UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IMPACTO DEL PROCESAMIENTO DEL JUGO DE CAS (*Psidium friedrichsthalianum*) SOBRE SUS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES Y CITOTÓXICAS EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas para optar al grado y Título de Maestría Académica en Bioquímica

LAURA NAVARRO BOLAÑOS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica
2021

DEDICATORIA

A Dios.

A Edgar: por todo el amor, la paciencia, el acompañamiento y el apoyo total. El mejor compañero de vida.

A Isabella y María Laura: en esta vida debemos completar cada uno de los proyectos que nos planteamos. Ustedes son mi razón de crecer y de ser mejor cada día.

A papi y mami: porque todo lo que soy es por todo lo que me enseñaron y me inculcaron con amor, paciencia y disciplina. Los amo muchísimo.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos: ustedes son una familia maravillosa.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

A las BQ chicas por todo su apoyo en el proceso. Geo, Silvia, Elvi, Lore, Gaby, Pao, Patri: mil gracias por el apoyo emocional, fundamental para salir adelante.

Mi agradecimiento a Lore por todo el soporte técnico en laboratorio.

A Geo por el apoyo en el tema estadístico y su fabulosa amistad.

A Gaby, Silvia y Ana Mercedes: gracias por creer en mi.

Al CITA por el apoyo en la parte logística.

Al Departamento de Bioquímica, Escuela de Medicina.

"Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con Énfasis en Bioquímica"

MARIA SOLEDAD QUESADA MORUA (FIRMA)
Firmado digitalmente por MARIA SOLEDAD QUESADA MORUA (FIRMA)
Fecha: 2022.06.09 10:55:33 -06'00'

M.Sc. María Soledad Quesada Morúa
Representante del Decano Sistema de Estudios de Posgrado

GABRIELA SOFIA AZOFEIFA CORDERO (FIRMA)
Firmado digitalmente por GABRIELA SOFIA AZOFEIFA CORDERO (FIRMA)
Fecha: 2022.06.09 20:26:07 -06'00'

PhD. Gabriela Azofeifa Cordero
Directora de Tesis

ANA MERCEDES PEREZ CARVAJAL (FIRMA)
Firmado digitalmente por ANA MERCEDES PEREZ CARVAJAL (FIRMA)
Fecha: 2022.06.08 22:24:56 -06'00'

PhD. Ana Mercedes Pérez Carvajal
Lectora

SILVIA QUESADA MORA (FIRMA)
Firmado digitalmente por SILVIA QUESADA MORA (FIRMA)
Fecha: 2022.06.07 16:53:17 -06'00'

PhD. Silvia Quesada Mora
Lectora

MARIA ELVIRA SALAS HIDALGO (FIRMA)
Firmado digitalmente por MARIA ELVIRA SALAS HIDALGO (FIRMA)
Fecha: 2022.06.07 17:21:49 -06'00'

PhD. Elvira Salas Hidalgo
Representante de la Directora Programa de Posgrado em Ciencias Biomédicas

LAURA PATRICIA NAVARRO BOLAÑOS (FIRMA)
Firmado digitalmente por LAURA PATRICIA NAVARRO BOLAÑOS (FIRMA)
Fecha: 2022.06.07 11:26:48 -06'00'

Laura Patricia Navarro Bolaños
Sustentante

TABLA DE CONTENIDOS

Portada i
Dedicatoria ii
Agradecimientos iii
Hoja de aprobación iv
Tabla de contenidos v
Resumen viii
Lista de cuadros ix
Lista de figuras x
Lista de abreviaturas xi
Licencia de publicación xiii

Introducción 1
Marco teórico
- Radicales Libres 5
- Estrés oxidativo 7
- Antioxidantes 12
- Género *Psidium* 16
- *Psidium friedrichsthalianum* (O.Berg) 19
- Metodologías para evaluar la capacidad antioxidante 21
  - Actividad barredora de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 22
  - Inhibición de la peroxidación lipídica (MDA) 23
  - Actividad antioxidante en eritrocitos humanos (ERYCA) 23
  - Actividad barredora de óxido nítrico (NO) 24
  - Determinación de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) 24
  - Inhibición de ROS intracelular 24

Objetivos
- Objetivo General 26
- Objetivos Específicos 26

Hipótesis 27
Metodología

Recolección y procesamiento de las muestras 28
Extracción de las muestras 30
Determinación de las características fisicoquímicas 31
Humedad 31
pH 32
Grados Brix 32
Concentración de polifenoles totales 32
Determinación de la actividad antioxidante 33
Actividad barredora de radical (DPPH) 33
Actividad barredora óxido nítrico (NO) 33
Inhibición de la peroxidación lipídica (MDA) 34
Actividad antioxidante en eritrocitos humanos (ERYCA) 35
Inhibición de ROS intracelular (DCFDA) 35
Determinación de la actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales 36
Líneas celulares 36
Determinación de la actividad citotóxica 36
Resultados 38
Determinación de las características físicoquímicas 38
Determinación de la actividad antioxidante 40
Actividad barredora de radical DPPH 40
Actividad barredora de óxido nítrico (NO) 41
Inhibición de la peroxidación lipídica (MDA) 42
Actividad antioxidante en eritrocitos humanos (ERYCA) 43
Inhibición de la generación de ROS intracelular (DCFDA) 45
Determinación de la actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales 45
Discusión 47
Características físico-químicas 47
Actividad antioxidante 52
Actividad citotóxica en líneas celulares tumorales 58
Procesamiento y pasteurización 61
Conclusiones y perspectivas de investigaciones futuras para cas 68
Bibliografía 71

Anexo 1 83
Anexo 2 84

RESUMEN

Los radicales libres se generan de forma continua en las células por medio de procesos tanto exógenos como endógenos. A bajas concentraciones son fundamentales para cumplimiento de funciones celulares normales, pero cuando el nivel se eleva puede desencadenar una serie de reacciones de oxidación produciendo transformaciones que pueden afectar la función celular generando un estadío conocido como estrés oxidativo, el cual se relaciona con la inducción y posteriores complicaciones de ciertas enfermedades como la diabetes mellitus, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, de tipo inflamatorio, isquémicas y cardiovasculares, entre otras.

Los antioxidantes son moléculas con capacidad de inhibir la oxidación de las macromoléculas contrarrestando el efecto de los radicales libres. Existen antioxidantes de tipo endógeno y exógeno. Dentro de los antioxidantes exógenos los polifenoles son un gran grupo que se han encontrado en alimentos, bebidas, suplementos alimenticios y medicinas de origen natural (provenientes de plantas).

El género *Psidium* es uno de los grupos de plantas, con frutos comestibles, más estudiados por su alto contenido de antioxidantes como polifenoles y su amplia utilización en medicina natural tradicional. Dentro de este género, una especie interesante es el *Psidium friedrichsthalianum*, conocido como cas. Este fruto es un producto autóctono de Costa Rica, con contenido de ciertos productos fenólicos como la (+)-catequina, la procianidina B1, la procianidina B2, (-)-epicatequina y el ácido elágico, entre otros.

En el presente estudio, fueron analizadas las actividades antioxidantes y citotóxicas sobre líneas celulares tumorales de distintas muestras de jugos de cas, con diversos procesamientos como el prensado, el tratamiento enzimático o la clarificación mediante microfiltración tangencial.

En los resultados del estudio se mostró que la concentración de polifenoles totales tiende a disminuir conforme aumentó la cantidad de operaciones unitarias de procesamiento aplicadas. Sin embargo, esta disminución de polifenoles no repercutió en igual medida en las distintas actividades biológicas evaluadas. Algunas técnicas como el DPPH y la inhibición de óxido nítrico mostraron disminuciones significativas asociadas al procesamiento, pero otras técnicas como la inhibición de la peroxidación lipídica (MDA y ERYCA) y la inhibición de ROS intracelulares mostraron una menor afectación por la pérdida de compuestos bioactivos durante el procesamiento.

En la determinación de la actividad citotóxica la actividad fue moderada y únicamente se evidenció en células de adenocarcinoma colorrectal humano. Adicionalmente el proceso de pasteurización mostró un detrimento considerable en la moderada actividad que se observó.

A partir de los datos obtenidos para el *Psidium friedrichsthalianum*, en el presente estudio se determinó que el potencial de este fruto subutilizado radica principalmente sobre su actividad antioxidante. Sin embargo, se deben ampliar los ensayos para valorar otras actividades biológicas e identificar los compuestos bioactivos que se asocian a esas actvidades.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Nombre	Página
1	Características fisicoquímicas del jugo de cas según su procesamiento	38
2	Concentración de polifenoles totales del jugo de cas según el procesamiento	39
3	Actividad antioxidante determinada por la capacidad barredora del radical DPPH en muestras de cas con distinto procesamiento	41
4	Actividad barredora de óxido nítrico determinada en muestras de cas con distinto procesamiento	42
5	Inhibición de la peroxidación lipídica en homogenizados de hígado de ratas *Sprague-Dawley* tratados con muestras de cas	43
6	Inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos utilizando distintas muestras de cas	44
7	Inhibición de ROS intracelulares utilizando distintas muestras de jugo de cas	45
8	Actividad citotóxica del jugo de cas sobre las líneas celulares tumorales Vero (células epiteliales de riñón de mono), SW620 (adenocarcinoma colorectal) y AGS (adenocarcinoma gástrico).	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Procesamiento del cas para obtención de las cinco muestras a estudiar	30
2	Evaluación de la inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos utilizando distintas muestras de cas	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH: 2,2´-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro

AGS: línea celular de adenocarcinoma gástrico humano

AOAC: Association of Official Analytical Chemist International

AP-1: proteína activadora-1

BHA: hidroxianisol butilado

BHT: hidroxitolueno butilato

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Cl: jugo de cas clarificado

Clp: jugo de cas clarificado pasteurizado

DCF: 2´-7´-diclorodihidrofluoresceína

DCFDA: 2´-7´-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ERYCA: Actividad antioxidante en eritrocitos humanos

GAE: equivalente de ácido gálico

HDPE: polietileno de alta densidad

IC50: concentración inhibitoria del 50% de la actividad

IL-8: interleuquina 8

LEBi: Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica

MDA: malondialdehído

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro

MS: materia seca

NF-κB: factor nuclear kappa-B

ORAC: capacidad de absorbancia del radical oxígeno

PBS: buffer fosfato salino

PGNU: unidad de poligalacturonasa

Pr: jugo de cas prensado

Prp: jugo de cas prensado pasteurizado

Pu: pulpa de cas

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROS: especies reactivas de oxígeno

SFB: suero fetal bovino

SNP: nitroprusiato de sodio

SW620: línea celular de adenocarcinoma colorectal humano

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBHP: tert-butil hidroperóxido

TBHQ: terbutilhidroxiquinona

TCA: ácido tricloroacético

TE: equivalentes de Trolox

TNF alfa: factor de necrosis tumoral alfa

Vero: línea celular de células epiteliales de riñón de mono

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SEP Sistema de Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Laura Navarro Bolaños, con cédula de identidad 1-0928-0902, en mi condición de autor del TFG titulado "Impacto del procesamiento del jugo de cas (Psidium friedrichsthalianum) sobre sus actividades antioxidantes y citotóxicas en líneas celulares tumorales"

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. **SI** [X] **NO** *[ ]

***En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).**

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

LAURA PATRICIA NAVARRO BOLAÑOS (FIRMA)

Firmado digitalmente por LAURA PATRICIA NAVARRO BOLAÑOS (FIRMA)
Fecha: 2022.06.07 11:27:42 -06'00'

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las muchas definiciones que se pueden encontrar hoy sobre los radicales libres encontramos la de Liguori *et al.* (2018) donde indica que, cualquier especie molecular capaz de existir de forma independiente y que contiene un electrón desapareado en un orbital atómico puede ser considerado un radical libre. Éstos pueden ser formados o producidos en el cuerpo humano por fuentes externas como exposiciones a químicos, por ejemplo, la nicotina del humo del tabaco, así también como parte de procesos propios del organismo como las reacciones enzimáticas involucradas en la cadena respiratoria (Liguori *et al.*, 2018).

Un desbalance entre la producción de los radicales libres y las defensas antioxidantes se asocia con un daño en las macromoléculas, entre las que podemos mencionar los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos. A este proceso se le conoce como estrés oxidativo. El estrés oxidativo se ha asociado a enfermedades inflamatorias como la vasculitis y la artritis, así como a enfermedades cardiovasculares, a desórdenes neurológicos como el Parkinson, al cáncer, entre otras enfermedades (Blesa *et al*., 2015; Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013; Sosa *et al*., 2013).

Los antioxidantes son moléculas estables capaces de donar un electrón al radical libre para neutralizarlo y así reducir su capacidad de producir daño a las distintas estructuras celulares. La actividad de los antioxidantes permite retrasar la oxidación, ya sea, inhibiendo la formación de los radicales libres o interrumpiendo la propagación de los mismos (Brewer, 2011; Gulcin, 2020).

Investigaciones actuales en radicales libres confirman que los alimentos ricos en antioxidantes pueden llegar a jugar un papel fundamental en la prevención de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, así como el cáncer y la diabetes (Cianciosi *et al*., 2019; Martín & Ramos, 2016).

Estas investigaciones han incrementado el interés en realizar pruebas que midan la capacidad antioxidante total tanto de los alimentos, así como de productos farmacéuticos y de tipo cosmético (Dilis & Trichopoulou, 2010; Ou *et al.*, 2001; Qureshi *et al.,* 2014).

Las plantas o alimentos han sido investigados porque presentan una gran variedad de compuestos antioxidantes. Varias sustancias constituyentes de los mismos han sido caracterizadas y se ha determinado su capacidad antioxidante. Dentro de esos compuestos se han identificado moléculas como las vitaminas (A, C, E , K y complejo B), minerales, carotenoides y uno de los grupos más investigados son los polifenoles, dentro de los cuales los más representativos son los flavonoides, los taninos, las cumarinas, las xantonas y las procianidinas, entre otras (Cianciosi *et al*., 2019; Vyas *et al*., 2010).

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos que se han encontrado en alimentos, bebidas, suplementos alimenticios y medicinas de origen natural (provenientes de plantas). A dichos productos se les ha atribuido una gran variedad de funciones como la protección contra la radiación ultravioleta e inclusive reducción del riesgo de padecer enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Manach *et al*., 2004).

Dentro de los compuestos fenólicos más importantes que se han identificado en las plantas se encuentran los flavonoides, los ácidos fenólicos, los taninos, los estilbenos y los lignanos (Jakobek, 2015; Manach *et al*., 2004). Los flavonoides, a su vez, presentan varias subcategorías dentro de las que se pueden mencionar a los flavonoles, los flavanoles (o catequinas) y las antocianidinas (Manach *et al.*, 2004).

Algunas de las actividades biológicas que se han descrito para estos compuestos se enumeran desde actividades anti-inflamatorias, hepato, nefro y neuroprotectoras, así como la inhibición de la peroxidación lipídica, lo que permite

mantener la integridad de las membranas celulares. Además, se ha reportado la acción de los polifenoles en tratamientos anti-cáncer, anti-cataratas, antimicrobianos, en diabetes y como prevención de enfermedades cardiovasculares (Montoro *et al*., 2006; Neha *et al*., 2019).

Entre las frutas, la familia Mirtaceae es una de las que más se ha estudiado su composición de polifenoles y antioxidantes, especialmente, las del género *Psidium*. Las especies que pertenecen a este género, se caracterizan por crecer en áreas bajo condiciones de estrés constante y dada la capacidad de adaptación de estas especies a dichas condiciones, los frutos son ricos en metabolitos secundarios que, consecuentemente, tienen propiedades funcionales de interés (Medina *et al*., 2011). Dentro de este género, el cas (*Psidium friedrichsthalianum*) es una fruta originaria de Costa Rica y que es cultivada desde Chiapas, México hasta Panamá, entre 90 y 1000 metros de altura sobre el nivel del mar (Pino *et al*., 2002); esta fruta se consume directamente, en jugo o en alguna otra preparación culinaria como jaleas y helados (Zapata *et al*., 2013).

Dentro de los principales componentes fenólicos originalmente identificados en el *P. friedrichstalianum* se encuentran los flavan-3-oles como: (+)-catequina, la procianidina B1, la procianidina B2, (-)-epicatequina y además se identificó al ácido elágico (Cuadrado-Silva *et al*., 2017b). En el 2019 se publicó una caracterización completa de los fitoquímicos presentes en el fruto del cas, donde se detectaron un total de 112 metabolitos secundarios polares de los cuales 110 fueron identificados. Los metabolitos identificados pertenecen a las siguientes familias químicas: proantocianidinas, elagitaninos, flavanoles y derivados del ácido cinámico, de quercetina y del ácido quínico, dihidrocalconas y biflavonoides (Rojas-Garbanzo *et al*., 2019).

La riqueza en compuestos fenólicos, además de su sencillo manejo agrícola y de producción, hacen al cas un buen candidato para investigar sus propiedades

antioxidantes y citotóxicas que pudieran tener un potencial efecto benéfico en la salud. Además, es importante recalcar que, la falta de reportes publicados basados en las propiedades biológicas del *P. friedrichstalianum* y la presencia de importantes moléculas con actividades biológicas reconocidas en otras especies del mismo género, permiten justificar el interés por estudiar estas propiedades, lo que incentivaría su consumo, así como el desarrollo de nuevos productos derivados.

MARCO TEÓRICO

Radicales libres

Los radicales libres son moléculas que presentan uno o más electrones desapareados en un orbital exterior que pueden generar reacciones en cadena, por medio de la eliminación de un electrón de otra molécula, para poder completar su propio orbital. Estas moléculas se forman tanto como parte de reacciones vitales dentro del organismo, así como por sobreexposición a factores externos, que pueden llegar a desencadenar reacciones donde se amplifica la formación de gran cantidad de estas moléculas con electrones desapareados (Liguori *et al.*, 2018).

Los radicales libres se generan de forma continua en las células por medio de procesos tanto exógenos como endógenos. En los procesos endógenos podemos mencionar la cadena respiratoria en la mitocondria, el proceso de fagocitosis, los procesos inflamatorios, la actividad de la enzima xantina oxidasa, en los peroxisomas, en la síntesis de prostaglandinas y en el sistema enzimático citocromo P-450. Dentro de los procesos exógenos de producción de radicales se pueden mencionar las reacciones ionizantes como la exposición a rayos X, el ozono, el humo del cigarrillo, la contaminación ambiental y la exposición a químicos industriales (Liguori *et al.*, 2018; Sonowal & Ramana, 2019).

En las especies de vida aeróbica la formación de radicales libres, a partir de una molécula de oxígeno, generan moléculas que se les conoce como especies reactivas de oxígeno o ROS por sus siglas en inglés (*Reactive Oxygen Species*). Desde el punto de vista fisiológico los ROS más importantes son el oxígeno singulete ($^1O_2$), el superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$), el ozono (O_3), y el ácido hipocloroso (HOCl) (Boots *et al.*, 2008; Sonowal & Ramana, 2019). La mayoría de estos ROS son considerados como productos del metabolismo humano (González *et al.*, 2010; Marrocco *et al.*, 2017).

Además, se producen otras especies reactivas, con importancia fisiológica, como las especies derivadas del nitrógeno, que son denominan RNS por sus siglas en inglés (*Reactive Nitrogen Species*), dentro de las cuales las más importantes de mencionar son: el óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) y el peroxinitrito (ONOO-) (Bartesaghi & Radi, 2018; Boots *et al*., 2008).

