



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE QUÍMICA-ICUAP

Caracterización química e identificación de
compuestos orgánicos volátiles de la guayaba
mexicana (*Psidium guajava*) variedad "Media China"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
(FISICOQUÍMICA)

PRESENTA:

I.Q. ERIKA JANETTE SEGURA RIVERA

DIRECTORA:

DRA. MARÍA DE LA PAZ ELIZALDE GONZÁLEZ

PUEBLA, MÉXICO

SEPTIEMBRE 2017



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lidia Esmeralda García Díaz, Dra. Vianey Marín Cevada, Dra. María Ana Pérez Cruz y Dr. Felipe Tafoya Rangel, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Caracterización química e identificación de compuestos orgánicos volátiles de la Guayaba mexicana (*Psidium guajava*) variedad “Media China”**”, que presenta la alumna **I.Q. Erika Janette Segura Rivera** con número de matrícula **215470685** para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los siete días del mes de julio del año dos mil diecisiete.

ATENTAMENTE

Dra. Lidia Esmeralda García Díaz

Dra. Vianey Marín Cevada

Dra. María Ana Pérez Cruz

Dr. Felipe Tafoya Rangel

80  **AÑOS**
DE UNIVERSIDAD

Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio FCQ 10,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397
posgrado.quimica@correo.buap.mx

Dedicatoria

A la memoria de mi Padre

a quien debo la disciplina, el esfuerzo y la dedicación.

A mi Madre

por su amor, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, por motivarme en aquellos momentos de obscuridad, por ser un ejemplo de fortaleza ante cualquier obstáculo, por darme la vida.

A mi esposo

por su amor, por su apoyo incondicional, por ser un ejemplo de dedicación y esfuerzo, por su comprensión y paciencia.

A mis hermanos y adorada familia

por brindarme fortaleza para seguir adelante y nunca rendirme, por sus palabras de aliento.

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes de la comisión revisora y miembros del jurado

1. Dra. Lidia Esmeralda García Díaz Comité tutorial, CQ-ICUAP
2. Dra. Vianey Marín Cevada Comité tutorial, CIM-ICUAP
3. Dra. María Ana Pérez Cruz FCQ-BUAP
4. Dr. Felipe Tafoya Rangel (externo) Univ. Autónoma de Aguascalientes

A los profesores que favorecieron el desarrollo de la tesis

Al CONACYT (México) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría (Registro: 581415).

A todos los integrantes del cuerpo académico de “Química física básica y aplicada” por las aportaciones a mi tesis en los coloquios internos.

A la Dra. María de la Paz Elizalde González por su paciencia, dedicación, enseñanzas y tiempo para la elaboración de este trabajo, por compartir su conocimiento en el ámbito laboral y personal.

A la Dra. Vianey Marín Cevada por su apoyo en el muestreo de guayaba en Calvillo, Aguascalientes.

A la Dra. Lidia Esmeralda García Díaz y Quím. Patricia Ruíz Gutiérrez por su apoyo en las técnicas cromatográficas.

**Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Adsorción y
Cromatografía del Centro de Química del ICUAP**

ÍNDICE

	Pág.
Introducción	XII
Hipótesis	XIV
Objetivos	XIV
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	
1.1 La guayaba (<i>Psidium guajava</i>).	1
1.1.1 Composición química.	2
1.1.1.1 Sólidos solubles totales (SST).	3
1.1.1.2 Acidez titulable.	3
1.1.1.3 Fenoles totales.	4
1.1.1.4 Ácido ascórbico.	5
1.1.1.5 Azúcares.	5
1.2 Compuestos orgánicos volátiles de la guayaba.	6
1.3 Métodos de extracción de compuestos orgánicos volátiles.	10
1.3.1 Espacio de cabecera “Headspace” (HS).	10
1.3.2 Microextracción en fase sólida (SPME).	13
1.3.3 Hidrodestilación.	15
Justificación.	17
Diagrama general del trabajo de la tesis.	18
CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 Caracterización química del fruto cuajado y maduro.	19
2.1.1 Sólidos solubles totales.	19
2.1.2 Acidez total.	19
2.1.3 Fenoles totales.	20
2.1.4 Ácido ascórbico.	21
2.1.5 Azúcares en fruto maduro.	23
2.2 Extracción de compuestos orgánicos volátiles en fruto cuajado y fruto maduro.	24
2.2.1 Optimización de parámetros en Headspace (HS).	24
2.2.2 Microextracción en fase sólida (SPME).	26
2.2.2.1 Fruto cuajado completo pre-cosecha.	27
2.2.2.2 Fruto cuajado y maduro completo post-cosecha.	28
2.2.2.3 Endocarpio post-cosecha.	28
2.2.2.4 Cinética de compuestos orgánicos volátiles en fruto maduro.	28
2.2.3 Hidrodestilación.	29
2.2.3.1 Destilado.	29
2.2.3.2 Aceite.	29

2.2.4	Análisis cromatográfico	29
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION		
3.1	Caracterización química de fruto cuajado y fruto maduro.	31
3.2	Extracción de compuestos orgánicos volátiles por HS.	35
3.2.1	Comparación entre fruto cuajado y fruto maduro.	35
3.2.2	Identificación de compuestos en fruto cuajado y fruto maduro.	36
3.3	Extracción de COVs por microextracción en fase sólida (SPME).	40
3.3.1	Optima extracción de COVs de frutos completos.	40
3.3.2	Comparación entre fruto cuajado y fruto maduro.	44
3.3.3	COVs en endocarpio.	45
3.3.4	Comparación de la extracción por HS y SPME.	47
3.3.5	COVs pre y post-cosecha.	50
3.3.6	Transformación de COVs durante la maduración de guayaba "Media China".	55
3.4	Extracción de COVs por hidrodestilación.	60
3.4.1	Análisis de extractos por HPLC-DAD y HPLC Q-TOF/MS.	61
3.4.2	Análisis de extractos por GC Q-TOF/MS.	66
CONCLUSIONES		73
BIBLIOGRAFÍA		75
ANEXOS		81
A1	Reactivos utilizados para la realización de la tesis.	81
A2	Equipos utilizados para la realización de la tesis.	82
A3	Método cromatográfico para determinación de ácido ascórbico.	83
A4	Método cromatográfico para determinación de azúcares.	85
A5	Método cromatográfico con inyección por HS.	87
A6	Método cromatográfico con inyección de microfibra de SPME de microextracción en fase sólida.	89
A7	Método cromatográfico para análisis de destilado y residuo de hidrodestilación (HPLC-DAD).	91
A8	Método cromatográfico para análisis de residuo de hidrodestilación (HPLC QTOF/MS).	93
A9	Método cromatográfico para análisis de aceite de hidrodestilación (HPLC QTOF/MS).	95
A10	Método cromatográfico para análisis de aceite de hidrodestilación (GC QTOF/MS).	97
A11	Compuestos identificados en fruto cuajado y fruto maduro.	99

Nomenclatura

Símbolo	Descripción
°Bx	Brix
cps	Cuentas por segundo
C _A	Concentración del patrón añadido
C _B	Concentración inicial de la muestra
C _G	Concentración en la fase gaseosa (espacio de cabeza)
C ₀	Concentración del analito en la muestra original
C _{S,L}	Concentración de la muestra (sólida o líquida)
C _X	Concentración de la muestra con el patrón añadido
d	Dobles enlaces
Equiv	Equivalente
K	Coefficiente de partición
m/z	Relación masa carga
min	Minuto
N	Normalidad
n	Número de átomos de carbono del alcano que eluye antes que x
ND	No determinado
Ni	Número de átomos
ni	No identificado
PM	Peso molecular
r	Número de anillos
t _R	Tiempo de retención
t _R (N)	Tiempo de retención del alcano que eluye después de x
t _R (n)	Tiempo de retención del alcano que eluye antes que x
t _R (X)	Tiempo de retención del compuesto a identificar
ua ²	Unidades arbitrarias al cuadrado
ua	Unidades arbitrarias
V _g	Volumen del gas en la muestra del vial
V _i	Valencia de un elemento
V _{S,L}	Volumen de muestra (sólida o líquida)
x	Compuesto a identificar
Δm	Error de masa

Abreviaturas

AA	Ácido ascórbico
CAR	Carboxen
COVs	Compuestos orgánicos volátiles
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DVB	Divinilbenceno
GAE	Equivalente de ácido gálico
GC Q-TOF/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con tiempo de vuelo
GPP	Geranyl difosfato
HPLC Q-TOF/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con tiempo de vuelo
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos con detector de arreglo de diodos
HPLC-IR	Cromatografía de líquidos con detector de índice de refracción
HS	Headspace
IK	Índice de Kovats
IPP	Isopentil difosfato
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
mM	Milimolar
PDMS	Polidimetilsiloxano
rpm	Revoluciones por minuto
SPME	Microextracción en fase sólida
SST	Sólidos solubles totales
T _{eb}	Temperatura de ebullición
UV-Vis	Ultravioleta visible

Lista de figuras

Número	Título de la figura	Pág.
1.1	Partes del fruto de Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	1
1.2	Guayaba (<i>Psidium guajava</i>) A) fruto cuajado, B) fruto maduro.	2
1.3	Efecto de la maduración sobre los componentes de los frutos.	6
1.4	Regla de isopreno.	8
1.5	Representación del equilibrio termodinámico en vial con muestra para análisis en HS.	11
1.6	Vista frontal de una fibra empleada en SPME.	13
1.7	Esquema del dispositivo de SPME.	14
1.8	Estado de la fibra SPME durante las dos etapas de extracción.	15
1.9	Equipo Clevenger.	16
2.1	Curva de calibración de disoluciones de ácido gálico empleado en la determinación de fenoles.	21
2.2	Curva de calibración de disoluciones de ácido ascórbico analizadas mediante HPLC con detector arreglo de diodos.	22
2.3	Curva de calibración de glucosa, sacarosa y fructosa obtenidos por HPLC-IR.	24
2.4	Intensidad de los picos cromatográficos con diferentes condiciones de extracción por HS: a) tiempo de equilibrio, b) temperatura, c) presión.	26
2.5	Montaje empleado para la toma de muestra de los COVs de fruto cuajado de guayaba (<i>Psidium guajava</i>), en campo (pre-cosecha), empleando la metodología SPME.	27
2.6	Montaje empleado para la toma de muestra de los COVs de fruto maduro de guayaba, <i>Psidium guajava</i> , empleando la metodología SPME en laboratorio.	28
3.1	Reacción de formación del complejo entre el fenol y la 4-aminoantipiridina.	32
3.2	Espectro UV-Vis de la fase acuosa y clorofórmica de fruto cuajado (a) y fruto maduro (b).	32
3.3	Oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico.	33
3.4	Comparación de cromatogramas (HPLC-DAD) de fruto maduro y cuajado, ácido ascórbico con concentración 40 mg L ⁻¹ y disolvente.	33
3.5	Comparación de cromatogramas (HPLC-DAD) de las muestras de fruto cuajado y fruto maduro dopadas con AA.	34
3.6	Cromatograma (HPLC-IR) de un estándar de glucosa (a), la mezcla de estándares fructosa + sacarosa (b) y muestra de	35

	fruto maduro (c).	
3.7	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de exocarpio (a y b) y fruto completo (c y d) con extracción por HS.	36
3.8	Compuestos extraídos por HS e identificados en exocarpio de fruto cuajado y fruto maduro.	37
3.9	Compuestos identificados en fruto cuajado y fruto maduro.	39
3.10	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de COVs extraídos por diferentes fibras para SPME en muestras de fruto cuajado.	41
3.11	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de COVs extraídos por diferentes fibras SPME en muestras de fruto maduro.	42
3.12	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de frutos completos cuajado y maduro con un tiempo de exposición de fibra de 12h.	45
3.13	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de endocarpio en fruto cuajado y fruto maduro.	47
3.14	Comparación de la extracción de COVs por SPME y HS en muestras de fruto cuajado y maduro. COVs ordenados por su temperatura de ebullición en función del número de átomos de carbono.	48
3.15	COVs identificados en diferentes partes del fruto cuajado y fruto maduro con diferente método de extracción.	49
3.16	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de fruto cuajado muestreado pre-cosecha en diferente horario.	51
3.17	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de fruto cuajado pre- y post-cosecha.	52
3.18	Comparación de COVs identificados en campo y laboratorio en fruto cuajado representados en la dependencia $KI=f(T_{eb})$.	53
3.19	Comparación del tipo de COVs identificados en fruto cuajado y maduro.	54
3.20	Comparación entre el contenido de los compuestos más abundantes extraídos por SPME de fruto cuajado en campo (emisión nocturna) y del fruto maduro en laboratorio.	55
3.21	Cinética de evolución del contenido de compuestos seleccionados con el tiempo de maduración de guayaba post-cosecha.	56
3.22	Biosíntesis de (S)-limoneno.	57
3.23	Presencia de (-)-trans-carveol durante el estudio cinético de maduración de la guayaba "Media China".	58
3.24	Biosíntesis de β -cariofileno.	59
3.25	COVs producidos por biosíntesis a partir de ácidos grasos.	60

3.26	Cromatograma (HPLC-DAD) del residuo de hidrodestilación de fruto cuajado (a) y destilado de fruto cuajado y fruto maduro (b).	61
3.27	Cromatograma (HPLC Q-TOF/MS) del residuo de hidrodestilación de fruto cuajado y maduro.	62
3.28	Cromatograma (HPLC Q-TOF/MS) de aceite de fruto maduro con los respectivos espectros de masas de los picos.	64
3.29	Estructura de la guajaverina.	65
3.30	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de la fase orgánica obtenida por hidrodestilación de fruto cuajado.	68
3.31	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de la fase orgánica (aceite) obtenida por hidrodestilación de fruto maduro y espectros de masas de los picos M1 y M2.	69
3.32	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de la fase orgánica (aceite) obtenida por hidrodestilación de fruto maduro y espectros de los picos M3 y M4.	70
3.33	Cromatograma (GC Q-TOF/MS) de la fase orgánica (aceite) obtenida por hidrodestilación de fruto maduro y espectro de masas del pico M5.	71
3.34	Dependencia $\log KI = f(T_{eb})$ para la mezcla de alcanos (C ₈ -C ₂₀) en una columna no polar.	72

Lista de tablas

Número	Título de la tabla	Pág.
1.1	Características químicas del fruto de guayaba.	2
1.2	Regla del isopreno para la unión de unidades de isopreno.	8
1.3	Clasificación de unidades de isopreno.	9
1.4	Tipos de fibras comerciales.	13
2.1	Parámetros de curva de calibración de ácido gálico.	21
2.2	Parámetros de la curva de calibración de ácido ascórbico.	22
2.3	Parámetros de la curva de calibración de azúcares.	24
2.4	Muestras de guayaba y parámetros para optimización de la extracción HS.	25
3.1	Características químicas de fruto cuajado de guayaba “Media China”.	31
3.2	COVs extraídos por HS e identificados en exocarpio de guayaba “Media China”.	38
3.3	Concentración relativa en mg mL ⁻¹ de compuestos seleccionados presentes en el exocarpio de fruto cuajado y fruto maduro.	39
3.4	COVs extraídos por HS e identificados en fruto cuajado y maduro de guayaba “Media China”.	40
3.5	Compuestos identificados en fruto cuajado extraídos por diferentes fibras SPME.	42
3.6	Concentración relativa en mg mL ⁻¹ de algunos COVs seleccionados extraídos por SPME de fruto cuajado y maduro.	43
3.7	Compuestos extraídos con diferentes fibras SPME en fruto maduro.	44
3.8	Compuestos identificados en endocarpio de fruto cuajado y maduro y su contenido normalizado.	46
3.9	Concentración relativa de β-cariofileno y (S)-limoneno determinada por dos métodos de extracción.	50
3.10	Compuestos identificados en fruto cuajado pre-cosecha en dos turnos diferentes.	51
3.11	Picos identificados en la muestra de aceite de fruto maduro de guayaba (m/z).	66
3.12	Índices de Kovats (KI) y temperatura de ebullición estimada de los compuestos detectados en aceite de fruto cuajado y fruto maduro.	72

Comunicaciones derivadas

- Optimización de la extracción y separación de los componentes de la guayaba (*Psidium guajava*). XX simposio interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Puebla, Puebla. Octubre 2015.
- Optimización de la extracción y separación de los componentes de la guayaba (*Psidium guajava*). XXI simposio interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Puebla, Puebla. Octubre 2016.

Introducción

En los últimos años la exportación de guayaba se ha visto afectada por la incidencia de enfermedades y plagas, entre las que se destaca el insecto “picudo de la guayaba” (*Conotrachelus dimidiatus*). La etapa de fruto cuajado (frutos de 2 cm de diámetro), es en la que ocurren los mayores ataques [1]. Los frutos atacados se petrifican y maduran prematuramente.

La guayaba (*Psidium guajava*) es considerada nativa del trópico de América [2]. El fruto se puede diferenciar por su forma de globosa a ovoide de hasta 8 cm de diámetro, olor fragante y sabor agridulce. Otra de sus características es el contenido de abundantes semillas redondas de 3 a 5 mm, rodeadas por una pulpa amarillenta de sabor agradable [3]. La guayaba se consume fresca o procesada; en forma de mermeladas, jaleas, jugos, conservas y dulces. Su gran aceptación se debe a su valor comercial, sabor agradable y valor nutritivo: excelente fuente de vitamina A, C, B, así como los minerales calcio, hierro y fósforo; además de carbohidratos [4].

En estudios recientes se ha reportado que la formación de los compuestos orgánicos volátiles ocurre en los tejidos reproductivos de la guayaba. Se han identificado alrededor de 400 compuestos volátiles, pero solo unos pocos contribuyen al aroma [5], entre los que encontramos terpenos; β -cariofileno, limoneno y copaeno, los cuales han sido encontrados en todos los tejidos reproductivos de la guayaba, siendo mayoritarios en la yema floral y fruto cuajado [6].

La agricultura en México es uno de los sectores que ha sufrido una serie de cambios y adaptaciones a lo largo de los años. Su evolución ha dado paso a las exportaciones de productos, posicionando a México como un país con elevada exportación de productos agrícolas [7]. El cultivo de productos agrícolas engloba una serie de condiciones que se deben evaluar para el desarrollo satisfactorio, entre los que se encuentran: tipo de suelo, clima, humedad, temperatura, periodo de cultivo, etc. Asimismo, se deben considerar otros factores que pueden poner en riesgo la obtención de los mismos. Tal es el caso de las plagas y del uso de pesticidas. Por ello se buscan nuevas alternativas que aseguren la calidad de los productos.

Esta tesis se centra en el estudio de la composición química del fruto de la guayaba mediante la extracción y separación de sus componentes con la finalidad de determinar los compuestos orgánicos volátiles (COVs) en dos etapas fenológicas: etapa de fruto cuajado y de fruto maduro, empleando las técnicas de “headspace”, microextracción en fase sólida e hidrodestilación, así como cromatografía de gases y líquidos.

Separar e identificar los compuestos orgánicos volátiles (COVs) presentes en las dos etapas fenológicas de la guayaba, contribuye a la identificación de aleloquímicos del fruto cuajado para su posterior uso en investigaciones de ecología química y sería una de las aportaciones de este trabajo de tesis.

Hipótesis

Los compuestos orgánicos volátiles presentes en la guayaba pueden ser extraídos mediante los métodos optimizados de headspace, microextracción en fase sólida e hidrodestilación e identificados y cuantificados después de su separación cromatográfica.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la composición química de la guayaba, extraer y separar sus componentes por métodos cromatográficos para identificar y diferenciar los compuestos orgánicos volátiles (COVs) en dos etapas fenológicas de la variedad mexicana “Media China”.

Objetivos específicos

- Determinar las características químicas de la variedad “Media China” de la guayaba *Psidium guajava*.
- Aplicar técnicas analíticas con la finalidad de identificar los compuestos orgánicos volátiles en fruto cuajado y maduro.
- Separar e identificar los compuestos orgánicos volátiles (COVs) presentes en el exocarpio, endocarpio y fruto completo de la guayaba (*Psidium guajava*).
- Estudiar la transformación de compuestos orgánicos volátiles después de la cosecha y durante la maduración de la guayaba.
- Identificar los COVs en el fruto cuajado pre-cosecha como posibles aleloquímicos para su posterior uso en investigaciones de ecología química.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.

1.1 La guayaba (*Psidium guajava*).

La Guayaba (*Psidium guajava*) es miembro de la familia Myrtaceae y es un frutal que se adapta a diversas condiciones de clima y suelo, donde otros frutos difícilmente prosperan. En México, una de las regiones productoras de guayaba se ubica en Calvillo, Aguascalientes el cual se encuentra en segundo lugar de exportación a nivel nacional. En México no se cuenta con variedades, sólo se dispone del material criollo que han seleccionado los productores y en la región se distinguen los siguientes tres tipos:

- i. “China”: su fruto es redondo, pulpa de color crema, abundante semilla y buena consistencia, mayoritariamente destinada a procesamiento industrial;
- ii. “Media China”: fruto ovoide, de pulpa color crema, sabor agradable, tamaño grande, con un diámetro ecuatorial mayor de 3 cm, un número menor de semillas y mesocarpio grueso y firme. Se cultiva en el 90% de las huertas;
- iii. “Criolla”: puede ser de varios tipos de tamaño y forma variable, con pulpa blanca, rosada y salmón [8].

El fruto de la guayaba es una baya, la cual consiste de un mesocarpio carnoso y un endocarpio con numerosas semillas pequeñas entre la pulpa carnosa (fig. 1.1). Las semillas son duras y tienen forma de riñón. En promedio el peso del fruto varía entre 50 y 500 g. El color de la piel del fruto maduro es comúnmente amarillo. El color de la pulpa es blanca o crema en su estado cuajado y maduro (fig. 1.2) [2].

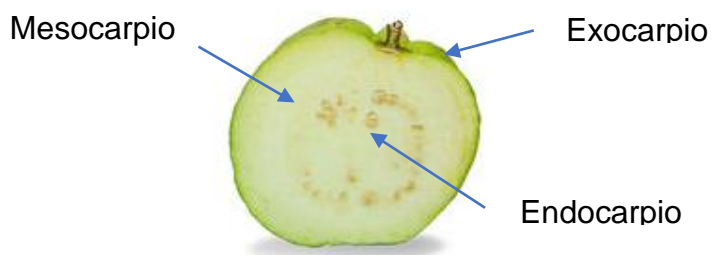


Fig. 1.1 Partes del fruto de Guayaba (*Psidium guajava*).



Fig. 1.2 Guayaba (*Psidium guajava*) A) fruto cuajado, B) fruto maduro.

1.1.1 Composición química.

La guayaba posee características químicas, nutricionales, organolépticas, medicinales y funcionales que la hacen aceptable en los mercados industriales y para su consumo directo [6,9]. Algunas de las características químicas de la guayaba se presentan en la tabla 1.1 y éstas cambian significativamente con la etapa de madurez, variedad y temporada.

Tabla 1.1 Características químicas del fruto de guayaba [2].

Característica	Intervalo de valores
Altura de fruto (cm)	3.9-9.8
Diámetro o anchura de fruto (cm)	4.2-8.3
Peso de fruto (g)	50-500
Volumen de fruto (mL)	210-300
Gravedad específica (g/mL)	0.94-1.11
Espesor de piel (cm)	1.3-3.5
Número de semillas por fruto	4-570
Peso de semillas por fruto (g)	0.4-4.4
Sólidos solubles totales (°Brix)	8.0-19.4
Acidez (% Cítrico)	0.08-2.20
Sólidos solubles totales / proporción de acidez	6.2-53.9
pH	4.1-5.4

Los carbohidratos son los principales constituyentes de la guayaba. Las frutas son una excelente fuente de vitamina C. Su contenido de ácido ascórbico se modifica dependiendo de la variedad, temporada, localización, madurez y prácticas de cultivo. El sabor es la característica más distinguible en el fruto de la guayaba y ha sido atribuido a la presencia de varios constituyentes volátiles, incluyendo carbohidratos, alcoholes y cetonas [2].

1.1.1.1 Sólidos solubles totales (SST).

Los sólidos solubles totales indican la cantidad de compuestos solubles en agua tales como azúcares, ácidos orgánicos, entre otros, contenidos en bebidas [10]. La medición de los sólidos solubles totales (SST) es un índice apropiado para evaluar el grado de madurez de los frutos en relación con el contenido de azúcares.

Los azúcares son sólidos solubles en jugo de fruto y pueden usarse como una estimación del contenido de azúcar. Los ácidos orgánicos, aminoácidos y pectinas solubles, también contribuyen a los sólidos solubles totales. El contenido de SST puede ser determinado en una muestra pequeña de jugo de fruta usando un refractómetro. La medición refractométrica consiste en pasar un rayo de luz a través del jugo de fruta y correlacionar los SST en unidades de grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) [11].

Los frutos deben contener un mínimo de azúcares totales para que sea rentable cosecharlos. Los ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico y tartárico) son otro componente del sabor y tienden a disminuir a medida que el fruto madura y los azúcares tienden a aumentar [12].

El aumento de SST puede atribuirse a la degradación hidrolítica de polímeros de carbohidratos como el almidón, la celulosa y la pectina con la aparición de monosacáridos solubles como la glucosa y el ácido galacturónico que dan sabor dulce del fruto [13].

1.1.1.2 Acidez titulable.

La acidez titulable es un parámetro que estima el contenido de ácidos orgánicos que es una característica importante de las frutas y constituye aproximadamente el 1% [14]. El ácido cítrico y el ácido málico son los ácidos más abundantes en las frutas. El ácido málico predomina en frutas con semilla (manzanas, ciruelas y tomates) mientras que el ácido cítrico es más abundante en frutas de baya, cítricas y tropicales. El ácido tartárico está presente en las uvas. La concentración de los ácidos orgánicos en las frutas disminuye con la maduración. El buen sabor del fruto depende del equilibrio entre el contenido de azúcares y ácidos [15].

Los ácidos orgánicos desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la calidad y el valor nutricional de los alimentos, pero también en el metabolismo post-cosecha. Algunos de ellos son componentes esenciales en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos de la respiración, y son una fuente de energía disponible que puede ser utilizada cuando otras reservas se agotan. Por otra parte, los ácidos orgánicos pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo del aroma y del sabor característico de los frutos. La mayoría de ácidos orgánicos se encuentran en pequeñas cantidades; sin embargo, algunos de ellos como el ácido málico o el cítrico pueden encontrarse en abundancia en los tejidos frutales [16].

La acidez libre (acidez titulable) representa a los ácidos orgánicos presentes que se encuentran libres y se mide neutralizando los jugos o extractos de frutas con una base fuerte. El pH aumenta durante la neutralización y la acidez titulable se calcula a partir de la cantidad de base necesaria para alcanzar el pH del punto final de la prueba. En la práctica se toma como punto final $\text{pH} = 8.5$ usando fenolftaleína como indicador. Bajo estas condiciones, los ácidos orgánicos libres y sólo una parte del ácido fosfórico y fenoles están involucrados en el resultado final. Para reportar la acidez, se considera el ácido orgánico más abundante del producto vegetal, el cual varía dependiendo de la especie de que se trate, por lo que el resultado se expresa en términos de la cantidad del ácido dominante [11].

1.1.1.3 Fenoles totales.

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con fines de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el *flavor* (sabor y aroma) de los vegetales y frutas. Los fenoles tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo. Su estructura química permite secuestrar radicales libres, debido a su facilidad para donar el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático. Los compuestos fenólicos pueden clasificarse de acuerdo con su estructura química en ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. Los compuestos fenólicos aumentan continuamente durante la madurez y la

actividad antioxidante aumenta del estado inmaduro al estado totalmente maduro para todas las frutas [16]. El estudio de la actividad antioxidante en frutas ha permitido asociar a los compuestos fenólicos y la vitamina C como los responsables de la protección contra las sustancias oxidantes. Así, un antioxidante es una sustancia que protege al organismo contra la formación de radicales libres. Los antioxidantes son importantes en la prevención de enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares [16].

1.1.1.4 Ácido ascórbico.

Entre los azúcares ácidos más importantes está el ácido ascórbico (AA) o vitamina C, que se localiza sobre todo en las frutas. Este compuesto da origen a varias reacciones químicas que inducen la producción de pigmentos amarillos en los alimentos que lo contienen [17].

La vitamina C es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante hidrosoluble derivado de los hidratos de carbono. Se sintetiza químicamente a partir de la glucosa, mediante una serie de reacciones enzimáticas [17,18].

Además, la vitamina C es un fuerte agente reductor que actúa como el mayor antioxidante soluble en agua, protegiendo los lípidos contra daño peroxidativo y disipando radicales libres de oxígeno. Por esta razón el consumo de frutas y vegetales ricos en vitamina C se asocia con bajos niveles de cáncer de cavidad oral, esófago, estómago y colon. Conocer el contenido de nutrientes como la vitamina C en la guayaba es de suma importancia para valorar el potencial nutricional de la fruta, como valor agregado a su producción [19]. El uso de la espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis), para la determinación del AA, es común en la investigación alimentaria, pues este ácido presenta transiciones electrónicas fuertes en la región UV, facilitando su identificación y cuantificación por esta técnica [20].

1.1.1.5 Azúcares.

Los azúcares o carbohidratos son compuestos orgánicos formados por carbono, oxígeno e hidrógeno. La glucosa se encuentra en las frutas y es el principal producto final proveniente de la hidrólisis de otros carbohidratos más complejos. Por su parte,

la glucosa da origen a otros azúcares, como la sacarosa y la fructosa, o bien a polímeros como la celulosa y el almidón. La fructosa o azúcar de la fruta es el más dulce de los azúcares. La sacarosa está formada por dos moléculas de monosacáridos, glucosa y fructosa [21].

La estructura química de los carbohidratos determina su funcionalidad y características, mismas que repercuten de diferentes maneras en los alimentos, principalmente en el sabor, la viscosidad, la estructura y el color. El contenido de los distintos azúcares en las frutas varía según el grado de maduración de éstas [17].

A lo largo del proceso de maduración, los azúcares solubles se acumulan, la acidez decae y el almidón disminuye progresivamente al acercarse a la madurez (fig.1.3). La desaparición del almidón coincide con el contenido máximo de azúcares solubles y con el término del crecimiento del fruto [22]. El aumento del contenido en azúcares incrementa el sabor dulce y la aceptabilidad de un fruto.

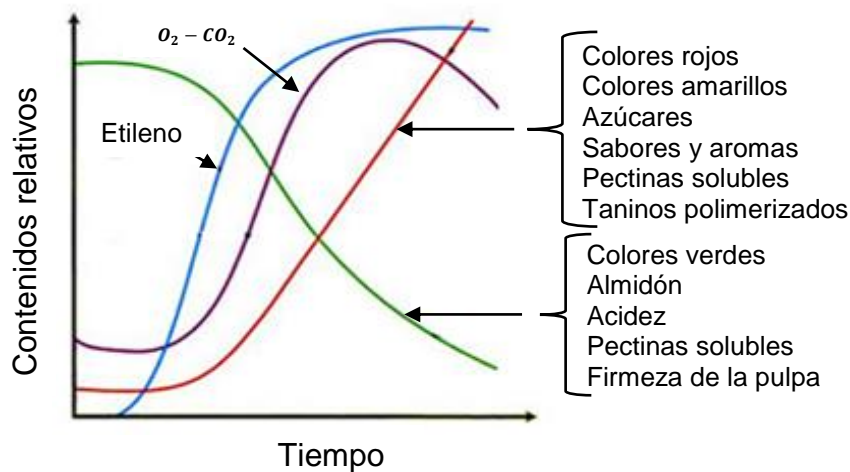


Fig.1.3 Efecto de la maduración sobre los componentes de los frutos [23].

1.2 Compuestos orgánicos volátiles de la guayaba.

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son compuestos orgánicos constituidos fundamentalmente por carbono, que se transforman fácilmente en vapor, presentan una temperatura de ebullición baja y una alta presión de vapor, lo que da como resultado la volatilización de los compuestos. En general son compuestos con punto de ebullición que oscila entre 50 y 260° C. El término COVs agrupa a una gran

cantidad de tipos de compuestos químicos, entre los que se incluyen los hidrocarburos alifáticos y aromáticos y otros compuestos como aldehídos, aminas, cetonas, éteres, ésteres, nitrilos, terpenos, ácidos y alcoholes [24]. Los compuestos del aroma son compuestos volátiles de bajo peso molecular generados por la oxidación de lípidos [17]. La guayaba es una fruta altamente reconocida por su aroma y sabor. El estudio del perfil aromático, ha mostrado que la composición del aroma es una mezcla de compuestos con diferente grupo funcional.

