gupta, A. K., Phulwaria M., Ram, K., Jaiswal, U. **2011**. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 106. 179-190.
- <sup>139</sup> Verslues, P. E., Bray, E. A. **2006**. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *Journal of Experimental Botany*. 57. 201-212.
- <sup>140</sup> Base de datos metlin para metabolómica.  
[https://metlin.scripps.edu/metabo\\_search\\_alt2.php](https://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php) Consultado Abril de 2016

- 
- <sup>141</sup> Peng, R.Y., Hsieh, C. L. **2006**. Review on the medicinal uses of *Psidium guajava* L. *Recent Progress in Medicinal Plants*. 20. 215-248.
- <sup>142</sup> Hattori, M., Taylor, T. D. **2009**. The human intestinal microbiome: A new frontier of human biology. *DNA Research*. 16. 1-12.
- <sup>143</sup> Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A. **2005**. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308. 1635-1638.
- <sup>144</sup> Scarpellini, E., Campanale, M., Leone, D., Purchiaroni, F., Vitale, G., Lauritano, E. C., Gasbarrini, A. **2010**. Gut microbiota and obesity. *Internal and Emergency Medicine*. 5. S53-S56.
- <sup>145</sup> Dueñas, M., Muñoz-González, I., Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B. **2015**. Review. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMedical Research International*. 1-15.
- <sup>146</sup> Zoetendal, E. G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D., de Vos, W. M. **2002**. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 68. 3401-3407.
- <sup>147</sup> Alminger, M, Aura, A., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martinez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T. Santos, C. N. **2014**. In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13. 13-36.
- <sup>148</sup> Clifford, M. N. **2004**. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*. 70. 1103-1114.
- <sup>149</sup> Sánchez-Patán, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson M., G. R. Quintanilla-López, J. E., Lebrón-Aguilar, R., P. Martín-Álvarez, J., Moreno-Arribas, M.

- V. Bartolomé, B. **2012**. In vitro fermentation of a red wine extract by human gut microbiota: changes in microbial groups and formation of phenolic metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60. 2136–2147.
- <sup>150</sup> Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S. Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Paslier, D. L., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, K., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, J., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S. D., Wang, J. **2010**. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464. 59-67.
- <sup>151</sup> Steed, H., Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. **2008**. Review: Prebiotics, synbiotics and inflammatory bowel disease. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52. 898 – 905.
- <sup>152</sup> Kasai, C., Sugimoto, K., Moritani, I., Tanaka, J., Oya, Y., Inoue, H., Tameda, M., Shiraki, K., Ito, M., Takei, Y., Takase, K. **2015**. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterology*. 100. 1-10.