

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

**ESTUDIO QUIMICO DEL AROMA DE LA GUAYABA (*Psidium guajava* L.
GENOTIPOS REGIONAL ROJA Y REGIONAL BLANCA) PROVENIENTE DE
LA HOYA DEL RIO SUAREZ**

DIANA CRISTINA SINUCO LEÓN

Tesis Doctoral en Ciencias Química

Dirigido por: Dr. Sc. CORALIA OSORIO R.

Bogotá, Octubre 30 de 2009

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.	i
SUMMARY	iii
INTRODUCCION.	v
1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA.	1
1.1 EL AROMA DE LAS FRUTAS.	1
1.2 METODOS DE ANALISIS DE COMPUESTOS ACTIVOS OLFATIVAMENTE.	3
1.2.1 Extracción de compuestos volátiles.	4
1.2.2 Detección de las zonas activas olfativamente por CG-O y AEDA.	9
1.2.3 Identificación de los compuestos activos olfativamente.	12
1.2.4 Cuantificación de los compuestos activos olfativamente.	14
1.2.5 Ensayos de recombinación y omisión.	17
1.3 COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES EN EL AROMA DE FRUTAS.	20
1.4 EL AROMA DE LA GUAYABA (<i>Psidium guajava</i> L.)	24
1.4.1 Generalidades de la fruta.	24
1.4.2 Estudios de volátiles libres en guayaba.	28
1.4.3 Cambios en el aroma por efecto de la maduración.	32
1.5 REFERENCIAS	34
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	41
2.1 MATERIAL VEGETAL Y CARACTERIZACIÓN	41
2.2 MATERIALES Y REACTIVOS	43

2.3 SINTESIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE REFERENCIA	44
2.3.1 Compuestos volátiles de referencia para identificación.	44
(<i>E</i>)-3-Hexenal (5)	44
(<i>Z</i>)-1,5-Octadien-3-ona (11)	45
2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (16 y 18)	45
Acetato de (3 <i>R</i> /3 <i>S</i>)-sulfanilhexilo (26) y (3 <i>R</i> /3 <i>S</i>)-sulfanil-1-hexanol (29)	47
<i>trans</i> -4,5-Epoxi-(<i>E</i>)-2-decenal (35) y <i>trans</i> -4,5-Epoxi-(<i>E</i>)-2-undecenal(38)	50
2.3.2 Síntesis de los compuestos marcados isotópicamente.	51
[1,1- ² H ₂]-3-Sulfanil-1-hexanol (29 <i>d</i>)	51
[1,1- ² H ₂]-Acetato de 3-sulfanilhexilo (26 <i>d</i>)	53
[² H ₃]-(<i>2R,3S</i>) y (<i>2S,3S</i>)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (16 <i>d</i> y 18 <i>d</i>)	53
[1,1- ² H ₂]-Alcohol cinamílico (45 <i>d</i>)	53
[1,1- ² H ₂]-Acetato de cinamilo (41 <i>d</i>)	54
[2,2,2- ² H ₃]-Butanoato de etilo (3 <i>d</i>)	54
[² H ₅]-Benzoato de metilo (22 <i>d</i>)	54
[² H ₅]-Benzoato de etilo (24 <i>d</i>)	54
[5,5,6,6- ² H ₄]-Hexanal (4 <i>d</i>)	54
[5,5,6,6,6- ² H ₅]-(<i>Z</i>)-3-Hexenal (6 <i>d</i>)	55
[7,7,8,8- ² H ₄]- <i>trans</i> -4,5-Epoxi-(<i>E</i>)-2-decenal (35 <i>d</i>)	55
([² H ₃]-Metiltio)propanal (metional) (14 <i>d</i>)	55
[² H ₃]-4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2 <i>H</i>)-furanona (21 <i>d</i>)	56
[¹³ C ₂]-4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2 <i>H</i>)-furanona (37 <i>c</i>)	56
[5,6- ¹³ C ₂]-3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5 <i>H</i>)-furanona o (¹³ C ₂)-sotolona (16 <i>c</i>)	56
2.4. EXPERIMENTOS DE IDENTIFICACION DE COMPUESTOS ACTIVOS OLFATIVAMENTE.	57
2.4.1 Extracción de componentes volátiles por SAFE.	57
2.4.2 Extracción de componentes volátiles por HS-MEFS.	58
2.4.3 Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) y AEDA comparativo.	58
2.4.4 HS-CG-O-AEDA.	59
2.4.5 Fraccionamiento por cromatografía en columna (CC).	59

2.4.5.1	Fraccionamiento de FNB.	59
2.4.5.2	Fraccionamiento de FNB para extracción selectiva de los tioles.	59
2.4.6	Determinación de la proporción de los ácidos 2 y 3-metilbutanoico.	60
2.4.7	Determinación de la distribución enantiomérica de los compuestos volátiles quirales.	61
2.4.8	Extracción de precursores cisteínizados en guayaba e hidrólisis.	61
2.5	EXPERIMENTOS DE CUANTIFICACIÓN	62
2.5.1	Determinación de la concentración de soluciones de compuestos marcados isotópicamente.	62
2.5.2	Obtención de los extractos de aroma para la cuantificación de compuestos activos olfativamente.	63
2.5.3	Cuantificación de acetato de 3-sulfanilhexilo.	63
2.5.4	Determinación de los factores de respuesta.	64
2.5.5	Determinación de la concentración de compuestos activos olfativamente.	64
2.5.6	Influencia del tiempo de homogenización.	65
2.6	MÉTODOS INSTRUMENTALES	65
2.6.1	CG-FID y CG-O.	65
2.6.2	CG-HS-EM.	66
2.6.3	CG-EM.	66
2.6.4	CGMD-EM.	67
2.6.5	HPLC.	68
2.6.6	RMN ¹H.	68
2.7	ANÁLISIS OLFATIVO	69
2.7.1	Determinación de umbrales de olor	69
2.7.1.1	Umbrales de olor en aire.	69
2.7.1.2	Umbrales de olor en agua.	69
2.7.2	Perfiles de aroma.	69
2.7.3	Ensayos de recombinación y omisión.	70

2.7.4	Análisis estadístico.	70
2.8	REFERENCIAS	70
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	73
3.1	EL AROMA DE LA GUAYABA VARIEDAD REGIONAL ROJA	73
3.1.1	Detección de los compuestos activos olfativamente-AEDA.	73
3.1.2	Identificación de los compuestos activos olfativamente.	80
3.1.3	Experimentos de cuantificación.	99
3.1.4	Experimentos de recombinación y omisión.	106
3.1.5	Cambios en el aroma de la guayaba durante la producción de bocadillo.	112
3.1.6	Consideraciones generales.	114
3.2	EL AROMA DE LA GUAYABA VARIEDAD REGIONAL BLANCA	117
3.2.1	Identificación de los compuestos activos olfativamente.	117
3.2.2	Experimentos de cuantificación.	122
3.2.3	Experimentos de recombinación y omisión.	123
3.2.4	Consideraciones generales.	125
3.3	CAMBIOS EN EL AROMA DE LA GUAYABA DURANTE LA MADURACIÓN	127
3.3.1	Maduración <i>in situ</i> .	127
3.3.2	Maduración poscosecha.	131
3.3.3	Consideraciones generales.	138
3.4	REFERENCIAS	140
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	144
	INDICE DE FIGURAS	147
	INDICE DE TABLAS	150
	ANEXO 1. Prueba sensorial	152

GLOSARIO NOTAS OLFATIVAS

AZUFRADA: Término usado para describir la sensación percibida por el sentido del olfato como pungente e irritante asociado con el aroma del huevo, el coliflor o los espárragos.

BLACK-CURRENT: Término usado para describir la característica olfativa asociada con la grosella negra (*Ribes nigrum* L.).

CARAMELO: Término usado para describir la característica olfativa derivada de la cocción del azúcar.

FRESCA: Término usado para describir productos que se encuentran en estado natural y que derivan connotaciones refrescantes asociadas al mentol.

FRUTAL: Término usado para describir la característica de sabor y olor de las frutas, el cual puede estar asociado a una fruta en particular.

ESPECIADA: Término usado para describir la sensación olfativa de condimentos o especias.

GRAPEFRUIT: Término usado para describir la característica olfativa de la toronja (*Citrus paradisi*), que algunas veces se asocia con el aroma del sudor humano.

METÁLICA: Término usado para describir un aroma que recuerda percepciones metálicas

RANCIO-QUESO: Término usado para describir la característica olfativa de los quesos maduros.

VERDE: Término usado para describir la característica olfativa derivada de cortar hierba o macerar hojas.

VIOLETA: Término usado para describir la fragancia característica de las violetas

LISTA DE ABREVIATURAS

AEDA: Aroma Extract Dilution Assay
AEDAc: Aroma Extract Dilution Assay comparativo
AT: Acidez Titulable
CC: Cromatografía en Columna
CCD: Cromatografía en Capa Delgada
CG: Cromatografía de Gases
CG-EM: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CG-FID: Cromatografía de Gases con detector de ionización llama
CGMD-EM: Cromatografía de Gases Multidimensional acoplada a Espectrometría de Masas; **CGMD-EM-O:** Cromatografía de Gases Multidimensional acoplada a Espectrometría de Masas y Olfatometría
CG-O: Cromatografía de Gases acoplada a Olfatometría
CGP: Cromatografía de Gases Preparativa
CHARM: Combined Hedonic Response Measurement
DVB/CAR/PDMS: Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano
DTT: Ditiotreitól
EM: Espectro de Masas
FA: Fracción Ácida
FD: Factor de Dilución
FID: Flame Ionization Detector
FNB: Fracción Neutra-Básica
FR: Factor de Respuesta
FT: Fracción de Tioles
HPLC: Cromatografía Líquida
HS: Headspace
HS-CG-EM: Análisis del *Headspace* mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas; **HS-MEFS:** *Headspace*- Microextracción en Fase Sólida
i: maduración *in situ*
IE: Impacto Electrónico
IQ: Ionización Química
IR: Índice de Retención
MEFS: Microextracción en Fase Sólida
OAV: Odor Active Value
p: maduración poscosecha
p-HMB: Ácido p-hidroximercuribenzoico
RMN ¹H: Resonancia Magnética Nuclear protónica
SAFE: Solvent Assisted Flavor Extraction
SIDA: Stable Isotopic Dilution Assay
SS: Sólidos Solubles

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos:

A la Universidad Nacional de Colombia-DIB, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a ASOHOFrucol, al DAAD y a Colciencias por la financiación que permitió la realización de esta tesis.

A la Dra. CORALIA OSORIO, investigadora principal del Grupo de Aditivos Naturales de Aroma y Color- GANAC por su dirección, acertada orientación y apoyo que me permitió llevar a cabo el presente trabajo, contribuyendo significativamente en mi formación profesional y personal.

Al Profesor Dr. PETER SCHIEBERLE y al Dr. MARTIN STEINHAUS, Senior Flavor Research, del Deutsch Forschungsanstalt Lebensmittelchemie de la Universidad Tecnológica de Munich (Alemania) por su invaluable colaboración en el entrenamiento en los métodos modernos en química de aromas, especialmente en el uso de los equipos y recursos para la cuantificación por SIDA.

A la Profesora ALICIA LUCIA MORALES de la Finca Las Alicias, Puente Nacional (Santander) por permitir el acceso a los cultivos de guayaba, seguimiento y recolección.

A la Profesora LUZ MARINA MELGAREJO y MARIA ELENA SOLARTE, del laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia y a CORPOICA-CIMPA, por la caracterización físico-química de los diferentes estados de madurez del material vegetal.

A mi familia y a mi esposo FREDDY ALEJANDRO RAMOS por brindarme su apoyo incondicional el cual me permitió concluir así una importante etapa de mi vida profesional.

A los compañeros del grupo GANAC por hacer más agradable el trabajo en el laboratorio y a todas aquellas personas que de una u otra manera me colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

En esta tesis se presenta el estudio químico del aroma de dos variedades de guayaba colombiana (*Psidium guajava* L.), regional roja y regional blanca, mediante el uso de una metodología analítica sistemática que contempla los siguientes pasos: 1. extracción suave de los compuestos volátiles por SAFE (Solvent Assisted Flavor Extraction); 2. detección de las zonas activas olfativamente por cromatografía de gases acoplada a olfatometría (CG-O) y aplicación del AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis); 3. identificación por comparación de las propiedades cromatográficas, espectrales y olfativas con sustancias de referencia; 4. cuantificación mediante el uso de estándares marcados isotópicamente (SIDA); y 5. verificación de los resultados analíticos por recombinación y determinación de los compuestos impacto por ensayos de omisión. La extracción SAFE fue complementada con el análisis del *headspace* de las frutas, para obtener información de aquellos compuestos de alta volatilidad.

Esta metodología permitió la detección de 52 zonas activas olfativamente y 34 zonas con actividad olfativa en los extractos de aroma de la variedad roja y blanca, respectivamente. Entre estos compuestos volátiles, 17 en la variedad roja y 13 en la variedad blanca se caracterizaron como los de mayor influencia en el aroma de estas frutas ya que presentaron valores de FD iguales o superiores a 32.

Para la identificación inequívoca de los compuestos responsables de esta actividad olfativa, se necesitaron las correspondientes sustancias de referencia, que para algunos compuestos requirió de su síntesis estereoespecífica. En este mismo sentido, el uso de la CGMD-EM constituyó una valiosa herramienta para la identificación de 9 compuestos nuevos en el aroma de la guayaba, presentes a nivel de trazas y cuyo aporte olfativo es importante para el aroma de esta fruta. Entre estos compuestos se destaca la presencia del 3-sulfanilhexanol (43% *3R* y 57% *3S*) y del acetato de 3-sulfanilhexilo (42% *3R* y 58% *3S*) y de los epimeros (*2R*, *3S*) y (*2S*, *3S*) del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (3:2).

Así se estableció que los compuestos de mayor actividad olfativa en el aroma de las dos variedades de guayaba son (en orden de elución cromatográfica): butanoato de etilo (frutal), hexanal (verde), (*Z*)-3-hexenal (verde), metional (papa cocida), 4-metoxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona (dulce), acetato de 3-sulfanilhexilo (*grapefruit*), 3-sulfanil hexanol (*black-currant*), *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-3-decenal (metálica), 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona (dulce), acetato de cinamilo (floral), 3-

hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona (especiado) y alcohol cinámico (floral). En el aroma de la variedad roja también son importantes por su contribución al aroma los compuestos: acetaldehído, (2*R*, 3*S*) y (2*S*, 3*S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo, benzoato de metilo y benzoato de etilo

La cuantificación de estos componentes mediante SIDA y la relación de la concentración con el valor umbral de olor de cada analito permitió establecer los valores OAV, los cuales indican el aporte efectivo al aroma global de la fruta de cada componente activo olfativamente y por ende las diferencias en la influencia olfativa de cada uno de los compuestos volátiles en el aroma de las dos variedades. Así, se determinó que el componente mayoritario en el extracto de aroma de las dos variedades fue el (*Z*)-3-hexenal, cuyo OAV es de 57000 en la variedad roja y de 17000 en la variedad blanca. En vista de la importancia olfativa de este compuesto el efecto de la homogenización y el tiempo de extracción en su generación y la de otros aldehídos C₆ fue evaluada. Se encontró que a mayor homogenización de la pulpa se libera una mayor cantidad de (*Z*)-3-hexenal.

En el aroma de la guayaba roja además del (*Z*)-3-hexenal, el 3-sulfanil-1-hexanol, acetato de 3-sulfanilhexilo, hexanal, butanoato de etilo y acetaldehído, presentaron los mayores valores de OAV. En la variedad blanca, los mayores OAV fueron para los compuestos (*Z*)-3-hexenal, acetato de 3-sulfanilhexilo, hexanal, 3-sulfanil-1-hexanol, butanoato de etilo, acetaldehído y 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona.

Finalmente mediante ensayos de recombinación y omisión, se logró establecer que los compuestos impacto del aroma de la guayaba regional roja y blanca son: hexanal y (*Z*)-3-hexenal responsables de la nota verde, acetato de 3-sulfanilhexilo y 3-sulfanil hexanol responsables de las notas *grapefruit* y *black-currant* respectivamente, butanoato de etilo responsable de la nota frutal, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona responsable de la nota dulce y acetato de cinámico responsable de la nota floral.

Adicionalmente se evaluó el efecto de la maduración en la distribución de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba. En las dos variedades se observó el mismo comportamiento en cuanto a la disminución en el contenido de aldehídos C₆, en contraste con el aumento de ésteres y compuestos furánicos con el transcurso de la maduración. También se estableció que el contenido de los compuestos azufrados 3-sulfanilhexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo depende del grado de madurez de la fruta.

SUMMARY

This work on the aroma of pink and white guava fruits provided an example of a systematic approach for the identification of the key odorants in food. Following the steps: 1) gentle isolation of volatiles, 2) gas chromatography-olfactometry and aroma extract dilution analysis (AEDA), 3) exact quantitation of odorants with high FD-factors by stable isotope dilution analysis (SIDA), 4) calculation of odor activity values (OAVs), 5) aroma reconstitution, and omission tests, was possible to identify the key aroma compounds in both varieties. SAFE extraction was complemented with headspace extraction.

We obtained 52 and 34 odor active regions in red and white guavas respectively. 17 compounds in red fruits and 13 in white fruits were the most important in each fruit because their FD values were higher than 32.

The identification of odor active compounds was made by comparison reference substances which were synthesized in some cases stereospecifically. GCMD-ME was a tool to identify 9 new compounds in guava aroma, which were present in very low amounts but with an important flavor. This compounds are 3-sulfanyl-1-hexanol (43% *3R* y 57% *3S*), 3-sulfanylhexyl acetate (42% *3R* y 58% *3S*), methyl (*2R*, *3S*)-2-hydroxy-3-methylpentanoate and methyl (*2S*, *3S*)-2-hydroxy-3-methylpentanoate (3:2), methional, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-undecenal, (*Z*)-1,5-octadien-3-one and 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(*5H*)-furanone.

The results of the identification experiments in combination with the FD factors revealed ethyl butanoate (fruity), hexanal (grassy), (*Z*)-3-hexenal (grassy), methional (potato), 4-methoxy-2,5-dimethyl-3(*2H*)-furanone (sweet), 3-sulfanyl acetate (*grapefruit*), 3-sulfanyl-1-hexanol (*black-currant*), *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (metallic), 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(*2H*)-furanone (sweet), cinnamyl acetate (floral), 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(*5H*)-furanone (especiado) and cinnamyl alcohol (floral) as important aroma contributors in both fruits. In red flesh fruit are also important methyl (*2R*, *3S*)-2-hydroxy-3-methylpentanoate and methyl (*2S*, *3S*)-2-hydroxy-3-methylpentanoate, methyl benzoate and ethyl benzoate.

Seventeen aroma-active volatiles were quantified by stable isotope dilution assays (SIDA). On the basis of the quantitative data and odor thresholds in water, odor activity value. (OAV: ratio of concentration to odor threshold) were calculated. High OAVs were determined for the green, grassy

smelling (Z)-3-hexenal and the grapefruit like smelling 3-sulfanyl-1-hexanol followed by 3-sulfanylhexyl acetate (black currant like).

Studies on the time course of odorant formation in guava puree or cubes, respectively, showed that (Z)-3-hexenal was hardly present in the intact fruits, but was formed very quickly during crushing. The aroma of fresh guava fruit cubes, which showed a very balanced aroma profile was successfully mimicked in a reconstitute consisting of 13 odorants in their naturally occurring concentrations. An omission test, in which single odorants were omitted from the entire aroma reconstitute, revealed (Z)-3-hexenal, 3-sulfanyl-1-hexanol, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, 3-sulfanylhexyl acetate, hexanal, ethyl butanoate, cinnamyl acetate and methional as the key aroma compounds in pink and white guavas.

Quantitation of selected aroma compounds followed by aroma re-engineering experiments finally showed that the set of key aroma compounds in the white guavas was virtually the same as that in pink guavas, but odorant concentrations showed some differences. White guavas exhibited higher amounts of sweet caramel-like 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, but lower values for the majority of other important aroma contributors, including 3-sulfanyl-1-hexanol and 3-sulfanylhexyl acetate, responsible for the characteristic sulfury-tropical aroma note

Additionally, changes of odour-active compounds in two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) fruits during their ripening were followed by stable isotopic dilution analysis (SIDA). A typical behavior for the production of volatile compounds during the ripening process was found. Thus, the concentration of C₆-aldehydes, as well as, the amount of sulfur compounds 3-sulfanylhexyl acetate and 3-sulfanyl-1-hexanol decreased while the concentration of aliphatic esters and furanic compounds increased during this process. The comparison between odor active values (OAVs) was introduced as a tool to establish changes in odor active compounds during ripening. The OAVs showed that even the amount of C₆-aldehydes decreased during ripening, their sensory contribution to the overall aroma of guava was the most important in all the ripening stages, followed by the contribution of thiol compounds. The changes in odour-active compounds in white- and pink-fleshed guavas showed the same behavior, even when the fruits were analyzed after *in situ* and postharvest ripening.

INTRODUCCION

En la actualidad la globalización de los mercados ha permitido que las frutas tropicales lleguen a los países subtropicales, cautivando importantes posibilidades del mercado para los países productores. Para un país como Colombia, clasificado entre los de mayor biodiversidad en el mundo y uno de los cinco principales productores de frutas tropicales, estas posibilidades motivan el desarrollo de investigaciones en pro del conocimiento y aprovechamiento de las especies nativas.

El Grupo de Aditivos Naturales de Aroma y Color (GANAC) ha enfocado sus esfuerzos en el estudio de especies frutales priorizadas por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural con el fin de ofrecer alternativas para el aprovechamiento y el desarrollo de productos innovadores con valor agregado a partir de estas especies. Es así como la presente tesis doctoral está enmarcada en el programa de investigación “Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba para el fortalecimiento de la cadena productiva” y específicamente en el proyecto “Desarrollo de aditivos naturales de aroma y color a partir de frutas de guayaba”.

En nuestro país la guayaba regional roja y regional blanca se producen de manera silvestre en pequeñas unidades de economía campesina con áreas menores a 2 Ha, en diversos ecosistemas andinos que van desde el nivel del mar hasta los 1900 m.s.n.m. Los departamentos de mayor producción de guayaba son: Santander, Boyacá, Tolima, Meta y Valle del Cauca; entre ellos, el departamento de Santander posee el mayor número de hectáreas cultivadas (4132 Ha) con una producción anual que alcanza las 41.000 toneladas y que constituyen un 30,57% de la producción nacional.¹

Una de las zonas de mayor producción de guayaba en Colombia está ubicada en el agroecosistema de la Hoya del Río Suárez conformado por 16 municipios entre los cuales se destacan: Vélez, Guavatá, Barbosa, Puente Nacional y Moniquirá donde se cultiva principalmente las variedades regional roja y regional blanca.² La mayoría de las plantaciones de guayaba de esta región son artesanales o de subsistencia, es decir, que no son tecnificadas y se enmarcan en una economía campesina, donde buena parte de la mano

de obra es familiar. Los excedentes o ganancias por la venta de la fruta son bajos y no acumulables debido a la baja calidad de la fruta y a que la producción de guayaba sale regularmente en una misma época del año lo que ocasiona algunas veces una sobre oferta.²

La calidad organoléptica de la guayaba se afecta significativamente durante el manejo poscosecha, bien sea en la recolección, el transporte o el almacenamiento que reducen su vida útil. Las pérdidas en todo el proceso de comercialización alcanzan valores de alrededor de un 8% al 15% del total de la carga.³

Tradicionalmente, la guayaba que no se consume en fresco se emplea en la fabricación del bocadillo, aprovechando sus características físico-químicas (contenido de sólidos solubles pectina) y sus características organolépticas (aroma y sabor). Sin embargo, no toda la fruta es útil para este proceso, pues dependiendo del estado de madurez de la misma se tendrá diferente contenido de pectina y de aroma. Así se ha observado que las guayabas verdes o pintonas no son aptas porque no han desarrollado el aroma, el color ni la cantidad de pectina adecuados para su procesamiento, mientras que las frutas sobremaduras producen una pasta de consistencia blanda.⁴

Entre los parámetros de calidad el cambio en el aroma es evidente, razón por la cual es necesario conocer su composición y así ofrecer posibles alternativas de manejo tecnológico para preservar las propiedades sensoriales de la fruta. Con estos antecedentes, al comenzar el presente estudio, se propusieron como objetivos específicos analizar cualitativa y cuantitativamente los componentes volátiles con actividad olfativa presentes en el aroma de la guayaba (*Psidium guajava*) variedad regional roja y regional blanca provenientes de la Hoya del Río Suarez y evaluar la influencia del estado de madurez en la producción de estos compuestos.

Actualmente, en química de aromas es bien aceptado que solo un limitado número del total de componentes volátiles presentes en un alimento son responsables de su aroma. Es por ello que el estudio minucioso del aroma involucra múltiples etapas que emplean como factor determinante el aporte sensorial de los constituyentes al aroma total del alimento.⁵ En

este sentido implementar el uso de una metodología sistemática en el grupo de investigación GANAC se convirtió en una necesidad. Es así como el desarrollo de la presente tesis doctoral permitió la adecuación del equipo SAFE para la extracción de volátiles, el perfeccionamiento de los análisis por CG-O y AEDA y la implementación de ensayos de recombinación y omisión en nuestro grupo de investigación, para confirmar la influencia olfativa de los compuestos volátiles en el aroma de un alimento.

Referencias

1. AGRONET, 2009. www.agronet.gov.co. Exportaciones del sector agropecuario 1991-2009. Guayabas frescas o secas. Consultada en octubre de 2009.
2. CCI, 2009. www.cci.org.co/publicaciones. Producción de guayaba y sus usos. Consultada en octubre de 2009.
3. CCI, 2009. www.cci.org.co/publicaciones. Actividades en la comercialización de la guayaba. Consultada en octubre de 2009.
4. CCI, 2009. www.cci.org.co/publicaciones. Bocadillo, dulce tradicional a partir de la guayaba. Consultada en octubre de 2009.
5. Molyneux, R..J., Schieberle, P., Compound identification: A Journal of Agricultural and Food Chemistry perspective. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 4625-4629.

1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1.1 EL AROMA DE LAS FRUTAS

Las frutas poseen características de aroma, sabor y textura típicas, las cuales son generadas por diversas rutas metabólicas durante los procesos de maduración (Reineccius, 2006). Esta combinación de las sensaciones percibidas por los sentidos olfativo, gustativo y trigeminal y la respuesta del proceso cognitivo que de estas señales se realice se denomina *flavor*¹ (Holley, 2006; Reineccius, 2006). De este conjunto de percepciones la más importante es el aroma, sin la cual es muy difícil identificar el *flavor* de un alimento; por este motivo el estudio del *flavor* se ha concentrado en la búsqueda e identificación de los componentes volátiles responsables de esta percepción sensorial.

El aroma de un alimento es una mezcla compleja de compuestos volátiles en una variedad de proporciones que exhiben diferentes estructuras y que son generados durante los procesos de maduración, almacenamiento o procesamiento. Es así como su estudio constituye un aporte valioso al conocimiento y desarrollo de procesos biológicos y/o tecnológicos, como por ejemplo: la determinación de rutas involucradas en la biogénesis de compuestos volátiles; la definición de los mejores estadios de cosecha; o el establecimiento de las mejores condiciones del manejo poscosecha. Así mismo, con estos estudios es posible establecer las variables que favorecen la producción u omisión de ciertos compuestos volátiles con miras a mejorar la calidad sensorial de los productos obtenidos.

Como parte del estudio de la composición del aroma de diversos alimentos, se han publicado listados de centenares de **compuestos volátiles**; sin embargo, solo un número limitado de estos componentes pueden ser considerados como **compuestos volátiles activos olfativamente (odor-active volatiles)** por cuanto se encuentran en una concentración superior a su **valor umbral de olor (*odor-threshold*)**, es decir en una concentración superior a la mínima necesaria para ser detectados por el sentido del olfato humano. Entre estos compuestos pueden existir algunos que por si mismos recuerdan el aroma de la fruta o del alimento y se denominan **compuestos impacto (*character impact*)**

1. *Flavor*: término del idioma inglés usado para definir la sensación simultánea causada por los sentidos trigeminal, del gusto y el olfato. No tiene equivalente en español.

aroma compounds) (Belitz, et al, 2009) y otros que se generan durante el procesamiento y que causan una nota sensorial desagradable en el aroma global, los cuales se denominan **compuestos *off-flavor***. Estos últimos usualmente se constituyen en tema de investigación ya sea para establecer las causas de su formación o para buscar soluciones que permitan eliminar su influencia olfativa, ya que a pesar de estar en muy baja cantidad y muchas veces no ser detectados por métodos instrumentales, su influencia sensorial es significativa.

La detección de los componentes activos olfativamente puede hacerse mediante el sentido del olfato (ortonasal) o del gusto (retronasal). El valor umbral de olor está afectado por la presión de vapor del compuesto y está relacionado con la composición de la matriz del alimento. Así, estos valores se determinan en un medio de disolución que represente la matriz original (Holley, 2006). Entre los medios más comunes para determinar valores umbral de olor se encuentran el agua, el aire, el aceite, las soluciones etanólicas, etc. Para este fin un grupo de panelistas entrenados determinan la mínima concentración necesaria para percibir el aroma del analito usando una prueba de análisis sensorial triangular. En la tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de valores de umbral de olor de compuestos volátiles en agua y su comparación con los correspondientes valores determinados en aire.

Tabla 1.1. Valores umbral de olor de ciertos compuestos volátiles en agua y en aire.

(Tomado de: Belitz, et al, 2009)

Compuesto	Valor umbral de olor	
	En agua ($\mu\text{g/L}$)	En aire (ng/L)
β -Damascenona	0,002	0,003
Metional	0,2	0,12
3-Metilisoborneol	0,03	0,009
2-Acetil-1-pirrolina	0,1	0,02
4-Vinilguayacol	5	0,6
Linalol	6	0,6
Vainillina	20	0,9
4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	30	1,0

Este ejemplo ilustra las diferencias entre los valores de umbral de olor de diferentes compuestos en la misma matriz, los cuales varían en un amplio rango de órdenes de magnitud. Además, los datos muestran que la mayoría de los valores de umbral de olor son mucho más bajos en aire que en agua debido a que los compuestos fueron analizados en un estado completamente vaporizado (Belitz, et al 2009). También se puede observar como compuestos polares como la 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, la vainillina y el linalol requieren de una mayor concentración para ser detectados en agua con respecto a su valor umbral en aire. En general puede decirse que el valor umbral de olor depende del medio en el que se determina, del protocolo de ensayo y de la capacidad de los panelistas, motivo por el cual estos valores generalmente se expresan en un rango y son de uso limitado únicamente a productos estudiados bajo las mismas condiciones en las que fueron ensayados (Noble, 2006).

1.2 METODOS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS ACTIVOS OLFATIVAMENTE

El estudio del aroma comprende varios factores que constituyen un reto analítico. Entre estos factores se encuentran la baja sensibilidad de la instrumentación analítica comparada con la alta sensibilidad del sentido del olfato, el cual tiene un límite de detección teórico cercano a 10^{-19} moles (Reineccius, 2006), nivel mucho menor que cualquier detector instrumental, lo cual sumado al amplio rango de concentraciones en las cuales se encuentran los componentes responsables del aroma (0,1-15mg/kg), la diversidad de funciones químicas, el gran número de componentes y la inestabilidad de algunos analitos, conllevan a que un solo método de separación o análisis no sea suficiente para proveer un panorama completo de los componentes responsables del aroma.

Además, estas características hacen que el análisis de todos los componentes del aroma de un alimento merezcan un estudio “bioguiado” para enfocar los esfuerzos de identificación y cuantificación en aquellos componentes volátiles capaces de interactuar con las proteínas receptoras en el bulbo olfativo humano y determinar así los compuestos activos olfativamente y diferenciar aquellos que son clave en el aroma del alimento (Molyneux y Schieberle, 2007).

El uso de la metodología sistemática implementada en el Instituto de Química de Alimentos (DFL) de la Universidad Tecnológica de Munich (Alemania) por el grupo del profesor Dr. Peter Schieberle, ha permitido establecer con éxito la identidad y la cantidad de los compuestos responsables del aroma de diversas frutas y alimentos. Dicha metodología contempla los siguientes pasos: 1. Extracción suave de los componentes volátiles mediante SAFE; 2. detección de las zonas activas olfativamente por CG-O y AEDA; 3. Identificación de los compuestos, 4. cuantificación y 5. ensayos de recombinación y omisión (Schieberle, 1995). Estas etapas metodológicas se describirán brevemente a continuación.

1.2.1 Extracción de compuestos volátiles. La selección de un método de extracción depende del propósito del estudio del aroma. Por ejemplo, si se busca determinar un componente *off-flavor* el proceso de extracción se enfocará en la obtención de dicho analito; mientras que si el objetivo es establecer el aroma global del alimento se requerirá de una o varias técnicas que representen lo más cercanamente posible el aroma global; o si se desea analizar el aroma de un producto como el té o el café se debe involucrar un método que utilice tratamiento térmico.

El análisis de los compuestos de un aroma comienza con la separación de la fracción volátil a partir del alimento. Para el estudio del aroma global, es imprescindible que el aroma del extracto sea idéntico o al menos muy similar al del alimento objeto de estudio y que no haya cambiado por transformaciones térmicas o enzimáticas. De tal forma que mediante una evaluación olfativa primero se debe confirmar que el extracto obtenido cumpla esta condición antes de hacer cualquier otro análisis químico (Schieberle, 1995).

Entre las técnicas comúnmente usadas se pueden contar procesos de concentración del *headspace* (HS), extracción por procesos de absorción y métodos con solventes por extracción o destilación.

Las técnicas de concentración del HS y los procesos de absorción como la MEFS dependen de la volatilidad y de los coeficientes de partición del analito entre la fase gaseosa o la fase de extracción y la matriz del alimento. A mayor coeficiente de partición, mayor

será la extracción del analito. En el caso de la MEFS la eficiencia de la extracción también depende de la relación de fase, es decir la relación de la cantidad de analito en la fase acuosa y la cantidad de analito en la fase de extracción.

El procedimiento para *headspace* consiste en colocar una cantidad de muestra en un vial herméticamente sellado a una temperatura determinada durante un tiempo en el que se alcanza un equilibrio entre los volátiles en la matriz del alimento y la fase gaseosa. Un volumen determinado de esta fase gaseosa se toma con una jeringa, que se inyecta en un cromatógrafo de gases equipado con un puerto de inyección criogénico en el que se concentran los componentes volátiles y que luego se transportan a la columna por una corriente de gas de arrastre (Figura 1.1).

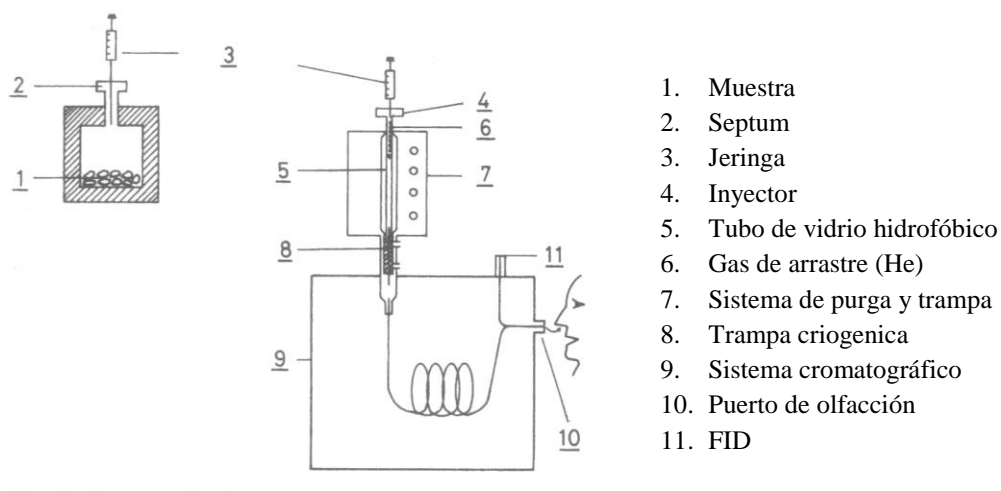


Figura 1.1 Esquema del equipo para extracción de componentes volátiles por *headspace*.
 (Tomado de Belitz, et al 2009)

El alto volumen de gas inyectado y el alto contenido de vapor de agua hacen que la separación cromatográfica sea poco eficiente y sólo los componentes mayoritarios sean detectados por el sistema de detección, que generalmente es FID, EM u olfatometría. Este método es muy útil en la determinación de analitos de alta volatilidad, como metanotiol o acetaldehído, los cuales se pierden durante los procesos de extracción y concentración o coeluyen con el solvente durante el análisis cromatográfico.

El método HS-MEFS, desarrollado por Pawliszyn y colaboradores (Pawliszyn, 1997, Kataoka et al, 2000) consiste en el uso de un material (absorbente o adsorbente) que se ubica en el *headspace* de la muestra o se sumerge directamente en la muestra. Los compuestos así retenidos son liberados del material por tratamiento térmico y un flujo de gas en el puerto de inyección de un CG como se muestra en la figura 1.2.

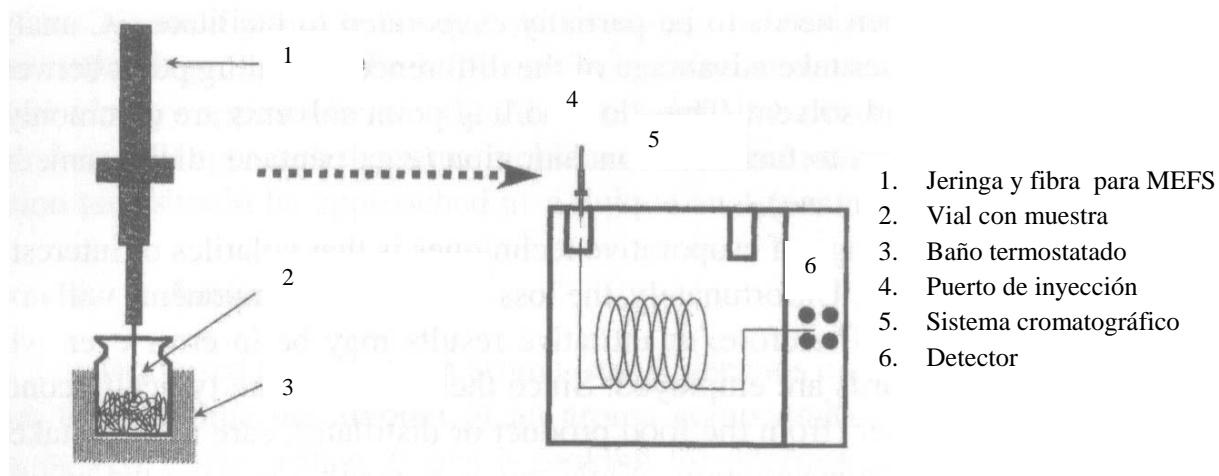


Figura 1.2 Esquema del equipo para extracción por HS-MEFS.
 (Tomado de: Reineccius, 2006)

Como una de las principales ventajas de la técnica de MEFS se tiene que no requiere el uso de alta temperatura o presión, ni de solventes o equipo sofisticado para la extracción de la fracción volátil de un alimento (Eisert y Pawliszyn, 1997). Los resultados obtenidos por MEFS dependen de la composición de la matriz y de las condiciones del proceso de extracción tales como: el tipo de material usado para la retención de componentes volátiles, la forma de muestreo (en el *headspace* de la muestra (HS-MEFS) o por inmersión directa), la temperatura y el tiempo de exposición de la fibra, entre otras. La optimización de estos parámetros incrementa la sensibilidad y el porcentaje de recuperación de los analitos; sin embargo, cada cambio en los parámetros de extracción tiene un efecto en la velocidad de división y de adsorción, lo cual tendrá una influencia en la reproducibilidad y repetibilidad de la extracción (Pawliszyn, 1997). La incorporación de un estándar interno en la matriz de análisis y el uso de tiempos de muestreo constantes, usualmente conlleva a buenas correlaciones cuantitativas (Harmon, 2002). Actualmente se han desarrollado diversos

métodos de calibración para el análisis cuantitativo de muestras ambientales, de alimentos y muestras biológicas (Ouyang y Pawliszyn, 2008).

Sin embargo, los métodos de extracción por HS y HS-MEFS son selectivos, razón por la cual los extractos así obtenidos muchas veces no son representativos del aroma global del alimento bajo estudio. En general las técnicas aplicadas para la extracción de componentes de aroma no deben discriminar ningún componente, las condiciones de extracción no deben alterar la estructura original del aroma y los componentes no volátiles deben ser completamente removidos del extracto (Engel et al, 1999).

Un método de extracción que cumple estos requisitos, es la extracción con solventes. Entre los métodos con solventes se destacan el uso de la extracción L-L (Drawert y Rapp, 1968) y la destilación por arrastre con vapor extracción simultanea con solvente orgánico (DES) (Flath y Forrey, 1977). Estos métodos presentan dificultades en alimentos ricos en lípidos, pues junto con los componentes volátiles se extrae una gran cantidad de triglicéridos, fosfolípidos y ceras que producen un extracto de aroma con una base lipídica, lo cual impide la concentración efectiva de los compuestos de aroma y su posterior análisis cromatográfico (Reineccius, 2006).

Por esta razón el uso de la extracción con solventes se ha combinado con procesos de destilación a alto vacío, con el fin de transferir los componentes volátiles del alimento por acción del vacío a una serie de trampas frías donde son condensados, logrando remover así el material no volátil (Schieberle, 1995). Es así como Engel y colaboradores diseñaron un equipo de extracción que involucra la destilación a presión reducida de un extracto orgánico del alimento, lo cual elimina el calentamiento de la muestra o el solvente y permite obtener extractos libres de sustancias no volátiles especialmente ácidos grasos y pigmentos (Engel, et al, 1999). En la figura 1.3 se presenta el diagrama de este equipo conocido comúnmente como SAFE (Solvent Assisted Flavor Extraction).

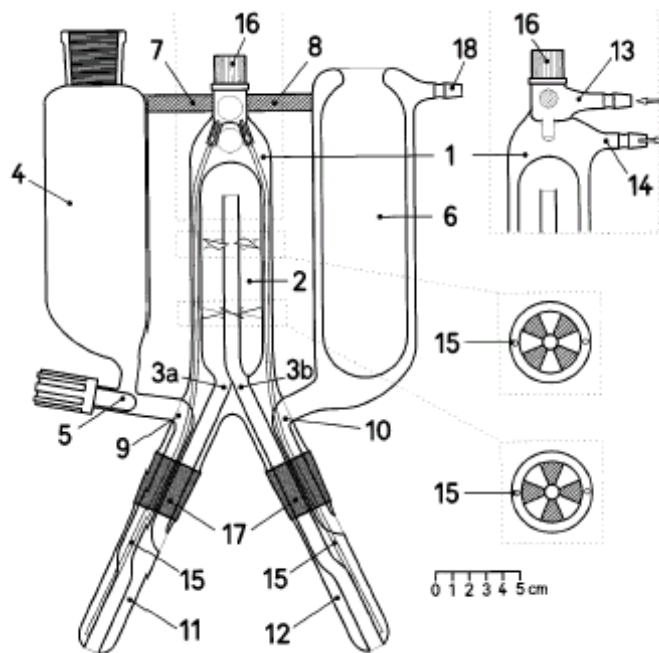


Figura 1.3. Esquema del equipo para extracción de aroma asistida por solvente (SAFE).
(Tomado de: Engel, et al, 1999)

El equipo SAFE consta de un embudo de adición (4), una trampa fría (6) y una cabeza central (2) de la cual se desprenden dos tubos de vidrio (11 y 12) equipados con una sección esmerilada (17), a la cual se conectan herméticamente dos balones. El balón conectado al extremo del embudo de adición se coloca en un baño termostático a 40°C, mientras que el segundo balón conectado a la trampa fría se coloca sobre un baño con nitrógeno líquido. La cabeza y los tubos de vidrio se encuentran completamente termostatados a 40°C con agua que ingresa hasta el fondo de los tubos de vidrio mediante tubos de polietileno (15) asegurando una temperatura homogénea. El equipo se conecta por el extremo 18 a una bomba de alto vacío a una presión de 10^{-3} Pa.