Los compuestos clasificados como terpenos constituyen lo que posiblemente es la clase más grande y más diversa de sustancias químicas producidas por los organismos vivientes conocidas bajo el término de productos naturales. Los terpenos son sustancias volátiles que dan a las plantas y flores su fragancia. Se producen ampliamente en las hojas y frutos de coníferas, cítricos y eucaliptos. El término "terpeno" se dio a los compuestos aislados de terpentina, un líquido volátil aislado de árboles de pinos. Los mono- y sesquiterpenos más simples son el principal constituyente de los aceites esenciales obtenidos de la savia y tejidos de ciertas plantas y árboles. Los di- y triterpenoides no son volátiles, se obtienen de plantas y resinas de árboles. Los tetraterpenoides forman un grupo de compuestos llamados "carotenoides".

Por definición, los terpenoides son los hidrocarburos de origen vegetal con la fórmula general $(C_5H_8)_n$, así como sus derivados oxigenados, hidrogenados y deshidrogenados. Estos se componen de "n" unidades de isopreno. La regla especial del isopreno establece que la molécula terpenoide está formada por dos o más unidades de isopreno unidas de tres formas, como se muestra en la tabla 1.2.

La regla del isopreno se ejemplifica en la fig. 1.4 con el monoterpeno mircenol, donde la unión de las moléculas de isopreno es "cabeza a cola". La mayoría de los terpenos son más conocidos por nombres triviales provenientes de la planta que los contiene que por su nombre sistemático de la IUPAC.

Los terpenoides se clasifican según el número de unidades de isopreno (n) presentes (tabla 1.3). Pueden clasificarse sobre la base del valor de n o del número de átomos de carbono presentes en la estructura. Cada clase puede subdividirse en subclases de acuerdo al número de anillos presentes en la estructura [25].

Tabla 1.2 Regla del isopreno para la unión de unidades de isopreno [26].

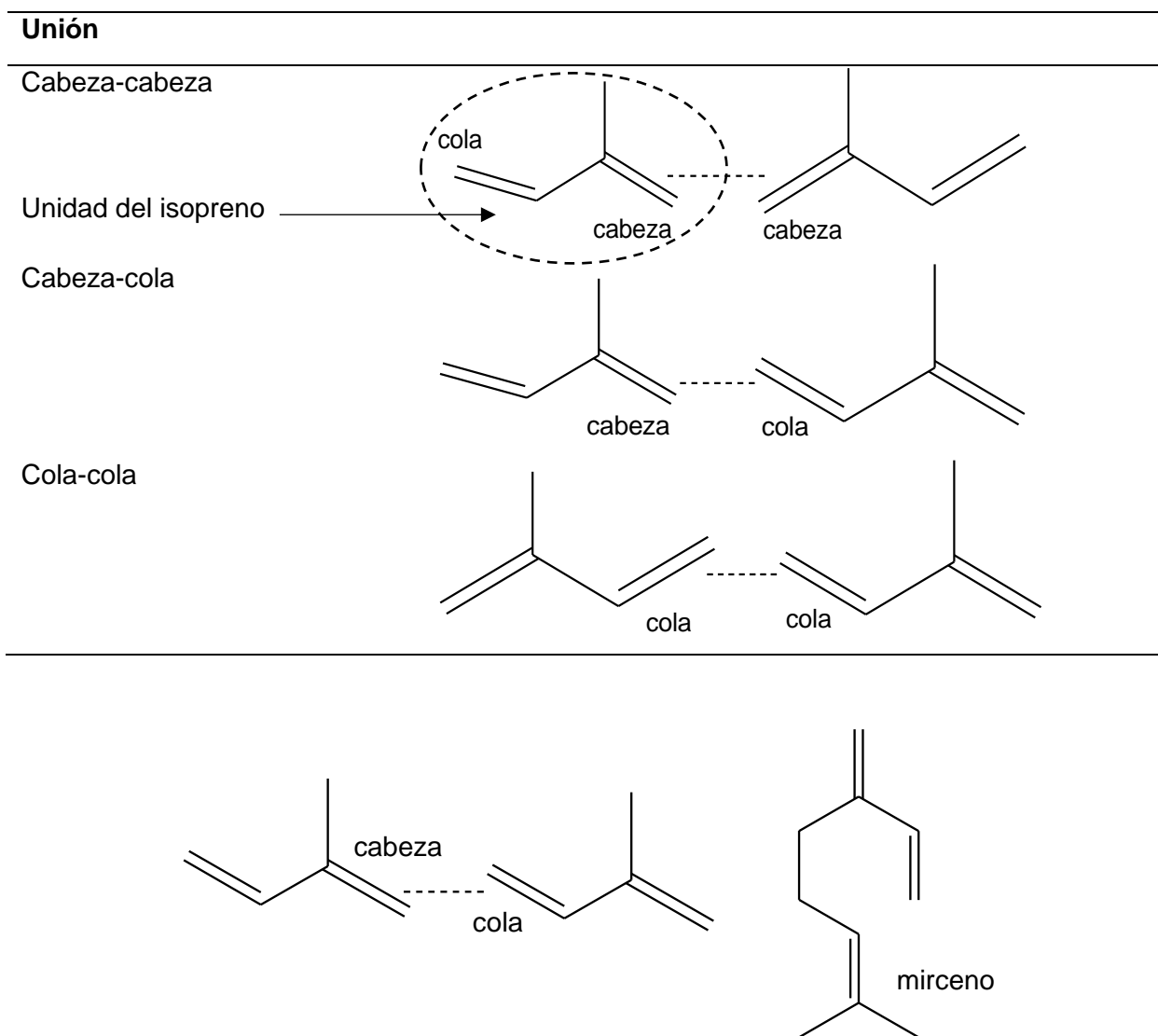
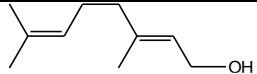
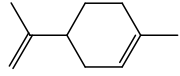
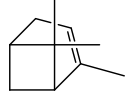
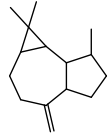
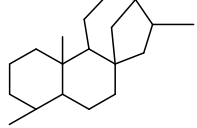


Fig. 1.4 Regla de isopreno.

Tabla 1.3 Clasificación de unidades de isopreno.

Clase	Valor de n	Átomos de carbono	Ejemplo [27]
Monoterpenos (C ₁₀ H ₁₆)	2	10	Mirceno, limoneno, geraniol, pineno
Sesquiterpenos (C ₁₅ H ₂₄)	3	15	Farnesol, cariofileno, nerolidol
Diterpenos (C ₂₀ H ₃₂)	4	20	Fitol, vitamina A
Sesterterpenos (C ₂₅ H ₄₀)	5	25	Geranilfarnesol
Triterpenos (C ₃₀ H ₄₈)	6	30	Escualeno
Tetraterpenos (C ₄₀ H ₆₄)	8	40	Carotenoides

Subclase	
i) Terpenos sin ciclo. Ejemplo: geraniol	
ii) Terpenos monocíclicos. Ejemplo: limoneno	
iii) Terpenos bicíclicos. Ejemplo: α-pineno	
iv) Terpenos tricíclicos. Ejemplo: aromadendreno	
v) Terpenos tetracíclicos. Ejemplo: kaurano	

Investigaciones en Brasil, África, Corea y Colombia han demostrado que existe una diversidad de compuestos orgánicos volátiles presentes en el fruto y hojas de guayaba. Padula y col. reportaron la caracterización de carotenoides en guayabas brasileñas donde los compuestos identificados fueron β-caroteno, licopeno, γ-caroteno, cis-γ-caroteno, zeinoxantina, 5,8-epoxi zeinoxantina. El licopeno contribuyó con el 86 % del contenido total de carotenoides reportados [28]. Lee y col. determinaron compuestos volátiles en frutos y hojas de guayaba (*Psidium guajava*) y encontraron 35 compuestos. Los compuestos identificados en fruto y hojas de guayaba fueron α-pineno, β-cariofileno, α-humuleno, β-(Z)-ocimeno y (Z)-3-hexenal,

mientras que los compuestos encontrados en frutos de guayaba fueron 3-hidroxi-2-butanona, 2-heptanona, benzaldehído, hexanoato de etilo, (Z)-3- acetato de hexenilo, hexenal, butanoato y etiloctanoato. Sólo en las hojas de guayaba Lee y col. identificaron canfeno, sabineno, eucaliptol, α -terpinoleno y germacreno B [29]. Ryu y col. realizaron la extracción de hojas de guayaba (*Psidium guajava*) con hexano y lograron identificar α -copaeno, fitol, óxido de β -cariofileno, α -patchuleno, α -terpineol, octadecano, entre 60 compuestos [9]. Raju y col. determinaron la composición química de aceite esencial de *Psidium cattleianum var lucidum* y reportaron 53 compuestos. El compuesto en mayor proporción fue el óxido de cariofileno (12.43%), mientras que otros constituyentes predominantes fueron identificados como biciclo (4.4.0) dec-1-ene (6.61%), 2,3-butanediol diacetato (4.84%) y patchuleno (4.73%) [30]. Romero realizó la extracción de compuestos orgánicos volátiles en guayaba colombiana variedad regional roja e Identificó en fruto cuajado; β -cariofileno, copaeno y limoneno [6]. Los métodos de extracción que más ampliamente se usan para determinar COVs son: headspace, extracción con fluido supercrítico, extracción Soxhlet, extracción con solventes de baja presión, extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, ultrasonido e hidrodestilación.

1.3 Métodos de extracción de compuestos volátiles.

1.3.1 Espacio de cabecera “Headspace” (HS).

La técnica de HS se emplea para determinar compuestos volátiles en muestras líquidas o sólidas, mediante el análisis de la fase vapor que está en equilibrio termodinámico con la muestra en un sistema cerrado. La recolección de las muestras por «headspace» o espacio en la cabecera en conjunto con los análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas constituyen una herramienta útil para el estudio de los COVs [6].

El muestreo mediante la técnica HS, se realiza a partir de un vial sellado herméticamente. El vial y la muestra se mantienen en condiciones de temperatura controlada para permitir que los COVs pasen de la fase sólida o líquida a la fase

vapor en el vial (fig. 1.5). La zona gaseosa del vial es lo que se denomina espacio de cabeza, por lo que una traducción no literal más apropiada sería espacio vacío o vapor en equilibrio con la muestra. La fracción volátil en la fase gaseosa, se transfiere a la columna cromatográfica [31].



Fig. 1.5 Representación del equilibrio termodinámico en vial con muestra para análisis en HS [32].

Las ecuaciones que describen la teoría del espacio de cabeza se derivan de tres leyes fundamentales de los gases ideales: de Dalton, de Henry y de Raoult.

La ley de las presiones parciales de Dalton establece que el total de presión de una mezcla de gases ideales es igual a la suma de la presión parcial de cada componente individual en esa mezcla de gas. La ley de Henry establece que a una temperatura constante, la cantidad de un gas disuelto en un líquido es directamente proporcional a la presión parcial de ese gas en equilibrio con ese líquido. La ley de Raoult establece que la presión parcial de un soluto en el volumen del espacio de cabeza es proporcional a la fracción molar de soluto en solución; es decir, la concentración de un compuesto en la fase vapor es proporcional a su concentración en la fase líquida.

Las concentraciones relativas de un compuesto entre las dos fases alcanzarán un valor constante o de equilibrio. La manera más conveniente de representar la distribución entre las dos fases es a través del coeficiente de partición K . Este es proporcional a la relación de la concentración entre las dos fases, donde el equilibrio se expresa por un cociente constante;

$$K = \frac{C_{S,L}}{C_G} \quad (1)$$

donde K es el coeficiente de partición de un compuesto entre la fase de la muestra (sólida o líquida) y la fase gaseosa (espacio de cabeza), $C_{s,l}$ es la concentración de ese compuesto en la fase de la muestra (sólida o líquida) y C_G es la concentración del compuesto en la fase gas (espacio de cabeza).

La concentración de analito en la muestra y en el volumen del espacio de cabeza viene dada por la siguiente expresión;

$$C_o V_{S,L} = C_G V_G + C_{S,L} V_{S,L} \quad (2)$$

donde, C_o es la concentración del analito en la muestra original, C_G es la concentración del analito en el espacio de cabeza, V_G es el volumen del gas en la muestra del vial, $V_{S,L}$ es el volumen de muestra y K es el coeficiente de partición.

Sustituyendo la ecuación (1) en la ecuación (2):

$$C_o V_{S,L} = C_G V_G + K C_G V_{S,L} \quad (3)$$

$$C_o V_{S,L} = C_G [K V_{S,L} + V_G] \quad (4)$$

$$C_o = C_G \left[\frac{K V_{S,L}}{V_{S,L}} + \frac{V_G}{V_{S,L}} \right] \quad (5)$$

$$C_o = C_G \left[K + \frac{V_G}{V_{S,L}} \right] \quad (6)$$

Despejando C_G :

$$C_G = \frac{C_o}{\left(K + \frac{V_G}{V_{S,L}} \right)} \quad (7)$$








La ecuación (7) muestra dos puntos importantes. Para obtener resultados confiables, la relación $V_G/V_{S,L}$ debe permanecer constante. Esto significa que la cantidad de muestra y el tamaño de vial deben mantenerse. Con el fin de obtener una mayor extracción, debe tenderse a que $C_G > C_{S,L}$; o sea, a reducir al mínimo el coeficiente de reparto, K y para que el sumando $V_g/V_{S,L}$ no afecte al cociente, una pequeña relación $V_G/V_{S,L}$ produce una mayor concentración de volátil de interés en el volumen de

espacio de cabeza, o sea que debe propiciarse que $V_G < V_{S,L}$. La concentración de analito en el volumen de espacio de cabeza depende también de otros factores como son temperatura y la presión total en el vial [32,33,34,35].

1.3.2. Microextracción en fase sólida (SPME).

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra (fig. 1.6) de sílice fundida que está recubierta con diferentes tipos de adsorbentes como los que se enlistan en la tabla 1.4. En la mayoría de los casos el adsorbente es de naturaleza polimérica.

Tabla. 1.4 Tipos de fibras comerciales [36].

Constitución de la Fibra	Características del analito	Polaridad	Color
75 μm /85 μm carboxen/ polidimetilsiloxano	Gases y compuestos de bajo peso molecular (30-225)	Semipolar	
100 μm polidimetilsiloxano	Volátiles (PM 60-275)	Polar	
65 μm polidimetilsiloxano/ divinilbenceno	Volátiles, aminas y compuestos nitro- aromáticos (PM 50-300)	Semipolar	
50/30 μm divinilbenceno/ Carboxen/polidimetilsiloxano	Volátiles y semivolátiles (PM 40-275)	Semipolar	
85 μm poliacrilato	Volátiles polares (PM 80-300)	Polar	
7 μm polidimetilsiloxano	Compuestos no polares con alto peso molecular (125-600)	No polar	
30 μm polidimetilsiloxano	COVs no polares (PM 80-500)	No polar	

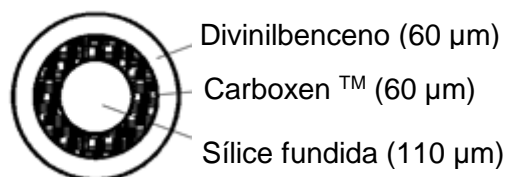


Fig. 1.6 Vista frontal de una fibra empleada en SPME.

El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla a una jeringa (fig. 1.7). El principio sobre el que se basa la SPME es generalmente la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el adsorbente de la fibra.

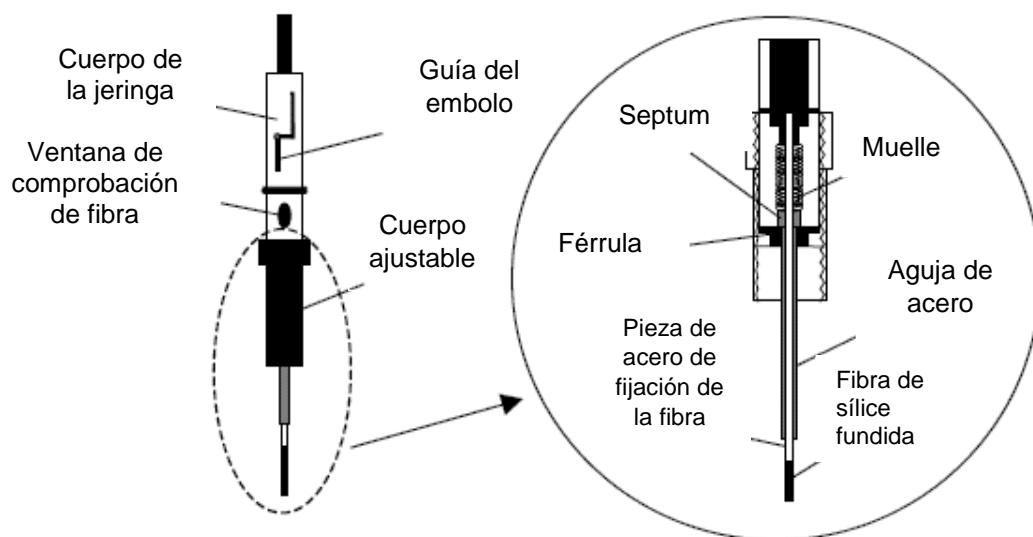


Fig. 1.7 Esquema del dispositivo de SPME [37].

En el proceso por SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. La primera etapa es la extracción; en la que la fibra recubierta del sorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y a temperatura determinada de manera que se produce una migración de los analitos a la fibra y la adsorción de estos. Después de esta primera etapa, ocurre la desorción de los analitos retenidos por la fibra mediante calentamiento o disolución (fig. 1.8) directamente en el puerto de inyección de un cromatógrafo o en un disolvente [38].

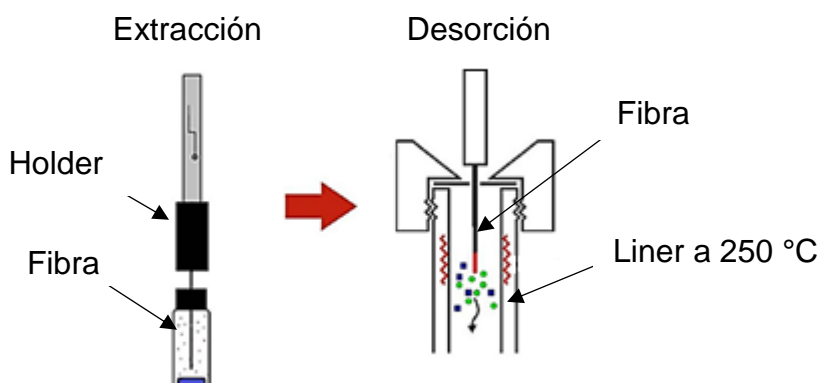


Fig. 1.8 Estado de la fibra SPME durante las dos etapas de extracción.

1.3.3 Hidrodestilación.

En este método, el material que contiene las sustancias a extraer se pone en contacto directo con el agua en ebullición y el material.

La hidrodestilación ha sido un método tradicional para la extracción de aceites. El aceite esencial es una mezcla de sustancias aromáticas producidas por muchas plantas. En realidad, los aceites tienen un punto de ebullición superior al del agua, pero la mezcla de aceites esenciales con agua presenta un punto de ebullición inferior y por eso la mezcla puede ser destilada. La hidrodestilación puede conseguirse en un equipo Clevenger (fig. 1.9). El material a extraer está inmerso en agua y alcanza una temperatura cercana a los 100°C. Al pasar por el condensador los vapores se enfrían, condensan y se transforman en un líquido formado dos fases inmiscibles; fase orgánica (aceite esencial) y fase acuosa (destilado). La fase orgánica formada por el aceite esencial, se separa fácilmente de la fase acuosa en el dispositivo, al tener distinta densidad y ser inmiscible en agua [39].

Los aceites esenciales son un conjunto de compuestos orgánicos volátiles de base lipídica que se encuentran en diversas plantas. Estos pueden ser extraídos de diferentes partes de las plantas como hojas, cortezas, raíces, flores y frutos. Los aceites están presentes en pequeñas cantidades y representan sólo una pequeña fracción del material vegetal completo.

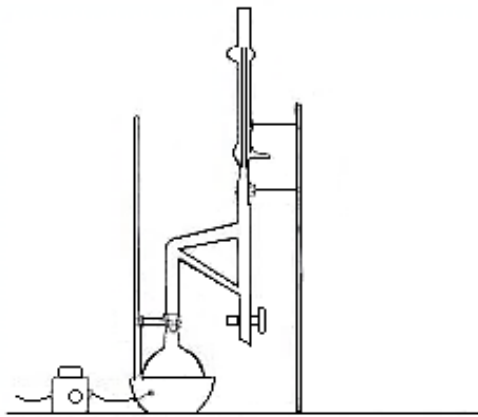


Fig. 1.9 Equipo Clevenger.

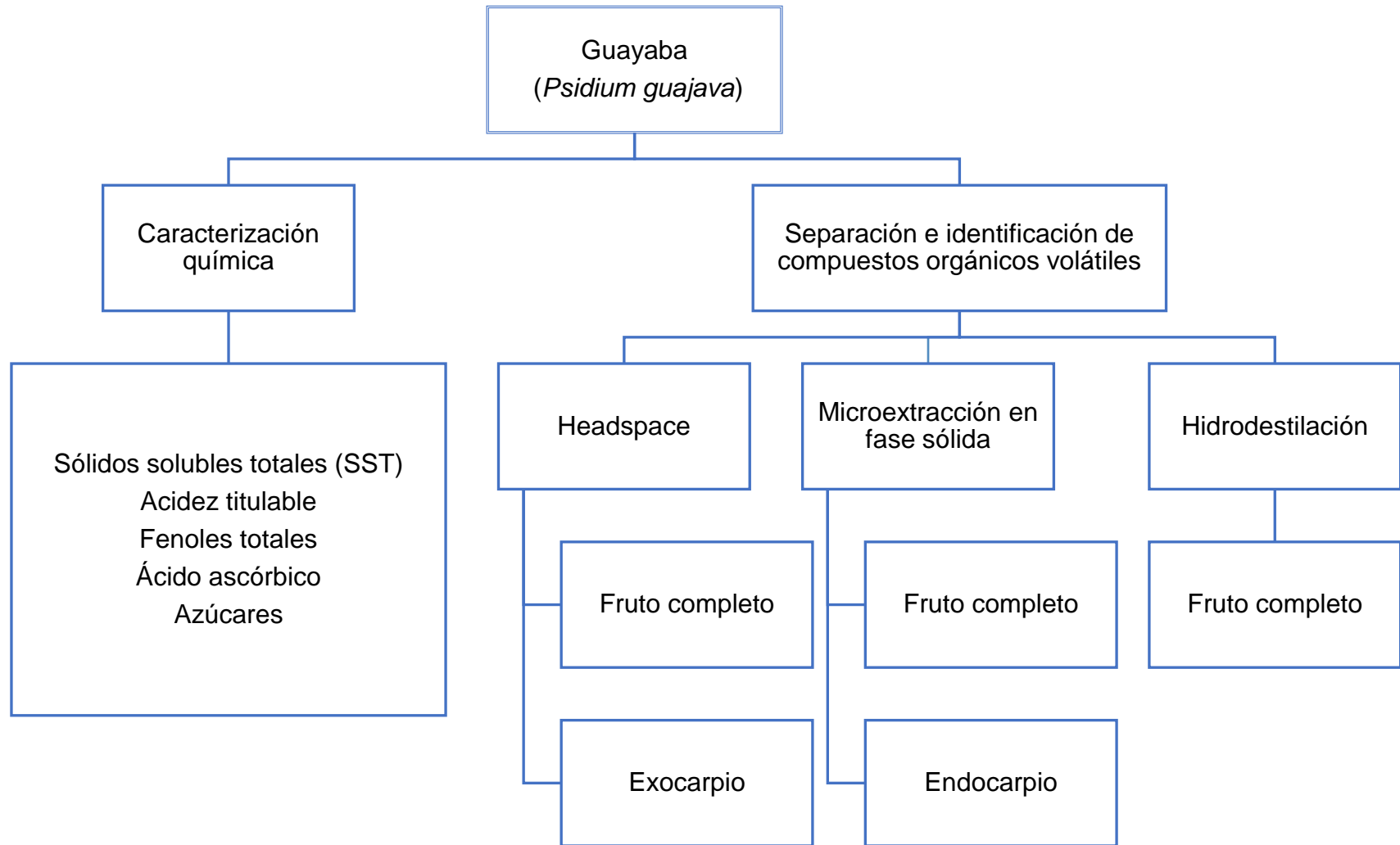
Los aceites se producen durante algunos procesos metabólicos de la planta y se excretan como subproductos odoríferos. Estos aceites esenciales son mezclas complejas que contienen generalmente una gran variedad de monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres y fenoles, entre otros. Los aceites esenciales son los principales constituyentes del aroma y pueden ser extraídos por arrastre de vapor e hidrodestilación, entre otros [40].

Justificación

La guayaba (*Psidium guajava*) es un producto agrícola que se destaca por tener una importancia nacional-regional. Su producción inició en el municipio de Calvillo, en el Estado de Aguascalientes (37%). Con el paso del tiempo, la producción de esta fruta se ha llevado a cabo en otros estados de la República como Michoacán (44% de la producción nacional), Zacatecas (11%) y Estado de México (4%).

En los últimos años la exportación de la guayaba se ha visto afectada por la incidencia de enfermedades y plagas, entre las que destaca el “picudo de la guayaba” (*Conotrachelus dimidiatus*), causantes del decremento de la producción frutal y de los productos derivados. En la etapa fenológica del fruto cuajado, cuando la guayaba es conocida como “canica” (frutos verdes, duros de 2 cm de diámetro), es cuando ocurren los mayores ataques. De aquí se desprende el interés por estudiar la composición química de la guayaba en dos etapas fenológicas: madura y cuajada. La caracterización química y la identificación de los compuestos orgánicos volátiles característicos de cada etapa fenológica pueden contribuir en la determinación del grado de madurez del fruto y también como indicadores de su calidad. Existen pocos trabajos acerca de la guayaba madura de Brasil, África, Corea y una investigación del fruto cuajado de Colombia. La caracterización química de la guayaba (*Psidium guajava*) de Calvillo de la variedad “Media China” no ha sido reportada. Este estudio contribuirá a establecer las características de la variedad “Media China” en dos etapas fenológicas. En el campo de la ecología química esta investigación puede aportar información acerca de los aleloquímicos que intervienen en la interacción planta-insecto.

Diagrama general del trabajo de la tesis



CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL.

2.1 Caracterización química del fruto cuajado y maduro.

2.1.1 Sólidos solubles totales.

En esta y todas las secciones posteriores, el fruto obtenido de un huerto experimental en Calvillo, Aguascalientes se lavó previamente con agua destilada y agua desionizada. Posteriormente se secó con toalla de papel. Las partes no comestibles fueron eliminadas incluyendo las zonas magulladas o dañadas, así como el endocarpio. Para la determinación de los sólidos solubles totales se licuaron 10 g de muestra con 10 mL de agua (disolución 1:1) y luego se maceró en un mortero. La suspensión se centrifugó 20 min a 10000 rpm, se extrajo el sobrenadante y se realizó la lectura en un refractómetro. Los reactivos y equipos empleados para la realización de la tesis se muestran en los anexos A1 y A2. Posteriormente se calcularon los sólidos solubles totales en grados Brix de acuerdo con la siguiente expresión [41,42].

$$^{\circ}\text{Brix} = \text{Lectura del equipo} \times 2$$

donde 2 representa el factor de dilución usado para la lectura de la muestra en el refractómetro.

2.1.2 Acidez total.

Se preparó una disolución al 10% (p/v) de exo- y mesocarpio licuados con agua. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se tomó una alícuota de 5 mL a la cual se adicionaron 3 gotas de indicador fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.1 N hasta un vire rosa. Posteriormente se calculó la acidez total de acuerdo a la siguiente expresión [43]:

$$\text{Acidez total}(\%) = \frac{\text{Volumen de valoración} \times 0.1 \frac{\text{eq}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000 \text{ mL}} \times 64.0413 \frac{\text{eq}}{\text{L}}}{\text{Volumen de muestra}} \times 100$$

donde el volumen de valoración son los mililitros gastados de NaOH 0.1 equiv. L⁻¹ y 64.0413 eq L⁻¹ corresponden a los equivalentes de hidróxido de sodio y ácido cítrico, respectivamente. El volumen de muestra es el volumen empleado en la determinación.

2.1.3 Fenoles totales.

Para la determinación de fenoles totales se licuaron 0.5 g de exo- con mesocarpio en 20 mL de disolvente (acetona: agua 1:1). La suspensión se mantuvo en agitación con barra magnética a temperatura ambiente y después se centrifugó 20 min a 10000 rpm. El concentrado extraído se filtró con una membrana de triacetato de celulosa (0.45 µm) y se aforó a 250 mL con agua desionizada. La disolución se vertió a un embudo de separación de 500 mL y se adicionaron 50 mL de agua desionizada. Después se agregaron 5 mL de búfer pH 10.1± 0.1, fosfato ácido de 4-aminoantipirina y sulfato de sodio, 560 mg de ferrocianuro de potasio como oxidante y 30 mL cloroformo. Entre cada adición se tapó y agitó el embudo para disolver. Finalmente, las fases fueron separadas y se realizó la lectura de la fase acuosa y fase cloroformo en un espectrofotómetro a 418 nm [44,45].

Para determinar la concentración de fenoles totales se construyó una curva de calibración usando una disolución de ácido gálico con una concentración de 0.2 mg L⁻¹ para expresar la concentración de fenoles relativa a este ácido como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg GAE) en 100 g de fruto [15].

Se realizaron lecturas en un espectrofotómetro UV-Vis a 418 nm de las disoluciones con concentraciones de 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg L⁻¹ preparadas en acetona: agua (1:1). La curva de calibración se muestra en la fig. 2.1 y el ajuste de la curva en la tabla 2.1.

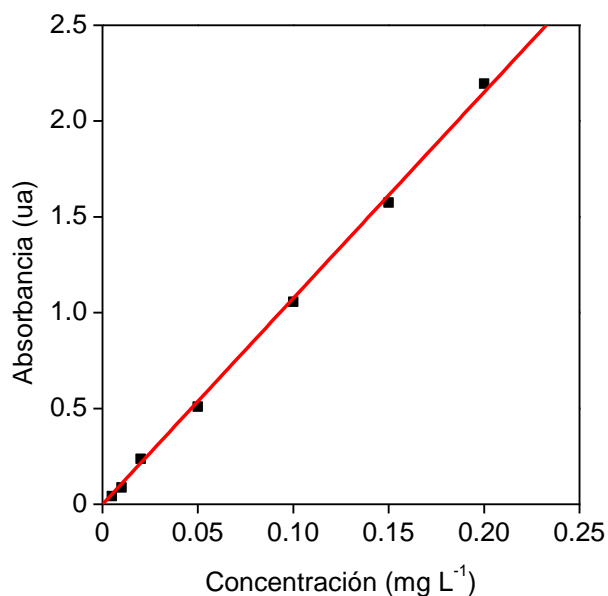


Fig. 2.1 Curva de calibración de disoluciones de ácido gálico empleado en la determinación de fenoles.

Tabla 2.1 Parámetros de curva de calibración de ácido gálico.

Ecuación	a	b	R ²
$A = a + b * C$	0	10.8	0.99925

2.1.4. Ácido ascórbico.

Para la determinación de ácido ascórbico se usaron juntos el exo- y el mesocarpio del fruto, los cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron. En un matraz se colocaron 2 g de fruto molido y se adicionó el disolvente (3.6 % ácido metafosfórico + 1 mM ácido etilendiaminotetraacético + 5 mM tris-(2carboxietil) fosfina; pH 1.5). La disolución se mantuvo en agitación con barra magnética por 20 min y posteriormente se centrifugó 30 min a 10000 rpm [46]. Se separó el sobrenadante, se extrajo el sedimento y se colocó en un vaso de precipitado al cual se adicionaron 2 mL del disolvente, se sónico 10 min y posteriormente se centrifugó nuevamente 30 min a 10000 rpm. El segundo sobrenadante se combinó con el primero y se aforó a 10 mL con disolvente. La muestra fue filtrada a través de una

membrana de triacetato de celulosa (0.45 μm) para ser analizada por cromatografía de líquidos con detector arreglo de diodos (HPLC-DAD) con el método descrito en el anexo A3. Para determinar la concentración de ácido ascórbico se construyó una curva de calibración usando ácido ascórbico en una concentración de 50 mg L^{-1} y las disoluciones con concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg L^{-1} en agua, analizadas por HPLC-DAD con el método descrito en el anexo A3. La curva de calibración se presenta en la fig. 2.2 y el ajuste de curva en la tabla 2.2.