Dentro de las distintas especies reactivas, ya sea de oxígeno o de nitrógeno, se encuentran moléculas químicas que pueden ser clasificadas como radicales propiamente y otras como no radicales. Las especies no radicales son aquellas que, a pesar de no tener un electrón desapareado, son moléculas con un alto poder de oxidación de biomoléculas y, por tanto, fácilmente generan radicales libres; a estos intermediarios reactivos se le conoce como oxidantes o como moléculas pro-oxidantes. Algunos ejemplos de estas especies reactivas no radicales son: el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el ozono y el peroxinitrito (Boots *et al*., 2008; Gulcin, 2020; Sonowal & Ramana, 2019).

Por otro lado, existen las especies reactivas radicales que sí cumplen con la definición de tener un electrón desapareado. Dentro de las más comunes podemos citar en el grupo de los ROS, el superóxido, el hidroxilo, el peroxilo y el aloxilo. Dentro de los RNS están el óxido nítrico y el dióxido de nitrógeno (Gulcin, 2020; Sonowal & Ramana, 2019).

Hay que tomar en consideración que no todos los ROS y los RNS tienen el mismo grado de reactividad. Cada uno de los tipos de radicales puede reaccionar con sustancias específicas y también pueden tener diferentes capacidades de desplazamiento, esto usualmente se correlaciona con el hecho de que son especies de tipo radical o si por el contrario son especies no radicales. Por lo general, las especies de tipo radical actúan en el mismo sitio donde ellos son formados. Por el

contrario, aquellas especies reactivas, de tipo no radical, deben atravesar la membrana biológica para manifestar su reactividad (Boots *et al.*, 2008).

Particularmente, el peróxido de hidrógeno es una molécula que, por su estado no ionizado y con poca carga, puede mezclarse muy bien con las moléculas de agua, esta condición le confiere al peróxido de hidrógeno un alto poder oxidativo y le permite atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas (Camps *et al.*, 2009).

Los efectos que se pueden presentar debido a las reacciones de las distintas especies reactivas pueden ser tanto positivos como negativos. Dentro de los efectos beneficiosos se encuentran la vasodilatación de músculo liso que se presenta gracias al radical óxido nítrico ($NO^{\cdot}$). Los radicales libres presentan, además, un papel fundamental en el metabolismo de xenobióticos, como el benceno, por medio de un proceso de oxidación que lleva a cabo el oxígeno reactivo que se produce en el sitio activo de la enzima citocromo P450 en el hígado (Boots *et al.*, 2008). Otro rol importante de los radicales libres está dado por medio del complejo enzimático NADPH oxidasa. Este complejo es activado cuando las células polimorfonucleares y los macrófagos del sistema inmune atacan a un agente infeccioso y, como producto de esta reacción, se aumenta la producción de superóxido. El superóxido se produce gracias a la reducción del oxígeno por la enzima NADPH oxidasa (Camps *et al.*, 2009; Gulcin, 2020).

Estrés oxidativo

El concepto de estrés oxidativo fue desarrollado en el año 1985 por H. Sies, proponiéndolo como un desbalance caracterizado, ya sea, por un aumento de los agentes oxidantes o bien, por una disminución de los agentes antioxidantes. El concepto fue acuñado bajo el principio de Gerschman que indicaba, que tanto la hiperoxia como la disminución de agentes antioxidantes llevaban al daño celular. H. Sies y E. Cadenas en 1985, propusieron el concepto de estrés oxidativo basado en

tres factores, en primer lugar, determinaron la quimioluminiscencia del oxígeno molecular singulete; en segundo lugar, midieron los productos finales de la peroxidación lipídica y, en tercer lugar, hicieron una cuantificación del glutatión. Todos estos estudios fueron realizados tanto en células como en tejidos, dentro de los cuales se describen los resultados en homogenizados de hígado y corazón (Sies & Cadenas, 1985).

Los ROS, a bajas concentraciones, son considerados a nivel fisiológico, como fundamentales para el cumplimiento de las funciones celulares normales. Sin embargo, se sabe que un alto nivel de ROS pueden desencadenar reacciones en cadena de propagación de radicales libres y el exceso de estas especies pueden actuar sobre moléculas como lípidos, proteínas y ADN transformándolos; estas modificaciones conllevan a desarrollar procesos patológicos y causan mutaciones en el ADN (González *et al.*, 2010; Gulcin, 2020).

La peroxidación lipídica es uno de los daños más comunes que se presenta por causa de los radicales libres. Por lo general, se da cuando estos radicales actúan sobre los ácidos grasos poliinsaturados localizados en las membranas celulares. Se ha visto que estos procesos de oxidación de lípidos pueden ser iniciados por el radical hidroxilo, produciendo radicales lipídicos que se transforman en productos conjugados, por ejemplo, el radical peroxilo por adición de oxígeno. Este radical, a su vez puede atacar a otro ácido graso, en un proceso de reacción en cadena, formando un hidroperóxido lipídico y nuevos radicales libres en una fase continua de propagación. Estos productos derivados de la peroxidación lipídica pueden ser utilizados como marcadores en diversos ensayos de laboratorio ya que se encuentran presentes en muchas enfermedades asociadas a los radicales libres. Además, las especies reactivas pueden generar ciertos productos de la peroxidación lipídica incrementando la permeabilidad de la membrana celular, lo que puede llevar a muerte celular (Sonowal & Ramana, 2019; Sosa *et al.*, 2013).

La oxidación de las proteínas puede producir hidroperóxidos, así como la hidroxilación de grupos aromáticos y de aminoácidos con cadenas alifáticas. Además, se puede dar la conversión de aminoácidos a derivados carbonílicos, provocando la ruptura de las cadenas polipeptídicas. En un medio anaerobio los radicales producen un entrecruzamiento considerable entre las proteínas y, en medios aérobicos, puede generarse una fragmentación muy importante de la cadena polipeptídica. Las modificaciones en las proteínas pueden provocar pérdida de funciones enzimáticas e inclusive inhibición de la degradación de las proteínas, lo que puede llevar a una acumulación de estos productos, pudiendo alterar la estructura de las proteínas y consecuentemente el cambio o la pérdida de la función de la proteína (Bartesaghi & Radi, 2018; Camps *et al.*, 2009; Sosa *et al.*, 2013).

A nivel de los ácidos nucleicos, los daños producidos por los radicales libres, principalmente por el radical hidroxilo, se manifiestan en las estructuras de las bases nitrogenadas y en los carbohidratos del ADN. Estos cambios químicos llevan al rompimiento de las hebras del ADN, lo que puede conllevar a una mutación o a la muerte celular. Uno de los casos más frecuentes de bases modificadas que se presentan en el ADN es la formación del 8-hidroxi-2´deoxiguanosina que se caracteriza por ser una molécula con alto poder mutagénico y que, durante la replicación, produce transversiones de T por C. Por tanto, el exceso de ROS puede alterar la función celular normal y promover el daño irreversible a los ácidos nucleicos (Camps *et al.*, 2009; Carvajal, 2019).

En cuanto al daño que los radicales pueden producir sobre los carbohidratos, se encuentra la reacción del radical hidroxilo directamente con azúcares, como la glucosa o el manitol, produciendo sustancias reactivas que pueden formar más radicales por reacciones en cadena. En el caso particular de los polisacáridos, la reacción con radicales libres puede producir la fragmentación de la molécula en productos más pequeños. Además, en enfermedades como la diabetes, la interacción de la glucosa con ciertas proteínas conlleva a la formación de ciertos

productos de glicosilación, los cuales pueden inactivar enzimas, promoviendo la formación de radicales libres y activando el factor de transcripción NF-κB, que estimula la síntesis de proteínas responsables de la producción de óxido nítrico (Camps *et al.*, 2009; Maritim *et al.*, 2003).

El estrés oxidativo puede presentarse en los tejidos una vez que éstos han sufrido algún daño, ya sea, por trauma, por ejercicio excesivo, por daño provocado por calor o por medio de procesos infecciosos, entre otros factores. Una vez que los tejidos se encuentran dañados pueden producir radicales libres en un corto plazo, esto conlleva al estrés oxidativo, ya sea por activación de enzimas generadoras de radicales como la xantina oxidasa o la lipoxigenasa, por activación de fagocitos o por la interrupción del transporte de electrones en la fosforilación oxidativa, entre otros. También el estrés oxidativo puede presentarse en un tejido sin una relación directa a un proceso agudo como los citados anteriormente, si no como consecuencia de un desequilibrio en el metabolismo celular asociado a una patología crónica, como diabetes, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico u otro tipo de patologías de progresión lenta como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas (Marrocco *et al.*, 2017; Neha *et al.*, 2019; Sonowal & Ramana, 2019).

Tomando en cuenta los daños que genera el estrés oxidativo en las distintas biomoléculas algunas estrategias buscan cuantificar los radicales libres propiamente y otras, ciertas sustancias que se producen de forma directa o indirecta de ese proceso de degradación. En ambos casos, esta cuantificación puede indicar el grado de daño oxidativo que existe en un organismo o célula particular. Por ejemplo, en el laboratorio, se puede determinar la concentración de algunos radicales libres como el anión superóxido o el óxido nítrico cuantificado como nitritos o los productos generados por estos.

Dentro de los productos generados que se cuantifican como indicadores de estrés oxidativo se encuentran el malondialdehído (MDA) o las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), los cuales son productos propios de la lipoperoxidación. Además, se pueden cuantificar moléculas que se producen como producto de la oxidación de los ácidos nucleicos como por ejemplo el 8-OH-deoxiguanosina. Otro marcador común es la cuantificación del carbonilo proteico, producto de la oxidación de las proteínas. Por otro lado, también es posible la cuantificación de actividades o concentraciones de ciertos antioxidantes. Dentro de estas cuantificaciones se pueden mencionar la concentración del glutatión y la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa (Marrocco *et al.*, 2017).

En humanos, el estrés oxidativo está fuertemente relacionado con la inducción y posteriores complicaciones de ciertas enfermedades como la diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. Además, hay información que lleva a considerar que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patología de enfermedades de tipo inflamatorio como la vasculitis, el lupus eritematoso, así como enfermedades isquémicas, enfisema, úlceras gástricas y la hipertensión, entre otras patologías (Lobo *et al.*, 2010; Sonowal & Ramana, 2019).

Además del papel directo de oxidación sobre las biomoléculas es importante la función que tienen los radicales libres en el proceso de inflamación. Se ha observado que los ROS son capaces de inducir la producción de varias citoquinas por medio de la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa-B (NF-kB) y la proteína activadora-1 (AP-1). Una de las citoquinas producidas por medio de la vía NF-kB, inducida por los ROS, es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa). El TNF alfa estimula la fosforilación oxidativa mitocondrial, lo cual lleva a un aumento en la producción de más ROS. Por otro lado, el TNF alfa estimula la producción de citoquinas, incluyendo interleuquina 8 (IL-8) que es una citoquina

proinflamatoria. Esto conlleva a niveles citotóxicos de citoquinas y de ROS que a fin de cuentas dirigen hacia un proceso final de apoptosis (Boots et al., 2008; Sonowal & Ramana, 2019).

Además de las patologías antes mencionadas, se ha llegado a considerar que el envejecimiento es otra condición que puede llevar a desarrollar estrés oxidativo, basado en el hecho de que en la edad adulta se asocia un proceso continuo de producción de radicales libres a nivel mitocondrial y, por ende, a una condición de estrés oxidativo. También durante el envejecimiento se ha detectado una menor actividad proteolítica en comparación con las células jóvenes, así como una disminución de las concentraciones de antioxidantes endógenos. En pruebas realizadas con ratas y ratones, se ha podido demostrar que el envejecimiento es una condición donde las mitocondrias disfuncionales están en aumento y no logran llevar a cabo sus funciones fisiológicas normales, principalmente se ha descrito esta condición a nivel de cerebro, hígado, corazón y riñón. Todas estas mitocondrias disfuncionales presentan una disminución de los parámetros que están directamente relacionados con la fosforilación oxidativa, así como un aumento de todos aquellos productos que provocan oxidación de las biomoléculas mitocondriales y una actividad disminuida de ciertas enzimas (Liguori *et al.*, 2018).

Antioxidantes

En cuanto al tema de los antioxidantes, es necesario poder establecer una definición. Para tal efecto se podría tomar la definición establecida por Ramos (2008), quien indica, "un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas" (Ramos *et al.*, 2008). Otra forma de definir un antioxidante es: aquella molécula capaz de apartar o remover el estrés oxidativo contrarrestando el efecto de los ROS. Los antioxidantes pueden contrarrestar los radicales libres y jugar un papel fundamental en la conservación de las funciones celulares (Neha *et al.*, 2019).

Dentro del grupo de los antioxidantes, según su naturaleza química, podemos considerar dos tipos de sustancias: las de origen enzimático y las que no son enzimas. En el primer grupo se pueden mencionar enzimas como:

- La glutatión peroxidasa (GSH-Px), que cataliza la siguiente reacción

  $2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + 2H_2O$

- La catalasa (CAT), que cataliza la siguiente reacción

  $H_2O_2 \xrightarrow{Catalasa} H_2O + ½\ O_2$

- La superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la siguiente reacción

  $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$

En cuanto al segundo grupo de antioxidantes se pueden citar sustancias como vitaminas C y E, el glutatión y sustancias químicas como los flavonoides, carotenoides, entre otras (Camps *et al.*, 2009; Cianciosi *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2008).

Otra forma de agrupar los antioxidantes es considerando su origen, o sea, si son endógenos o exógenos. Por antioxidantes de tipo endógeno se puede decir que son aquellas moléculas que son producidas directamente en el organismo, mientras que las de naturaleza exógena son aquellas sustancias que forman parte de elementos externos al organismo y que pueden ser consumidas, por ejemplo, a partir de frutas y vegetales (Cianciosi *et al.*, 2019; Wootton-Beard & Ryan, 2011). Dentro de los antioxidantes de tipo endógeno se contemplan diversos grupos, se pueden mencionar proteínas de tipo redox como la tioredoxina; compuestos hormonales como la melatonina y el estradiol. Además, sustancias enzimáticas como

reductasas, peroxidasas y transferasas, entre otras; el glutatión y efectores lipídicos como el ácido lipoico.

Por otro lado, los antioxidantes exógenos incluyen un amplio grupo de sustancias con actividad antioxidante. Primeramente, se puede hablar de los carotenoides. Este grupo se subdivide a su vez en dos partes: los carotenos como el betacaroteno y las xantofilas como la luteína (Gulcin, 2020; Wootton-Beard & Ryan, 2011). También los minerales, como el selenio y el zinc, así como sustancias químicas que contienen sulfuro, como las moléculas organosulfuradas, son clasificadas como antioxidantes exógenos (Wootton-Beard & Ryan, 2011).

Otro grupo importante de sustancias con actividad antioxidante de tipo exógeno, son los estilbenos, esteroides y saponinas, así como las vitaminas liposolubles, A y E, y las hidrosolubles, como el ácido ascórbico. El ácido ascórbico o vitamina C es considerado uno de los antioxidantes naturales más poderoso y menos tóxico que se encuentra en altas concentraciones en los productos alimenticios y plantas (Gulcin, 2020; Wootton-Beard & Ryan, 2011).

Finalmente, el grupo más grande y diverso de antioxidantes a considerar son las moléculas químicas conocidas como polifenoles. Los polifenoles son sustancias que se encuentran mayoritariamente en las plantas y que se caracterizan por tener al menos, un grupo fenol en su estructura. El grupo de los taninos, como los elagitaninos y las proantocianidinas, pertenecen a este grupo, así como los flavonoides ejemplificados por las flavonas, los flavonoles, la quercetina, catequinas, cianidinas y antocianidinas entre otros (Shahidi & Yeo, 2016; Wootton-Beard & Ryan, 2011).

De todos los antioxidantes naturales, los polifenoles, es uno de los grupos más consumidos en la dieta. Estos componentes fenólicos presentes en plantas

actúan como terminadores de reacciones en cadena que generan radicales libres (Gulcin, 2020; Wootton-Beard & Ryan, 2011).

Dentro de los productos naturales que tradicionalmente han sido estudiados por sus concentraciones de polifenoles con alta capacidad antioxidantes son: el té, las uvas, el vino y el cacao. Sin embargo, los estudios se han ampliado hacia otro tipo de alimentos entre los que se encuentran las bayas, las leguminosas, las cebollas, los ajos, las berenjenas, el aceite de oliva, los mangos y la granada real (Shahidi & Yeo, 2016). También, cada vez más estudios publican sobre frutas de menor producción a escala o de fuentes más exóticas o silvestres como lo son las especies del género *Psidium* que se describirán más adelante.

Así como se encuentran antioxidantes naturales, también existen compuestos de naturaleza sintética que cumplen dicha función. Dentro de este grupo de antioxidantes sintéticos se encuentran el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilato (BHT) y la terbutilhidroxiquinona (TBHQ) (Brewer, 2011; Gulcin, 2020; Neha *et al.*, 2019). Estos antioxidantes sintéticos tienen como objetivo el inhibir la oxidación de los componentes de los alimentos, principalmente los ácidos grasos insaturados (Brewer, 2011). Tanto el BHT como el BHA han sido ampliamente utilizados por la industria alimentaria y farmacéutica como antioxidantes. Actualmente su uso se encuentra un poco restringido por sus posibles efectos tóxicos y carcinogénicos. Debido a esta situación es que los antioxidantes de tipo natural han cobrado una mayor relevancia para sustituir a escala industrial a los de naturaleza sintética, principalmente en la producción de alimentos (Gulcin, 2020).

Existe además una tendencia a validar los distintos alimentos no sólo por sus características físicas, que miden la aceptabilidad del consumidor como el sabor, olor y la apariencia física, sino también por la cantidad de antioxidantes que un determinado producto pueda contener, así como la capacidad antioxidante del mismo. Todo esto ha sido explotado como una herramienta de mercado para

promocionar la comercialización de ciertos productos (Brewer, 2011; Wootton-Beard & Ryan, 2011).

Lo que se tiene claro es que, tanto los antioxidantes sintéticos, así como los compuestos fenólicos naturales, tienen la capacidad de eliminar radicales libres, absorber luz ultravioleta, quelar metales y detener el daño autoxidativo que puede afectar negativamente las características de olor y sabor de un producto determinado (Brewer, 2011).

Género Psidium

Psidium es uno de los géneros más difíciles de delimitar dentro de la familia Myrtaceae, la cual contiene aproximadamente 150 géneros y más de 5650 especies. Landrum (2016) indica que el género *Psidium* puede llegar a tener de 60 hasta 100 especies a nivel neotropical y subtropical y que es muy probable que nuevas especies de este género están todavía sin descubrir (Landrum, 2016).

Las especies asociadas al género *Psidium* se han descrito en zonas con condiciones de estrés constante, como por ejemplo ambientes extremos en cuanto a la cantidad de agua disponible y temperaturas (Medina *et al.*, 2011).

De todas las posibles especies del género *Psidium* se considera que sólo 20 de ellas presentan frutos que son comestibles. Dentro de éstas, las más ampliamente cultivadas son el *P. guajava* (Guayaba), el *P. cattleianum* (Guayabita del Perú), *P. guineense* (Guayaba agria)y el *P. friedrichstalianum* (Cas) (Flores *et al.*, 2013).

El fruto de *Psidium guajava*, conocido como guayaba o "guava" en inglés, entre otros nombres, es una de las especies con mayor comercialización para el consumo humano. Además de la buena aceptación del *P. guajava* en la industria alimentaria y su alta riqueza en polifenoles, el fruto es utilizado en la medicina tradicional en países del trópico y subtrópico. Se ha documentado su uso en

Centroamérica y en países como Colombia, México, Panamá, Egipto, Cuba, India, China, Filipinas y Tahití (Flores *et al.*, 2015; Pérez Gutiérrez *et al.*, 2008). Las partes de la planta más comúnmente utilizadas son los frutos, las hojas y la corteza (Vyas *et al.*, 2010).