La destilación se inicia cuando desde el embudo de adición se dejan caer gotas que debido a la presión se atomizan. Los volátiles y el solvente son transferidos por medio del tubo 3a dentro de la cabeza de destilación (2). El destilado, a través del tubo 3b entra en el balón donde el solvente y los componentes volátiles son condensados por acción del nitrógeno líquido. De esta forma se obtiene un extracto incoloro, libre de componentes no volátiles que usualmente posee el olor característico del alimento.

Como se observa tanto los métodos de concentración del *headspace*, como de absortividad y extracción con solventes son complementarios entre sí, pues dada la variedad de la naturaleza química de los componentes responsables del aroma, cada técnica puede extraer diferentes componentes cuyo aporte al aroma debe ser caracterizado. En este trabajo se utilizaron las tres metodologías para el estudio del aroma de la guayaba.

1.2.2 Detección de las zonas activas olfativamente por CG-O y AEDA. En la pasada década, el estudio del aroma ofrecía como resultado listados de cientos de componentes volátiles. Sin embargo, actualmente las investigaciones en química de aromas se han enfocado solo sobre aquellos componentes que aportan una nota olfativa al aroma global del alimento bajo estudio, es decir aquellos que se encuentran en concentraciones superiores a su valor umbral de olor.

Para ello es necesario hacer un *screening* del extracto de aroma, el cual se logra mediante el análisis por CG-Olfatometría (CG-O) en por lo menos dos fases estacionarias diferentes. Convencionalmente un CG posee un sistema de detección instrumental, sin embargo en el CG-O este sistema es dual, por cuanto se conserva la detección instrumental (FID) y se adiciona un segundo detector, el cual no es más que la nariz de un panelista entrenado permitiendo así establecer una relación entre la señal instrumental y la percepción olfativa (d'Acampora Zellner, et al, 2008; Acree y Bernard, 1994; Mayol y Acree, 2001). Dado que la respuesta del FID es proporcional al número de enlaces C-C, mientras que la respuesta del olfato esta relacionada con el entrenamiento y capacidad olfativa del panelista, es posible observar que señales imperceptibles por el FID posean una nota olfativa importante en el aroma, o que algunas señales intensas en el FID no posean ninguna nota olfativa reconocible por el olfato humano (Reineccius, 2006).

Es por ello que el análisis por CG-O constituye una herramienta invaluable en la identificación certera de ciertos isómeros cuya comparación de los datos cromatográficos (IR) y espectrales (EM) con sustancias de referencia no basta para lograr este propósito. Como ejemplo, en la figura 1.4 se observa que los espectros de masas e índices de retención

en dos fases estacionarias de las pirazinas isoméricas 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina y 3-metoxi-2,5-dimetilpirazina, son idénticos y prácticamente indistinguibles.

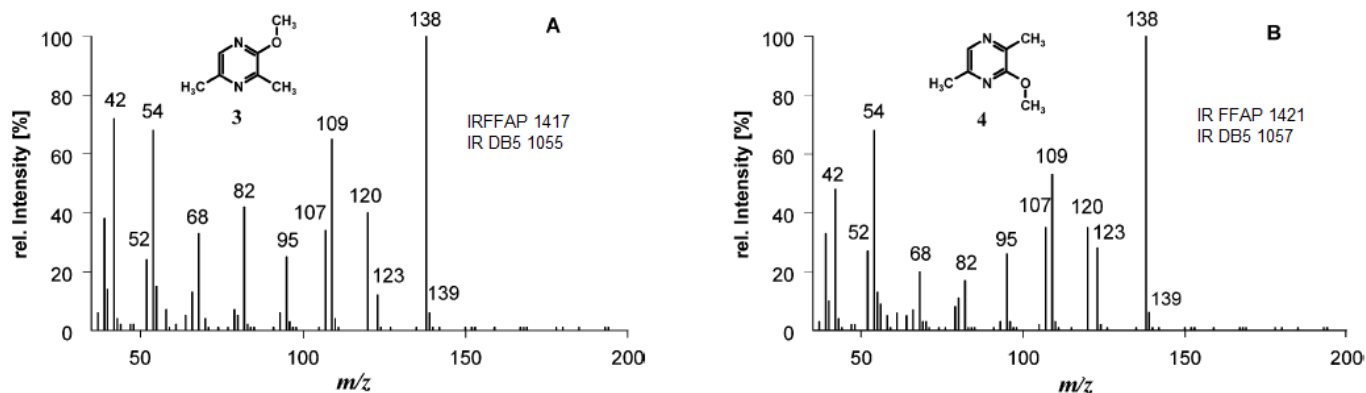


Figura 1.4 Espectro de masas (IE) de las pirazinas isoméricas: A. 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina y B. 3-metoxi-2,5-dimetilpirazina. (Tomado de: Molyneux y Schieberle, 2007)

En este caso solo mediante las diferencias en las cualidades de aroma de estos isómeros se logró la identificación correcta. Mientras que el isómero A presenta una alta actividad sensorial marcada por un bajo valor de umbral de olor (0,001ng/L en aire) y una nota olfativa descrita como aroma terroso, el isómero B posee una menor actividad sensorial (valor de umbral de olor 56 ng/L en aire) y exhibe una nota olfativa que recuerda el aroma de las arvejas (Czerny y Grosch, 2000).

La percepción del aroma en el eluyente cromatográfico depende de varios factores tales como la cantidad de alimento extraído, el grado de concentración de la fracción volátil y la cantidad de muestra separada por CG. Estas limitaciones pueden ser eliminadas mediante un análisis por CG-O de una serie de diluciones del extracto de aroma. Esta técnica recibe el nombre AEDA (Aroma Extract Dilution Assay) (Ullrich y Grosch, 1987; Grosch, 1994) y permite establecer la contribución individual de los diferentes compuestos presentes en una mezcla compleja de aroma y su relación con un parámetro físico reproducible como es el índice de retención. En este método el aporte sensorial de cada compuesto puede ser determinado sin necesidad de conocer la estructura química del mismo (Schieberle, 1995).

Usualmente, el AEDA se realiza mediante la dilución del extracto original en un factor de 2^n y el respectivo análisis por CG-O de las diversas diluciones hasta que ningún odorante sea percibido olfativamente en el eluyente cromatográfico. La dilución más alta a la cual un compuesto puede ser detectado se define como el factor de dilución de aroma (FD, *flavor dilution factor*) (Belitz, et al, 2009; Grosch, 1994). Los resultados de este análisis se presentan en un diagrama logarítmico FD vs. IR, denominado cromatograma FD.

Este análisis también se puede aplicar en la detección de cambios en el aroma de los alimentos durante la maduración o el almacenamiento. Así, mediante un análisis AEDA comparativo (AEDAc), en el cual la misma cantidad de alimento, es extraída por el mismo método de separación y cuyos extractos se concentran a un mismo volumen y se analizan por CG-O usando el mismo volumen de inyección. Asumiendo pérdidas idénticas en los procesos de extracción y comparando un componente activo olfativamente de alto FD, se pueden observar los cambios en su concentración e indicar cuales odorantes son los principales responsables en las diferencias de aroma.

Una variante más elaborada del análisis de dilución de aroma, desarrollada por Acree y Bernard (1984), analiza una serie de diluciones 3^n por CG-O y la percepción del panelista es registrada mediante un *software* en el que se almacena la respuesta según el tiempo de retención y la duración del estímulo sensorial percibido. Así se calculan los valores CHARM (*combined hedonic response measurement*) como la integración del área bajo la curva del pico obtenido. En la figura 1.5 se presenta un esquema de este método.

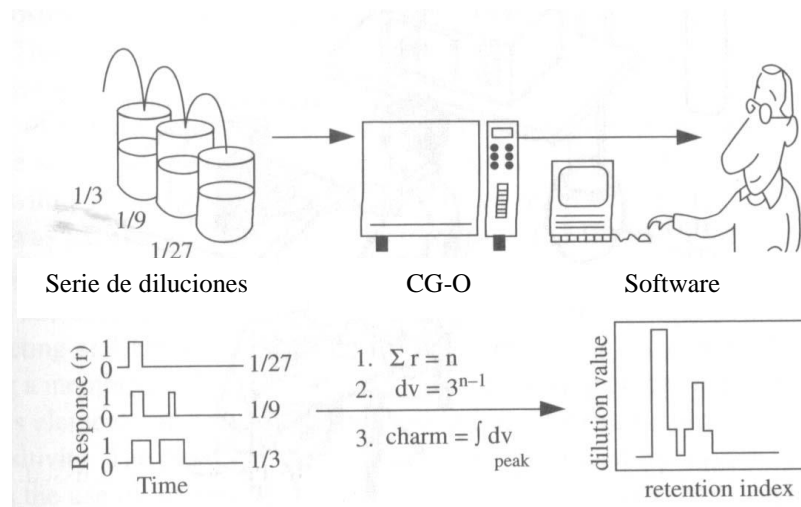


Figura 1.5 Esquema del sistema de análisis CHARM (Tomado de Reineccius, 2006)

Los dos métodos proponen que a mayor FD o valor CHARM, mayor será el aporte del componente al aroma global del alimento y que sobre estos compuestos se deben enfocar los esfuerzos de identificación y cuantificación; sin embargo, la detección en CHARM es continua mientras la detección del AEDA es discreta.

1.2.3 Identificación de los compuestos activos olfativamente. La identificación de los compuestos activos olfativamente involucra la comparación de los siguientes parámetros: los índices de retención en al menos dos columnas de diferente polaridad, el valor del umbral de olor, la nota olfativa y el espectro de masas de los analitos contra los obtenidos para sustancias de referencia bajo las mismas condiciones de estudio. Si el componente de referencia no se encuentra disponible, se requiere realizar su síntesis para corroborar esta identificación mediante la comparación de los parámetros analíticos y olfativos antes mencionados e inclusive la comparación de sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Molyneux y Schieberle, 2007).

Con el fin de disminuir la complejidad de los extractos de aroma, algunas veces es conveniente fraccionar el extracto según la naturaleza de los analitos (ácida y básica o neutra; polares o apolares) o por selección de grupos funcionales específicos (mercaptanos, pirazinas, etc) para los cuales se recurre al fraccionamiento por cromatografía en columna

(CC), cromatografía de gases preparativa (CGP) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Belitz, et al, 2009).

En otras ocasiones, los componentes volátiles son muy activos a bajas concentraciones, lo cual impide la adquisición de un buen espectro de masas que permita su identificación. En estos casos, la cromatografía de gases multidimensional (CGMD) surge como herramienta para el enriquecimiento de estos componentes. Esta técnica consiste en la separación cromatográfica en línea de los componentes de un extracto en dos columnas al conectar en serie dos cromatógrafos de gases con un sistema de división y una línea de transferencia termostatable. Una fracción del eluyente cromatográfico de la primera columna (polar) es introducida en la segunda columna (apolar) logrando una resolución completa de la mezcla. Este desarrollo ha sido aplicado al estudio del aroma de frutas tropicales por detección con espectrometría de masas y olfatometría (CGMD-EM-O) y ha permitido por ejemplo la identificación de la 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona y el 2-metilbutanoato de etilo como compuestos impacto en el aroma de la piña (Tokitomo et al., 2005).

Esta técnica también ha sido utilizada en el análisis de la estereoquímica de compuestos volátiles quirales, reemplazando la segunda columna cromatográfica por una con fase quiral (por ejemplo β -ciclodextrinas). Estas determinaciones son muy importantes en la caracterización del aroma por cuanto la intensidad y la nota sensorial de un enantiómero puede ser completamente diferente a las de su antípoda (Bentley, 2006). La configuración absoluta y la relación enantiomérica (expresada como exceso enantiomérico), son herramientas muy útiles en la evaluación de la autenticidad de productos naturales (Belitz et al, 2009). En la figura 1.6 se muestran los perfiles cromatográficos de la *trans*- α -ionona en jugo de frambuesa natural y artificial.

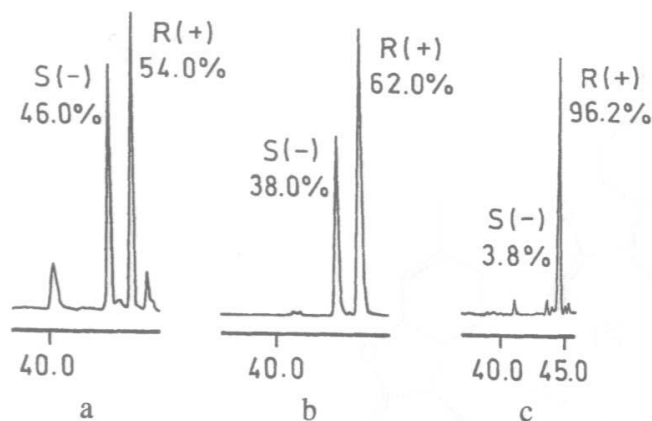


Figura 1.6 Análisis enantioselectivo de *trans*- α -ionona en jugo de frambuesa a. y b. artificiales y c. natural. (Tomado de Belitz, 2009)

Estos resultados muestran que mientras en el aroma del jugo natural se obtiene principalmente la forma enantiomérica *R*(+), en el aroma artificial se encuentra la mezcla racémica de los enantiómeros. Este ejemplo ilustra como esta técnica permite la detección de adulteraciones por adición de aromatizantes artificiales (Belitz, 2009).

Para el caso particular de la guayaba, solo se ha determinado la composición enantiomérica de linalol en frutas provenientes de Brasil, estableciendo que el isómero *R*(-)linalol se encuentra en un exceso enantiomérico del 93,2% (Bernreuther y Schreier, 1991).

1.2.4 Cuantificación de los compuestos activos olfativamente. El método convencionalmente usado en la cuantificación de compuestos del aroma, es la adición de un estándar interno, cuyas propiedades físicas y químicas sean semejantes a las del analito a cuantificar y luego la determinación de la relación de un comportamiento cromatográfico o espectral determinado. Sin embargo, esta cuantificación es aproximada por cuanto el estándar no reproduce exactamente las propiedades del analito.

En este sentido, un isotopo es el estándar perfecto pues posee propiedades físicas y químicas idénticas al analito, por lo cual las pérdidas durante los procesos de extracción o separación son idealmente compensadas y así este método constituye una forma de cuantificación muy precisa. Es por ello que en el método denominado SIDA (Stable

Isotopic Dilution Assay) los derivados isotópicos se emplean como estándares para cuantificación. Este método involucra el uso de especies deuteradas o marcadas con C_{13} , disponibles comercialmente o sintetizadas en el laboratorio según las necesidades del mismo análisis, con la condición que el marcado no sea intercambiado durante el procedimiento analítico (Schieberle, 1995; Sen y Grosch, 1991; Schieberle y Grosch, 1987).

Para tal fin se adiciona una cantidad de estándar que conserve una relación lo más cercana posible a 1:1 entre el estándar y el analito a cuantificar. El alimento se somete al proceso de extracción y el extracto se analiza por CG-EM en modo de ionización química (IQ) lo cual permite relacionar los iones moleculares protonados o los principales iones fragmento del analito con los del estándar adicionado. En la figura 1.7 se presenta un ejemplo de la cuantificación por SIDA para tres componentes azufrados en el aroma del café.

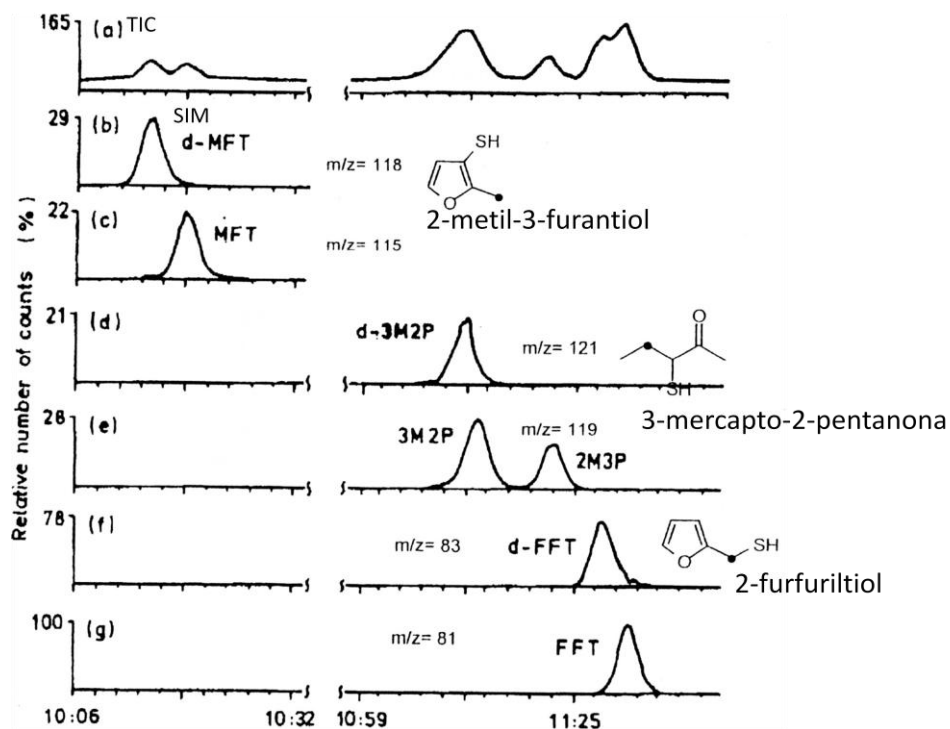


Figura 1.7 Cuantificación por SIDA de 2-furfuriltiol, 3-mercapto-2-pentanona y 2-metil-3-furantiol. a) Corriente total iónica; b-g) espectro de masas de los analitos y compuestos de referencia deuterados en modo SIM (Tomado de: Belitz, et al, 2009)

La cuantificación de los compuestos se hace mediante comparación de las áreas de iones pseudomoleculares o fragmentos del analito y su isotopomero. En el ejemplo anterior se siguieron los iones pseudomoleculares m/z 118 y m/z 115 para el 2-metil-3-furantiol; m/z 121 y m/z 119 para la 3-mercapto-2-pentanona y los iones fragmento $[M-SH]^+$ m/z 83 y m/z 81 para el 2-furfuriltiol de los compuestos deuterados y sin deuterar, respectivamente. Así mismo se debe determinar el factor de respuesta de cada estándar mediante la elaboración de una curva de calibración que relaciona la concentración del analito marcado y sin marcar, con las áreas obtenidas para los iones característicos.

Una vez identificados y cuantificados aquellos componentes con actividad olfativa en el aroma de un alimento, se busca estimar la importancia de cada componente en cuanto al aporte que hace a la percepción global. Patton y Josephson (1957) propusieron estimar dicho aporte relacionando la concentración del analito en el aroma del alimento con su valor umbral de olor (*odor-threshold*), relación actualmente conocida como *Odor Activity Value* (OAV) o valor de actividad de aroma (Reinecciuss, 2006; Belitz, et al, 2009). Para ilustrar los beneficios del uso de OAV en la estimación del aporte de cada compuesto al aroma de una fruta, en la Tabla 1.2 se presentan los OAVs calculados para algunos componentes del aroma del tomate.

Tabla 1.2 OAV de algunos componentes volátiles del aroma de tomate.
(Tomado de: Blank, 2002)

Componente	Concentración (mg/Kg)	Umbral de olor (mg/L)	OAV
(Z)-3-Hexenal	12000	0.25	50000
Hexanal	3100	4.5	630
β -Ionona	4	0.007	630
(E)- β -Damascenona	1	0.002	500
3-Metilbutanal	27	0.2	130
(E)-2-Hexenal	270	17	16
2-Isobutiltiazol	36	3	12

Estos resultados indican que en el aroma del tomate la presencia del (*Z*)-3-hexenal es fundamental para lograr el aroma característico de esta fruta. Sin embargo, este aporte no es únicamente debido a la alta concentración de este analito, pues para sustancias a nivel de trazas también se encuentra un aporte relevante para el aroma del tomate. Es así como los OAV de la β -ionona y la (*E*)- β -damascenona, indican que estos poseen un aporte importante en el aroma global del tomate igual e inclusive superior al ofrecido por componentes mayoritarios como el hexanal o el (*E*)-2-hexenal. Solo aquellos componentes con $OAV > 1$ pueden ser considerados como los de mayor aporte al aroma global del alimento y por ende ser empleados en los ensayos de recombinación y omisión para la determinación de los componentes impacto del aroma del alimento.

1.2.5 Ensayos de recombinación y omisión. Durante los análisis AEDA o CHARM se evalúa sensorialmente el aporte individual de cada componente al aroma total del alimento. En forma análoga en el cálculo de los OAV solo se tienen en cuenta los valores de umbral de olor individuales en un medio (solvente o matriz) determinado. Sin embargo, en un alimento los umbrales de olor pueden verse afectados por componentes no volátiles como lípidos, azúcares o proteínas presentes en la matriz particular de cada alimento (Belitz, et al, 2009). La influencia de estos factores solo se puede evaluar mediante ensayos de simulación del aroma (experimentos de recombinación y omisión).

Los estudios de recombinación estiman el papel de los componentes en un aroma complejo. Se hacen mezclas de los analitos que tengan OAV superiores a la unidad y se comparan con pruebas sensoriales triangulares con respecto al alimento original. En los ensayos de omisión, se preparan las mezclas de aroma eliminando alguno de los constituyentes y se comparan con el aroma de la mezcla recombinada total o el alimento original. Estas pruebas permiten definir cuales son los compuestos impacto en el aroma de un alimento (Belitz, 2009).

Los resultados de estos análisis se presentan en forma de diagramas de superficie los cuales son la representación gráfica de un grupo de notas olfativas que describen el aroma de un alimento. Estos perfiles de aroma constituyen una huella dactilar única que permiten

adquirir información acerca de la calidad olfativa del aroma de un alimento por comparación cualitativa y cuantitativa entre los perfiles en cuestión. Durante el entrenamiento de panelistas para la elaboración de estas gráficas se emplean compuestos de referencia que evocan un determinado atributo de aroma y una escala que indica la similitud de la nota sensorial con la evocada por el compuesto de referencia (Plutowska y Wardencki, 2007).

Por ejemplo, en el estudio de los compuestos volátiles con actividad olfativa en el aroma del durazno (*Prunus armeniaca*) se preparó una mezcla de aroma por recombinación de los 18 componentes cuyos OAVs fueron superiores a la unidad, en concentraciones iguales a las determinadas por SIDA en una matriz acuosa con 1.7% glucosa, 0.9% fructosa, 5.1% sacarosa, 0.8% sorbitol, 1% ácido málico, 0.4% ácido cítrico y 1% de pectina para simular el contenido natural de carbohidratos y ácidos en los duraznos (Greger y Schieberle, 2007).

La evaluación orthonasal de la mezcla recombinada y su comparación con el aroma de la fruta fresca permitió establecer el perfil sensorial mostrado en la figura 1.8.

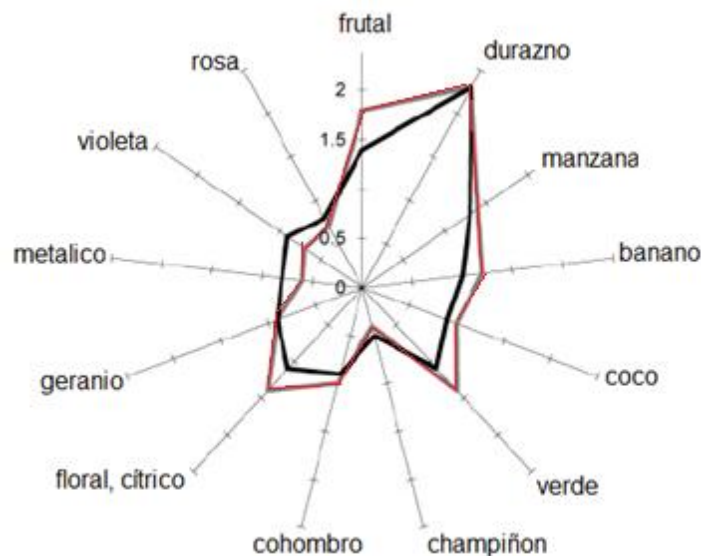


Figura 1.8 Perfil olfativo de duraznos frescos (—) y la mezcla recombinada (—)
(Tomado de: Greger y Schieberle, 2007)

En la figura anterior se observan ligeras diferencias en las notas frutal, verde y floral, las cuales fueron percibidas un poco más intensas en el aroma de la fruta fresca. La similitud

entre el aroma de la fruta y la solución recombinada fue calificada como 2,6 en una escala de 0 a 3 (Greger y Schieberle, 2007).

En este mismo estudio para los experimentos de omisión, se preparó una segunda mezcla en la cual se omitieron aquellos componentes con altos valores OAV con el fin de encontrar su aporte al aroma del durazno. Estos experimentos demostraron que el (*E,Z*)-2,6-nonadienal y la (*Z*)-1,5-octadien-3-ona son los compuestos impacto en el aroma de esta fruta, pues al hacer la evaluación olfativa de la mezcla recombinada y compararla con los experimentos de omisión se encontraron diferencias significativas. Varios panelistas confirmaron que la mezcla recombinada tiene un aroma semejante al aroma de la fruta fresca, mientras que la mezcla de omisión solo fue reconocida por 23 de los 32 panelistas (Greger y Schieberle, 2007).

La metodología sistemática aquí descrita ha sido aplicada con éxito en diferentes alimentos encontrando resultados interesantes. Por ejemplo, en café tostado se ha establecido que de los 850 compuestos volátiles identificados, solo 40 contribuyen al aroma y con la recombinación de sólo 28 de estos compuestos se puede reproducir de manera muy aproximada el aroma del café tostado y que de todos estos componentes el 2-furfuriltiol es el más importante en el aroma del café (Poisson, et al 2004).

En el aroma de frutas tropicales como la piña (el cual ha sido extensamente estudiado) se estableció que mediante la combinación de solo cinco componentes es posible obtener el característico aroma de esta fruta a saber: 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, 2-metilpropanoato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, 2-metilbutirato de metilo y (*E,E,Z*)-1,3,5-undecatrieno (Tokitomo, et al, 2005).

1.3 COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES EN EL AROMA DE FRUTAS.

Los compuestos azufrados juegan un papel importante en el aroma de diversos alimentos donde son responsables de la nota vegetal y frecuentemente característica del aroma de muchas frutas y alimentos procesados (Blank, 2002). También poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antibacterianas, antinematódicas y anticáncer (Jacob, 2006).

Los compuestos azufrados (Figura 1.9) contemplan una amplia diversidad teniendo en cuenta los diferentes estados de oxidación que puede tener el átomo de azufre, desde -2 en la especie más reducida (RSH) hasta +6 en la especie más oxidada (SO_4^-); así como la variedad de propiedades químicas en cuanto a actividad redox, interacciones electrostáticas, nucleoficidad y electroficidad y la coordinación con átomos metálicos (Jacob, 2006).

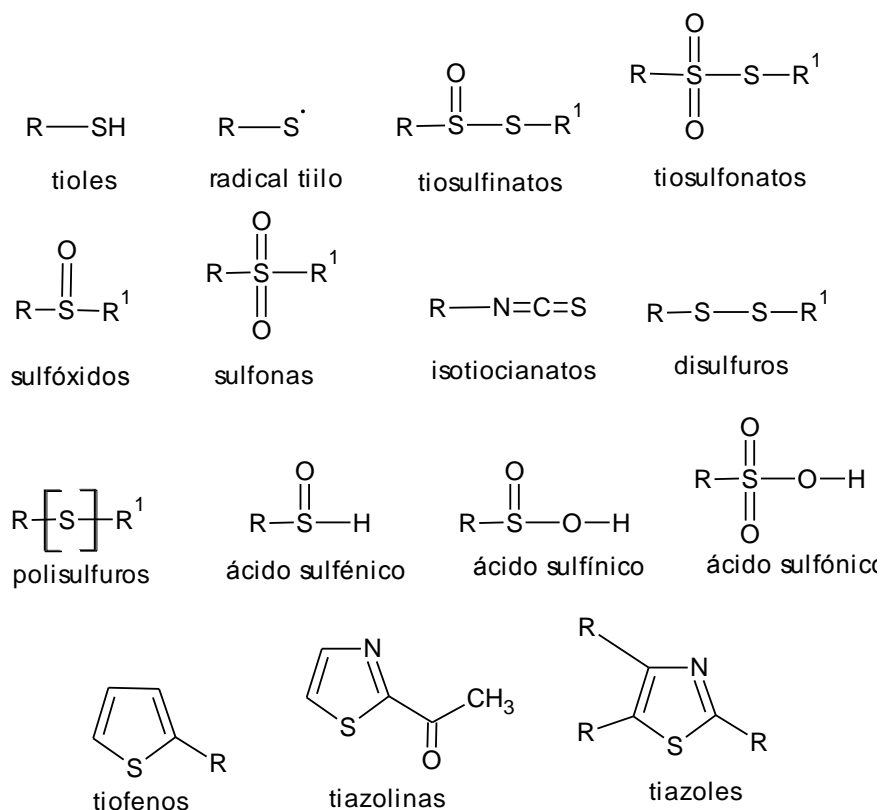


Figura 1.9 Principales grupos funcionales azufrados identificados como constituyentes volátiles de productos naturales.

Entre esta variedad de estructuras, los tioles o mercaptanos constituyen la especie azufrada más reducida. Dada su alta polarizabilidad son más ácidos (pK_a 10) que los

correspondientes alcoholes (pK_a 15) y son excelentes nucleófilos, en especial cuando se encuentra en forma de radical tiilo (RS^\ominus). Adicionalmente los tioles tienen una fuerte actividad antioxidante porque son fácilmente oxidables a formas disulfuro. Estas reacciones de intercambio entre grupos sulfhidrilo y disulfuro dependen del pH y la temperatura: a mayor pH se observa una mayor pérdida de disulfuro, mientras que a mayor temperatura se incrementa el intercambio pues la desnaturalización de proteínas ofrece una mayor disponibilidad de grupos sulfhidrilo (Adams, et al, 2001; Morel, et al, 2000).

Otra propiedad de los tioles es la posibilidad de formación de complejos de coordinación con iones metálicos como Cu, Ag, Zn, Pb y Hg, reacciones que generalmente se emplean en procesos de desintoxicación por envenenamiento con metales pesados (Blanusa, et al 2005) o extracción selectiva (Tominaga, et al, 1998). Es así como el método de extracción selectiva de tioles aplicado en los estudios del aroma, consiste en la reacción del grupo tiol con el átomo de mercurio del ácido p-hidroximercuribenzoico a pH 8.5 y temperatura ambiente. El derivado es soluble en agua y puede separarse usando solventes lipofílicos como un exceso de cisteína o glutatión (figura 1.10).

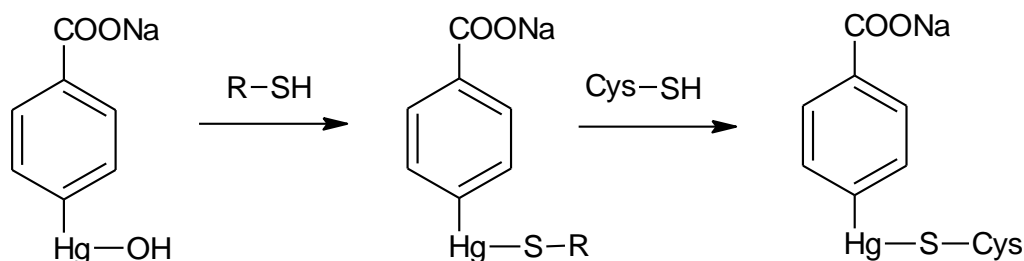


Figura 1.10 Reacción de derivatización para extracción selectiva de tioles.

Esta variedad de propiedades químicas hace que los tioles puedan considerarse precursores del resto de especies azufradas mediante reacciones redox, de sustitución nucleofílica, condensación, dimerización e hidrogenación (Figura 1.11). Sin embargo, la formación y transformación de los diferentes grupos funcionales está dada para cada especie de acuerdo con la naturaleza precisa del compuesto azufrado y factores como pH, solvente y concentración de pro o antioxidantes (Jacob, 2006).

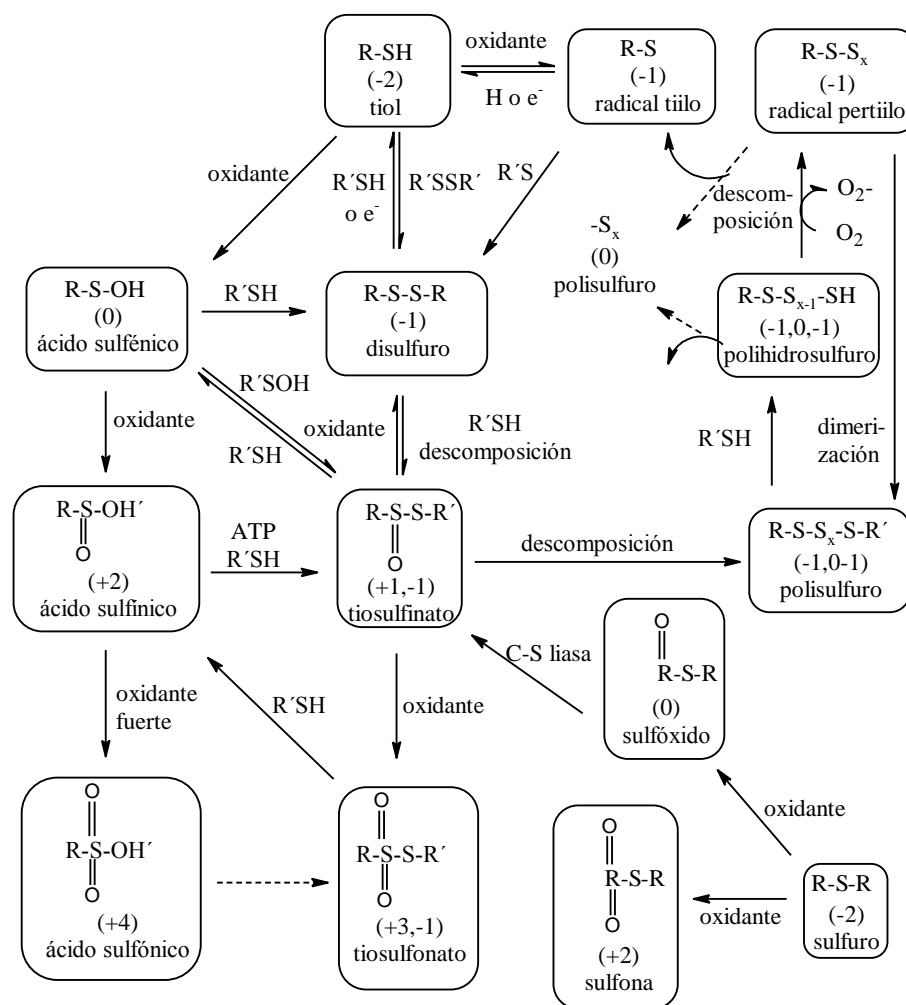


Figura 1.11 Vías de formación y transformación de tioles para la formación de diversos compuestos azufrados (Tomado de: Jacob, 2006).

Otras especies azufradas altamente reactivas son los tiosulfinatos. Estos compuestos se forman *in vivo* por diversas rutas como: reacciones oxidativas a partir de disulfuros; reducción a partir de ácidos sulfínicos; y por acción enzimática a partir de sulfóxidos. Los tiosulfinatos son compuestos importantes en las especies *Allium* spp donde son precursores de otros productos azufrados tales como disulfuros y tiosulfonatos (Block, 1992).

Las especies *Allium* son las más ricas en componentes volátiles azufrados, entre estos: el óxido de S-propanotial, reconocido como el factor lacrimógeno de la cebolla; y el propanotiosulfonato de propilo y el 3-mercapto-2-metil-1-pentanol, los cuales se consideran componentes impacto de su aroma (Boelens y van Gemert, 1993). Otros componentes como metanotiol, metional y 2-furfuriltiol, productos de la degradación térmica de

aminoácidos azufrados, poseen notas sensoriales que contribuyen al aroma de productos cárnicos y del café por sus notas tostadas y ahumadas (Blank, 2002).

De todos estos componentes, los tioles son probablemente los compuestos del aroma más comunes en muchos alimentos y bebidas; sus valores umbral de olor son del orden de ppt y se caracterizan por su amplio espectro sensorial con notas frutales, uva y *black currant* (Blank, 2002). Son delicados a bajas concentraciones, pungentes e irritantes a altas concentraciones y su descripción sensorial depende de la posición del átomo de azufre, la longitud de cadena, la estereoquímica y la presencia de otros grupos funcionales (Vermeulen, et al, 2005).

Por ejemplo los tioles de bajo peso molecular como metanotiol o etanotiol poseen notas muy desagradables relacionadas frecuentemente con la descomposición microbiológica (Mateo-Vivaracho, 2006); mientras que los mercaptanos polifuncionales de mayor peso molecular tienen una nota sensorial poderosa y penetrante, que en algunos casos les hace responsables de características sensoriales particulares de frutas como el maracuyá (Engel y Tressl, 1991) y otros productos como café (Boelens y van Gemert, 1993) y vino (Tominaga, et. al., 1998).

La biogénesis de estos componentes esta relacionada con precursores conjugados *S*-cisteína y derivados de la ruta metabólica del glutatión. La liberación de los tioles a partir de precursores no volátiles ocurre durante la fermentación alcohólica a través de la actividad de C-S liasas (Tominaga, et al, 1998). En las frutas tropicales como maracuyá los precursores conjugados son probablemente convertidos en tioles libres por hidrólisis ácida o por efecto de enzimas endógenas tales como β -liasas (Dubourdieu y Tominaga, 2008). También pueden generarse por adición de sulfuro de hidrogeno sobre aldehídos (Vermeulen, et al, 2006). En la figura 1.12 se presentan las rutas de biogeneración de tioles en el aroma de vinos

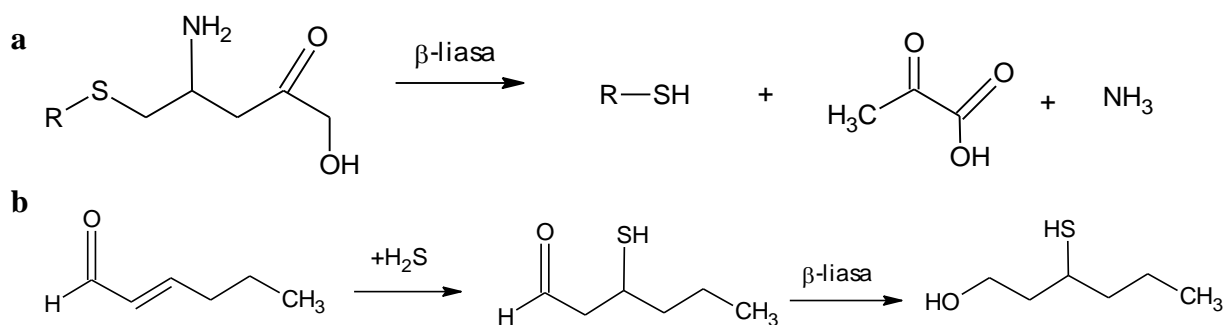


Figura 1.12 Posibles rutas de biogénesis de compuestos azufrados en vino. a. A partir de precursores conjugados *S*-cisteína y b. Por adición de H_2S sobre aldehídos.

1.4 EL AROMA DE LA GUAYABA (*Psidium guajava* L.)

1.4.1 Generalidades de la fruta. La guayaba es una fruta de origen tropical, que pertenece a la familia *Myrtaceae* y al género *Psidium*. Es una fruta de forma esférica u ovoide de 5-10 cm de diámetro, cuya pulpa puede ser rosada o blanca. Posee un alto contenido de vitamina C, carotenoides y fibra dietaria y a la vez es apreciada por su inconfundible aroma y agradable sabor. Colombia es uno de los principales productores de guayaba a nivel internacional compitiendo con países como India, Brasil, México, Suráfrica, Jamaica, Kenia, Cuba, República Dominicana, Puerto Rico, Haití, Estados Unidos, Taiwán, Egipto y Filipinas (Lozano, et al, 2002).

La cosecha de la guayaba comprende diversas etapas que duran entre seis meses y un año. La recolección del fruto se realiza en dos épocas del año: durante los meses de mayo a junio y de noviembre a enero (Lozano, et al, 2002). Esta planta crece en temperaturas entre 18 y 30°C con una temperatura promedio de 24°C. Su cultivo requiere una precipitación de 800 a 2.000 mm anuales, aunque para que ocurra una floración buena y abundante se requiere de una época seca definida. Se desarrolla muy bien en una amplia gama de suelos desde arenosos hasta arcillosos pero con preferencia en suelos francos donde se producen frutos de mejor calidad (Sena Virtual, 2009).

Además de sus propiedades nutricionales la guayaba posee propiedades antibióticas, antidiarréicas, astringentes, desinflamantes, expectorantes, sedantes y sudoríficas, que la hacen útil en diversos usos medicinales para el tratamiento de problemas digestivos y respiratorios (Pérez Gutiérrez, et al, 2008). Adicionalmente, la guayaba se emplea para forraje como complemento de la alimentación de ganado (Lozano, et al 2002).

De acuerdo con datos del Centro de Investigación para el Mejoramiento de la Agroindustria Panelera (Corpoica-CIMPA) en Barbosa-Santander, las principales variedades producidas en la región de la Hoya del Río Suarez son: Regional roja, Regional blanca, CIMPA00196, Guavatá victoria, Brasil redonda, Brasil roja ácida, Ráquira blanca, Brasil blanca y Palmira ICA-1 (Gómez, 2001).

Algunas variedades de guayaba difieren sutilmente en sus propiedades físicas, químicas, nutricionales y sensoriales lo que ocasiona que un consumidor común no las pueda reconocer fácilmente. Las principales diferencias morfológicas y de composición entre algunas variedades cultivadas en la Hoya del río Suarez se presentan en la tabla 1.3.

Tabla 1.3 Diferencias morfológicas y composicionales de diferentes variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.)