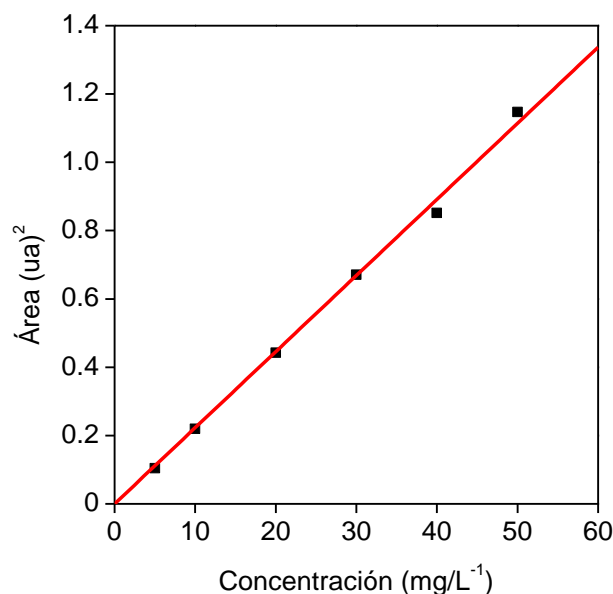


Fig. 2.2 Curva de calibración de disoluciones de ácido ascórbico analizadas mediante HPLC con detector arreglo de diodos.

Tabla 2.2 Parámetros de la curva de calibración de ácido ascórbico.

Ecuación	a	b	R ²
$A = a + b * C$	0	0.02	0.99879

Para determinar el porcentaje de recuperación de ácido ascórbico se tomaron 500 μL de la disolución filtrada de fruto cuajado preparada como se describió anteriormente. Se aforó a 1 mL con agua desionizada, se tomó una alícuota de 500 μL y se aforó a 1 mL con una solución patrón de ácido ascórbico. Para el fruto maduro se tomaron

100 μ L de muestra de fruto maduro y se aforaron a 1 mL con agua desionizada. A continuación, se tomó una alícuota de 500 μ L y se aforaron a 1 mL con una solución patrón de ácido ascórbico con concentración de 10 mg L⁻¹. Las muestras fueron analizadas por HPLC-DAD con el método descrito en el anexo A3. Posteriormente se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo a la siguiente ecuación [47].

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{C_x - C_B}{C_A} \times 100$$

donde C_x es la concentración de la muestra con el patrón añadido, C_B es la concentración de la muestra y C_A es la concentración del patrón añadido.

2.1.5 Azúcares en fruto maduro.

Para la determinación de azúcares se cortaron 20 g de fruto completo en trozos ($l \approx 0.5$ cm) y se licuaron con agua desionizada tibia (40°C). La muestra se filtró para separar las semillas y se agitó con barra magnética por 2 horas, se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm [48]. El sobrenadante se extrajo, se almacenó a -20°C y se analizó por cromatografía de líquidos con detector índice de refracción (HPLC-IR) con el método descrito en el anexo A4.

Para determinar la concentración de azúcares se construyó una curva de calibración. Se usó una disolución stock de glucosa de 60 mg mL⁻¹ y otra de fructosa + sacarosa con un contenido de 20 mg mL⁻¹ de cada una. Las curvas de calibración de los azúcares se obtuvieron en el intervalo de concentración de 2,4,5,6,8,10 mg mL⁻¹. Los estándares de fructosa + sacarosa se analizaron juntos y la glucosa por separado mediante HPLC-IR con el método descrito en el anexo A4. La curva de calibración se presenta en la fig. 2.3 y el ajuste de la curva en la tabla 2.3. Dada la falta de resolución de los picos de fructosa y sacarosa por la columna utilizada, se recurrió al procedimiento de deconvolución.

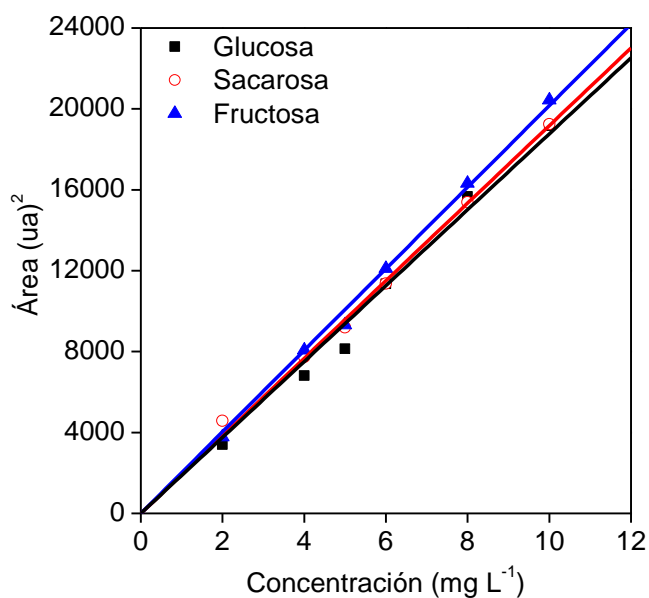


Fig. 2.3 Curva de calibración de glucosa, sacarosa y fructosa obtenidos por HPLC-IR.

Tabla 2.3 Parámetros de la curva de calibración de azúcares.

Sustancia	Ecuación $A = a + b * C$		
	a	b	R ²
Glucosa	0	1877.0	0.9962
Sacarosa	0	1917.6	0.9990
Fructosa	0	2016.3	0.9990

2.2 Extracción de compuestos orgánicos volátiles en fruto cuajado y fruto maduro.

2.2.1. Optimización de parámetros en Headspace (HS).

Para la optimización de los parámetros de análisis por el método de HS se utilizaron juntos el exo- y mesocarpio congelados en nitrógeno líquido. Se colocaron en 10 viales con las masas indicadas en la tabla 2.4, donde también se anotan las condiciones de análisis.

Tabla 2.4 Muestras de guayaba y parámetros para optimización de la extracción HS.

No. muestra	Muestra (g)	Tiempo de equilibrio en el vial (min)	Temperatura en el horno (°C)	Presión de llenado de vial (psi)
1	1.14277	10	80	15
2	1.16010	20	80	15
3	1.16667	30	80	15
4	1.15825	10	80	15
5	1.15952	45	80	15
6	1.17050	10	60	15
7	1.15821	10	100	15
8	1.11997	10	80	30
9	1.15384	10	80	60
10	1.18923	10	80	15

Las gráficas de la figura 2.4 muestran la intensidad de la señal de 6 picos cromatográficos obtenidos con diferentes condiciones en la inyección HS para el tiempo de equilibrio (fig. 2.4 a), la temperatura (fig. 2.4b) y la presión de llenado de vial (fig. 2.4c). Se observó que la mayor intensidad de la señal se obtuvo con 10 min de tiempo de equilibrio para dos compuestos ($15 < t_R < 25$ min), tiempo necesario para lograr una buena extracción. Después de establecer el tiempo de equilibrio como 10 min, se probaron las temperaturas de 60, 80 y 100 °C en la unidad de HS. Se observó (fig. 2.4b) que a mayor temperatura se extrae una mayor cantidad de los compuestos. El efecto de la mayor temperatura de 100 °C sobre la altura de pico no fue sobresaliente en comparación con 80 °C por lo que se estableció como temperatura de trabajo 80 °C para evitar la pérdida de volátiles. Finalmente, se analizaron las muestras a la presión de llenado del vial de 15, 30 y 60 psi (fig. 2.4c). Se observó que la presión no tuvo un efecto significativo sobre la intensidad de los picos de los compuestos seleccionados por lo que se trabajó con la presión de “default” (15 psi). Finalmente, los parámetros optimizados resultantes fueron una temperatura de 80 °C, un tiempo de equilibrio de 10 minutos y una presión de llenado de vial de 15 psi.

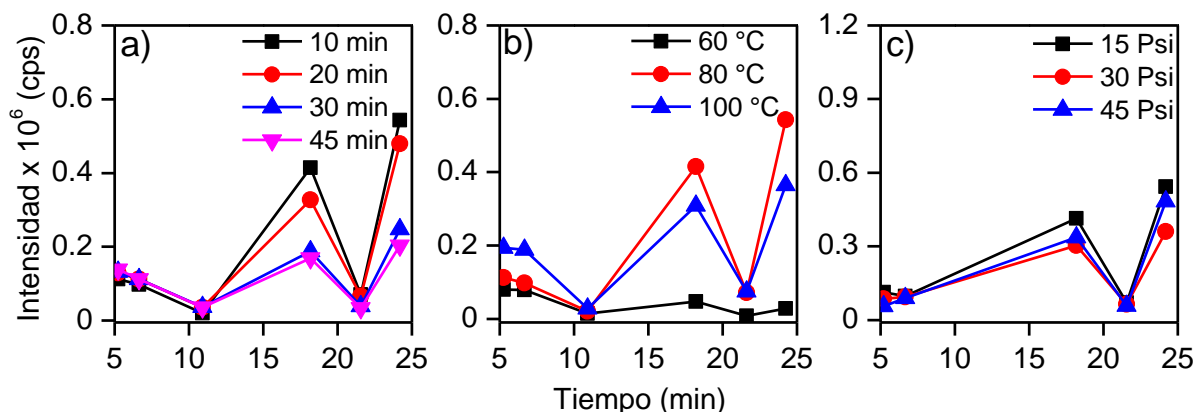


Fig. 2.4 Intensidad de los picos cromatográficos con diferentes condiciones de extracción por HS: a) tiempo de equilibrio, b) temperatura, c) presión.

Las muestras de fruto cuajado y de fruto maduro se analizaron por cromatografía de gases con HS (GC QTOF/MS). En el caso del fruto cuajado completo se utilizaron 3 g, mientras que en los otros casos, se colocó 1 g en el vial y en todos los casos se empleó el método descrito en el anexo A5. Para estimar la concentración de COVs extraídos, se seleccionaron cuatro compuestos: hexanal 4.2 mg mL⁻¹, benzaldehído 5.2 mg mL⁻¹, (S)-limoneno 4.2 mg mL⁻¹, y β-cariofileno 4.5 mg mL⁻¹. El área de los picos producidos se relacionó con el área en HS y SPME con diferentes fibras para establecer comparaciones.

2.2.2 Microextracción en fase sólida (SPME).

Todos los análisis empleando esta técnica de extracción se hicieron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con tiempo de vuelo (CG-QTOF/MS) utilizando el método descrito en el anexo A6. Algunos COVs fueron cuantificados después de la extracción (HS y SPME) y separación cromatográfica empleando el método de estándar externo. Por el método de HS los COVs cuantificados fueron hexanal, benzaldehído, (S)-limoneno y β-cariofileno, mientras que por SPME fueron (S)-limoneno y β-cariofileno. Los estándares se prepararon a una concentración conocida, se analizaron como disolución en hexano y los picos cromatográficos resultantes fueron integrados. Posteriormente, los picos de los compuestos de interés identificados en las muestras de fruto cuajado y maduro se

integraron y su área se relacionó con el área de los estándares para determinar la concentración. En esta tesis se considera que la cuantificación corresponde a una concentración relativa por tratarse de condiciones de extracción uniformes y no óptimas para cada uno de los analitos.

2.2.2.1 Fruto cuajado completo pre-cosecha.

Para la recolección de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) se empleó la metodología de microextracción en fase sólida por adsorción sobre fibras de polímeros adsorbentes. Se utilizó la fibra de polidimetilsiloxano/ divinilbenceno /carboxen (PDMS/DVB/CAR 50/30 μm).

La figura 2.5 muestra el recipiente de polipropileno de 355 mL usado como cámara para la extracción de volátiles. Se esperó una hora para alcanzar el equilibrio, luego se introdujo la fibra de SPME dentro del orificio de la cámara y se expuso por un tiempo de 5 horas (fig. 2.5). Todas las muestras se tomaron a temperatura ambiente a 27.1 °C y humedad de 52 %. En cada muestreo se obtuvo previamente un blanco omitiendo el material vegetal, y exponiendo la fibra a las mismas condiciones que las muestras. Las fibras fueron almacenadas y transportadas en tubos con tapa de teflón sellados a 10 °C hasta su análisis, realizado durante las siguientes 24 horas.



Fig. 2.5 Montaje empleado para la toma de muestra de los COVs de fruto cuajado de guayaba (*Psidium guajava*) en campo (pre-cosecha), empleando la metodología SPME.

2.2.2.2 Fruto cuajado y maduro completo post-cosecha.

El fruto cuajado completo en campo se cortó y analizó en laboratorio después de 24 h con una fibra PDMS/DVB/CAR con un tiempo de exposición de 24h. Los COVs liberados por los frutos recolectados se analizaron por SPME con un tiempo de exposición de 12 h utilizando 3 fibras (tabla 1.4): No polar PDMS, bipolar PDMS/DVB y bipolar PDMS/DVB/CAR (50/30 μm).

Se utilizaron 20 g de fruto cuajado y 60 g de maduro. El muestreo se realizó a temperatura ambiente (25 °C) por duplicado (fig. 2.6). Bajo las mismas condiciones se obtuvo previamente un blanco con la cámara vacía.

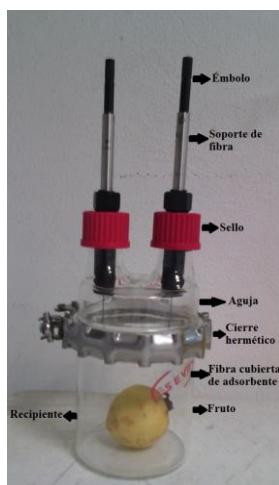


Fig. 2.6 Montaje empleado para la toma de muestra de los COVs de fruto maduro de guayaba, *Psidium guajava*, empleando la metodología SPME en laboratorio.

2.2.2.3 Endocarpio post-cosecha.

Los COVs liberados por el endocarpio se recolectaron por SPME utilizando la fibra de PDMS/DVB/CAR (50/30 μm), con un tiempo de exposición de 12 h. Se usaron 3 g de endocarpio de fruto cuajado y fruto maduro en experimentos por separado a 20°C.

2.2.2.4 Cinética de compuestos orgánicos volátiles en fruto maduro.

Para estudiar la cinética de liberación de COVs durante la maduración del fruto se utilizó la fibra de PDMS/DVB/CAR (50/30 μm). Se tomaron 60 g de fruto maduro

entero y se colocaron en la cámara donde la fibra se expuso por 12 horas (fig. 2.6). Este procedimiento se realizó alternando las fibras durante 10 días. El análisis se realizó inmediatamente terminado el tiempo de exposición.

2.2.3 Hidrodestilación.

2.2.3.1 Destilado.

Las partes no comestibles fueron eliminadas; incluyendo las zonas magulladas o dañadas. El fruto fue cortado en trozos (≈ 0.5 cm) y se adicionaron 100 mL de agua desionizada en un matraz de bola. Se añadieron 20 perlas de ebullición y se montó el matraz en un aparato Clevenger. Después de 5 h de destilación, el aceite esencial fue removido de la fase acuosa para ser analizada por cromatografía de líquidos con detector arreglo de diodos (HPLC-DAD) con el método descrito en el anexo A7. Se tomaron 100 g de fruto cuajado y 200 g de fruto maduro, respectivamente.

2.2.3.2 Aceite.

Para separar el aceite esencial de la fase acuosa obtenida según la descripción en la sección anterior, se utilizó la extracción líquido-líquido. En un matraz de separación se colocaron 1.5 mL de agua desionizada, se adicionó la fase aceite e inmediatamente se agregaron 1.5 mL de hexano, se tapó y agitó. El tiempo de equilibrio de la fase acuosa y fase hexano fue de 5 minutos. Transcurrido el tiempo se separaron la fase acuosa y la fase hexano. Esta última se colectó en un vial donde se dejó evaporar la muestra. Ya evaporada la muestra se adicionaron 500 μ L de tetrahidrofurano para resuspender y analizar por HPLC QTOF/MS con el método descrito en el anexo A9 y GC QTOF/MS con el método descrito en el anexo A10.

2.2.4 Análisis cromatográfico.

Las condiciones de cada análisis se compilan en los anexos A3-A10. Los índices de Kovats (IK) se calcularon a partir de mezcla estándar de n-alcanos (C₈-C₂₀). En este

método, la retención cromatográfica de un compuesto en condiciones específicas se determina con relación a la retención de una serie de n-alcenos analizados en las mismas condiciones. Por definición el índice de retención de los alcanos es 100 veces su número de átomos de carbono.

El índice de Kovats de cada compuesto x se calculó con la siguiente fórmula:

$$IK = 100_n + 100 \left[\frac{t'_R(x) - t'_R(n)}{t'_R(N) - t'_R(n)} \right]$$

donde $t'_R(x)$ es el tiempo de retención del compuesto objeto del cálculo, n el número de átomos de carbono del alcano que eluye inmediatamente antes de x , $t'_R(n)$ su tiempo de retención y $t'_R(N)$ el tiempo de retención del alcano que eluye inmediatamente después de x [6].

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización química de fruto cuajado y fruto maduro.

Las características químicas del fruto cuajado y fruto maduro obtenidas en este trabajo de tesis se presentan en la tabla 3.1, donde se observan diferencias significativas entre el fruto cuajado y el maduro. El contenido de sólidos solubles totales (SST) que está directamente relacionado con la aceptación del fruto, es mayor en el fruto maduro en correspondencia con el mayor contenido de azúcares [23]. La cantidad de ácido ascórbico incrementa a través del proceso de maduración y para que la fruta tenga un buen sabor, existe una relación entre los azúcares y ácidos. En este trabajo, el cociente SST/acidez se quintuplica en el fruto maduro. Los ácidos son convertidos en azúcares dando lugar al suave sabor de los frutos maduros. Los sólidos solubles totales, la acidez total y el ácido ascórbico en fruto maduro de la guayaba coincide con lo reportado por Mondragón [14], Rojas [49] y Salunkhe [2] para guayaba de México y Colombia. El fruto contiene cantidades significativas de fenoles que aumentan con la madurez del fruto, por lo que la guayaba es una excelente fuente de antioxidantes como el ácido ascórbico y fenoles. La sacarosa es el azúcar predominante en el fruto maduro estudiado en esta tesis.

Tabla 3.1 Características químicas de fruto cuajado de guayaba “Media China”.

Parámetro	Fruto cuajado	Fruto maduro
SST (°Bx)	3.7±0.2	14.6±0.1
Acidez (% cítrico)	0.84 ± 0.06	0.74±0.1
Fenoles totales (mg GAE en 100 g)	8.6	11.0
Ácido ascórbico (mg en 100 g)	8.7	189.2
% Recuperación ácido ascórbico	81	97.0
Fructosa (mg en 100 g)	ND	1051
Glucosa (mg en 100 g)	ND	970
Sacarosa (mg en 100 g)	ND	1812
Relación SST/acidez	4.0	20.0

ND: No determinado

La concentración de fenoles totales se determinó por reacción con 4-aminoantipiridina para formar un complejo (fig. 3.1) que fue detectado a una longitud de onda de 418 nm (fig. 3.2a y b) para la fase acuosa del extracto de fruto cuajado y maduro. La banda para fruto maduro presentó mayor absorbancia lo cual indica directamente que ese estado del fruto contiene mayor cantidad de fenoles.

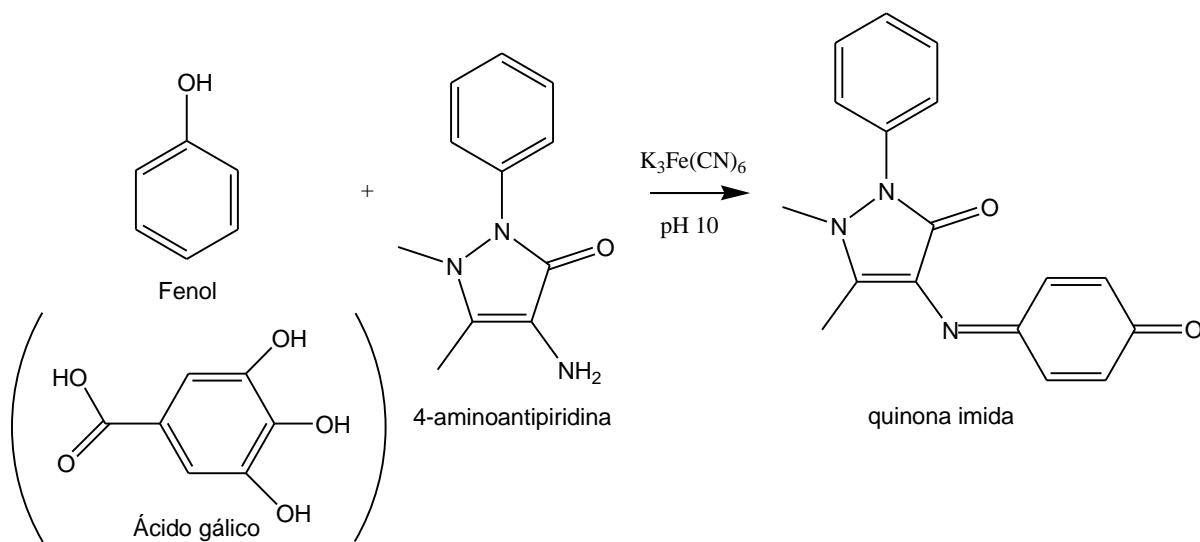


Fig. 3.1 Reacción de formación del complejo entre el fenol y la 4-aminoantipiridina.

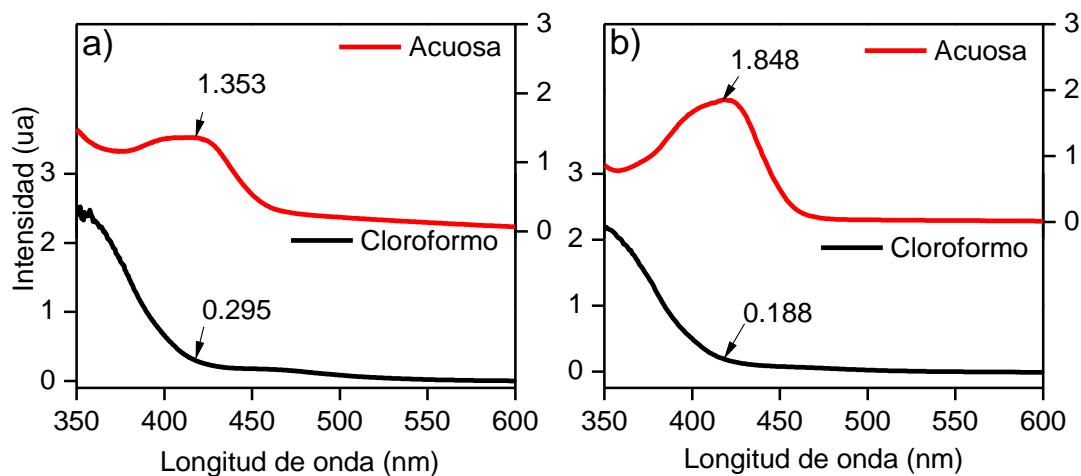


Fig. 3.2 Espectro UV-VIS de la fase acuosa y cloroformica de fruto cuajado (a) y maduro (b).

La determinación del ácido ascórbico se realizó en condiciones inhibitorias de su oxidación, la cual ocurre según la reacción de la fig. 3.3.

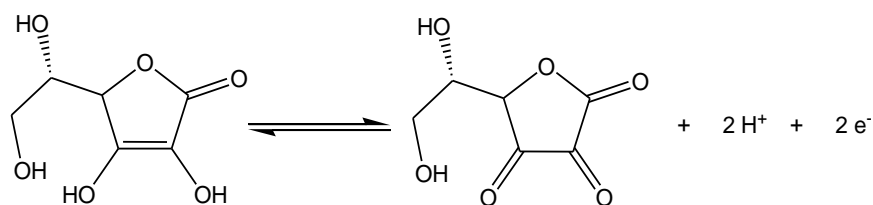


Fig. 3.3 Oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico.

En la fig. 3.4 se observa que el pico del compuesto con el tiempo de retención t_R de 2.58 min corresponde al ácido ascórbico (AA) mientras que el pico del compuesto con el t_R de 1.58 min, corresponde al disolvente. En una prueba de oxidación acelerada se produjo el ácido dehidroascórbico el cual eluyó a t_R 1.77 min en congruencia con su menor polaridad con respecto al AA. Por lo tanto, los dos pequeños picos a $t_R < 2.58$ min en el cromatograma del fruto cuajado y maduro no corresponden a la molécula oxidada del AA. Se observa que el pico correspondiente a AA presenta mayor intensidad para el fruto maduro lo cual indica que contiene mayor cantidad de ácido ascórbico.

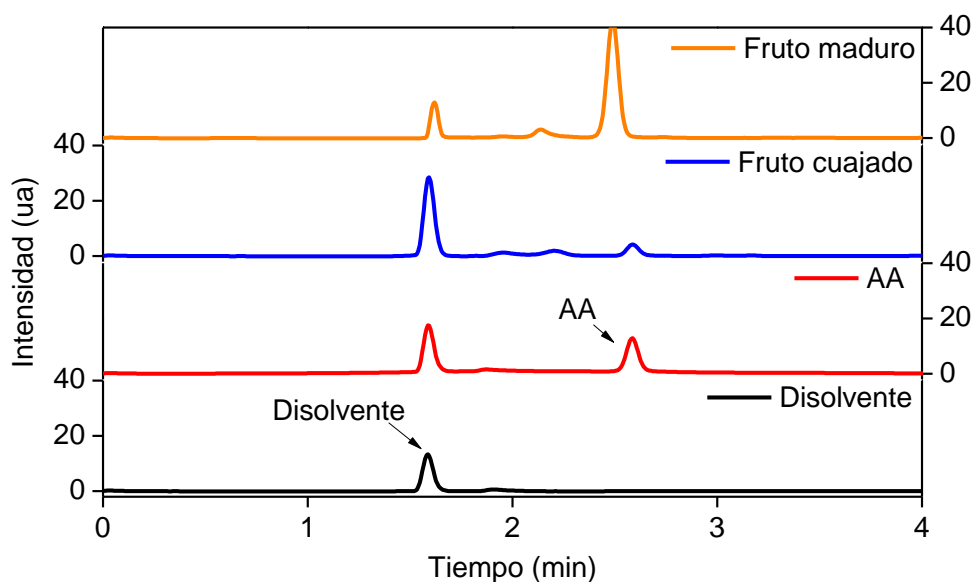


Fig. 3.4 Comparación de cromatogramas (HPLC-DAD) de fruto maduro y cuajado, ácido ascórbico con concentración 40 mg L^{-1} y disolvente. Condiciones cromatográficas en el anexo A3. λ 254 nm.

Para determinar la eficiencia del método de extracción del AA se doparon las muestras de fruto cuajado y maduro con la finalidad de conocer el porcentaje de recuperación del AA (fig. 3.5a y b). En el cromatograma del fruto cuajado (fig. 3.5a) se observan los 2 picos de otros componentes como en la fig. 3.4, los cuales también se ven afectados después de la adición de AA.

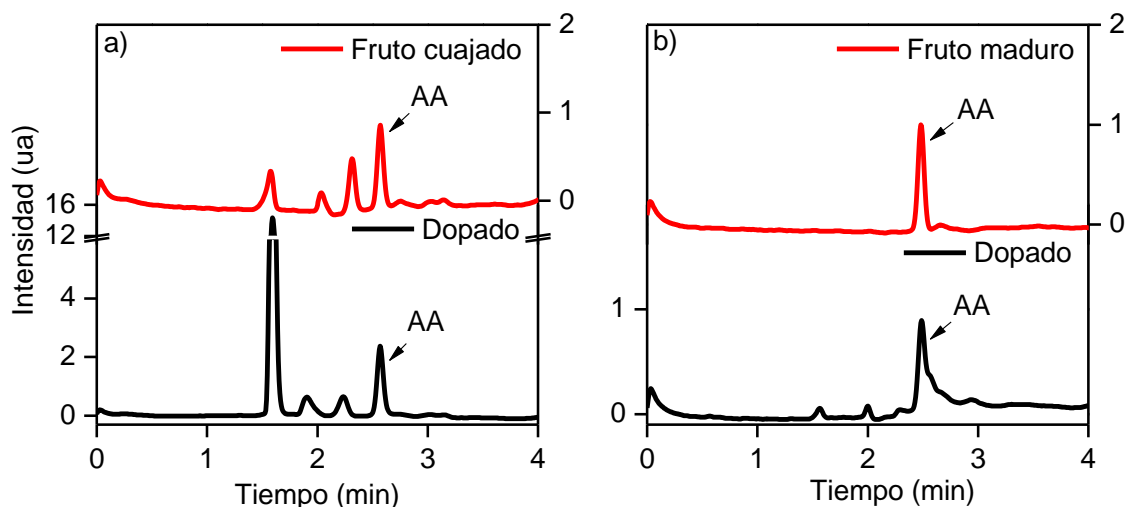


Fig. 3.5 Comparación de cromatogramas (HPLC-DAD) de las muestras de fruto cuajado y fruto maduro dopadas con AA. Condiciones cromatográficas en el anexo A3. $\lambda = 254$ nm.

La determinación de azúcares consistió en la cuantificación de fructosa, glucosa y sacarosa. Un cromatograma representativo con deconvolución de picos se muestra en la fig. 3.6. Los picos con t_R de 7.83, 8.46 y 10.4 min, corresponden a fructosa, glucosa y sacarosa, respectivamente. El pico a t_R de 5.03 min, es producido por el disolvente (agua). Se encontró que la sacarosa es el azúcar predominante en el fruto maduro.

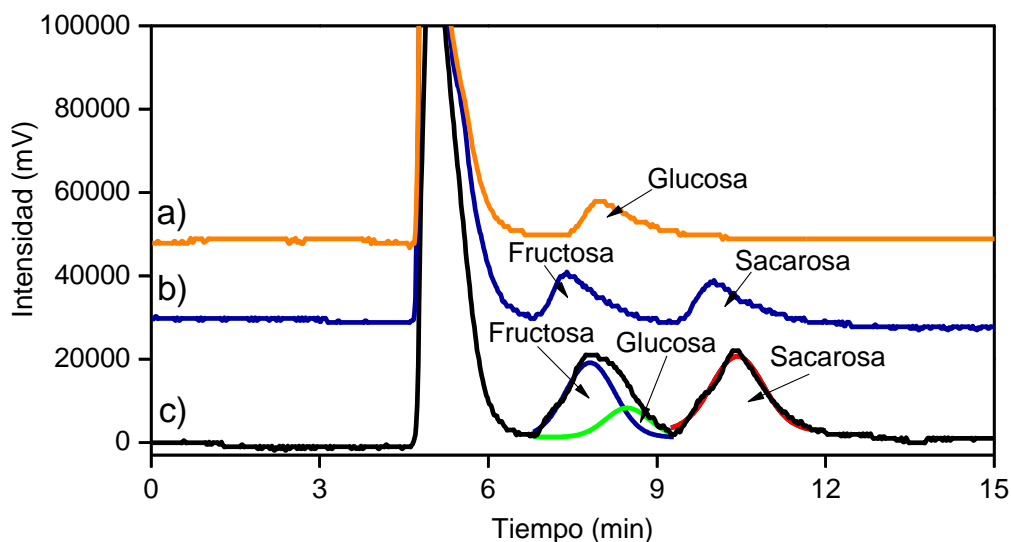


Fig. 3.6 Cromatograma (HPLC-IR) de un estándar de glucosa (a), la mezcla de estándares fructosa + sacarosa (b) y muestra de fruto maduro (c). Condiciones cromatográficas en el anexo A4.

3.2 Extracción de compuestos orgánicos volátiles por HS.

3.2.1 Comparación entre fruto cuajado y fruto maduro.

En la fig. 3.7 se observa que el contenido de COVs de alta temperatura de ebullición tanto en exocarpio (1 g) como en fruto completo (3 g), es mayor en el fruto cuajado que en el fruto maduro. Por comparación de los cromatogramas 3.7a con 3.7c, el fruto completo contiene compuestos que no están en el exocarpio ($8 < t_R < 12$ min), y por tanto corresponden al meso- y endocarpio. Los resultados de los cromatogramas de la fig. 3.7a y b muestran que durante la madurez del fruto se produce en el exocarpio un número considerable de COVs ($5 < t_R < 10$ min) que proporcionan el aroma característico del fruto. En el cromatograma del fruto completo maduro (fig. 3.7d) se observa un número menor de picos que en fruto cuajado (fig. 3.7c). Esto se debe a que el fruto maduro contiene una mayor cantidad de agua que de COVs.