La utilización de *P. guajava* se ha documentado en problemas gastrointestinales como la gastroenteritis, la diarrea, la disentería, donde se maneja la hipótesis de que su acción es directamente sobre los microorganismos patógenos del intestino (Pérez Gutiérrez *et al.*, 2008). Se utiliza también en el tratamiento de úlceras en la piel por aplicación directa de una cocción de las hojas del *P. guajava*. Las hojas de esta especie también se han utilizado para manejo de dolor de dientes, para esto se mastican las hojas cocidas. La infusión de hojas se ha reportado para el manejo del reumatismo y las convulsiones (Pérez Gutiérrez *et al.*, 2008; Sanda *et al.*, 2011).

P. guajava, es una de las especies más estudiadas y con una gran cantidad de actividades biológicas descritas como actividad hepatoprotectora, antialérgica, antimicrobiana, citotóxica, antiespasmódica, entre otras (Flores *et al.*, 2015; Metwally *et al.*, 2011; Pérez Gutiérrez *et al.*, 2008). Cada actividad puede variar según la parte de la planta que se estudie, se han descrito variaciones entre los extractos de hojas y de frutos, por ejemplo (Boora, 2012; Coser *et al.*, 2012; Flores *et al.*, 2015).

Distintos estudios han encontrado que la guayaba puede ser utilizada como excelente fuente natural de antioxidantes para uso comercial, farmacéutico, alimentario y medicinal. Se ha descrito que principalmente los componentes fenólicos de los extractos de las distintas partes del árbol y el fruto son los responsables de su actividad antioxidante (Chen & Yen, 2007).

El *P. guajava* tiene reportes de actividades biológicas referidas principalmente a sus componentes fenólicos, flavonoides, carotenoides, terpenoides y triterpenos (Flores *et al.*, 2015; Metwally *et al.*, 2011). Adicionalmente, *P. guajava* representa una excelente fuente de vitamina A, complejo B y C, también como fuente de calcio, zinc, fósforo y hierro (Coser *et al.*, 2012). Está documentado que la guayaba contiene hasta cuatro veces más vitamina C que una naranja (Flores *et al.*, 2015; Metwally *et al.*, 2011). Vyas *et al.* (2010) describen que el *P. guajava* contiene, además, aceites esenciales, taninos, saponinas, lectinas, fibra y ácidos grasos (Vyas *et al.*, 2010).

En estudios realizados para determinar los componentes con actividades biológicas en el *P. guajava* se han reportado compuestos del grupo de las antocianinas como la delfinidin-3-O-glucósido y la cianidin-3-O-glucósido. Además, se han identificado hasta diez flavonoides, dentro de los que se encuentran tres agliconas: la miricetina, la quercetina y la isorhamnetina, así como derivados de estas moléculas. Otras moléculas descubiertas son del grupo de las proantocianidinas como la galocatequin-(4α-8)-galocatecol y galocatequin-(4α-8)-catequina, sesquiterpenoides como el ácido abscisico y más de cinco triterpenos como la pinfaensina, el pendunculósido y el ácido asiático (Flores *et al.*, 2015).

Otra especie del género *Psidium* que ha sido estudiada es el fruto de *Psidium cattleianum*, conocida como Guayabita del Perú. Esta es una fruta nativa de Brasil, que no ha sido muy explotada, pero que ha demostrado ser una excelente fuente natural de antioxidantes con gran potencial para ser utilizada en la industria alimenticia y fitofarmacéutica (Ribeiro *et al.*, 2014).

El *P. cattleianum* es muy común en la medicina tradicional brasileña y sus aplicaciones reportadas son muy diversas. Entre sus usos se encuentra tratamiento el manejo del dolor, diarrea, caries dentales, diabetes y como un agente hepatoprotector profiláctico. Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que los

compuestos fenólicos y los carotenoides presentes en los extractos de la planta tienen alto poder secuestrador de ROS y RNS (Ribeiro *et al.*, 2014).

Dentro de las moléculas con actividad biológica que han sido identificadas, en extractos de pulpa y de la cáscara de esta fruta, se encuentran componentes fenólicos como el ácido elágico, ácido elágico deoxihexósido, epicatequina galato. Además, se han encontrado diversos carotenoides como el all-trans-β-caroteno. Entre otros detalles del *P. cattleianum* se ha descrito que posee entre tres y cuatro veces más ácido ascórbico que ciertos cítricos (Ribeiro *et al.*, 2014).

Psidium friedrichsthalianum (O.Berg)

Otras de las especies comestibles del género *Psidium* es el *P. friedrichsthalianum*, conocido como cas, guayaba costarricense, guayaba agria o guayaba ácida.

El *P. friedrichsthalianum* es una planta que pertenece al phylum Tracheophyta, clase Magnoliopsida, orden Myrtales, familia Myrtaceae y género *Psidium*. El fruto de este árbol es descrito como más aromático que la guayaba (*P. guajava*) (Pino *et al.*, 2002). Sus frutos son atractivos por sus características sensoriales tan particulares. Este árbol de aproximadamente 8 metros de altura se encuentra distribuido en Centroamérica y en el norte de Suramérica, en alturas aproximadas de 90 a 1000 metros. Crece naturalmente de la zona sur del México hasta la parte más norte de Suramérica (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017a).

La fruta es utilizada para consumo como fruta fresca, además se utiliza para preparar jugos, jaleas y helados (Flores *et al.*, 2013). Se le han identificado más de 173 compuestos volátiles que se relacionan con el aroma característico de la fruta. Dentro de dichos componentes volátiles los que se encuentran en mayor concentración son el etil butirato, el etil hexanoato, el 3-sulfanilhexil acetato y el δ-dodecalactona. Varios de estos compuestos han sido identificados en otros frutos de

la familia Myrtaceae (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b). Se han logrado determinar la presencia de terpenos y de derivados terpénicos, los principales constituyentes que se encuentran reportados en la literatura son: (E)-β-cariofileno, α-terpineol, α-pineno, α-selinene, entre otros. Se ha propuesto que estos terpenos y derivados terpénicos pueden ser contribuyentes al aroma del fruto (Pino *et al.*, 2002).

Dentro de los principales componentes fenólicos identificados en el *P. friedrichstalianum* se identifican a los siguientes flavan-3-oles: (+)-catequina, la procianidina B1, la procianidina B2, (-)-epicatequina, además, se identificó el ácido elágico. Estos compuestos se caracterizan por su alta efectividad como agentes antioxidantes, lo que se ha atribuido a la presencia de grupos hidroxilo en la posición orto de sus estructuras, favoreciendo así la capacidad de donar hidrogeniones. A las procianidinas se les han identificado la capacidad de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) mientras que al ácido elágico se le asocia con propiedades quimiopreventivas en el cáncer de colon (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b).

Rojas-Garbanzo *et al.* (2019) realizaron una caracterización fitoquímica en el fruto del cas y lograron detectar un total de 112 metabolitos secundarios polares de los cuales 110 fueron identificados. Estos metabolitos identificados pertenecen a las siguientes familias químicas: proantocianidinas, elagitaninos, flavanoles y derivados del ácido cinámico, de quercetina y de ácido quínico, dihidrocalconas, biflavonoides (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2019).

Dentro de la descripción realizada se establecieron porcentajes diferentes de las moléculas según se tratara de la cáscara o propiamente en la pulpa. En ambas partes del fruto, los grupos más representativos fueron las proantocianidinas, en mayor porcentaje, los elagitaninos y los flavanoles. La cáscara del cas mostró no solo un perfil más complejo de metabolitos secundarios polares que la pulpa, sino que se presentó un contenido 29.5% mayor que la pulpa. En la cáscara el mayor porcentaje reportado fueron las proantocianidinas. El porcentaje de elagitaninos fue

mayor en la pulpa que en la cáscara. De los 110 compuestos que fueron debidamente identificados, 44 de ellos fueron encontrados únicamente en la cáscara y dentro de esos compuestos podemos mencionar la presencia de cinco flavolignanos, isómeros de deoxicinchonaína, eucaglobulina, isómeros cis del ácido cafeoilquínico y algunas proantocianidinas. Específicamente, en la cáscara los compuestos reportados en mayor concentración fueron: tres tipos de proantocianidinas tipo B, un isómero geraniino y la epicatequina. En el caso de la pulpa del cas, exclusivamente, se reportó la presencia de tres biflavonoides, y 14 elagitaninos C-glicosídicos. De los compuestos reportados tanto por Cuadrado-Silva *et al.* (2017b) como por Flores *et al.* (2013) únicamente fueron encontrados en las muestras de Rojas-Garbanzo *et al*. (2019) el hexóxido-O-cinamoil, la quercetina, el ácido gálico, el ácido cafeico, catequina, epicatequina y procianidinas tipo B. Rojas-Garbanzo *et al.* explican que las diferencias se basan posiblemente en el método de extracción así como al método analítico utilizado y al estado de maduración de los frutos de cas (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b; Flores *et al*., 2013; Rojas-Garbanzo *et al*., 2019).

Metodologías para evaluar la capacidad antioxidante

Actualmente se conocen varios métodos que permiten evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de un determinado producto, los cuales se basan, por lo general, en la determinación de la capacidad del producto para captar radicales libres del medio donde se encuentren.

Según describe Prior *et al.* (2005) ciertos requerimientos ideales en los métodos para determinar actividades antioxidantes son (Prior *et al*., 2005):

1. Ser simple.
2. Utilizar una metodología que tenga un mecanismo químico y preferiblemente con un punto final definido.
3. Utilizar reactivos químicos e instrumental que estén disponibles.

4. Utilizar mediciones químicas actualizadas con potenciales aplicaciones.
5. Utilizar una fuente de radicales que sea relevante a nivel biológico.
6. Ser reproducible.
7. Que sea adaptable para ensayos tanto con antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos.
8. Usar diferentes fuentes de radicales.
9. Poder adaptarse a análisis rutinarios de alta producción.

Algunos de estos métodos, ampliamente utilizados, para la determinación de la capacidad antioxidante de ciertos alimentos se abordan a continuación:

Actividad barredora de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Esta es una de las técnicas indirectas más antiguas, que se han utilizado para medir la actividad antioxidante y que utiliza uno de los pocos radicales orgánicos estables derivados del nitrógeno, el DPPH. Este radical se caracteriza por tener un color morado muy intenso que cambia a un color amarillo una vez que ha sido reducido. Esta técnica se basa en la reducción del DPPH en solución alcohólica en presencia de una muestra con antioxidantes donadores de hidrógeno y que lleva a la formación de una molécula no radical DPPH-H. Esta capacidad es evaluada por medio de disminución en la absorbancia de la molécula que presenta un máximo a 517 nm. Cuando los radicales DPPH encuentran un sustrato que les puede donar electrones, como por ejemplo un antioxidante de un producto natural, la absorbancia del producto decae (Gulcin, 2020). Para el análisis de datos en esta técnica usualmente se realizan curvas dosis-respuesta y se determina un IC_{50} (concentración capaz de reducir la absorbancia del DPPH al 50%).

Inhibición de la peroxidación lipídica (MDA)

Las especies reactivas tienen la capacidad de oxidar los lípidos polinsaturados y como resultado se obtiene malondialdehído (MDA), el cual es un aldehído reactivo. El MDA puede ser formado a partir de ácidos grasos poliinsaturados. La

concentración del MDA se mide por medio de una reacción de este con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando productos de condensación de color rosado que pueden ser medidos por medio de la absorbancia a 532-535 nm. La reacción no es totalmente específica para lípidos ya que además el TBA puede reaccionar con otros productos como proteínas. Normalmente los valores obtenidos son descritos como cuantificación de sustancias reactivas al TBA (TBARS) (Gulcin, 2020).

Actividad antioxidante en eritrocitos humanos (ERYCA)

Esta técnica se utiliza para determinar la actividad antioxidante de un compuesto o extracto al inhibir la hemólisis de eritrocitos humanos inducida por medio de radicales peroxilo. Las membranas de los eritrocitos son ricos en ácidos grasos poliinsaturados y proteínas, ambas moléculas son susceptibles a oxidación por medio del peroxilo. La consecuente hemólisis desencadenada por el peroxilo afecta la turbidez de la solución. Esta prueba mide la diferencia en turbidez entre los eritrocitos humanos que son lisados y aquellos que permanecen intactos. En presencia de moléculas antioxidantes, por ejemplo, aquellos de muestras de alimentos, estos antioxidantes anulan los radicales peroxilo y se inhibe la hemólisis de los eritrocitos (González *et al.*, 2010). Para el análisis se comparan las áreas bajo la curva de absorbancia de los eritrocitos a lo largo del tiempo.

Actividad barredora de óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico es una molécula altamente reactiva con una vida media de pocos segundos. Tiene la facilidad de difundir a través de las membranas biológicas. Para la determinación *in vitro* de la capacidad barredora de óxido nítrico se utiliza la reacción de Griess, la cual se basa en la utilización de dos productos: naftilenediamina dicloruro y sulfanilamida en ácido fosfórico. En esta reacción el agente nitrosante derivado del NO (N_2O_3) reacciona con ácido sulfanílico para producir un ion diazonio que se acopla al N-(1-naftil) etilendiamina para formar un producto coloreado rojo-rosado, al cual se le mide la absorbancia a 548 nm (Gulcin, 2020).

Determinación de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu)

Esta técnica es ampliamente utilizada y se basa en medir la concentración de polifenoles y asumir que existe una correlación con la capacidad antioxidante de la muestra. Es necesario la eliminación de la interferencia de aquellas moléculas que sean reductores no fenólicos como azúcares reductores y ácido ascórbico. Se utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu que es una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolíbdico. Este reactivo se reduce a tungsteno y molibdeno, que son productos de coloración azul, por medio de la oxidación de los fenoles de las muestras, en medio alcalino (carbonato de sodio). La absorbancia de la coloración azul se mide a 760 nm y se expresa como equivalentes de ácido gálico o catequina por 100 gramos de muestra (de extracto o por litro) (Georgé *et al.*, 2005).

Inhibición de ROS intracelular

Una de las técnicas más utilizadas para medir el estado redox a nivel intracelular es por medio de la utilización de la sonda 2´-7´-diclorodihidrofluoresceina diacetato o DCFH-DA. Una vez que la sonda es incubada con las células e internalizada por las mismas, las esterasas intracelulares cortan la molécula de DCFH-DA en el enlace éster, produciendo una porción polar, impermeable a la membrana y no fluorescente, el H_2DCF. Este derivado desacetilado no puede salir de la célula y así garantiza una evaluación del estado oxidativo interno celular. Posteriormente, se realiza un reto oxidativo con un radical libre (peróxido de hidrógeno, TBHP, etc.) que oxida el H_2DCF para producir un producto altamente fluorescente, DCF. La acumulación de DCF en las células puede medirse por medio de un detector de fluorescencia, ya sea en un lector de placas o en un citómetro de flujo. Este reto oxidativo se puede realizar en presencia de distintos antioxidantes y así evaluar su capacidad de inhibición de ROS a nivel intracelular (Armstrong, 2010).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el impacto del procesamiento de los frutos del cas (*Psidium friedrichsthalianum*) sobre las actividades antioxidantes y citotóxicas en líneas celulares tumorales.

Objetivos específicos

a. Realizar una caracterización físico-química de muestras de las diferentes etapas de producción de un jugo de cas que permitan identificar pérdidas de componentes bioactivos.
b. Determinar la capacidad antioxidante de muestras de las diferentes etapas de producción del jugo de cas para evaluar el impacto del procesamiento sobre las mismas.
c. Evaluar la actividad citotóxica de las muestras de jugo de cas sobre líneas celulares tumorales.

HIPÓTESIS

Cada uno de los procesos a los cuales se someterá el jugo de cas (*Psidium friedrichsthalianum*) puede afectar, parcialmente, las distintas actividades biológicas, tanto antioxidantes como citotóxica, debido a la degradación de compuestos bioactivos o modificaciones de los mismos.

METODOLOGÍA

Recolección y procesamiento de las muestras

Las muestras de cas (*Psidium friedrichsthalianum*) (tres lotes iniciales de 10 kg de cas cada lote), variedad conocida como "criollo", fueron colectadas en la zona del Valle de Orosi, Cartago, Costa Rica, a una altitud de 1077 metros sobre el nivel del mar, en el estado de madurez utilizado normalmente para la cosecha. El procesamiento de la muestra se llevó a cabo en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica. El procesamiento se hizo a escala piloto.

El procesamiento del jugo se inició con el lavado del fruto con agua potable para eliminar tierra y partículas gruesas que pudieran traer del campo de recolección. Luego se desinfectó por medio de inmersión en una solución de cloro a una concentración de 200 ppm durante tres minutos. Seguidamente la muestra se sometió a un proceso de molienda en un molino de martillo con una malla de 0,59 in. Posteriormente se procedió al despulpado con una malla de 0,33 in para eliminar los restos de cáscara y semillas trituradas de la fruta. Aquí se procedió a tomar la muestra número uno que se denominó: **PULPA (PU)**. En este punto del procesamiento se procedió a empacar la muestra de pulpa en bolsas de polietileno de alta densidad (HDPE) y se almacenó a una temperatura de -20 ^{o}C.

La muestra fue descongelada a una temperatura de 5 ^{o}C durante 48 h, luego se le aplicó un tratamiento con el preparado enzimático comercial Pectinex® Ultra Clear, de la compañía Novozymes Latin America, Ltda. Este preparado contiene una enzima llamada poligalacturonasa con una actividad declarada de 7900 PGNU/mL; esta enzima es producida por medio de fermentación por microorganismos como el *Aspergillus niger* y el *Aspergillus aculetus*. El tratamiento enzimático se aplicó a una concentración de 75 ppm, durante una hora, a una temperatura de 35 ^{o}C y luego se

inició el proceso de prensado, utilizando una hidroprensa. En este punto del proceso se obtuvo la muestra número dos denominada: **JUGO PRENSADO (Pr).**

El jugo prensado se sometió a un proceso de microfiltración tangencial. Este es un proceso de separación de suspensiones donde se eliminan partículas en suspensión del jugo. Las particularidades utilizadas para la clarificación del jugo de cas fueron las siguientes: membrana cerámica marca Membralox, área de filtración: 0,22 m^2, tamaño promedio de poro: 0,2 µm, velocidad tangencial de 7m/s, presión transmembranaria de 2,3 ±0,3 bar y una temperatura de 35 ^oC (Sandri *et al.*, 2011; Vaillant *et al.*, 2001). En este punto del procesamiento se obtuvo la muestra número tres del estudio y se denominó: **JUGO CLARIFICADO (Cl)**.

Para evaluar el efecto del proceso de pasteurización, se sometieron las muestras a un calentamiento a una temperatura de 90-95 ^oC y se mantuvo esa temperatura durante 3 minutos. Posteriormente se procedió a un proceso de enfriamiento por medio de un sistema con agua y hielo hasta bajar la temperatura lo más rápido posible. Todo el proceso fue monitoreado utilizando termómetro y cronómetros. El proceso se llevó a cabo de manera piloto con materiales usuales de laboratorio (Hager *et al.*, 2008). Tanto la muestra número dos (jugo prensado, **Pr**) como la muestra número tres (jugo clarificado, **Cl**) se sometieron al proceso antes descrito. De esta forma, se obtuvieron dos muestras más: la muestra número cuatro denominada **JUGO PRENSADO PASTEURIZADO (Prp)** y la muestra número cinco: **JUGO CLARIFICADO PASTEURIZADO (Clp)**. Se realizó una repetición del proceso de pasteurización de cada muestra de jugo: prensado y pasteurizado.