Variedad	Forma y color	Tamaño y peso promedio	Índice de madurez	Otras características
Regional roja ^a	Redonda de pulpa roja	116 g	14,2	pH = 4,16 ±0,01 SS 9,8 ± 0,1 Acidez 0,74 ± 0,05 g ácido cítrico/100 g de fruta Contenido de pectina 1,50% Porcentaje de semilla 4,27%
Regional blanca ^a	Redonda de pulpa blanca	116 g	16,3	pH = 4,15 ±0,02 SS 9,8 ± 0,1 Acidez 0,60 ± 0,04 g ácido cítrico/100 g de fruta Contenido de pectina 0,94%
Guavata Victoria ^a	Piriforme, pulpa de color blanca	155 g	20	pH = 4,27 ± 0,05 SS 9,9°Brix Acidez 0,38 ± 0,01 g ácido cítrico/100 g de fruta Contenido de pectina 1,05%
CIMPA 00196 ^b	Redonda, de corteza amarillo claro y pulpa color rojo	256 g	11	SS 8,4 Acidez 0,67 g ácido cítrico/100 g de fruta Porcentaje de semilla 3,8%
Brasil roja y blanca ^b	Esférica, pulpa de color blanco	143 g	4	SS 9,9% Acidez 2,44 g ácido cítrico/100 g de fruta Porcentaje de semilla 1,58%
Palmira ICA-1 ^b	Piriforme, cáscara verde-amarillo. Pulpa gruesa de color rosado	100-130 g	14,1	pH = 3,90 ±0,02 SS 9,9 ± 0,1 Acidez 0,70 ± 0,06 g ácido cítrico/100 g de fruta Porcentaje de semilla 4,5%

A pesar de su importancia socioeconómica, el cultivo y la agroindustria de la guayaba presentan aún un marcado retraso tecnológico, que afecta su competitividad en los mercados y se refleja en bajos rendimientos del cultivo, altos costos de producción, deficiencias de calidad y en la inestabilidad de la oferta y los precios de la fruta y sus productos procesados (Gómez, 2001). Desde el punto de vista fitosanitario, esta especie afronta una serie de problemas asociados con el ataque de plagas y enfermedades, que de una u otra manera han afectado la producción y calidad de la fruta. Entre las limitantes fitosanitarias de mayor impacto económico se destacan tres: el ataque de moscas de la fruta del género *Anastrepha* (Díptera: tephritidae), el picudo de la guayaba (*Conotracheluspsidii* Marshall) (Coleóptera: Curculiónidae) y la enfermedad de la costra o clavo de la guayaba (*Pestalotia versicolor* Speg.) (Corpoica, 2006). Entre las variedades afectadas por esta problemática, las frutas de la variedad Regional roja son las más perjudicadas por este fenómeno.

Las variedades Regional roja y blanca (figura 1.13), se destinan principalmente a la agroindustria del bocadillo por cuanto poseen muy buenas características sensoriales y alto rendimiento. En este trabajo se seleccionaron estas variedades como objeto de estudio teniendo en cuenta que son las de mayor producción en la Hoya del río Suarez.

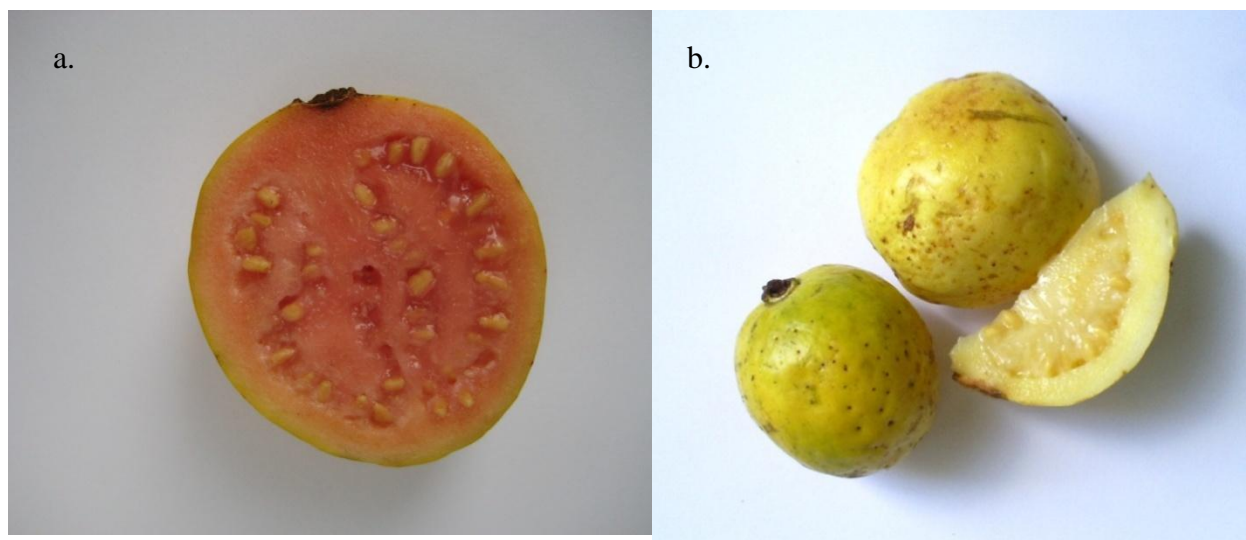


Figura 1.13 Guayaba a. Regional Roja y b. Regional Blanca (*Psidium guajava* L.)

1.4.2 Estudios de volátiles libres en guayaba. La guayaba es ampliamente reconocida por su exquisito e inigualable aroma y sabor. El aroma combina las notas olfativas verde, frutal y dulce. Existen estudios del aroma realizados desde la década de los sesenta, con frutas provenientes de: Hawai, Venezuela, Brasil, Malasia, Japón, Estados Unidos, Taiwán, Egipto, Indonesia, Cuba, India y México. Desde entonces se han realizado numerosos estudios a cerca de la composición de volátiles permitiendo la identificación de más de 400 componentes. Sin embargo, la contribución individual de estos compuestos al aroma total de la fruta no ha sido estudiada.

Entre las técnicas de extracción para el estudio del aroma de la guayaba se han empleado la extracción con solventes usando cloroformo (Pattabhiraman, et al, 1969), isopropano (MacLeod y González de Troconis, 1982), diclorometano (Nishimura et al, 1989) y pentano:diclorometano (Vernin, et al, 1991). También se han realizado extracciones por hidrodestilación (Ekundayo, et al, 1991), destilación por arrastre con vapor y extracción simultánea con solvente orgánico (DES) (Chyau, et al, 1992), freón 12 (Torline y Ballschmieter, 1973), *headspace* (Toulemonde and Beauverd, 1985) y *Headspace-Microextracción en Fase Sólida* (HS-MEFS) (Carasek and Pawliszyn, 2006; Cardeal, et al, 2005; Paniandy, et al, 2000).

Entre las variedades estudiadas se encuentran: Cortibel (Soares, et al, 2007), Vietnamese (Yusoff, et al, 1988) y Beaumont (Stevens, et al, 1970). En la tabla 1.4 se presenta una compilación de la revisión bibliográfica relacionada con el estudio de compuestos volátiles de diversas variedades de guayaba. En cuanto a la guayaba colombiana solo existe un estudio (Quijano et al, 1999) con frutas de las variedades Palmira ICA-1 y Glum Sali provenientes del Valle del Cauca, conocidas comúnmente como guayaba pera y guayaba manzana. En dicho trabajo se establecieron como principales constituyentes volátiles de la variedad Palmira ICA-1 el acetato de cinamilo, el acetato de (*Z*)-3-hexenilo y el alcohol cinamílico. En la variedad Glum Sali, los componentes mayoritarios fueron (*E*)-2-hexenal, hexanal y tetradecano. Así mismo se identificaron ocho componentes publicados por primera vez en el el aroma de la guayaba, sin embargo la contribución efectiva de estos componentes al aroma total de la fruta no fue realizada.

Tabla 1.4. Resumen de los estudios publicados sobre el aroma de guayaba (*Psidium guajava*).

Método de extracción	Variedad y origen	Principales componentes	Compuestos responsables del aroma	Referencia
HS-Dinámico	Cortibel (Brasil): 3 estados de madurez: inmadura, intermedio y madura.	Aldehídos C ₆ , ésteres, monoterpenos, sesquiterpenos (cariofileno). A mayor grado de madurez mayor proporción de ésteres y menor contenido de aldehídos C ₆	(<i>E</i>)-2-hexenal y (<i>Z</i>)-2-hexenal	Soares, et al, 2007
DES	Lucknow-49 (India): 2 estados de madurez: intermedio y completamente maduro	Ácidos C ₂ , C ₄ y C ₆ , aldehídos C ₆ , ésteres, benzoato de metilo y benzoato de etilo. A mayor grado de madurez mayor proporción de ésteres y ácidos y menor proporción de aldehídos C ₆	Esteres.	Toth-Markus, et al, 2005
Ultrasonido	Indefinida (Jakarta-Indonesia) Pulpa amarilla	Compuestos heterocíclicos con estructuras tiazolidina.	Sin establecer por CG-O	Fernández, et al, 2001
HS-MEFS	Indefinida (Francia)	Compuestos C ₆ , aldehídos, esterres y lactonas	Sin establecer por CG-O	Paniandy, et al, 2000
Extracción L-L	Palmira ICA-1 y Glum Sali (Colombia)	En la var. Palmira ICA-1 alto contenido de acetato de cinamilo, acetato de (<i>Z</i>)-3-hexenilo y alcohol cinamico. En la var. Glum Sali alto contenido de hidrocarburos y aldehídos C ₆ como (<i>E</i>)-2-hexenal y hexanal.	Sin establecer por CG-O	Quijano, et al, 1999
Likens-Nickerson	Indefinida- (Kaohsiung - Taiwán) Puré pasteurizado y sin pasteurizar	El contenido de ésteres disminuye en el puré pasteurizado mientras que los niveles de aldehídos, terpenos y ácidos aumentan.	Sin establecer por CG-O	Yen, et al, 1992
Destilación al vacío-extracción con solventes	Indefinida (Taiwán) Pulpa blanca maduras e inmaduras	En la fruta madura: 1,8-cineol, (<i>E</i>)-2-hexenal y (<i>E</i>)-3-hexenal son los mayores componentes En la fruta inmadura: hexanoato de etilo y acetato de (<i>Z</i>)-3-hexenilo.	Sin establecer por CG-O	Chyau, et al, 1992

Hidrodestilación	Indefinida (Nigeria-África)	Sesquiterpenos y ácidos grasos de cadena larga C ₈ -C ₁₆ . Ausencia de alcoholes y ésteres C ₆	Ácidos C ₈ -C ₁₆ , alcoholes sesquiterpénicos, β-cariofileno	Ekundayo, et al, 1991
Extracción con solventes	Indefinida (El Cairo-Egipto)	Aldehídos C ₆ , ésteres C ₃ -C ₁₈	Acetato de Z-3-hexenilo, acetato de 3-fenilpropilo, alcohol cinamílico, γ y δ-lactonas	Vernin, et al, 1991
Destilación al vacío-extracción con solventes	Indefinida (Taiwán). Frutas con y sin cáscara	β-cariofileno presente en la cáscara. Fruta con cáscara tiene un mayor contenido de componentes volátiles.	Esteres responsables del aroma dulce-floral de la guayaba	Chyau, et al, 1989
Extracción L-L	Indefinida (Isla Amami-Japón) Pulpa rosada y blanca sin cáscara	Compuestos C ₆ (aldehídos, alcoholes y ácidos), acetato de 3-fenilpropilo	Alcohol cinamílico	Nishimura, et al, 1989
Destilación a alto vacío y extracción L-L	Indefinida (Brasil)	Norisoprenoides: 4-oxo-dihidro-β-ionol	Sin establecer por CG-O	Idstein, et al, 1985
Likens-Nickerson	Indefinida (Venezuela) Madurez óptima	Esteres, sesquiterpenos, hidrocarburos monoterpénicos	Benzaldehído, α-copaeno y mirceno	McLeod, et al, 1982
Extracción con solventes	Wild Florida (Florida-USA)	Hidrocarburos terpénicos	Sin establecer por CG-O	Wilson, et al, 1978
Extracción con solventes	Beaumont (Hawai-USA)	Hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol y compuestos aromáticos	Sin establecer por CG-O	Stevens, et al, 1970

La bibliografía se encuentra organizada por orden cronológico.

Existen algunos estudios de naturaleza comparativa que incluyen diferencias en el aroma de diferentes variedades (Pino, et al, 1999; Ortega, 1998; Askar, et al, 1986), entre pulpa y cáscara (Chyau, et al, 1989) y la composición del aroma de acuerdo con el estado de madurez (Hashinaga, et al, 1987; Chyau, et al, 1992; Toth-Markus, et al, 2005, Soarez, et al, 2007). Estos estudios muestran una alta variabilidad en los componentes volátiles, aunque no se han detectado componentes impacto que permitan diferenciar una variedad de otra.

Otras diferencias pertinentes se deben al contenido de los compuestos volátiles de la pulpa y la cáscara, las cuales indican que en la pulpa existen mayores cantidades de acetato de etilo y otros esteres etílicos, mientras que (*Z*)-ocimeno, β - y γ -cariofileno existen en altas cantidades en la cáscara. Los aldehídos C_6 son mayoritarios en la pulpa, mientras que los alcoholes C_6 son mayoritarios en la cáscara (Chyau, et al, 1989).

El aroma de algunos productos de la guayaba también ha sido estudiado. Así se han estudiado el aroma del jugo de guayaba (Yen and Lin, 1999), el puré de guayaba (Yen, et al, 1992; Yusof, et al, 1988) y la esencia de guayaba (Jordán, et al, 2003). Otros estudios involucran diferentes condiciones de tratamiento como alta presión y calentamiento o congelación para comparar los cambios en el aroma durante el almacenamiento. De acuerdo con estos resultados el tratamiento a alta presión mantiene el aroma original mientras que el calentamiento disminuye la mayoría de los componentes volátiles. El puré de guayaba pasteurizado mostró un incremento en el contenido de aldehídos e hidrocarburos y una disminución en el contenido de esteres cuando se compara con purés sin pasteurizar (Yen, et al, 1992).

La formación de aroma en cultivos celulares de guayaba con el uso de varias combinaciones de hormonas también ha sido estudiado encontrando que el hexanol es el componente más abundante en el cultivo de callos (Prabha, et al, 1990).

Aunque se encuentran publicados varios estudios sobre el aroma de la guayaba, estos estudios carecen de los análisis olfativos indispensables para establecer los compuestos relevantes en el aroma de esta fruta. Es así como en este trabajo se incluye el uso de técnicas analíticas enfocadas hacia la determinación de compuestos impacto en el aroma de la guayaba, empleando los métodos modernos en química de aromas.

1.4.3 Cambios en el aroma por efecto de la maduración. En general la composición química y física de los frutos depende considerablemente de la variedad, las condiciones climáticas de cultivo y el grado de madurez. Los estudios de frutas en diferentes estados de madurez, generalmente comparan la composición en analitos no volátiles responsables del color, la acidez, el pH y el contenido de sólidos solubles en frutas inmaduras, maduras y sobremaduras (Soares, et al, 2007; El Bulk, et al, 1997). En la guayaba se ha establecido que en los estadios iniciales de desarrollo, la firmeza depende del contenido de pectina, el cual disminuye por efecto de la actividad de enzimas pécticas durante el proceso de maduración. Así mismo el contenido de ácido ascórbico incrementa lentamente durante el periodo inicial de crecimiento pero se acelera durante la maduración, y el contenido de sólidos solubles se incrementa gradualmente con la maduración, excepto durante el periodo final de crecimiento (El Bulk, et al, 1997).

Tradicionalmente y de acuerdo con los patrones respiratorios, las frutas han sido clasificadas como climatéricas y no climatéricas. Las frutas no climatéricas son aquellas cuya respiración y producción de etileno disminuyen gradualmente durante el proceso de maduración. Las frutas climatéricas se caracterizan por un incremento distintivo en la respiración, que generalmente se asocia con una elevada producción de etileno justo antes del incremento en la respiración y una disminución paulatina de este contenido durante la fase posclimatérica. En estas frutas el etileno desempeña un papel clave en los cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante la maduración (Azzolini, et al, 2005).

La guayaba se clasifica como una fruta climatérica que completa su proceso de maduración después de su cosecha, mostrando cambios profundos en el color y la firmeza en pocos días (Azzolini, et al, 2005). Estos cambios físicos necesariamente están relacionados con

cambios químicos que la fruta adquiere durante la poscosecha según la variedad y las condiciones climáticas en las que fue cultivada (Soares, et al, 2007). Dichos cambios están relacionados con una disminución de la actividad enzimática del ciclo del ácido cítrico, la cual conlleva al incremento del contenido de citrato y al incremento en la respiración de dióxido de carbono (Fisher y Scott, 1997).

En cuanto a cambios en la composición de volátiles por efecto de la madurez, algunos autores han realizados estudios con frutas de pulpa blanca provenientes de Taiwán (Chyau, et al, 1992) y de Brasil (Soares, et al, 2007) y guayabas de la variedad Lucknow-49 cultivadas en la India (Toth-Markus, et al, 2005).

Estos estudios han mostrado que en las frutas maduras los ésteres: acetato de *cis*-3-hexenilo y acetato de *trans*-3-hexenilo y los sesquiterpenos: cariofileno, α -humuleno y β -bisaboleno, son los componentes mayoritarios, mientras que en frutas inmaduras los compuestos aldehídicos como (*E*)-2-hexenal y (*Z*)-3-hexenal son predominantes (Chyau, et al, 1992; Soares, et al, 2007). Aunque estos estudios comparan la distribución relativa de componentes volátiles en los diferentes estados de madurez de la fruta, no involucran un análisis olfativo que permita caracterizar los principales componentes que contribuyen al aroma en cada estadio de madurez para caracterizar los estadios fenológicos de esta fruta.

Un estado fenológico se define como un cambio fisiológico externo que ocurre durante periodos específicos de tiempo los cuales coinciden con el ciclo natural de crecimiento del fruto (Salazar, et al, 2006). La florescencia y la maduración de las frutas son indicadores fenológicos del desarrollo de una planta. En la guayaba estos ciclos dependen de la variedad y condiciones de cultivo, razón por la cual el estudio de su aroma permitirá conocer la composición y establecer los compuestos responsables del aroma característico de las variedades regional roja y regional blanca en diferentes estados de madurez.

1.5 REFERENCIAS

Acree, T.E., Bernard, J., Gas Chromatography-olfactometry using CHARM analysis. En: *Trends in Flavour Research*. Proceedings of the 7th Weurman Flavor Research Symposium. Maarse, H. Editor; Elsevier: Noordwijkerhout, Netherlands, Amsterdam, **1994**, Vol 35, p.211-220

Adams, R.L., Mottram, D.S., Parker, J.K., Brown, H.M., Flavor protein binding: disulfide interchange reaction between ovalbumin and volatile disulfides. *J. Agric Food Chem.*, **2001**, 49, 4333-4336

Askar, A., El-Nemr S.E., Bassiouny, S.S., Aroma constituents in white and pink guava fruits. *Alimenta*, **25**, **1986**, 162-167

Azzolini, M., Jacomino, A.P., Urbano, I., Kluge, R., Schiavinato, M., Ripening of Pedro Sato" guava: study on its climacteric or non-climacteric nature. *Braz. J. Plant Physiol.*, **2005**, 17, 299-306

Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P., *Food Chemistry*, 4th revised and extended edition, Springer, CIUDAD, Germany, **2009**, 1070p

Bernreuther, A., Schreier, P., Multidimensional Gas chromatography/Mass Spectrometry: A powerful tool for the direct chiral evaluation of aroma compounds in plant tissues. II Linalool in essential oils and fruits. *Phytochem. Anal.*, **1991**, 2, 167-170

Bentley, R., The nose as a stereochemist. Enantiomers and odor. *Chem.. Rev.*, **2006**, 106, 4099-4112

Blank, I. Sensory relevance of volatile organic sulfur compounds in food. En *Heteroatomic Aroma Compounds*. Reineccius, G.A., Reineccius, T.A., Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., **2002**, p. 25-53

Blanusa, M., Varnai, V.M., Piasek, M., Kostial, K., Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 2771-2794

Block, E., The organosulfur chemistry of the Genus *Allium*- Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1992**, 31, 1135-1178

Boelens, M.H., van Gemert, L.J. Volatile character impact sulfur compounds and their sensory properties. *Perfumer & Flavorist*, **1993**, 18, 29-39

Carasek, E.; Pawliszyn, J. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME Fiber., *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 8688-8696

Cardeal, Z.L., Moreira Guimara, E., Vilela Parreira, F., Analysis of volatile compounds in some typical Brazilian fruits and juices by SPME-GC method. *Food Addit. Contam.*, **2005**, 22, 508-513

Corpoica, Manejo fitosanitario del cultivo de la guayaba en Santander, Instituto Colombiano Agropecuario, Boletín técnico. Imprenta Nacional de Colombia, **2006**, 40p.

Czerny, M., Grosch, W. Potent odorants of raw Arabica coffee. Their changes during roasting. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 868-872

Chyau, C., Wu, C., Differences in volatile constituents between inner and outer flesh-peel of guava (*Psidium guajava*, Linn) fruit. *Lebensm Wiss Technol.*, **1989**, 22, 104-106

Chyau, C., Chen, S., Wu, M., Differences of volatile and non-volatile constituents between mature and ripe guava (*Psidium guajava* Linn.), *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 846-849.

d'Acampora Zellner, B., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L., Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A.*, **2008**, 1186, 123-143

Drawert, F. Rapp, A., Gas Chromatographische Untersuchung Pflanzlicher Aromen I. Anreicherung, Trennung und Identifizierung von flüchtigen aromastoffen in traubenmosten und wienen. *Chromatographia*, **1968**, 1, 446-457

Dubourdieu, D., Tominaga, T., Polyfunctional thiol compounds. En: *Wine Chemistry and Biochemistry*, Moreno-Arribas, M.V., Polo, C. Eds. Springer, New York, USA, **2008**, p. 275-293

Eisert, R., Pawliszyn, J., New trends in solid phase microextraction. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1997**, 27, 103-135

Ekundayo, O., Ajani, F., Seppanen-Laakso, T., Laakso, I. **Volatile constituents of *Psidium Guajava* L. (guava) fruits** *Flavour Fragr. J.*, **1991**, 6, 233-236

El Bulk, R.E., Babiker, E.F. El Tinay, A.H., Changes in chemical composition of guava fruits during development and ripening. *Food Chem.*, **1997**, 59, 395-399

Engel, K.H., Tressl, R. Identification of new sulfur-containing volatiles in yellow passionfruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 2249-2252.

Engel, W., Bahr, W., Schieberle, P., Solvent assisted flavour evaporation: a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.*, **1999**, 209, 237-241

Fernandez, X.F., Fellous, R., Lizzani-Cuvelier, L., Michel, L., Dompe, V., Cozzolino, F., George, G., Rochard, S., Schippa, C., Identification of thiazolidines in guava: stereochemical studies. *Flavour Fragr. J.*, **2001**, 16, 274-280

Fisher, C., Scott, T.R., Food Flavours. Biology and Chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge-Reino Unido, **1997**, 165p.

Flath, R.A., Forrey, R.R., Volatile components of papaya (*Carica papaya* L., solo variety) *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 24, 103-109

Gómez, S.R., Estudios agronómicos, caracterización fisicoquímica y determinación de uso industrial en diferentes tipos de guayaba (*Psidium guajava* L) en la provincia de Vélez. Memorias segundo seminario internacional de la guayaba y su agroindustria. CIMPA-CORPOICA, Barbosa-Santander, Colombia, **2001**, p. 15

Greger, V., Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in apricots (*Prunus armeniaca*) by application of the molecular sensory science concept. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 5221-5228

Grosch, W. Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Fragr. J.* **1994**, 9, 147-158.

Harmon, A.D., Solid-phase microextraction for the analysis of aromas and flavors. En *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*. Ray Marsili Ed. Marcel Dekker Inc., New York, Estados Unidos, **2002**, p 75-106

Hashinaga, F., Shima, Y., Ito S., Production of volatile components of guava during maturation. *Bull. Fac. Agric. Kagoshima Univ.*, **1987**, 37, 59-64

Holley, A. Processing information about flavour. En: *Flavour in Food*. Voilley, A, Etiévant, P., Eds. CRC, Cambridge, England, **2006**, p.36-54

Idstein, H.; Schreier, P., Volatile constituents from guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **1985**, 33, 138-143.

Jacob, C., A Scent therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, 23, 851-863.

Jordan, M.J., Margaria, C.A., Shaw, P.E., Goodner, K.L. Volatile Components and aroma active compounds in aqueous essence and fresh pink guava fruit puree (*Psidium guajava* L.) by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 1421-1426.

Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J. Applications of solid phase microextraction on food analysis. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 880, 35-62.

Lozano, J.C., Toro, J.C., García, R., Tafur, R., Manual sobre el cultivo del guayabo en Colombia. Fruticultura Colombiana. Litografía Autónoma del Valle, Cali-Colombia, **2002**, 278 p

MacLeod, A.J., González de Troconis, N., Volatile flavour compounds of guava. *Phytochemistry.*, **1982**, 21, 1339-1342

Mateo-Vivaracho, L., Ferreira, V., Cacho, J., Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptohexyl acetate at ng L⁻¹ level by headspace solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometric determination. *J. Chromatogr.*, **2006**, 1121, 1-9

Mayol, A. R., Acree, T.E., Advances in gas chromatography olfactometry. En *Gas Chromatography-Olfactometry. The state of the Art.*, Leland, J.V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T.E. Eds., ACS Symposium Series 782; American Chemical Society: Washington, D.C., **2001**, p. 1-10

Molyneux, R.J.; Schieberle, P., Compound identification: A Journal of Agricultural and Food Chemistry perspective. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 4625-4629

Morel, M.H., Bonicel, J., Micard, V., Guilbert, S., Protein insolubilization and thiol oxidation in sulfite-treated wheat gluten films during aging at various temperatures and relative humidities. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 186-192

Nishimura, O., Yamaguchi, K., Mihara, S., Shibamoto, T., Volatile constituents of guava fruits (*Psidium guajava* L.) and canned puree., *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 139-142

Noble, A.C. Sensory analysis of food flavor. En *Flavour in Food*. Voilley, A., Etiévant, P. Eds. CRC Press, Cambridge, England, **2006**, p 62-80

Ortega, A. G.; Pino, J. A.; Chang, L.; Marbot, R.; Rosado, A.; Gonzalez, G. Studies on the volatile components and sensorial profile of four guava cultivars (*Psidium guajava* L.). *Alimentaria*, **1998**, 298, 31-35.

Ouyang, Y., Pawliszyn, J. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction, *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 627, 184-197

Paniandy, J.C., Chane-Ming, J., Pieribattesti, J.C., Chemical composition of the essential oil and headspace solid-phase microextraction of the guava fruit (*Psidium guajava* L.), *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12, 153-158

Patton, S., Josephson, D.V., A method for determining significance of volatile flavor compounds in foods. *Food Res.*, **1957**, 22, 316

Pattabhiraman, T.R.; Sastry, L.F.L.; Abraham, K.O., Preparation of odour concentrates and identification of odours ingredients in mango and guava- Part II. *P. & E.O.R.*, **1969**, 233-238

Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. **1997**, Wiley-VCH, New York, p- 256-269

Pérez Gutiérrez, R.M., Mitchell, S., Vargas Solis, R., *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, 117, 1-27

Pino, J.A., Ortega, A., Rosado, A., Volatile constituents of guava (*Psidium guajava* L.) fruits from Cuba *J. Ess. Oil Res.*, **1999**, 11, 623-628.

Poisson, L. Kerler, J., Liardon, R. Assessment of the contribution of new aroma compounds found in coffee to the aroma of coffee brews. En: State of the Art in Flavor Chemistry and Biology. Hofmann, T., Rothe, M., Schieberle, P., Eds. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie. Garching-Germany, **2004**, p.495

Plutowska, B., Wardencki, W., Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chem.*, **2007**, 101, 845–872

Prabha, T.N., Narayanan, M.S., Patwardhan, M.V., Flavour formation in callus cultures of guava (*Psidium guajava*) fruit. *J. Sci. Food Agric.*, **1990**, 50, 105-110

Quijano, C., Suarez, M., Duque, C. Volatile constituents of two guava (*Psidium guajava*) varieties: Palmira ICA-1 and Glum Sali. *Rev. Col. Quim.*, **1999**, 28, 55-63

Reineccius, G. *Flavor Chemistry and Technology*. CRC Press-Taylor and Francis Group. Second edition, USA; **2006**, 489p.

Salazar, D.M., Melgarejo, P., Martínez. R., Martínez, J.J., Hernández, F., Burguera, M., Phenological stages of the guava tree (*Psidium guajava* L.) *Sci. Horti.*, **2006**, 108, 157-161

Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. En: *Characterization of Food: Emerging Methods*. A.G. Gaonkar Ed., Elsevier, Amsterdam, **1995**, p. 403-443

Schieberle, P., Grosch, W. Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1987**, 185, 111-113

Sen, A., Grosch, W. Synthesis of six deuterated sulfur containing odorants to be used as internal standards in quantification assays. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1991**, 192, 541-547

Sena virtual,. Manejo postcosecha del cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.), **2006**
<http://www.biblioteca.senavirtual.edu.co> Consultado en Julio 2009

Soares, F.D., Pereira, T., Maio M.O., Monteiro, A.R., Volatile and non-volatile chemical composition of the White guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. *Food Chem.*, **2007**, 100, 15-21

Stevens, K.L., Brekke, J.E., Stern, D.J. Volatile constituents in guava., *J. Agric. Food Chem.*, **1970**, 18, 598-599.

Tokitomo, Y., Steinhaus, M., Büttner, A., Schieberle, P. Odor-Active constituents in fresh pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) by quantitative and sensory evaluation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2005**, 69, 1323-1330

Tominaga, T., Murat, M.L., Dubourdieu, D., Development of a method for analysis of the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Suvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 1044-1048

Torline, P., Ballschmieter, H.M.B., Volatile constituents from guava. I. A comparison of extraction methods. *Lebensm. Wiss Technol.*, **1973**, 6, 32-33

Toth-Markus, M., Siddiqui, S., Kovacs, E., Roth, E., Nemeth-Szerdahelyi, E. Changes in flavour, cell wall degrading enzymes and ultrastructure of guava (*Psidium guajava* L.) during ripening. *Acta Aliment.*, **2005**, 34, 259-266

Toulemonde, B., Beauverd, D., Headspace analysis. Trap desorption by microwave energy application to the volatile components of some tropical fruits. Proceedings of the 4th Weurman Flavor Research Symposium, Elsevier Science Publishers B.V., Dourdan, France, **1985**, p.40-45.

Ullrich, F., Grosch, W., Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1987**, 184, 277

Vernin, G., Vernin, E., Vernin, C., Metzger, J., Soliman, A. Extraction and GC-MS-specma data bank analysis of the aroma of *Psidium guajava* L. fruit from Egypt. *Flavour Fragr. J.*, **1991**, 6, 143-148.

Vermeulen, C., Lejeune, I., Tran, T.T.H., Collin, S., Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 5061-5068

Vermeulen, C., Gijs, L., Collin, S., Sensorial contribution and formation pathways of thiol in foods: A Review. *Food Rev. Int.*, **2005**, 21, 69-137

Wilson, C.W., Shaw, P.E., Terpene hydrocarbons from *Psidium guajava*. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 1435-1436

Yen, G., Lin, H., Pat, Y., Changes in volatile flavor components of guava puree during processing and frozen storage. *J. Food Sci.*, **1992**, 57, 679-685

Yen, G; Lin, H., Changes in volatile flavor components of guava juice with high-pressure treatment and heat processing and during Storage. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2082-2087

Yusoff, S.; Mohamed, S.; Abu Bakar, A. Effect of fruit maturity on the quality and acceptability of guava pure. *Food Chem.*, **1988**, 30, 45-58

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 MATERIAL VEGETAL Y CARACTERIZACIÓN

El presente estudio se desarrolló con frutas de guayaba de dos variedades: regional roja y regional blanca recolectadas en Puente Nacional (Santander) en la Finca Las Aliciaas durante los meses comprendidos entre octubre y diciembre de 2006, 2007 y 2008. Para asegurar una muestra representativa, se seleccionaron 5 árboles de cada variedad de forma aleatoria, los cuales se marcaron con la fecha de inicio de la floración y a partir de la cual se recolectaron manualmente 3-5 frutos de cada árbol una vez que alcanzaron su madurez fisiológica (150 – 160 días), que fueron clasificados por el color de su cáscara, para luego tomar al azar las frutas necesarias para los respectivos análisis (figura 2.1).



Figura 2.1 Recolección y clasificación de frutos de guayaba regional roja y blanca

Para el estudio cualitativo de los componentes activos olfativamente se utilizaron frutas en estado de madurez de consumo y para los análisis de cuantificación por SIDA, las frutas maduras fueron transportadas a Munich-Alemania vía aérea.

Para los estudios de maduración se utilizaron dos tipos de frutas, unas maduras *in situ* y otras maduras durante la poscosecha, las cuales se clasificaron en los diferentes estados de madurez de acuerdo con el color de su cáscara y las propiedades físico-químicas de pH, sólidos solubles (SS) y acidez titulable (AT) presentadas en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Características físico-químicas de la guayaba en diferentes estados de madurez.

Maduración	<i>In situ</i>						Poscosecha				
	Guayaba regional roja			Guayaba regional blanca			Guayaba regional roja		Guayaba regional blanca		
Variedad/ Estado de madurez											
Parámetros	Ii	IIi	IIIi	Ii	IIi	IIIi	Ip	IIIp	Ip	IIp	IIIp
Color											
<i>L</i>	48,10±1,93	55,61±5,74	55,09±5,66	60,45±1,39	61,97±2,81	61,59±4,65	50,57±1,45	62,42±5,50	59,22±1,67	70,11±4,51	76,33±2,90
<i>C</i>	34,98±2,80	36,35±4,40	36,68±6,55	40,54±2,46	43,10±2,40	44,20±4,86	36,80±2,54	45,69±6,45	41,35±2,55	49,22±3,55	47,62±5,15
<i>H</i>	89,62±2,16	85,72±1,06	71,45±2,27	99,45±1,95	93,11±2,35	81,03±4,41	104,78±2,15	79,75±2,35	103,53±1,50	95,95±2,65	85,84±4,85
pH	3,99±0,01	4,16±0,03	4,16±0,01	3,98±0,03	4,04±0,03	4,15±0,02	3,80 ±0,03	4,16±0,03	3,95±0,01	4,05 ±0,03	4,15±0,01
SS (°Brix)	7,9±0,2	8,7±0,3	10,5±0,1	8,9±0,2	9,7±0,1	9,8±0,1	9,8±0,1	10,5±0,1	8,9±0,1	9,8±0,1	11,3±0,1
AT (%)	0,82±0,01	0,74±0,02	0,74±0,05	0,71±0,02	0,62±0,01	0,60±0,04	ND	ND	ND	ND	ND

SS= sólidos solubles (°Brix); AT=ácidez titulable (%), ±desviación estándar

Las frutas maduras *in situ* se analizaron por HS-MEFS el mismo día de su recolección cuando se cumplieron 150, 160 y 170 días de maduración en la planta, contados a partir de la fecha de la floración y se clasificaron en tres estados de madurez: Ii, Iii y IIIi, los cuales pueden considerarse como verde, pintón y maduro.

El seguimiento del aroma de frutas maduras en poscosecha se realizó con frutas de pulpa roja en estados de maduración Ip y IIIp y en guayabas de pulpa blanca en estado Ip, Iip y IIIp, alcanzados a partir de su recolección en madurez fisiológica y su almacenamiento a temperatura ambiente (18°C) en recipientes de icopor abiertos durante 3, 6 y 9 días, respectivamente.

El color de la cáscara fue medido con un colorímetro Hunterlab® Labscan XE (1.00 paso de luz) en áreas diferentes para obtener una medida representativa. El pH fue medido sobre el puré de la fruta con un equipo Hitachi pH-meter. El contenido de sólidos solubles fue medido directamente en el puré de la fruta con un refractómetro Atago HSR-500 y los resultados fueron expresados como °Brix (ICONTEC, 1999a). La acidez titulable fue determinada por titulación de 5 ml de jugo de fruta hasta alcanzar un pH 8.1 con una solución de NaOH 0,1 N y expresada como porcentaje de ácido cítrico por cada 100 g de fruta (ICONTEC, 1999b). Todas las mediciones fueron hechas por triplicado y se sometieron a análisis estadístico para obtener el valor promedio y la desviación estándar.

2.2 MATERIALES Y REACTIVOS

Las siguientes sustancias de referencia para la identificación de los compuestos activos olfativamente fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania): butanoato de etilo, hexanal, (*Z*)-3-hexenal, metional, (+/-)-linalol, benzoato de metilo, benzoato de etilo, ácido butanoico, ácidos 2 y 3-metilbutanoico, ácido pentanoico, ácido heptanoico, ácido fenilacético, γ -octalactona, γ -nonalactona, γ -decalactona, δ -decalactona, γ -dodecalactona, 4-metoxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona, acetato de cinamilo, alcohol cinámico, (*E,E*)-2,4-decadienal,

(*E,E*)-2,4-undecadienal, ácido 3-cloroperbenzoico y $^{13}\text{C}_2$ -acetaldehído. Los compuestos 1-octen-3-ona y 3-sulfanil-1-hexanol fueron adquiridos de Alfa Aesar, (Karlsruhe, Alemania)

Los solventes diclorometano, éter etílico y pentano así como los materiales y reactivos: silica gel (Kiesegel 60, 230-400 mesh), silica gel (silica 60, 0,040-0,063mm,), acetato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, sulfato de sodio anhidro, tiosulfato de sodio y ácido clorhídrico fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Affi-gel 10 fue adquirido de Bio-Rad (Munich, Alemania) y C_{18} (C-Gel C18 C-490) de Alltech (Munich, Alemania).

2.3 SINTESIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE REFERENCIA

Las sustancias de referencia y los compuestos marcados isotópicamente que no se encontraron disponibles comercialmente fueron sintetizados como se indica a continuación.

2.3.1 Compuestos volátiles de referencia para identificación. Para corroborar la identidad de compuestos activos olfativamente se requiere el uso de sustancias de referencia para comparar sus características olfativas sensoriales, cromatográficas y espectrales. Algunas de estas sustancias fueron sintetizadas. En cada compuesto, la pureza olfativa y el valor umbral de olor fueron determinados por CG-O. El número entre paréntesis corresponde al presentado en la tabla 3.5

(*E*)-3-Hexenal (5)

Sobre una solución de 1,1,1-tris(acetiloxi)-1,1-dihidro-1,2-bencenyodioxol-3-(*IH*)-ona (periodinano Dess-Martin, 550 mg; 1,3 mmol) en 5 ml de diclorometano se adicionó una solución de (*E*)-2-hexenol (100 mg, 1mmol) previamente disueltos en 5 ml adicionales de diclorometano (Dess y Martin, 1983). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se adicionaron 80 ml de éter etílico y la mezcla se lavó con porciones sucesivas de una solución de tiosulfato de sodio saturada con bicarbonato de sodio (1 M, 100 ml) seguida por una solución de bicarbonato de sodio (0,5 M, 100 ml) y una porción de agua (50 ml). La mezcla se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. Enseguida se

adicionaron 2 ml de hexano y se concentró a un volumen de 2 ml. La purificación de la síntesis se realizó por CC sobre sílica gel (9 g, sílica 60, 0,040-0,063 mm). El aldehído fue eluído con una mezcla de pentano:éter etílico (9:1, 50 ml). La concentración fue determinada por CG-FID usando como estándar interno (*E*)-2-hexenal. Finalmente se obtuvieron 44 mg del compuesto (44%). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 41 (100), 69 (44), 39 (27), 55 (24), 42 (15), 83 (12), 98 (12), 70 (12), 80 (11), 53 (10). EM-IQ (isobutano) m/z (% abundancia relativa): 99 (100; M+H⁺).

(Z)-1,5-Octadien-3-ona (11)

Mediante reacción de Grignard entre el (*Z*)-3-hexenal (294 mg; 3 mmol) y bromuro de vinilmagnesio (80 mg; 10 mmol) se obtuvo (*Z*)-1,5-octadien-3-ol. La oxidación posterior con periodinano Dess-Martin (933 mg; 2,2 mmol) permitió la obtención de 87 mg de (*Z*)-1,5-octadien-3-ona (35%) (Ullrich y Grosch, 1988). La concentración fue determinada usando 1-octen-3-ona como estándar interno. EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 55 (100), 41 (23), 39 (9), 95 (8), 109 (7), 67 (6), 69 (5). EM-IQ (isobutano), m/z (% abundancia relativa): 125 (100; M+H⁺).

2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (16 y 18)

La síntesis de los cuatro isómeros del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo se realizó a partir de *L*-isoleucina (102 mg; 0,78 mmol), *D*-isoleucina (117,4 mg; 0,90 mmol), *L*-allo-isoleucina (119,1 mg; 0,91 mmol), *D*-allo-isoleucina (118,8 mg; 0,91 mmol) según la metodología propuesta por Snowden, et al. (2005) (figura 2.2) disolviendo separadamente cada uno de los aminoácidos en 10 ml de ácido sulfúrico (1 M) y dejando en agitación la mezcla de reacción en un baño de hielo. Posteriormente se adicionaron 10 ml de una solución de nitrito de sodio (0,015 M) y se dejó en agitación durante 32 horas. Finalmente el pH se ajustó entre 2 y 3 con una solución de bicarbonato de sodio (0,5 M), se adicionó cloruro de sodio hasta saturación y en cada caso se extrajo el producto con acetato de etilo (3 porciones de 20 ml).

El solvente se eliminó en cada caso por destilación al vacío y el residuo se disolvió en 10 ml de metanol. Luego, se adicionaron 5 gotas de ácido sulfúrico al 95% y se mantuvo en

reacción a 60 °C durante 5 horas, después la mezcla fría se colocó en el rotavapor a 50 °C. En todos los casos la muestra obtenida fue un líquido viscoso amarillo, cuya nota olfativa fue descrita como frutal, verde, semejante al aroma del kiwi.

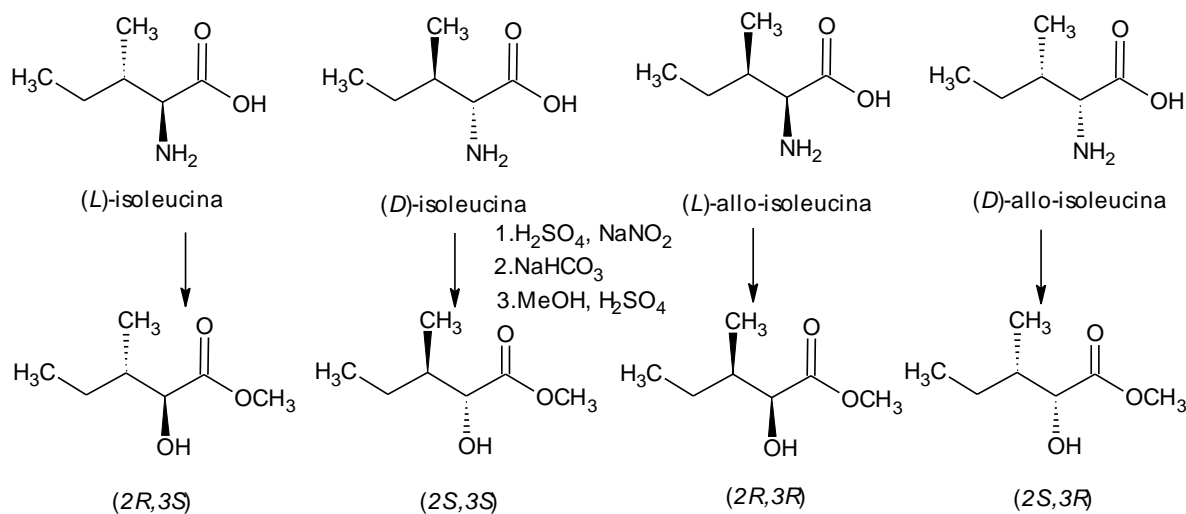


Figura 2.2 Diagrama de la síntesis de los cuatro estereoisómeros del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo

Los datos obtenidos para cada componente fueron:

$(2R,3S)$ -2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo: 52 mg (40%). EM-IE, m/z (abundancia relativa en %): 90 (100), 87 (71), 45 (70), 41 (47), 57 (38), 69 (25), 43 (14), 58 (10), 39 (9). EM-IQ (isobutano), m/z (abundancia relativa en %): 147 (100; $\text{M}+\text{H}^+$).