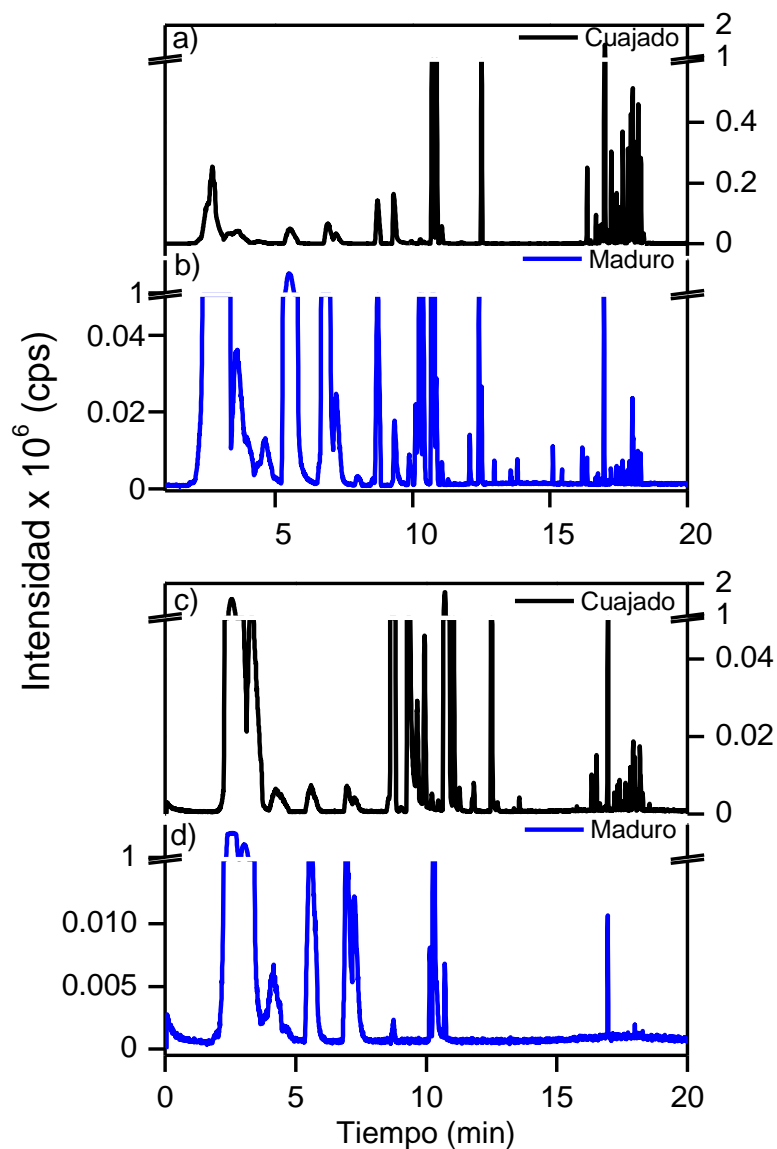


Fig. 3.7 Cromatograma (GC QTOF/MS) de exocarpio (a y b) y fruto completo (c y d) con extracción por HS. Condiciones cromatográficas en el anexo A5.

3.2.2 Identificación de compuestos en fruto cuajado y fruto maduro.

Los cromatogramas de las extracciones por HS se presentan en la fig. 3.8a y b con etiquetas numéricas para los picos identificados. Los compuestos identificados en exocarpio de fruto cuajado y maduro se presentan en la tabla 3.2. La estructura de todos compuestos identificados en esta tesis se presentan en el anexo A11.

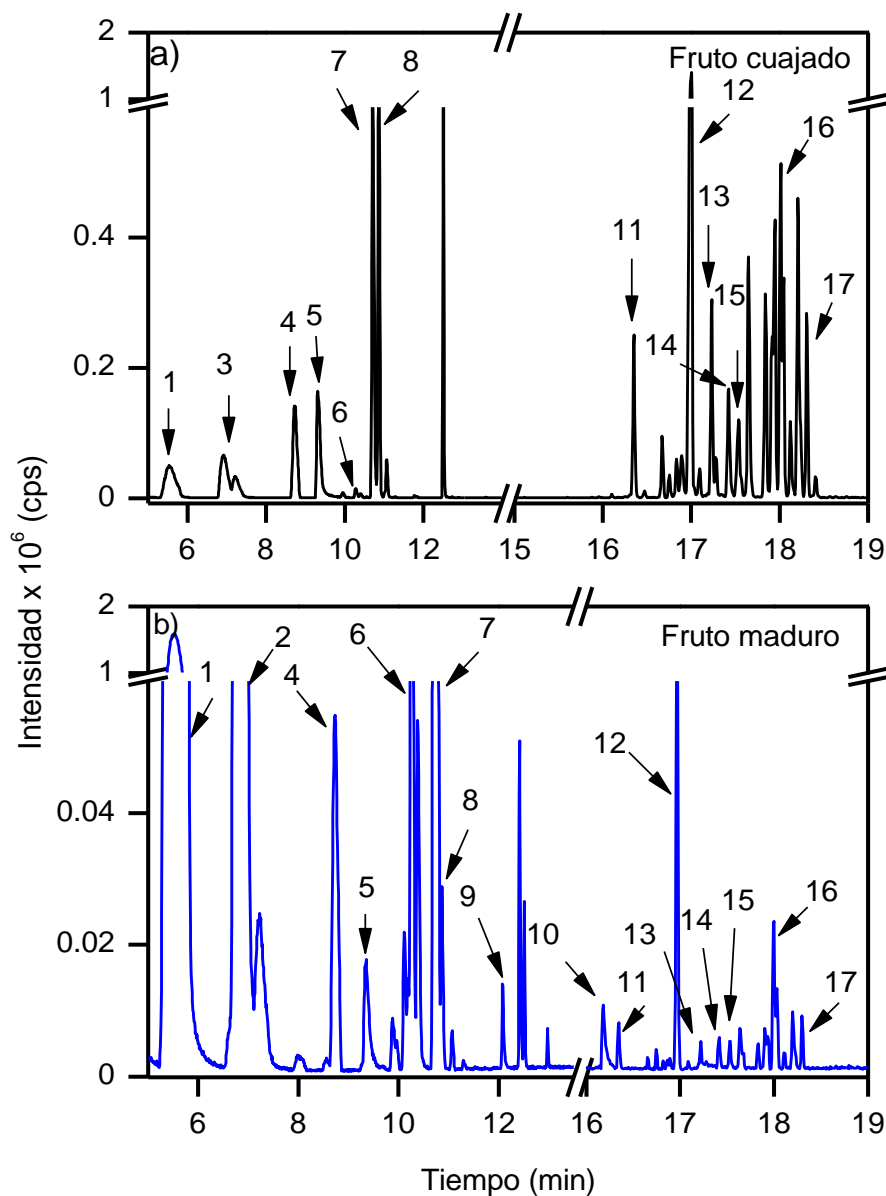


Fig. 3.8 Compuestos extraídos por HS e identificados en exocarpio de fruto cuajado y fruto maduro. La numeración de los picos está asociada a los compuestos de la tabla 3.2.

Los compuestos identificados fueron 14 para fruto cuajado y 16 para fruto maduro. La intensidad de los picos de hexanal y trans-2-hexen-1-al fue mayor en el fruto maduro mientras que (+)-aromadendreno, α -humuleno, (E,E)- α -farneseno, (E,Z)- α -farneseno, (E- β)-farneseno presentaron mayor intensidad en fruto cuajado. El

nonanal y el acetato de 3 fenilpropilo, solo se identificaron en el fruto maduro. Esto se debe a que las plantas producen y emiten numerosos COVs característicos de la etapa fenológica en que se encuentre la planta. Se ha descrito que el aroma característico del fruto maduro se debe a ésteres y terpenos [50]. En el fruto maduro, el éster *cis*-3-acetato de hexilo, el monoterpeno (S)-limoneno y los sesquiterpenos β -cariofileno y α -humuleno coinciden con lo reportado en otros trabajos de investigación que los asocian como los compuestos predominantes del aroma de la guayaba [50].

Tabla 3.2 COVs extraídos por HS e identificados en exocarpio de guayaba “Media China”.

No.	Fruto cuajado	Fruto maduro	Compuesto	T _{ebullición} (°C)
1	+	++	Hexanal	128
2	-	++	Trans-2-hexen-1-al	147
3	+	-	Trans-2-hexen-1-ol	158
4	+	+	α -Pino	158
5	+	+	Benzaldehído	179
6	+	+	<i>cis</i> -3-Acetato de hexilo	174
7	+	+	(S)-Limoneno	175
8	+	+	Eucaliptol	174
9	-	+	Nonanal	191
10	-	+	Acetato de 3-Fenilpropilo	263
11	+	+	(-)- α -Copaeno	248
12	+	+	β -Cariofileno	268
13	++	+	(+)-Aromadendreno	258
14	++	+	α -Humuleno	276
15	++	+	(E,E)- α -Farneseno	278
16	++	+	(E,Z)- α -Farneseno	278
17	++	+	(E)- β -Farneseno	271

Notación: + identificado, ++ identificado con mayor abundancia, - no identificado.

La comparación del contenido de 4 COVs con diferente presión de vapor en el exocarpio de fruto cuajado y fruto maduro se muestra en la tabla 3.3. Se observa mayor concentración relativa de benzaldehído, (S)-limoneno, y β -cariofileno en fruto cuajado que en fruto maduro, mientras que hexanal presenta mayor concentración en el fruto maduro.

Tabla 3.3 Concentración relativa en mg mL⁻¹ de compuestos seleccionados presentes en el exocarpio de fruto cuajado y fruto maduro.

Experimento	Hexanal	Benzaldehido	(S)-limoneno	β-cariofileno
Fruto cuajado	11	8	84	27
Fruto maduro	>400	~1	51	1

Los compuestos identificados en fruto cuajado (fig. 3.9a) y fruto maduro (fig. 3.9b) se presentan en la tabla 3.4. Se identificaron 13 compuestos en fruto cuajado y 6 en fruto maduro. El α-pineno y β-cariofileno presentan mayor intensidad en el fruto cuajado y disminuyeron conforme maduró el fruto. Del total de compuestos extraídos, α-pineno, (S)-limoneno y β-cariofileno se encuentran en los dos estados fenológicos. La acetoina, el hexanoato de etilo y *cis*-3-acetato de hexilo están presentes en el fruto maduro mientras que en el fruto cuajado se identificaron aldehídos, monoterpenos y sesquiterpenos; donde los aldehídos son característicos del aroma verde fresco de algunas frutas. El (S)-limoneno, (-)-α-copaeno, β-cariofileno y (+)-aromadendreno identificados en el fruto cuajado coinciden con lo reportado en el trabajo de Romero-Frías [6]. Los monoterpenos (-)-β-pineno, α-terpineno y terpinoleno identificados en fruto cuajado no fueron observados en el exocarpio.

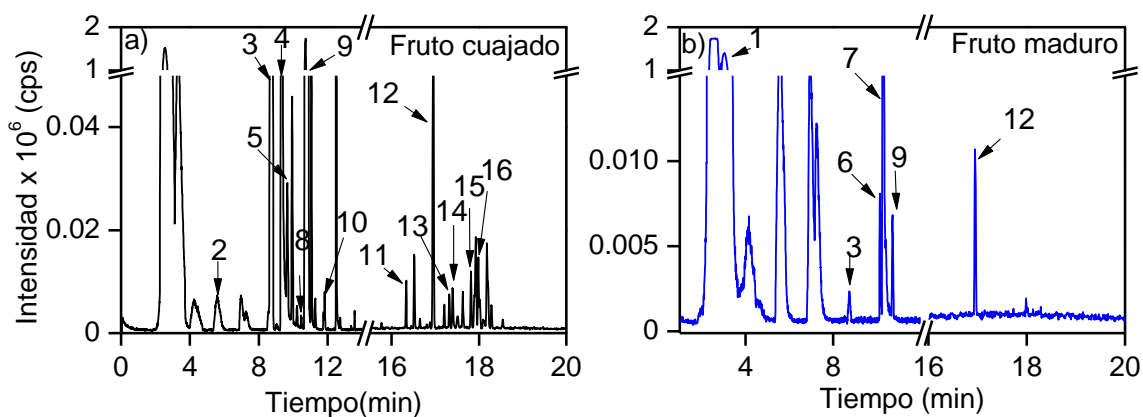


Fig. 3.9 Compuestos identificados en fruto cuajado y fruto maduro.

Tabla 3.4 COVs extraídos por HS e identificados en fruto cuajado y maduro de guayaba “Media China”.

No.	Fruto cuajado	Fruto maduro	Compuesto
1	-	+	Acetoína
2	+	-	Hexanal
3	++	+	α -Pino
4	+	-	Benzaldehído
5	+	-	(-)- β -Pino
6	-	+	Hexanoato de etilo
7	-	+	<i>cis</i> -3-Acetato de hexilo
8	+	-	α -Terpino
9	+	+	(S)-Limoneno
10	+	-	Terpinoleno
11	+	-	(-)- α -Copaeno
12	+	+	β -Cariofileno
13	++	-	(+)-Aromadendreno
14	+	-	α -Humuleno
15	+	-	(E,E)- α -Farneseno
16	+	-	(E,Z)- α -Farneseno

Notación: + identificado, ++ identificado con mayor abundancia, - no identificado.

3.3 Extracción de COVs por microextracción en fase sólida (SPME).

3.3.1. Óptima extracción de COVs de frutos completos.

En la fig. 3.10 se muestran los cromatogramas obtenidos de fruto cuajado por extracción SPME con un tiempo de exposición de 12 h a tres diferentes fibras: PDMS (roja), PDMS/DVB (rosa) y PDMS/DVB/CAR (gris). Las diferencias entre los cromatogramas obtenidos con las diferentes fibras son la intensidad y número de compuestos extraídos. Los compuestos etiquetados con un asterisco azul se encontraron en cromatogramas de los blancos y se descartaron en la evaluación de todos los cromatogramas obtenidos por SPME. Con la fibra roja y rosa se identificaron 8 compuestos y 15 con la fibra gris. Los compuestos (-)- α -copaeno, β -cariofileno, (+)-aromadendreno, α -humuleno, (E,E)- α -farneseno y el (E,Z)- α -farneseno se extrajeron con los tres tipos de fibra. El β -cariofileno mantuvo una

intensidad constante en la extracción con la fibra roja y gris. Los compuestos identificados se presentan en la tabla 3.5.

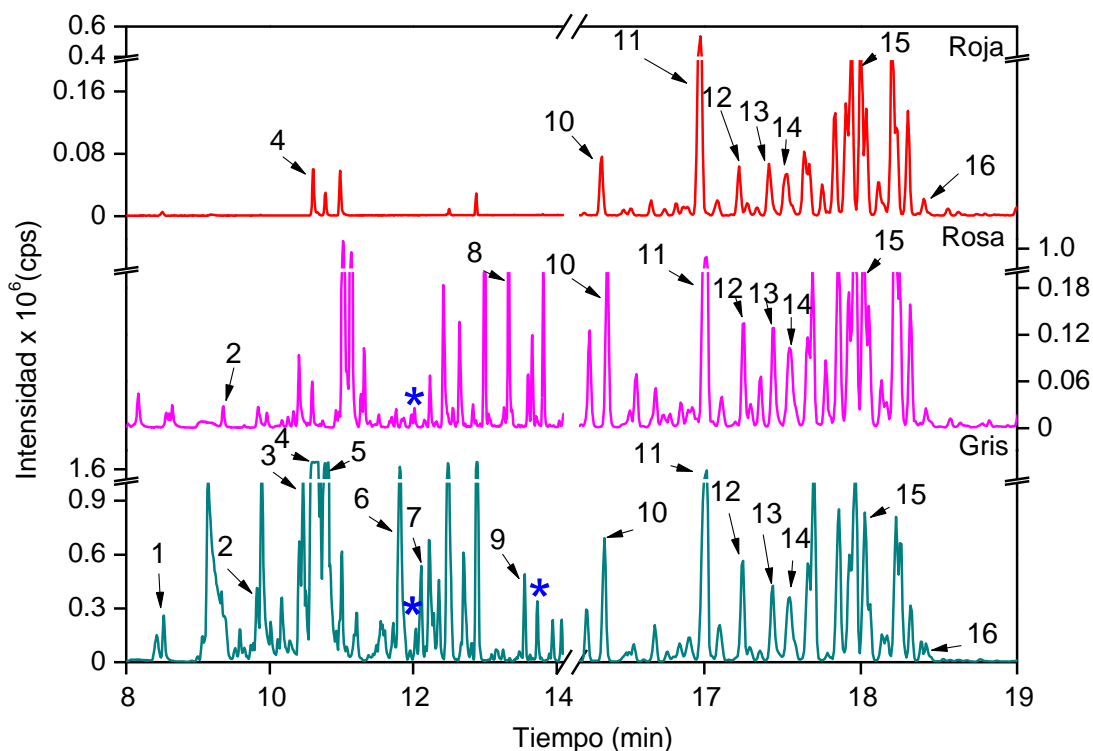


Fig. 3.10 Cromatograma (GC QTOF/MS) de COVs extraídos por diferentes fibras para SPME en muestras de fruto cuajado. Condiciones cromatográficas en el anexo A6.

En la fig. 3.11 se muestran los cromatogramas de fruto maduro por extracción SPME con un tiempo de exposición de 12 h. Se observa que la intensidad de los picos resultó similar en los tres tipos de fibras y superior a la del fruto cuajado presentado en la fig. 3.10 debido a que el fruto maduro emite mayor cantidad de COVs. Los compuestos extraídos *cis*-3-acetato de hexilo, benzoato de etilo, *cis*-3-butilato de hexilo, octanoato de etilo, ácido geránico, β -cariofileno y el (E,Z)- α -farneseno fueron extraídos por los tres tipos de fibras. El *cis*-3-acetato de hexilo mantiene una intensidad constante en la extracción con los tres tipos de fibras.

Tabla 3.5 Compuestos identificados en fruto cuajado extraídos por diferentes fibras SPME.

No.	Roja	Rosa	Gris	Compuesto	Tebullición (°C)	Δm (ppm) en fibra gris
1	-	-	+	α -Pinoeno	158	0.9
2	-	+	+	(-)- β -Pinoeno	166	0.9
3	-	-	+	3-Metil-4-octanona	174	0.3
4	+	-	+	(S)-Limoneno	175	2.4
5	-	-	+	Eucaliptol	174	1.3
6	-	-	+	2-Nonanona	194	2.5
7	-	-	+	α -Tujona	200	1.9
8	-	+	-	Benzoato de etilo	212	-
9	-	-	+	α -Terpineol	217	0.1
10	+	+	+	(-)- α -Copaeno	248	2.8
11	++	++	++	β -Cariofileno	268	0.4
12	+	+	+	(+)-Aromadendreno	258	1.9
13	+	+	+	α -Humuleno	276	1.9
14	+	+	+	(E,E)- α -Farneseno	278	2.8
15	+	+	+	(E,Z)- α -Farneseno	278	2.8
16	+	-	+	Z- β -Farneseno	271	3.6

Notación: + identificado, ++ identificado con mayor abundancia, - no identificado.

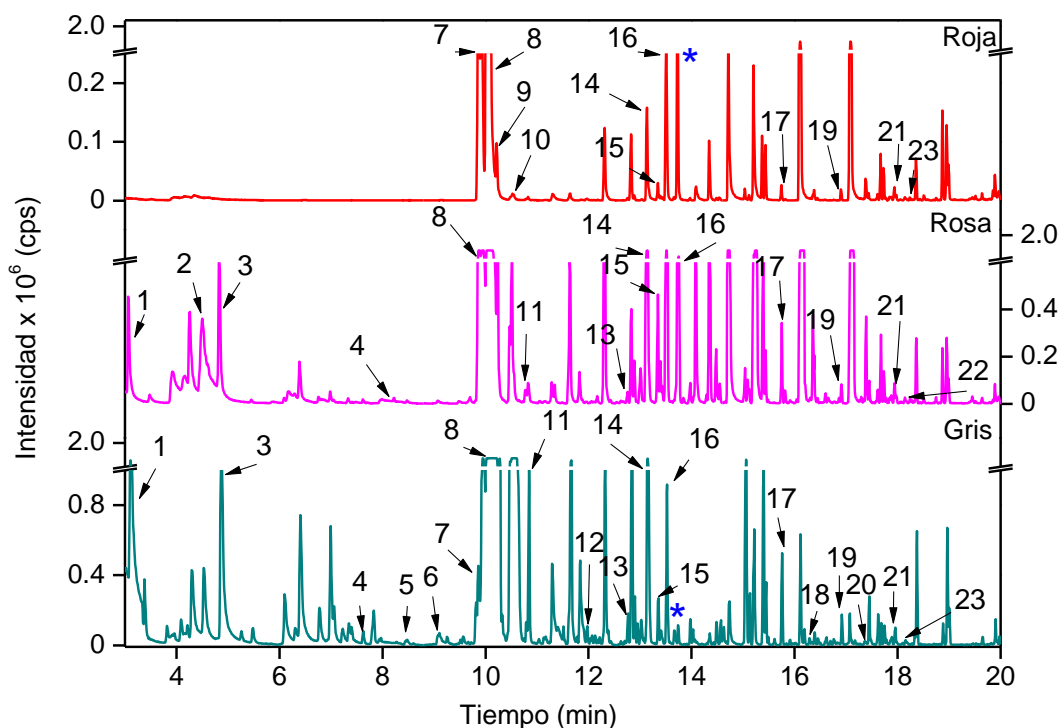


Fig. 3.11 Cromatograma (GC QTOF/MS) de COVs extraídos por diferentes fibras SPME en muestras de fruto maduro. Condiciones cromatográficas en el anexo A6.

Los componentes identificados fueron 11 con la fibra PDMS (roja), 14 con la fibra PDMS/DVB (rosa) y 20 con la fibra DVB/CAR/PDMS (gris). Además, con la fibra DVB/CAR/PDMS (gris) se extrajeron mayor número de terpenos que con la fibra PDMS/DVB (rosa). La diferencia en el número y tipo de compuestos extraídos se debe a la composición de cada fibra y su afinidad por los analitos, ya que como es sabido, la retención con una fibra determinada depende de la polaridad, grupo funcional, masa molecular y forma del analito. El espesor de la película soportada en la fibra de sílica fundida, juega un menor papel ya que son similares; 100 μm (roja) \sim 50+30=80 μm (gris) $>$ 65 μm (rosa). Pudo observarse que la fibra no polar PDMS (roja) no retiene compuestos con $t_R < 10$ min.

Por el método de normalización se calcularon concentraciones relativas para evaluar la capacidad de extracción de forma comparativa. En la tabla 3.6 se contrasta la fibra gris con la roja en la extracción de 3 compuestos seleccionados en muestras de fruto cuajado y maduro. Se observa que la fibra gris (PDMS/DVB/CAR) extrae cerca de 100 veces más (S)-limoneno y 4 veces más β -cariofileno que la roja (PDMS) en el fruto cuajado, donde además estos compuestos son más abundantes que en el fruto maduro.

Tabla 3.6. Concentración relativa en mg mL^{-1} de algunos COVs seleccionados extraídos por SPME de fruto cuajado y maduro.

Fruto	Fibra	Benzaldehído	(S)-limoneno	β -Cariofileno
cuajado	gris	0	>300	32
	roja	0	4	8
maduro	gris	2	0	2
	roja	0	1	<1

Los compuestos extraídos por la fibra gris de muestras de fruto maduro, identificados y cuantificados porcentualmente se presentan en la tabla 3.7, donde se observa que el *cis*-3-acetato de hexilo tiene la mayor concentración.

Tabla 3.7 Compuestos extraídos con diferentes fibras SPME en fruto maduro.

No.	Roja	Rosa	Gris	Compuesto	% normalizado (fibra gris)
1	-	+	+	Acetoína	15.0
2	-	+	-	Acetato de isobutilo	-
3	-	+	+	Butirato de etilo	14.0
4	-	+	+	Hexanoato de metilo	1.0
5	-	-	+	α -Pinoeno	<1
6	-	-	+	Benzaldehído	<1
7	+	-	+	Hexanoato de etilo	2.0
8	++	++	++	<i>cis</i> -3-Acetato de hexilo	34.0
9	+	-	-	Acetato de hexilo	-
10	+	-	-	(S)-Limoneno	-
11	-	+	+	2-Metilbutanoato de butilo	6.0
12	-	-	+	2-Nonanona	<1
13	-	+	+	<i>cis</i> -3-Isobutirato de hexilo	1.0
14	+	+	+	Benzoato de etilo	16.0
15	+	+	+	<i>cis</i> -3-Butirato de hexilo	1.0
16	+	+	+	Octanoato de etilo	5.0
17	+	+	+	Ácido geránico	3.0
18	-	-	+	(-)- α -Copaeno	<1
19	+	+	+	β -Cariofileno	1.0
20	-	-	+	α -Humuleno	<1
21	+	+	+	(E,Z)- α -Farneseno	<1
22	-	+	-	(Z,Z)- α -Farneseno	-
23	+	-	+	(E)- β -Farneseno	<1

Notación: + identificado, ++ identificado con mayor abundancia, - no identificado.

3.3.2 Comparación entre fruto cuajado y fruto maduro.

En la fig. 3.12 se compara el cromatograma de frutos completos cuajado (20 g) y maduro (60 g) con 12 h de exposición, utilizando la fibra gris, la cual fue usada en el resto de la investigación a partir de este momento. Se observa que los picos a $16 \text{ min} < t_R < 20 \text{ min}$ presentan mayor intensidad en el fruto cuajado no obstante que la cantidad de muestra fue menor. Esto se debe a la serie de transformaciones que experimenta el fruto. La disminución de algunos compuestos en el fruto maduro puede también atribuirse al efecto de las condiciones de almacenamiento, ya que la temperatura y la disponibilidad de oxígeno favorecen un ciclo bioquímico específico que repercute en la síntesis de ciertos volátiles [17].

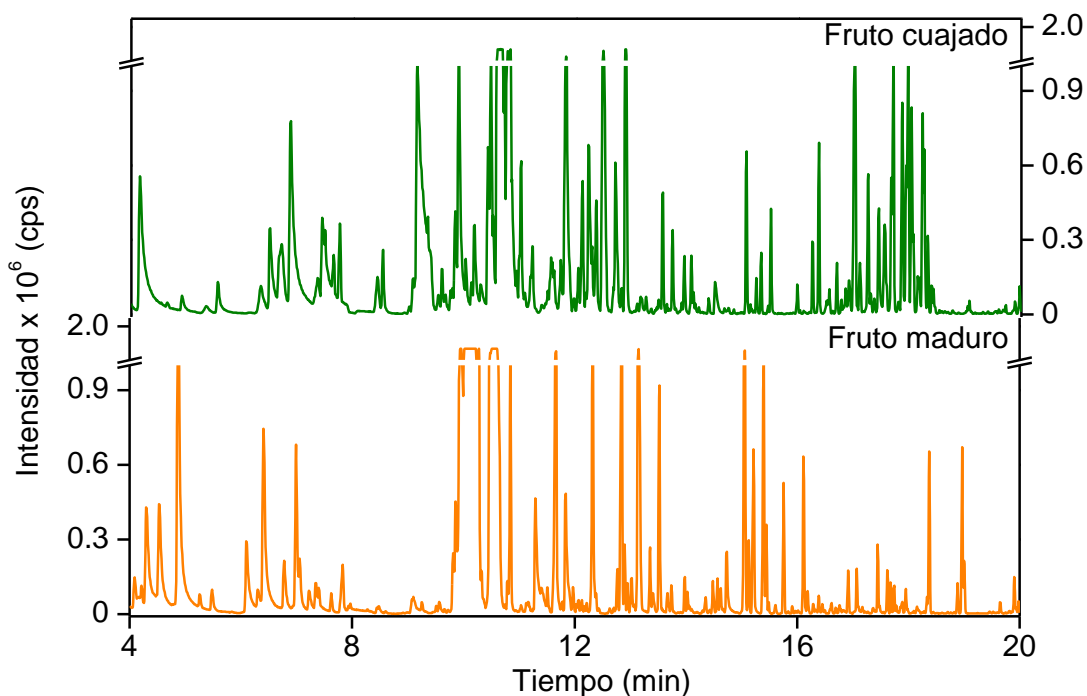


Fig. 3.12 Cromatograma (GC QTOF/MS) de frutos completos cuajado y maduro con un tiempo de exposición de fibra de 12h. Condiciones cromatográficas en el anexo A6.

3.3.3 COVs en endocarpio.

Con el objeto de explorar los COVs emitidos por el endocarpio y su identificación, se extrajeron COVs con la fibra gris. Los compuestos identificados en endocarpio de fruto cuajado y maduro se presentan en la tabla 3.8 y los cromatogramas en la fig. 3.13. Se observan diferentes compuestos extraídos en los dos estados fenológicos. El hexanal y β -cariofileno fueron comunes para los dos estados fenológicos, β -cariofileno presentó mayor intensidad en el fruto cuajado mientras que el hexanal en el fruto maduro. El endocarpio de fruto cuajado contiene compuestos de naturaleza terpénica en su mayoría.

Tabla 3.8 Compuestos identificados en endocarpio de fruto cuajado y maduro y su contenido normalizado.

No.	Fruto Cuajado (%)	Fruto Maduro (%)	Compuesto
1	8.0	40.0	Hexanal
2	2.0	–	Trans-2-hexen-1-al
3	18.0	–	Trans-2-hexen-1-ol
4	–	1.0	2-Heptanona
5	<1	–	α -Pinoeno
6	–	9.0	Hexanoato de etilo
7	2.0	–	<i>cis</i> -3-Acetato de hexilo
8	–	22.0	3-metilo-4-octanona
9	5.0	–	α -Terpineno
10	–	2.0	(S)-Limoneno
11	–	3.0	Terpinoleno
12	–	8.0	α -Tujona
13	–	<1.0	Benzoato de etilo
14	–	15.0	Octanoato de etilo
15	<1	–	2-Undecanona
16	<1	–	<i>cis</i> -3-Hexanoato de hexilo
17	6.0	–	(-)- α -Copaeno
18	34.0	1.0	β -Cariofileno
19	6.0	–	(+)-Aromadendreno
20	1.0	–	(Z,E)- α -Farneseno
21	9.0	–	α -Humuleno
22	3.0	–	(Z,Z)- α -Farneseno
23	2.0	–	(Z)- β -Farneseno

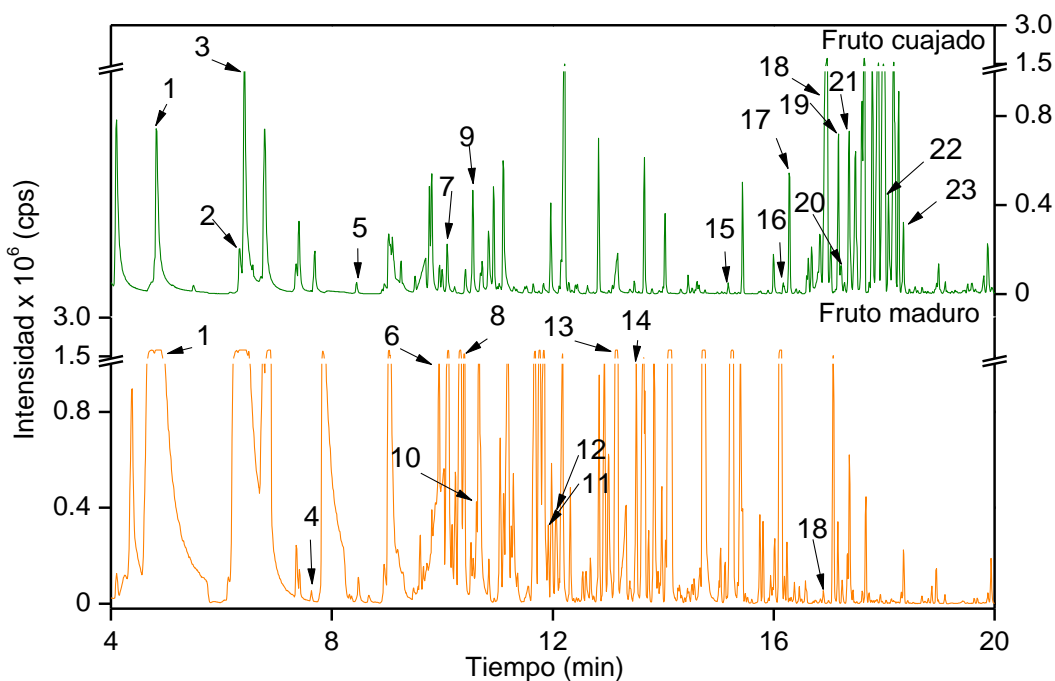


Fig. 3.13 Cromatograma (GC QTOF/MS) de endocarpio en fruto cuajado y fruto maduro. Condiciones cromatográficas en el anexo A6.