En la figura 1 se muestra el procesamiento del cas anteriormente descrito para la obtención de las muestras utilizadas en el presente estudio.

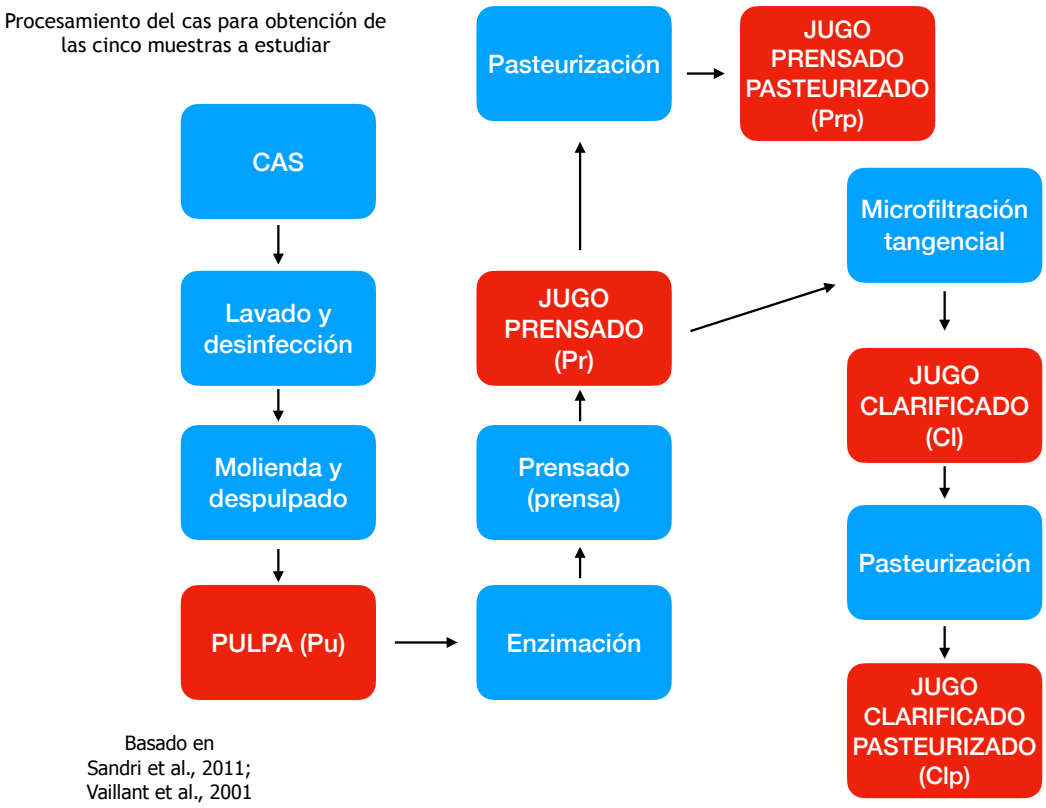

FIGURA 1: Procesamiento del cas para obtención de las cinco muestras a estudiar

Extracción de las muestras

Para la purificación de compuestos bioactivos, debido a que la muestra de pulpa y la de jugo prensado presentaron partículas en suspensión se sometieron a un proceso de extracción con una solución de acetona-agua. (70:30). Para este proceso, se tomaron muestras de 10 mL de cada jugo y se le realizaron tres extracciones con la solución de acetona-agua. Cada muestra se puso en un agitador magnético en velocidad media por 5 min y un tiempo similar en ultrasonido. Después de cada extracción las muestras se filtraron, utilizando un embudo con papel Whatman 4 (20-25 µm) y se tomó la fracción con acetona-agua.

Luego las muestras se colocaron en un rotavapor para evaporar la acetona a una velocidad de 80 rpm, temperatura 37 °C y tiempo 15 min. Cada una de las muestras permanecieron protegidas de la luz. El extracto se filtró con un filtro microporo de 0,45 µm. Cada uno de los extractos se llevó a volumen final de 15 mL con agua destilada, luego de lo cual se procedió a formar alícuotas de 1 mL, las cuales se mantuvieron a una temperatura de -80 °C hasta su respectivo análisis. Una parte de la muestra de jugo prensado fue sometida al proceso de pasteurización.

En el caso de las muestras de jugo clarificado y su respectivo jugo pasteurizado, por no presentar partículas en suspensión, no fue requerida la extracción con acetona-agua y las alícuotas de 1 mL fueron realizadas directamente del jugo.

Determinación de las características físico-químicas

Una vez que se obtuvieron las cinco muestras, a partir del procesamiento del jugo de cas detallado anteriormente, se procedió a enviar las muestras al Laboratorio de Química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) para determinar los parámetros detallados a continuación.

Humedad

El contenido de humedad de los jugos procesados de cas se determinó por medio de los métodos estándar establecidos por la AOAC (*Association of Official Analytical Chemist International*) (Association of Official Analytical Chemist International, 2010). Para esta determinación se pesaron 20 g del jugo de cas en un plato de aluminio pre-pesado. La muestra fue secada en un horno a 70 °C y a 30 kPa durante 24 h (National Appliance Co., Portland, OR, USA). Posteriormente el plato de aluminio se transfirió a un desecador para el enfriamiento. Una vez frío se procedió a pesar el plato para determinar el peso de materia seca y, a partir de ahí, calcular el porcentaje de humedad.

pH

Para la determinación del pH de cada una de las muestras, éstas fueron equilibradas a una temperatura de 25 °C y se procedió a determinar el pH por medio de la inmersión de los electrodos en el líquido. Se siguió el método estándar 981.12, establecido por la AOAC (Association of Official Analytical Chemist International, 1981)

Grados Brix

El contenido de sólidos solubles de las muestras de jugo de cas se determinó utilizando los métodos estándar establecidos por el AOAC (Association of Official Analytical Chemist International, 2010). Para dicha determinación se utilizó un refractómetro de mano marca Abbe (ATAGO, Tokio, Japón) y los datos fueron corregidos según la temperatura y la acidez de la muestra.

Concentración de polifenoles totales

Se determinó la concentración de polifenoles totales por medio del ensayo modificado de Folin-Ciocalteu (Georgé *et al.*, 2005). En este método un volumen de 2,5 mL de cada una de las muestras se mezcló con el reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua (1:10). Cada una de las mezclas fue incubada por dos horas a temperatura ambiente y se le adicionó 2.0 mL de solución de bicarbonato de sodio (75 g/L). Posteriormente la mezcla se colocó por 15 min a 50 °C. Pasado este periodo se procedió a colocar las muestras en un baño de agua-hielo. Después de este proceso se midió la absorbancia a 760 nm. El mismo procedimiento se realizó con concentraciones conocidas de ácido gálico para establecer una curva patrón. Los resultados finales de cada muestra de cas se reportaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de muestra o también como miligramos de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de materia seca. Cada muestra se analizó por triplicado.

Determinación de la actividad antioxidante

Actividad barredora de radical (DPPH)

Para la cuantificación de la capacidad barredora de radical DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo), se realizaron una serie de diluciones de cada muestra de cas en un volumen de 1 mL cada una las cuales fueron luego incubadas junto con 0,5 mL de una solución de DPPH disuelto en metanol (0,25 mM). La incubación se realizó en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 min. Una vez que concluyó la incubación se procedió a medir la absorbancia a 517 nm (Kim *et al.*, 2004). Se preparó un tubo control (sin cas) para determinar el 100% de la absorbancia del DPPH oxidado y un tubo blanco (con cas, pero sin DPPH) para corregir una posible interferencia de color del jugo. El porcentaje de actividad barredora de radical DPPH (%RSA) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

%RSA = (1-(Absorbancia muestra-Absorbancia blanco/Absorbancia control)) * 100

Estos % RSA se grafican contra la concentración de extracto utilizada, se calcula así el $IC_{50,}$ el cual se define como la concentración de extracto (expresada en µg/mL) que produce el 50% de actividad barredora del radical DPPH. Cada muestra de jugo se analizó por triplicado.

Actividad barredora de óxido nítrico (NO)

Una serie de diluciones de cada muestra de jugo de cas (50 µL) se incubaron junto con 50 µL de una solución de nitroprusiato de sodio (SNP) (5 mM) que es un generador de oxido nítrico. La incubación se hizo durante 60 min, en presencia de luz directa utilizando placas de 96 pozos. Luego del periodo de incubación se procedió a agregar 100 µL del reactivo de Griess (1% sulfanilamida y 0,1% naftiletilenediamina dihidroclorhidrato en 2% H_3PO_4) en cada uno de los pozos y se procedió a una segunda incubación de 6 min en oscuridad. Como último paso, se midió la absorbancia en un lector de placas a 540 nm (Cytation 3, Biotek, USA). Cada dilución de las muestras se analizó por triplicado (Balakrishnan *et al.*, 2009).

Las concentraciones de nitritos en las muestras se calcularon interpolando los valores de absorbancia en una curva patrón de soluciones estándar de nitrito de sodio (3-200 µM). La curva patrón se preparó en la misma placa que las muestras. La actividad barredora de NO se calculó como la cantidad de extracto necesaria para reducir un 50% el NO generado por el SNP (IC_{50}).

Inhibición de la peroxidación lipídica (MDA)

Para esta prueba se utilizaron hígados de rata Sprague-Dawley, obtenidas en el Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica (LEBi). El procedimiento fue aprobado por el Comité Institucional para el Uso y Cuido de los Animales (CICUA Nº 036-15) (Ver anexo 1). Los hígados de rata se extrajeron luego de que las ratas fueran anestesiadas con CO_2 y sacrificadas por el método de decapitación. Los hígados fueron homogenizados en 20 mL de solución PBS con un Ultraturax T-25 (Ika-Labortechnik, Alemania). La suspensión se centrifugó a 9000 *x g* durante 15 min a 4 ºC para reducir los sólidos suspendidos. A 0,75 mL del homogenizado de hígado, se le agregaron 75 µL de una serie de diluciones de cada muestra de cas y se incubaron por 30 min a una temperatura de 37 ºC. Posterior a la incubación se indujo el estrés oxidativo con 50 µL de una solución de TBHP (hidroperóxido de tert-butilo, 30 mM) por una hora a 37 ºC.

Posteriormente, se tomó 0,25 mL de cada uno de los tubos que contenían el hígado, el cas y el TBHP y se mezclaron con 0,25 mL de TCA (ácido tricloroacético, 35%) para acidificar el medio y precipitar la proteína. Luego, se neutralizó la reacción con 0,25 mL de buffer Tris-HCL (50 mM, pH 7,4) por 10 min y luego se agregó 0,5 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico) (0,75%) para que se formara un complejo colorimétrico cuantificable MDA:TBA (malondialdehído: ácido tiobarbitúrico). Para favorecer la formación del complejo los tubos se colocaron en un baño a ebullición por 45 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se adicionó 0,5 mL de TCA (ácido tricloroacético) (70%). Las muestras se mezclaron y

se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min. La centrifugación permitió separar en el sobrenadante, un complejo rosado MDA:TBA el cual absorbe a 532 nm, donde la intensidad del complejo rosado es proporcional a la cantidad de productos formados por la peroxidación lipídica. Finalmente, se determinó la concentración de malondialdehído (MDA) utilizando el respectivo coeficiente de extinción molar del MDA ($1,56 \times 10^5\ cm^{-1}M^{-1}$) (Azofeifa et al., 2015)

Actividad antioxidante en eritrocitos humanos (ERYCA)

Para esta prueba se siguió el método descrito por González *et al.* (2010). Los eritrocitos humanos (50 µL) (concentración final en el pozo 0,4%, cerca de $1,8 \pm 0,2 \times 10^7$ células/mL) se colocaron, en una placa de 96 pozos, junto con 100 µL de una serie de diluciones de las muestras de cas y, el agente generador de radicales libres, el AAPH (178 µM) (2,2´-azo-bis-2metil-propanimidamida, Marca Aldrich, CAS 2997-92-4). Posteriormente, la hemólisis de los eritrocitos, que se manifiesta en la disminución de la turbidez de la muestra, se monitoreó en un lector de placas cada cinco minutos durante seis horas con agitación leve por 30 s antes de cada lectura (Cytation 3, Biotek, USA). La absorbancia se midió a 700 nm a una temperatura constante de 37 °C. La curva patrón se realizó con quercetina a distintas concentraciones (2,5 µM-40 µM, Sigma-Aldrich, CAS 117-39-5) como antioxidante inhibidor de hemólisis. El efecto protector de cada jugo de cas se midió mediante el área bajo la curva (AUC) de la muestra y su comparación con el AUC de la quercetina. Los resultados se expresan en milimoles de equivalentes de quercetina por gramo de muestra. La muestra se analizó en tres experimentos independientes y cada una de las muestras se evaluó por triplicado (González *et al.*, 2010).

Inhibición de la generación de ROS intracelular (DCFDA)

En placas de cultivo celular de 48 pozos, se sembraron células de la línea celular Vero (células epiteliales de riñón de mono), en medio mínimo esencial Eagle, con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibióticos. Se cultivaron 4×10^5 células por

pozo en un volumen de 250 µl y se dejaron adherir por cuatro horas. Posteriormente, se agregaron una serie de diluciones de las distintas muestras de jugo de cas (50 µL) y se incubaron por 20 horas, a 37 ^{o}C en un ambiente al 5% de CO_2. Luego, se llevaron a cabo dos lavados con 300 µL de PBS en cada pozo para eliminar el jugo de cas. Como agente oxidante se agregó 300 µL de medio de cultivo con hidroperóxido de terbutilo (TBHP) 50 mM por 2 h, a 37 °C y 5% de CO_2. Treinta min antes de que terminara la incubación con TBHP se adicionó la sonda fluorescente DCFDA (diclorodihidrofluorescein- diacetato) (300 µL de DCFDA, 10 µM) sensible a la presencia de ROS. Al terminar la incubación las células fueron lavadas con PBS, se tripsinizaron y se tiñeron utilizando solución de yoduro de propidio (1 mg/mL, Life Technologies). Las células recolectadas con cada tratamiento se analizaron utilizando citometría de flujo (BD Biosciences, FACSCalibur), se determinó el porcentaje (%) de células DCF^{+}, o sea células fluorescentes, en una muestra de 10.000 eventos y se procedió a determinar el IC_{50} al graficar los porcentajes de células positivas contra las concentraciones del extracto (Azofeifa et al., 2015).

Determinación de la actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales

Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: Vero (línea no tumoral proveniente de riñón de mono), SW620 (células de adenocarcinoma humano de colon) y AGS (células de carcinoma gástrico humano). Las líneas celulares se mantuvieron en medio mínimo esencial Eagle suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, glutamina 2 mmol/L, penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 100 µg/L y anfotericina B 0,25 µg/mL. Además, se mantuvieron en incubadora humidificada a 37 ºC bajo una atmósfera de CO_2 al 5%.

Determinación de la actividad citotóxica

Se preparó una suspensión de células de 1,5 x 10^5 células/mL, en medio mínimo esencial Eagle, con 10 % suero fetal bovino (SFB) y antibióticos. En una

placa de cultivo celular de 96 pozos se sembraron 100 µL de la suspensión de células y se incubaron por un periodo de 24 h, a una temperatura de 37 °C, en un ambiente al 5% de CO_2. Posteriormente, se procedió a retirar 50 µL de medio de cada pozo y se adicionó 50 µL de diferentes diluciones de las muestras de jugo a los pozos, se incubó por 48 h a una temperatura de 37 °C y en un ambiente de 5% de CO_2. Finalmente se realizó la determinación de la citotoxicidad utilizando el método de MTT. Para esto, se eliminó todo el medio de cultivo de cada pozo, se realizaron dos lavados con 100 µL de solución de PBS y se agregó 100 µL de MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio Bromuro) 0,5 mg/mL), luego se incubó por 2 h a 37 °C y 5% de CO_2. Se descartó el sobrenadante y se procedió a disolver los cristales de MTT con 100 µL de etanol al 95% en cada pozo. Por último, se midió la absorbancia a 570 nm. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la absorbancia del control (células incubadas sin extracto) como el 100% y el IC_{50} fue calculado a partir de una curva dosis-respuesta. La muestra se analizó en tres experimentos independientes y en cada uno las diluciones se evaluaron por triplicado.

RESULTADOS

Determinación de las características físico-químicas

Con el fin de conocer cambios en las características fisicoquímicas de los jugos y en el contenido de sus componentes, según la etapa de su procesamiento, se realizaron una serie de pruebas que evaluaron cambios en las siguientes características: humedad, pH, grados Brix y concentración de polifenoles totales.

En el cuadro 1 se presentan los valores que corresponden a los porcentajes de humedad, los valores de pH y los grados Brix para los distintos procesamientos a los cuales se sometió el jugo de cas. Como se puede observar, los jugos (prensado, clarificado y sus respectivos jugos pasteurizados) presentaron un porcentaje mayor de humedad (90,7% $\pm$ 0,64) con respecto a la pulpa (86%), lo cual es congruente con la mayor cantidad de sólidos que contiene la pulpa. Adicionalmente, se determinó el valor de pH de cada procesamiento estudiado. Las muestras mostraron valores con un rango que varía entre 2,66 y 2,69.

Al determinar los grados Brix de cada muestra, las muestras de cas mostraron valores que oscilaron entre los 9,01 grados Brix (jugo clarificado pasteurizado) y 10,58 grados Brix (jugo prensado pasteurizado).

Cuadro 1. Características fisicoquímicas del jugo de cas según su procesamiento.

Muestra	Humedad (g/100 g)	pH	Grados Brix
Pulpa	86,0	2,68	9,51
Jugo prensado	91,5	2,69	9,58
Jugo clarificado	92,0	2,67	9,08
Jugo prensado pasteurizado	89,5	2,67	10,58
Jugo clarificado pasteurizado	89,6	2,66	9,01

Para el análisis del contenido de polifenoles totales, según el procesamiento de la muestra, se realizó el ensayo modificado de Folin-Ciocalteu. Como se puede observar en el cuadro 2, se encontraron diferencias significativas entre todas las muestras analizadas con respecto a la pulpa. La concentración de polifenoles totales es significativamente mayor en la pulpa (69,8 mg GAE/g MS) en comparación con los jugos (36,7 – 43,2 mg GAE/g MS) (p<0.001). Los valores muestran que el procesamiento para la producción de jugos tanto el prensado como el clarificado provocó pérdidas en la concentración de polifenoles totales de 47% y 38%, respectivamente, en comparación con la pulpa. El mayor impacto en la pérdida de los polifenoles totales fue evidenciado en los jugos prensados, tanto para el jugo sin pasteurizar como pasteurizado.

Cuadro 2. Concentración de polifenoles totales del jugo de cas según el procesamiento.

Muestra	[Polifenoles totales] (mg GAE / g jugo) (Base húmeda)	Error Estándar	[Polifenoles totales] (mg GAE / g MS) (Base seca)	Error Estándar
Pulpa	9,8[a]	23,8	69,8 [a]	1,7
Jugo prensado	3,1[b]	4,2	36,6 [b]	0,5
Jugo clarificado	3,4[b]	3,2	42,3 [c]	0,4
Jugo prensado pasteurizado	4,2[c]	5,2	39,6 [b]	0,5
Jugo clarificado pasteurizado	4,5[c]	2,0	43,2 [c]	0,2

GAE: equivalentes de ácido gálico. MS: masa seca. Valor de p<0,001 prueba de ANOVA, diferentes letras representan diferencias significativas entre los promedios. Cada concentración es expresada como promedio de dos repeticiones.