$(2S,3S)$ -2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo: 29 mg (22%). EM-IE, m/z (abundancia relativa en %): 90 (100), 87 (62), 45 (55), 41 (44), 57 (41), 69 (23), 39 (8). EM-IQ, m/z (abundancia relativa en %): 147 (100; $\text{M}+\text{H}^+$).

$(2R,3R)$ -2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo: 57 mg (43%). EM-IE, m/z (abundancia relativa en %): 90 (100), 45 (62), 87 (59), 41 (44), 57 (36), 69 (20), 43 (14), 39 (9), 58 (9). EM-IQ (isobutano), m/z (abundancia relativa en %): 147 (100; $\text{M}+\text{H}^+$).

(2*S*,3*R*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo: 41 mg (31%). EM-IE, m/z (abundancia relativa en %): 90 (100), 87 (65), 45 (51), 57 (35), 41 (34), 69 (21), 85 (8), 58 (7). EM-IQ (isobutano), m/z (abundancia relativa en %): 147 (100; M+H⁺).

Acetato de (3*R*/3*S*)-sulfanilhexilo (26) y (3*R*/3*S*)-sulfanil-1-hexanol (29)

Sobre una solución de 3-sulfanil-1-hexanol (2,69 g; 200 mmol en 15 ml de diclorometano) se adicionó una solución de cloruro de acetilo (3,93 g; 50 mmol en 14 ml de diclorometano) a 0°C bajo atmosfera de argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El solvente y el exceso de cloruro de acetilo se eliminaron por destilación al vacío (Heusinger y Mosandl, 1994). De esta forma se obtuvieron 2,64 mg de una mezcla racémica de acetato de (3*R*/3*S*)-sulfanilhexilo (75%). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 43 (100), 55 (49), 88 (45), 116 (45), 83 (38), 73 (33), 87 (25), 67 (22), 41 (21), 82 (14). EM-IQ (isobutano) (% abundancia relativa): 117 (100; M+H⁺-CH₃COOH).

Para la separación de los isómeros en una escala preparativa, la mezcla racémica del acetato de 3-mercaptohexilo se hizo reaccionar con ácido (1*S*,4*R*)-clorocamfenoico para obtener los diastereoisómeros *R* y *S* de los acetatos de (3*R*) y (3*S*)-[(1*S*,4*R*)-camfonil]sulfanilhexilo los cuales se separaron por cromatografía en columna. La elución se llevo a cabo sobre silica gel (60 x 3,5 cm d.i) con una mezcla pentano:éter etílico (8:2) recogiendo 80 fracciones de 50ml cada una. El seguimiento por CCD (silica gel 60 F₂₅₄ 5x10 cm) se realizó usando la misma mezcla de elución. De esta forma los compuestos de interés fueron detectados en las fracciones 39 a 72. Esta fracciones fueron analizadas por HPLC, indicando que la fracción 45 estaba enriquecida en el isómero (3*R*) y la fracción 69 en el isómero (3*S*).

Las fracciones combinadas 39 a 44 y 46 a 48 (enantiomero *R*), las fracciones combinadas 65 a 68 y 70 a 72 (enantiomero *S*) y las fracciones 45 y 69 se utilizaron para recuperar el tiol y su acetato. El tiol se recuperó por reducción con LiAlH₄ disuelto en éter etílico y reacción en reflujo durante 2 horas. Los respectivos acetatos (3*R*) y (3*S*) se obtuvieron por reacción de los respectivos tioles con cloruro de acetilo disuelto en diclorometano durante 2 horas a temperatura ambiente. La figura 2.3 muestra el diagrama completo de la ruta sintética empleada.

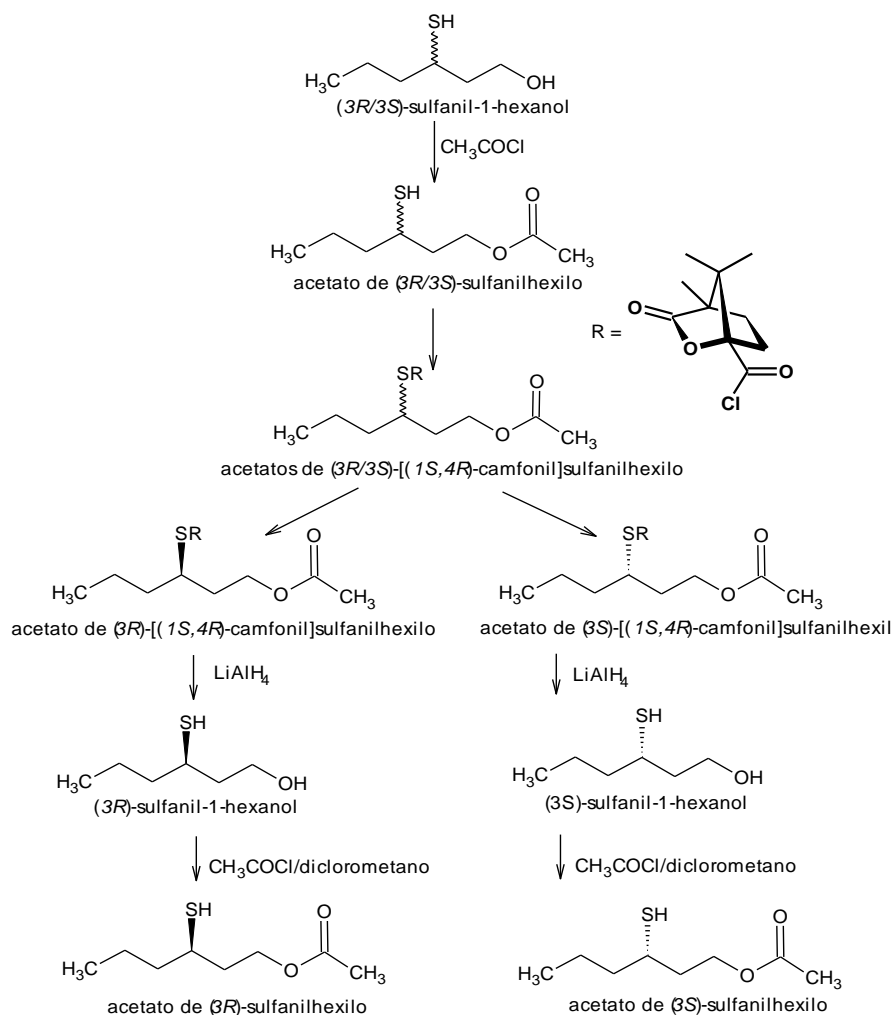


Figura 2.3 Síntesis para la separación de enantiómeros (3*R*/3*S*)-sulfanil-1-hexanol y acetato de (3*R*/3*S*)-sulfanilhexilo.

La concentración de los productos de síntesis fue determinada usando octanoato de metilo como estándar interno. Como resultado de la síntesis a partir de las fracciones 45 y 69 se obtuvieron 7,46 mg del (3*R*)-3-sulfanil-1-hexanol (ee 99,8%) y 6,78 mg del (3*S*)-3-sulfanil-1-hexanol (ee 99,7%) respectivamente. EM-IE, m/z (abundancia relativa en %): 55 (100), 100 (64), 57(57), 41 (49), 61(43), 67 (35), 82 (34), 83 (28), 47 (19), 73 (16), 88 (15), 39 (15), 43 (14), 134 (14, M^+), 56 (13), 71 (13), 69 (13), 45 (12), 42 (11), 59 (11).

La síntesis de los acetatos se realizó separadamente a partir de 3,73 mg (0,028 mmol) de (3*R*)-3-sulfanil-1-hexanol y de 3,39 mg (0,025 mmol) de (3*S*)-3-sulfanil-1-hexanol como se describió para la mezcla racémica. El producto de reacción se purificó por CC sobre sílica

gel (15 x 2 cm d.i.) y elución con 300 ml de una mezcla pentano:éter etílico (9:1). Se recolectaron fracciones de 50 ml y los tioacetatos fueron detectados por CCD en las fracciones 3 a 4. La concentración fue determinada por CG-FID usando octanoato de metilo como estándar interno. Así se obtuvieron 2,30 mg de acetato de (3*R*)-3-sulfanilhexilo (41%; ee 100%) y 2,71 mg de acetato de (3*S*)-3-sulfanilhexilo (53%; ee 99,5%).

Los tioacetatos obtenidos a partir de las fracciones combinadas 39-44 y 46-48 (enantiómero *R*) y de las fracciones 65-68 y 70-72 (enantiómero *S*), se emplearon en la síntesis de los derivados diastereoisoméricos fenilpropanoides para la asignación de la configuración absoluta de los tioles sintetizados (figura 2.4). Los tioacetatos se hicieron reaccionar separadamente con cloruro de (2*R*)-fenilpropanoilo obtenido a partir del ácido (2*R*)-fenilpropanoico y cloruro de oxalilo. El producto de reacción fue purificado por CC sobre sílica gel (15 x 2 cm d.i.) y elución con 200 ml de una mezcla pentano:éter etílico (9:1).

Cada uno de los derivados obtenidos se analizó por RMN ¹H en las condiciones expuestas en el numeral 2.6.6 y mediante el cálculo de las diferencias en los desplazamientos químicos y aplicación del modelo de Helmchen se logró establecer la configuración absoluta de los isómeros sintetizados (Heusinger y Mosandl, 1984).

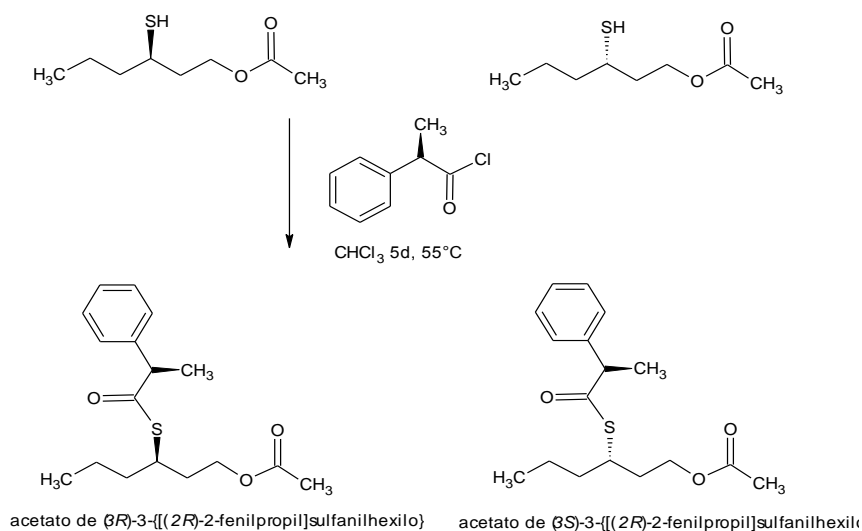


Figura 2.4 Diagrama de la síntesis de los acetatos de (2*R*,3*S*) y (2*R*,3*R*)-2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo

***trans*-4,5-Epoxi-(*E*)-2-decenal (35) y *trans*-4,5-Epoxi-(*E*)-2-undecenal (38)**

La síntesis de estos compuestos se realizó por reacción de (*E,E*)-2,4-decadienal y (*E,E*)-2,4-undecadienal con ácido 3-cloroperbenzoico respectivamente (Schieberle y Grosch, 1991). – El (*E,E*)-2,4-decadienal (912 mg, 6 mmol) y el ácido 3-cloroperbenzoico (836 mg, 6 mmol) se disolvieron por separado en 10 ml de diclorometano. El agente oxidante se adicionó en porciones de 5 ml durante 1 hora a temperatura ambiente y la mezcla se mantuvo a -25 °C durante 12 horas. La mezcla finalmente se extrajo 2 veces con porciones de 50 ml de carbonato de sodio (0,5 M) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El producto se concentró a un volumen de 2,5 ml y se analizó por CG-O.

En el caso de la síntesis del *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-undecenal se emplearon 996 mg de (*E,E*)-2,4-undecadienal (6 mmol) y 912 mg de ácido 3-cloroperbenzoico (6 mmol) en las condiciones descritas anteriormente. Como producto de esta síntesis se obtuvo una mezcla del *trans*-2,3-(*E*)-epoxiundecenal (nota cítrica, grasa) y del *trans*-4,5-(*E*)-2-undecenal (nota metálica) fácilmente diferenciables no solo por su nota olfativa sino por sus IR en columna DB-5 (1393 y 1486, respectivamente). Sin embargo, el valor umbral del componente *trans*-2,3-epoxiundecenal no superó en 100 veces el valor umbral del compuesto de interés, razón por la cual el resultado de esta síntesis se utilizó como sustancia de referencia para la identificación del *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-undecenal en la mezcla de aroma de guayaba.

La concentración de los productos de las síntesis fue determinada por CG-FID usando como estándar interno (*E,E*)-2,4-decadienal y (*E,E*)-2,4-undecadienal respectivamente. Así se obtuvieron 43,2 mg de *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal (4%). EM-IE, m/z (abundancia relativa en %): 68(100), 81 (15), 39 (14), 45 (11), 43 (10), 44 (10), 57 (10), 69 (9), 42 (9), 40 (8), 41 (7), 46 (6), 58 (5), 55 (5), 59 (5), 109 (4), 84 (4), 82 (3), 56 (3), 85 (3), 71 (3), 83 (3), 70 (2), 47 (2), 97 (2), 60 (2), 108 (2), 53 (2), 54 (2), 86 (1), 143 (1), 95 (1), 67 (1), 72 (1). EM-IQ m/z (% abundancia relativa): 169 (100; M+H⁺), 151 (31; M+H⁺-H₂O), 170 (10), 107 (10), 123 (8), 153 (6), 139 (6), 109 (5), 125 (4); y 52,2 mg de *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-undecenal (5%). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 68 (100), 41 (12), 81 (28), 166 (4). EM-IQ, m/z (% abundancia relativa): 183 (100; M+H⁺), 165 (20; M+H⁺-H₂O).

2.3.2 Síntesis de los compuestos marcados isotópicamente. Muchos de los compuestos marcados isotópicamente empleados en el análisis cuantitativo del aroma de la guayaba fueron previamente sintetizados en el laboratorio de química de aromas del profesor Dr. Peter Schieberle de la Universidad Tecnológica de Munich-Alemania. Con base en el resultado del estudio del aroma de la guayaba, como parte de este trabajo se sintetizaron los compuestos marcados isotópicamente identificados por primera vez en su aroma: 3-sulfanil-1-hexanol (**29d**), acetato de 3-sulfanilhexilo (**26d**), (*2R,3S*) y (*2S,3S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (**16d** y **18d**) (Los números entre paréntesis corresponden a los presentados en la tabla 3.6). La síntesis de estos compuestos se describe a continuación.

[1,1-²H₂]-3-Sulfanil-1-hexanol (**29d**)

Para la obtención de este compuesto se empleó un procedimiento análogo al seguido para la síntesis del [1,1-²H₂]-3-sulfanil-2-metil-1-pentanol (Granvogel, et al, 2004), pero a partir de (*E*)-2-hexenal como se muestra en la figura 2.5.

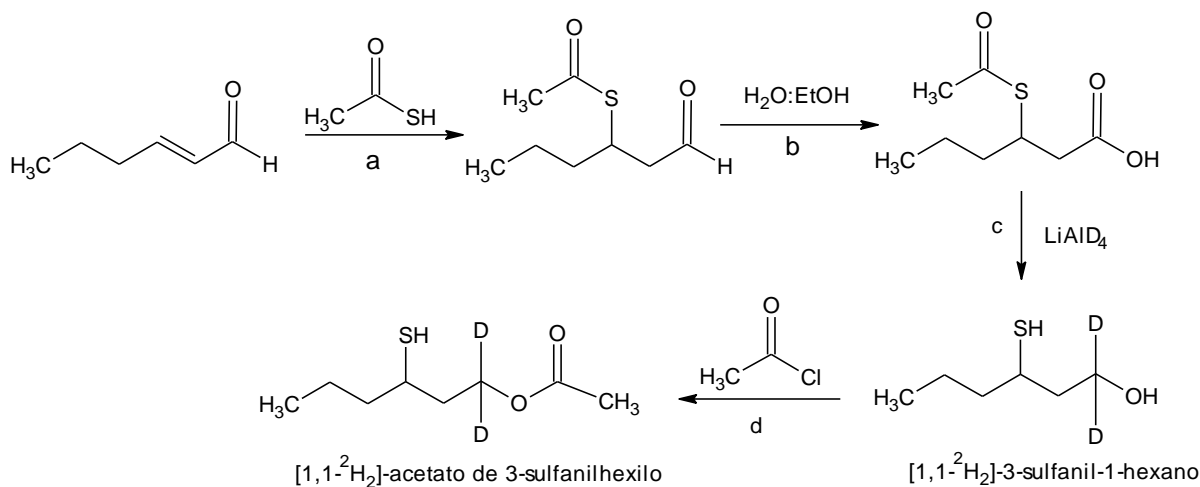


Figura 2.5 Esquema de la síntesis de [1,1-²H₂]-3-sulfanil-1-hexanol (**29d**) y [1,1-²H₂]-acetato de 3-sulfanilhexilo (**26d**). Síntesis de a. 3-(acetiltio)-hexanal; b. ácido 3-(acetiltio)-hexanoico; c. [1,1-²H₂]-3-sulfanil-1-hexanol y d. [1,1-²H₂]-acetato de 3-sulfanilhexilo

- Síntesis del 3-(acetiltio)-hexanal. En un sistema bajo atmósfera de argón se disolvieron 2,5 ml de (*E*)-2-hexenal (20 mmol) en 20 ml de piperidina (0,25 mmol). Sobre esta solución se adicionaron lentamente 2 ml de ácido tioacético (27 mmol). La mezcla se dejó en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de reacción se adicionaron 220 ml de éter etílico y la mezcla se lavó con HCl (1 M) dos veces con porciones de 5 ml y luego con una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). La fase orgánica obtenida se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró por destilación en una columna Vigreux. EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 44 (100), 40 (16), 45 (12), 43 (8), 41 (6), 39 (5), 43 (5), 42 (4), 36 (4), 73 (4)

- b. Ácido 3-(acetiltio)-hexanoico: el producto de la síntesis anterior se mezcló con 2,5 g de ácido amidosulfónico (26 mmol) y se disolvieron en una mezcla de agua:etanol 2,5:1 (30 ml). Posteriormente se adicionó una solución de NaClO (27 mmol) en etanol:agua 1:1 (30 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Al cabo de este tiempo, la solución obtenida se extrajo con éter etílico (2 x 80 ml) y las fases etéreas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro y el solvente se removió al vacío en un rotavapor. EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 43 (100), 45 (47), 70 (27), 44 (23), 130 (23), 55 (22), 97 (21), 41 (19), 69 (19), 89 (19), 73 (15), 87 (15), 60 (10), 71 (10), 88 (10).
- c. [1,1-²H₂]-3-sulfanil-1-hexanol: El ácido 3-(acetiltio)-hexanoico obtenido en el paso anterior se disolvió en 5 ml de éter etílico y se adicionó gota a gota sobre una suspensión de 1,3 g de LiAlD₄ (30 mmol) en 25 ml de éter etílico bajo atmósfera de argón. Después de dejar en reflujo y agitación durante 3 horas, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se adicionaron 15 ml de una solución saturada de NH₄Cl, seguida por 10 ml de una solución de HCl (2 M). La fase orgánica se separó y lavó con 10 ml de una solución saturada de NaHCO₃ y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro para finalmente llevarla a un volumen de 100 ml con éter etílico. Así se obtuvieron 289 mg de [1,1-²H₂]-3-sulfanil-1-hexanol (11%). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 55 (100), 41 (94), 61 (86), 58 (82), 56 (74), 57 (61), 102 (59) 69 (58), 85 (47), 42 (45), 101 (44), 83 (42), 47 (37), 43 (36), 39 (35), 68 (33), 84 (31), 89 (31), 75 (29), 59 (28), 45 (24), 136 (24); EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 119 (100; M+H-H₂O).

[1,1-²H₂]-Acetato de 3-sulfanilhexilo (26d)

Una solución de 70,7 mg de [1,1-²H₂]-3-sulfanil-1-hexanol (0,52 mmol) en diclorometano se adicionó gota a gota sobre una solución de 0,1 g de cloruro de acetilo (1,3 mmol) en 3 ml de diclorometano a 0 °C. Después de agitar por 2 horas, el solvente y el exceso de cloruro de acetilo se removieron por destilación a presión reducida (figura 2.5d). Se obtuvieron 81 mg (87%) del [1,1-²H₂]-acetato de 3-sulfanilhexilo. EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 43 (100), 90 (42), 118 (40), 85 (39), 75 (32), 55 (25), 56 (23), 89 (19), 57 (18), 69 (18), 41 (16), 87 (15), 84 (14), 103 (12), 42 (11), 45 (10). EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 119 (100; M+H-CH₃COOH).

[²H₃]-(*2R,3S*) y (*2S,3S*)- 2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (16d y 18d)

Teniendo en cuenta que en el aroma de la guayaba solo están presentes dos diastereoisómeros de esta molécula, se realizó la síntesis de los respectivos estándares marcados isotópicamente. Estos compuestos se obtuvieron a partir de (*L*)-isoleucina y (*D*)-allo-isoleucina, respectivamente, utilizando la misma reacción de la figura 2.2 pero con [²H₄]-metanol como fuente de deuterio. Así se obtuvieron 15 mg del [²H₃]-(*2R,3S*) 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (24%); EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 93 (100), 87 (69), 45 (69), 36 (43), 41 (40), 57 (28), 69 (24), 36 (17), 40 (13), 38 (12), 43 (11), 39 (10), 58 (8); EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 150 (100; M+H⁺); 21 mg del (*2S,3S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (30%); EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 93 (100), 87 (57), 45 (55), 41 (36), 36 (28), 57 (26), 69 (21), 36 (16), 38 (8), 43 (8), 58 (8), 40 (8), 39 (8); EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 150 (100; M+H⁺).

[1,1-²H₂]-Alcohol cinámico (45d)

Este compuesto marcado isotópicamente se preparó por reducción de cinamato de etilo con LiAlD₄ (Klemm, et al, 1966). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 93 (100), 136 (75), 92 (56), 78 (47), 91 (44), 79 (42), 117 (40), 106 (38), 77 (35), 94 (30), 107 (26), 51 (26), 80 (21), 116 (20), 135 (17), 118 (16), 104 (15), 119 (12), 63 (12), 103 (12), 39 (11), 105 (11). EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 119 (100; M+H-H₂O), 120 (9).

[1,1-²H₂]-Acetato de cinamilo (41d)

Se preparó por reacción del alcohol cinámico marcado (45d) con una solución de cloruro de acetilo. EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 43 (100), 116 (80), 117 (67), 135 (55), 136 (54), 119 (49), 107 (37), 178 (34), 118 (34), 93 (27), 92 (12), 94 (12), 77 (12), 78 (10), 51 (8), 79 (8). EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 119 (100; M+H-CH₃COOH).

[2,2,2-²H₃]-Butanoato de etilo (3d)

La reacción controlada de ácido butanoico y [2,2,2-²H₃]-etanol en presencia de ácido sulfúrico permitió la obtención de [2,2,2-²H₃]-butanoato de etilo. EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 71 (100), 91 (91), 43 (79), 41 (56), 61 (42), 42 (41), 74 (35), 48 (28), 39 (21), 72 (20), 104 (20), 73 (13), 90 (13). EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 120 (100; M+H⁺).

[²H₅]-Benzoato de metilo (22d)

Sobre una mezcla de metanol y óxido de zinc se adicionó [²H₅]-cloruro de benzoilo (Tamaddon, et al., 2005). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 110 (100), 82 (90), 52 (83), 141 (29), 54 (18), 52 (6), 111 (6), 83 (3), 142 (2). EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 142 (100; M+H⁺).

[²H₅]-Benzoato de etilo (24d)

La síntesis de este compuesto se realizó de manera análoga a la empleada para la obtención del éster metílico, pero usando etanol en cambio de metanol. EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 110 (100), 82 (40), 127, (27), 54 (15), 155 (12), 111 (7), 83 (3), 109 (4), 52 (4), 83 (3), 128 (2). EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 156 (100; M+H⁺).

[5,5,6,6-²H₄]-Hexanal (4d)

A partir de [5,5,6,6-²H₄]-hexanol, el cual se obtuvo mediante deuteración de 5-hexin-1-ol usando un catalizador de Wilkinson y su subsecuente oxidación usando periodinano Dess-Martin (Young, et al, 1965, Dess, et al, 1983). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 44 (100), 59 (45), 60 (41), 43 (31), 45 (23), 57 (22), 46 (21), 58 (19), 61 (18), 41 (17), 76 (15),

42 (14), 47 (14). EM-IQ (metanol), m/z (% abundancia relativa): 87 (100; M+H⁺-H₂O), 105 (93; M+H⁺), 86 (92; M+H⁺-HDO).

[5,5,6,6,6-²H₅]-(*Z*)-3-Hexenal (6d)

El compuesto fue obtenido a partir de 2-([5,5,6,6,6-²H₅]-3-hexin-1-iloxi)tetrahydro-2H-pirano el cual fue sintetizado a partir de 2-(3-butin-iloxi)-tetrahydro-2H-pirano y [²H₅]-yoduro de etilo y posterior hidrólisis en [5,5,6,6,6-²H₅]-3-hexin-1-ol (Brenstrum, et al, 1993) el cual fue finalmente convertido en [5,5,6,6,6-²H₅]-(*Z*)-3-hexenal usando periodinano Dess-Martin (Dess, et al, 1983). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 44 (100), 43 (90), 74 (83), 45 (40), 46 (39), 57 (35), 42 (34), 103 (30), 85 (26), 41 (23), 60 (22), 40 (21), 39 (16), 47 (13), 72 (13), 84 (10), 56 (10), 55 (10), 73 (10), 58 (10). EM-IQ (metanol) m/z (% abundancia relativa): 85 (100; M+H⁺-HDO), 84 (35; M+H⁺-D₂O), 86 (17; M+H⁺-H₂O), 104 (17; M+H⁺).

[7,7,8,8-²H₄]-*trans*-4,5-Epoxi-(*E*)-2-decenal (35d)

El decadienal marcado se obtuvo a partir de [3,3,4,4-²H₄]-hexanal obtenido de manera análoga a la descrita anteriormente para la obtención de [5,5,6,6-²H₄]-hexanal (4d), reemplazando el 5-hexin-1-ol por 3-hexin-1-ol. La reacción entre el aldehído marcado y un reactivo de Grignard permitió la obtención del decadienal que fue finalmente sometido a epoxidación (Guth y Grosch, 1990). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 68 (100), 81 (35), 109 (10), 143 (5). EM-IQ (isobutano) m/z (% abundancia relativa): 173 (100; M+H⁺), 154 (17; M+H⁺-H₂O),

([²H₃]-Metiltio)propanal (metional) (14d)

La síntesis de metional marcado se realizó mediante el tratamiento de un haluro de alquilo con sales de mercaptanos. Aunque la solubilidad del haluro de alquilo en agua es pequeña, la alta reactividad del compuesto azufrado es suficiente para obtener una reacción completa. La función éster es reducida con hidruro de aluminio y litio para obtener el respectivo alcohol, el cual se oxida con clorocromato de piridinium hasta el aldehído (Sen y Grosch, 1991). EM-IE, m/z (% abundancia relativa): 51 (100), 107 (78, M⁺), 79 (28), 64 (27), 49 (20), 55 (19).

[²H₃]-4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (21d)

Una solución de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona y [²H₃]-yoduro de metilo en 10ml de acetona fueron puestos en reflujo en presencia de carbonato de potasio. EM-IQ, *m/z* (% abundancia relativa): 145 (100, M⁺), 43 (60), 127 (20), 74 (20), 58 (20) (Schieberle y Hofmann, 1997).

[¹³C₂]-4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (37c)

El compuesto fue marcado con ¹³C para evitar el intercambio de hidrógeno y oxígeno durante el análisis, empleando como fuente de átomos marcados [¹³C₂]- acetaldehído. El 3-butin-2-ol, protegido con bicarbonato de *tert*-butilo (BOC) se hizo reaccionar con diisopropilamido de litio (LDA) y luego con [¹³C₂]- acetaldehído, para obtener un alcóxido, el cual posteriormente se hizo reaccionar con bicarbonato de *tert*-butilo para producir un alquino doblemente protegido. La oxidación del alquino protegido con permanganato de potasio permitió obtener la 1,2-diona. Al remover los grupos protectores BOC con ácido oxálico, se produjo simultáneamente una reacción de ciclización que permitió obtener el analito marcado isotópicamente (Blank, et al, 1997). EM-IE, *m/z* (% abundancia relativa): 130 (100), 87 (12), 85 (13), 59 (32), 57 (41), 45 (47), 43 (45), 29 (18); EM-IQ (amoníaco), *m/z* (% abundancia relativa): 148 (100, [M + NH₄]⁺).

[5,6-¹³C₂]-3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona o (¹³C₂)-sotolona (16c)

La síntesis de este componente se realizó mediante la condensación del 2-metil-3-oxobutanodioato de dietilo y el [1,2-¹³C₂]-acetaldehído seguido por la lactonización y subsecuente descarboxilación bajo condiciones fuertemente ácidas. EM-IE, *m/z* (% abundancia relativa): 83 (100), 55 (95), 128 (60, M⁺), 43 (55), 57 (45), 29 (40), 27 (30), 39 (25), 72 (25), 85 (25).

2.4. EXPERIMENTOS DE IDENTIFICACION DE COMPUESTOS ACTIVOS OLFATIVAMENTE.

2.4.1 Extracción de componentes volátiles por SAFE. Las frutas enteras (100g) se homogenizaron durante 5 minutos y se adicionaron 300 ml de diclorometano, enfriando la mezcla sobre un baño de hielo. Luego se adicionaron pequeñas porciones de sulfato de sodio anhidro (300 g) las cuales se homogenizaron mediante agitación continua. El sólido obtenido se empacó en una columna de vidrio y se eluyó con 200 ml de diclorometano. La fase orgánica obtenida que presentó el aroma característico de la guayaba y una coloración rojiza intensa se sometió a destilación a presión reducida usando el equipo SAFE (figura 2.6) cuyo funcionamiento se describe a continuación.

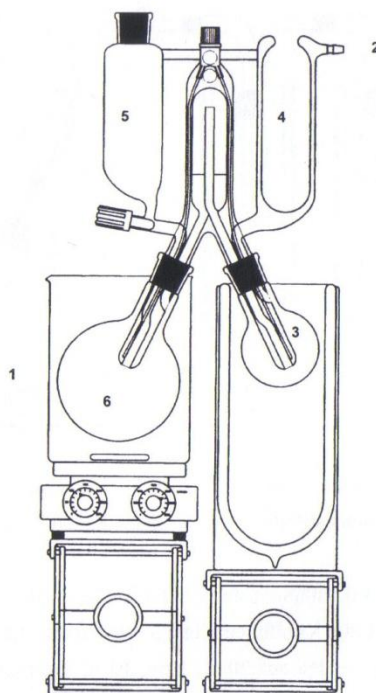


Figura 2.6 Equipo SAFE (Solvent Assisted Flavor Extraction) (Engel et al, 1999)

El equipo SAFE se encuentra completamente termostatado a una temperatura de 40°C y conectado por la salida 2 a una fuente de vacío entre 10^{-2} y 10^{-3} Pa. El balón 6 se sumerge en el baño termostatado 1 a una temperatura de 40°C. La sección 3 se sumerge en un baño de nitrógeno líquido y la sección 4 también se llena con nitrógeno líquido. El extracto de

aroma de guayaba se ubica en el compartimento 5 y se hace ingresar al sistema por operación de la llave del embudo. Los componentes volátiles son condensados en la trampa de nitrógeno y conservados en el balón 3. El extracto así obtenido fue incoloro y presentó el aroma característico de la guayaba.

Para disminuir la complejidad del extracto, los compuestos de aroma fueron separados según su naturaleza química en dos fracciones: compuestos neutros-básicos y compuestos ácidos. La extracción con una solución de carbonato de sodio (0,5 M) permitió remover los componentes ácidos. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró hasta un volumen de 1ml (FNB). La fase acuosa se acidificó (pH 2-3) con una solución de ácido clorhídrico (16 %) y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró hasta un volumen de 1 ml (FA).

2.4.2 Extracción de componentes volátiles por HS-MEFS. Para la extracción por HS-MEFS se usó la fibra: DVB/CAR/PDMS (Supelco). Los análisis se realizaron con 5 g de fruta, en un vial herméticamente cerrado de 200 ml, que se mantuvo durante un tiempo de equilibrio de 45 minutos a 18°C, tiempo después del cual se realizó la extracción de la muestra con un tiempo de muestreo de 15 minutos. Los compuestos retenidos se desorbieron en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases en modo *splitless* a 250°C durante 3 minutos.

2.4.3 Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) y AEDA comparativo. El AEDA se realizó mediante la dilución del extracto obtenido por SAFE en un factor de dilución 2^n y el respectivo análisis por CG-O de las diversas diluciones hasta obtener un número tal de diluciones que ningún odorante fuese percibido. Para ello, se tomó cada una de las fracciones (FNB y FA) a partir de las cuales se prepararon dos diluciones 1:20 y 1:200 que se analizaron por CG-O por al menos tres panelistas en dos fases estacionarias de diferente polaridad (DB-5 y FFAP). La fase estacionaria FFAP en la cual los panelistas detectaron el mayor número de zonas olfativamente activas en la mayor dilución fue seleccionada para hacer el análisis AEDA completo.

Con este fin se prepararon separadamente una serie de diluciones 2^n de las fracciones FNB y FA que se analizaron por CG-O durante dos días consecutivos. En el primer día se analizaron la fracción FNB sin diluir y las diluciones: 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 y 1:1024 y en el segundo día se analizaron las diluciones 1:2, 1:8, 1:32, 1:128, 1:512. Con el fin de asegurar la reproducibilidad de los resultados el análisis se repitió tres veces por dos panelistas. Los resultados del análisis AEDA se graficaron en un diagrama el logaritmo del factor de dilución (FD) vs. el índice de retención (IR).

El AEDA comparativo entre las variedades y entre los estados de madurez se realizó de manera análoga a la descrita anteriormente, comparando extractos obtenidos a partir de la misma cantidad de guayaba y por el mismo método de extracción.

2.4.4 HS-CG-O-AEDA. Para el análisis de componentes de alta volatilidad, se utilizó la extracción por *headspace* (HS) y su análisis por CG-O. En un vial sellado de 300 ml se colocaron 50 g de guayaba, los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se tomaron diferentes volúmenes del HS así: 20 ml, 10 ml, 5 ml, 2.5 ml, 1.25 ml, 0.625 ml que se analizaron por CG-O bajo las condiciones descritas en el numeral 2.6.2.

2.4.5 Fraccionamiento por cromatografía en columna (CC)

2.4.5.1 Fraccionamiento de FNB. La fracción neutra-básica del extracto de aroma fue sometida a CC sobre silica gel (Rieselgel 7% H₂O) usando como eluyente un gradiente discontinuo de pentano:éter etílico en porciones de 50 ml (100:0, 99:1, 90:10, 70:30, 0:100). Se recogieron 25 fracciones de 10 ml cada una que se concentraron por destilación a 40°C hasta un volumen de 0,1 ml. Cada fracción fue analizada por CG-O y la nota olfativa detectada se correlacionó con las percepciones sensoriales detectadas en el análisis CG-O de la fracción neutra-básica completa.

2.4.5.2 Fraccionamiento de FNB para extracción selectiva de los tioles.

Preparación agarosa mercurada: El fraccionamiento de los tioles se realizó sobre una columna Affi-gel 10 (2 ml) previamente mercurada con una solución de acetato de p-

aminofenilmercurio (Tominaga, et al, 1998). Para ello se disolvieron 0,417 g del acetato de p-aminofenilmercurio en 7,5 ml de dimetilformamida con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas, seguido por la adición de 0,25 ml de etanolamina y agitación por 1 hora adicional. La mezcla se filtró usando un embudo Büchner y se lavó con 100 ml de dimetilformamida y 200 ml de isopropanol. El sólido se suspendió en 75 ml de isopropanol y la agarosa mercurada se conservó en una botella ámbar a -20 °C.

Extracción selectiva de tioles: La fracción FNB obtenida según se indicó en el numeral 2.4.1 se pasó por una columna empacada con la agarosa mercurada (2 cm x 0,5 cm d.i.), previamente acondicionada con 5 ml de isopropanol. El extracto se eluyó inicialmente con 15 ml de una mezcla pentano:diclorometano (2:1 v/v) para eliminar otros volátiles. Los tioles retenidos en la agarosa se liberaron por elución con 50 ml de una mezcla pentano:diclorometano (2:1 v/v) que contenía disueltos 77,15 mg de ditioneol (DTT). El eluido obtenido se sometió a extracción SAFE para eliminar el exceso de DTT y el extracto se concentró hasta un volumen de 10 µl usando un vial Dünge (microdestilador). En forma análoga se obtuvo un blanco. La fracción enriquecida en tioles (FT) y el blanco se analizaron por CG-O y CG-EM usando una columna DB-FFAP en las condiciones expuestas en el numeral 2.6.1.

2.4.6 Determinación de la proporción de los ácidos 2 y 3-metilbutanoico. Para establecer la relación de los ácidos 2 y 3-metilbutanoico en la fracción FA del aroma de la guayaba, se preparó una curva de calibración mediante el análisis por CG-EM en modo IE de un conjunto de soluciones preparadas con las siguientes cantidades (v/v) de los ácidos 2 y 3-metilbutanoico: 100:0, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 y 0:100. Estas mezclas se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas (ver numeral 2.6.1) y espectrales (ver numeral 2.6.3). Con la intensidad de los iones fragmento típicos de cada ácido: m/z 74 para el ácido 2-metilbutanoico y m/z 60 para el ácido 3-metilbutanoico, se obtuvo una curva de calibración de la relación entre la intensidad del ion m/z 60 y la suma de las intensidades de los iones m/z 60 y 74 contra el porcentaje de ácido 3-metilbutanoico en la mezcla que permitió establecer el factor de respuesta mediante la siguiente relación:

$$FR = [m_R (3Mb) / m_R (3Mb) + m_R (2Mb)] \times [I_R (60) + I_R (74) / I_R (60)] \quad (\text{I})$$

Donde FR= factor de respuesta; $m_R (3Mb)$ = Cantidad de ácido 3-metilbutanoico en la solución de calibración; $m_R (2Mb)$ = Cantidad de ácido 2-metilbutanoico en la solución de calibración; $I_R (m/z)$ = intensidad del ion fragmento.

La intensidad de los iones fragmento en el extracto de aroma permitió calcular el porcentaje de ácido 3-metilbutanoico teniendo en cuenta la corrección por el factor de respuesta con la siguiente ecuación:

$$A (3Mb) = I_p (60) / [I_p (60) + I_p (74)] \times FR \times 100 \quad (\text{II})$$

Donde A (3Mb) = porcentaje de ácido 3-metilbutanoico; $I_p (m/z)$ = intensidad del ion fragmento y FR = factor de respuesta.

2.4.7 Determinación de la distribución enantiomérica de los compuestos volátiles quirales. Para establecer la distribución enantiomérica del 3-sulfanil-1-hexanol, del acetato de 3-sulfanilhexilo y de los isómeros del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo, cada esteroisómero fue sintetizado y analizado por CG-O. Todos los esteroisómeros presentaron una buena separación tanto en columnas polares (FFAP) como en columnas quirales BGB 175 y BGB-176 (30 m x 0,25 mm d.i.; $df= 0,25 \mu\text{m}$ BGB Analytik, Schlossböckelheim, Alemania). Con los datos espectrales y sensoriales de las sustancias de referencia y mediante la comparación de dichos parámetros con los obtenidos para el extracto de aroma, se estableció la presencia o ausencia de cada esteroisómero en el aroma de la guayaba.

2.4.8 Extracción de precursores cisteinilizados en guayaba e hidrólisis. La extracción de precursores cisteinilizados se realizó mediante la homogenización de 500 g de fruta en agua, la cual fue posteriormente eliminada por liofilización. Así se obtuvieron 20 g de un sólido seco que se redisolvió en 200 ml de agua. Esta solución se extrajo con diclorometano para eliminar componentes volátiles remanentes. Se preparó una columna con fase estacionaria C_{18} (Alltech, C-Gel C18 C-490; 15 cm x 5 cm d.i.) previamente acondicionada con etanol y mezclas sucesivas de etanol:agua 80:20; 60:40; 40:60; 20:80 y agua (Tominaga y Dubourdieu, 2000).

El extracto libre de solvente se aplicó sobre la columna por acción de vacío y se eluyó con un gradiente discontinuo agua:etanol 100:0; 90:10; 80:20; 70:30; 50:50. Se recolectaron 5 fracciones de 150 ml cada una. El etanol de las fracciones se eliminó al vacío a 40°C y el agua remanente fue eliminada por liofilización. Así se obtuvieron 1,6095 g de la fracción 1; 0,1670 g de la fracción 2; 0,2278 g de la fracción 3; 0,0862 g de la fracción 4 y 0,1077 g de la fracción 5.

Cada fracción se sometió a hidrólisis enzimática por dilución de la muestra en 2 ml de buffer fosfato 50 mM (pH 7,4) que contenía 100 mM de piridoxalfosfato. Sobre esta mezcla se adicionaron 200 µl de una solución de triptofanasa (Aldrich, 700 µg/ml). La mezcla se dejó en agitación por una hora a 30°C, tiempo al cabo del cual se extrajo con dos porciones de 1 ml de diclorometano (Wakabayashi, et al, 2004). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a un volumen de 200 µl. Cada extracto fue analizado por CG-O.

2.5 EXPERIMENTOS DE CUANTIFICACIÓN

2.5.1 Determinación de la concentración de soluciones de compuestos marcados isotópicamente. Los productos de cada síntesis fueron obtenidos en soluciones de un volumen definido. Las concentraciones de los estándares fueron determinadas por la relación de áreas con un estándar interno y su respuesta en un detector FID. Para ello se prepararon soluciones independientes en concentraciones conocidas del estándar sin marcar y de octanoato de metilo como estándar interno. Alícuotas de las dos soluciones se mezclaron en relaciones 1+4, 1+1 y 4+1 se analizaron por CG-FID. La relación de las concentraciones y de la intensidad del área obtenida para cada compuesto permitió calcular el respectivo factor de respuesta (FR).