3.3.4 Comparación de la extracción por HS y SPME.

Tanto el muestreo por HS como la SPME son conocidos por su alta reproducibilidad. Por esta razón, este aspecto no fue abordado en esta tesis. Esto se debe en gran medida a que no requieren preparación de la muestra. Sin embargo, HS es una técnica de inyección automática mientras que en SPME la inyección es manual.

En la fig. 3.14 se muestra el universo de COVs identificados por las dos técnicas representándolos por la temperatura de ebullición asociada al número de átomos de carbono en la molécula. Se observa una buena distribución de los puntos en $4 < n < 15$ y $120\text{ }^{\circ}\text{C} < T_{\text{eb}} < 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin sesgo para ambas técnicas. Sin embargo, por SPME se extrajeron e identificaron un mayor número de COVs que con HS.

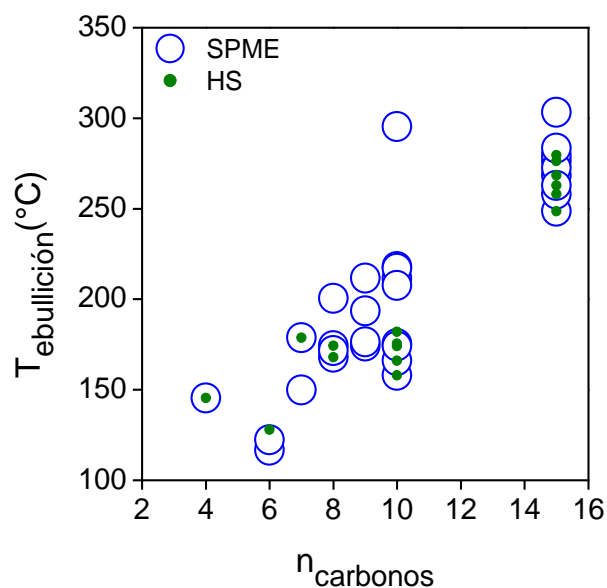


Fig. 3.14 Comparación de la extracción de COVs por SPME y HS en muestras de fruto cuajado y maduro. COVs ordenados por su temperatura de ebullición en función del número de átomos de carbono.

Para comparar la cantidad de COVs identificados en las diferentes partes del fruto cuajado y maduro por las dos técnicas, se construyó la gráfica que se presenta en la fig. 3.15. Por HS se identificaron 22 COVs: 19 en fruto maduro, 17 en fruto cuajado, 16 en fruto completo y 19 en exocarpio. Por SPME se extrajeron e identificaron 43 COVs: 27 en fruto cuajado y maduro, 36 en fruto completo y 22 en endocarpio. En todos los casos el número de compuestos extraídos e identificados fue mayor con SPME que con HS.

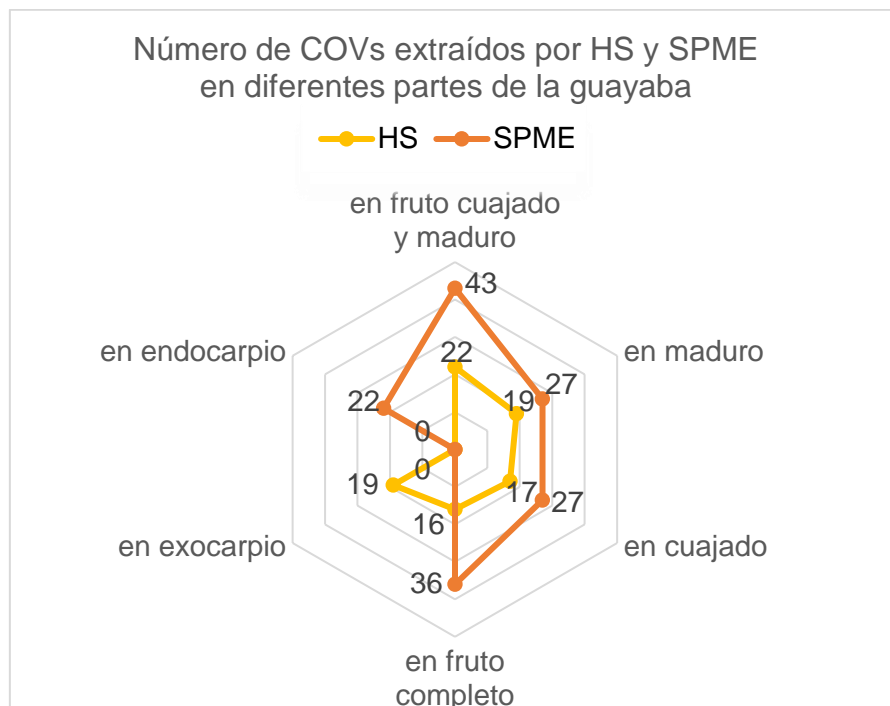


Fig. 3.15 COVs identificados en diferentes partes del fruto cuajado y fruto maduro con diferente método de extracción.

El contenido relativo de (S)-limoneno y β -cariofileno se determinó para fruto cuajado y maduro en extracciones por las dos técnicas (tabla 3.9) usando estándares de los compuestos. De las extracciones con HS se observó que para el fruto cuajado: (S)-limoneno > β -cariofileno mientras que en maduro (S)-limoneno \sim β -cariofileno. En el exocarpio de cuajado: (S)-limoneno \sim β -cariofileno, mientras que en el exocarpio de maduro: (S)-limoneno \gg β -cariofileno. Por SPME se encontró que (S)-limoneno > β -cariofileno en fruto cuajado y endocarpio maduro. El contenido de β -cariofileno en cuajado > maduro, tanto en el fruto completo como en el endocarpio. Una comparación de los valores obtenidos por los 2 métodos no es posible debido a que desafortunadamente no se analizaron las mismas partes del fruto por ambas técnicas.

Tabla 3.9 Concentración relativa de β -Cariofileno y (S)-Limoneno determinada por dos métodos de extracción.

Método	Experimento	(S)-limoneno ($\mu\text{g mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	β -cariofileno ($\mu\text{g mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
HS	cuajado completo	28	1
	maduro completo	1	1
	exocarpio cuajado	32	41
	exocarpio maduro	15	2
SPME	cuajado completo	4	2
	maduro completo	-	0.1
	endocarpio cuajado	-	16
	endocarpio maduro	7	0.7

- No se encontró

3.3.5 COVs pre y post-cosecha.

En la fig. 3.16 se muestran los cromatogramas obtenidos al muestrear por SPME fruto cuajado en campo durante el día (10:30-15:30 h, $T=31.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad= 45 %) y la noche (21:30-02:30 h, $T=23.7\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad= 65 %) en los mismos árboles durante 5 horas. Como puede verse para este estado fenológico, la intensidad y el número de picos es mayor en el caso de la muestra obtenida en el horario diurno. Esto se debe a que la temperatura y humedad fueron diferentes. Los compuestos identificados se presentan en la tabla 3.10, 2-heptanona, (S)-limoneno, (-)- α -copaeno, β -cariofileno, (+)-aromadendreno, (E,E)- α -farneseno y (E,Z)- α -farneseno se extrajeron en los dos horarios. El (S)-limoneno y β -cariofileno mantuvieron una intensidad constante en el día y la noche, mientras que los demás COVs se detectaron en cantidades menores durante la noche. Por el método de normalización se calculó el porcentaje de los compuestos identificados en el horario diurno y nocturno donde el (S)-limoneno presentó mayor concentración. El (S)-limoneno, (-)- α -copaeno y β -cariofileno identificados en el fruto cuajado también fueron encontrados por Romero Frías para la guayaba de la variedad regional roja [6].

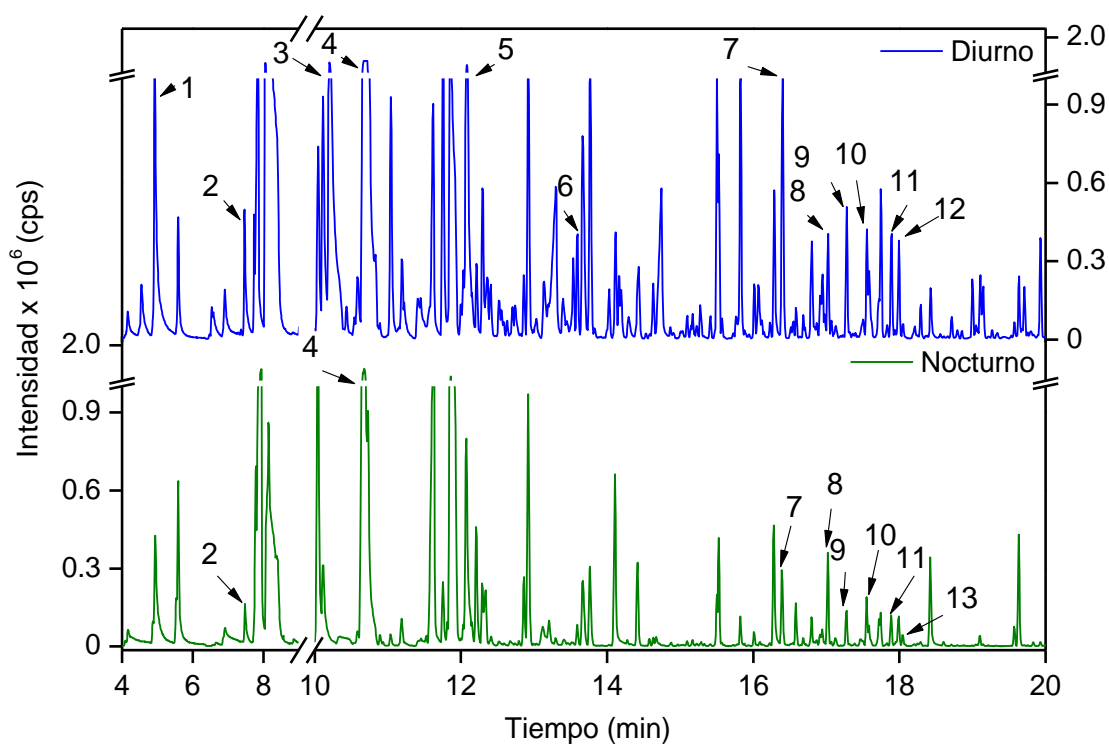


Fig. 3.16 Cromatograma (GC QTOF/MS) de fruto cuajado muestreado pre-cosecha en diferente horario.

Tabla 3.10 Compuestos identificado en fruto cuajado pre-cosecha en dos turnos diferentes.

No.	Diurno	Nocturno	Compuesto	Concentración normalizada (%)	
				diurno	nocturno
1	+	-	Hexanal	17.0	-
2	+	+	2-Heptanona	6.0	7.0
3	+	-	<i>cis</i> -3-Acetato de hexilo	19.0	-
4	++	++	(S)-Limoneno	21.0	71.0
5	+	-	Nonanal	14.0	-
6	+	-	α -Terpineol	2.0	-
7	+	+	(-)- α -Copaeno	8.0	7.0
8	+	+	β -Cariofileno	2.0	8.0
9	+	+	(+)-Aromadendreno	3.0	3.0
10	+	+	(E,E)- α -Farneseno	3.0	1.0
11	+	+	(E,Z)- α -Farneseno	3.0	3.0
12	+	-	Z- β -Farneseno	2.0	-
13	-	+	E- β -Farneseno	-	1.0

Notación: + identificado, ++ identificado con mayor abundancia, - no identificado.

En la fig. 3.17 se compara el cromatograma obtenido al exponer la fibra durante 5 h al fruto cuajado colgante del árbol con el registrado para los mismos frutos cortados después de 24 h de exposición en laboratorio. Se observa que los picos son más intensos en el cromatograma de la muestra post-cosecha. Con la cosecha por corte, el fruto queda separado de su fuente natural de nutrientes pero sus tejidos todavía respiran y desarrollan actividades metabólicas [51] que transforman constituyentes y producen nuevos compuestos químicos derivados de los naturales originarios.

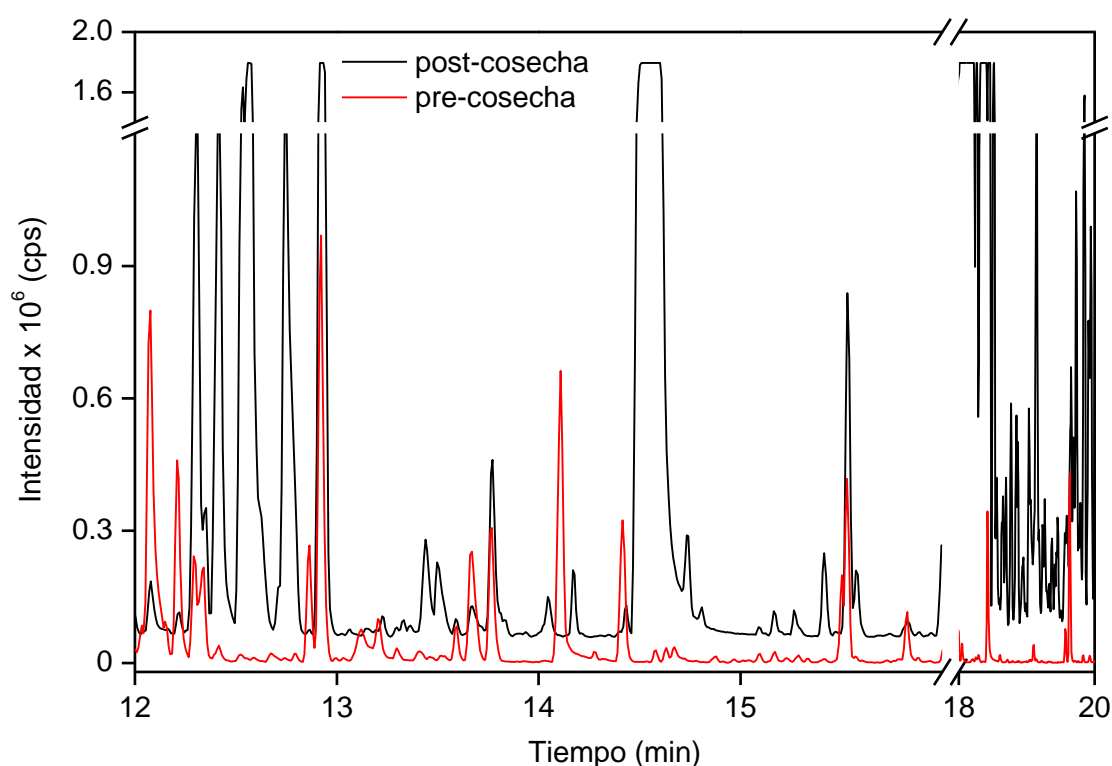


Fig. 3.17 Cromatograma (GC QTOF/MS) de fruto cuajado pre- y post-cosecha.

Para comparar los compuestos identificados en fruto cuajado pre y post-cosecha se construyó una gráfica que despliega el universo de compuestos asociando su índice de Kovats KI con la T_{eb} (fig. 3.18). Se observa que los compuestos con $T_{eb} < 150^{\circ}\text{C}$ se encontraron solo en el fruto cuajado colgado al árbol mientras que la mayoría de los compuestos con $T_{eb} > 150^{\circ}\text{C}$ se encontraron en ambos casos.

Desafortunadamente ninguno de los nuevos compuestos detectados en la muestra post-cosecha pudo ser identificado.

Para conocer los COVs característicos de estas dos etapas fenológicas, se construyó la gráfica que se presenta en la fig. 3.19. En fruto cuajado pre-cosecha se identificaron 13 COVs: 1 alcoholes monoterpénicos, 2 aldehídos, 1 cetona, 1 éster, 1 monoterpeneo y 7 sesquiterpenos. En fruto maduro en laboratorio se identificaron 19 COVs: 1 ácido, 1 aldehído, 2 cetonas, 9 ésteres, 1 monoterpeneo y 5 sesquiterpenos, La relación de los compuestos característicos de cada etapa fue, para aldehídos: fruto cuajado > fruto maduro y para ésteres: fruto maduro > fruto cuajado como se aprecia en la fig. 3.19. Los aldehídos son los responsables del aroma verde y los ésteres son los responsables del aroma en el fruto maduro [25, 45].

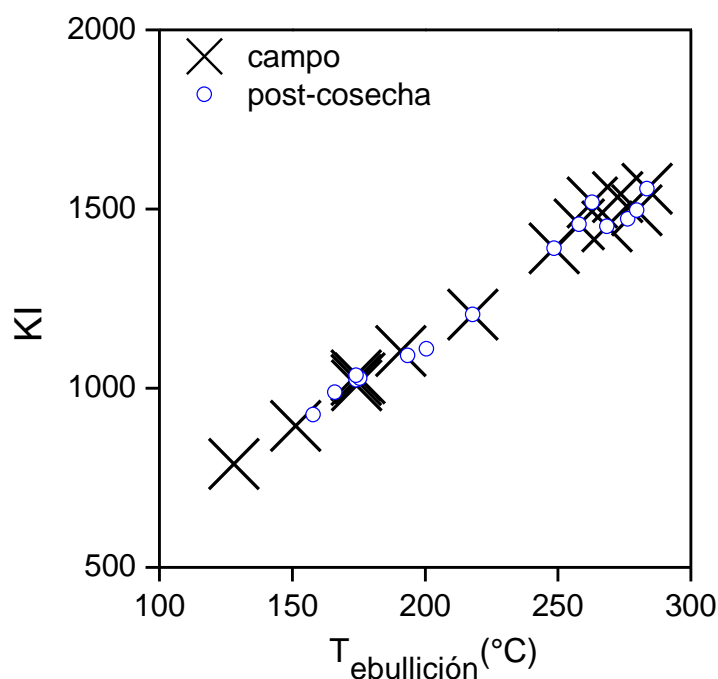


Fig. 3.18 Comparación de COVs identificados en campo y laboratorio en fruto cuajado representados en la dependencia $KI = f(T_{\text{eb}})$.

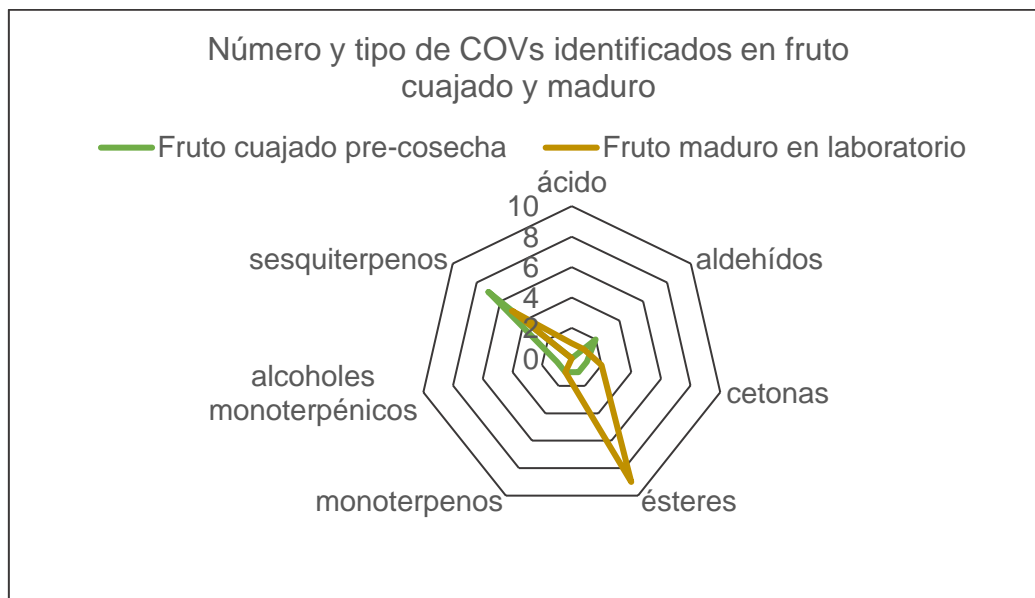


Fig. 3.19 Comparación del tipo de COVs identificados en fruto cuajado y maduro.

Otra importante comparación que puede establecerse es entre los compuestos que mayoritariamente están presentes en el fruto cuajado colgante del árbol y después ausentes en el fruto maduro. Esta interrogante surge en el contexto del papel de los aleloquímicos del fruto cuajado y el insecto *Conotrachelus dimidiatus* que lo parasita y cuya mayor actividad es la nocturna. La figura 3.20 compara los compuestos cuyo contenido fue superior a 1% en el muestreo nocturno del fruto cuajado pre-cosecha con los del fruto maduro en el laboratorio, ordenados en orden creciente de su temperatura de ebullición para indicar directamente su grado de volatilidad. Destacan el monoterpeno (S)-limoneno (71%) en el fruto cuajado en su emisión nocturna y el éster *cis*-3-acetato de hexilo, cuyo contenido fue 34% en el fruto maduro en experimentos de laboratorio, en contraste con el 10% presente en el fruto cuajado. Podría proponerse un aleloquímico que contenga los compuestos identificados en el fruto cuajado en las proporciones encontradas, para atraer al “picudo de la guayaba”.

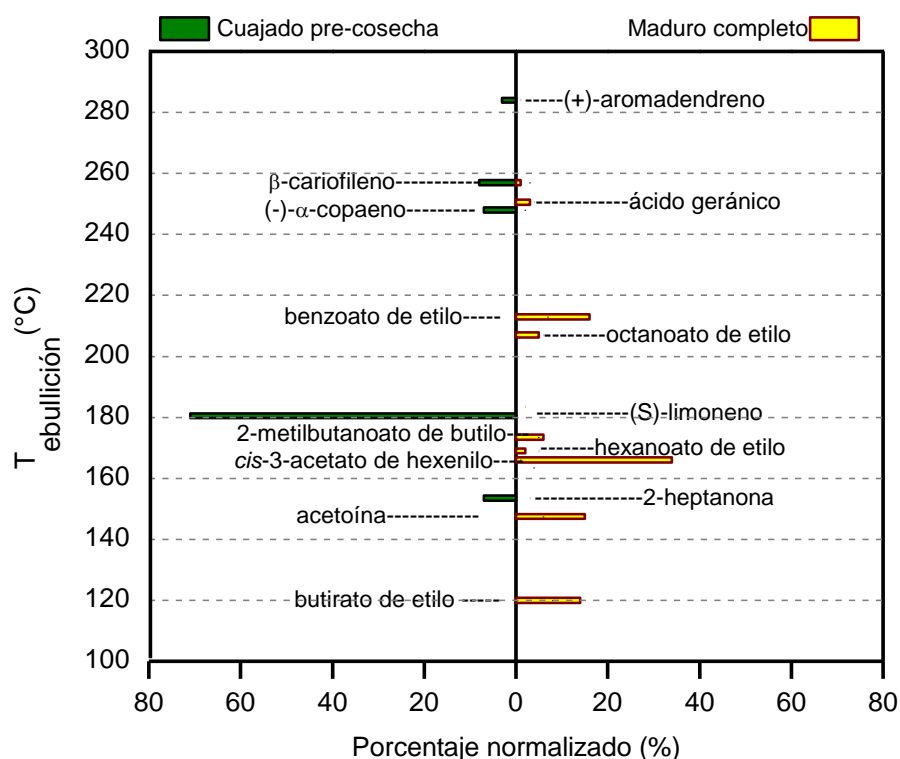


Fig. 3.20 Comparación entre el contenido de los compuestos más abundantes extraídos por SPME de fruto cuajado en campo (emisión nocturna) y del fruto maduro en laboratorio.

3.3.6 Transformación de COVs durante la maduración de guayaba “Media China”.

Para dar seguimiento a la transformación de compuestos contenidos en guayaba cosechada durante su maduración desde la coloración verdosa hasta amarilla lista para el consumo, se monitorearon durante las 250 h que el fruto se mantuvo sin daño visual, las áreas de picos de compuestos identificados. La fig. 3.21 muestra que el contenido de benzoato de etilo presenta un máximo a las 125 h y posteriormente decrece con el tiempo, mientras que el pico del (S)-limoneno decrece igual que la mayoría de los compuestos monitoreados (fig. 3.21a) a excepción del hexanoato de etilo. Puede suponerse que la disminución de las áreas de los picos de estos compuestos se debe a transformaciones en otros compuestos. En la fig. 3.21b se observan máximos a diferentes tiempos; marcadamente para acetoína y la *quasi*-extinción de acetato de 3-fenilpropil, α -copaeno y β -cariofileno. En la fig. 3.21c se observa que el trans-2-hexanal se encuentra presente al iniciar el experimento e

incrementa con el tiempo, mientras que el hexanal aparece después de las 50 h e incrementa manteniéndose constante después de las 100 h.

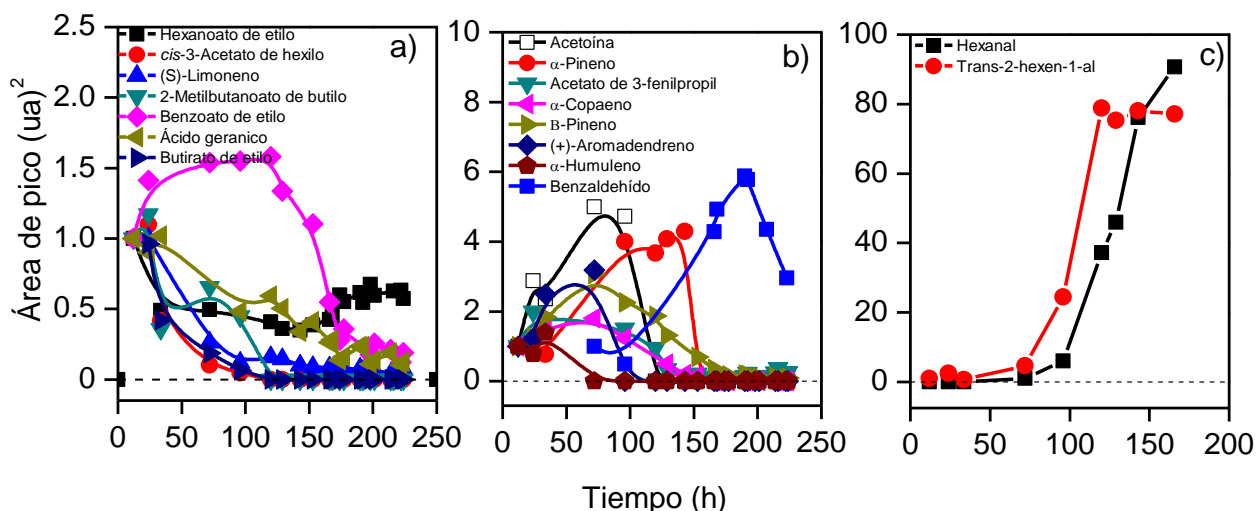


Fig. 3.21 Cinética de evolución del contenido de compuestos seleccionados con el tiempo de maduración de guayaba post-cosecha.

En la fig. 3.21a se observa que el área de pico del (S)-limoneno decrece con el tiempo. Esto se debe probablemente a la transformación de (S)-limoneno en otros compuestos. A continuación, se estudia su conversión a detalle.

Los terpenos son biosintetizados a partir de metabolitos primarios por al menos dos rutas diferentes. La biosíntesis de (S)-limoneno se presenta en la fig. 3.22. En la ruta del ácido mevalónico se forman el isopentil difosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP) que son los precursores activos con cinco átomos de carbonos que se combinan para formar moléculas mayores. En primer lugar, el IPP y el DMAPP reaccionan para formar geranyl difosfato (GPP), precursor con diez átomos de carbonos de prácticamente todos los monoterpenos. Entonces, el geranyl difosfato interacciona con la enzima (+)-limoneno sintetasa para dar origen al (+)-limoneno. Enseguida el (+)-limoneno formado es hidroxilado a (+)-trans-carveol por la enzima (+)-limoneno-6-hidroxilasa y posteriormente es oxidado por la enzima (+)-trans-carveol a (+)-carvona. Estudios de la regulación del desarrollo de las actividades de estas tres enzimas sugirieron que la enzima (+)-limoneno-6-hidroxilasa es el paso limitante de velocidad en la formación de (+)-carvona [52,53,54,55].

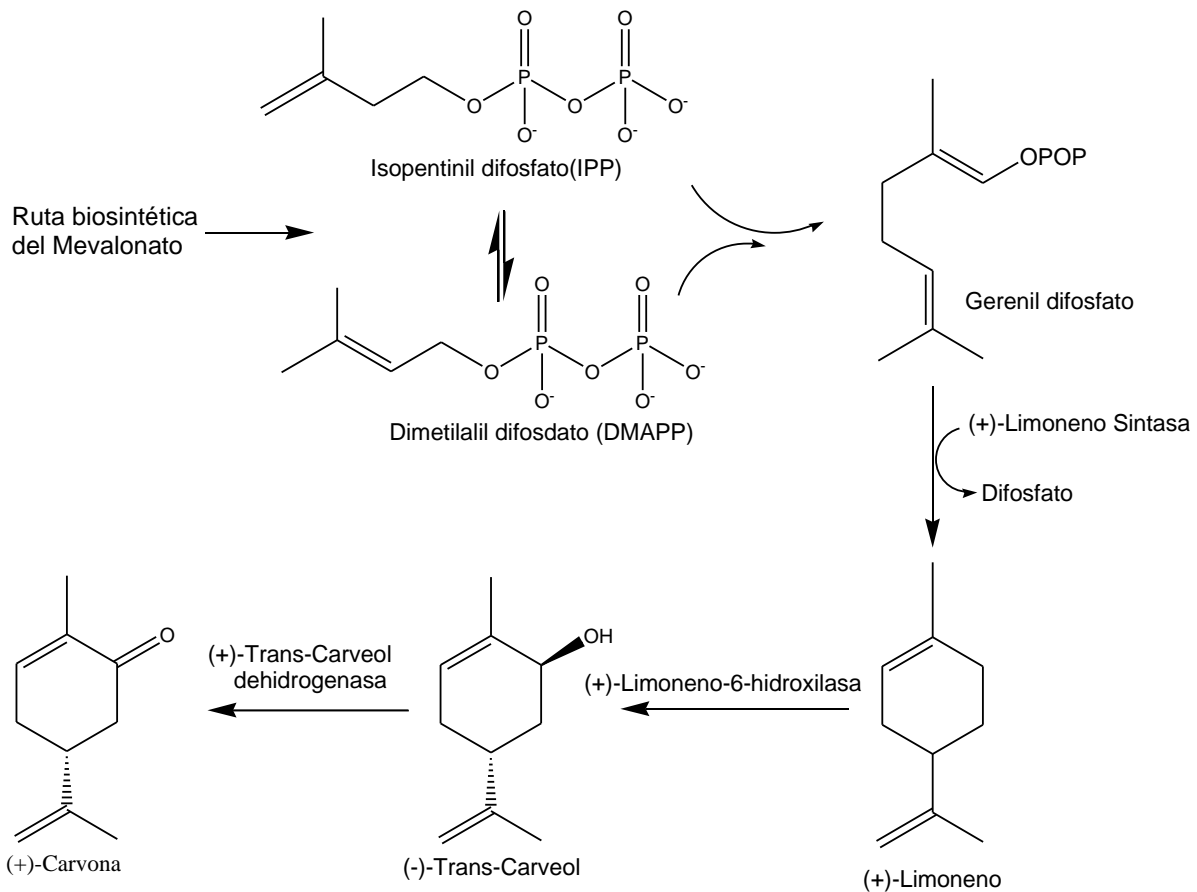


Fig. 3.22 Biosíntesis de (S)-limoneno [53,56].

Para demostrar que el (S)-limoneno se transforma en (-)-trans-carveol, se analizó la serie de cromatogramas que generaron las curvas de la fig. 3.21. La formación del compuesto (-)-trans-carveol durante la cinética de fruto maduro se observa en la fig. 3.23. Primero se generó el cromatograma de iones extraídos para la masa del (-)-trans-carveol (PM=152.1201) a partir del cromatograma del fruto maduro (fig. 3.23a). Después se buscó el pico del compuesto en el cromatograma de la muestra (fig. 3.23b) y su respectivo espectro de masas (fig. 3.23c) donde se corroboró la estructura con $\Delta m/z = 3.23$ ppm para la masa exacta del (-)-trans-carveol con la fórmula $C_{10}H_{16}O$ correspondiente al (-)-trans-carveol. También se localizó el pico del compuesto en todos los cromatogramas de fruto maduro durante el experimento cinético (fig. 3.23d).