Determinación de la actividad antioxidante

Con el objetivo de determinar el impacto que tienen las diferentes etapas o procesos aplicados al procesamiento del jugo de cas en su capacidad antioxidante, se realizaron los análisis de la actividad barredora de radicales (DPPH), la actividad barredora de óxido nítrico, la determinación de la capacidad inhibitoria de la peroxidación lípidica (MDA) en homogenizados de hígado de rata y en eritrocitos humanos (ERYCA) y la inhibición de ROS intracelulares. En adelante, se exponen los resultados obtenidos para cada uno de los análisis y las diferencias encontradas en las muestras de cas según el tipo de procesamiento aplicado.

Actividad barredora de radical DPPH

Para la determinación de la actividad barredora del radical DPPH se evaluaron concentraciones entre 19 µg y 180 µg MS/mL para obtener las curvas dosis-respuesta. Como se observa en el cuadro 3, la pulpa presentó la mejor capacidad barredora del radical DPPH (IC_{50} =59,1 µg MS/mL) y esta actividad es significativamente mejor con respecto al resto de los jugos ($p<0,001$). Adicionalmente, se puede observar que tanto la muestra de jugo prensado como la muestra de jugo clarificado presentaron menor capacidad barredora de radical DPPH y sus valores de IC_{50} evidencian pérdidas de la actividad antioxidante de un 37 y 34% respectivamente comparado con la pulpa. Esta pérdida de actividad antioxidante es aún mayor al pasteurizar los jugos con disminuciones de 51% y 56% en los jugos prensado pasteurizado y clarificado pasteurizado, respectivamente.

Cuadro 3. Actividad antioxidante determinada por la capacidad barredora del radical DPPH en muestras de cas con distinto procesamiento.

Muestra	IC_{50} (µg/mL) (Base húmeda)	Error Estándar	IC_{50} (µg /mL) (Base seca)	Error Estándar
Pulpa	422[a]	5	59,10[a]	0,81
Jugo prensado	949[b]	28	80,73[b]	2,39
Jugo clarificado	991[b]	18	79,33[b]	1,44
Jugo prensado pasteurizado	854[c]	27	89,66[c]	2,85
Jugo clarificado pasteurizado	889[c]	18	92,50[c]	1,89

Valor de $p<0,001$ prueba de ANOVA, diferentes letras representan diferencias significativas entre los promedios. Cada concentración es expresada como promedio de tres repeticiones.

Actividad barredora de óxido nítrico (NO)

En el cuadro 4 se pueden observar reflejados los datos correspondientes a la prueba realizada para determinar la capacidad barredora de óxido nítrico de cada una de las muestras de cas según su procesamiento.

En este caso se puede ver que no hay diferencias significativas en la capacidad barredora de óxido nítrico de la pulpa con respecto las muestras de jugo prensado y el jugo clarificado. Sin embargo, las muestras pasteurizadas presentaron reducciones significativas entre un 18% (Clp) y un 23% (Prp) de la capacidad barredora de óxido nítrico con respecto a sus respectivos jugos sin pasteurizar.

Cuadro 4. Actividad barredora de óxido nítrico determinada en muestras de cas con distinto procesamiento.

Muestra	IC_{50} (µL g MS/mL)	Error Estándar
Pulpa	577 [a,c]	27
Jugo prensado	530 [a]	13
Jugo clarificado	533 [a]	13
Jugo prensado pasteurizado	653 [b]	24
Jugo clarificado pasteurizado	631 [b,c]	29

p<0,005 prueba de ANOVA, letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones.

Inhibición de la peroxidación lipídica (MDA)

En el Cuadro 5 se presenta la concentración de las distintas muestras de cas que inhibe al 50% las concentraciones de MDA presentes en homogenizados de hígados de rata sometidos a un reto oxidativo con TBHP. Descriptivamente, se observó una reducción en la inhibición de la producción de MDA conforme aumentó el procesamiento de la muestra. Los hígados sometidos al tratamiento de pulpa de cas presentaron el menor IC_{50} (9,44 µg MS/mL) y las muestras de hígado tratadas con los jugos prensados, clarificados y sus respectivos jugos pasteurizados presentaron una reducción entre 16 y 33% en el efecto inhibidor de la peroxidación lipídica. Sin embargo, a pesar de que se observa una reducción en la actividad inhibitoria de peroxidación lipídica, las diferencias no tuvieron significancia estadística (*p*=0,134).

Cuadro 5. Inhibición de la peroxidación lipídica en homogenizados de hígado de ratas *Sprague-Dawley* tratados con muestras de cas.

Muestra	IC_{50} (µg MS/mL)	Error Estándar
Pulpa	9,44[a]	0,64
Jugo prensado	11,68[a]	0,72
Jugo clarificado	10,98[a]	0,69
Jugo prensado pasteurizado	11,55[a]	1,16
Jugo clarificado pasteurizado	12,56[a]	0,88

$p>0,005$ prueba de ANOVA, letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los promedios. Cada valor es el promedio de 10 repeticiones.

Actividad antioxidante en eritrocitos humanos (ERYCA)

En el cuadro 6 se puede observar el resultado de la determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica utilizando una suspensión de eritrocitos humanos. La muestra correspondiente a la pulpa de cas fue la que presentó una mejor actividad protectora (0,77 mmoles Q/ g extracto). Este resultado presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros cuatro jugos de cas que se evaluaron, los cuales presentaron pérdidas en la capacidad de inhibición de la peroxidación entre un 42 y un 62%. El jugo de cas prensado, clarificado y sus correspondientes muestras pasteurizadas no presentaron diferencias significativas entre ellos.

En la figura 2 se observa que la muestra de pulpa (Cn=93,3 µg/mL) es la que más se aproxima a la curva que representa a la quercetina (40 µM) que es el control con mayor actividad de inhibición de peroxidación lipídica. La absorbancia de las muestras de los distintos jugos va disminuyendo debido a la hemólisis de los eritrocitos producida por el AAPH que causa la peroxidación lipídica.

Cuadro 6. Inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos utilizando distintas muestras de cas.

Muestra	mmoles Q/ g jugo	Error Estándar
Pulpa de cas	0,77[a]	0,08
Jugo de cas prensado	0,44[b]	0,08
Jugo de cas clarificado	0,32[b]	0,04
Jugo de cas prensado pasteurizado	0,37[b]	0,04
Jugo de cas clarificado pasteurizado	0,29[b]	0,02

Q: quercetina. $p<0,001$ prueba de ANOVA, diferentes letras representan diferencias significativas entre los promedios. Cada valor es el promedio de 4 repeticiones

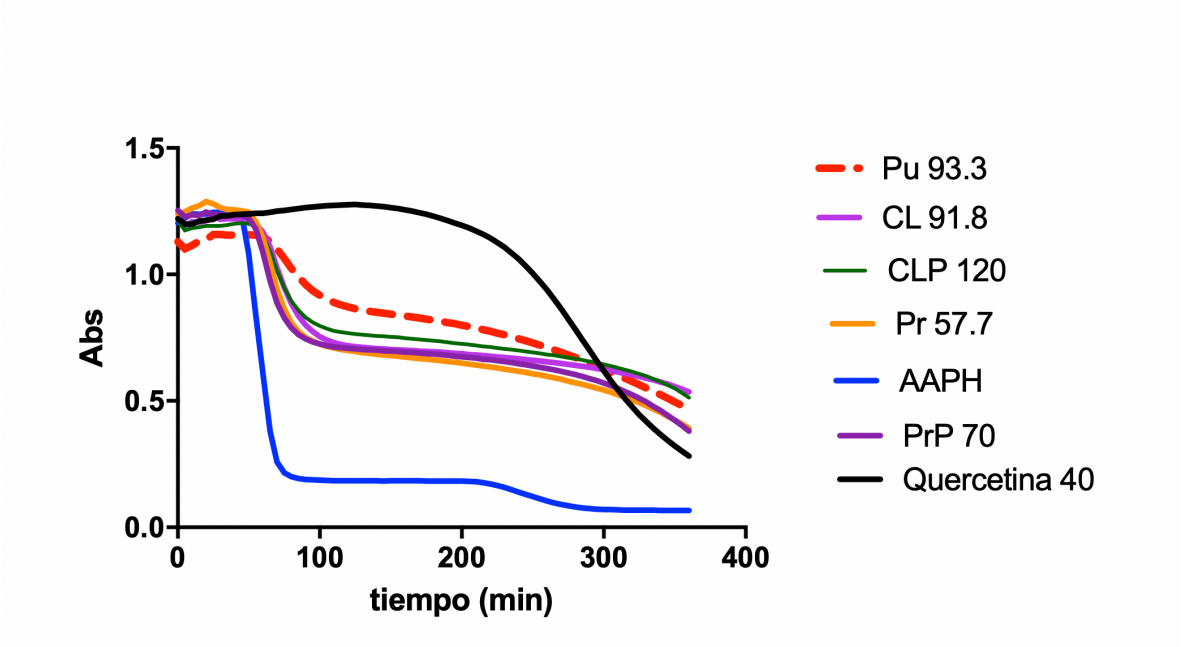

Figura 2. Evaluación de la inhibición de la peroxidación lipídica en eritrocitos humanos utilizando distintas muestras de cas.
(Pu: pulpa, Cl: clarificado, Clp: clarificado pasteurizado, Pr: prensado, Prp: prensado pasteurizado) (Concentración de jugos de cas: µg/mL)

(Los valores representados corresponden a la mejor concentración de cada jugo de cas procesado)

Inhibición de generación de ROS intracelular

En el Cuadro 7 se presentan las concentraciones de las distintas muestras de cas que reducen a un 50% la cantidad de células con presencia de ROS intracelulares, posterior a un reto oxidativo de TBHP.

Descriptivamente, se observó que la pulpa presentó el menor valor de IC_{50} (733 µg MS/mL) y por lo tanto la mejor actividad inhibitoria de la producción de ROS intracelulares. Las muestras de jugo prensado, clarificado y sus respectivos jugos pasteurizados perdieron su capacidad de inhibir la producción de ROS entre un 2% y un 18% con respecto al valor de la pulpa, aunque las reducciones no son diferentes significativamente.

Cuadro 7. Inhibición de ROS intracelulares utilizando distintas muestras de jugo de cas.

Muestra	IC_{50} (µg MS/mL)	Error Estándar
Pulpa	716[a]	65
Jugo prensado	770[a]	63
Jugo clarificado	816[a]	32
Jugo prensado pasteurizado	727[a]	90
Jugo clarificado pasteurizado	>850[a]	--

MS: masa seca. $p<0,05$ prueba de ANOVA, letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones.

Determinación de la actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales

En el cuadro 8 se presentan los datos de la actividad citotóxica de las distintas muestras de cas sobre líneas celulares tumorales: AGS (adenocarcinoma gástrico humano) y SW620 (adenocarcinoma colorectal humano), y se utilizó las Vero (células epiteliales de riñón de mono) como control no tumoral.

Cuando se analizan los resultados de la prueba de citotoxicidad se puede observar que las distintas muestras de cas no presentaron actividad citotóxica en las líneas celulares Vero ni AGS. En el caso de las células SW620 se muestran valores de citotoxicidad, donde las muestras de pulpa, jugo prensado y jugo clarificado no presentaron diferencias significativas entre ellas, mientras que, en el caso de las muestras de jugo prensado pasteurizado y jugo clarificado pasteurizado, la actividad citotóxica disminuyó significativamente, con respecto a la pulpa, presentando una pérdida de actividad de un 62% y un 69% respectivamente.

Cuadro 8. Actividad citotóxica del jugo de cas sobre las líneas celulares tumorales Vero (células epiteliales de riñón de mono),
(SW620 (adenocarcinoma colorectal) y AGS (adenocarcinoma gástrico).

	IC_{50} (µg MS/mL)		
Muestra	SW620	AGS	Vero
Pulpa	309 ± 22[a]	> 1000	> 1000
Jugo prensado	366 ± 46[a]	> 1000	> 1000
Jugo clarificado	323 ± 21[a]	> 1000	> 1000
Jugo prensado pasteurizado	501 ± 10[b]	> 1000	> 1000
Jugo clarificado pasteurizado	524 ± 12[b]	> 1000	> 1000

MS: masa seca. $p<0,05$ prueba de ANOVA, letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones.

DISCUSIÓN

La familia Myrtaceae incluye más de 140 géneros y dentro de esos géneros el *Psidium* es ampliamente estudiado al producir frutos comestibles. El género *Psidium* contiene más de 150 especies dentro de las que podemos mencionar el *P. friedrichsthalianum* (Mitra *et al.*, 2012).

Debido a su amplia diversidad, las distintas especies del género *Psidium* son estudiadas tanto por sus diversas características morfológicas como físicoquímicas, su composición química y sus actividades antioxidantes, entre otras (Sharma *et al.,* 2010). El estudio de la composición química y las actividades de dichos compuestos bioactivos se ha asociado con el retraso o prevención de enfermedades degenerativas así como en el incremento de la expectativa de vida (Ashraf *et al.*, 2016).

Dentro de las ventajas de realizar este estudio con el *Psidium friedrichsthalianum* se encuentran el poder analizar características fisicoquímicas y actividades biológicas de un fruto comestible consumido ampliamente en la región, pero que ha sido poco estudiado. En este contexto el presente estudio puede hacer una importante contribución al conocimiento científico.

Características físico-químicas

La cantidad de sólidos solubles medidos en grados Brix, la acidez y las concentraciones de ácido ascórbico son considerados factores importantes a analizar para determinar la calidad de los distintos frutos. Además, se consideran elementos que pueden variar debido no solo a condiciones ambientales sino también a prácticas industriales y a prácticas culturales de manipulación y consumo de los frutos (Sharma *et al.*, 2010).

El rango de valor de pH de las muestras de cas del presente estudio (Cuadro 1) es comparable con el dato publicado por Cuadrado-Silva *et al*. en el año 2017a que utilizó fruta entera de cas (pH= 2,67 ± 0,08) y con la publicación de Montoya-Arroyo *et al.* (2020) quienes reportaron un valor de pH de 2,84 ± 0,01 para muestras de pulpa de cas (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017a; Montoya-Arroyo *et al.*, 2020).

Valorando los resultados del pH de la pulpa y los distintos jugos de cas (pH= 2,66-2,69) (Cuadro 1) y comparándolos con los valores de pH de jugos de *Psidium guajava* (pH= 3,81 +/- 0,13) podemos observar que los jugos de cas se encuentran entre los más ácidos de los frutos del género *Psidium* (Ordóñez-Santos & Vázquez-Riascos, 2010). Adicionalmente, el presente estudio, muestra que el pH de las distintas muestras evaluadas de cas no presentó cambios significativos relacionados con los procesamientos a los que fueron sometidas.

Marquina y colaboradores (2008) estudiaron varios preparados de *P. guajava* a base de fruta fresca, piel, pulpa procesada y mermelada y describieron valores de pH que variaron entre 3,8 y 4,1 mostrando, al igual que en el presente estudio, que no existen diferencias significativas en el pH entre en el procesamiento industrial de los frutos de guayaba (Marquina et al., 2008). En otro caso expuesto por Ordoñez-Santos & Vázquez-Riascos (2010) se valoró el efecto del procesamiento sobre el valor de pH, la pulpa de guayaba presentó un valor de pH de 3,72 ± 0,03 y el jugo de guayaba mostró un pH de 3,81 ± 0,13.

Medina y colaboradores (2011) estudiaron 6 genotipos diferentes de *Psidium cattleianum* y describieron valores de pH entre 3,1 y 3,7 (Medina *et al.*, 2011). Lo anterior nuevamente reafirma que la pulpa de cas presenta los pH más ácidos del género *Psidium.*

En cuanto a la concentración de sólidos solubles (grados Brix), Cuadrado-Silva y colaboradores (2017a) estudiaron muestras de pulpa del cas y obtuvieron valores de 9,6 ± 0,3 °Brix en la muestra. Montoya-Arroyo y colaboradores (2020) reportaron valores de 10,490 +/- 0,004 °Brix en muestras de pulpa de cas. Ambos valores similares a los reportados en este estudio (9,01-10,58 °Brix) (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017a; Montoya-Arroyo *et al.*, 2020).

Por el contrario, las muestras del presente estudio presentaron una mayor cantidad de sólidos solubles al compararse con los resultados de guayaba de Ordoñez-Santos & Vázquez-Riascos (8,84° ± 0,64 °Brix) (Ordóñez-Santos & Vázquez-Riascos, 2010). Los valores de grados Brix reportados en la literatura para el *Psidium cattleianum* fueron un poco más variables (6,0-11,8 °Brix) debido, probablemente, a que los estudios representan varios genotipos diferentes del mismo fruto y al hecho de que algunas especies de género *Psidium* presentan gran adaptabilidad a condiciones de estrés como condiciones extremas de humedad y temperatura, que pueden producir algunos cambios en los distintos frutos (Medina *et al.*, 2011).

La humedad de una muestra de pulpa de *P. friedrichsthalianum* fue evaluada por Montoya-Arroyo y colaboradores (2020) mostrando un valor de 89 %, este porcentaje es similar con el valor de humedad reportado en esta investigación para la pulpa (86%) (Cuadro 2) (Montoya-Arroyo *et al.*, 2020). En el caso del *P. guajava*, la humedad de muestras de fruto y pulpa también ha sido analizada mostrando resultados de humedad que variaron entre los 84,0 % y 86,08 %, lo cual sugiere un contenido de agua similar a la pulpa del cas (Marquina *et al.*, 2008).

En cuanto a la concentración de polifenoles totales del cas, se reportó en este estudio un valor de 977 mg GAE/100 gramos de pulpa de cas (base húmeda) y un valor más reducido para aquellas muestras sometidas a diferentes operaciones unitarias para su procesamiento a escala piloto (311-450 mg GAE/100 gramos de

jugo (base húmeda)) (Cuadro 2). Cuadrado-Silva *et al.* (2017a) reportaron valores de concentración de polifenoles totales menores (26 - 138 mg GAE/100 gramos de fruta) para distintas fracciones extraídas de *P. friedrichsthalianum*, sin embargo estos valores corresponden a fracciones de polifenoles del cas y no a una pulpa como la utilizada en el presente estudio. (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b)

Otros estudios previos han reportado concentraciones de polifenoles totales para pulpas de otros frutos del género *Psidium*. En el caso de *P. guajava*, los reportes en pulpa indican 860 mg de equivalentes de ácido gálico/100 gramos de pulpa de guayaba (Marquina *et al.*, 2008). En el caso de *P. cattleianum*, los valores obtenidos van de 402 a 768 mg de equivalentes de ácido gálico/100 gramos de pulpa fresca (Medina *et al.*, 2011). También se han estudiado subtipos de *P. cattleianum*, donde los resultados han mostrado que las variedades de frutos rojos tienen concentraciones de polifenoles totales de 501 mg de equivalentes de ácido gálico/100 gramos de pulpa fresca siendo más abundantes que las variedades amarillas donde los valores son de 292 mg de equivalentes de ácido gálico/100 gramos de pulpa fresca (Dos Santos Pereira *et al.*, 2018; Medina *et al.*, 2011). Todos estos reportes citados anteriormente para distintas especies de *Psidium* muestran concentraciones menores de polifenoles totales en comparación con la pulpa de *P. friedrichsthalianum* utilizada en el presente estudio, reafirmando así el potencial de esta fruta poco estudiada.