Luego se prepararon soluciones del estándar isotópicamente marcado y octanoato de metilo en relaciones 1+4 y 4+1. La concentración del estándar marcado fue calculada usando

dicho factor de respuesta y la relación de las áreas del compuesto isotópicamente marcado y octanoato de metilo.

$$C_{em} = C_{om} / A_{om} \times A_{em} \times FR \quad (\text{III})$$

Donde C_{em} = concentración del estándar marcado; C_{om} = concentración de octanoato de metilo; A_{om} = área del octanoato de metilo; A_{em} = área del estándar marcado.

2.5.2 Obtención de los extractos de aroma para la cuantificación de componentes activos olfativamente. Los extractos con los componentes de aroma a cuantificar fueron preparados de manera análoga a la indicada en el numeral 2.4.1, agregando cantidades definidas de los estándares marcados en el solvente de extracción. Los estándares fueron agrupados por concentración, es decir en un mismo análisis se cuantificaron componentes mayoritarios y en otro independiente se cuantificaron los componentes minoritarios. La cantidad de muestra y de estándar adicionado fue determinada por diversos ensayos, buscando aquellas cantidades de fruta y estándar que cumplieren una relación lo más cercana posible a 1:1.

Así se emplearon diversas cantidades de material vegetal (0,5 g, 1 g, 10 g, 100 g, 200 g) según la cantidad de analito a cuantificar. La concentración de los estándares estuvo en el rango entre 0,2 y 20 μg .

Los estándares marcados en las cantidades seleccionadas fueron disueltos en cantidades que van desde 50 ml hasta 1000 ml de diclorometano según cada caso, el cual fue adicionado sobre la cantidad de fruta previamente homogenizada durante 5 minutos. Mediante agitación continua y sobre un baño de hielo se adicionaron pequeñas porciones de sulfato de sodio hasta obtener un polvo que se filtro posteriormente. El extracto obtenido fue sometido a destilación SAFE y posteriormente se concentró a un volumen entre 10 μl y 1 ml según la concentración del analito a cuantificar.

2.5.3 Cuantificación de acetaldehído por HS-CG-EM. Para la determinación de acetaldehído se prepararon soluciones acuosas independientes de [$^{13}\text{C}_2$]-acetaldehído y acetaldehído (aprox. 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se prepararon mezclas de acetaldehído marcado y sin

marcar en relaciones 1:1; 1:0,5; 1:0,2; 0,5:1 y 0,2:1. Las mezclas se analizaron por HS-CG-EM y se determinaron las áreas de los iones fragmento m/z 45 y 47 para el acetaldehído sin marcar y marcado respectivamente. Al graficar la relación de la intensidad de los iones fragmento característicos de cada analito y su análogo marcado isotópicamente –vs- la relación de sus concentraciones, se obtiene una relación lineal cuya pendiente corresponde al FR.

Para determinar el contenido de acetaldehído en la guayaba se prepararon muestras de guayaba con cantidades de fruta y acetaldehído hasta obtener áreas de los iones fragmento en una relación aproximadamente 1:1. El puré de la fruta se disolvió en 50 ml de agua destilada que se mantuvo durante 1 hora en un vial herméticamente cerrado de 250 ml a temperatura ambiente. Así se prepararon muestras por triplicado de 50 g de guayaba sobre las que se adicionó 1 ml de la solución de acetaldehído marcado. Luego se obtuvo el extracto según el procedimiento descrito en el numeral 2.4.4.

2.5.4 Determinación de los factores de respuesta. El factor de respuesta (FR) es un factor que compensa el marcado incompleto de un estándar. Para la determinación de los factores de respuesta, se prepararon soluciones de calibración con cantidades definidas del compuesto isotópicamente marcado y sin marcar en relaciones de 1+3 a 3+1 que se analizaron por CG-EM. Al graficar la relación de la intensidad de los iones fragmento característicos de cada analito y su análogo marcado isotópicamente –vs- la relación de sus concentraciones, se obtiene una relación lineal cuya pendiente corresponde al FR.

2.5.5. Determinación de la concentración de compuestos activos olfativamente. La cuantificación de los analitos se realizó por relación del área estimada para el fragmento característico del analito marcado y sin marcar, la concentración de estándar adicionado y la corrección por el FR de cada analito utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{compuesto activo olfativamente}] = [I_{d_0} / I_{d_n}] * C_{\text{estándar}} * FR / M \quad (\text{IV})$$

Donde I_{d_0} es la abundancia del fragmento característico del analito sin marcar, I_{d_n} es la abundancia del fragmento característico del analito deuterado o marcado con ^{13}C , $C_{\text{estándar}}$

es la concentración de estándar adicionada, FR el factor de respuesta para el analito cuantificado y M es la cantidad de guayaba en kilogramos.

2.5.6 Influencia del tiempo de homogenización. Para establecer la influencia del tiempo y de la forma de homogenizar la fruta, en la liberación enzimática de componentes C_6 en el aroma de la guayaba, se analizó con una misma fruta cortada en cubos (1 g) y en forma de puré (1 g) durante intervalos de tiempo entre 24-600 segundos (puré) y 10-600 segundos (cubos). Una vez cumplido un tiempo determinado, la fruta se puso en contacto con 1ml de una solución saturada de cloruro de calcio. Para obtener el valor cero, una fruta completa fue sumergida en una solución de cloruro de calcio y cortada dentro de la solución. La extracción y cuantificación de volátiles se realizó como se indicó en el numeral 2.5.2 agregando cantidades conocidas de los estándares marcados de hexanal, (*Z*)-3-hexenal y (*E*)-2-hexenal.

2.6 MÉTODOS INSTRUMENTALES

2.6.1 CG-FID y CG-O. Para los análisis por CG-FID y CG-O se empleó un cromatógrafo de gases 8160 (Fisons Instruments, Mainz, Alemania) usando Helio como gas de arrastre. El cromatógrafo contaba con un puerto de inyección *on-column* que se mantuvo a 40°C. La columna cromatográfica se dividió al final por medio de un divisor de cuarzo para obtener respuesta simultánea en el detector fotométrico de llama (FID) y el puerto de olfacción (O). Los dos detectores se mantuvieron a 250 °C. El FID fue operado con Hidrógeno (20 ml/min) y aire (200 ml/min) y con Nitrógeno como gas auxiliar (30 ml/min). El detector olfatométrico consistió en un tubo de aluminio (8 cm x 2,5 cm d.i.) que se mantuvo a 250°C al final del cual se ubicaba un panelista entrenado en la detección de notas olfativas de los compuestos que eluyen de la columna. Una vez percibido un aroma, este se indicó en el cromatograma y se describió la percepción olfativa.

Las columnas empleadas en este análisis fueron las siguientes: DB-FFAP y DB-5 (J&W Scientific, Chromatographie-Handel Müller, Fridolfing, Alemania) de 30 m x 0,32 mm d.i., $df = 0,25 \mu m$ a una presión en la cabeza de la columna de 70 kPa; columnas quirales BGB-

175 y BGB-176 (BGB Analytik, Schlossböckelheim, Alemania) de 30 m x 0,25 mm d.i., $df=0,25\ \mu\text{m}$ a una presión en la cabeza de la columna de 140 kPa. El volumen de inyección fue de 0,5 μl . El programa de temperatura fue de 40 °C por 2 minutos luego calentamiento a una velocidad de 6 °C/min hasta 190 °C seguido por calentamiento a una velocidad de 12 °C/min hasta 240 °C donde se mantuvo por 5 minutos.

El cálculo de los índices de retención se realizó por relación de los tiempos de retención de los analitos con los tiempos de retención de una mezcla de parafinas patrón (C_6 - C_{26}).

2.6.2 CG-HS-EM. En un vial sellado de 300 ml se colocaron 50 g de guayaba, los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se tomaron diferentes volúmenes del HS así: 20 ml, 10 ml, 5 ml, 2.5 ml, 1.25 ml, 0.625 ml que se analizaron por CG-O en un cromatografo de gases Varian Chrompack CP-3800 equipado con una columna DB-5 (30m x 0,32mm d.i., $df=1,2\mu\text{m}$). El programa de temperatura fue el siguiente: 0 °C durante 2 minutos, luego calentamiento a una velocidad de calentamiento de 6 °C/min hasta 240 °C durante 5 minutos. La temperatura del detector fue 250°C, del inyector 100°C, la temperatura de desorción fue de 250°C y el tiempo de desorción 10 minutos, la temperatura de la trampa fue de -150°C y el tiempo de enfriamiento fue de 2 minutos. La columna fue conectada a un EM Incos XL (Finnigan MAT, Bremen, Alemania) y analizados por ionización química (IQ) con metano como gas reactivo a 115eV.

2.6.3 CG-EM . Para los análisis por HS-MEFS se utilizó un cromatógrafo de gases GC7A (Shimadzu, Kyoto, Japón), acoplado a un detector selectivo de masas QP 5050 operado en modo de impacto electrónico con una energía de ionización de 70eV en un intervalo de adquisición de masas 40-350u y con un software de adquisición de datos Shimadzu Class 5KA.

Para los análisis de identificación de componentes mayoritarios se utilizó un cromatógrafo de gases 5890 serie II (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemania) equipado con un espectrómetro de masas de sector de campo MAT 95 S (Finnigan, Bremen, Alemania). El

espectrómetro de masas fue operado en modo de impacto electrónico a 70eV y en modo de ionización química a 115eV usando isobutano como gas reactivo.

Para la determinación de factores de respuesta, la identificación preliminar de 3-sulfanil-1-hexanol y 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo así como para la diferenciación entre los ácidos 2 y 3-metilbutanoico, se utilizó un cromatógrafo de gases 5160 (Carlo Erba, Hofheim) equipado con un detector de trampa de iones ITD 800 (Finnigan, MAT, Bremen). El espectrómetro de masas fue operado en modo de impacto electrónico a 70eV y en modo de ionización química a 70eV usando metanol como gas reactivo.

2.6.4 CGMD-EM. Para la cuantificación de los componentes del aroma por SIDA se empleó un sistema CGMD-EM (figura 2.7). El equipo utilizado consistía de un autosampler Combi PAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) y dos cromatografos de gases: 1. Trace Ultra (Thermo Scientific, Dreieich, Germany) y 2. CP3800 acoplado a un espectrómetro de masas Saturn 2200 (Varian, Darmstad, Germany). El primer cromatógrafo (C) estaba equipado con un inyector *on-column* (A1), una columna capilar FFAP (30m x 0,32mmi.d., 0,25 μ m d.f.), un sistema de cortes (Moving Column Stream Switching System) (G), un detector FID (E) y un puerto de olfacción (F).

El sistema de cortes (G) (Moving Column Stream Switching System) fue conectado al segundo cromatógrafo (L) mediante una línea de transferencia de silica fundida desactivada (H) (0,32mm i.d.) que se mantuvo a 250°C (Horst, Lorsch, Germany). La fracción de eluyente transferida al segundo cromatógrafo se almacenaba en una trampa fría (I) (SGE, Griesheim, Germany) antes de inyectarse en una columna (K) DB-1701 (30m x 0,25mm i.d, 0,25 μ m d.f.). Los analitos se detectaron en un espectrómetro de masas (M) en modo de ionización química usando metanol como gas reactivo.

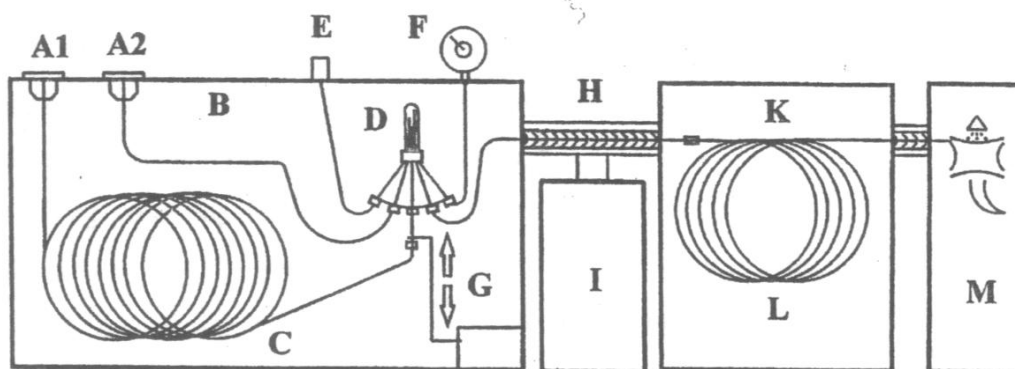


Figura 2.7 Diagrama del equipo CGMD-EM.

Para el análisis SIDA, la concentración de los analitos fue calculada mediante la relación de las áreas de fragmentos de masas característicos tanto del analito como del estándar isotópicamente marcado, teniendo en cuenta el factor de respuesta de cada componente en las condiciones de análisis. El programa de temperatura de los dos cromatógrafos fue establecido para cada analito bajo estudio según el tiempo de corte y el tiempo de su detección en el espectrómetro de masas.

2.6.5 HPLC. Para determinar la pureza enantiomérica de los acetatos (*3S*) y (*3R*)-[(*1S,4R*)-camfanoil]sulfanilhexilo se empleó un sistema de cromatografía líquida Jasco PU-1580 (Jasco, Grossumstadt, Alemania) equipado con un inyector Rheodyne 7125, una columna Nucleosil-100-5 C18 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), una bomba 110B (Beckman, Munich, Alemania) y un detector UV/Vis Jasco UV-1575. Los acetatos fueron separados con una mezcla isocrática de hexano:acetato de etilo 90:10 a un flujo de 1 ml/min y monitoreados a una longitud de onda de 254 nm.

2.6.6 RMN ^1H . Los espectros de RMN ^1H de los derivados fenilpropanoides del 3-sulfanilhexanol fueron tomados en un espectrómetro AM 360 (Bruker, Karlsruhe). La frecuencia de transmisión fue de 360,13 MHz. Todas las muestras fueron disueltas en C_6D_6 y se usó tetrametilsilano para ajustar la señal a $\delta=0.0\text{ppm}$.

2.7 ANALISIS OLFATIVO

2.7.1 Determinación de umbrales de olor

2.7.1.1 Umbrales de olor en aire: Los umbrales de olor en aire para cada analito fueron determinados mediante el análisis por CG-O de una mezcla del compuesto a evaluar y (*E*)-2-hexenal y el análisis de diluciones sucesivas 1:2 hasta que el analito de interés no fue detectado en la eluyente cromatográfico. Así se determinó la concentración mínima necesaria para percibir un analito.

2.7.1.2 Umbrales de olor en agua: Los umbrales de olor en agua para cada compuesto fueron determinados por medio de una prueba triangular (ver anexo 1). Los panelistas recibían nueve grupos de tres muestras aleatoriamente marcadas con cifras de tres dígitos. Cada grupo de muestras consistía de dos soluciones que contenían agua destilada y una tercera que contenía una mezcla acuosa del componente a evaluar y (*E*)-2-decenal. Cada uno de los 9 grupos presentaba de mayor a menor concentración el mismo conjunto de muestras pero en una serie de diluciones sucesivas 1:3. El análisis de los datos se realizó teniendo en cuenta la concentración de la última respuesta correcta y la concentración de la última respuesta incorrecta de cada panelista para establecer el umbral individual y el umbral de olor grupal usando el método de Ullrich y Grosch (Ullrich y Grosch, 1988) teniendo en cuenta un umbral de olor de 2,7 ng/l para el (*E*)-2-decenal.

2.7.2 Perfiles de aroma. Se colocaron 20 g de guayaba en viales ámbar con tapa (7 cm x 3 cm d.i) para la evaluación orthonasal por un grupo de panelistas entrenados. Los descriptores usados fueron definidos por medio de soluciones acuosas de compuestos de referencia en concentraciones 100 veces por encima de sus respectivos valores umbral. Así se emplearon butanoato de etilo (frutal), 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona (dulce-caramelo), alcohol cinámico (floral), *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal (metálico), 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(*5H*)-furanona (especiado), (*Z*)-3-hexenal (verde), acetaldehído (fresco) y 3-sulfanil-1-hexanol (*grapefruit*). Los panelistas evaluaron cada descriptor presente en las muestras de guayaba en una escala de 7 puntos de 0 a 3 donde 0 es no detectable, 1 débil, 2 moderado y 3 fuerte.

El promedio de las calificaciones para cada nota sensorial fue graficado en un diagrama de superficie.

2.7.3 Ensayos de recombinación y omisión. Los ensayos de recombinación consistieron en la mezcla de los componentes olfativamente activos en las concentraciones determinadas por SIDA. La evaluación del perfil sensorial de esta recombinación y su comparación con el perfil sensorial de la fruta fresca fue realizada como se indicó en el numeral anterior.

Los ensayos de omisión consistieron en la preparación de mezclas de aroma eliminando un solo componente de la mezcla total recombinada. Para establecer diferencias en el aroma de la mezcla recombinada y la mezcla de omisión se realizó una prueba triangular. Cada panelista recibió un grupo de tres muestras aleatoriamente marcadas con cifras de tres dígitos, las cuales consistían de dos soluciones de recombinación y una mezcla de omisión. Los panelistas evaluaban olfativamente el conjunto de muestras e indicaban obligatoriamente cual muestra era diferente. El número de respuestas correctas del total de panelistas se analizó estadísticamente para establecer diferencias a un determinado nivel de significancia (ICONTEC, 2006).

2.7.4 Análisis estadístico. Los resultados cuantitativos se sometieron a análisis de varianza, calculando el promedio y la desviación estándar. Las diferencias de los resultados sensoriales fueron analizadas según la Norma Técnica Colombiana 2681 (ICONTEC, 2006).

2.8 REFERENCIAS

Blank, I.; Fay, L. B.; Lakner, f. J.; Schlosser, M. Determination of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone and 2(or 5)-ethyl-4-hydroxy-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone in pentose suger-based Maillard model systems by stable isotope dilution assays. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2642–2648.

Brenstrum, T.; Brimble, M. A.; Rush, C. J.; Shaw, G. J.; Reid, D. C. W. Syntheses of deuterium labelled hexenols. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **1993**, *31*, 629–635.

Dess, D. B.; Martin, J. C. Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155–4156

Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P. Solvent assisted flavour evaporations a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 237–241.

Granvogl, M., Christlbauer, M., Schieberle, P., Quantitation of the intense aroma compound 3-mercapto-2-methylpentan-1-ol in raw and processed onions (*Allium cepa*) of different origins and in other *allium* varieties using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 2797-2802

Guth, H., Grosch, W., Deterioration of soya-bean oil: quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1990**, *23*, 513-522

Heusinger, G., Mosandl, A. Chiral S-containing aroma compounds in yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). Synthesis and characterization of the absolute configuration. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *25*, 507-510.

ICONTEC, NTC 2681, Norma Técnica Colombiana, Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular. Traducción de la ISO 4120:2004. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). Bogotá-Colombia, Junio de 2006

ICONTEC NTC 4624, Norma Técnica Colombiana, Jugos de frutas y hortalizas. Determinación del contenido de sólidos solubles. Método refractométrico. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). Bogotá-Colombia, Junio de 1999a

ICONTEC NTC 4623, Norma Técnica Colombiana, Productos de Frutas y Verduras. Determinación de la acidez titulable. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). Bogotá-Colombia, Junio de 1999b.

Klemm, L. H.; Hsu Lee, D.; Gopinath, K. W.; Klopfenstein, C. E. Intramolecular Diels-Alder reactions. III. Cyclizations of *trans*cinnamyl and phenylpropargyl phenylpropionates. *J. Org. Chem.*, **1966**, *31*, 2376–2380.

Schieberle, P.; Hofmann, T. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 227–232.

Sen, A.; Grosch, W. Synthesis of six deuterated sulfur containing odorants to be used as internal standards in quantification assays. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, *192*, 541–547.

Snowden, R.L., Grenno, R., Vial, C., Synthesis and organoleptic properties of various 3-methyl-2-oxopentanoates, 2-hydroxy-3-methylpentanoates and 2-acyloxy-3-methylpentanoates. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 372-380

Tamaddon, F.; Amrollahi, M. A.; Sharafat, L. A green protocol for the chemoselective *O*-acylation in the presence of zinc oxide as a heterogeneous, re-usable and eco-friendly catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7841–7844.

Tominaga, T., Murat, M.L., Dubourdieu, D., Development of a method for analysis of the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Suvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 1044-1048

Tominaga, T., Dubourdieu, D., Identification of cysteinylated aroma precursors of certain volatile thiols in passion fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 2874-2876

Ullrich, F., Grosch, W., Identification of the most intense odor compounds formed during autoxidation of methyl linolenate at room temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 1313-1317

Wakabayashi, H. Wakabayashi, M., Eisenreich, W., Engel, K.H., Stereochemical course of the generation of 3-mercapto hexanal and 3-mercaptohexanol by b-lyase catalysed cleavage of cysteine conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 110-116

Young, J. F.; Osborn, J. A.; Jardine, F. H.; Wilkinson, G. Hydride intermediates in homogenous hydrogenation reactions of olefins and acetylenes using rhodium catalysts. *Chem. Commun.* **1965**, *73*, 131–132.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 EL AROMA DE LA GUAYABA VARIEDAD REGIONAL ROJA

El aroma de la guayaba variedad Regional roja se caracteriza por presentar notas frutal, dulce, tropical-azufrada, que ofrecen una percepción única, intensa y expansiva que perdura con el tiempo e “invade” por completo el lugar donde se encuentra. Esta variedad es la de mayor producción y consumo en la región de la Hoya del río Suarez y su principal destino es la industria bocadillera. El estudio de su aroma constituye un aporte al conocimiento de nuestra biodiversidad y es el fundamento para el desarrollo de planes de aprovechamiento integral de esta variedad y desarrollo de productos con valor agregado adicionales al tradicional bocadillo.

3.1.1 Detección de los compuestos activos olfativamente-AEDA. El estudio del complejo aroma de la guayaba fue abordado teniendo en cuenta que para lograr una visión panorámica de su composición, es necesario complementar la información obtenida por varios métodos de extracción. Es así como se utilizaron la extracción con solventes para obtener un extracto global de compuestos volátiles y el muestreo del *headspace* (HS) para el análisis de los compuestos de mayor volatilidad que generalmente se eliminan en los procesos de concentración del primer método.

Durante los ensayos preliminares la extracción consistió en poner el puré de fruta completa (pulpa, cáscara y semillas) en contacto con varios solventes de diferente polaridad (separadamente diclorometano, éter etílico y pentano) con el objetivo de obtener un extracto de aroma cuya percepción olfativa fuese lo más cercana posible al aroma de la fruta fresca. En este primer intento, el alto contenido de pectina de la guayaba (0,9-1,5%, Corpoica-CIMPA, 2008) ofreció un primer obstáculo por cuanto el proceso de extracción no resultó homogéneo. Para superar este inconveniente experimental se adicionaron pequeñas porciones de sulfato de sodio anhidro durante el proceso de homogenización. De este proceso se obtuvo una relación de sulfato de sodio:fruta 3:1, la cual permitió la

formación de un sólido de fácil manipulación que pudo ser extraído con cada solvente bajo condiciones de temperatura controlada.

El análisis olfativo de los extractos obtenidos con éter etílico y pentano, reveló que éstos se caracterizaron por un aroma en los que predominaba la nota verde y los cuales no recordaban el aroma típico de la guayaba fresca. En contraste, el extracto obtenido con diclorometano fue descrito con las notas verde, frutal, dulce, fresca y *grapefruit*, que recordaban el aroma característico de la guayaba, razón por la cual este solvente fue seleccionado para subsecuentes procesos de extracción.

Así mismo se observó que la extracción con diclorometano ofrecía un extracto altamente coloreado, que indicó la presencia de compuestos no volátiles tales como pigmentos (posiblemente carotenoides) y ácidos grasos que dificultan los procesos de concentración y posterior análisis cromatográfico. Con el fin de eliminar estos compuestos no volátiles, se utilizó un equipo SAFE con el cual se realizó una destilación a presión reducida para recuperar los compuestos cuya presión de vapor fuera igual o menor a la del solvente de extracción. El uso de esta técnica de extracción ha surgido como respuesta a la necesidad de obtener extractos que reflejen lo más cercanamente posible la composición del aroma sin temor a pérdidas por efecto térmico o generación de compuestos artefactos (Engel, et al, 1999). En el estudio del aroma de la guayaba es la primera vez que se emplea esta metodología.

Una vez el extracto de aroma cumplía con esta condición esencial se analizó cualitativamente por CG-O. Como resultado de este análisis se observó que el extracto de aroma completo poseía una alta complejidad en cuanto al número de zonas activas olfativamente que coeluían y hacían difícil su relación con un parámetro cromatográfico como es el índice de retención (IR).

Para mejorar este análisis, se disminuyó la complejidad del extracto total por fraccionamiento de acuerdo con la naturaleza química de los compuestos. Así se fraccionó inicialmente por adición de una solución de carbonato de sodio para obtener una fracción

de compuestos volátiles de naturaleza neutra-básica (FNB) y posteriormente por acción de una solución de ácido clorhídrico y extracción con diclorometano para obtener la fracción de compuestos de naturaleza ácida (FA).

El análisis por CG-O de cada fracción arrojó como resultado un consenso entre las percepciones sensoriales detectadas por tres panelistas y su relación con el índice de retención. En la FNB se detectaron 38 zonas olfativamente activas, que presentaron las siguientes notas: frutal, verde, dulce, caramelo, *black-currant*, *grape-fruit*, violeta, floral, miel, metálica y champiñón; mientras que en la FA se detectaron 16 zonas olfativamente activas, las cuales exhibieron principalmente notas rancia-queso, dulce, coco y melocotón.

Este análisis cualitativo se complementó con un análisis cuantitativo, que determinó la magnitud de la contribución de cada zona activa olfativamente en el aroma global del extracto. Este análisis cuantitativo se realizó por AEDA y los resultados se expresaron como valores FD, los cuales indican el número de partes de solvente necesarios para que un componente olfativamente activo dado deje de ser percibido en el extracto de aroma de la fruta.

Esta cuantificación constituye un aporte novedoso en el estudio del aroma de la guayaba por cuanto en la bibliografía consultada ningún estudio previo presenta esta técnica como herramienta para el análisis de su aroma. En las figuras 3.1. y 3.2 se presentan en forma gráfica los resultados del análisis CG-O y AEDA, para las fracciones FNB y FA, respectivamente.

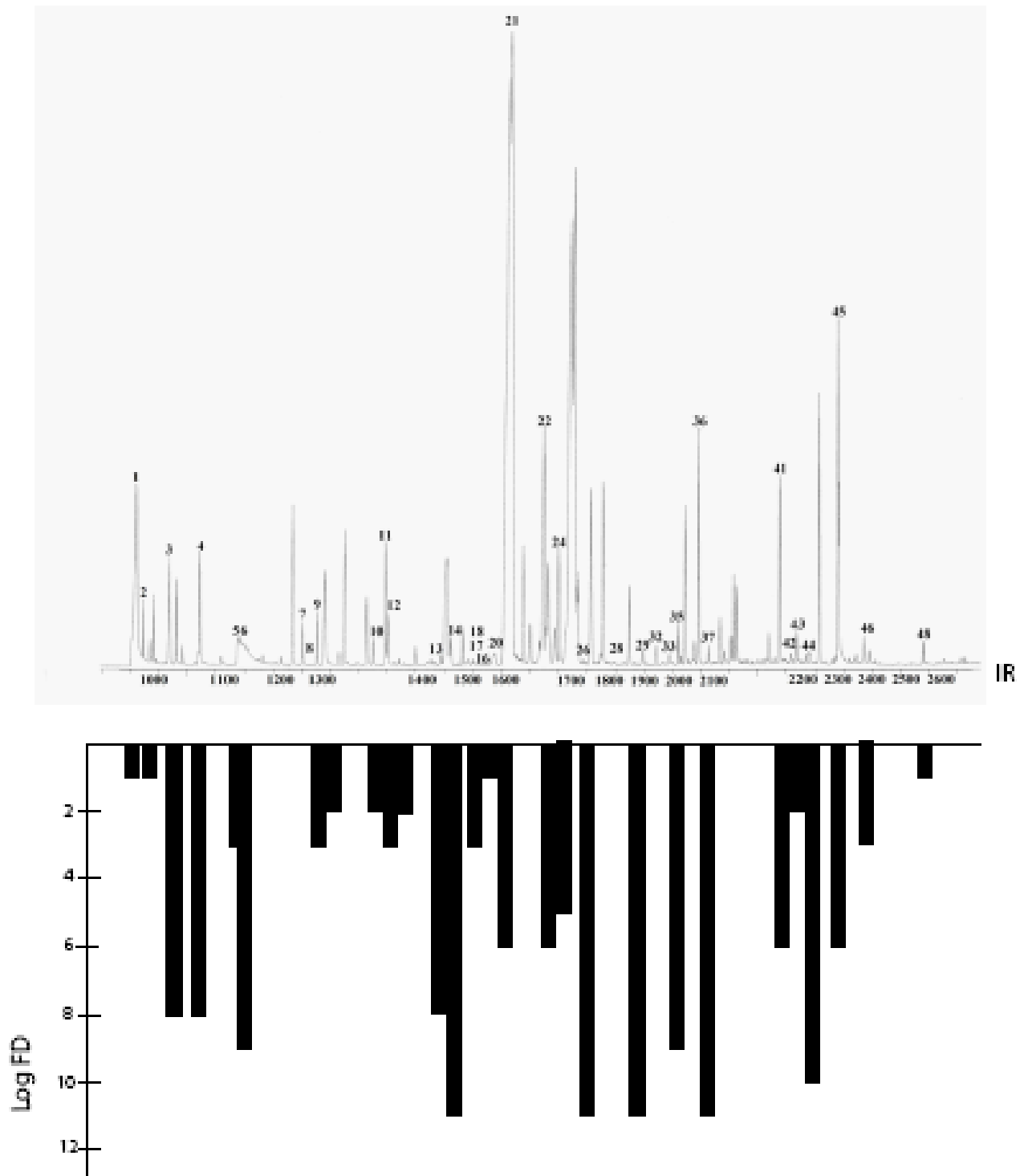


Figura 3.1 Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción FNB del aroma de la guayaba variedad regional roja. (los números corresponden con los presentados en la tabla 3.5)

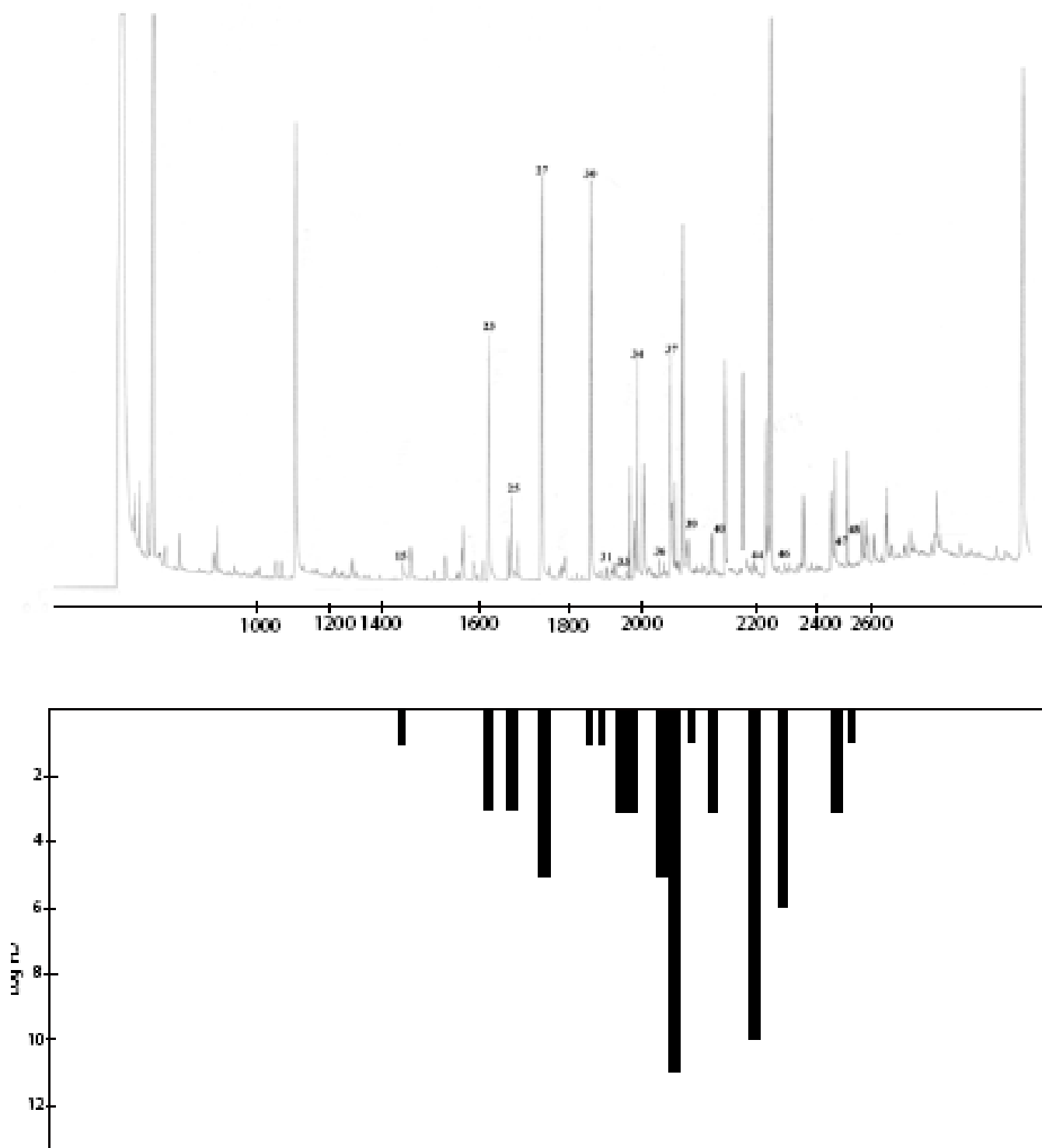


Figura 3.2 Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción FA del aroma de la guayaba variedad regional roja. Columna FFAP. (Los números corresponden a los presentados en la tabla 3.5)

Como se puede observar en las figuras anteriores, las señales cromatográficas detectadas por el detector FID no siempre coinciden con una señal olfativa determinada por el AEDA. Así, se detectaron olfativamente compuestos cuya señal cromatográfica se confundía con la línea base del cromatograma como es la de los compuestos 26 y 29 cuya percepción sensorial alcanzó valores FD 2048, mientras que compuestos con una alta respuesta en el detector FID no fueron detectados olfativamente; por ejemplo los compuestos entre 21 y 22 (IR_{FFAP} 1600) y entre 24 y 26 (IR_{FFAP} 1655) en la figura 3.1. De acuerdo con el análisis del espectro de masas de estas señales corresponden a β -cariofileno y otro sesquiterpeno no identificado, los cuales requieren de altas concentraciones (alto valor umbral de olor) para lograr ser percibidos olfativamente.

En este mismo análisis vale la pena aclarar que algunas zonas activas olfativamente no coincidieron con la elución de una señal cromatográfica específica sino que se ubicaron en la base o extremos del pico cromatográfico, hecho que puede causar confusión en el proceso de identificación. Es el caso del compuesto 21, cuya nota sensorial fue detectada en la base del pico obtenido por FID sin coincidir con la elución del pico cromatográfico. En este proceso la experticia adquirida en el análisis CG-O permitió establecer que una zona activa olfativamente a nivel de trazas puede coeluir con un compuesto mayoritario olfativamente inactivo y ocasionar una detección cromatográfica y espectral que conlleva a una identificación errónea. Así el pico 21 hubiese sido identificado como β -cariofileno, por cuanto el espectro de masas corresponde con este compuesto pero cuya nota olfativa y su alto valor umbral de olor no coinciden con los parámetros esperados para este compuesto.

La fracción FA posee un aroma rancio que no se relaciona con el aroma de la guayaba. El seguimiento de la actividad olfativa de sus constituyentes se dirigió hacia la identificación de los ácidos grasos de cadena corta responsables de estas notas. Los bajos valores de FD detectados para la mayoría de los compuestos presentes en esta fracción denotan una escasa participación de la misma en el aroma global de la fruta.

El análisis de compuestos de alta presión de vapor requiere de un método de extracción directo que evite las pérdidas durante los procesos de extracción y concentración o coelución con el solvente de extracción durante el análisis cromatográfico. El muestreo del *headspace* (HS) constituye una forma de solucionar estos inconvenientes y permite obtener información de aquellos compuestos de alta volatilidad. Para el estudio del aroma de la guayaba se realizó el muestreo por HS complementado con un análisis AEDA (figura 3.3).

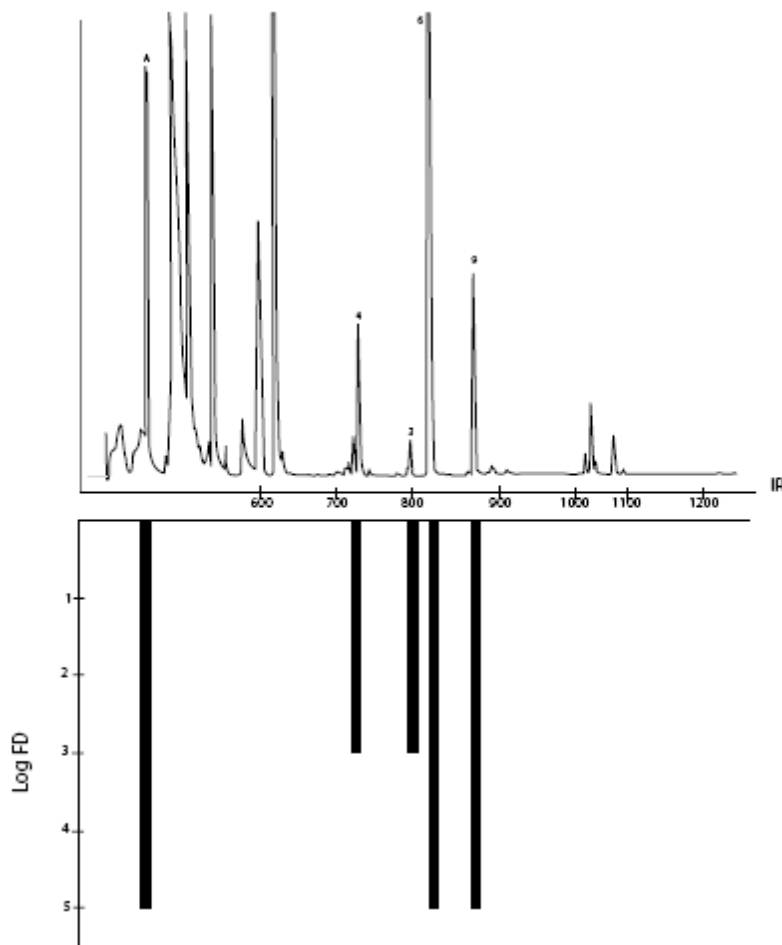


Figura 3.3 Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción de volátiles obtenida por *headspace* de guayaba regional roja. (los números corresponden con los presentados en la tabla 3.5)

El análisis CG-O de la muestra del *headspace* de guayaba regional roja permitió la detección de 8 zonas olfativamente activas, entre las cuales se presentan las notas fresca, azufrada, frutal, verde, papa y champiñon. La nota fresca y la nota azufrada no fueron detectadas en el análisis de las fracciones FNB y FA.

En este análisis también se observó que algunas señales intensas en la respuesta del detector FID no fueron detectadas olfativamente, mientras que señales imperceptibles por el detector instrumental presentaron actividad olfativa. El análisis AEDA del HS se realizó mediante la inyección de volúmenes de muestra cada vez menores hasta que ningún componente fue percibido olfativamente. Así se percibió la nota frutal hasta la tercera dilución, mientras que las notas fresca y verde fueron detectadas hasta la quinta dilución. La sexta dilución no presentó ninguna zona activa olfativamente.

3.1.2 Identificación de los compuestos activos olfativamente. La identificación de los compuestos activos olfativamente se realizó mediante la comparación de los criterios cromatográfico, espectral y olfativo de cada analito contra sustancias de referencia, analizadas bajo las mismas condiciones.

El análisis por CG-EM de la fracción de compuestos volátiles obtenida por HS permitió establecer que la nota fresca es debida a la presencia de acetaldehído (A), la nota azufrada a dimetilsulfóxido (B), la nota frutal a isobutirato de etilo (C) y butanoato de etilo (3) y la nota verde a hexanal (4) y (Z)-3-hexenal (6). Los compuestos responsables las notas papa y champiñón no fueron identificados por cuanto no se logró la obtención del respectivo EM.

Para la identificación de los compuestos activos olfativamente en el extracto SAFE, se obtuvo un extracto de aroma a partir de una mayor cantidad de fruta (500g) que se fraccionó en compuestos de naturaleza ácida (FA) y en compuestos de naturaleza neutra-básica (FNB) como se mencionó anteriormente.

El análisis convencional de las fracciones FNB y FA por CG-EM permitió la obtención de los EM de los compuestos de mayor respuesta en el detector de masas, cuya fragmentación y correlación con el IR en dos fases estacionarias (FFAP y DB-5) permitió identificar estas señales cromatográficas. Sin embargo, esta identificación tentativa debe ser corroborada por la comparación no sólo de los criterios analíticos mencionados, sino que debe incluir la comparación del criterio olfativo contra sustancias de referencia.

Entre los expertos en química de aromas es bien sabido que ciertas notas sensoriales se deben a la presencia de reconocidos compuestos o grupos funcionales. Por ejemplo, la nota verde está asociada con la presencia de aldehídos C₆ como hexanal, (*Z*)-3-hexenal y (*E*)-2-hexenal; la nota frutal es debida a la presencia de ésteres como butanoato de metilo y butanoato de etilo, entre otros; las notas tostadas se relacionan con pirazinas; las notas dulce-caramelo con compuestos furánicos; las notas floral-cítrica con compuestos terpénicos; la nota rancia con ácidos carboxílicos de cadena corta; y las notas coco o melocotón con γ - o δ -lactonas. Con esta evidencia preliminar se prepararon soluciones de referencia con compuestos cuyas características olfativas y cromatográficas estuviesen relacionadas con las notas detectadas en las fracciones FNB y FA.

El análisis de estas soluciones de referencia bajo las mismas condiciones de análisis de las fracciones FNB y FA y la subsecuente comparación del IR, el EM y la percepción olfativa permitió identificar inequívocamente los siguientes compuestos: butanoato de metilo (1), butanoato de etilo (3), hexanal (4), (*Z*)-3-hexenal (6), 4-metoxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona (21), benzoato de metilo (22), benzoato de etilo (24), 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona (37), acetato de cinamilo (41) y alcohol cinamílico (45) en la FNB; y de ácido acético (15), ácido butanoico (23), ácidos 2- y 3-metilbutanoico (25), ácido pentanoico (27), ácido hexanoico (30), ácido heptanoico (34), γ -octalactona (33) y γ -decalactona (40) en la FA.

En el caso de los compuestos minoritarios, el fenómeno de coelución con compuestos mayoritarios impidió la obtención tanto del IR como del EM necesarios para su correcta identificación. Por ello fue necesario disminuir la complejidad de la fracción FNB por CC y luego hacer el respectivo análisis por CG-O. De esta forma se corroboró la nota sensorial, el IR y en algunos casos se logró la obtención del EM que permitieron la identificación de otros compuestos volátiles como: (*E*)-3-hexenal (5), (*Z*)-4-heptenal (7), (*E*)-2-heptenal (9), 2,3-dimetilpirazina (10), nonanal (13), metional (14) y 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(*5H*)-furanona (44).