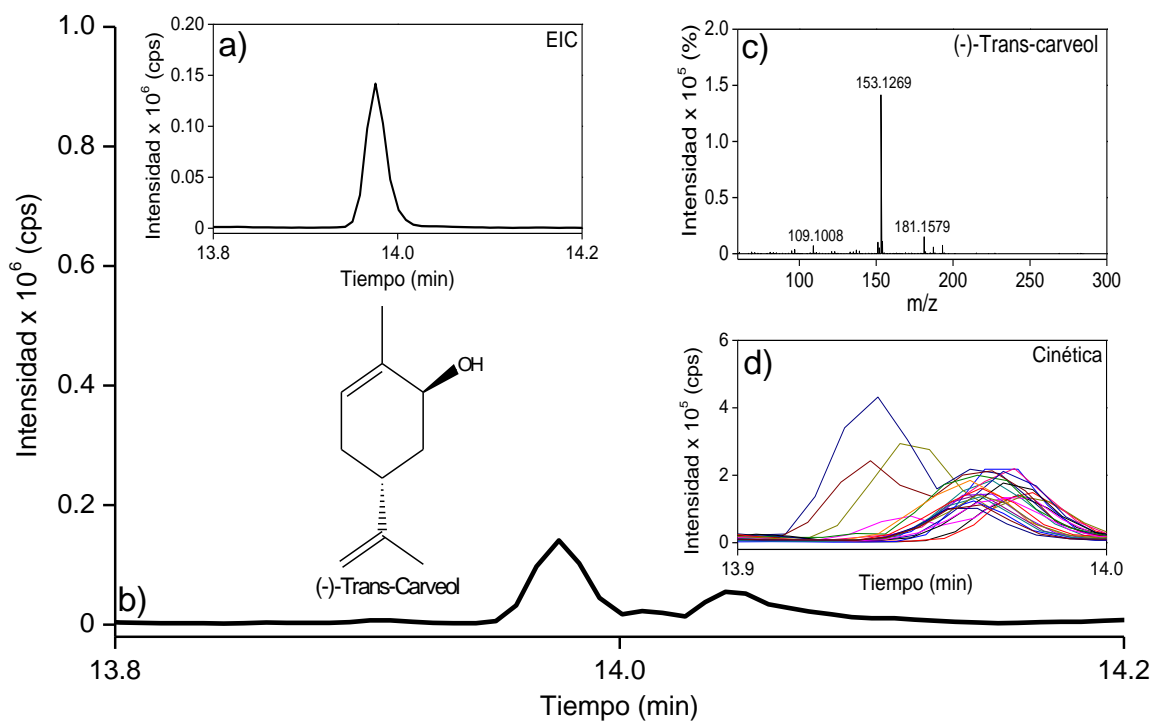


Fig.3.23 Presencia de (-)-trans-carveol durante el estudio cinético de maduración de la guayaba “Media China”.

En la fig. 3.21b se observa cómo algunos compuestos decrecen mientras que otros incrementan con el tiempo. También puede suponerse como en el caso del (S)-limoneno \rightarrow (-)-trans-carveol, que existe una posible transformación α -humuleno \rightarrow β -cariofileno. Esto se fundamenta en la biosíntesis de sesquiterpenos bicíclicos de diferentes estructuras como el β -cariofileno (fig. 3.24). En la ruta del ácido mevalónico se forman el isopentil difosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP) que son los precursores activos de cinco carbonos que se combinan para formar moléculas mayores. En primer lugar, el IPP y el DMAPP interaccionan para formar geranyl difosfato (GPP), precursor de diez carbonos de la mayoría de los monoterpenos. Después el geranyl difosfato se combina con el isopentil difosfato e interaccionan con la enzima farnesil difosfato sintasa para formar el farnesil difosfato, precursor de quince carbonos de todos los sesquiterpenos. Después se tiene una especie intermedia para formar el catión farnesil y su isómero el catión humulil. Enseguida la enzima α -humuleno sintasa reacciona con el catión humulil para formar α -humuleno. Después el catión humulil se cicla para formar el catión cariofileno que

interacciona con una enzima (cariofileno sintasa, (E)- β -cariofileno sintasa, β -cariofileno sintasa [57]) para formar el β -cariofileno [52,58,59].

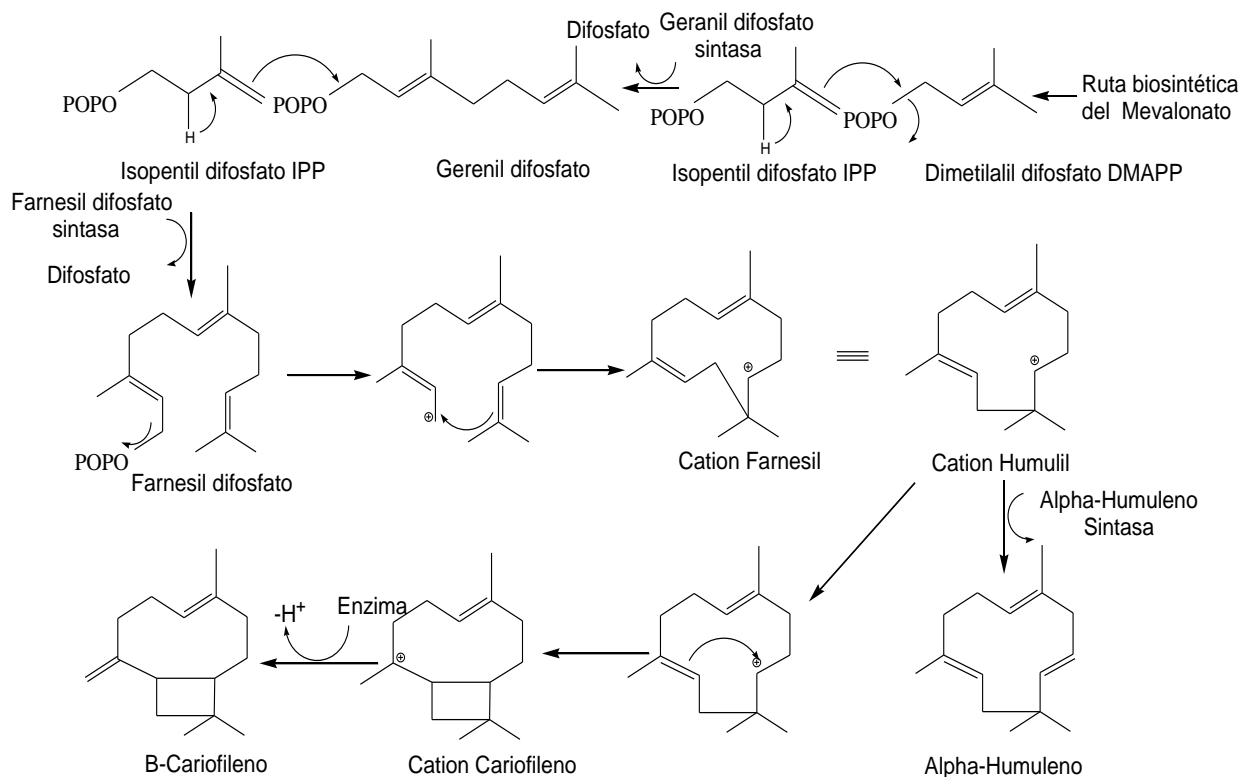


Fig. 3.24. Biosíntesis de β -cariofileno [56,58,59].

En la fig. 3.21c se atribuye el aumento de los aldehídos en el fruto, a los ácidos grasos/lipooxigenasa como se muestra en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos de la fig. 3.25. Estos son sintetizados a partir del ácido linolénico y sus respectivos 9 y 13 hidropéroxidos que son metabolizados para formar dos compuestos; uno de 12 carbonos (ácido 12-oxo-dodecanoico) y otros de seis carbonos ((Z)-3-hexenal, hexenal) que posteriormente son metabolizados para producir los COVs como alcoholes, aldehídos y ésteres. Las enzimas lipoxigenasas e hidropéroxido liasa son claves en la formación de estos compuestos [52,60].

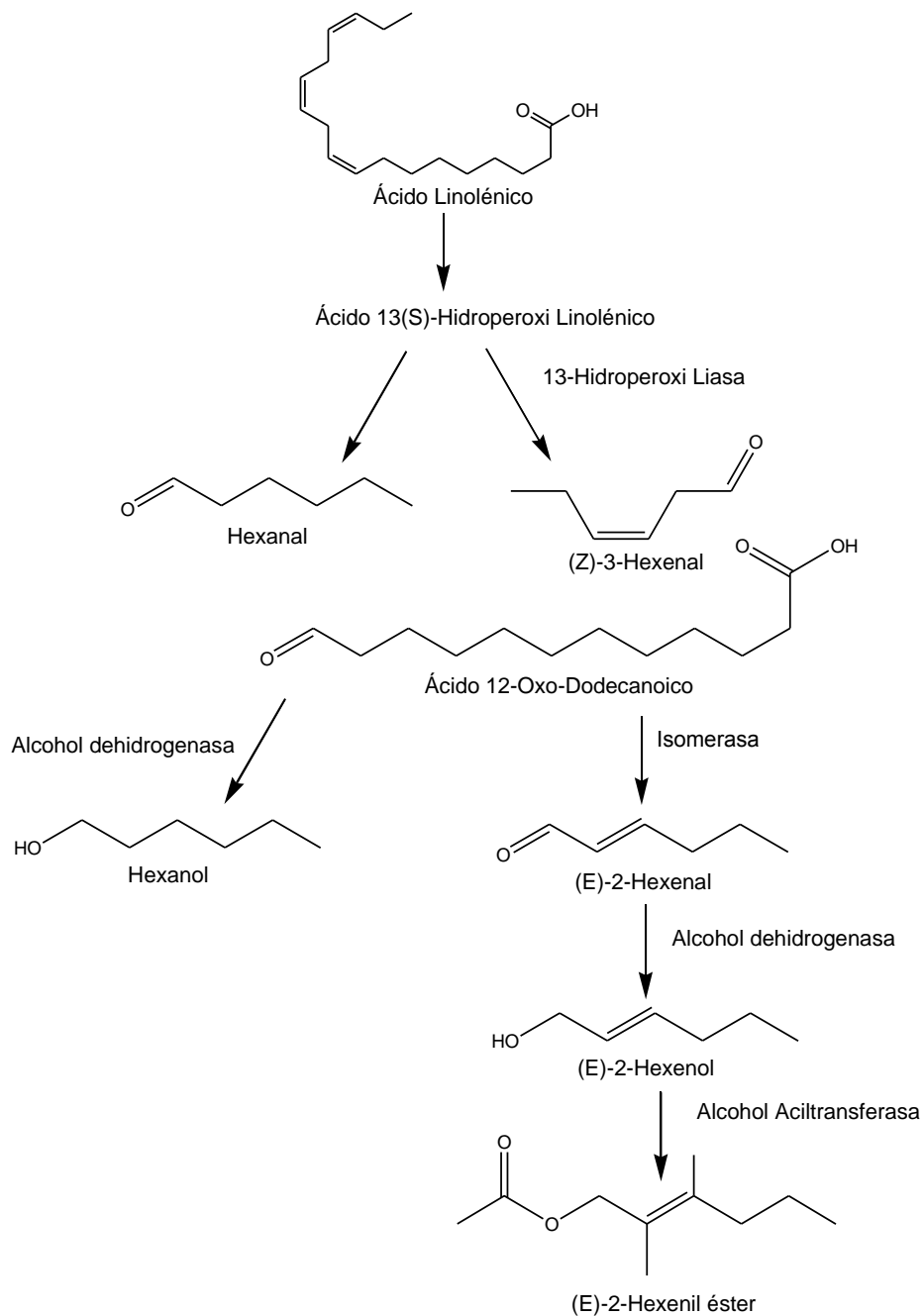


Fig. 3.25 COVs producidos por biosíntesis a partir de ácidos grasos [60].

3.4 Extracción de COVs por hidrodestilación.

Por medio de la hidrodestilación se logró extraer y explorar la identidad de aceites esenciales constituidos por COVs contenidos en fruto cuajado y maduro.

3.4.1 Análisis de extractos por HPLC-DAD y HPLC QTOF/MS.

En la fig. 3.26a se comparan los cromatogramas del destilado y residuo del fruto cuajado. Se observa que los compuestos con $t_R < 7.5$ min no pasaron al destilado y que sólo la extracción del constituyente con $t_R = 11$ min fue completa. Esto se debe a que los compuestos necesitan mayor temperatura para ser volatilizados aún con el arrastre de vapor. La fig. 3.26b muestra que prácticamente los compuestos principales en el destilado del fruto maduro no se encuentran en el fruto cuajado. Esto indica que existe una posible liberación o transformación de COVs en las etapas fenológicas como se demostró en las secciones 3.3.5 y 3.3.6.

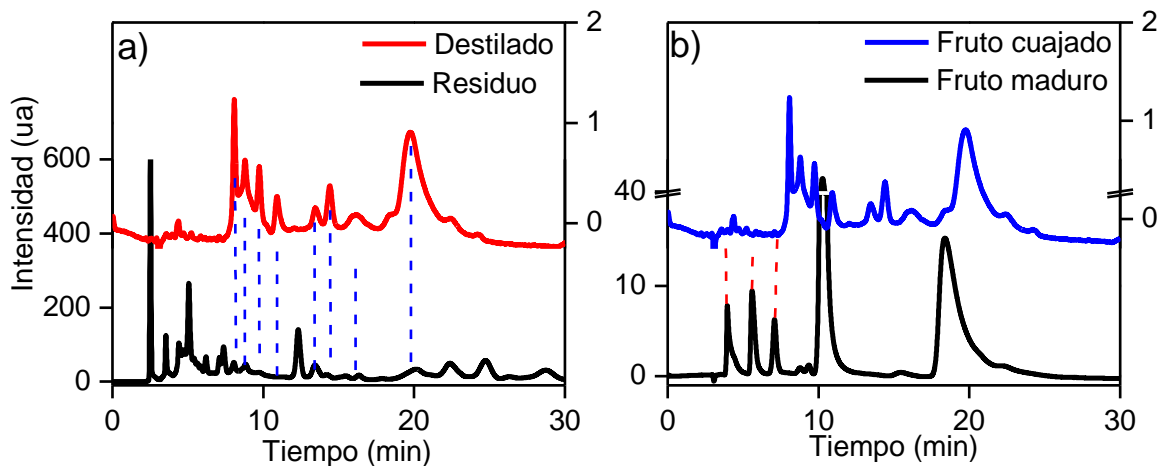


Fig. 3.26. Cromatograma (HPLC-DAD) del residuo de hidrodestilación de fruto cuajado (a) y destilado de fruto cuajado y fruto maduro (b). Condiciones cromatográficas en el anexo A7. λ 254 nm.

En la fig. 3.27 se muestra el cromatograma HPLC QTOF/MS del residuo obtenido con detector de masas donde los compuestos con asterisco rojo sólo están presentes en el fruto cuajado y los compuestos con asterisco negro sólo están presentes en el fruto maduro. Es notable que el pico con el tiempo de retención de 9.5 min, presente mayor intensidad en fruto cuajado que en fruto maduro.

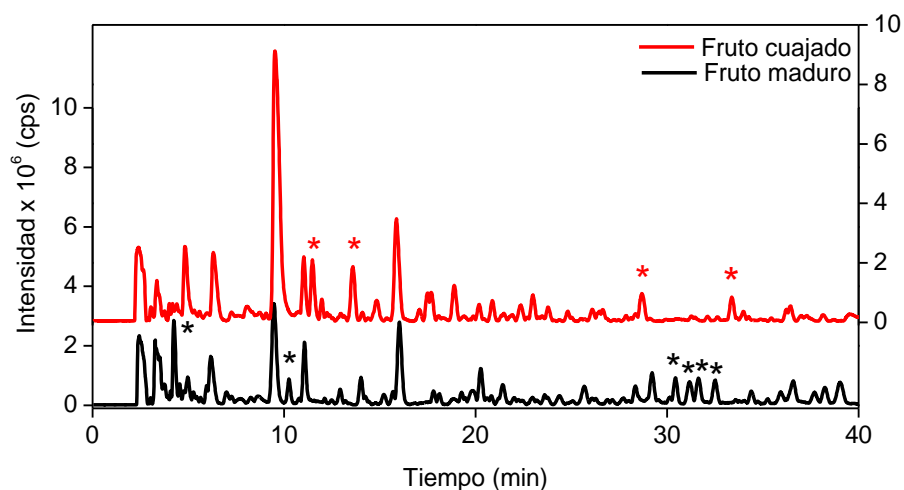


Fig. 3.27 Cromatograma (HPLC QTOF/MS) del residuo de hidrodestilación de fruto cuajado y maduro. Condiciones cromatográficas en el anexo A8.

El análisis de la fase orgánica (aceite) obtenida por hidrodestilación de fruto maduro se realizó por HPLC-QTOF/MS. El cromatograma y los espectros de masa de algunos picos se muestran en la fig. 3.28.

Para la interpretación de espectro se hizo la identificación del ion molecular en 4 espectros de la fig. 3.28. Posteriormente se siguieron los siguientes pasos;

1. Se examinó el patrón isotópico ($M+1$ y $M+2$).
2. Se calculó el porcentaje de $M+1$ y $M+2$ con respecto al ion molecular.
3. Se estimó el número de átomos de carbono en la molécula basado en el porcentaje de $M+1$ y $M+2$.
4. Se verificó que la fórmula propuesta coincidiera con la masa del ion molecular y se calculó $\Delta m/z$.
5. Se analizó la existencia de nitrógeno en la molécula considerando que si la masa del ion molecular es par, no contiene nitrógeno o tiene un número par de átomos de nitrógeno. Si la masa del ion molecular es impar, entonces contiene un átomo de nitrógeno o un número impar de átomos de nitrógeno.
6. Se determinó el número de anillos (r) y dobles enlaces (d) en la estructura usando la siguiente fórmula general.

$$r + d = 1 + 0.5 * \sum_i^{i_{max}} N_i(V_i - 2)$$

donde V_i representa la valencia de un elemento y N_i es el número de átomos. La expresión $0.5 * (V_i - 2)$ puede calcularse. Para elementos monovalentes (H, F, Cl, Br, I) se obtiene $0.5 * (1 - 2) = -0.5$, para elementos divalentes (O, S, Se) se obtiene $0.5 * (2 - 2) = 0$ que es la razón por la cual la contribución de elementos divalentes se cancela, y la ecuación queda de la siguiente manera;

$$r + d = 1 - 0.5 N_{mono} + 0.5 N_{tri} + N_{tetra} + 1.5 N_{penta} + \dots$$

Para la fórmula química del tipo general $C_c H_h N_n O_o$, la expresión se reduce a [61];

$$r + d = 1 + c - 0.5h + 0.5n$$

Como la masa del ión molecular de los espectros en la fig. 3.26 es impar, esto indica la presencia de nitrógeno. Sin embargo, no se encontró ninguna coincidencia con los compuestos con nitrógeno contenidos en plantas y frutos de la familia Myrtaceae, a la cual pertenece *Psidium guajava*.

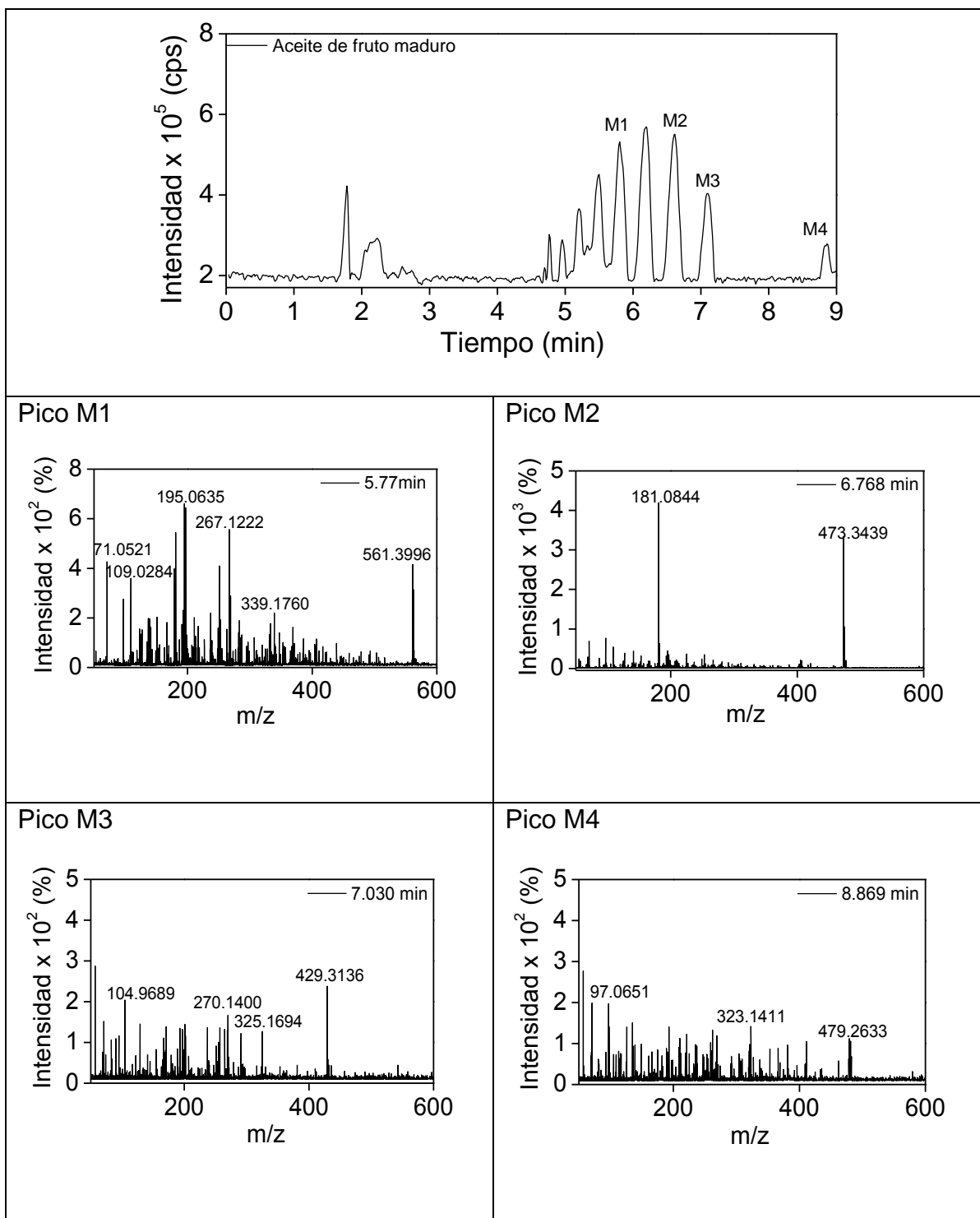


Fig.3.28 Cromatograma (HPLC QTOF/MS) de aceite de fruto maduro con los respectivos espectros de masas de los picos. Condiciones cromatográficas en el anexo A9.

Por esta razón la elucidación se enfocó a moléculas compuestas de C, H, O. Para la búsqueda de los posibles compuestos se hizo la interpretación del espectro como se mencionó anteriormente. Debido a que no se obtuvieron resultados y la masa de los compuestos es grande, puede suponerse que la molécula tiene unido un grupo glicona (azúcar). La molécula de guajaverina (fig. 3.29) que se encuentra en el fruto y hojas de la guayaba y pertenece a la familia de los flavonoides, está constituida por una quercetina y α -L-arabinosa. A los flavonoides comúnmente se unen azúcares, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos siendo la D-glucosa el azúcar más común. La parte sin azúcar de la molécula flavonoide se llama aglicona [62]. Tomando como base la molécula de guajaverina, se consideró la arabinosa, también se consideró la fructosa, glucosa y sacarosa que son los azúcares que se cuantificaron en el fruto maduro.

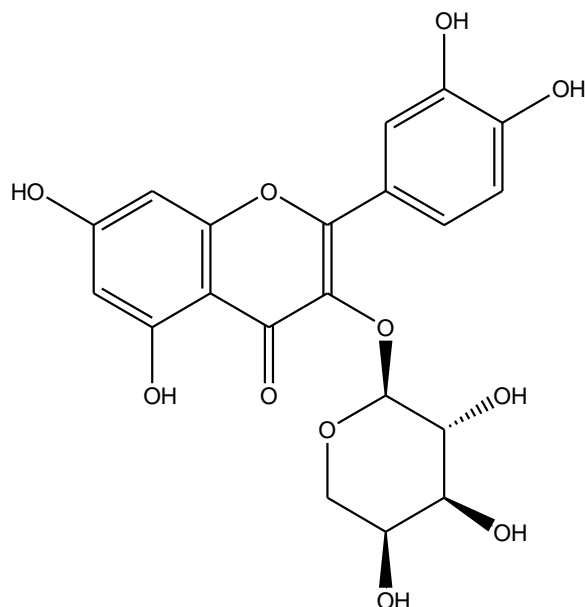


Fig. 3.29 Estructura de la guajaverina.

Para cada uno de los iones moleculares de los picos M1-M4 de la muestra de aceite de fruto maduro (fig.3.28) se calcularon los fragmentos sin glicona (tabla 3.11). Desafortunadamente, en las bases de datos exploradas no se encontró ningún posible compuesto para los fragmentos resultantes.

Tabla 3.11 Picos identificados en la muestra de aceite de fruto maduro de guayaba (m/z).

Pico	t _R , min	M+H ⁺	Fragmentos resultantes de la resta de la glicona:			
			Arabinosa	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
M1	5.770	561.3996	411.3468	381.3362	381.3362	219.2834
M2	6.768	473.3439	323.2911	293.2805	293.2805	131.2277
M3	7.030	429.3136	279.2608	249.2502	249.2502	87.1974
M4	8.869	479.2633	329.2105	299.1999	299.1999	137.1471

3.4.2 Análisis de extractos por GC QTOF/MS.

El análisis de la fase orgánica (aceite) de fruto cuajado y fruto maduro obtenida por hidrodestilación, también se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas con tiempo de vuelo.

Para la interpretación de espectro se siguieron los siguientes pasos:

1. Se obtuvo el cromatograma de iones extraídos usando la masa de cada uno de los estándares existentes en el laboratorio, así como de los compuestos reportados en la bibliografía para guayaba (*Psidium guajava*).
2. Todas las masas de los picos que se encontraron en la línea base fueron descartadas.
3. Se verificó que la masa de la fórmula propuesta coincidiera con la masa del ión molecular.
4. Se determinó el índice de Kovats y se comparó con el reportado para el compuesto en cuestión en el mismo tipo de fase estacionaria.
5. Se estimó el número de anillos más dobles enlaces en la estructura (r+d) como se mostró en la sección 3.4.1.

En la fig. 3.30A se presenta el cromatograma de aceite en fruto cuajado obtenido por hidrodestilación, donde los picos que se evaluaron están etiquetados como C1 y C2. En la fig. 3.30B y 3.30C se muestra el espectro para los picos C1 en el tiempo de retención de 14.487 y C2 en 15.385 min, así como los datos de la evaluación. En la

fig. 3.1A se observa el cromatograma del aceite de fruto maduro donde los picos que se evaluaron están etiquetados como M1, M2, M3, M4 y M5. En la fig. 3.31B, 3.31C, 3.32B, 3.32C y 3.33B se muestra el espectro de masas de estos picos así como los datos de la evaluación. Desafortunadamente sólo es posible proponer dos compuestos identificados como trans-4,5-epoxi-(E)-2-octenal en fruto cuajado y 2.5-bis (1,1-dimetiletil)-fenol en fruto maduro.

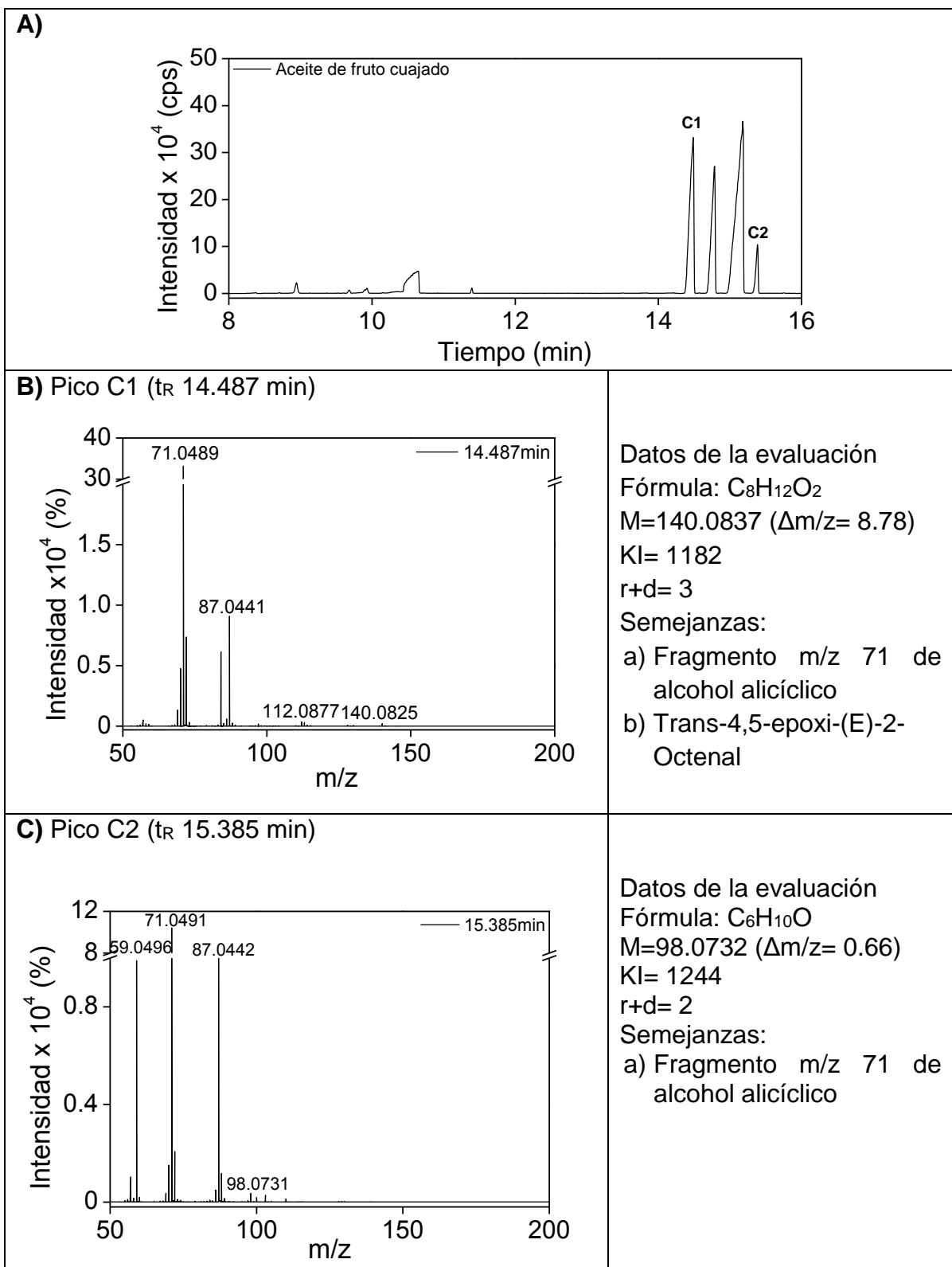


Fig.3.30 Cromatograma (GC QTOF/MS) de la fase orgánica obtenida por hidrodestilación de fruto cuajado. Condiciones cromatográficas en el anexo A10.