La reducción en el contenido de polifenoles totales de las distintas muestras de cas, con respecto a la pulpa, puede deberse a que los polifenoles están ligados a los componentes de la pulpa, por lo que habría pérdidas de los mismos luego del proceso de prensado o del proceso de clarificación, puesto que se elimina la parte fibrosa del fruto.

Aunque en el presente estudio no se caracterizaron polifenoles de las muestras de cas, análisis previos han identificado compuestos fenólicos presentes

en el fruto del *P. friedrichsthalianum* (Cuadrado-Silva *et al*., 2017b; Flores *et al*., 2013; Rojas-Garbanzo *et al*., 2019). Inicialmente, en el 2013 se reporta la presencia de ciertos compuestos fenólicos como flavonoides y derivados del ácido elágico, a los cuales se les pueden atribuir las propiedades antioxidantes del cas (Flores *et al*., 2013).

Posteriormente, Cuadrado-Silva *et al.* (2017b) presentan una identificación más clara de los componentes del cas, así como una cuantificación de los compuestos fenólicos. Dentro de los compuestos fueron identificados el ácido benzoico y derivados (ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatechico, ácido vanílico, ácido ftálico, ácido gálico, ácido 3-O-metilgálico, ácido siríngico), ácido fenilacético (ácido 3,4-Dihidroxifenilacético, ácido 4-hidroximandélico), ácido fenilpropanoico y derivados (ácido cafeico, ácido isoferúlico, ácido ferúlico), flavan-3-oles ((+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina A2, procianidina B1, procianidina B2) y otras moléculas tipo fenoles y lactonas (α-valerolactona, pirogalol, ácido elágico) (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b).

En el mismo estudio se describen los compuestos que se presentaron en mayor concentración, éstos fueron: (+)-catequina, procianidina B1, procianidina B2, (-)-epicatequina y el ácido elágico. Solamente, este último, había sido descrito con anterioridad en el estudio de Flores *et al.* (2013). De estas moléculas, descritas en mayor concentración, se asocian con el valor más alto de actividad antioxidante la procianidina B1, procianidina B2 y el ácido elágico (Cuadrado-Silva *et al*., 2017b; Flores *et al.*, 2013).

En el 2019, Rojas-Garbanzo *et al*. realizaron una caracterización de los metabolitos secundarios polares del cas y detectaron 112 moléculas de las cuales 110 fueron adecuadamente identificadas. De las moléculas descritas anteriormente (Cuadrado-Silva *et al*., 2017b; Flores *et al*., 2013) solamente fueron encontrados en el estudio de Rojas-Garbanzo el cinamoil-O-hexósido, la quercetina, el ácido gálico,

el ácido cafeico, algunos derivados de flavanoles (catequina, epicatequina, dos tipos de procianidinas tipo B).

En la descripción de los constituyentes del cas que se llevó a cabo en el año 2019 se describieron moléculas pertenecientes a los siguientes grupos: ácido gálico y sus derivados, derivados del ácido cinámico, derivados del ácido elágico incluyendo elagitaninos, flavanonas, flavonoles, flavanoles monoméricos, proantocianidinas, flavanolignanos, dihidrocalconas, acetofenona y benzofenona, biflavonoides y terpenoides. Ochenta y tres metabolitos polares secundarios se detectaron por primera vez en la cáscara y cincuenta y nueve en la pulpa. Las proantocianidinas fueron el grupo que se documentó en mayor concentración tanto en la cáscara (52,2%) como en la pulpa (35,8%). Los elagitaninos C-glicósidos fueron el segundo grupo (cáscara: 19,3%, pulpa: 34,5%) (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2019). Muchos de estos compuestos han sido asociados con actividades antioxidantes en distintos frutos (Wootton-Beard & Ryan, 2011).

Actividad antioxidante

Se ha visto que la actividad antioxidante de un jugo, fruta u hoja de una especie en particular se correlaciona con la presencia de los diversos compuestos bioactivos. Los ensayos antioxidantes *in vitro* son usados para tratar de recrear las diversas reacciones de óxido-reducción que ocurren en los distintos sistemas biológicos. Por lo general, un único procedimiento no funciona para tratar de aclarar todos los posibles mecanismos antioxidantes presentes en una muestra que se estudie (Ashraf *et al.*, 2016). Por esta razón se presentan en la literatura gran variedad de pruebas antioxidantes y cada una utiliza un mecanismo diferente, lo que provoca que la comparación entre resultados de pruebas distintas se haga con algunas reservas.

En este estudio, la actividad antioxidante *in vitro* del cas fue evaluada en pruebas como la determinación de actividad barredora del DPPH y del óxido nítrico

(Cuadro 3 y Cuadro 4). En el caso del DPPH, fue la pulpa (IC_{50}: 59,10 µg MS/mL) la muestra que presentó una actividad antioxidante significativamente mejor en comparación con los jugos procesados, el prensado (IC_{50}: 80,73 µg MS/mL) y el clarificado (IC_{50}: 79,33 µg MS/mL) (Cuadro 3). Al analizar la correlación entre la concentración de polifenoles totales (Cuadro 2) y la actividad barredora de radical DPPH para cada uno de los jugos (Cuadro 3) se nos muestra una correlación significativa donde la pérdida en la actividad antioxidante observada entre la pulpa y los jugos prensado y clarificado, así como con sus jugos pasteurizados, se podrá deber a la pérdida de polifenoles totales que se da durante el procesamiento (R^2=0,979) (ver Anexo 2).

En el caso de la evaluación de la actividad barredora del óxido nítrico tanto la muestra de pulpa (IC_{50}: 577 µg MS/mL) como los jugos procesados, el prensado (IC_{50}: 530 µg MS/mL) y el clarificado (IC_{50}: 533 µg MS/mL), no presentaron diferencias significativas entre ellos, ni correlación con las concentraciones de polifenoles (R^2=0.013).

No existen valores publicados sobre la actividad barredora de DPPH o el óxido nítrico para la especie *P. friedrichsthalianum*. Otro tipo de ensayos *in vitro*, se han publicado para *P. friedrichsthalianum* por ejemplo el estudio reportado por Cuadrado Silva *et al.* (2017b) evaluó la actividad antioxidante por medio de método ABTS en diversas fracciones de extracción. El extracto preparado con acetato de etilo obtuvo la mayor actividad antioxidante con un valor máximo de actividad antioxidante de 10,99 ± 1,09 mM de equivalentes de Trolox/kg de fruta. En ese mismo estudio se atribuye dicha actividad antioxidante a los principales componentes fenólicos identificados en dicha fracción de manera mayoritaria: (+)-catequina, procianidina B1, procianidina B2, (-)-epicatequina y ácido elágico (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b).

En otro estudio se evaluó la actividad antioxidante de varias especies de frutas tropicales por medio de la técnica ORAC y se reportó un valor de 456 µM

equivalentes de quercetina/100 g fruta fresca para *P. friedrichsthalianum,* valor que corresponde a una actividad superior a la de otras frutas citadas en el mismo artículo, como el melón, mango y piña (62-146 µM equivalentes de quercetina/100 g fruta fresca), pero menor a frutos como la mora y los arándanos, 1865-2043 µM de equivalentes de quercetina/100 g fruta fresca (González *et al.*, 2012).

La actividad barredora del DPPH ha sido evaluada para otras especies del género *Psidium,* presentando gran variación en los valores al comparar las publicaciones. Reportes de DPPH para *P. guajava* , comparan frutos brasileños en distintos estados de madurez y reportan IC_{50} de 849-859 µg MS/mL (Araújo *et al.*, 2015), en el análisis de 7 cultivares en Florida los valores de IC_{50} oscilaron en un rango de 150 – 450 µg MS/ml (Flores *et al.*, 2015). Los valores anteriores corresponden a una actividad 3-10 veces menor que los IC_{50} obtenidos en el presente estudio (59,1-92,5 µg MS/mL). En el caso de la especie *P. cattleianum* la capacidad antioxidante determinada por DPPH fue evaluada para diferentes genotipos del fruto (variedad roja y amarilla). Utilizando extractos de 100 mg de fruta fresca/mL, los valores de actividad barredora de DPPH variaron entre 19,7% y 45,3%. Se cree que dichos valores se deben a los altos niveles de (-) epicatequina y ácido gálico descritos para este fruto (Medina *et al.*, 2011). En el caso del presente estudio con *P. friedrichsthalianum* la actividad antioxidante determinada con DPPH presentó valores mucho mejores porque una inhibición del 50% del DPPH fue obtenida utilizando concentraciones de extracto entre 0,422 – 0,991 mg en base húmeda/mL (datos del Cuadro 3 convertidos a otras unidades para efectos de comparación).

En cuanto a los ensayos que se realizaron para determinar la inhibición de la peroxidación lipídica, utilizando las muestras de cas, se llevaron a cabo pruebas en dos tipos de modelos: en homogenizados de hígados de ratas y en eritrocitos humanos.

En el modelo que utiliza los homogenizados de hígado de rata se utiliza el TBHP como inductor de estrés oxidativo en los hepatocitos y se mide la concentración del MDA producido en la muestra. En cuanto al *P. friedrichsthalianum* los valores de IC_{50} muestran un mejor efecto inhibidor en la pulpa cuando se compara con los otros jugos. Aunque se presenta una reducción de la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas, pero a pesar de esto, sí existe una correlación entre la disminución de la concentración de los polifenoles totales (Cuadro 2) y la inhibición de la peroxidación lipídica (Cuadro 5) estudiada en cada uno de los jugos (R^2=0,803) (ver cuadro de correlaciones en el anexo 2).

Esta prueba inhibitoria de peroxidación lipídica en homogenizados de rata no ha sido aplicada a otras especies del género *Psidium*. Sin embargo, en otros frutos tropicales en los que se ha utilizado la prueba, se reportan valores de 52,8 ± 3,7 µg/mL para el güiscoyol (*Bactris guineensis)* y 49,4 ±2,7 µg/mL para jugos de mora (*Rubus adenotrichos*) (Azofeifa *et al.*, 2015; M. Quesada *et al.*, 2020). En el caso del cas, las muestras presentaron valores de IC_{50} mejores que los frutos anteriormente citados, para la pulpa (9,44 µg MS/mL), el jugo prensado (11,68 µg MS/mL) y el jugo clarificado (10,98 µg MS/mL) (Cuadro 5).

El segundo modelo estudiado para determinar la posible inhibición de la peroxidación lipídica, utilizando eritrocitos humanos, es aquel donde estos son tratados con la sustancia AAPH, generadora de radicales libres tipo peroxilo, para desencadenar la peroxidación lipídica y la consecuente hemólisis. Esta hemólisis se cuantifica evaluando cambios en la turbidez de la muestra. La idea es medir el efecto protector que tienen los distintos jugos de cas. La pulpa de cas presentó un valor de 0,77 mmoles Q/g pulpa. Los jugos procesados presentaron diferencias significativas con respecto a la pulpa con valores entre los 0,44 mmoles Q/g extracto (jugo prensado) y 0,29 mmoles Q/g jugo (jugo clarificado pasteurizado) (Cuadro 6). Estas diferencias significativas observadas se pueden explicar por la disminución en la

concentración de polifenoles totales (Cuadro 2) de las distintas muestras, como se respalda al calcular la correlación entre ambos valores (R^2=0,825) (ver cuadro de correlaciones en el anexo 2). En un estudio previo para P. *friedrichsthalianum* se reportaron valores de 0,174 mmol Q/g materia seca (González *et al.*, 2012).

Otras frutas que han sido estudiadas con el mismo modelo de peroxidación lipídica en eritrocitos humanos son los extractos de polifenoles de *Bactris guineensis* (güiscoyol) y distintos jugos de mora (*Rubus adenotrichos*). En estos extractos ambas frutas presentaron mejores actividades inhibitorias de la peroxidación lipídica con valores de 3,65 ± 0,15 mmoles Q/ g extracto para la mora y de 1,56 ± 0,03 mmoles Q/ g extracto para el guiscoyol. En el caso del güiscoyol esta capacidad antioxidante se sugiere que se debe a los flavonoides, ya que éstos pueden reducir la cinética de las reacciones de oxidación e inhibir la peroxidación lipídica. La actividad barredora directa de los flavonoides contra los radicales libres podría contribuir también a la reducción de los niveles de peroxidación lipídica (Azofeifa *et al.*, 2015; Quesada *et al.*, 2020).

También se evaluó la inhibición de la producción de los ROS a nivel intracelular para los distintos jugos de cas. Los IC_{50} que se obtuvieron variaron entre la pulpa (716 µg MS/mL), el jugo prensado (770 µg MS/mL) y el jugo clarificado (816 µg MS/mL). Aunque estos datos no presentaron diferencias significativas entre ellos, se observa una tendencia a disminuir la actividad de los jugos si se comparan con los resultados obtenidos con la pulpa (Cuadro 7). Los valores descritos para las distintas muestras de cas fueron valores con una actividad menor a los reportados en la literatura; para el extracto de güiscoyol cuya concentración para barrer el 50% de los ROS intracelulares fue de 153 ± 13 µg /mL. En el caso de los jugos de mora, se describió un valor de 204 ± 9 µg /mL. Posiblemente las variaciones se deban a los compuestos bioactivos particulares de cada especie y a los distintos procesos de extracción o de preparación de los jugos (Azofeifa *et al.*, 2015; Quesada *et al.*, 2020).

Aunque el presente estudio no realizó una caracterización de los compuestos bioactivos del *Psidium friedrichsthalianum,* previas publicaciones han descrito sus componentes y estos a su vez han sido correlacionados con actividades antioxidantes reportadas en otros frutos del género *Psidium*. Por esta razón a continuación se discutirá la asociación entre los compuestos fenólicos reportados para *P. friedrichsthalianum* y su posible participación en las actividades antioxidantes anteriormente descritas.

Dentro de los principales constituyentes, con capacidad antioxidante, identificados tanto en las guayabas blancas y rojas (*P. guajava*) se describen el ácido ascórbico, ácido gálico, equivalentes de catequina, beta-cariofileno, alfa-bisabolono, entre otras moléculas (Barbalho *et al.*, 2012). De estos compuestos algunos como las catequinas coinciden con la identificación de polifenoles realizada por Cuadrado-Silva *et al.* (2017b) así como Rojas-Garbanzo *et al.* (2019) en el *Psidium friedrichsthalianum* (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b; Rojas-Garbanzo *et al.*, 2019).

En el caso de la catequina se atribuye su actividad antioxidante a la capacidad de donar electrones y la capacidad de interrumpir las reacciones en cadena de producción de radicales libres. Funciona, además, como una molécula secuestradora de superóxido. Tanto la catequina como la epicatequina tienden a inhibir la oxidación de lípidos, ayudando a disminuir los procesos de inflamación, aterosclerosis y cáncer (Ferrari, 2004). Es muy probable que la epicatequina que se encuentra presente en el *P. friedrichsthalianum* sea una de las moléculas responsables de la inhibición de la peroxidación lípidica que fue medida en este estudio utilizando homogenizados de hígados de rata y en el ensayo con eritrocitos (Cuadro 5 y Cuadro 6).

Otro polifenol con una importante capacidad barredora de radicales identificado en muestras de *P. friedrichsthalianum*, tanto en el estudio de Cuadrado-Silva (2017b) como de Rojas-Garbanzo (2019), es el ácido elágico, un polifenol

natural derivado del ácido gálico. El ácido elágico se presenta en la forma de polímeros como los elagitaninos y en pequeñas cantidades en su forma libre. Distintos estudios que se han realizado muestran que el mecanismo por medio del cual el ácido elágico reacciona con los radicales libres es por medio de la transferencia de un átomo de hidrógeno (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b; Rojas-Garbanzo *et al.*, 2019; Simić *et al.*, 2013). Se ha encontrado que el ácido elágico puede ser metabolizado de manera gradual por la microbiota intestinal hasta producir diferentes tipos de urolitina y se le atribuye su capacidad antioxidante gracias a la presencia de varios grupos hidroxilo en posición orto que podrían facilitar la habilidad de donar un hidrógeno y estabilizar un electrón desapareado. La eficiencia antioxidante del ácido elágico es directamente correlacionado con el grado de hidroxilación y disminuye con la presencia de fragmentos de azúcar (Landete, 2011).

Además de las catequinas y el ácido elágico los estudios previos han identificado flavonoides en los frutos de cas. Estas moléculas tienen en su estructura química una cantidad variable de grupos hidroxilo, lo que les permite quelar el hierro y otros metales de transición, así como tener una alta capacidad antioxidante. Su acción es primordialmente sobre el radical hidroxilo y el radical superóxido (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Actividad citotóxica en líneas celulares tumorales

En el presente estudio una de las líneas celulares estudiadas con los jugos de cas correspondió a la línea celular SW620 (adenocarcinoma colon humano) donde se obtuvieron valores de IC_{50} de 309 ± 22 µg MS/mL para la pulpa, 366 ± 46 µg MS/mL para el jugo prensado y 323 ± 21 µg MS/mL para el jugo clarificado. Estos valores no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero sí con las muestras que se sometieron al proceso de pasteurización: 501 ± 10 µg MS/mL (jugo prensado pasteurizado) y 524 ± 12 µg MS/mL (jugo clarificado pasteurizado) (Cuadro 8). Esta misma línea celular fue probada con extractos de varias frutas tropicales como:

Bactris guineesis (güiscoyol) donde se obtuvo un valor de 16,2 ± 1,5 µg /mL (M. Quesada et al., 2020), frutos y jugos de mora donde se reportan valores entre 112 ± 345 µg /mL (Madrigal-Gamboa *et al.*, 2021) y distintas variedades de frutos de mango con IC_{50} entre 374 - 500 µg /mL (Navarro *et al.*, 2019). En el estudio de *B. guineensis* se sugiere que la actividad puede estar relacionada con la presencia de las procianidinas, ya que su potencial anticancerígeno ha sido ampliamente estudiado en semillas de uva y en el caso de la mora la actividad anticancerígena se asocia principalmente a los elagitaninos. En el caso de ambas moléculas, su estructura química les impide ser absorbidas a través del tracto gastrointestinal debido a su alto peso molecular, lo que les permite llegar casi intactas al colon y ejercer su efecto citotóxico directamente con las células tumorales de ese órgano (Quesada *et al.*, 2020). En el caso de *P. friedrichstalianum,* las procianidinas y el ácido elágico también están presentes de acuerdo con la identificación de Cuadrado-Silva *et al.* y Rojas-Garbanzo *et al.,* por lo tanto también se les podría atribuir el efecto citotóxico observado para las muestras de cas (Cuadrado-Silva *et al.*, 2017b; Rojas-Garbanzo *et al.*, 2019). Sin embargo, al ser las procianidinas moléculas poliméricas con gran variación en los posibles tipos de estructuras, posiblemente el tipo específico de polímeros presentes en el *B. guineensis* están asociados a un mejor efecto citotóxico en comparación al cas.

La actividad antiproliferativa de extractos de frutos del género *Psidium* ha sido evaluada en otras líneas celulares distintas a las utilizadas en el presente estudio. Un reporte para *Psidium cattleianum* presentado por Medina *et al.* (2011) evaluó una línea celular de cáncer de mama humana (MCF-7) y describió que todos los extractos en concentraciones de 40, 60 y 80 µg/mL redujeron significativamente la proliferación de este tipo de células. Las mismas concentraciones se aplicaron a una línea de adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2) mostrando también reducciones significativas (Medina *et al.*, 2011). Las concentraciones de *P. cattleianum* utilizadas por Medina *et al.* para la línea colorectal Caco-2 presentan mejor actividad citotóxica que las concentraciones reportadas en el presente estudio

para el cas. Sin embargo, hay que considerar que además de las diferencias en las especies de *Psidium*, la línea colorectal SW-620 corresponde a células metastásicas que usualmente presentan mayor resistencia, ya que pueden presentar múltiples modificaciones genéticas que pueden resultar en resistencia a la muerte celular y por lo tanto pueden requerir mayores concentraciones de los extractos para observar un efecto citotóxico (Belayachi *et al.*, 2013).