Otros compuestos a nivel de trazas cuya detección instrumental no fue posible, constituyeron un reto experimental. Es el caso de las zonas olfativas con las notas

sensoriales *black-currant* (**26**) y *grapefruit* (**29**), detectadas en la FNB y en las fracciones de CC 11-12 y 14-19, respectivamente. Una primera aproximación a su identificación se basó en la búsqueda bibliográfica de sustancias de referencia cuyas notas sensoriales coincidieran con las establecidas en este análisis. Así se estableció que estas notas están asociadas con la presencia de compuestos azufrados, específicamente tioles (Vermeulen, et al, 2005; Vermeulen y Collin, 2003), cuyos bajos valores umbral permiten obtener una clara detección olfativa pero una escasa o nula detección por FID y EM.

La hipótesis de la presencia de compuestos azufrados conlleva a la búsqueda de un método de extracción selectivo que permitiese aumentar la concentración de estos analitos para lograr su detección e identificación. La bibliografía consultada emplea las propiedades de los átomos de azufre como instrumento para su extracción y análisis; entre ellas se aprovecha la formación de complejos reversibles con átomos de metales pesados como mercurio. Así, se utilizó como fuente de mercurio una solución de ácido p-hidroximercuribenzoico (p-HMB) soportada en una fase estacionaria Affi-gel. La fracción FNB fue sometida a CC con esta fase modificada para obtener una fracción enriquecida en tioles (FT) que se analizó por CG-O.

Como resultado de este experimento se corroboró la presencia de dos zonas activas olfativamente cuyas notas sensoriales (*black-currant* y *grapefruit*) coincidían con los IR obtenidos en la FNB y en las fracciones de CC. Sin embargo la adquisición de una señal en los detectores convencionales (FID o EM) seguía siendo una limitante en la identificación inequívoca de estos compuestos.

El análisis de la fracción FT por CGMD-EM permitió la obtención de los EM que correspondía a los compuestos responsables de estas notas olfativas. En la figura 3.4 se presentan los resultados del análisis por CGMD-EM de los compuestos **26** y **29** del aroma de la guayaba regional roja. En este experimento se detectó una señal cromatográfica caracterizada por la nota *black-currant* (IR_{FFAP} 1708) y una segunda señal, de nota olfativa *grapefruit* (IR_{FFAP} 1831) cuyos espectros de masas en modo IE se presentan en la misma figura.

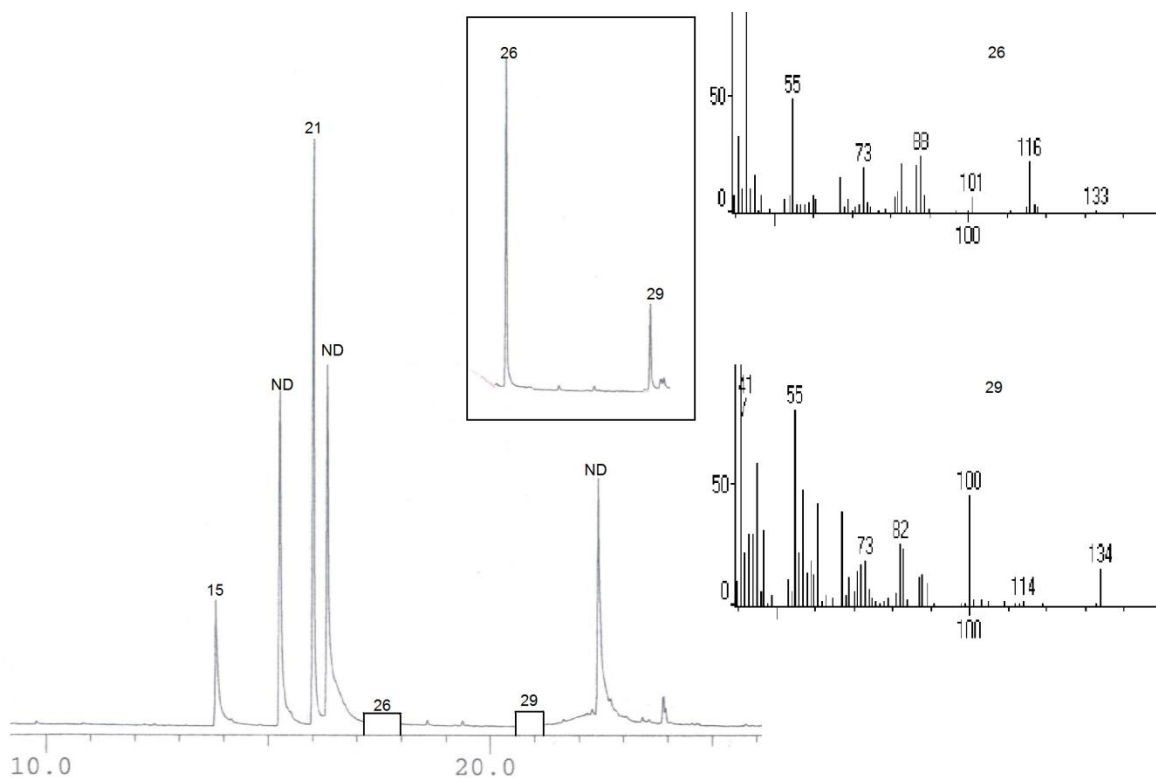


Figura 3.4 Análisis por CGMD-EM de la fracción FT del aroma de guayaba variedad regional roja. A. Columna FFAP; B. Columna DB-5.

Los espectros en modo ionización química de los compuestos 26 y 29 presentaron iones pseudomoleculares m/z 177 y 135 respectivamente. La fragmentación del primer compuesto coincide con la pérdida de $\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{O}^+$ para dar origen a los iones en m/z 43 y 133; el fragmento en m/z 116 se puede explicar por la pérdida de una unidad de ácido acético $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^+$ y el de 101 por la posterior pérdida de un grupo metilo. El ión en m/z 88 corresponde al fragmento $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{SH}^+$ originado por la ruptura α al enlace C-S.

Para el segundo compuesto (29), se obtuvo el ión molecular en m/z 134, un ión en m/z 100 que corresponde a la pérdida de una molécula neutra de H_2S $[\text{M}-\text{H}_2\text{S}]^+$, el cual genera un ión en m/z 82 por la posterior pérdida de una molécula de agua que sugiere la presencia de un alcohol primario. Los datos cromatográficos y espectrales determinados coincidieron con los publicados para el acetato de 3-sulfanilhexilo y el 3-sulfanil-1-hexanol (Vermeulen,

et al 2005; Vermeulen y Collin, 2003). Para corroborar esta identificación preliminar y establecer la distribución enantiomérica de cada uno de los compuestos 26 y 29, fue necesario comparar los parámetros cromatográficos (IR), espectrales (EM) y sensoriales (descripción olfativa) con sustancias de referencia que fueron sintetizadas a partir de la mezcla racémica del 3-sulfanil-1-hexanol. Este compuesto presentó una nota *grapefruit* que coincidió con el IR_{FFAP} 1831 obtenido en la FT y por el compuesto 29, mientras que el producto de su acetilación presentó una nota *black-currant* e IR_{FFAP} 1708 que concuerda con los datos exhibidos por el compuesto 26.

Dada la relevancia de estos compuestos en el aroma de la guayaba por cuanto presentan altos valores de FD (2048) y debido a que estas moléculas son quirales y que esta propiedad puede influir en la nota olfativa de las moléculas (Bentley, 2006), se estableció la distribución enantiomérica tanto del acetato como del alcohol en la fracción FT del aroma de guayaba regional roja.

En primer lugar se obtuvieron las sustancias de referencia mediante la separación de los enantiómeros *3R* y *3S* del acetato de 3-sulfanilhexilo por derivatización con ácido clorocamfenoico y separación por CC. En la figura 3.5 se presentan los resultados obtenidos al analizar por HPLC los enantiómeros.

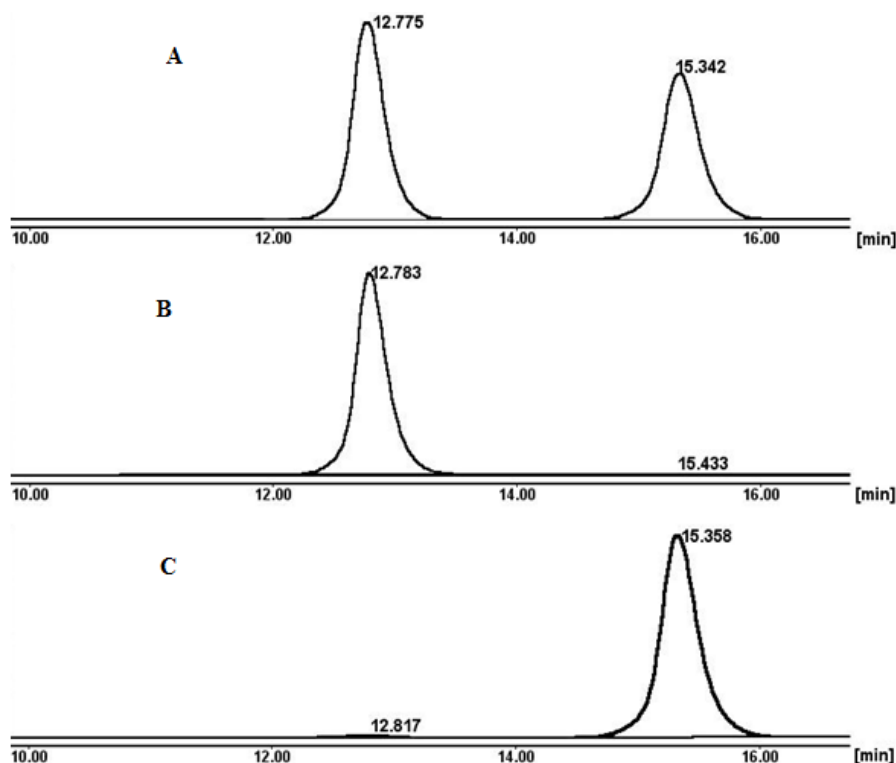


Figura 3.5 Análisis cromatográfico de los derivados clorocamfenólicos de acetato de (*3S*) y (*3R*)-sulfanilhexilo. (Columna RP-18). A. Mezcla; B. enantiómero *3R* (99,8%) y C. enantiómero *3S* (99,3%)

Una vez separados los enantiómeros, el alcohol fue recuperado por reducción con LiAlH_4 y el acetato se obtuvo por posterior acetilación con cloruro de acetilo. Para establecer la configuración absoluta de los ésteres sintetizados se obtuvieron los derivados fenilpropanoides, los cuales se analizaron por RMN ^1H para aplicar el modelo de Helmchen (Heusinger y Mosandl, 1984).

El modelo de Helmchen posee las características básicas de un método para la determinación de configuración absoluta ya que emplea un reactivo que contiene un grupo magnéticamente anisotrópico (grupo fenilo) el cual es responsable de los desplazamientos experimentados por los sustituyentes diasterotópicos, posee un grupo polar que favorece una determinada configuración y posee un grupo funcional adicional que permite su enlace con el sustrato (enlace éster). Este modelo se basa en la aplicación de una regla empírica en la cual un tiol quiral posee una determinada configuración absoluta cuando la señal del grupo R_1 (ver figura 3.6) aparece a campo más bajo con respecto a la señal del éster de tiol

y/o la señal del grupo R_2 aparece a campo más alto que la señal del éster de tior. El modelo de Helmchen utiliza como agente derivatizante quiral el cloruro de (2*R*)-fenilpropanoilo. Al calcular la diferencia entre los desplazamientos de los protones del enantiomero *R* menos los del enantiomero *S* ($\Delta\delta_{R-S}$) es posible ubicar en el espacio los sustituyentes R_1 y R_2 de acuerdo con el modelo de la figura 3.6 (Helmchen, 1976).

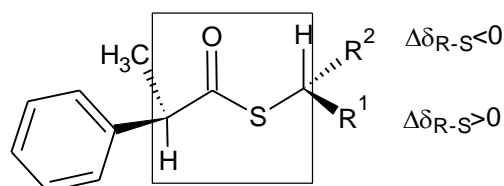


Figura 3.6 Modelo de Helmchen para la determinación de la configuración de 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo (Helmchen, 1976).

En la figura 3.7a y 3.7b se presenta en forma comparativa los espectros de RMN ^1H de los diastereoisómeros (2*R*,3*S*) y (2*R*,3*R*) del acetato de 2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo. En ellos se identifican señales a campo bajo entre δ 7,0-7,2 ppm que corresponden a los protones aromáticos del anillo bencénico del ácido camfenoico; señales en la región entre δ 3,7-4,2 ppm debida a la presencia de protones alifáticos unidos a un heteroátomo como oxígeno o azufre; señales en la región entre δ 0,6-1,8 ppm correspondientes a protones de grupos metilo y etilo de la cadena alifática; y en δ 1,7 la señal del grupo acetato. En la tabla 3.1 se resumen los datos de RMN ^1H para cada isómero sintetizado.

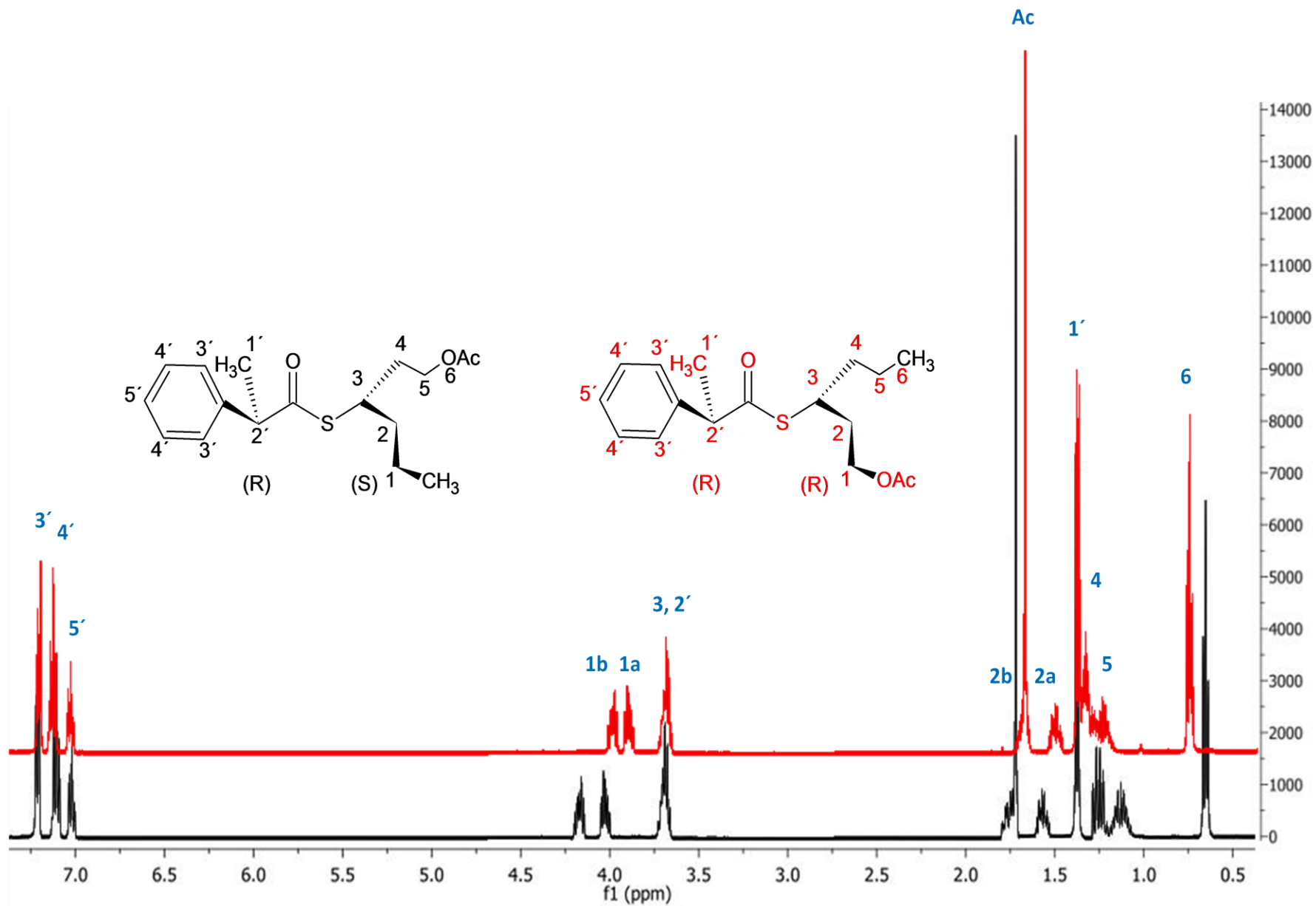


Figura 3.7 A. Espectro RMN ^1H (C_6D_6 ; 360MHz) de los acetatos de $(2R,3S)$ y $(2R,3R)$ -2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo

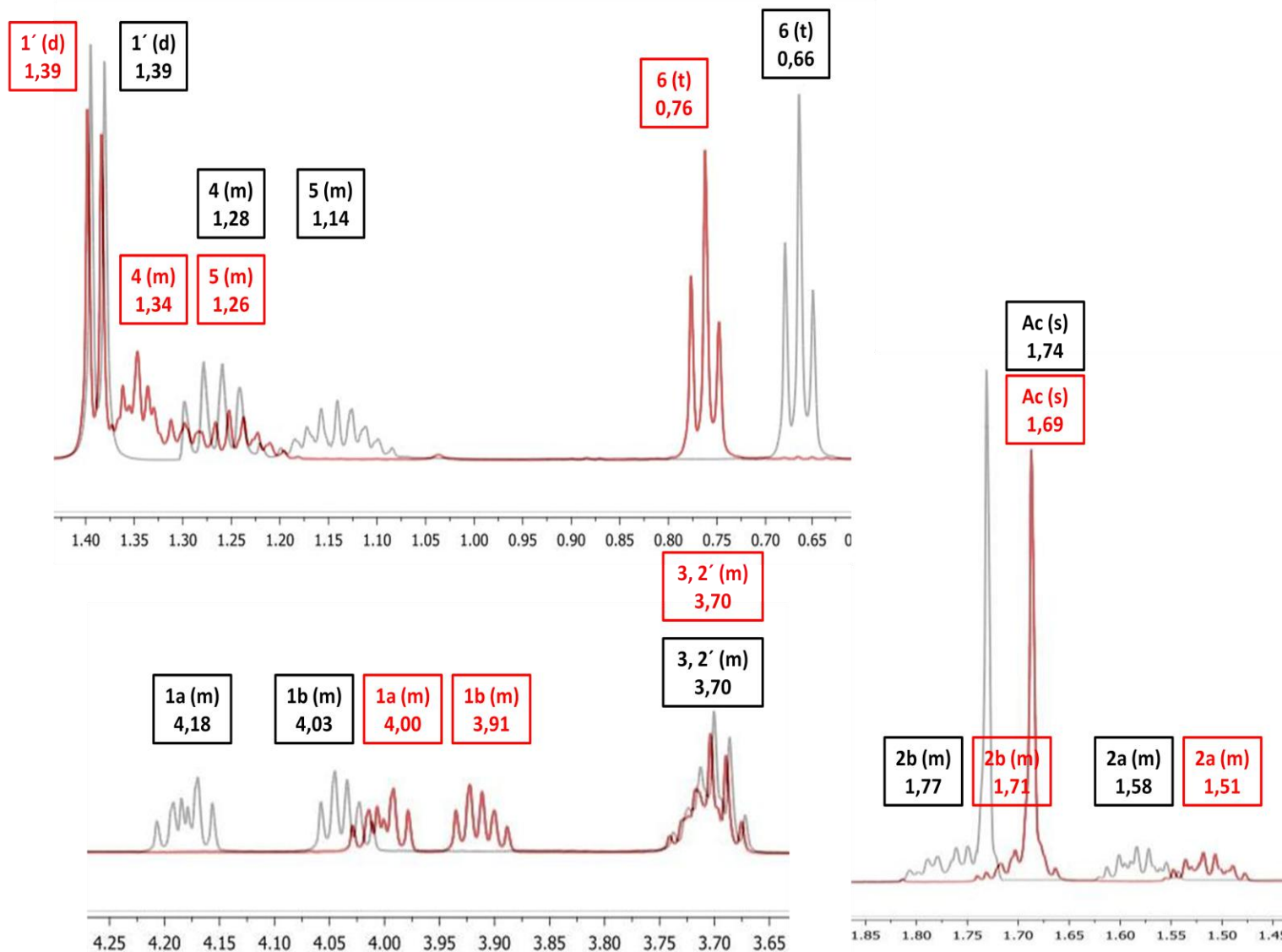


Figura 3.7 B. Ampliación del espectro RMN ^1H (C_6D_6 , 360MHz) de los acetatos de (2*R*,3*S*) y (2*R*,3*R*) -2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo

Tabla 3.1 Datos de RMN ^1H (C_6D_6 ; 360MHz) para enantiomeros de los acetatos de (2*R*,3*R*) y (2*R*,3*S*)-2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo

No.	δ_{ppm} (m) 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	δ_{ppm} (m) 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	$\Delta\delta_{R-S}$
1	a 4,00 (m) 1H	a 4,18 (m) 1H	-0,18
	b 3,91 (m) 1H	b 4,03 (m) 1H	-0,12
2	a 1,51 (m) 1H	a 1,58 (m) 1H	-0,07
	b 1,71 (m) 1H	b 1,77 (m) 1H	-0,06
3	3,70 (m) 1H	3,70 (m) 1H	
4	1,34 (m) 2H; J=7	1,28 (m) 2H; J=7	0,06
5	1,26 (m) 2H	1,14 (m) 2H	0,12
6	0,76 (t) 3H; J=7	0,66 (t) 3H; J=7	0,10
1'	1,39 (d) 3H; J=7	1,39 (d) 3H; J=7	
2'	3,69 (q) 1H; J=7	3,69 (q) 1H; J=7	
3'	7,22 (d) 2H; J=8	7,22 (d) 2H; J=8	
4'	7,11 (m) 2H; J=8	7,11 (m) 2H; J=8	
5'	7,03 (t) 1H; J=8	7,03 (t) 1H; J=8	
AcO	1,69 (s) 3H	1,74 (s) 3H	-0,05

δ ppm, J en Hz

El cálculo de las diferencias en los desplazamientos de los protones de los carbonos 1, 2, 4, 5, 6 y del AcO y la utilización del modelo de la figura 3.6 permitieron asignar inequívocamente la configuración de los isómeros. Todos los protones cuyas diferencias fueron negativas se encuentran de un mismo lado de la molécula y aquellos cuyas diferencias fueron positivas se encuentran del lado opuesto.

Las diferencias en los desplazamientos de las señales de los grupos diasterotópicos R_1 y R_2 son el resultado de un efecto anisotrópico del grupo fenilo. El efecto del desplazamiento en el grupo R_2 es mayor en el arreglo cisoide que en el arreglo transoide. Este modelo ha sido experimentalmente confirmado al aplicarlo sobre una serie análoga de amidas, ésteres y ésteres de tiol, los cuales poseen una estructura planar.

Así se estableció la configuración de los tioles sintetizados los cuales se usaron como sustancias de referencia para determinar la distribución enantiomérica de estos

constituyentes en el aroma de la guayaba regional roja. Las características cromatográficas y sensoriales de cada enantiomero se presentan en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Parámetros cromatográficos y descripción olfativa de los enantiómeros del 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo

Compuesto	IR _{BGB-175}	Descripción olfativa	Umbral de olor (ng/L aire)
(3 <i>S</i>)-sulfanil-1-hexanol	1490	<i>Grapefruit</i>	0,07
(3 <i>R</i>)-sulfanil-1-hexanol	1497	<i>Grapefruit</i>	0,08
Mezcla racémica 3-sulfanilhexanol	1831 ^b	<i>Grapefruit</i>	0,06 ^a
Acetato de (3 <i>R</i>)-sulfanilhexilo	1461	<i>Black-currant</i>	0,10
Acetato de (3 <i>S</i>)-sulfanilhexilo	1466	<i>Black-currant</i>	0,03
Mezcla racémica acetato de 3-sulfanilhexilo	1708 ^b	<i>Black-currant</i>	0,02 ^a

^a. umbral de olor en agua; b. IR_{FFAP}

Como se observa en la tabla anterior, los enantiómeros del alcohol presentan valores umbrales semejantes entre sí y descriptores de aroma idénticos, en tanto que los enantiómeros del acetato, aunque presentan la misma descripción sensorial, difieren en sus valores umbrales por un factor de 3 a 4 siendo el isómero 3*S* más activo que el isómero 3*R*. Estos bajos valores de umbral de olor coincidieron con aquellos determinados para estos compuestos en el aroma de vinos (Bouchilloux, et al, 1998).

Otras publicaciones indican que la mezcla racémica del 3-sulfanilhexanol se describe con notas frutal, animal, uva y maracuyá y su límite de percepción en agua es alrededor de 12-15 ng/L; y que el acetato de 3-sulfanilhexilo se caracteriza por la nota maracuyá con un valor umbral en agua alrededor de 2,3 ng/L (Mestres et al, 2000). Sin embargo, es importante resaltar que la descripción olfativa de estos compuestos esta ligada con la concentración en la que fueron detectados. Es por ello que pueden encontrarse otras descripciones olfativas cuando estos compuestos están en altas concentraciones que los relacionan con notas similares a la de los espárragos o el sudor y con notas frutal, *grapefruit*, maracuyá, lima o fruta tropical, cuando se encuentran en bajas cantidades (Vermeulen et al, 2005).

Pocas publicaciones presentan las diferencias olfativas entre enantiómeros. Para el caso de los isómeros del alcohol se encuentra publicado que no hay diferencia sensorial y han sido descritos con un aroma intensamente azufrado. Para los enantiómeros del acetato se distinguen dos notas: para el isómero *3R* se ha descrito con una nota frutal, tropical, mientras que el isómero *3S* con una nota azufrada, herbal (Bentley, 2006). Estos resultados difieren con los obtenidos en este trabajo, lo cual puede explicarse por una diferencia en la concentración en la que fueron analizados. La descripción olfativa que aquí se presenta fue obtenida en una concentración igual a su valor umbral de olor en aire.

Los enantiómeros presentes en la fracción FT del aroma de la guayaba fueron separados por CG usando una fase quiral BGB-175. En la tabla 3.3 se presentan los resultados de la distribución enantiomérica de los compuestos 26 y 29 en el aroma de la guayaba regional roja.

Tabla 3.3 Distribución enantiomérica de compuestos azufrados presentes en el aroma de la guayaba regional roja

Compuesto	Distribución enantiomérica
(<i>3R</i>)-sulfanil-1-hexanol	43%
(<i>3S</i>)-sulfanil-1-hexanol	57%
Acetato de (<i>3R</i>)-sulfanilhexilo	42%
Acetato de (<i>3S</i>)-sulfanilhexilo	58%

Estos resultados indican que la distribución enantiomérica del 3-sulfanil-1-hexanol y del acetato de 3-sulfanilhexilo en la guayaba regional roja es cercana al racemato, y este comportamiento es diferente al encontrado para estos mismos constituyentes en el aroma del maracuyá, en el cual se ha establecido un exceso enantiomérico del isómero *3S* entre 91-96% para el acetato y entre 58-90% para el 3-sulfani-1-hexanol (Weber et al, 1995; Werkhoff et al, 1998). En el aroma del vino el 3-sulfanil-1-hexanol también se encontró con un exceso enantiomérico del 68-73% para el enantiómero *S*. En contraste para el acetato se han determinado mezclas racémicas R/S en relaciones que van entre 41/59 a

57/43 en vinos elaborados con uvas sanas, mientras que se favorece el isómero S en vinos obtenidos a partir de uvas afectadas por *Botritis cinerea* (Tominaga et al, 2006).

En cuanto a la biogénesis del 3-sulfanil-1-hexanol, se ha establecido que en el aroma del vino es generado durante la fermentación alcohólica a través de la actividad de una enzima C-S liasa (Wakabayashi, et al., 2004) sobre precursores conjugados de S-cisteína (Tominaga, et al., 1998) los cuales son derivados de precursores conjugados del S-glutación (Peyrot des Gachons et al, 2002). En el aroma del maracuyá se determinó que este precursor libera el tiol por acción de hidrólisis ácida o por acción de enzimas β -liasa endógenas (Tominaga y Dubourdieu, 2000).

Con el propósito de verificar esta hipótesis, se extrajeron los precursores cisteinilizados de esta fruta según la metodología empleada para su extracción en vinos la cual consiste en el paso del extracto acuoso de la fruta a través de una columna C_{18} y su elución con un gradiente discontinuo etanol:agua (Tominaga y Dubourdieu, 2000). El extracto así obtenido se sometió a hidrólisis con una β -liasa. Sin embargo, el análisis por CG-O indicó que el compuesto 3-sulfanil-1-hexanol no se liberó como resultado de este procedimiento. Este resultado sugiere que en la guayaba roja la biogénesis de este compuesto puede deberse a otra ruta, por ejemplo la relacionada con la presencia de aldehídos α,β insaturados como (*E*)-2-hexenal, los cuales pueden adicionar un átomo de azufre sobre el doble enlace y reducir posteriormente el grupo carbonilo (Schneider, et al 2006).

Otro compuesto cuya detección instrumental fue nula y su nota olfativa fue descrita como frutal (IR_{FFAP} 1473), se detectó por CG-O en la fracción 15 obtenida de la CC de la FNB sobre silica gel. La acumulación de varios cortes entre 11 y 13 minutos de la fracción 15 en un sistema CGMD-EM permitió la obtención de un espectro de masas en modo IQ y en modo IE los cuales se presentan en la figura 3.8

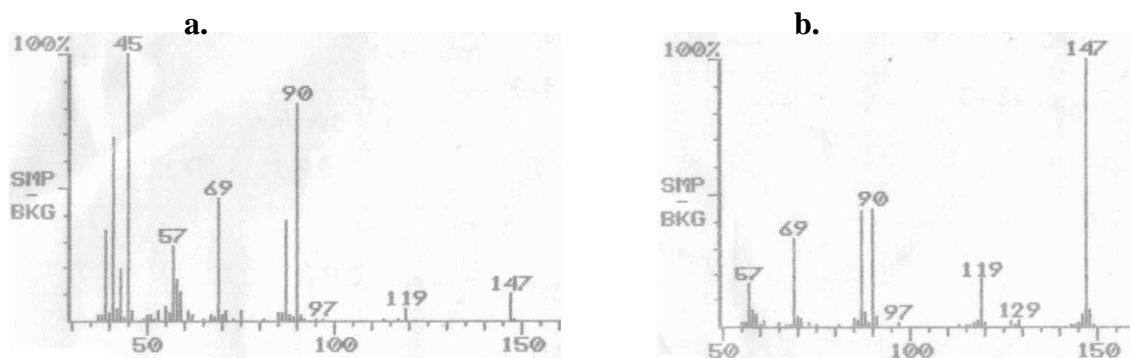


Figura 3.8 Espectros de masas del compuesto 16R a. Impacto electrónico y b. ionización química (isobutano).

En el espectro obtenido por ionización química se obtuvo como ión de más alta masa el m/z 147 que corresponde al ión pseudomolecular $[M+H]^+$. Otros iones presentes en el espectro son: el m/z 129 que se genera por la pérdida de una molécula de H_2O $[M+H-H_2O]^+$; el ión m/z 97 que se explica por la pérdida de una molécula neutra de metanol a partir del ión m/z 129; el ión en m/z 90 que es producto de la pérdida de 56 u a partir del ión molecular por trasposición de un átomo de hidrógeno y eliminación de la cadena alifática ($CH_2=CHCH_2CH_3$) y el ión en m/z 87 que se produce por la ruptura α al carbonilo y al hidroxilo. El fragmento m/z 45 en el espectro de impacto electrónico corresponde a $[CH_3CHOH]^+$ el cual sugiere la presencia de un alcohol secundario. Este análisis, el IR y la nota olfativa corresponde con el 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo.

Esta identificación preliminar fue verificada por comparación de los parámetros cromatográficos, olfativos y espectrales con aquellos de la sustancia de referencia, sintetizada a partir de isoleucina. Dado que la molécula posee dos centros quirales, se realizó la síntesis de los cuatro estereoisómeros del compuesto de referencia a partir de los respectivos aminoácidos quirales: *L*-isoleucina, *D*-isoleucina, *L*-allo-isoleucina y *D*-allo-isoleucina (Snowden, et al 2005) (ver figura 2.2).

El análisis individual por CG-O de los cuatro estereoisómeros sintetizados permitió establecer los criterios cromatográficos y olfativos de cada uno de ellos (tabla 3.4).

Tabla 3.4 Datos cromatográficos y descripción olfativa de los cuatro estereoisómeros del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo

Isómero	IR FFAP	IR DB-5	IR OV-1701	IR BGB-176	Descripción olfativa	Umbral de olor en aire (ng/L)
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	1471	990	1095	1086	Frutal	110
(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)	1471	990	1095	1092	Frutal	11
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	1492	991	1101	1100	Frutal	>200
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)	1492	991	1101	1114	Frutal	10

Como se observa en la tabla 3.4, la separación de los estereoisómeros en columnas apolares DB-5 y OV-1701 no es factible; aunque en la columna polar FFAP las parejas diastereoisoméricas pueden separarse, la separación completa de los cuatro estereoisómeros sólo fue posible en una columna quiral BGB-176. Sensorialmente los cuatro estereoisómeros poseen la misma descripción olfativa pero sus valores de umbral de olor exhiben notables diferencias. Los epímeros (2*S*,3*S*) y (2*R*,3*S*) poseen menores valores umbral, mientras que los isómeros (2*R*,3*R*) y (2*S*,3*R*) requieren de una mayor cantidad de analito para ser detectados por el sentido del olfato. En este trabajo se presenta por primera vez la determinación de los umbrales de olor de estos isómeros, lo cual constituye una contribución al estudio del aroma de alimentos.

Para establecer la distribución enantiomérica de estos compuestos en el aroma de la guayaba roja, la fracción 15 fue analizada por CGMD-EM. En la figura 3.9 se presenta el perfil cromatográfico de la mezcla de los cuatro estereoisómeros sintetizados y en forma comparativa con el de la fracción 15 del aroma de la guayaba regional roja en una columna quiral BGB-176.

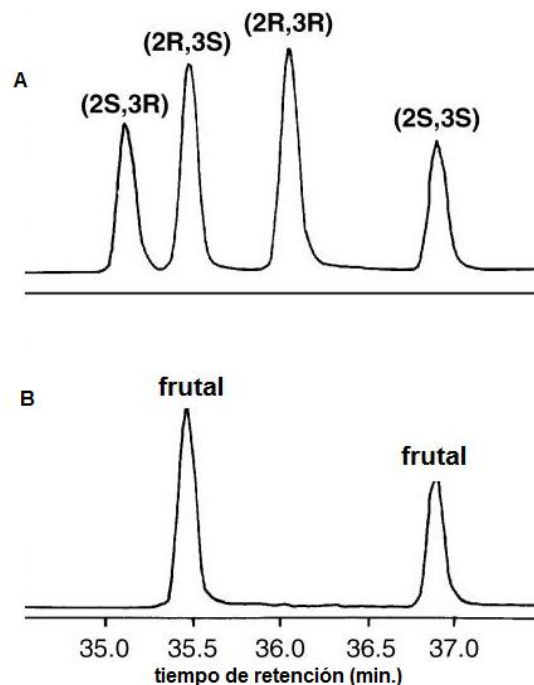


Figura 3.9 Perfil cromatográfico de A. los cuatro esteroisómeros del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo y B. de la fracción 15 del extracto de aroma de guayaba (columna BGB-176)

Así se estableció que en el aroma de la guayaba regional roja sólo se encuentran presentes los epímeros (2*R*,3*S*) (16) y (2*S*,3*S*) (18) en una proporción 3:2. Los esteroisómeros con configuración 3*R* no fueron detectados en el aroma de la guayaba roja.

Los hidroxiácidos y sus ésteres son compuestos comunes en el aroma de frutas tropicales como por ejemplo la piña (Sinuco, 2004), el maracuyá (Tressl, et al., 1998), el lulo (Suarez, et al., 1993), la papayuela (Krajewski, et al, 1997), el tomate de árbol (Torrado, et al., 1995), el lulo del Choco (Morales, et al., 2000), la uchuva (Mayorga, et al., 2002) y el mamey (Morales y Duque, 2002).

De otra parte, en el análisis cromatográfico de la fracción FA, se estableció que los ácidos 2- y 3-metilbutanoico coeluyen como una sola señal. Para establecer su distribución porcentual en la fracción FA de la guayaba, se comparó la intensidad de los iones fragmento típicos para cada ácido: m/z 74 para el ácido 2-metilbutanoico y m/z 60 para el ácido 3-metilbutanoico y se relacionaron en la curva de calibración de la figura 3.10 en

donde se grafica el porcentaje de la intensidad del ión m/z 60 vs. el porcentaje de ácido 3-metilbutanoico en la mezcla.

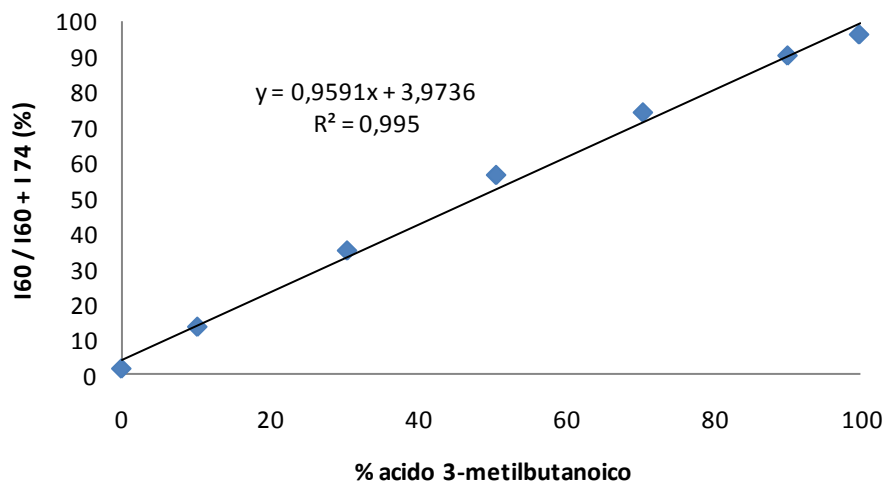


Figura 3.10 Curva de calibración para cuantificar el contenido de ácido 2-metilbutanoico y ácido 3-metilbutanoico.

La gráfica anterior y la ecuación I (numeral 2.4.6) permitieron determinar que el FR para el ácido 3-metilbutanoico es de 0,96. El análisis del espectro de masas de la mezcla de ácido 2 y 3-metilbutanoico, presentes la fracción FA, indicó que la intensidad del ión m/z 60 es 3,7 y para el ión m/z 74 es 12,4. Con la ecuación II (numeral 2.4.6), se estableció que el porcentaje de ácido 3-metilbutanoico en el aroma de la guayaba era de 22% y de ácido 2-metilbutanoico de 78%, lo cual es común en la naturaleza. Aunque la nota olfativa de estos ácidos es la misma, su valor umbral en aire es diferente: para el ácido (+/-)-2-metilbutanoico es de 140 ng/l y para el ácido 3-metilbutanoico es de sólo 2,8 ng/L.

En resumen la identificación de los compuestos responsables del aroma de la guayaba se enfocó en aquellos compuestos con actividad olfativa y requirió de procesos analíticos y de síntesis para lograr la identificación inequívoca mediante comparación de parámetros cromatográficos, espectrales y olfativos con sustancias de referencia. En la Tabla 3.5 se presentan los resultados de esta identificación.

Tabla 3.5 Compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba regional roja.

No. ^a	IR _{FFAP} ^b	IR _{DB-5} ^b	Compuesto ^d	Descripción olfativa	FD ^e	Fracción ^g	FNB ^h	FA ^h	FT ^h
A		<600	Acetaldehído	Fresco	32	HS			
B		<600	Dimetilsulfoxido	Azufrado	2	HS			
C		726	Isobutirato de metilo	Frutal	2	HS			
1R	<1000	<1000	Butanoato de metilo	Frutal	2	10	X		
2R	<1000	<1000	Diacetilo	Mantequilla	2		X		
3R	1028	802	Butanoato de etilo	Frutal	256	10, HS	X		
4R	1075	802	Hexanal	Verde	256	10, HS	X		
5R	1130	800	(E)-3-Hexenal	Verde	8	10-19	X		
6R	1135	796	(Z)-3-Hexenal	Verde	512	10-11, HS	X		
7R	1235	899	(Z)-4-Heptenal	Pescado	1		X		
8R	1289	978	1-Octen-3-ona ^f	Champiñon	8	10	X		
9R	1309	954	(E)-2-Heptenal	Frutal	4	11, HS	X		
10R	1331	915	2,3-Dimetilpirazina	Tostado	4		X		
11R	1364	987	(Z)-1,5-Octadien-3-ona ^f	Geranio	8		X		
12R	1369	858	(Z)-3-Hexenol	Menta, fresco	4	17	X		
13R	1383	1096	Nonanal	Cítrico	1	10	X		
14R	1443	903	Metional	Papa cocida	256	19	X		
15R	1448	660	Ácido acético	Vinagre	2	19		X	X
16R	1473	992	(2R,3S)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	Frutal	32	15	X		
17R	1477	990	γ-Butirolactona ^f	Coco	4		X		
18R	1493	994	(2S,3S)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	Frutal	16	15	X		
19R	1540	1103	Linalool ^f	Floral, cítrico	8		X		
20R	1575	1177	Terpinen-4-ol ^f	Herbal, floral	2		X		
21R	1591	1041	4-Metoxi-2,5-metil-3(2H)-furanona	Caramelo	2048	16-17	X		X
22R	1610	1096	Benzoato de metilo	Violeta, floral	64	10	X		
23R	1615	817	Ácido butanoico	Queso, rancio	8	16,17		X	
24R	1652	1170	Benzoato de etilo	Violeta, floral	32		X		
25R	1658	885	Ácido 2-/3-metilbutanoico (78:22)	Queso, rancio	8			X	
26R	1708	1249	Acetato de 3-sulfanilhexilo	<i>Black currant</i>	2048	11-12	X		X
27R	1726	918	Ácido pentanoico	Queso, rancio	32			X	
28R	1816	1257	Acetato de 2-feniletilo	Floral, dulce	1	17	X		
29R	1831	1130	3-Sulfanil-1-hexanol	<i>Grapefruit</i>	2048	14-19	X		X
30R	1835	1019	Ácido hexanoico	Queso, rancio	2			X	
31R	1862	1179	δ-Heptalactona ^f	Coco	2			X	
32R	1873	1222	(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal ^f	Cereal	1		X		
33R	1906	1257	γ-Octalactona	Coco	8		X	X	
34R	1943	1112	Ácido heptanoico	Queso, rancio	8			X	
35R	2006	1383	trans-4,5-Epoxi-(E)-2-decenal ^f	Metálico	512	14-17	X		
36R	2021	1370	γ-Nonalactona ^f	Coco	32	20	X	X	
37R	2023	1081	4-Hidroxi-2,5-metil-3(2H)-furanona ^f	Caramelo	2048	19	X	X	
38R	2094	1486	Trans-4,5-epoxi-(E)-2-undecenal ^f	Metálico	32		X		

39R	2099	1389	δ -Nonalactona ^f	Coco	2			X	
40R	2138	1468	γ -Decalactona	Melocotón	8			X	
41R	2144	1453	Acetato de cinamilo	Miel, floral	128	12	X		
42R	2166	1361	Eugenol ^f	Clavo	4		X		
43R	2188	1495	δ -Decalactona ^f	Coco	64	19	X		
44R	2200	1136	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona	Especiada	1024	10-20	X	X	
45R	2284	1335	Alcohol cinamílico	Miel, floral	512	18-19	X		
46R	2383	1678	γ -Dodecalactona ^f	Melocotón	64		X	X	
47R	2565	1261	Ácido fenilacético ^f	Miel	8			X	
48R	2585	1400	Vainillina ^f	Cacao, miel	2		X	X	

a. Los compuestos fueron enumerados según el orden de elución en la columna FFAP; b. IR= índice de retención; c. la descripción sensorial corresponde a la percibida a la salida del puerto de olfacción durante CG-O; d. los compuestos fueron identificados por comparación de los índices de retención en columna FFAP y DB-5, sus espectros de masas obtenidos por CG-EM y sus características sensoriales con las respectivas sustancias de referencia; e. FD= factor de dilución de aroma; f. la obtención de un espectro de masas no fue posible por lo que su identificación solo se basa en la comparación de IR y descripción sensorial con sustancias de referencia; g. Compuestos presente en el HS o en la fracción obtenida por cromatografía en columna; h. presencia en la fracción neutra básica (FNB), ácida (FA) o de tioles (FT).