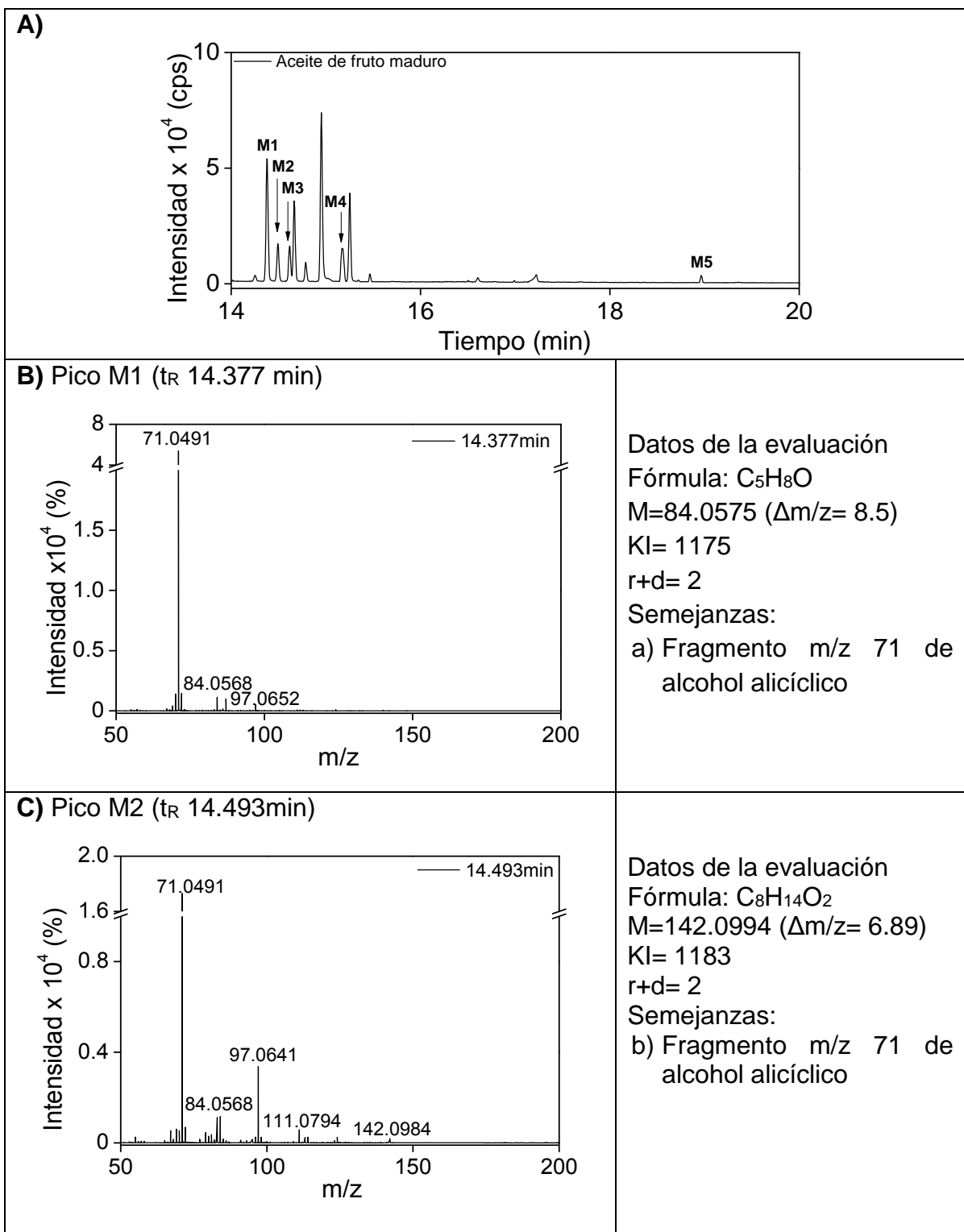


Fig. 3.31 Cromatograma (GC QTOF/MS) de la fase orgánica (aceite) obtenida por hidrodestilación de fruto maduro y espectros de masas de los picos M1 y M2.

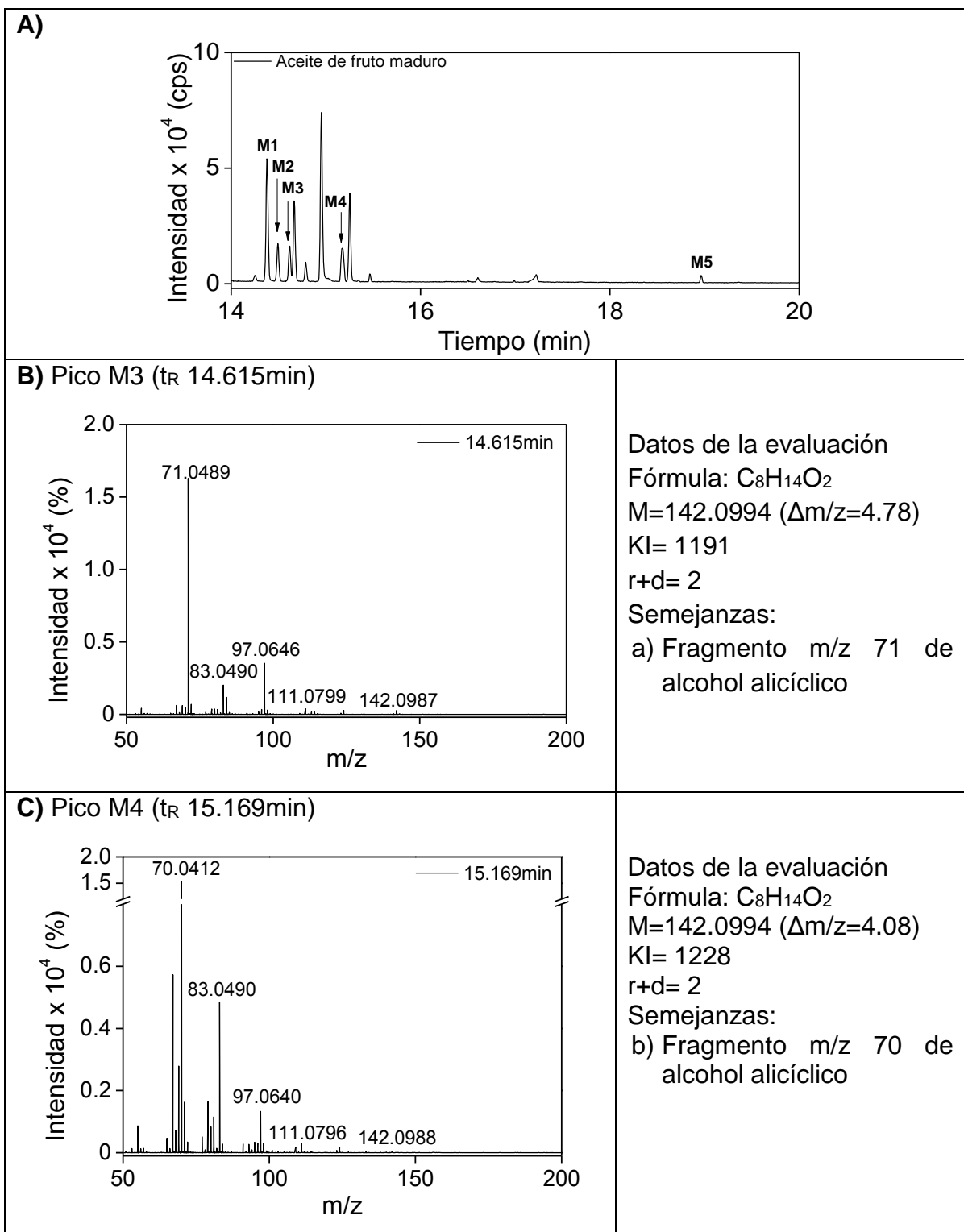


Fig. 3.32 Cromatograma (GC QTOF/MS) de la fase orgánica (aceite) obtenida por hidrodestilación de fruto maduro y espectros de masas de los picos M3 y M4.

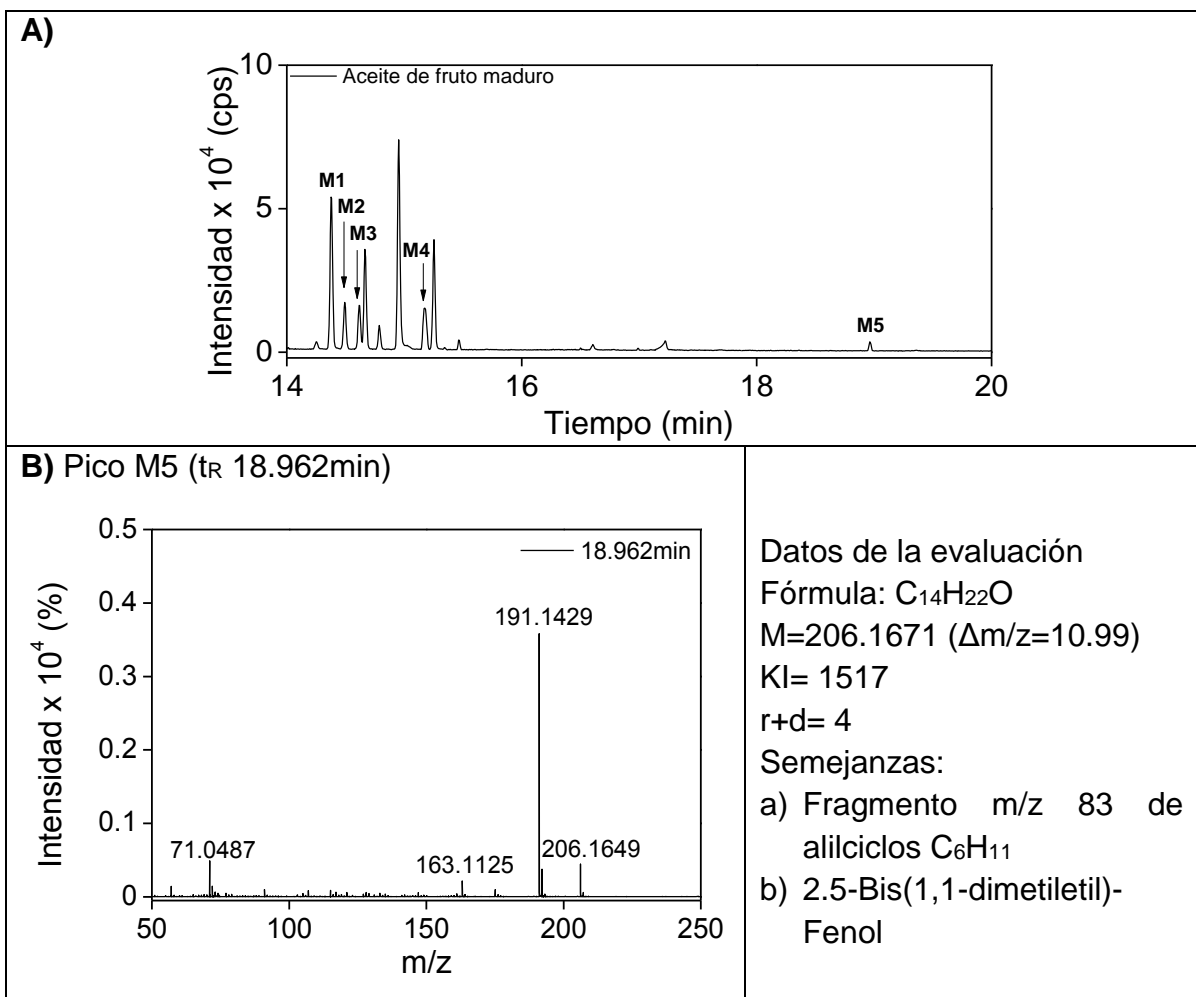


Fig.3.33 Cromatograma (GC QTOF/MS) de la fase orgánica (aceite) obtenida por hidrodestilación de fruto maduro y espectro de masas del pico M5.

Dado el poco éxito en la identificación de los compuestos contenidos en el aceite de fruto cuajado y maduro, se probó estimar su temperatura de ebullición. En la fig. 3.34 se muestra la dependencia de log KI con la temperatura de ebullición de los alcanos C₈-C₂₀. Con los valores de KI determinados para los compuestos de los picos C1, C2, M1-M5, se estimó por interpolación a la dependencia $\log KI = 2.64726 + 0.00193T_{\text{ebullición}}$ la temperatura de ebullición de los compuestos detectados en fruto cuajado y fruto maduro, los cuales tendrían una temperatura de ebullición que varía entre 220 y 276°C. Los valores interpolados se presentan en la tabla 3.12.

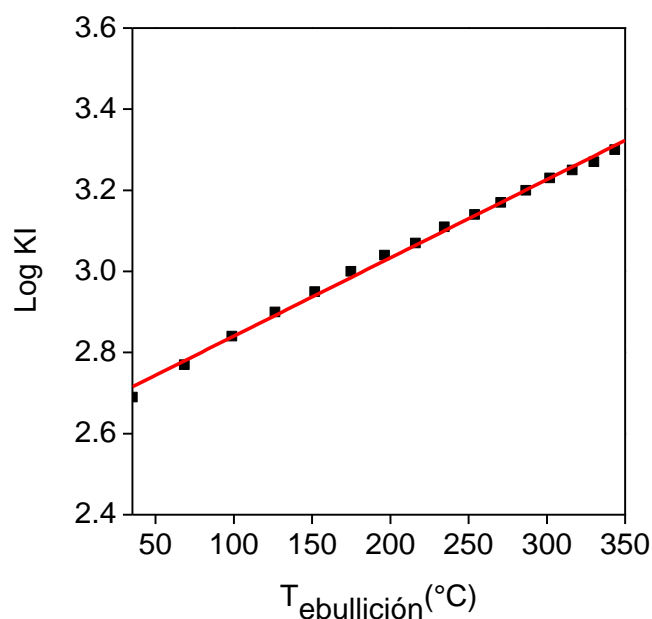


Fig. 3.34 Dependencia $\log KI = f(T_{eb})$ para la mezcla de alcanos (C_8-C_{20}) en una columna no polar.

Tabla 3.12 Índices de Kovats (KI) y temperatura de ebullición estimada de los compuestos detectados en aceite de fruto cuajado y fruto maduro.

Fruto	Pico	KI	Tebullición (°C)	Tebullición interpolada (°C)
cuajado	C1	1182	196.3-216.1	220
	C2	1244	216.1-234.5	232
maduro	M1	1175	196.3-216.1	219
	M2	1183	196.3-216.1	221
	M3	1191	196.3-216.1	222
	M4	1228	216.1-234.5	229
	M5	1517	270.6-286.6	276

Conclusiones

- Al comparar los parámetros de la caracterización química de la guayaba variedad “Media China” se observa que la mayor variación entre el fruto cuajado y el maduro es la relación sólidos solubles totales/acidez y que la sacarosa predomina sobre la glucosa y la fructosa en el fruto maduro.
- La microextracción en fase sólida permitió identificar un mayor número de compuestos orgánicos volátiles que el método de headspace en el análisis de exocarpio, endocarpio y fruto completo para ambos estadios del fruto.
- Para la fase aceite obtenida por hidrodestilación y analizada por cromatografía de gases (GC QTOF/MS) sólo se proponen dos estructuras correspondientes a los compuestos trans-4,5-epoxi-(E)-2-octenal en fruto cuajado y 2,5-bis (1,1-dimetiletil)-fenol en fruto maduro, los cuales no han sido reportados.
- Con la técnica SPME se extrajo un mayor número de COVs en ambos estados fenológicos de la guayaba, usando la fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenceno/carboxen (gris).
- En muestras de fruto completo cuajado pre-cosecha y maduro se identificaron aldehídos, ácidos, cetonas, ésteres, monoterpenos, alcoholes monoterpénicos y sesquiterpenos y se observó que en el fruto cuajado predominan los aldehídos y en el fruto maduro, los ésteres y el más abundante es el *cis*-3-acetato de hexilo.
- El fruto maduro emite más compuestos orgánicos volátiles que el fruto cuajado bajo las mismas condiciones y no se identificaron los mismos compuestos en el exocarpio y en el endocarpio.
- Los compuestos identificados en fruto cuajado colgante del árbol difieren en número y concentración de los observados después del corte del fruto.
- El número de compuestos extraídos del fruto cuajado pre-cosecha durante el día, es mayor que durante la noche, debido a las diferencias de temperatura y humedad.

- Durante la maduración de la guayaba “Media China”, el (S)-limoneno se convierte en (-)-*trans*-carveol por la ruta de biosíntesis de (S)-Limoneno y α -humuleno en β -cariofileno por la ruta de biosíntesis de β -cariofileno.
- El (S)-limoneno es el compuesto que se emite en mayor cantidad (71%) en el fruto cuajado durante la noche, y puede ser uno de los aleloquímicos a los que responde el insecto *Conotrachelus dimidiatus*.
- Los métodos de headspace y microextracción en fase sólida permitieron la extracción e identificación de compuestos orgánicos volátiles de la guayaba mexicana variedad “Media China” en dos etapas fenológicas. Sin embargo, el número de compuestos y el grado de extracción fue diferente y no hay propiedades físicas distintivas de los compuestos extraídos por cada método.
- Los compuestos extraídos por hidrodestilación fueron separados por cromatografía de gases/líquidos, pero no identificados. No obstante se estableció que las fracciones de aceite esencial de fruto cuajado y maduro contienen compuestos con masa molecular superior a cualquiera de las reportadas en extractos de guayaba y con temperatura de ebullición superior a 200 °C.

Bibliografía

- [1] Agroservicios de México S.C. DECA: *Ficha técnica de Conotrachelus dimidiatus*. <http://www.cesaveg.org.mx/html/fichastecnicas/fichatecnicaconotrachelusdimidiatus>. (Consultado el 24 de agosto de 2015).
- [2] D. K. Salunkhe, S. S. Kadam (1995): *Handbook of fruit science and technology. Production composition, storage and processing*. New York, CRC Press.
- [3] T. D. Pennington, J. Sarukhán (2005): *Árboles tropicales de México*. México: Fondo de cultura económica.
- [4] M. L. Medina, F. Pagano. *Characterization of guava pulp (Psidium guajava L.) Criolla Roja*. Rev. Fac. Agron. 20 (2003) 72–86.
- [5] J. A. Pino, L. Bent, C. E. Quijano-Célis. *Determinación de la contribución al aroma de la guayaba cv. Suprema roja de los componentes volátiles determinados por microextracción en fase sólida*. Alimentos hoy 21 (2012) 17–25.
- [6] A. A. Romero Frías (2015): *Estudio de los semioquímicos responsables de la interacción entre la guayaba (Psidium guajava L.) y el picudo de la guayaba Conotrachelus psidii Marshall*. Bogotá: Tesis de doctorado.
- [7] SAGARPA (2010): *Diagnostico de las necesidades de infraestructura estratégica para impulsar el mercado de exportación de Guayaba*. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/./Estudios_promercado/guayaba. (Consultado 9 de octubre de 2015).
- [8] F. Lucio Ortíz, L. Reyes Muro, J. L. Ramos González, L. H. Maciel Pérez, R. R. Lozano Domínguez, J. Espinoza Calzada, F. González Castañeda, F. Esquivel Villagrana, J. S. Padilla Ramírez, E. S. Osuna Ceja (1998): *Guía para la asistencia técnica agrícola. Área de influencia del campo experimental pabellón*. Pabellón de Arteaga, INIFAP, CIRNOC.

- [9] N. H. Ryu, K. R. Park. *A hexane fraction of guava Leaves (Psidium guajava L.) induces anticancer activity by suppressing AKT/mammalian target of rapamycin/ribosomal p70 S6 kinase in human prostate cancer cells.* J. Med. Food 15 (2012) 231–41.
- [10] J. Samoticha, A. Wojdylo, T. Golis. *Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland.* Food Chem. 215 (2017) 263–273.
- [11] V. K. Joshi, L. R. Verma (2002): *Postharvest Technology of fruits and vegetables: Handling, processing, fermentation and waste management.* Indus Publishing Company, pp 215.
- [12] A. F. López Camelo (2003): *Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Del campo al mercado.* Balcarse, Argentina: FAO.
- [13] D. B. Hodge, M. N. Karim, D. J. Schell, J. D. McMillan. *Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose.* Biores. Technol. 99 (2008) 8940–8948.
- [14] C. Mondragon Jacobo, L.M. Toriz Ahumada, S. H. Guzmán Maldonado. *Characterization of Guava selection for the Bajío Region of Guanajuato, Mexico.* Agricultura técnica en México 35 (2009) 315–322.
- [15] H.D. Belitz, W. Grosh, P. Schieberle (2009): *Food Chemistry.* Berlin-Heidelberg: Springer.
- [16] A. L. Morales, L. M. Melgarejo (2010): *Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (Psidium guajava L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva.* Bogotá: Panamerica.
- [17] S. Badui Dergal (2006): *Química de los alimentos.* Mexico: Pearson.
- [18] H. M. Serra, T. A. Cafaro. *Ascorbic acid : from chemistry to its crucial protective role in the eye.* Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 41 (2007) 525–532.
- [19] M. E. Solarte, M. S. Hernández, A. L. Morales, J. P. Fernández Trujillo, L. M.

- Melgarejo (2010): *Caracterización fisiológica y bioquímica del fruto de guayaba durante la maduración*. Bogotá: Panamerica.
- [20] T.M. Gutiérrez, O. L. Hoyos, M. I. Páez. *Ascorbic acid determination in Gooseberry*. Rev. Biotecnol. II, 5 (2007) 70–79.
- [21] C. Vázquez, A. I. de Ocos, C. L. Nomdedeu (2005): *Alimentación y nutrición. Manual teórico-práctico*. Madrid: Díaz de Santos.
- [22] F. G. Velarde (1995): *Tratado de arboricultura frutal. Morfología y fisiología del árbol frutal*. Madrid: Mundiprensa, pp. 64.
- [23] Á. Gil (2010): *Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Tomo II. Madrid: Panamerica.
- [24] J. M. Sánchez Montero, A. R. Alcántara León (2007): *IX. Compuestos orgánicos volátiles en el medio ambiente*. Madrid: Dep. Química Orgánica y Farm. Univ. Complutense, p. 27.
- [25] S. Bano. *Terpenoids*. Chemistry of natural products (2007) 1-21.
- [26] G. Gamini. *OChemPal*. United States of America. <http://www.ochempal.org/index.php/alphabetical/s-t/terpenes>. (Consultado el 16 de mayo de 2017).
- [27] M. D. Romero Márquez (2004): *Plantas aromáticas. Tratado de aromaterapia científica*. Buenos Aires, Argentina: Kier.
- [28] M. Padula, D. B. Rodríguez-Amaya. *Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guavas (Psidium guajava L.)*. Food Chem. 20 (1986) 11–19.
- [29] S. Lee, Y.S. Km, H.K. Choi, S. K. Cho. *Determination of the Volatile Components in the Fruits and Leaves of Guava Plants (Psidium guajava L.) Grown on Jeju Island, South Korea*. J. Essent. Oil Res. 23 (2001) 52–56.
- [30] R. K. Chalannavar, V. K. Narayanaswamy. *Chemical composition of essential oil of Psidium cattleianum var. lucidum (Myrtaceae)*. African J. Biotechnol. 11

(2012) 8341–8347.

- [31] C. S. L. B. de Cromatografía: *Muestreo por espacio de cabeza*. 2015. <http://blog.cromlab.es/muestreo-por-espacio-de-cabeza-headspace-sampling-hs/>. (Consultado el 10 de marzo de 2016).
- [32] Agilent Technologies (2014): *Headspace Sampler*. United States of America.
- [33] A. Tipler (2013): *An Introduction to Headspace Sampling in Gas Chromatography*. PerkinElmer, Inc. pp. 3–33.
- [34] Restek (2000): *A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC*. United States of America.
- [35] B. Kolb, L. S. Ettre (2006): *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*. Canada: Wiley interscience.
- [36] R. Mindrup, R. E. Shirey (2001): *Improved performance of SPME fibers and applications*. United States of America. pp. 61–85.
- [37] J. C. Botana (2005): *Contribución a la determinación de contaminantes polares en muestras medioambientales mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases*. España. Tesis de doctorado.
- [38] A. M. Peñalver Hernando (2009): *Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental*. España. Tesis de doctorado.
- [39] M. F. Ortuño Sánchez (2006): *Manual práctico de aceites esencial, aromas y perfumes*. España: Aiyana.
- [40] R. Kumar, Y. C. Tripathi. *Getting fragrance from plants. Manual on extraction*. Forest research institute (2011) 2-27.
- [41] Fssai Home (2005). *Manual of methods of analysis of foods, fruits and vegetable products*. http://old.fssai.gov.in/Portals/0/Pdf/Draft_Manuals/FRUITS_AND_VEGETABLE. (Consultado el 30 de mayo de 2017).
- [42] J. Fernández Salguero (2009): *Análisis de los alimentos*. España: Acrabia

Zaragoza, pp. 1–7.

- [43] M. Domene, M. Segura. *Parámetros de calidad interna de hortalizas y frutas en la industria agroalimentaria*. Cajamar 5 (2014) 1–18.
- [44] C. Vasco, J. Ruales, A. Kamal-Eldin. *Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador*. Food Chem. 111 (2008) 816–823.
- [45] P. Manual (2005): *DR5000 Spectrophotometer Procedures Manual*. pp. 529–533.
- [46] M. T. Tarrago-Trani, K. M. Phillips, M. Cotty. *Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods*. J. Food Compos. Anal. 26 (2012) 12–25.
- [47] R. Suarez, E. Arévalo, L. Linares, F. Ustáriz, G. Hernández. *Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario*. Av. Química, 4 (2009) 53–62.
- [48] L. Arenas de Moreno, M. Marín, C. Castro de Rincón, L. Sandoval. *Determinación por HPLC de los azúcares en los frutos de guayaba (Psidium guajava L.) de una plantación comercial del Municipio Mara*. Rev. Fac. Agron. (1995) 467–483.
- [49] D. Rojas Barquera, C. E. Narváez Cuenca. *Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (Psidium guajava L.) cultivadas en Colombia*. Quim. Nova 32 (2009) 588–594.
- [50] S. P. Singh (2011): *Guava (Psidium guajava L.)*. Postharvest Biol. Technol. Trop. Subtrop. Fruits p. 213–246.
- [51] P. Y. Eduardo (1998): *Química de los alimentos*. Madrid: Síntesis.
- [52] J. C. Marín-Loaiza, C. L. Céspedes. *Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro*. Rev. Fitotec. Méx. 30 (2007) 327–351.

- [53] H. J. Bouwmeester, J. Gershenzon, M. C. J. M. Konings, R. Croteau. *Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. I. Demonstration of enzyme activities and their changes with development.* Plant Physiol. 117 (1998) 901–912.
- [54] H. J. Bouwmeester, M. C. J. M. Konings, J. Gershenzon, F. Karp, R. Croteau. *Cytochrome P-450 dependent (+)-limonene-6-hydroxylation in fruits of caraway (Carum carvi).* Phytochemistry, 50 (1999) 243–248.
- [55] L. Taiz, E. Zeiger (2006): *Fisiología vegetal.* Universitat Jaume.
- [56] A. Kristian (2017). *The enzyme database.* <http://www.enzyme-database.org/about.php>. (consultado el 11 de mayo de 2017).
- [57] *SolCyc Home* (2016). <http://solcyc.solgenomics.net/>. (consultado el 16 de mayo de 2017).
- [58] S. Kumar Talapatra, B. Talapatra (2015): *Chemistry of plant natural products.* London: Springer.
- [59] G. Bagetta, M. Cosentino, T. Sakurada (2015): *Aromatherapy basic mechanisms and evidence-based clinical use.* Italy: CRC Press.
- [60] N. Dudareva, A. Klempien, J. K. Muhlemann, I. Kaplan. *Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds.* New Phytol. 198 (2013) 16–32.
- [61] H. G. Jurgens (2004): *Mass spectrometry.* Springer. Germany.
- [62] S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras, M. J. Tuñón. *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.* Nutr. Hosp. 17 (2002) 271–278.

Anexos

Anexo A1. Reactivos utilizados para la realización de la tesis.

Reactivos	Marca	Características
Acetona	Honeywell	Disolvente orgánico grado HPLC
Ácido ascórbico	Sigma	Pureza 99 %
Ácido etilendiaminotetraacético	Mallinckrodt	
Ácido fórmico	Sigma	Pureza ≥ 95 %
Ácido gálico	Sigma	Valoración 97.5-102.5 %
Ácido metafosfórico	Sigma	Pureza 33.5-36.5 %
Búfer	Hach	pH 10.1 ± 0.1
Cloroformo	Merck KGaA	Disolvente orgánico grado HPLC
D-(-)-Fructosa	Sigma	Pureza ≥ 99 %
D-(+)-Glucosa	Supelco	
Fenoltaleína		Concentración 1 %
Ferrocianuro de potasio	Hach	
Fosfato 4-aminoantipiridina	Hach	
Hidróxido de sodio	J. T. Baker	Perlas, pureza 98.4 %
Sacarosa	Sigma	Pureza ≥ 99.5 %
Tris-(2-carboxietil) fosfina	Sigma	Concentración 0.5 M, pH 7.0

Anexo A2. Equipos utilizados para la realización de la tesis.

Instrumento/equipo	Marca	Modelo
Centrífuga	Eppendorf	5415D
Cromatógrafo GC	Agilent	Serie 7200
Cromatógrafo HPLC	Agilent	Serie 1260 infinity
Detector de arreglo de diodos	Agilent	Serie 1260 infinity
Detector índice de refracción	Milton Roy	1109
Detector Q-TOF/MS	Agilent	Serie 6520
Detector Q-TOF/MS	Agilent	Serie 7200
Espectrofotómetro UV-Vis	Hach	DR 5000
Headspace	Agilent	Serie 7697A
Limpiador ultrasónico	Cole Parmer	
Refractómetro	Reichert	Abbe Mark II

Anexo A3. Método cromatográfico para determinación de ácido ascórbico.

A3. Método: A ASCORBICO.M, equipo HPLC-DAD serie 1200 infinity

Binary Pump (G1312C)

Flow:1.000 ml/min
Low pressure limit:0.00 bar
High pressure limit:400.00 bar
Maximum flow gradient:0.500 ml/min²
Stroke A
Automatic stroke calculation A: Yes
Stroke B
Automatic stroke calculation B: Yes
Compress A
Compressibility mode A: Compressibility
Value Set
Compressibility A: 50*(10e-6/bar)
Compress B
Compressibility Mode B: Compressibility
Value Set
Compressibility B:115*(10e-6/bar)
Stop time
Stoptime mode: Time set
Stoptime: 6.00 min
Post Time
Posttime mode: Off
Timetable
Solvent composition
A: 0.05% (w/v) formic acid
Percent: 100%
Instrument curves
Store pressure: Yes
Store flow: Yes
Store solvent ratio A: Yes
Store solvent ratio B: Yes
Store direction of piston A: Yes
Store direction of piston B: Yes

Hip sampler (G1367E)

Auxiliary
Draw speed: 200.0 µl/min
Eject speed: 200.0 µl/min
Draw position offset: -0.3 mm
Wait time after drawing: 0.0 s
Sample flush out factor: 5.0
Vial/Well bottom sensing: No
Injection
Injection mode: Standard injection
Injection volume: 1.00 µL
High throughput
Valve to bypass after injection enabled: No
Overlapped injection
Enable overlapped injection: No
Thermostat

Not ready temperature mode: As current
config.
Thermostat control: As current config
Valve switching
Valve movements:0
Valve switch time 1
Switch time 1 enabled: No
Valve switch time 2
Switch time 2 enabled: No
Valve switch Time 3
Switch time 3 enabled: No
Valve switch time 4
Switch time 4 enabled: No stop time
Stoptime mode: As pump/No limit
Post time
Posttime mode: Off
Timetable
Instrument curves
Store temperature: No

Column Comp. (G1316A)

Left temperature control
Temperature control mode: Temperature set
Temperature: 25.00 °C
Enable analysis left temperature
Enable analysis left temperature on: Yes
Enable analysis left temperature Value:0.80
°C
Right temperature control
Right temperature control mode: Combined
Enable analysis right temperature
Enable analysis right temperature On: Yes
Enable analysis right temperature Value: 0.80
°C
Stop time
Stoptime mode: As pump/injector
Post time
Posttime mode: Off
Timetable
Instrument curves
Store left temperature: No
Store right temperature: No

DAD (G1315D)

Peakwidth:>0.10 min (2.0 s response time)
(2.5 Hz)
Slitwidth: 4 nm
UV lamp required: Yes
VIS lamp required: Yes
Analog output 1

Analog 1 zero: 5 %
Analog 1 attenuation:1000 mAU
Analog output 2
Analog 2 zero: 5 %
Analog 2 attenuation:1000 mAU
Signals
Signaltable

Use Sig.	Signal	Wavelength nm	Bandwith nm
Yes	Signal A	220	4
Yes	Signal B	254	4
Yes	Signal C	280	4

Prepare mode
Margin for negative absorbance:100 mAU
Prepare automation
Do preprun balance: Yes
Do postrun balance: No
Spectra acquisition
Spectra range from:190 nm
Spectra range to: 400 nm
Spectra step:1.0 nm
Spectra acq mode: All
Stop time
Stoptime mode: As pump/injector
Post time
Posttime mode: Off
Timetable
Instrument curves
Store board temperature: No
Store optical unit temperature: No
Store UV lamp anode voltage: No

Column

Column description: Phenomenex Synergi 4u
Fusion-RP 80A
Serial#: 715363-9
Product#: 993967-902
Batch#:
Diameter: 4.6 mm
Length: 150.0 mm
Particle size:
Void volume:
Maximum Pressure:
Maximum pH:
Minimum pH:
Maximum Temperature:
Comment:

Anexo A4. Método cromatográfico para determinación de azúcares.