En el caso de la especie *Psidium guajava,* distintas concentraciones de extractos de pulpa de fueron aplicados sobre líneas celulares BGM (riñón de mono verde africano) y no se detectó citotoxicidad alguna en concentraciones de extracto en un rango entre los 7,8 µg/mL y 1 mg/mL (Dos Santos et al., 2020). Sin embargo, otros estudios de variedades de *P. guajava* aplicadas en líneas celulares de leucemia (U937) mostraron un efecto citotóxico de hasta un 64% en tratamientos con concentraciones tan altas como 333 mg/mL (Suwanwong & Boonpangrak, 2021).

Algunos de los principales compuestos bioactivos reportados para *P. friedrichstalianum* han sido asociados a actividades antiproliferativas. Nuevamente el caso de las procianidinas ha sido ampliamente estudiado en cultivos celulares de cáncer de seno humano MCF-7 y MDA-MB-468, cáncer de pulmón humano A427, cáncer de próstata humano DU145 y LNCaP, cáncer de vejiga humana BIU87, cáncer colorectal humano HCT-8, HT29, LoVo y CaCo-2. Estas procianidinas resultaron en la inhibición de la proliferación celular y/o una inducción de la apoptosis sin un efecto citotóxico en las células normales (Lee, 2017).

Al ácido elágico no solamente se le atribuyen funciones antioxidantes; Landete (2011) estudió diversas referencias relacionadas con funciones de la molécula y sus posibles efectos biológicos. Describe al ácido elágico como un potente antiestrógeno en células MCF-7 derivadas de cáncer de seno, además de propiedades anti-inflamatorias en carcinogénesis en colon de rata. Landete (2011) recopiló además información relacionada con la intervención del ácido elágico en el

proceso de apoptosis en células Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano y la no inducción de apoptosis en células normales de colon (Landete, 2011).

Procesamiento y pasteurización

Distintas metodologías de procesamiento de jugos incluyen tratamientos térmicos como la pasteurización. Cambios en el contenido de polifenoles, así como cambios en las actividades antioxidantes posteriores a la pasteurización, se han reportado en la literatura, tanto un aumento como una disminución en la actividades antioxidantes. Aparte de los tratamientos térmicos, otras operaciones unitarias como los procesos como la homogenización, la filtración y la clarificación también pueden causar la pérdida de la integridad celular, lo que conlleva a posibles cambios en las actividades biológicas (Hager *et al.*, 2010; Sattar *et al.*, 2020).

Por otro lado, el procesamiento térmico puede traer efectos positivos sin afectar las características físicoquímicas de una planta en particular. Por ejemplo, los procesos térmicos pueden mejorar la digestibilidad de proteínas y carbohidratos, así como reforzar la biodisponiblidad de ciertas vitaminas, en algunos casos debido a la destrucción de ciertos componentes anti-nutricionales termolábiles o también a la liberación de las moléculas del atrapamiento dentro de la matriz de la planta (Gibson *et al.*, 2006).

En tejidos vegetales intactos, se ha documentado la presencia de los polifenoles y enzimas como las polifenol oxidasas que se encuentran presentes en diversos compartimentos de la planta. Cuando las células se rompen, por ejemplo por acción de ciertos tipos de procesamiento como la molienda o la presión, los polifenoles pueden entrar en contacto tanto con los polisacáridos de la pared celular como con las polifenol oxidasas provocando reacciones de oxidación (Renard *et al.*, 2017).

Las procianidinas corresponden al segundo grupo más abundante de polifenoles encontrados en plantas. Se encuentran en la cáscara de frutas y su contenido puede verse disminuido por los procesamientos industriales como el descascarado, los procesos de filtración de los jugos, la maceración, el secado o el almacenamiento por largo tiempo (Maldonado & Raul, 2010). Las procianidinas se encuentran entre los componentes mayoritarios descritos por Rojas-Garbanzo *et al.* para el cas, por lo que su pérdida, debido al procesamiento, puede ser uno de los puntos responsables de las variaciones en las actividades antioxidantes (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2019).

En este estudio, las características físicoquímicas como el pH y los grados Brix no fueron afectados significativamente por el procesamiento de las muestras. Sin embargo, otras variables fisicoquímicas como la concentración de polifenoles totales mostraron variaciones significativas a lo largo del procesamiento. Con respecto a la pulpa, el jugo prensado perdió un 47% de la concentración de polifenoles y el jugo clarificado perdió un 38%, posiblemente luego del proceso de microfiltración tangencial, donde se da un proceso de separación generado por presión, lo que permite retener ciertas moléculas de mayor tamaño y permitiendo que moléculas de menor tamaño permanezcan en el jugo, concentrando de esa forma esas moléculas. Por el contrario, la concentración de polifenoles totales entre los jugos prensados y los jugos clarificados con sus respectivos jugos pasteurizados no mostraron diferencias significativas (Cuadro 2), lo que nos lleva a considerar que la pérdida de los polifenoles totales es más importante al aplicar procesos como la maceración, el tratamiento enzimático, el prensado o la microfiltración tangencial, más que los procesos térmicos de pasteurización.

Los resultados del presente estudio coinciden con lo reportado por Rojas-Garbanzo *et al.* (2019) al analizar los efectos de procesamiento sobre jugos de *P. friedrichsthalianum.* Estos autores determinaron que la pasteurización no reflejaba un efecto sobre las características fisicoquímicas de los jugos y que, más bien, los

cambios se podían observar entre el proceso de prensado de la fruta fresca y el proceso de preparación de los jugos tratados con los productos de naturaleza enzimática (Rojas-Garbanzo *et al.*, 2019). En el caso de este estudio, el mayor impacto en la pérdida de la concentración de los polifenoles totales se mostró en el proceso de prensado y en menor medida en el proceso de clarificación (Cuadro 2). Esto podría deberse a la presencia de polifenoles no extraíbles, los cuales estarían ligados a componentes de la pared celular (Reynoso-Camacho et al., 2018) y que por lo tanto quedan retenidos por el medio filtrante utilizado en el proceso de prensado o de clarificación.

En cuanto al efecto de la pasteurización, los resultados obtenidos en el presente estudio a 90-95 ^{o}C, al igual que en los estudios en *P. friedrichsthalianum* presentados por Rojas-Garbanzo *et al.* (2019) a temperaturas de 60 y 71.1 ^{o}C, y reportes en otras frutas, coindicen en que la pasteurización no necesariamente reduce el contenido de polifenoles. Un estudio valoró el efecto de distintas temperaturas de pasteurización en jugos de aonla (*Emblica officinalis* Gaertn) conocida como grosella de la India. En este caso el contenido de polifenoles totales en los jugos estudiados no presentó variaciones significativas con las distintas temperaturas de pasteurización probadas (intervalo de temperaturas entre 75 y 95 ^{o}C) (Bhattacherjee *et al.*, 2011).

El efecto de la pasteurización en otros jugos, como por ejemplo en bebidas de melocotón, se ha estudiado relacionado con la concentración de polifenoles totales. En este caso específico se reporta que la pasteurización no mostró diferencias significativas en la concentración de los polifenoles totales del jugo (457,40 ± 0,0004 µg de equivalentes de ácido gálico/100 mL de jugo) y luego de la pasteurización (464,19 ± 0,0005 µg de equivalentes de ácido gálico/100 mL de jugo) (Sattar *et al.*, 2020).

En el presente estudio los distintos jugos de cas se sometieron a la evaluación de las diversas actividades antioxidantes. En el caso del DPPH se presentaron diferencias significativas entre la pulpa y los jugos prensado (-37%) y clarificado (-34%), correlacionando con la pérdida de compuestos bioactivos durante el tratamiento enzimático y la eliminación de material fibroso que contiene sólidos insolubles provenientes de la pared celular vegetal, durante el prensado o la clarificación, que se mostró en el Cuadro 2. De igual manera, la actividad antioxidante determinada por DPPH fue adicionalmente reducida en los jugos que fueron sometidos a la pasteurización (prensado pasteurizado -14% y clarificado pasteurizado -22%) al compararlo con sus respectivos jugos sin pasteurizar (Cuadro 3). En el caso de la actividad antioxidante evaluada por el efecto barredor al óxido nítrico no se presentaron diferencias significativas entre la pulpa y los jugos procesados (prensado y clarificado), pero sí se presentaron reducciones significativas (-23% (Prp) y -18% (Clp)) en la actividad barredora luego de los procesos de pasteurización (Cuadro 4).

Al comparar la pérdida de actividad antioxidante debida a la pasteurización de los jugos de cas, reflejada tanto en la prueba de DPPH como de óxido nítrico, con otras publicaciones se muestran resultados variables según los estudios. Por ejemplo en el caso del jugo de melocotón, el proceso de pasteurización no mostró diferencias significativas en la evaluación de la actividad antioxidante valorada con pruebas como el DPPH , el ABTS y el FRAP (Sattar *et al.*, 2020). Por el contrario, en un estudio con jugos de mora se observaron reducciones en la actividad barredora de DPPH de entre un 26 y 27% en los jugos pasteurizados con respecto a los no pasteurizados y en el caso del óxido nítrico reducciones de 15-16% (Azofeifa et al., 2015). Para ambas pruebas los porcentajes de reducción de la actividad son similares a los presentados en el jugo de cas. Estas diferencias entre los resultados de las publicaciones, evidencia que las frutas muestran variaciones en la termo-sensibilidad de los compuestos bioactivos en cada especie. Aún más, entre los mismos compuestos de una misma especie existen variaciones. Como se señala en

el caso de la mora, los elagitaninos no sufrieron afectación significativa con la pasteurización, mientras que las antocianinas sí fueron afectadas (Azofeifa et al., 2015).

En cuanto a la evaluación de la peroxidación lipídica en homogenizados de hígados de rata utilizando los distintos jugos de cas, tanto pasteurizados como sin pasteurizar, no se presentaron diferencias significativas, lo que sugiere que los componentes involucrados en la inhibición de la peroxidación no sufren afectación con los cambios de temperatura o las operaciones unitarias aplicadas para el procesamiento como el prensado, el tratamiento enzimático o la clarificación mediante microfiltración tangencial. También el nivel de sensibilidad de la prueba de MDA en hígados podría no permitir observar diferencias significativas por efecto del procesamiento. Este es un método de determinación que no es específico para productos de la peroxidación lipídica como el MDA, ya que algunos aldehídos generados simultáneamente durante la peroxidación lipídica pueden también reaccionar y absorber a la misma longitud de onda. Además, algunos otros componentes que puedan estar en los jugos como proteínas o productos de degradación de azúcares podrían interferir los resultados de la determinación (Gulcin, 2020).

En cuanto a la inhibición de la peroxidación lipídica utilizando eritrocitos humanos, se presentaron reducciones significativas entre un 42 y un 62%, al comparar la pulpa y los demás jugos, tanto los pasteurizados como sin pasteurizar, lo que hace pensar que los componentes involucrados en el modelo con eritrocitos pudieron verse afectados con el procesamiento y la pasteurización (Cuadro 6 y Figura 2).

Estas mismas pruebas de inhibición de peroxidación lipídica en homogenizados de hígados de rata y en eritrocitos, fueron evaluadas utilizando jugos de mora (*Rubus adenotrichos*) y en el caso de esta fruta tampoco presentaron

diferencias significativas en los resultados, al comparar las muestras pasteurizadas y las que no se pasteurizaron (Azofeifa et al., 2015). Lo que nos indica que el proceso de pasteurización no tendría un efecto sobre los componentes de la matriz alimentaria estudiada.

En concordancia con la disminución de la actividad antioxidante anteriormente descrita para las distintas pruebas, se ha reportado para el caso del *P. guajava* que los subproductos de las etapas de procesamiento de los jugos, como las hojas, las semillas, la piel o parte de la pulpa, muestran presencia de compuestos fenólicos. Por lo tanto, parte de la actividad antioxidante del fruto se puede perder en los jugos debido a los subproductos descartados (Barbalho *et al.*, 2012).

En el caso de las moras (cv. Apache), estos frutos son fuentes importantes de polifenoles como los elagitaninos y antocianinas. Como producto del procesamiento, en jugos clarificados y no clarificados, las antocianinas monoméricas disminuyeron su concentración en un 65% y la misma disminución fue reportada en su capacidad antioxidante. El mismo resultado se reporta para los elagitaninos (pérdidas entre 70% y 82%) debido en gran parte a la eliminación de las semillas que son ricas en estos compuestos (Hager et al., 2008, 2010).

Pérdidas de compuestos bioactivos, en los subproductos generados durante la aplicación de las distintas operaciones unitarias en la preparación de los jugos, como las descritas anteriormente para *P. guajava* y para las moras Apache, podrían estar ocurriendo de manera similar en las muestras de jugos de cas evaluadas en el presente estudio. Adicional, durante el proceso de pasteurización, los compuestos individuales pueden verse afectados por la temperatura de forma distinta para cada polifenol. Por ejemplo, algunas variedades de granada iraní (*Punica granatum* L.) fueron estudiadas y se identificaron las principales antocianinas de la fruta. De esas variedades de granada se prepararon jugos que fueron pasteurizados y luego se procedió a cuantificar de nuevo las antocianinas presentes en los jugos. Luego de la

pasteurización se reportó una disminución de antocianinas pero el resultado dependía de la variedad de granada. Se presume que la degradación de esas antocianinas se puede deber a la formación de productos derivados de carbohidratos y degradación de ácidos orgánicos de los frutos (Alighourchi *et al.*, 2008).

Otro tipo de comportamiento en el efecto de la pasteurización sobre los polifenoles específicos es el caso de las catequinas. Un estudio con jugos de uva encontró que la concentración de procianidinas disminuyó luego del proceso de pasteurización. El mismo estudio evaluó el proceso de prensado en los jugos. La concentración de catequinas, en los jugos prensados en caliente, presentaron concentraciones disminuidas de catequinas (Fuleki & Ricardo-Da-Silva, 2003), lo que podría hacernos suponer que algunas catequinas pueden ser termo-sensibles.

En el caso de las fresas frescas sometidas a un proceso de pasteurización, se comprobó un incremento en las concentraciones de compuestos como la (-)-epitequina, el ácido elágico y el (-)-epigalocatequina galato. Además se reportó una disminución en la concentración de pelargonidina-3-glucósido. El proceso térmico puede conllevar una ruptura de compuestos fenólicos durante el proceso de degradación de constituyentes celulares. La disrupción de la pared celular también tiende a liberar enzimas hidrolíticas y oxidativas que pueden llegar a destruir ciertos antioxidantes en frutas y vegetales. El calor no solamente puede promover la degradación de moléculas complejas en sus monómeros sino que también puede explicar el incremento de algunas otras sustancias, como resultado de la liberación de las células al espacio extracelular. El tratamiento térmico, en presencia de oxígeno, puede inducir la degradación de ciertas proantocianidinas en sus subunidades como la (+)-catequina y la (-)-epicatequina o generar enlaces covalentes con otros compuestos fenólicos (Bolling *et al.*, 2010; Dewanto *et al.*, 2002; Fuleki & Ricardo-Da-Silva, 2003; Oliveira *et al.*, 2015).

En el presente estudio, el tratamiento térmico de las muestras de jugo prensado y jugo clarificado provocó reducciones significativas en las actividades antioxidantes determinadas mediante las técnicas de DPPH e inhibición de óxido nítrico. Sin embargo, para las técnicas que involucran escenarios más cerca de la realidad biológica, como lo son homogenizados de hígados de rata (MDA), los eritrocitos humanos (ERYCA) y la inhibición de ROS intracelulares, las actividades antioxidantes y de inhibición de la peroxidación lipídica no se vieron disminuidas significativamente en las muestras sometidas a tratamientos térmicos. Lo anterior sugiere que los compuestos bioactivos con mayor protagonismo para la actividad antioxidante en los sistemas celulares son menos termo-sensibles.

Conclusiones y perspectivas de investigaciones futuras para cas

El *Psidium friedrichsthalianum* presenta características importantes en su actividad antioxidante, que podrían contribuir a fomentar el cultivo de este producto comestible en búsqueda de un beneficio para la población. A manera de resumen, podemos describir lo encontrado en este estudio.

La concentración de polifenoles totales en las muestras de jugos de cas tiende a ser mayor en comparación con otros jugos de especies del género *Psidium.* Sin embargo, las operaciones unitarias involucradas en la elaboración de los jugos si provocan disminuciones en la concentración de polifenoles totales. Siendo que la pulpa presenta una concentración significativamente mayor que el resto de muestras analizadas ($p<0,001$). A pesar de lo anterior, la disminución en la concentración de polifenoles totales repercute en distinta medida en las actividades biológicas evaluadas. Lo anterior, debido a que cada compuesto bioactivo es afectado en distinta manera durante el procesamiento y, a la vez, cada compuesto bioactivo juegan un papel predominante en cada ensayo. Por lo tanto, la combinación de ambas variables, es lo que explica las diferencias observadas en las actividades biológicas evaluadas en el presente estudio.

En cuanto a la actividad barredora de radicales libres (DPPH) la actividad disminuye luego de las etapas de prensado y clarificación, siendo significativas las diferencias ($p<0,001$) y adicionalmente existe una pérdida de actividad extra luego del proceso de pasteurización. En lo relativo a la actividad barredora de óxido nítrico, las primeras etapas del procesamiento (prensado y clarificado) no parecen afectar a los compuestos bioactivos barredores de oxido nítrico, pero estos compuestos parecen ser más termosensibles debido a que luego de la pasteurización, la actividad disminuye significativamente($p<0,005$).

En la determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica, tanto con el método que mide MDA ($p<0,005$) como ERYCA ($p<0,001$), la pulpa presenta la mejor actividad de inhibición, la cual se reduce en los jugos procesados. Esta disminución está directamente correlacionada con la concentración de polifenoles totales de las muestras. Por lo tanto, las distintas operaciones unitarias, tanto de prensado, filtrado y los tratamientos térmicos, repercuten en la capacidad inhibitoria de peroxidación. Sin embargo, estos últimos (tratamientos térmicos) parecen ser los de menor impacto.

Por otra parte, la valoración de la actividad citotóxica de las muestras de cas sobre líneas celulares tumorales mostró una leve actividad citotóxica únicamente sobre la línea celular SW620 (adenocarcinoma colorectal humano) que si se compara con reportes para otros frutos no muestra valores prometedores. Adicionalmente la pasteurización parece afectar dicha actividad citotóxica de manera significativa ($p<0,05$). Lo anterior sugiere que el potencial del cas radica más sobre su actividad antioxidante y no sobre su actividad anti-tumoral.

Como perspectivas a futuro se debe completar el presente estudio purificando polifenoles específicos del fruto de cas para así lograr identificar los compuestos bioactivos involucrados en cada una de las actividades biológicas evaluadas. Se podría considerar retomar el proceso de extracción de polifenoles de cada una de

las muestras utilizando una columna de resina de intercambio iónico (por ejemplo, AmberLite™) o tecnicas de HPLC semipreparativos para mejorar la separación de los mismos.

Adicionalmente, con miras a la comercialización de los productos de cas, uno de los factores que se podría considerar importante al plantear estudios posteriores sería valorar las condiciones de almacenamiento de los jugos, como el tiempo y la temperatura, así como el material de empaque. También otro factor a tomar en consideración, para posibles estudios, es el hecho de que el estado de maduración, el lugar de recolección y la fecha de recolecta puede afectar la concentración de distintos compuestos bioactivos del fruto del cas.