3.1.3 Experimentos de cuantificación. Una vez establecida la identidad de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba se cuantificaron sólo 17 compuestos, seleccionados porque presentaron un FD igual o superior a 32 ya que en este rango de dilución se estima que se encuentran los compuestos que contribuyen principalmente al aroma de un alimento (Belitz, 2009). En la figura 3.11 se presentan los compuestos marcados isotópicamente empleados como estándar interno en la cuantificación por SIDA del extracto de aroma de la guayaba variedad regional roja.

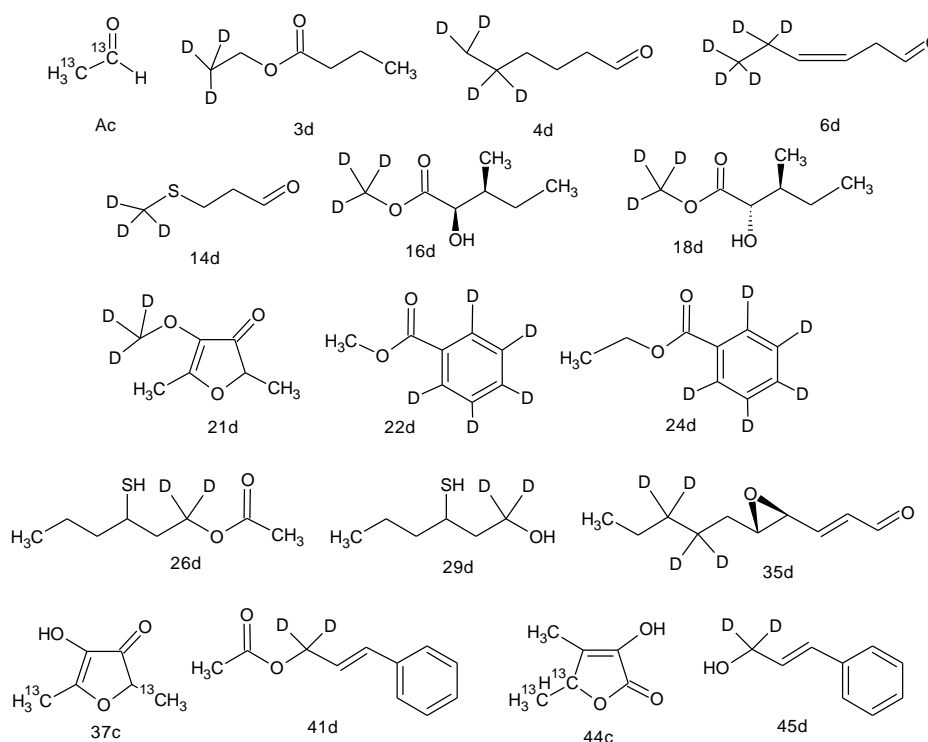


Figura 3.11 Estructuras de los compuestos marcados isotópicamente usados como estándares internos en la cuantificación del aroma de guayaba regional roja. (la numeración corresponde a la presentada en la tabla 3.6)

Los compuestos 16d, 18d, 26d y 29d, fueron sintetizados en esta tesis como consecuencia de los resultados del análisis cualitativo del aroma de la guayaba regional roja. Los demás compuestos marcados isotópicamente fueron facilitados por la biblioteca de materias primas del grupo de investigación del profesor Dr. Peter Schieberle de la Universidad Tecnológica de Munich (Alemania).

Cada estándar marcado isotópicamente fue caracterizado cromatográfica y espectralmente. Cromatográficamente se determinaron los tiempos de corte para el análisis por CGMD-EM y el factor de respuesta (FR) y espectralmente se establecieron los iones fragmento más abundantes producto de la ionización química de cada compuesto. Como ejemplo se presenta la determinación de los parámetros mencionados para el acetato de 3-sulfanilhexilo y su análogo marcado isotópicamente con deuterio.

Con el objeto de establecer el tiempo de corte para el análisis por CGMD, se analizó olfativamente una solución del estándar sin marcar y se estableció como tiempo de corte un rango entre el tiempo de su detección olfativa $\pm 0,2$ segundos (columna FFAP). Posteriormente a partir del análisis por CG-EM de una solución de acetato de 3-sulfanilhexilo marcado y sin marcar en relación 1:1 se estableció que los principales iones de la fragmentación química de la molécula corresponden a la formación del ión m/z 117 $[M+H-CH_3COOH]^+$ para el analito sin marcar y m/z 119 para el analito marcado con 2H . El FR para el acetato de 3-sulfanilhexilo fue establecido por el seguimiento de la abundancia de estos iones en mezclas de concentración conocida del estándar marcado y sin marcar (figura 3.12).

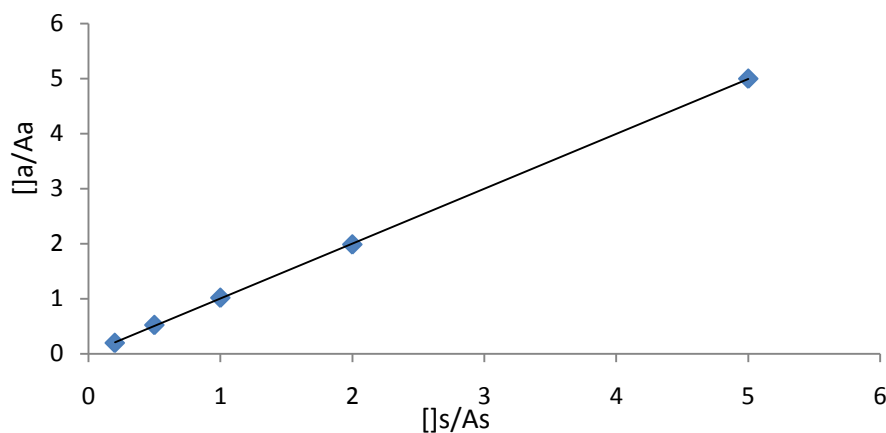


Figura 3.12 Determinación del factor de respuesta (FR) del acetato de 3-sulfanilhexilo. $[a]$ = Concentración del analito; $[s]$ =concentración del estándar; A_a = área del analito; A_s = área del estándar

La correlación de los datos fue confiable y a partir de la pendiente de la gráfica se obtuvo que el FR para el acetato de 3-sulfanilhexilo era 0,99. Este valor se empleó en la corrección de la concentración determinada por los cálculos de estándar interno.

En la tabla 3.6 se presentan los parámetros cromatográficos y espectrales obtenidos de manera análoga a la descrita anteriormente para los demás compuestos marcados isotópicamente.

Tabla 3.6 Parámetros cromatográficos, espectrales y FR de los compuestos marcados isotópicamente utilizados en la cuantificación de los compuestos activos olfativamente en el aroma de guayaba regional roja.

No. ^a	Componente	Tiempo de corte (min) ^b	m/z analito ^d	m/z estándar ^e	Factor de respuesta
Ac	[¹³ C ₂]-Acetaldehído	3,2-3,6 (HS) ^c	45 [M+H] ¹⁺	47	0,67
3d	[² H ₃]-Butanoato de etilo	3,5-3,9	117 [M+H] ¹⁺	120	0,97
4d	[² H ₄]-Hexanal	3,9-4,3	83 [M+H-18] ⁺	87	0,54
6d	[² H ₅]- (Z)-3-Hexenal	4,8-5,2	81 [M+H-18] ⁺	84:86	0,98
14d	[² H ₃]-Metional	9,8-10,2	105 [M+H] ¹⁺	108	1,03
16d	[² H ₃]- (2R,3S)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	10,4-10,8	147 [M+H] ¹⁺	150	0,98
18d	[² H ₃]- (2S,3S)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	10,7-11,1	147 [M+H] ¹⁺	150	0,98
21d	[² H ₃]-4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	12,0-12,4	143 [M+H] ¹⁺	146	0,91
22d	[² H ₅]-Benzoato de metilo	12,5-12,9	137 [M+H] ¹⁺	142	0,83
24d	[² H ₅]-Benzoato de etilo	13,1-13,5	151 [M+H] ¹⁺	156	0,67
26d	[² H ₂]-Acetato de 3-sulfanilhexilo	13,9-14,3	117 [M+H-60] ⁺	119	0,99
29d	[² H ₂]-3-Sulfanil-1-hexanol	15,6-16,0	117 [M+H-18] ⁺	119	0,98
35d	[² H ₄]- <i>trans</i> -4,5-Epoxi-(<i>E</i>)-2-decenal	18,0-18,3	139 [M-29] ¹⁺	143	0,93
37c	[¹³ C ₂]-4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	18,2-18,6	129 [M+H] ¹⁺	131	1,00
41d	[² H ₂]-Acetato de cinamilo	19,8-20,2	117 [M+H-60] ⁺	119	0,89
44c	[¹³ C ₂]-3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona	20,3-20,7	129 [M+H] ¹⁺	131	1,03
45d	[² H ₂]-Alcohol cinámico	21,4-21,8	117 [M+H-18] ⁺	119	0,90

a. los números corresponden con los de la tabla 3.5, b. tiempos de corte en columna FFAP (programa de calentamiento ver numeral 2.6.1); c. muestreo en el *headspace*; d. fragmento característico en IQ del analito sin marcar; e. fragmento característico en IQ del analito marcado isotópicamente.

Como ejemplo de la forma en que se realizó la cuantificación de los analitos activos olfativamente en el aroma de la guayaba, a continuación se explicará la cuantificación del componente mayoritario (*Z*)-3-hexenal y del compuesto 3-sulfanil-1-hexanol. Es importante resaltar que la preparación de las muestras para cuantificación de los analitos es un procedimiento que consume tiempo en el sentido de lograr una relación analito:estándar cercana a 1:1, ya que esta relación es ideal para una cuantificación precisa pues se conserva una respuesta igual en el detector para los dos compuestos. Una vez lograda esta condición para todos los compuestos activos olfativamente, las muestras se analizaron por CGMD-EM.

Para la cuantificación de (*Z*)-3-hexenal, el tiempo de corte en la primera columna cromatográfica (FFAP) fue entre 4,8 y 5,2 minutos; este segmento se transfirió a una segunda columna (DB-5) y se analizó por espectrometría de masas en modo IQ y se calculó la concentración a partir de las áreas de los iones característicos del analito (m/z 81) y del estándar marcado (m/z 84-86). En la figura 3.13 se observa el análisis CGMD-EM para esta cuantificación.

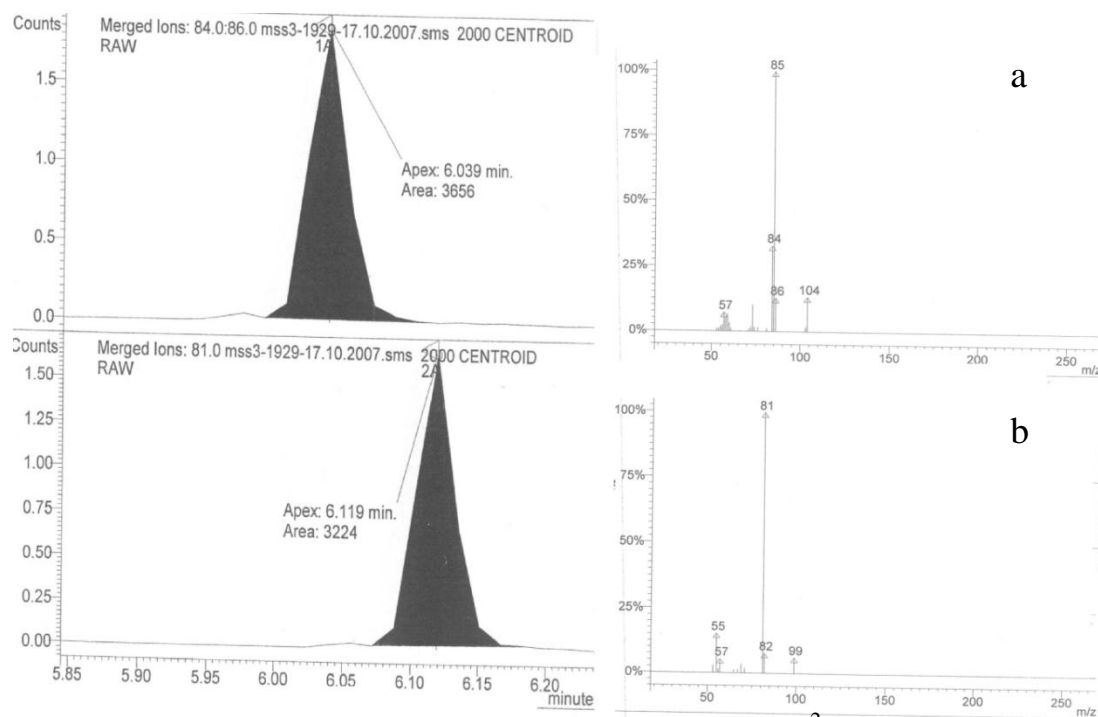


Figura 3.13 Intensidad de los fragmentos característicos de la IQ de a. [$^2\text{H}_5$]-(*Z*)-3-hexenal y b. (*Z*)-3-hexenal para el análisis cuantitativo de (*Z*)-3-hexenal.

En los espectros a y b se observan los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ 104 y 99 para el estándar marcado isotópicamente y el analito respectivamente. El pico base del espectro del (*Z*)-3-hexenal en m/z 81 corresponde a la pérdida de una unidad de agua a partir del ión pseudomolecular. En el análogo marcado isotópicamente se observa como pico base el ión en m/z 85 que corresponde a la pérdida de HDO a partir del ión pseudomolecular. En este espectro también se obtuvieron en una proporción significativa los iones en m/z 84 (35%) producido por la eliminación de una molécula de D_2O a partir del ión pseudomolecular y en m/z 86 (17%) correspondiente a la pérdida de una molécula de agua $[M+H-H_2O]^+$. Por esta razón la abundancia de los iones fragmento del compuesto marcado resultan del promedio de abundancias de los iones 84, 85 y 86. Al usar la ecuación IV (ver numeral 2.5.5), se pudo establecer que para una primera replica la concentración de (*Z*)-3-hexenal en el aroma de la guayaba roja fue de 6646 $\mu\text{g/Kg}$ de fruta. La cuantificación se realizó por quintuplicado y el resultado del promedio de estas mediciones fue de 6890 ± 310 $\mu\text{g/Kg}$ de fruta.

Para la cuantificación del 3-sulfanil-1-hexanol se cuantificó la mezcla racémica teniendo en cuenta que la distribución enantiomérica determinada fue cercana al racemato. Se determinó que el tiempo de corte en la primera columna fue de 15,6 a 16,0 minutos. En la figura 3.14 se presenta la intensidad de los iones fragmento característicos de la IQ del estándar marcado isotópicamente y sin marcar y los respectivos espectros de masas.

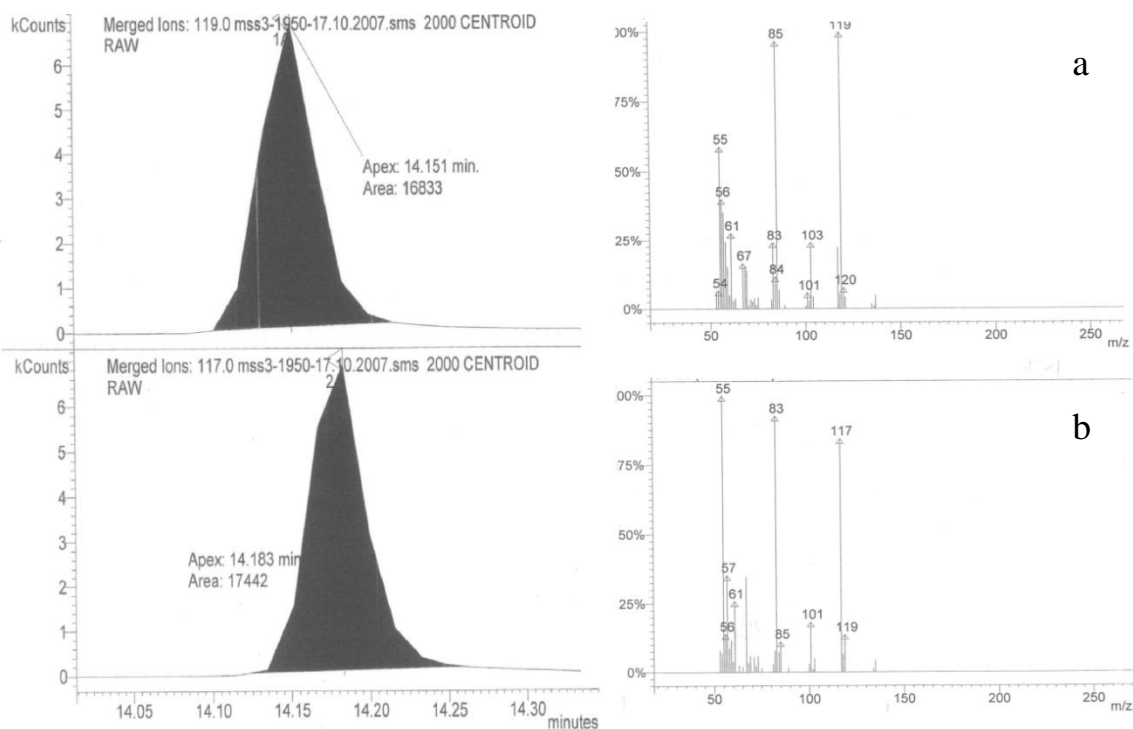


Figura 3.14 Intensidad de los fragmentos característicos de la IQ de a. $[^2\text{H}_2]$ -3-sulfanil-1-hexanol y b. 3-sulfanil-1-hexanol para el análisis cuantitativo de 3-sulfanil-1-hexanol

Los fragmentos característicos del espectro de masas por ionización química del estándar deuterado y del estándar sin deuterar del 3-sulfanil-1-hexanol fueron 119 y 117 respectivamente, correspondientes a la pérdida de una molécula de agua partir del ión pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$. Aunque en los espectros obtenidos por IQ se forman los iones en m/z 103 y 85 para el estándar marcado y los respectivos fragmentos obtenidos por IQ en m/z 101 y 83 para el estándar sin marcar, estos iones son fragmentos comunes a la ionización de diferentes moléculas, razón por la cual no se tuvieron en cuenta para la cuantificación de este compuesto. Estos fragmentos corresponden a la pérdida de una molécula neutra de H_2S a partir del ión pseudomolecular y a partir de los iones en m/z 119 y 117 respectivamente.

La relación de las áreas de los fragmentos en m/z 119 y 117 para el estándar marcado y el analito y la utilización de la ecuación IV (numeral 2.5.5) permitió establecer que para un primer ensayo la concentración de 3-sulfanil-1-hexanol en el aroma de la guayaba roja era

de 518 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de fruta. La cuantificación se realizó por duplicado y el resultado del promedio de estas mediciones fue de 555 ± 9 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de fruta.

Este compuesto ha sido detectado en el aroma de vino en concentraciones que oscilan entre 12-250 ppb (Tominaga et al, 2000) y en frutas como toronja y maracuyá en concentraciones alrededor de 38 ppb (Lin et al, 2002; Tominaga y Dubourdieu, 2000). En la guayaba se encuentra en concentraciones superiores lo cual ratifica su relevante contribución al aroma global de esta fruta.

Si bien la concentración es un factor determinante en la percepción olfativa de un componente, la relación con su valor umbral, denominada OAV, permite establecer si esta concentración supera la cantidad mínima necesaria para ser detectado por el sentido del olfato y por ende establecer su aporte real al aroma global de la fruta.

La determinación de los valores umbral de olor en aire se realizó para los compuestos 16, 18, 26 y 29 como se indica en el numeral 2.7.1.1. Los demás valores umbral fueron determinados en agua como se indica en el numeral 2.7.1.2. Para la determinación de los valores umbral de olor se contó con la colaboración del panel entrenado del Instituto de Química de Alimentos de la Universidad Tecnológica de Munich (Alemania). El entrenamiento del panel se realizó semanalmente mediante el análisis olfativo de soluciones acuosas de los compuestos de referencia en concentraciones iguales a 100 veces su valor umbral teórico, con el fin de lograr un vocabulario común entre los panelistas involucrados y establecer la capacidad olfativa individual de ellos para la detección de diferentes notas características del aroma de alimentos. Así algunos panelistas reconocen fácilmente unas notas mientras otros requieren de una mayor concentración para detectar el mismo compuesto.

La comparación de los valores OAV indica la relevancia de cada compuesto en el aroma de la fruta. En la tabla 3.7 se presentan los resultados de la cuantificación y los OAV calculados para cada compuesto activo olfativamente en el aroma de la guayaba regional roja.

Tabla 3.7 Resultados del análisis cuantitativo de los compuestos de mayor actividad olfativa en el aroma de la guayaba regional roja

No. ^a	Compuesto	No. de replicas	Concentración (µg/Kg fruta) ^b	Valor umbral (µg/Kg de agua) ^c	OAV
A	Acetaldehído	3	2440 ± (45%)	25	98
3	Butanoato de etilo	3	126 ± 16 (13%)	0,76	170
4	Hexanal	3	857 ± 51 (6%)	2,4	360
6	(Z)-3-Hexenal	5	6890 ± 310 (4%)	0,12	57000
14	Metional	3	1,3 ± 0,2 (12%)	0,43	3,1
16	(2R,3S)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	3	9,7 ± 1,6 (16%)	13 ^d	0,7
18	(2S,3S)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	3	27,2 ± 3,2 (12%)	2,4 ^d	11
21	4-Metoxi-2,5-metil-3(2H)-furanona	7	9,4 ± 0,8 (8%)	160	<<1
22	Benzoato de metilo	3	2,6 ± 0,4 (14%)	73	<<1
24	Benzoato de etilo	2	7,2 ± 0,0 (0%)	53	<<1
26	Acetato de 3-sulfanilhexilo	2	11,4 ± 0,6 (5%)	0,02 ^d	570
29	3-Sulfanilhexanol	2	555 ± 9 (2%)	0,06 ^d	9300
35	<i>trans</i> -4,5-epoxi-(<i>E</i>)-2-decenal	3	16,8 ± 4,0 (24%)	0,22	76
37	4-Hidroxi-2,5-metil-3(2H)-furanona	5	1420 ± 50 (4%)	40	36
41	Acetato de cinamilo	5	862 ± 78 (9%)	150	5,7
44	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona	5	4,3 ± 1,7 (39%)	1,7	2,5
45	Alcohol cinámico	5	1290 ± 140 (11%)	77	17

a. Los números corresponden con los presentados en la tabla 3.5; b. concentración promedio ± desviación estándar (% desviación); c. valor obtenido siguiendo la metodología del numeral 2.7.1, d. estos datos fueron obtenidos como parte de este trabajo

Con base en los resultados obtenidos se encontró que la nota verde debida a (*Z*)-3-hexenal tenía el OAV más alto, superando su valor umbral por un factor de 57000, seguido por la nota *grapefruit* debida a 3-sulfanil-1-hexanol con un OAV de 9300. Otros compuestos con altos OAV fueron el acetato de 3-sulfanilhexilo, hexanal y butanoato de etilo. Compuestos como acetaldehído, *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal y 4-hidroxi-2,5-metil-3(2H)-furanona arrojaron como resultado valores de OAV intermedios.

El alcohol cinámico, el (2*S*,3*S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo, el acetato de cinamilo, metional, la 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona, el (2*R*,3*S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo, el (2*R*,3*S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo, el benzoato de metilo, el benzoato de etilo y la 4-metoxi-2,5-metil-3(2*H*)-furanona presentaron los OAV más bajos.

En el aroma de la guayaba regional roja se observa la importancia olfativa de los compuestos azufrados 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo, los cuales fueron detectados por primera vez en este trabajo y a los cuales se les atribuye la nota azufrada característica de la guayaba. Adicionalmente en esta tesis es la primera vez que se determinan los valores OAV para compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba, por cuanto la metodología utilizada permitió identificar, cuantificar y establecer el aporte individual de cada uno de estos compuestos al aroma de esta fruta.

3.1.4 Experimentos de recombinación y omisión. Los experimentos de recombinación permitieron confirmar los resultados analíticos de identificación y cuantificación de los compuestos activos olfativamente del aroma de la guayaba. Para ello se mezclaron sólo los compuestos cuyos OAV fueron superiores o iguales a la unidad (ver tabla 3.8).

El análisis sensorial descriptivo del aroma de la fruta fresca indicó que las notas predominantes eran frutal, dulce, floral, metálica, especiada, verde, fresca y *grapefruit*. La cuantificación de estos descriptores en el aroma del puré y de la recombinación se presentan en la figura 3.15.

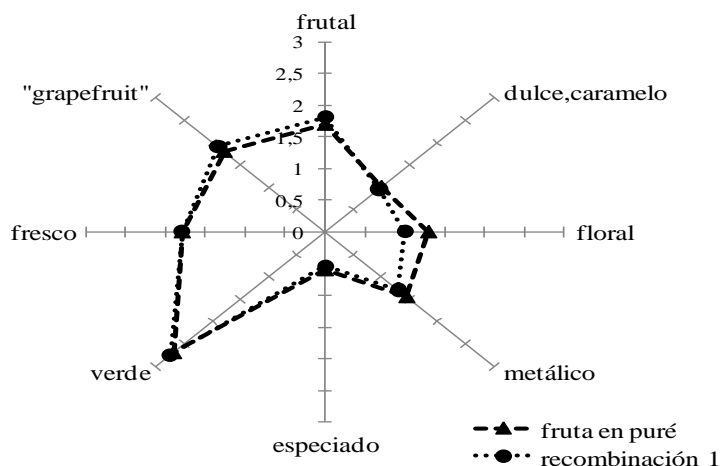


Figura 3.15 Perfil olfativo de la recombinación de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba regional roja en puré (0 no detectable, 1 débil, 2 moderado y 3 fuerte).

El aroma de la recombinación y del puré de la fruta se caracterizaron por una nota verde predominante. Sin embargo, esta intensa percepción de la nota verde no se compara con la

detectada al consumir la fruta fresca, lo cual indica que puede haberse sobreestimado el aporte sensorial del (Z)-3-hexenal, responsable por este tipo de nota olfativa.

Por ello se diseñó un experimento para evaluar comparativamente la formación de los aldehídos C₆ con el tiempo de homogenización tanto en el puré como en los trozos de la fruta, controlando el proceso enzimático por adición de las muestras en soluciones saturadas de cloruro de calcio (conocidas inhibidoras de las enzimas de la ruta lipoxigenasa) y cuantificando por el método SIDA.

En la figura 3.16 se muestran los resultados del seguimiento de la cantidad de (Z)-3-hexenal generada durante el tiempo tanto en el puré como en los cubos de una misma fruta.

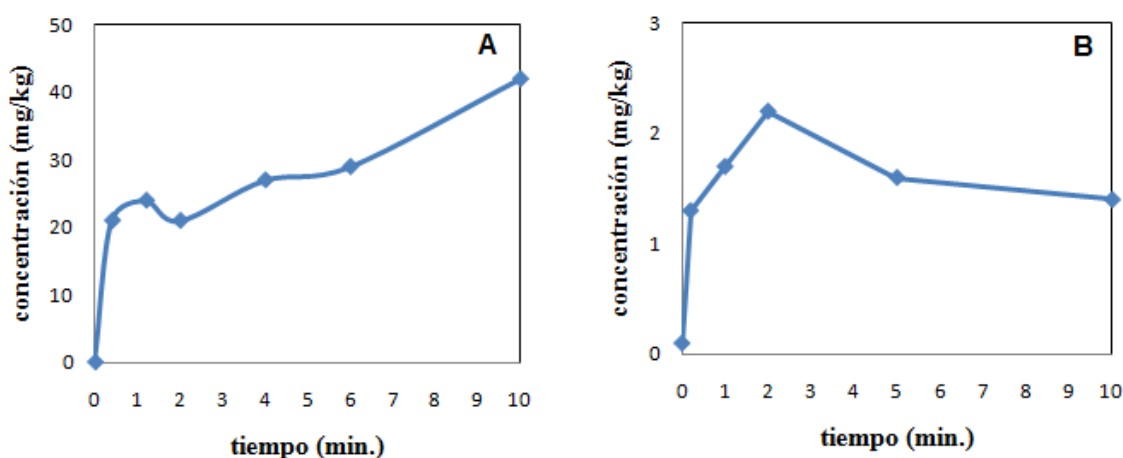


Figura 3.16 Formación de (Z)-3-hexenal en A. puré y B. en cubos de guayaba.

Los resultados obtenidos indicaron una clara influencia de la forma de homogenización de la fruta en la generación de (Z)-3-hexenal. En la fruta intacta (tiempo 0) el contenido de (Z)-3-hexenal fue muy bajo ($\ll 1$ mg/kg). En el puré la concentración se incrementó rápidamente hasta 21 mg/kg en tan solo 24 segundos, tiempo en el cual se homogenizó la fruta. Al dejar en reposo por 5 minutos se obtuvieron 28 mg/kg y luego de 10 minutos se alcanzó un máximo de 42 mg/kg.

En la fruta en cubos, así como en puré, el incremento en la concentración fue rápido, produciendo 1,3 mg/kg de (Z)-3-hexenal después de 10 segundos. Luego de 2 minutos, se

siguió observando un incremento que alcanzó 2,2 mg/kg, y después de 10 minutos se observó una disminución en la concentración que alcanzó la concentración de 1,4 mg/kg. En la tabla 3.8 se presentan los resultados de cuantificación de los aldehídos C₆ tanto en trozos de guayaba como en el puré después de 5 minutos de preparación de la fruta.

Tabla 3.8 Concentración y OAVs de los aldehídos C₆ según el procesamiento de la guayaba regional roja.

Compuesto	Umbral de olor (µg/kg de agua)	Concentración en cubos (µg/kg)	OAV en cubos	Concentración en puré (µg/kg)	OAV en puré
(Z)-3-Hexenal	0,12	1630	14000	6890	57000
Hexanal	2,4	652	270	857	360
(E)-2-Hexenal	110	67	0,6	ND	ND

ND = no determinado

La comparación de los OAV indicó que si bien la cantidad de (Z)-3-hexenal en cubos es menor a la determinada en el puré, su contribución al aroma de la guayaba sigue siendo la más relevante debido a sus altos valores de OAV. Aunque la nota verde es también debida a la presencia de hexanal, su OAV indica que, en el caso de la guayaba el aporte de este compuesto es insignificante con respecto al del (Z)-3-hexenal. La isomerización enzimática de (Z)-3-hexenal produce (E)-2-hexenal, cuyo OAV es menor a la unidad lo que significa que no es un compuesto activo olfativamente y puede omitirse de los ensayos de recombinación. Por esta razón en el puré de la fruta no se determinó la cantidad de este compuesto.

Con la nueva información a cerca del contenido de (Z)-3-hexenal y hexanal en la guayaba en cubos, luego de 5 minutos de corte, se preparó una nueva recombinación la cual se evaluó olfativamente y se comparó con el aroma de la fruta fresca cortada en cubos. En la figura 3.17 se presenta el perfil sensorial obtenido.

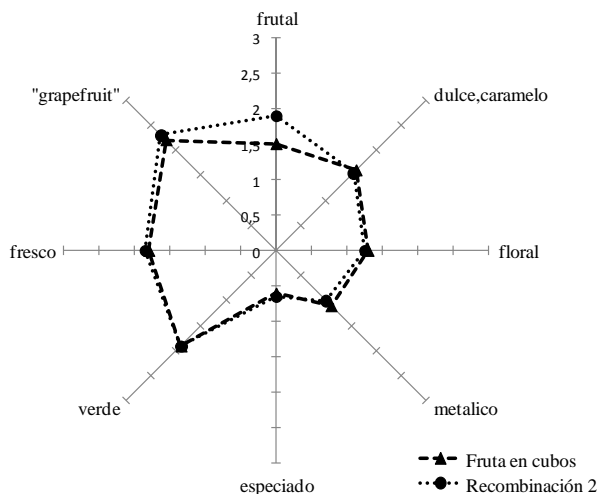


Figura 3.17 Perfil olfativo de la recombinação de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba regional roja en trozos (0 no detectable, 1 débil, 2 moderado y 3 fuerte).

Al igual que en la primera recombinação, los resultados muestran un buen grado de concordancia entre la solución de recombinação y el aroma de la fruta cortada en cubos excepto por la nota frutal la cual fue calificada con menor intensidad en los trozos de fruta. En general, el aroma de esta recombinação se caracteriza por poseer un perfil sensorial balanceado que representa en buen grado la percepción que se tiene durante el consumo de la fruta.

En comparación con el aroma de la primera recombinação (figura 3.15) se puede observar que el aroma de la segunda recombinação posee una menor calificación en la nota verde, mientras que la nota dulce-caramelo frutal fue calificada con mayores valores. El aroma del puré es dominado por la nota verde, mientras que en el aroma de la fruta en cubos se pueden percibir las mismas notas olfativas detectadas en el puré pero en diferente proporción. Estos resultados muestran la influencia del tratamiento de la muestra y como se puede sobreestimar el aporte de un componente activo olfativamente por su generación como producto del proceso de preparación de la muestra, lo cual generalmente es obviado en el análisis de productos naturales. El rompimiento del tejido celular implica la activación de la ruta lipoxigenasa involucrada en la formación de aldehídos C_6 (figura 3.18).

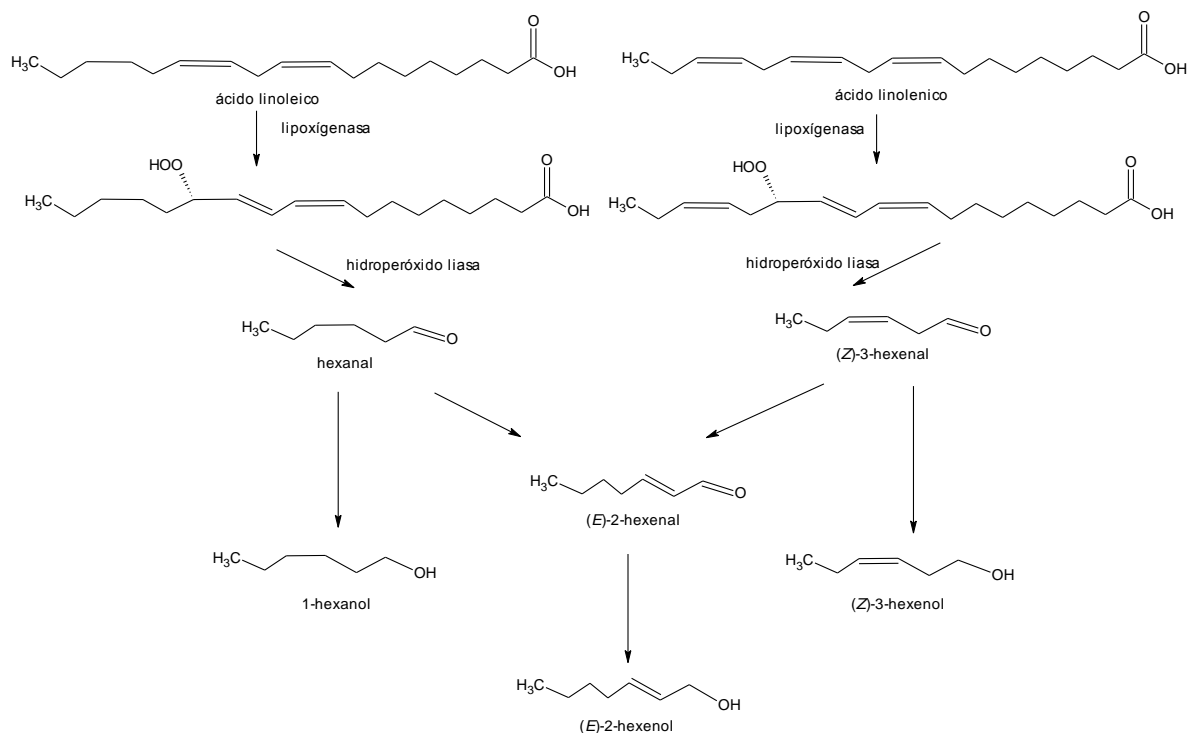


Figura 3.18 Ruta biogénica para la formación de aldehídos C₆

La formación del (Z)-3-hexenal es debida a la hidrólisis enzimática de ácido α -linolenico a través de la formación de 13-(S)-hidroperóxido (C 18:3), el cual por medio de una hidropéroxido liasa libera (Z)-3-hexenal, precursor de (E)-2-hexenal. La misma ruta a partir de ácido linoleico permite la formación de hexanal (Fisher y Scott, 1997; Hatanaka, 1993).

La diferencia entre el rompimiento del tejido celular durante el proceso de consumo y el proceso de formación del puré, pueden indicar que hay una exagerada formación de (Z)-3-hexenal durante este último con respecto a la cantidad formada durante el consumo.

Con el fin de confirmar el aporte individual de cada uno de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba regional roja e identificar los compuestos impacto, se realizaron ensayos de omisión. Así en 13 experimentos independientes se omitió cada uno de los compuestos activos olfativamente y el aroma de la nueva solución se evaluó contra la segunda recombinación usando un modelo de evaluación triangular con un panel entrenado (anexo 1). En la tabla 3.9 se presentan los resultados que indican diferencias

significativas en el aroma de las recombinaciones en las que se omitieron individualmente el (*Z*)-3-hexenal, 3-sulfanil-1-hexanol, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona, acetato de 3-sulfanilhexilo, hexanal, butanoato de etilo, acetato de cinamilo y metional.

Tabla 3.9 Resultados de los ensayos de omisión aplicados a la recombinación de aroma de la guayaba regional roja

No. ^a	Compuesto omitido	No. de panelistas.	Respuestas correctas	Nivel de significancia (%)
3R	Butanoato de etilo	14	9=64%	5
4R	Hexanal	16	11=69%	1
6R	(<i>Z</i>)-3-Hexenal	19	16 =84%	0,1
14R	Metional	16	9=56%	5
18R	(<i>2S,3S</i>)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	16	4=25%	nds
26R	Acetato de 3-sulfanilhexilo	14	10=71%	1
29R	3-Sulfanilhexanol	16	12=75%	0,1
35R	<i>Trans</i> -4,5-epoxi-(<i>E</i>)-2-decenal	19	8=42%	nds
37R	4-Hidroxi-2,5-metil-3(<i>2H</i>)-furanona	15	11=73%	1
41R	Acetato de cinamilo	16	10=63%	5
44R	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(<i>5H</i>)-furanona	19	3=16%	nds
45R	Alcohol cinamilico	14	7=50%	nds
49R	Acetaldehído	16	4=25%	nds

Los datos se compararon a un nivel de significancia (riesgo alfa) de 0,05; nds= no hay diferencia significativa, a. los números concuerdan con los presentados en la tabla 3.5

Las principales diferencias a un nivel del 0,1% se observaron cuando el (*Z*)-3-hexenal y 3-sulfanil-1-hexanol fueron omitidos, hecho que concuerda con sus altos OAV. La omisión de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona, acetato de 3-sulfanilhexilo y hexanal fue determinada con un nivel de significancia del 1%, también debido a sus altos OAV. Así mismo se percibió una mayor diferencia en la percepción del aroma de la guayaba cuando se omitió el (*Z*)-3-hexenal en presencia de hexanal, hecho que indica que la nota verde es debida principalmente al (*Z*)-3-hexenal.

La omisión de butanoato de etilo, acetato de cinamilo y metional fue detectada con un nivel de significancia del 5%. Cuando se realizó la omisión de alcohol cinamilico, *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal, acetaldehído, (*2S,3S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo o 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(*5H*)-furanona no se encontraron diferencias significativas en el aroma global de la recombinación.

Así se logró establecer que los compuestos impacto en el aroma de la guayaba roja son (Z)-3-hexenal y hexanal responsables de la nota verde, 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo responsables de las notas azufradas, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona responsable de la nota dulce, butanoato de etilo responsable de la nota frutal y acetato de cinamilo responsable de la nota floral.

3.1.5 Cambios en el aroma de la guayaba durante la producción de bocadillo. El principal producto de la guayaba en Colombia es el bocadillo. En su elaboración se emplea principalmente pulpa de guayaba regional roja la cual se mezcla con azúcar y se somete a cocción a temperaturas superiores a 90°C, hasta formar una pasta sólida con un contenido de sólidos solubles totales alrededor de 75 °Brix y 60% de pulpa. La pulpa se obtiene por trituración de la guayaba fresca y se separa de las semillas en una despulpadora. Teniendo en cuenta que el rendimiento de la guayaba en estado de madurez óptima es alrededor del 70% y que posee un contenido promedio de SS de 10°Brix, se calcula que para obtener 1 kg de bocadillo de las características mencionadas se requieren 850 g de guayaba y 700 g de azúcar (UN-virtual, 2006).

Teniendo en cuenta la importancia económica del bocadillo en la Hoya del río Suarez, se determinó la concentración de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba de un lote de bocadillos producidos en dicha región. En la tabla 3.10 se presentan los resultados de dicha cuantificación.

Tabla 3.10 Cuantificación de los compuestos activos olfativamente de la guayaba en el aroma del bocadillo

No. ^a	Compuesto	Concentración ^b ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bocadillo)	OAV _{boc}
3	Butanoato de etilo	1,5 \pm 0,3 (20%)	2
4	Hexanal	4,4 \pm 2,3 (52%)	2
6	(Z)-3-Hexenal	0,30 \pm 0,09 (30%)	3
14	Metional	0,04 \pm 0,0 (0%)	<1
16	(2R,3S)- 2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	0,10 \pm 0,01 (10%)	<1
18	(2S,3S)-2-Hidroxi-3-metilpentanoato de metilo	0,40 \pm 0,2 (50%)	<1
21	4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	4,8 \pm 1,5 (31%)	<<1
22	Benzoato de metilo	0,10 \pm 0,02 (20%)	<1
24	Benzoato de etilo	0,30 \pm 0,06 (20%)	<1
26	Acetato de 3-sulfanilhexilo	0,05 \pm 0,02 (40%)	2
29	3-Sulfanil-1-hexanol	0,10 \pm 0,007 (7%)	2
35	<i>trans</i> -4,5-Epoxi-(E)-2-decenal	0,30 \pm 0,2 (67%)	2
37	4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	680 \pm 13,6 (2%)	20
41	Acetato de cinamilo	0,92 \pm 0,04 (4%)	<<1
44	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona	0,65 \pm 0,2 (30%)	<1
45	Alcohol cinamílico	98 \pm 27 (28%)	1,5

a. los números concuerdan con los presentados en la tabla 3.5 b. Resultado del promedio de tres replicas \pm desviación estándar (%)

En términos de concentración, al comparar estos resultados con los de la fruta fresca (tabla 3.5) se concluye que todos los compuestos disminuyen su cantidad por efecto del tratamiento térmico durante la producción de bocadillo. Además, los compuestos de alto impacto en el aroma de la fruta fresca como son el (Z)-3-hexenal, 3-sulfanil-1-hexanol, acetato de 3-sulfanilhexilo y butanoato de etilo son eliminados del aroma del bocadillo casi por completo.