A4. Método azúcares, equipo HPLC-IR serie 1200 infinity

Binary Pump (G1312C)

Flow: 0.700 ml/min
Low pressure limit: 0.00 bar
High pressure limit: 400.00 bar
Maximum flow gradient: 0.300 ml/min²
Stroke A
Automatic stroke calculation A: Yes
Stroke B
Automatic stroke calculation B: Yes
Compress A
Compressibility mode A: Compressibility value Set
Compressibility A: 50 10e-6/bar
Compress B
Compressibility mode B: Compressibility value Set
Compressibility B: 115 10e-6/bar
Stop time
Stoptime mode: Time set
Stoptime: 60.00 min
Post time
Posttime mode: Off
Timetable
Solvent composition

Channel	Name 1	Name 2	Selected (%)	Used percent
A	H2O	Ch. 1	Yes	20.0
B	ACN	Ch. 1	Yes	80.0

Instrument curves
Store pressure: Yes
Store flow: Yes
Store solvent ratio A: Yes
Store solvent ratio B: Yes
Store direction of piston A: Yes
Store direction of piston B: Yes

Hip sampler (G1367E)

Post time
Posttime mode: Off
Auxiliary
Draw speed: 200.0 µl/min
Eject speed: 200.0 µl/min
Draw position offset: -0.3 mm
Wait time after drawing: 0.0 s
Sample flush out factor: 2.0
Vial/Well bottom sensing: No
Injection
Injection mode: Injection with needle wash
Injection volume: 20.00 µL

Needle wash
Needle wash location: Flush port
Wash time: 10.0 s
High throughput
Valve to bypass after injection enabled:
No
overlapped injection
Enable overlapped injection: No
thermostat
Not ready temperature mode: As current config
Thermostat control: As current config
Valve switching
Valve movements: 0
Valve switch time 1
Switch time 1 enabled: No
Valve switch time 2
Switch time 2 enabled: No
Valve switch time 3
Switch time 3 enabled: No
Valve switch time 4
Switch time 4 enabled: No
Stop time
Stoptime mode: As pump/No limit
Timetable
Instrument curves
Store temperature: No

Column Comp. (G1316A)

Left temperature control
Temperature control mode: Temperature Set
Temperature: 40.00 °C
Enable analysis left temperature
Enable analysis left temperature On: Yes
Enable analysis left temperature value: 0.80 °C
Right temperature control
Right temperature control mode: Combined
Enable Analysis Right Temperature
Enable Analysis Right Temperature On: Yes
Enable Analysis Right Temperature Value: 0.80 °C
Stop Time
Stoptime Mode: As pump/injector
Post Time
Posttime Mode: Off
Timetable

Instrument Curves

Store Left Temperature: No

Store Right Temperature: No

Refractive index detector (mode 1109)

Energy: 5

Range: 10

Column(s)

Column Description: 5 NH₂

Serial#: PP/1265A

Product#:

Batch#:

Diameter: 4.6 mm

Length: 250.0 mm

Particle size:

Void volume:

Maximum pressure:

Maximum pH:

Minimum pH:

Maximum temperature:

Comment:

Anexo A5. Método cromatográfico con inyección por HS.

A5. Método PCI_HS_muestras150gc.M, equipo GC QTOF/MS agilent 7200

Control information

Sample inlet: GC
Injection source: Headspace
Injection location: Front
Mass spectrometer: Enabled

Sequence actions:
Vial missing: Skip
Wrong vial size: Abort
Leak detected: Continue
System not ready: Abort

Headspace Parameters

Agilent 7697A (QTOF HSP)
Instrument info
Address:192.168.254.19
Serial Number:CN14510032
Firmware revision: A.01.06

Instrument settings
Vial pressurization gas: Helium
Loop size (mL):1
Keyboard lock: ON
Transfer line type fused silica
Transfer line diameter (mm):0.53

System configuration
Carrier control: GC instrument
Resource conservation
Vial standby flow (mL/min): 20

Temperature settings:
Oven temperature (°C): 80
Loop temperature (°C): 90
Transfer line temperature (°C):100

Timing settings:
Vial equilibration (min): 10.00
Injection duration (min):0.50
GC cycle time (min):50.00

Vial and loop settings:
Vial size: 20
Fill mode: Default
Fill pressure (psi): 15
Loop fill mode: Default

Carrier settings:
Carrier control mode: GC controls carrier

Advanced settings:
Extraction mode: Single extraction
Vent after extraction: ON
Post injection purge: Default, 100 mL/min for 1 min
Acceptable leak check: Default, 0.2mL/min

GC

Oven
Temperature
Setpoint: On
(Initial): 50 °C
Hold time: 5 min
Post run: 300 °C
Program
#1 Rate: 10 °C/min
#1 Value: 300 °C
#1 Hold time: 10 min

Equilibration time: 1 min
Max temperature: 325 °C
Maximum temperature override disabled
Slow fan: Disabled
Cryo: Off
Collision Cell/Backflush
He Quench gas: Off
N2 Collision gas: On 1.5 mL/min
He Backflush EPC: Supplies Column 2

ALS

Front injector
Syringe size: 10 µL
Injection volume: 1.2 µL
Solvent A washes (PreInj): 2
Solvent A washes (PostInj): 2
Solvent A volume: 8 µL
Solvent B washes (PreInj): 2
Solvent B washes (PostInj): 2
Solvent B volume: 8 µL
Dwell time (PostInj): 0 min
Solvent wash draw speed: 300 µL/min
Solvent wash dispense speed: 3000 µL/min
Sample wash draw speed: 300 µL/min
Sample wash dispense speed: 3000 µL/min
Injection dispense speed: 6000 µL/min
Viscosity delay: 0 sec
Sample depth: Disabled
Injection type: Standard
L1 Airgap: 0.2 µL
Solvent wash mode: A, B
Sample overlap

Mode sample overlap is not enabled

ALS

Front SS inlet He
Mode: Splitless
Heater: On 250 °C
Pressure: On 14.093 psi
Total flow: On 54.2 mL/min
Septum purge flow: On 3 mL/min
Gas saver: On 20 After 2 min mL/min
Purge flow to split vent: 50 mL/min at 1 min
Liner: Agilent 5181-8818: 250 µL (Splitless, straight liner, deactivate)

Thermal aux 1 (G3520 transfer line)

Temperature
Setpoint: On
(Initial): 100 °C
Post Run: 0 °C
Thermal aux 2 (RIS MSD)
Temperature
Setpoint: On
(Initial): 300 °C
Post Run: 0 °C
Column
Column #1
Flow
Setpoint: Off
(Initial): 1.2 mL/min
Post Run: 1.2 mL/min
Agilent 19091S-433
HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane
0 °C—325 °C (325 °C): 30 m x 250 µm x 0.25 µm
Column lock unlocked
In Front SS Inlet He
Out backflush EPC
(Initial): 50 °C
Pressure: 14.093 psi
Flow: 1.2 mL/min
Average velocity: 28.657 cm/sec
Holdup time: 1.7448 min

Column #2

Flow
Setpoint Off
(Initial): 2.3 mL/min
Post Run: 2.3 mL/min
Agilent restrictor
Restrictor
0 °C—325 °C (325 °C): 1 m x 150 µm x 0 µm
Column lock unlocked

In He backflush EPC
Out MSD
(Initial): 50 °C
Pressure: 0.61666 psi
Flow: 2.3 mL/min
Average velocity: 338.46 cm/sec
Holdup time: 0.0049242 min
Column outlet pressure: 0 psi

Signals

Signal #1: Test Plot
Description Test Plot
Details
Save Off
Data rate 50 Hz
Dual Injection assignment front sample

Signal #2: Test plot
Description Test plot
Details
Save Off
Data Rate: 50 Hz
Dual injection assignment back sample

Signal #3: Test plot
Description Test plot
Details
Save Off
Data Rate: 50 Hz
Dual injection assignment back sample

Signal #4: Test plot
Description Test plot
Details
Save Off
Data rate: 50 Hz
Dual injection assignment back sample

GC/Q-TOF Acquisition method report

Tune file: atunes.pci.tune.xml
Ion source: CI
Source temp. (C): 150
Emission mode: Fixed
Fixed emission (µA): 10
Stop mode: By stop time
Stop time (min): 10
Solvent delay (min): 0
Time segment 1:MS
Mass range: 58-500

Anexo A6. Método cromatográfico con inyección de microfibra de SPME de microextracción en fase sólida.

A6. Método PCI_SPME_estandares150gc.M, equipo GC QTOF/MS agilent 7200

Control Information

Sample inlet: GC
Injection source: Manual
Mass spectrometer: Enabled

GC

Oven

Temperature
Setpoint On
(Initial): 50 °C
Hold time: 5 min
Post run: 300 °C
Program
#1 Rate: 10 °C/min
#1 Value: 300 °C
#1 Hold time: 10 min

Equilibration time: 1 min
Max temperature: 325 °C
Maximum temperature override disabled
Slow fan disabled
Cryo off

Collision cell/Backflush
He Quench gas: Off
N2 Collision gas: On 1.5 mL/min
He Backflush EPC: Supplies column 2

ALS

Front injector
Syringe size: 10 µL
Injection volume: 0.2 µL
Solvent A washes (PreInj): 4
Solvent A washes (PostInj): 2
Solvent A volume: 8 µL
Solvent B washes (PreInj): 4
Solvent B washes (PostInj): 2
Solvent B volume: 8 µL
Sample washes: 2
Sample wash volume: 4 µL
Sample pumps: 7
Dwell time (PreInj): 0 min
Dwell time (PostInj): 0 min
Solvent wash draw speed: 300 µL/min
Solvent wash dispense speed: 6000 µL/min
Sample wash draw speed: 300 µL/min
Sample wash dispense speed: 6000 µL/min
Injection dispense speed: 6000 µL/min
Viscosity delay: 0 sec

Sample depth: Disabled
Injection type: Standard
L1 Airgap: 0.2 µL
Solvent wash mode A, B
Sample overlap
Mode: Sample overlap is not enabled

Front SS Inlet He
Mode: Splitless
Heater: On 250 °C
Pressure: On 14.091 psi
Total flow: On 54.2 mL/min
Septum purge flow: On 3 mL/min
Gas saver: On 20 After 2 min mL/min
Purge flow to split vent: 50 mL/min at 1 min
Liner: Agilent 5190-4048: 35 µL (Straight Ultra Inert liner for SPME)

Thermal Aux 1 (G3520 Transfer line)
Temperature
Setpoint: Off
(Initial): 50 °C
Post run: 0 °C

Thermal aux 2 (RIS MSD)
Temperature
Setpoint: On
(Initial): 300 °C
Post run: 0 °C

Column
Column #1
Flow
Setpoint: Off
(Initial): 1.2 mL/min
Post run: 1.2 mL/min

Agilent 19091S-433: 1840.53008
HP-5MS 5% Phenyl methyl siloxane
0 °C—325 °C (325 °C): 30 m x 250 µm x 0.25 µm
Column lock unlocked
In front SS inlet He
Out backflush EPC
(Initial): 50 °C
Pressure: 14.091 psi
Flow: 1.2 mL/min
Average velocity: 28.739 cm/sec
Holdup time: 1.7398 min

Column #2
Flow
Setpoint: Off
(Initial): 1.8 mL/min
Post run: 1.8 mL/min
Agilent restrictor
Restrictor
0 °C—325 °C (325 °C): 1 m x 150 µm x 0 µm
Column lock unlocked
In He backflush EPC
Out MSD
(Initial): 50 °C
Pressure: 0.44931 psi
Flow: 1.8 mL/min
Average velocity: 267.81 cm/sec
Holdup time: 0.0062233 min

Fixed emission (µA): 10
Stop mode: By stop time
Stop time (min): 10
Solvent delay (min): 0
Time segment 1:MS
Mass range: 58-500

Column Outlet Pressure: 0 psi
Signals
Signal #1: Test plot
Description: Test plot
Details
Save: Off
Data rate: 50 Hz
Dual injection assignment: Front sample

Signal #2: Test plot
Description: Test plot
Details
Save: Off
Data rate: 50 Hz
Dual injection assignment back sample

Signal #3: Test plot
Description: Test plot
Details
Save: Off
Data rate: 50 Hz
Dual injection assignment back sample

Signal #4: Test plot
Description: Test plot
Details
Save: Off
Data rate: 50 Hz
Dual injection assignment: Back sample

GC/Q-TOF Acquisition method report

Tune file: atunes.pci.tune.xml
Ion source: CI
Source temp. (C): 150
Emission mode: Fixed

Anexo A7. Método cromatográfico para análisis de destilado y residuo de hidrodestilación (HPLC-DAD).

A7. Método: HIDRODESTILACION.M, equipo HPLC-DAD serie 1200 infinity

Binary Pump (G1312C)

Flow:0.700 ml/min
Low pressure limit:0.00 bar
High pressure limit:400.00 bar
Maximum flow gradient:0.500 ml/min²
Stroke A
Automatic stroke calculation A: Yes
Stroke B
Automatic stroke calculation B: Yes
Compress A
Compressibility mode A: Compressibility
Value Set
Compressibility A: 50*(10e-6/bar)
Compress B
Compressibility Mode B: Compressibility
Value Set
Compressibility B:115*(10e-6/bar)
Stop time
Stoptime mode: Time set
Stoptime: 40.00 min
Post Time
Posttime mode: Off
Timetable
Solvent composition
A: 0.05% (w/v) formic acid
Percent: 100%
B: Metanol
Percent: 0%
Instrument curves
Store pressure: Yes
Store flow: Yes
Store solvent ratio A: Yes
Store solvent ratio B: Yes
Store direction of piston A: Yes
Store direction of piston B: Yes

Hip sampler (G1367E)

Auxiliary
Draw speed: 200.0 µl/min
Eject speed: 200.0 µl/min
Draw position offset: -0.3 mm
Wait time after drawing: 0.0 s
Sample flush out factor: 5.0
Vial/Well bottom sensing: No
Injection
Injection mode: Standard injection
Injection volume: 50.00 µL
High throughput
Valve to bypass after injection enabled: No

Overlapped injection
Enable overlapped injection: No
Thermostat
Thermostat control: As current config
Valve switching
Valve movements:0
Valve switch time 1
Switch time 1 enabled: No
Valve switch time 2
Switch time 2 enabled: No
Valve switch Time 3
Switch time 3 enabled: No
Valve switch time 4
Switch time 4 enabled: No stop time
Stoptime mode: As pump/No limit
Post time
Posttime mode: Off
Timetable
Instrument curves
Store temperature: No

Column Comp. (G1316A)

Left temperature control
Temperature control mode: Temperature set
Temperature: 25.00 °C
Enable analysis left temperature
Enable analysis left temperature on: Yes
Enable analysis left temperature Value:0.80 °C
Right temperature control
Right temperature control mode: Combined
Enable analysis right temperature
Enable analysis right temperature On: Yes
Enable analysis right temperature Value: 0.80 °C
Stop time
Stoptime mode: As pump/injector
Post time
Posttime mode: Off
Timetable
Instrument curves
Store left temperature: No
Store right temperature: No

DAD (G1315D)

Peakwidth:>0.10 min (2.0 s response time)
(2.5 Hz)
Slitwidth: 4 nm
UV lamp required: Yes

VIS lamp required: Yes
Analog output 1
Analog 1 zero: 5 %
Analog 1 attenuation:1000 mAU
Analog output 2
Analog 2 zero: 5 %
Not ready temperature mode: As current config
Analog 2 attenuation:1000 mAU
Signals
Signaltable

Use Sig.	Signal	Wavelength nm	Bandwith nm
Yes	Signal A	220	4
Yes	Signal B	254	4

Prepare mode
Margin for negative absorbance:100 mAU
Prepare automation
Do preprun balance: Yes
Do postrun balance: No
Spectra acquisition
Spectra range from:190 nm
Spectra range to: 400 nm
Spectra step:1.0 nm
Spectra acq mode: All
Stop time
Stoptime mode: As pump/injector
Post time
Posttime mode: Off
Timetable
Instrument curves
Store board temperature: No
Store optical unit temperature: No
Store UV lamp anode voltage: No

Column

Column description: Phenomenex Synergi 4u
Fusion-RP 80A
Serial#: 715363-9
Product#: 993967-902
Batch#:
Diameter: 4.6 mm
Length: 150.0 mm
Particle size:
Void volume:
Maximum Pressure:
Maximum pH:
Minimum pH:
Maximum Temperature:
Comment:

Anexo A8. Método cromatográfico para análisis de residuo de hidrodestilación (HPLC QTOF/MS).

A8. Método HIDRODESTILACIONG, equipo HPLC QTOF/MS serie 1200 infinity

Acquisition method info

Device list
 1260 HiP ALS
 1260 BinPump
 1260 TCC MS Q-TOF

Use bottle A
 Ref nebulizer -
 Auto recalibration -
 Average scans -
 Detection window -
 Min height -

TOF/Q-TOF mass spectrometer

Ion source dual ESI
 Tune file autotune.tun
 Stop mode: No Limit/As Pump
 Stop time: -
 Fast polarity: N/A
 Time segments
 Time segment #: 1
 Start time diverter valve state: 0 MS
 Storage mode: centroid
 Ion mode: Dual ESI
 Time segment: 1

Wellplate sampler

Name 1260 HiP ALS
 Model: G1367E
 Ordinal #: 1
 Options: THM
 Stop time (min): As pump
 Post time (min): of
 Injection type: Needle wash
 Injection volume: 100
 Overlap time: Disable overlapped injection
 Draw position: -3
 Draw position detection: 0
 Draw speed: 200
 Eject speed: 200
 Flush out factor: 5
 Automatic delay volume reduction: No
 Equilibration time: 0
 Wash vessel: N/A
 Wash location: FlushPort
 Wash time: 1
 Wash cycles: N/A
 Ready temp. range
 Temp.
 Contact 1 0
 Contact 2 0
 Contact 3 0
 Contact 4 0
 Injector Program
 Signals Selected
 Contacts Time
 Table

Acquisition mode targetedMS2
 MS min range: 50
 MS max range: 1000
 MS scan rate: 1.41

Source Parameters

Parameter	Value
Gas temp (°C)	350
Gas flow (l/min)	11
Nebulizer (psi)	60

Scan Segments

Scan seg#	Ion polarity
1	Positive
Scan segment	1

Scan Source Parameters

Parameter	Value
Vcap	3500
Fragmentor	175
Skimmer	65
Octopole RFPeak	750

Chromatograms

Chrom Type	Label	Offset	Y-Range
TIC	TIC	15	10000000

Reference Masses

Ref mass enabled Disabled

Binary pump

Name 1260 Binpump
 Model G1312C
 Ordinal# 1
 Options SSV
 Stop time (min): 40
 Post time (min): off
 Flow (ml/min): 0.7
 Pressure min (bar): 0

Pressure max (bar): 400
 Max flow Gradient (ml/min): 5
 Solvent A: H₂O + 0.05 %FA
 Solvent B: Metanol
 Solvent ratio A: 90
 Solvent ratio B: 10
 Solvent type A1
 Solvent type A2
 Solvent type B1
 Solvent type B2
 Compress A (*10-6/ bar):50
 Compress B (*10-6/ bar): 115
 Stroke A: auto
 Stroke B: auto
 Stroke synchronization
 Contact 1 0
 Contact 2 0
 Contact 3 0
 Contact 4 0

Pump time table

Time	Flow	Pressure	Solv ratio B
0	0.7	400	10
30	0.7	400	50
35	0.7	400	50
35.1	0.7	400	10
40	0.7	400	10

Signals Selected
 Contact time table

Thermostated column compartment

Name 1260 TCC Model G1316A
 Ordinal# 1 Options
 Stop time (min): As pump
 Post time (min): Off
 Left temp: 25
 Right temp: Same as left
 Left ready: When temp within set point +/-
 0.8
 Right ready: When temp within set point +/-
 0.8
 Valve position 1
 Contact 1 0
 Contact 2 0
 Contact 3 0
 Contact 4 0
 Temperature time table
 Signals Selected
 Description
 Temperature of left heat exchange

Anexo A9. Método cromatográfico para análisis de aceite de hidrodestilación (HPLC QTOF/MS).

A9. Método HIDRODESTILACIONG, equipo HPLC QTOF/MS serie 1200 infinity

Acquisition method info

Device list
 1260 HiP ALS
 1260 BinPump
 1260 TCC MS Q-TOF

TOF/Q-TOF mass spectrometer

Ion source dual ESI
 Tune file autotune.tun
 Stop mode: No Limit/As Pump
 Stop time: -
 Fast polarity: N/A
 Time segments
 Time segment #: 1
 Start time diverter valve state: 0 MS
 Storage mode: centroid
 Ion mode: Dual ESI
 Time segment: 1

Acquisition mode targetedMS2
 MS min range: 50
 MS max range: 1000
 MS scan rate: 1.41
 MS/MS min range: 50
 MS/MS max range: 700
 MS/MS scan rate: 1.41
 Max time between MS: 0
 Fixed collision energy: 0

Source Parameters

Parameter	Value
Gas temp (°C)	350
Gas flow (l/min)	11
Nebulizer (psi)	60

Scan Segments

Scan seg#	Ion polarity
1	Positive
Scan segment	1

Scan Source Parameters

Parameter	Value
Vcap	3500
Fragmentor	175
Skimmer	65
Octopole RFPeak	750

Chromatograms

Chrom Type	Label	Offset	Y-Range
TIC	TIC	15	10000000

Reference Masses

Ref mass enabled Disabled
 Use bottle A -
 Ref nebulizer -
 Auto recalibration
 Average scans -
 Detection window -
 Min height -

Wellplate sampler

Name 1260 HiP ALS
 Model: G1367E
 Ordinal #: 1
 Options: THM

Stop time (min): As pump
 Post time (min): of
 Injection type: Needle wash
 Injection volume: 100
 Overlap time: Disable overlapped injection
 Draw position: -3
 Draw position detection: 0
 Draw speed: 200
 Eject speed: 200
 Flush out factor: 5
 Automatic delay volume reduction: No
 Equilibration time: 0
 Wash vessel: N/A
 Wash location: FlushPort
 Wash time: 1
 Wash cycles: N/A
 Ready temp. range
 Temp.
 Contact 1 0
 Contact 2 0
 Contact 3 0
 Contact 4 0
 Injector Program
 Signals Selected
 Contacts Time
 Table

Binary pump

Name 1260 Binpump

Model G1312C
 Ordinal# 1
 Options SSV
 Stop time (min): 30
 Post time (min): off
 Flow (ml/min): 0.7
 Pressure min (bar): 0
 Pressure max (bar): 400
 Max flow Gradient (ml/min): 5
 Solvent A: H₂O + 0.05 %FA
 Solvent B: THF
 Solvent ratio A: 100
 Solvent ratio B: 0
 Solvent type A1
 Solvent type A2
 Solvent type B1
 Solvent type B2
 Compress A (*10⁻⁶/ bar):50
 Compress B (*10⁻⁶/ bar): 115
 Stroke A: auto
 Stroke B: auto
 Stroke synchronization
 Contact 1 0
 Contact 2 0
 Contact 3 0
 Contact 4 0

Contact 2 0
 Contact 3 0
 Contact 4 0
 Temperature time table
 Signals Selected
 Description
 Temperature of left heat exchange

Pump time table

Time	Flow	Pressure	Solv ratio B
0	0.7	400	0
20	0.7	400	90
20.1	0.7	400	0
30	0.7	400	0

Signals Selected
 Contact time table

Thermostated column compartment

Name 1260 TCC Model G1316A
 Ordinal# 1 Options
 Stop time (min): As pump
 Post time (min): Off
 Left temp: 25
 Right temp: Same as left
 Left ready: When temp within set point +/-
 0.8
 Right ready: When temp within set point +/-
 0.8
 Valve position 1
 Contact 1 0

Anexo A10. Método cromatográfico para análisis de aceite de hidrodestilación (GC QTOF/MS).

A10. Método Quickswap.m equipo GC QTOF/MS agilent 7200

Control information

Sample inlet: GC
Injection source: GC ALS
Injection location: Front
Mass spectrometer: Enabled

GC

Oven
Temperature
Setpoint On
(Initial): 50 °C
Hold time: 5 min
Post run: 310 °C
Program
#1 Rate: 10 °C/min
#1 Value: 300 °C
#1 Hold Time: 10 min

Equilibration time: 5 min
Max temperature: 325 °C
Maximum temperature override disabled
Slow fan disabled
Cryo: Off

Collision Cell/Backflush
Pressure
Setpoint: Off
(Initial): 6 psi
Post Run: 0 psi

He Quench Gas: Off
N2 Collision Gas: On 1.5 mL/min

ALS
Front injector
Syringe size: 10 µL
Injection volume: 4 µL
Solvent A washes (PreInj): 4
Solvent A washes (PostInj): 2
Solvent A volume: 8 µL
Solvent B washes (PreInj): 4
Solvent B washes (PostInj): 2
Solvent B volume: 8 µL
Sample washes: 0
Sample wash volume: 1 µL
Sample pumps: 1
Dwell time (PreInj): 0 min
Dwell time (PostInj): 0 min
Solvent wash draw speed: 300 µL/min
Solvent wash dispense speed: 3000 µL/min

Sample wash draw speed: 300 µL/min
Sample wash dispense speed: 3000 µL/min
Injection dispense speed: 6000 µL/min
Viscosity delay: 0 sec
Sample depth: Disabled
Injection type: Standard
L1 airgap: 0.2 µL
Solvent wash mode: A, B
Sample overlap
Mode sample overlap is not enabled

ALS

Front SS Inlet He
Mode: Splitless
Heater: On 250 °C
Pressure: On 15.093 psi
Total flow: On 29 mL/min
Septum purge flow: On 3 mL/min
Gas saver: On 20 After 2 min mL/min
Purge flow to split vent: 25 mL/min at 1 min
Liner: Agilent 5190-2295: 870 µL (Universal, low pressure drop, ultra i)

Thermal Aux 1 (G3520 Transfer line)
Temperature
Setpoint: Off
(Initial): 50 °C
Post Run: 0 °C

Thermal aux 2 (RIS MSD)
Temperature
Setpoint: On
(Initial): 300 °C
Post Run: 0 °C

Column

Column #1
Flow
Setpoint: Off
(Initial): 1 mL/min
Post Run: 1 mL/min
Agilent 19091S-433
HP-5ms
0 °C—325 °C (350 °C): 30 m x 250 µm x 0.25 µm
Column lock unlocked
In front SS inlet He
Out aux PCM B
(Initial): 50 °C

Pressure: 15.093 psi
Flow: 1 mL/min
Average velocity: 21.645 cm/sec
Holdup time: 2.31 min
Column #2
Pressure
Setpoint: On
(Initial): 5 psi
Post run: 5 psi

Agilent 160-2635-5
Restrictor -Quickswap-
0 °C—325 °C (325 °C): 1.1 m x 100 µm x 0 µm
Column lock unlocked
In aux PCM B He
Out MSD
(Initial): 50 °C
Pressure: 5 psi
Flow: 0.54666 mL/min
Average velocity: 140.72 cm/sec
Holdup time: 0.013028 min
Column outlet pressure: 0 psi

PCM B
PCM B He
Pressure
Setpoint Off
(Initial): 6 psi
Post Run: 0 psi
Aux PCM B He
Aux PCM B He Supplies Column 2

Signals
Signal #1: Test Plot
Description Test Plot
Details
Save Off
Data rate: 50 Hz
Dual injection assignment front sample

Signal #2: Test plot
Description Test plot
Details
Save Off
Data rate 50 Hz
Dual injection assignment back sample

Signal #3: Test plot
Description Test plot
Details
Save Off

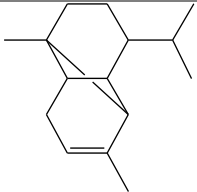
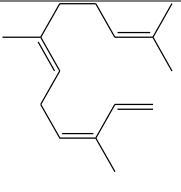
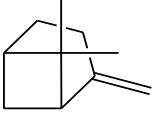
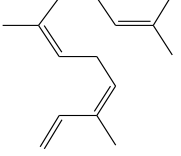
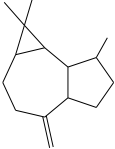
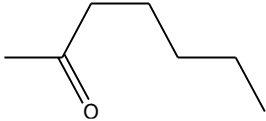
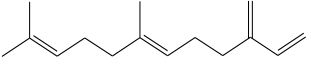
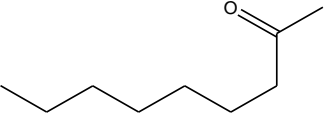
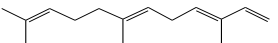
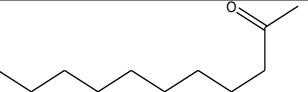
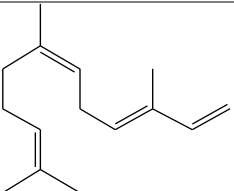
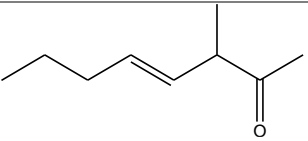
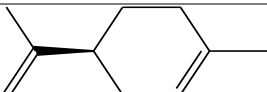
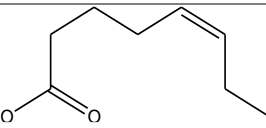
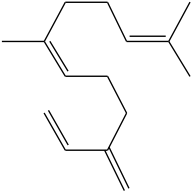
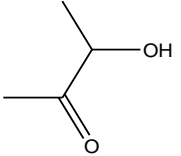
Data rate 50 Hz
Dual injection assignment back sample
Signal #4: Test plot
Description Test plot
Details
Save Off
Data rate 50 Hz
Dual injection assignment back sample

GC/Q-TOF Acquisition method report

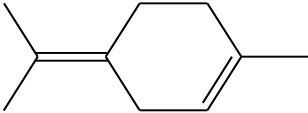
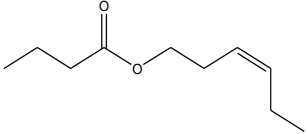
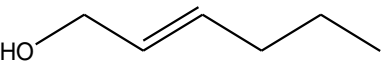
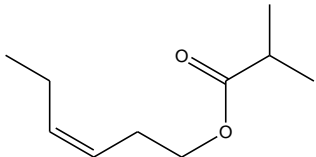
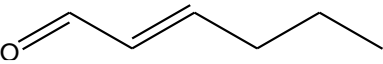
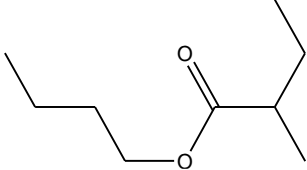
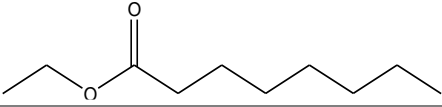
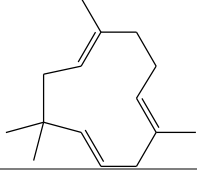
Tune file: atunes.pci.tune.xml
Ion source: EI
Source temp. (C): 230
Emission mode: Fixed
Fixed emission (µA): 4
Stop mode: By stop time
Stop time (min): 40
Solvent delay (min): 8

Time segment 1:MS
Mass range: 50-700

Anexo A11. Compuestos identificados en fruto cuajado y fruto maduro.

Nombre compuesto	Estructura	Nombre compuesto	Estructura
(-)- α -Copaeno KI 1395		(Z-E)- α -Farneseno KI 1466	
(-)- β -Pinoeno KI 986		(Z-Z)- α -Farneseno KI 1524	
(+)-Aromadendreno KI 1462		2-Heptanona KI 895	
(E)- β -Farneseno KI 1533		2-Nonanona KI 1096	
(E-E)- α -Farneseno KI 1497		2-Undecanona KI 1299	
(E-Z)- α -Farneseno KI 1518		3-Metil-4-octanona KI 1023	
(S)-Limoneno KI 1035		<i>cis</i> -3-Acetato de hexilo KI 1007	
(Z)- β -Farneseno KI 1557		Acetoína KI 701	

Nombre compuesto	Estructura	Nombre compuesto	Estructura
Ácido geránico KI 1360		Hexanoato de etilo KI 996	
Acetato de 3-fenilpropil KI 1375		Hexanoato de metilo KI 919	
Acetato de isobutilo KI 764		Hexanal KI 789	
Benzaldehído KI 968		α -Pinoeno KI 939	
Benzoato de etilo KI 1179		β -Pinoeno KI 986	
Butirato de etilo KI 794		α -Terpineno KI 1026	
Decanal KI 1212		α -Terpineol KI 1205	
Eucaliptol KI 1036		α -Tujona KI 1110	
Hexanoato de hexilo KI 996		β -Cariofileno KI 1451	
<i>cis</i> -3-Hexanoato de hexenilo KI 1384		Nonanal KI 1109	

Nombre compuesto	Estructura	Nombre compuesto	Estructura
Terpinoleno KI 1096		<i>cis</i> -3-Butirato de hexilo KI 1186	
Trans-2-hexen-1-ol KI 856		<i>cis</i> -3-Isobutirato de hexilo KI 1146	
Trans-2-hexen-1-al KI 857		2-Metil butanoato de butilo KI 1044	
Octanoato de etilo KI 1201		α -Humuleno KI 1477	
Acetato de hexilo KI 1022	