Finalmente, se deben validar las actividades biológicas descritas en el presente estudio en modelos animales y finalmente en ensayos clínicos. Por otro lado, también se puede ampliar el estudio del cas evaluando otras actividades biológicas, como su posible efecto hipoglicemiante y se podría estudiar otras partes de los árboles del *Psidium friedrichsthalianum* como lo son las hojas que han sido estudiadas en otras plantas de género *Psidium*.

BIBLIOGRAFÍA

Alighourchi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2008). Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (Punica granatum L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*, *227*(3), 881–887. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0799-1

Araújo, H., Rodrigues, F., Costa, W., Nonato, C., Rodrigues, F., Boligon, A., Athayde, M., & Costa, J. (2015). Chemical profile and antioxidant capacity verification of psidium guajava (Myrtaceae) fruits at different stages of maturation. *EXCLI Journal*, *14*, 1020–1030. https://doi.org/10.17179/excli2015-522

Armstrong, D. (Ed.). (2010). *Advanced protocols in oxidative stress II* (First edit). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1441-8

Ashraf, A., Sarfraz, R., Rashid, M., Mahmood, A., Shahid, M., & Noor, N. (2016). Chemical composition, antioxidant, antitumor, anticancer and cytotoxic effects of Psidium guajava leaf extracts. *Pharmaceutical Biology*, *54*(10), 1971–1981. https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1137604

Association of Official Analytical Chemist International. (1981). AOAC: pH of acidified foods. *Journal of AOAC International*, *64*(2), 332–336.

Association of Official Analytical Chemist International. (2010). AOAC: fruits and fruit products. *Journal of AOAC International*, *75*(1), 112–113.

Azofeifa, G., Quesada, S., Pérez, A., Vaillant, F., & Michel, A. (2015). Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. *Journal of Food Composition and Analysis*, *42*, 56–62. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.015

Balakrishnan, N., Panda, A., Raj, N., Shrivastava, A., & Prathani, R. (2009). The evaluation of nitric oxide scavenging activity of Acalypha indica Linn root. *Asian Journal of Research in Chemistry*, *2*(2), 148–150.

Barbalho, S., Farinazzi-Machado, F., Goulart, R., Saad, A., Ottoboni, A., & Teixeira,

C. (2012). Psidium Guajava (Guava): A Plant of Multipurpose Medicinal Applications. *Medicinal & Aromatic Plants*, *1*(4), 1–6. https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000104

Bartesaghi, S., & Radi, R. (2018). Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biology*, *14*, 618–625. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.009

Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri, Y., Fernández de Mattos, S., Amzazi, S., & Villalonga, P. (2013). Screening of North African medicinal plant extracts for cytotoxic activity against tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Plants*, *3*(3), 310–332. https://doi.org/10.1002/ptr.4752

Bhattacherjee, A., Tandon, D., Dikshit, A., & Kumar, S. (2011). Effect of pasteurization temperature on quality of aonla juice during storage. *Journal of Food Science and Technology*, *48*(3), 269–273. https://doi.org/10.1007/s13197-010-0171-5

Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*, 1–9. https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00091

Bolling, B., Blumberg, J., & Chen, O. (2010). The influence of roasting, pasteurisation, and storage on the polyphenol content and antioxidant capacity of California almond skins. *Food Chemistry*, *123*(4), 1040–1047. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.058

Boora, R. (2012). Improvement in guava (Psidium guajava L.)-A review. *Agricultural Reviews*, *33*(4), 341–349.

Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 585, Issues 2–3, pp. 325–337). https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008

Brewer, M. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(4), 221–247. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x

Camps, D., Ruffino, S., Majul, E., & Joison, A. (2009). *Bioquímica del estrés oxidativo* (Primera ed). Editorial Lulu.com.

Carvajal, C. (2019). Especies reactivas de oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*, *36*(1), 91–100.

Chen, H.-Y., & Yen, G.-C. (2007). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (Psidium guajava L.) leaves. *Food Chemistry*, *101*(2), 686–694. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.047

Cianciosi, D., Simal-Gándara, J., & Forbes-Hernández, T. (2019). The importance of berries in the human diet. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, *12*(4), 335–340. https://doi.org/10.3233/MNM-190366

Correa, M., Chaves, J., Jham, G., Ramos, A., Minim, V., & Yokota, S. (2010). Changes in guava (Psidium guajava L. var. Paluma) nectar volatile compounds concentration due to thermal processing and storage. *Ciência ETecnologia de Alimentos*, *30*(4), 1061–1068. https://doi.org/10.1590/s0101-20612010000400035

Coser, S., Ferreira, M., Ferreira, A., Mitre, L., Carvalho, C., & Clarindo, W. (2012). Assessment of genetic diversity in Psidium guajava L. using different approaches. *Scientia Horticulturae*, *148*, 223–229. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.030

Cuadrado-Silva, C., Pozo-Bayón, M., & Osorio, C. (2017a). Identification of aroma compounds and precursors of sour guava (Psidium friedrichsthalianum Nied.) following a sensomics approach. *European Food Research and Technology*, *243*(1), 1–10. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2716-y

Cuadrado-Silva, C., Pozo-Bayón, M., & Osorio, C. (2017b). Targeted metabolomic analysis of polyphenols with antioxidant activity in sour guava (Psidium friedrichsthalianum Nied.) fruit. *Molecules*, *22*(1), 1–11. https://doi.org/10.3390/molecules22010011

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., & Liu, R. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 3010–3014.

https://doi.org/10.1021/jf0115589

Dilis, V., & Trichopoulou, A. (2010). Assessment of antioxidants in foods and biological samples: A short critique. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *61*(5), 441–448. https://doi.org/10.3109/09637480903386234

Dos Santos Pereira, E., Vinholes, J., Franzon, R., Dalmazo, G., Vizzotto, M., & Nora, L. (2018). Psidium cattleianum fruits: A review on its composition and bioactivity. *Food Chemistry*, *258*, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.024

Dos Santos, R., Costa, G., Cerávolo, I., & Dias-Souza, M. (2020). Antibiofilm potential of Psidium guajava and Passiflora edulis pulp extracts against Staphylococcus aureus, cytotoxicity, and interference on the activity of antimicrobial drugs. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *6*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s43094-020-00056-8

Ferrari, C. K. B. (2004). Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*, *5*, 275–289.

Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S.-B., Whalen, K., Dabo, A., Reynertson, K., Foronjy, R., D'Armiento, J., & Kennelly, E. (2013). Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (Psidium friedrichsthalianum) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chemistry*, *141*(2), 889–895. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.025

Flores, G., Wu, S. B., Negrin, A., & Kennelly, E. J. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (Psidium guajava) fruits. *Food Chemistry*, *170*, 327–335. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.076

Fuleki, T., & Ricardo-Da-Silva, J. (2003). Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(3), 640–646. https://doi.org/10.1021/jf020689m

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1370–1373. https://doi.org/10.1021/jf048396b

Gibson, R., Perlas, L., & Hotz, C. (2006). Improving the bioavailability of nutrients in plant foods at the household level. *Proceedings of the Nutrition Society*, *65*(2), 160–168. https://doi.org/10.1079/pns2006489

González, E., Vaillant, F., Pérez, A., & Rojas, G. (2012). In Vitro Cell-Mediated Antioxidant Protection of Human Erythrocytes by Some Common Tropical Fruits. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, *02*(03), 1–8. https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000139

González, E., Vaillant, F., Rojas, G., & Pérez, A. (2010). Novel semiautomated method for assessing in vitro cellular antioxidant activity using the light-scattering properties of human erythrocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(3), 1455–1461. https://doi.org/10.1021/jf903467x

Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3). https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3

Hager, T., Howard, L., & Prior, R. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(3), 689–695. https://doi.org/10.1021/jf071994g

Hager, T., Howard, L., & Prior, R. (2010). Processing and storage effects on the ellagitannin composition of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(22), 11749–11754. https://doi.org/10.1021/jf102964b

Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, *175*, 556–567. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013

Joseph, B., & Priya, R. (2011). Phytochemical and Biopharmaceutical Aspects of Psidium guajava (L.) Essential oil: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, *5*(4), 432–442.

Kim, H.-J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H. Y., & Jin, Z. (2004). Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (Melaleuca alternifolia) Oil and Its

Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(10), 2849–2854. https://doi.org/10.1021/jf035377d

Landete, J. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, *44*(5), 1150–1160. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027

Landrum, L. (2016). Re-evaluation of Psidium acutangulum (Myrtaceae) and a new combination in Psidium. *Brittonia*, *68*(4), 409–417. https://doi.org/10.1007/s12228-016-9431-7

Lee, Y. (2017). Cancer chemopreventive potential of procyanidin. *Toxicological Research*, *33*(4), 273–282. https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.4.273

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, *13*, 757–772. https://doi.org/10.5772/2535

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118–126. https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902

Madrigal-Gamboa, V., Jiménez-Arias, J., Hidalgo, O., Quesada, S., Pérez, A., & Azofeifa, G. (2021). Membrane processing effect of blackberry (Rubus adenotrichos) on cytotoxic and pro-apoptotic activities against cancer cell lines. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1–12. https://doi.org/10.1111/jfpp.15575

Maldonado, M., & Raul, F. (2010). Efecto pro-apoptótico de procianidinas de manzana en células humanas de cáncer de colon y sus células metastásicas derivadas. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, *17*(3), 337–347.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727

Maritim, A., Sanders, R., & Watkins, J. (2003). Diabetes, oxidative stress, and

antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *17*(1), 24–38. https://doi.org/10.1002/jbt.10058

Marquina, V., Araujo, L., Ruíz, J., Rodríguez-Malaver, A., & Vit., P. (2008). Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (Psidium guajava L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *58*(1), 98–102.

Marrocco, I., Altieri, F., & Peluso, I. (2017). Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/6501046

Martín, M., & Ramos, S. (2016). Cocoa polyphenols in oxidative stress: Potential health implications. *Journal of Functional Foods*, *27*, 570–588. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.10.008

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., & Jesús Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. *Nutr. Hosp*, *17*(6), 271–278.

Medina, A., Haas, L., Chaves, F., Salvador, M., Zambiazi, R., Da Silva, W., Nora, L., & Rombaldi, C. (2011). Araçá (Psidium cattleianum Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, *128*(4), 916–922. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.119

Metwally, A., Omar, A., Ghazy, N., Harraz, F., & El Sohafy, S. (2011). Monograph of Psidium guajava L. leaves. *Pharmacognosy Journal*, *3*(21), 89–104. https://doi.org/10.5530/pj.2011.21.17

Mgaya-Kilima, B., Remberg, S., Chove, B., & Wicklund, T. (2015). Physiochemical and antioxidant properties of roselle-mango juice blends; effects of packaging material, storage temperature and time. *Food Science and Nutrition*, *3*(2), 100–109. https://doi.org/10.1002/fsn3.174

Mitra, S., Irenaeus, T., Gurung, M., & Pathak, P. (2012). Taxonomy and Importance of Myrtaceae. *Acta Horticulturae*, *959*, 23–34. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.959.2

Montoro, P., Tuberoso, C., Piacente, S., Perrone, A., De Feo, V., Cabras, P., & Pizza, C. (2006). Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of Myrtus communis L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(5), 1614–1619. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.018

Montoya-Arroyo, A., Díaz, C., Vaillant, F., & Tamayo-Castillo, G. (2020). Oral administration of Costa Rican guava (Psidium friedrichsthalianum) juice induces changes in urinary excretion of energy-related compounds in Wistar rats determined by 1H NMR. *NFS Journal*, *20*, 48–57. https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.07.003

Navarro, M., Arnaez, E., Moreira, I., Quesada, S., Azofeifa, G., Wilhelm, K., Vargas, F., & Chen, P. (2019). Polyphenolic characterization, antioxidant, and cytotoxic activities of Mangifera indica cultivars from Costa Rica. *Foods*, *8*(9), 1–26. https://doi.org/10.3390/foods8090384

Neha, K., Haider, M., Pathak, A., & Yar, M. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *178*, 687–704. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010

Oliveira, A., Coelho, M., Alexandre, E., Almeida, D., & Pintado, M. (2015). Long-Term Frozen Storage and Pasteurization Effects on Strawberry Polyphenols Content. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(9), 1838–1844. https://doi.org/10.1007/s11947-015-1539-3

Ordóñez-Santos, L., & Vázquez-Riascos, A. (2010). Effect of processing and storage time on the vitamin C and lycopene contents of nectar of pink guava (Psidium guajava L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *60*(3), 280–284.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626. https://doi.org/10.1021/jf010586o

Pérez Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S., & Vargas Solis, R. (2008). Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. In *Journal of*

Ethnopharmacology (Vol. 117, Issue 1, pp. 1–27). https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.025

Pino, J., Marbot, R., & Vázquez, C. (2002). Characterization of volatiles in Costa Rican guava [Psidium friedrichsthalianum (Berg) Niedenzu] fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(21), 6023–6026. https://doi.org/10.1021/jf011456i

Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4290–4302. https://doi.org/10.1021/jf0502698

Quesada, M., Azofeifa, G., Campone, L., Pagano, I., Pérez, A., Cortés, C., Rastrelli, L., & Quesada, S. (2020). Bactris guineensis (Arecaceae) extract: Polyphenol characterization, antioxidant capacity and cytotoxicity against cancer cell lines. *Journal of Berry Research*, *10*(3), 329–344. https://doi.org/10.3233/JBR-190449

Quesada, María, Azofeifa, G., Campone, L., Pagano, I., Pérez, A., Cortés, C., Rastrelli, L., & Quesada, S. (2020). Bactris guineensis (Arecaceae) extract: Polyphenol characterization, antioxidant capacity and cytotoxicity against cancer cell lines. *Journal of Berry Research*, *10*(3), 329–344. https://doi.org/10.3233/jbr190449

Qureshi, S., Lund, A., Veierød, M., Carlsen, M., Blomhoff, R., Andersen, L., & Ursin, G. (2014). Food items contributing most to variation in antioxidant intake; a cross-sectional study among Norwegian women. *BMC Public Health*, *14*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-45

Ramos, E., Castañeda, B., & Ibañez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Académica Perú Salud*, *15*(1), 42–46.

Renard, C., Watrelot, A., & Le Bourvellec, C. (2017). Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science and Technology*, *60*, 43–51.

https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.022

Reynoso-Camacho, R., Rufino, R., Amaya, C., & Pérez, A. M. (2018). Non-extractable polyphenols in tropical fruits: occurrence and health-related properties. In F. S.-C. & J. Pérez-Jiménez (Ed.), *Non-extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health.* (pp. 88–110). Royal Society of Chemistry,.

Ribeiro, A., Chisté, R., Freitas, M., Da Silva, A., Visentainer, J., & Fernandes, E. (2014). Psidium cattleianum fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, *165*, 140–148. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.079

Rojas-Garbanzo, C., Rodríguez, L., Pérez, A. M., Mayorga-Gross, A. L., Vásquez-Chaves, V., Fuentes, E., & Palomo, I. (2021). Anti-platelet activity and chemical characterization by UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS of the main polyphenols in extracts from Psidium leaves and fruits. *Food Research International*, *141*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110070

Rojas-Garbanzo, C., Winter, J., Montero, M., Zimmermann, B., & Schieber, A. (2019). Characterization of phytochemicals in Costa Rican guava (Psidium friedrichsthalianum -Nied.) fruit and stability of main compounds during juice processing - (U)HPLC-DAD-ESI-TQD-MSn. *Journal of Food Composition and Analysis*, *75*, 26–42. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.012

Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica Sur*, *20*(3), 161–168.

Sanda, K., Grema, H., Geidam, Y., & Bukar-Kolo, Y. (2011). Pharmacological Aspects of Psidium guajava: An Update. *International Journal of Pharmacology*, *7*(3), 316–324. https://doi.org/10.3923/ijp.2011.316.324

Sandri, I., Fontana, R., Barfknecht, D., & Da Silveira, M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(10), 2217–2222. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.02.008

Sattar, S., Imran, M., Mushtaq, Z., Ahmad, M., Arshad, M., Holmes, M., Maycock, J., Nisar, M., & Khan, M. (2020). Retention and stability of bioactive compounds in

functional peach beverage using pasteurization, microwave and ultrasound technologies. *Food Science and Biotechnology*, *29*(10), 1381–1388. https://doi.org/10.1007/s10068-020-00797-5

Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, *21*(9), 1–12. https://doi.org/10.3390/molecules21091216

Sharma, A., Sehrawat, S., Singhrot, R., & Tele, A. (2010). Morphological and Chemical Characterization of Psidium Species. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *38*(1), 28–32. https://doi.org/10.15835/nbha3813569

Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *311*, 617–631.

Simić, A., Verbić, T., Sentić, M., Vojić, M., Juranić, I., & Manojlović, D. (2013). Study of ellagic acid electro-oxidation mechanism. *Monatshefte Fur Chemie*, *144*(2), 121–128. https://doi.org/10.1007/s00706-012-0856-8

Sonowal, H., & Ramana, K. (2019). 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal in the Regulation of Anti-Oxidative and Pro-Inflammatory Signaling Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/5937326

Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, *12*(1), 376–390. https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004

Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J., Xu, Z., & Finley, J. (2012). Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(27), 6658–6677. https://doi.org/10.1021/jf300861c

Suwanwong, Y., & Boonpangrak, S. (2021). Phytochemical contents, antioxidant activity, and anticancer activity of three common guava cultivars in Thailand. *European Journal of Integrative Medicine*, *42*, 101290. https://doi.org/10.1016/j.eujim.2021.101290

Vaillant, F., Millan, A., Dornier, M., Decloux, M., & Reynes, M. (2001). Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow

microfiltration. *Journal of Food Engineering*, *48*, 83–90. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00152-7

Vyas, N., Tailang, M., Gavatia, N., & Gupta, B. (2010). Antioxidant potential of Psidium Guajava Linn. *International Journal of PharmTech Research*, *2*(1), 417–419.

Wootton-Beard, P., & Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, *44*(10), 3135–3148. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.015

Yen, G.-C., & Lin, H.-T. (1999). Changes in volatile flavor components of guava juice with high-pressure treatment and heat processing and during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(5), 2082–2087. https://doi.org/10.1021/jf9810057

Zapata, K., Cortes, F., & Rojano, B. (2013). Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (Psidium araca). *Información Tecnológica*, *24*(5), 103–112. https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500012

ANEXO 1

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDO Y USO DE ANIMALES

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
08 SEP 2015
RECIBIDO

Lunes 17 de agosto de 2015
CICUA-036-15

Doctora
Gabriela Azofeifa
Depto. Bioquímica
Escuela de Medicina

Estimada Dra. Azofeifa:

En la sesión número 151 del Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales (CICUA), del jueves 13 de agosto del 2015, se evaluaron las aclaraciones del proyecto "Determinación de las actividades antioxidantes y citotóxicas de dos especies frutales (cas y güiscoyol) y el efecto de los procesos industriales sobre estas actividades".

Este Comité acepta las aclaraciones presentadas, con lo cual queda aprobado dicho proyecto.

Atentamente,

Dra. Sara González Camacho
Coordinadora
CICUA

Cc: Dr. Domingo Campos, Dirección de Gestión de Investigación
Archivo

ANEXO 2

Cuadro de correlaciones

	Base húmeda	Base seca
DPPH	0,979	0,740
NO	0,013	0,000
MDA	0,658	0,804
ERYCA	0,825	0,826
ROS	0,065	0,059
SW	0,125	0,223