La comparación de los OAVs permitió evaluar el aporte individual de cada uno de los compuestos al aroma global del bocadillo. Así se estableció que la influencia de la 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona es muy relevante en el aroma del bocadillo en comparación con su influencia en el aroma de la guayaba fresca.

3.1.6 Consideraciones generales. El estudio del aroma de la guayaba aquí descrito presenta una combinación de métodos analíticos que involucran cambios en el proceso de extracción e incluyen el seguimiento de los compuestos activos olfativamente, su identificación y cuantificación y finaliza con la confirmación de los resultados obtenidos aplicando evaluación sensorial (olfativa).

En cuanto al método de extracción, la extracción SAFE y su complemento con el muestreo del HS resultó una combinación eficiente para obtener un extracto representativo de los compuestos responsables del aroma de la guayaba regional roja. Otras técnicas de extracción han sido empleadas en numerosos estudios del aroma de la guayaba; sin embargo, estas metodologías conllevan generalmente a la formación de artefactos producto del tratamiento de la muestra que terminan en la identificación de compuestos volátiles poco relevantes en el aroma de la fruta. Por ello la importancia de confirmar que el extracto de compuestos volátiles sea representativo del aroma del alimento en estudio.

En cuanto a la identificación, el seguimiento de los compuestos activos olfativamente por CG-O, complementado con un componente cuantitativo como los FD obtenidos por AEDA son indudablemente la base para enfocar los esfuerzos de identificación en aquellos compuestos responsables del aroma de la guayaba.

La identificación inequívoca resultó de la comparación de parámetros cromatográficos, espectrales y sensoriales con sustancias de referencia. Estos criterios de identificación implicaron esfuerzos en la obtención de sustancias de referencia. Con este trabajo se enfatiza en la componente sensorial (olfativa) como criterio de identificación, pues se ha establecido que muchos compuestos son identificados erróneamente al obtener IR y EM de los compuestos mayoritarios que coeluyen con compuestos a nivel de trazas responsables de la nota sensorial percibida durante el análisis CG-O.

Es así como en el estudio del aroma de la guayaba se realizó un aporte novedoso en cuanto a la identificación de compuestos azufrados, identificados por primera vez como constituyente de su aroma y la determinación de su distribución enantiomérica en esta fruta,

de la cual se habían encontrado varias publicaciones sin resultado semejante. En el mismo sentido la identificación de los estereoisómeros del hidroxiéster 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo y la caracterización sensorial de estas moléculas son un aporte novedoso en el campo de química de aromas.

La identificación de compuestos detectados a nivel de trazas, solo fue posible por la combinación de herramientas sensoriales e instrumentales. Es así como la identificación por primera vez de la (*Z*)-1,5-octadien-3-ona, *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal, *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-undecenal, metional y 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(*5H*)-furanona en el aroma de la guayaba fue posible.

En cuanto a la cuantificación de los compuestos activos olfativamente, el método SIDA resultó confiable por cuanto el uso de estándares marcados isotópicamente asegura un comportamiento idéntico al del analito y su recuperación y factor de respuesta permiten corregir las pérdidas ocasionadas por el procesamiento y análisis de la muestra. Así se estableció que los compuestos mayoritarios en el aroma de la guayaba roja son el (*Z*)-3-hexenal, hexanal, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona, acetato de cinamilo y alcohol cinamílico. Sin embargo, no sólo la concentración determina el aporte de un componente al aroma global de la fruta, sino que la relación con su valor umbral, definida como OAV, permite establecer cuantitativamente este aporte. En este sentido se observa que el aporte al aroma de los compuestos 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo es más relevante que el de aquellos cuyas concentraciones superaban en varios ordenes de magnitud la cantidad determinada para estos constituyentes.

Este trabajo confirma la nueva visión del estudio del aroma con una componente de actividad olfativa en la que se incluyen ensayos de recombinación de los compuestos activos olfativamente identificados y cuantificados, para regenerar la actividad sensorial percibida. Es así como los ensayos de omisión permitieron establecer que los compuestos impacto en el aroma de la guayaba roja son el: (*Z*)-3-hexenal responsable de la nota verde, 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo responsables de la nota azufrada, tropical

y 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, butanoato de etilo, acetato de cinamilo responsables de las notas dulce, frutal y floral respectivamente.

3.2 EL AROMA DE LA GUAYABA VARIEDAD REGIONAL BLANCA

A simple vista, los frutos de la variedad blanca no se diferencian de los frutos de la variedad roja dado que su apariencia exterior y su aroma son semejantes. Sin embargo el consumo de la variedad blanca en Colombia es escaso y se limita a la producción de bocadillo en mezcla con frutos de la variedad roja. Es así como en este trabajo se realizó el estudio del aroma de la variedad blanca con el fin de establecer posibles diferencias en el aroma de estas dos variedades.

3.2.1 Identificación de los compuestos activos olfativamente. El estudio del aroma de la guayaba regional blanca se realizó de manera análoga a la descrita para el aroma de la guayaba regional roja. El extracto de aroma obtenido mediante el método SAFE fue descrito como una mezcla de notas olfativas verde, frutal y dulce. La complejidad de este extracto fue disminuida por fraccionamiento en compuestos de naturaleza básica-neutra (FNB), compuestos de naturaleza ácida (FA) y compuestos azufrados (FT) de forma análoga a la empleada para el estudio de la variedad roja. En la figura 3.20 se presenta el perfil cromatográfico y AEDA determinado para la fracción FNB y en la figura 3.21 para la fracción FA.

El análisis AEDA de la fracción FNB confirmó la presencia de 24 zonas olfativamente activas que involucran las notas verde, dulce, frutal, *black-currant* y *grapefruit*; en forma análoga en la fracción FA se detectaron 11 zonas olfativamente activas caracterizadas por las notas rancio-queso y coco. La identificación de los compuestos activos olfativamente se basó en la comparación de los criterios cromatográfico, espectral y sensorial con los exhibidos por sustancias de referencia. En la tabla 3.11 se presenta la identidad de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba blanca.

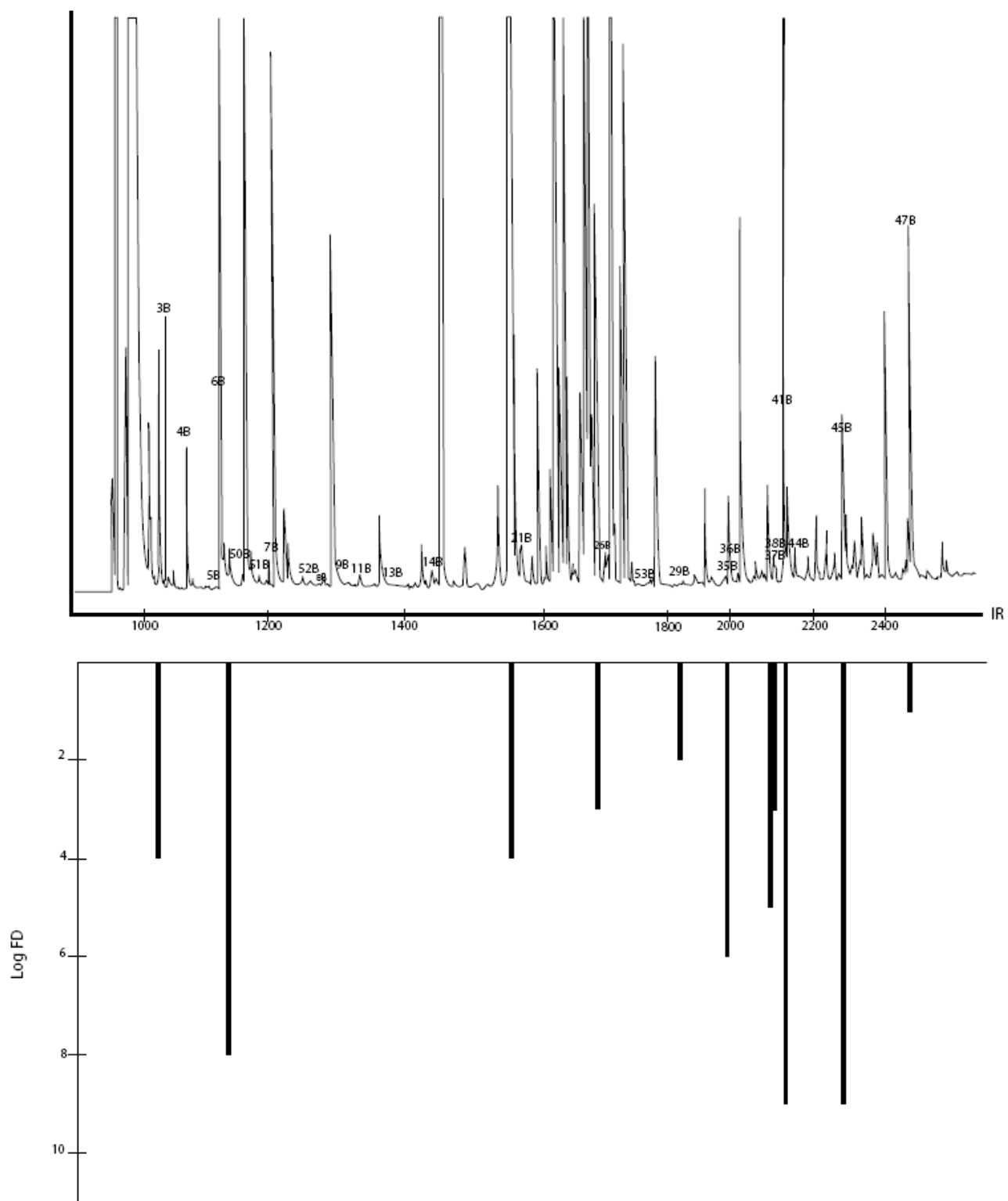


Figura 3.19 Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción FNB del aroma de la guayaba variedad regional blanca. (los números corresponden con los presentados en la tabla 3.11)

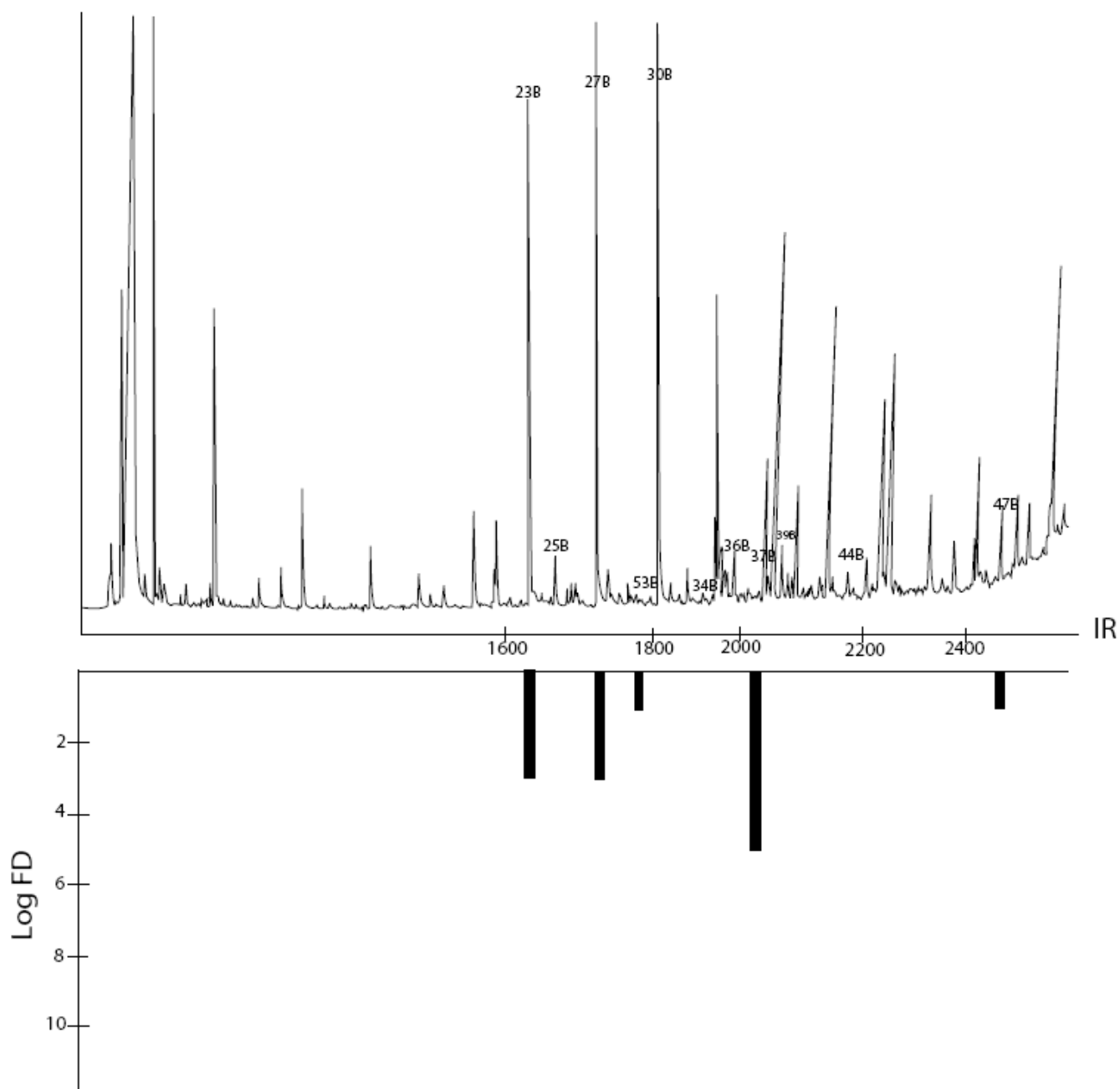


Figura 3.20 Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción FA del aroma de la guayaba variedad regional blanca. (los números corresponden con los presentados en la tabla 3.11)

Tabla 3.11 Compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba regional blanca.

No. ^a	IR _{FFAP} ^b	IR _{DB-5} ^b	Compuesto ^d	Descripción olfativa	FD ^e	FNB ^g	FA ^g	FT ^g
3B	1053	802	Butanoato de etilo	Frutal	32	X		
4B	1079	802	Hexanal	Verde	4	X		
5B	1118	800	(E)-3-Hexenal	Verde	1	X		
6B	1131	796	(Z)-3-Hexenal	Verde	256	X		
50B	1187	1028	1,8-Cineol	Mentolado	2	X		
51B	1192	906	Heptanal ^f	Herbal, grasoso	1	X		
7B	1218	899	(Z)-4-Heptenal	Pescado	1	X		
52B	1269	1004	Octanal	Cítrico	1	X		
8B	1282	978	1-Octen-3-ona ^f	Champiñon	4	X		
9B	1300	954	(E)-2-Heptenal	Frutal	1	X		
11B	1356	987	(Z)-1,5-Octadien-3-ona ^f	Geranio	4	X		
13B	1380	1096	Nonanal	Cítrico	1	X		
14B	1438	903	Metional	Papa cocida	2	X		
21B	1580	1591	4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	Caramelo	16	X		
23B	1615	817	Ácido butanoico	Rancio, queso	8		X	
25B	1652	885	Ácido 2-y 3-metilbutanoico (80:20)	Rancio, queso	1		X	
26B	1720	1249	Acetato de 3-sulfanilhexilo	<i>Black-currant</i>	8	X		X
27B	1726	918	Ácido pentanoico	Rancio, queso	8		X	
29B	1830	1418	3-Sulfanil-1-hexanol	<i>Grapefruit</i>	4	X		X
30B	1835	1179	Ácido hexanoico	Rancio, queso	1		X	
53B	1779	1148	γ -Heptalactona ^f	Coco	2	X	X	
34B	1934	1112	Ácido heptanoico	Rancio, queso	1		X	
35B	2000	1383	<i>Trans</i> -4,5-epoxi-(E)-2-decenal	Metálico	64	X		
36B	2015	1370	γ -Nonalactona ^f	Coco	1	X	X	
37B	2032	1081	4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	Caramelo	32	X	X	
38B	2053	1486	<i>Trans</i> -4,5-epoxi-(E)-2-undecenal	Metálico	8	X		
39B	2077	1389	δ -Nonalactona ^f	Coco	1		X	
41B	2147	1453	Acetato de cinamilo	Floral, miel	512	X		
44B	2197	1136	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona	Especiado	1	X	X	
45B	2287	1335	Alcohol cinámico	Floral, miel	512	X		
47B	2555	1261	Ácido fenilacético	Miel	2		X	

a. Los compuestos fueron numerados según el orden de elución en la columna FFAP y concuerdan con los presentados en la figura 3.20 y con los de la tabla 3.5 para la guayaba roja. b. IR= Índice de retención en columna FFAP y DB-5 c. la descripción sensorial corresponde a la percibida a la salida del puerto de olfacción durante CG-O d. los compuestos fueron identificados con base en sus índices de retención en columna FFAP y DB-5, sus espectros de masas y sus características sensoriales. e. FD= factor de dilución de aroma f. la obtención de un espectro de masas no fue posible; la identificación esta basada sólo en la comparación de IR y descripción sensorial con sustancias de referencia. g. fracción obtenida por partición en compuestos neutros básicos (FNB), compuestos ácidos (FA) y fracción de tioles (FT).

La comparación cualitativa de los compuestos de aroma detectados en el análisis AEDA de la guayaba blanca y la guayaba roja indicó que en el aroma de la guayaba blanca se detectaron olfativamente el 1,8-cineol (50B), heptanal (51B), octanal (52B) y γ -heptalactona (53B), los cuales no fueron detectados olfativamente en la variedad roja.

En contraste las notas olfativas debidas al butanoato de metilo (1R), diacetilo (2R), 2,3-dimetilpirazina (10R), (*Z*)-3-hexenol (12R), ácido acético (15R), (2*R*,3*S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (16R), γ -butirolactona (17R), (2*S*,3*S*)-2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo (18R), linalool (19R), terpinen-4-ol (20R), benzoato de metilo (22R), benzoato de etilo (24R), acetato de 2-feniletilo (28R), δ -heptalactona (31R), (*E,E,Z*)-2,4,6-nonatrienal (32R), γ -octalactona (33R), γ -decalactona (40R), eugenol (42R), δ -decalactona (43R), γ -dodecalactona (46R) y vainillina (48R) determinadas en el aroma de la guayaba regional roja, no fueron detectadas en el aroma de la guayaba regional blanca.

Se realizó un AEDA comparativo de los extractos de guayaba blanca y roja, por cuanto fueron obtenidos a partir de la misma cantidad de fruta y mediante el mismo método de extracción. Asumiendo pérdidas iguales de los compuestos volátiles durante el procesamiento de la muestra se logró establecer diferencias en el aroma de las dos variedades.

Para los compuestos butanoato de etilo, hexanal, (*Z*)-3-hexenal, metional, 4-metoxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona, acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol, trans-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona, acetato de cinamilo, 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(*5H*)-furanona y alcohol cinámico cuyos FD en el aroma de la guayaba roja estuvieron en un rango entre 128-2048 se observó que en el aroma de la guayaba blanca solo alcanzaron valores entre 1-512. En vista que el FD de un componente activo olfativamente esta relacionado con su valor umbral y este a su vez depende de la concentración del analito en el extracto, las diferencias en los FD para los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba roja y blanca sugirieron que la concentración de estos volátiles en la variedad blanca es menor a la determinada en el aroma de guayaba roja.

En el aroma de la variedad blanca los compuestos acetato de cinamilo, alcohol cinamílico y (Z)-3-hexenal poseen los valores de FD más altos. Estos compuestos son los responsables de notas floral-miel y verde, que indican una mayor relevancia de estas notas en el aroma de la variedad blanca en contraste con las notas dulce-caramelo y azufrada percibidas en la variedad roja y producidas por los tioles y compuestos furánicos.

3.2.2 Experimentos de cuantificación. La cuantificación de los compuestos activos olfativamente en la variedad blanca cuyos valores de FD fueron iguales o superiores a 32, se realizó por el método SIDA. La cuantificación de (Z)-3-hexenal y hexanal en el aroma de la variedad blanca fue determinada en fruta cortada en cubos con base en los resultados obtenidos en la variedad roja. Para establecer el aporte individual de cada uno de los compuestos activos olfativamente al aroma global de la guayaba blanca, se calcularon los OAV mediante la relación de sus concentraciones y los valores umbral de olor. En la tabla 3.12 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 3.12 Resultados del análisis cuantitativo de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba regional blanca.

No. ^a	Compuesto	Concentración ^b (µg/Kg fruta)	Valor umbral (µg/kg agua)	OAV ^c
3B	Butanoato de etilo	170 ± 42 (25%)	0,76	200
4B	Hexanal	970 ± 190 (20%)	2,6	400
6B	(Z)-3-Hexenal	2010 ± 460 (23%)	0,12	17000
14B	Metional	0,3 ± 0,2 (67%)	0,43	<1
21B	4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	194 ± 25 (13%)	160	1
26B	Acetato de 3-sulfanilhexilo	9,2 ± 5,6 (61%)	0,02	130
29B	3-Sulfanil-1-hexanol	7,8 ± 2,8 (36%)	0,06	460
35B	<i>trans</i> -4,5-Epoxi-(E)-2-decenal	2,3 ± 0 (0%)	0,22	10
37B	4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	3440 ± 340 (10%)	40	90
41B	Acetato de cinamilo	0,8 ± 0,2 (25%)	150	<<1
44B	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona	0,5 ± 0,07 (13%)	1,7	<<1
45B	Alcohol cinamílico	620 ± 50 (8%)	77	8

a. Los números corresponden con los presentados en la tabla 3.11; b. concentración promedio ± desviación estándar (% desviación) resultado de tres replicas; c. OAV=odor active value.

Los compuestos mayoritarios fueron 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, (*Z*)-3-hexenal y hexanal. Las concentraciones mas bajas se encontraron para el metional, 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona y acetato de cinamilo. Sin embargo, esta comparación de las concentraciones no indica la importancia olfativa de cada uno de los analitos en el aroma total de la fruta. Como se ha mencionado anteriormente, la determinación de valores OAV es la que permite establecer el aporte individual y efectivo de los compuestos activos olfativamente en el aroma de un alimento. Así se estableció que los mayores valores de OAV se obtuvieron para el (*Z*)-3-hexenal, hexanal, 3-sulfanil-1-hexanol, butanoato de etilo, acetato de 3-sulfanilhexilo y 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, algunos de los cuales conservan el mismo orden de magnitud que los determinados en el aroma de la variedad roja. Estos compuestos son los responsables de las notas verde, *grapefruit*, frutal y dulce-caramelo (respectivamente), características del aroma de esta variedad.

3.2.3 Experimentos de recombinación y omisión. La solución de recombinación del aroma fue obtenida mediante la mezcla de los compuestos con OAV mayores a 1 en las concentraciones determinadas por SIDA. El perfil olfativo de esta recombinación se comparó contra el perfil olfativo de los cubos de fruta blanca y roja (figura 3.21).

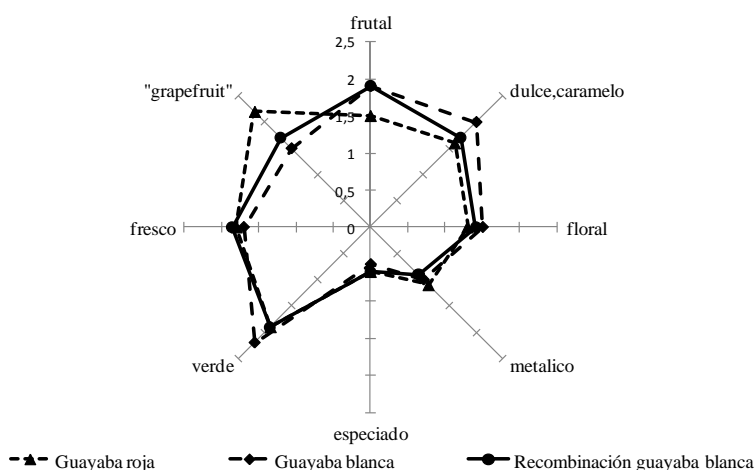


Figura 3.21 Perfil del aroma de cubos de guayaba blanca en comparación con la solución recombinada y cubos de guayaba roja.

El perfil de aroma de la recombinación de la fruta blanca fue similar al perfil de la fruta fresca, lo cual indica la validez de los resultados cualitativos y cuantitativos en la caracterización del aroma de la guayaba blanca. Así en la variedad blanca la nota dulce y verde esta mas acentuada que en la recombinación. Al comparar el aroma de las dos variedades, se observa que el aroma de la guayaba blanca posee una mayor influencia de las notas verde, frutal y dulce-caramelo con respecto al aroma de la guayaba roja mientras que en la variedad roja se observa una mayor influencia de la nota *grapefruit*.

Los resultados aquí presentados demuestran que el aroma de las dos variedades esta conformado por los mismos compuestos activos olfativamente y que aunque difieren en su composición cuantitativa, es posible afirmar que el aroma de la variedad blanca es olfativamente equivalente al aroma de la variedad roja.

Con base en este resultado se plantearon los ensayos de omisión, mediante el uso de pruebas triangulares. Así fue posible establecer los compuestos impacto en el aroma de la guayaba regional blanca. En la tabla 3.13 se presentan los resultados del análisis olfativo y estadístico de estos ensayos.

Tabla 3.13 Ensayos de omisión en el aroma de guayaba regional blanca

Compuesto omitido	Respuestas correctas^a	Nivel de significancia
3-Sulfanil-1-hexanol	11	1%
Acetato de 3-sulfanilhexilo	8	-
4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)furanona	7	-
(Z)-3-Hexenal	9	5%
Hexanal	3	-
Butanoato de etilo	9	5%
4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)furanona	8	-
Alcohol cinamílico	7	-
<i>trans</i> -4,5-epoxi-(<i>E</i>)-2-decenal	0	-

a. número de panelistas = 15

Los resultados anteriores mostraron diferencias significativas en el aroma global de la recombinación cuando el (Z)-3-hexenal, 3-sulfanil-1-hexanol y el butanoato de etilo fueron omitidos de los respectivos ensayos. Estos resultados coinciden con los obtenidos para la guayaba regional roja.

Aunque la concentración de 3-sulfanil-1-hexanol empleada en este modelo de recombinación fue mucho menor a la empleada en el aroma de la guayaba roja, el aroma global de este modelo, muestra el característico aroma de la guayaba. Los ensayos de omisión confirman la influencia de los compuestos azufrados, el butanoato de etilo y el (Z)-3-hexenal en el aroma de la variedad blanca.

3.2.4 Consideraciones generales. El estudio del aroma de la guayaba blanca y su comparación con el aroma de la variedad roja, se realizó mediante un análisis AEDA comparativo. Los resultados obtenidos mostraron que el aroma de las dos variedades presentan los mismos compuestos activos olfativamente. Sin embargo, el análisis SIDA permitió establecer que el aroma de la guayaba blanca presenta diferencias en la concentración de los analitos activos olfativamente con respecto a la concentración para los mismos analitos en guayaba roja.

Otros estudios comparativos del aroma de las variedades roja y blanca en frutas provenientes de Egipto discuten las diferencias en la composición del aroma con respecto al contenido de diversos grupos funcionales. Mientras que en el aroma de la guayaba blanca los principales constituyentes fueron hidrocarburos, en la guayaba roja los compuestos carbonílicos fueron mayoritarios. En este estudio también se estableció que el hexanal es el componente mayoritario en las dos variedades y que el aroma característico es debido a derivados cinamílicos, compuestos C_6 y β -cariofileno (Askar, et al, 1986). Estudios en frutas colombianas de las variedades Palmira ICA-1 y Glum Sali destacan un mayor contenido de ésteres en la primera variedad e hidrocarburos y aldehídos C_6 en la segunda (Quijano, et al, 1999). Sin embargo estos resultados no permiten esclarecer las posibles diferencias sensoriales de las variedades estudiadas por cuanto los compuestos identificados y cuantificados no corresponden a los responsables del aroma de la fruta.

Este conocimiento en la composición del aroma y los resultados del mayor valor nutricional hallado para frutas de la variedad blanca en comparación con la variedad roja, son razones que justifican aumentar el consumo de esta variedad. Además constituye un aporte al conocimiento de nuestras especies para su defensa, promoción y aprovechamiento, pues son la base para investigaciones en pro de la agroindustria y fortalecimiento de la cadena productiva de la guayaba.

Aparentemente las guayabas blancas tienen una menor producción de compuestos azufrados, lo cual sugiere que la ruta de su biogénesis en la variedad roja es más activa que en la variedad blanca. De manera análoga al resultado en guayaba roja, en la guayaba blanca no se pudo establecer la presencia de precursores cisteinilizados posibles precursores de compuestos azufrados volátiles. Así es posible sugerir que en el aroma de la guayaba blanca el origen de los tioles se debe a otra ruta biogenética como por ejemplo la adición de H₂S sobre (*E*)-2-hexenal (Vermeulen, et al, 2006).

3.3 CAMBIOS EN EL AROMA DE LA GUAYABA DURANTE LA MADURACIÓN

En general la composición química y las propiedades físicas de las frutas son afectadas por diversos factores externos como son las condiciones climáticas de cultivo (suelo, temperatura, humedad, etc), el periodo de cosecha, la maduración *in situ* o poscosecha, etc. En este capítulo se presentan los resultados del estudio de los cambios en el aroma de la guayaba roja y blanca por efecto de la maduración *in situ* y la maduración poscosecha de frutas recolectadas una misma zona de cultivo (Finca Las Alicia-Puente Nacional) y durante el mismo periodo de cosecha (Octubre-Diciembre, 2006, 2007 y 2008). Este estudio se realizó con el fin de establecer la variación de los compuestos activos olfativamente durante el proceso de maduración.

Con el fin de obtener una muestra representativa, la recolección de la fruta se realizó mediante la toma al azar de 3-5 frutas de 5 árboles. Los frutos recolectados y clasificados, fueron caracterizados físico-químicamente (tabla 2.1). Se observó que las frutas se recolectan cuando su cáscara es de color verde y poseen una alta firmeza, que con el paso del tiempo su color cambia por tonalidades amarillas y pierden firmeza. Así mismo se notó un cambio en el aroma transcurridos tan sólo 3-4 días de su recolección.

3.3.1 Maduración *in situ*. Una primera aproximación al estudio del cambio del aroma de la guayaba colombiana durante su maduración se realizó con frutos madurados *in situ* con el objeto de conocer el comportamiento natural de esta fruta. La extracción de los compuestos volátiles se realizó por HS-MEFS y los extractos así obtenidos se analizaron por CG-O y CG-EM. Los parámetros de análisis por HS-MEFS fueron previamente seleccionados teniendo en cuenta la fibra y las condiciones en las que se detectó el mayor número de compuestos volátiles (González, 2007).

Se definieron tres estados de madurez: Ii, Iii y IIIi, que pueden relacionarse con frutas verdes, pintonas y maduras. Después de realizar su caracterización físico-química (tabla 2.1) se procedió a realizar su caracterización olfativa acorde con las notas olfativas frutal,

verde, dulce, fresco y *grapefruit* (figura 3.22). Las notas olfativas como especiado, metálico y floral no fueron descritas en esta primera aproximación.

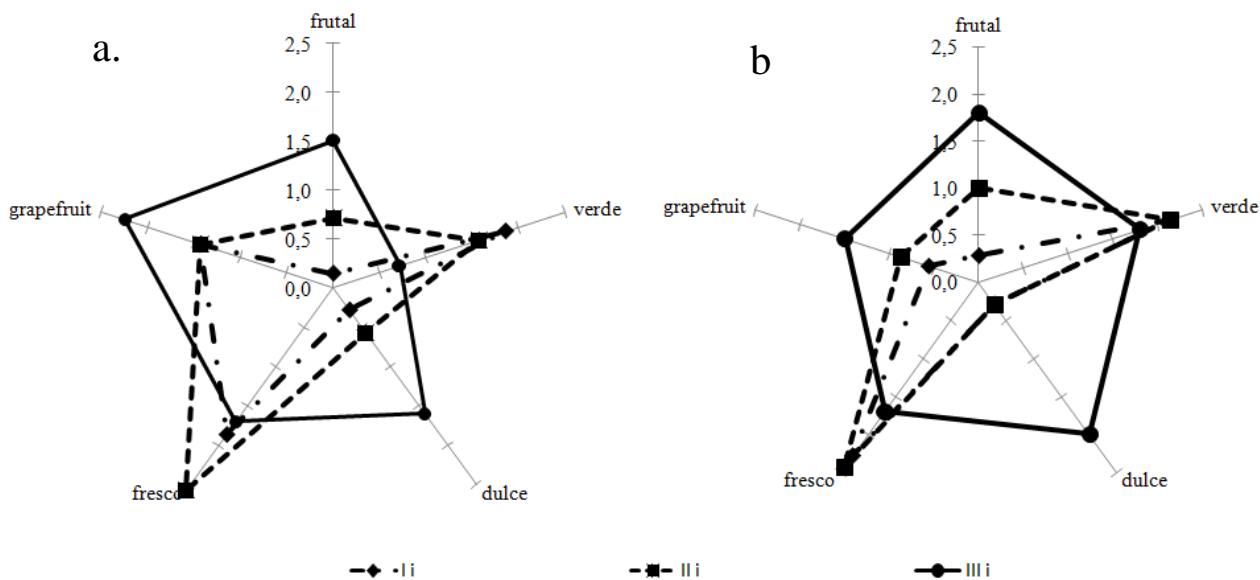


Figura 3.22 Perfil olfativo por estados de madurez *in situ* (Ii, Iii, IIIi) de:
A. Guayaba regional roja y B. Guayaba regional blanca

El comportamiento general fue similar en las dos variedades. Con la maduración disminuyen las notas verde y fresca y aumentan las notas dulce, frutal y *grapefruit*. El perfil olfativo de las dos variedades en los estados de madurez Ii y Iii se caracterizó por las notas fresca y verde, mientras que en el estado IIIi las notas *grapefruit*, frutal y dulce son las más reconocidas.

Cada uno de los extractos obtenidos por HS-MEFS se analizó por CG-O y CG-EM. (figura 3.23). En la tabla 3.14 se presenta la distribución porcentual de los compuestos detectados.

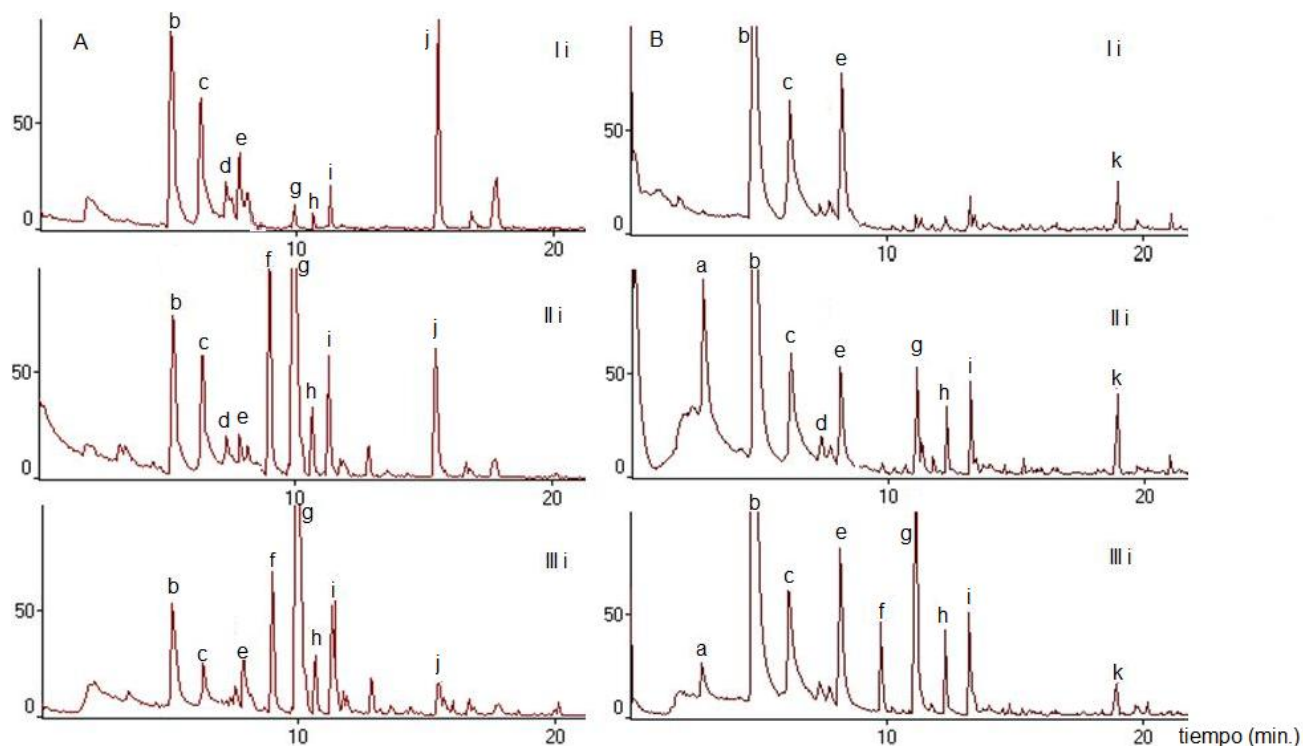


Figura 3.23 Perfiles cromatográficos obtenidos del muestreo por HS-MEFS para tres estados de maduración en A. guayaba regional roja y B. guayaba regional blanca. a. etanol; b. hexanal; c. (Z)-3-hexenal; d. limoneno; e. (E)-2-hexenal; f. acetato de hexilo; g. acetato de (Z)-3-hexenilo; h. hexanol; i. (Z)-3-hexenol; j. β -cariofileno; k. sesquiterpeno no identificado.

Tabla 3.14 Distribución porcentual compuestos detectados por HS-MEFS en diferentes estados de maduración de guayaba regional roja y blanca.

No.	Compuesto	Guayaba roja (%)			Guayaba blanca (%)		
		Ii	IIi	IIIi	Ii	IIi	IIIi
a	Etanol	0,0	0,0	0,0	0,0	12,2	0,3
b	Hexanal	26,7	10,8	8,1	74,2	54,9	55,2
c	(Z)-3-hexenal	5,5	5,0	3,7	8,8	5,7	7,0
d	Limoneno	5,4	0,8	0,0	0,0	0,6	0,0
e	(E)-2-hexenal	4,0	2,5	2,6	13,1	10,5	9,1
f	Acetato de hexilo	0,0	7,2	3,9	0,0	0,0	4,2
g	Acetato de (Z)-3-hexenilo	2,7	64,2	77,2	0,0	5,5	16,3
h	Hexanol	1,7	1,7	1,2	0,0	3,2	3,5
i	(Z)-3-hexenol	5,0	2,8	2,6	0,0	4,4	3,5
j	β -cariofileno	49,1	5,1	0,8	0,0	0,0	0,0
k	Sesquiterpeno	0,0	0,0	0,0	3,9	3,0	0,9

Con base en el análisis anterior se encontró que las señales detectadas corresponden a compuestos C₆ y sesquiterpenos. Olfativamente sólo fueron detectados el hexanal y el (*Z*)-3-hexenal caracterizados por una nota verde.

En la variedad roja y en la blanca se observa que el contenido de hexanal, (*Z*)-3-hexenal y (*E*)-2-hexenal, disminuyen con la maduración, mientras que el contenido de acetato de hexilo y acetato de (*Z*)-3-hexenilo aumentan. En las dos variedades el contenido de hexanol y (*Z*)-3-hexenol permanece casi constante durante el proceso. Dado que las enzimas no fueron desactivadas durante el muestreo HS-MEFS, las cantidades determinadas para estos compuestos corresponden a la suma del contenido endógeno y al formado por acción enzimática de la 13-hidroperoxi C18:2 y C18:3 liasa sobre ácido linolenico y linoleico como se expuso en el numeral 3.1.4.

Mientras en la variedad roja se observa una disminución en el contenido de β-cariofileno con el transcurso de la maduración, en la variedad blanca, se estableció la presencia de un sesquiterpeno no identificado cuyo contenido también disminuye en el transcurso de la maduración. Así mismo se puede destacar que en la composición del aroma de las dos variedades se produce limoneno, el cual fue detectado principalmente en el estado intermedio Ii de la variedad roja. La formación de terpenos y sesquiterpenos esta relacionada con la ruta del ácido mevalonico (Fisher y Scott, 1997).

Los compuestos volátiles de la guayaba han sido estudiados mediante extracción HS-MEFS en frutas provenientes de Francia (Paniandy, et al 2000) y Brasil (Cardeal, et al, 2005; Carasek, et al, 2006). En las frutas provenientes de Francia se determinaron ésteres, aldehídos y lactonas como constituyentes del HS y se atribuyó la nota verde a la presencia de (*E*)-2-hexenal y (*E*)-3-hexenal; mientras que en las frutas de Brasil se destaca la presencia de alcoholes, aldehídos, ésteres y terpenos como principales constituyentes del HS de la guayaba. Sin embargo en estos estudios no se determinan los compuestos activos olfativamente aquí determinados.

El presente estudio permitió establecer diferencias en la composición del aroma de los tres estados de maduración de la fruta alcanzados *in situ* mostrando que el aroma cambia en cuanto a la degradación de hexanal y (Z)-3-hexenal, y la formación de alcoholes y ésteres C₆. De esta manera la técnica de HS-MEFS permitió tener una idea del desarrollo de la nota verde durante el proceso de maduración, pero el seguimiento del resto de compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba no fue posible. Por esta razón fue necesario buscar una metodología de análisis que permitiera comparar la influencia de todos los compuestos activos olfativamente en cada estado de maduración. Así se planteó el uso del análisis AEDA comparativo de extractos de aroma obtenidos por SAFE y la cuantificación por SIDA de los compuestos activos olfativamente en diferentes estados de maduración tanto de guayaba roja como de guayaba blanca, resultados que se discutirán a continuación.

3.3.2 Maduración poscosecha. La guayaba se clasifica como una fruta climatérica que completa su proceso de maduración después de su cosecha, mostrando cambios profundos en el color y la firmeza en pocos días (6-8 días) (Azzolini, et al, 2005). Para evaluar la influencia de la maduración poscosecha en la composición del aroma se emplearon frutos con las características físico-químicas presentadas en la tabla 2.1, los cuales se caracterizaron olfativamente (figura 3.24). Este experimento se planteó porque la guayaba usualmente se recolecta en estado verde y se deja madurar durante su transporte y almacenamiento.

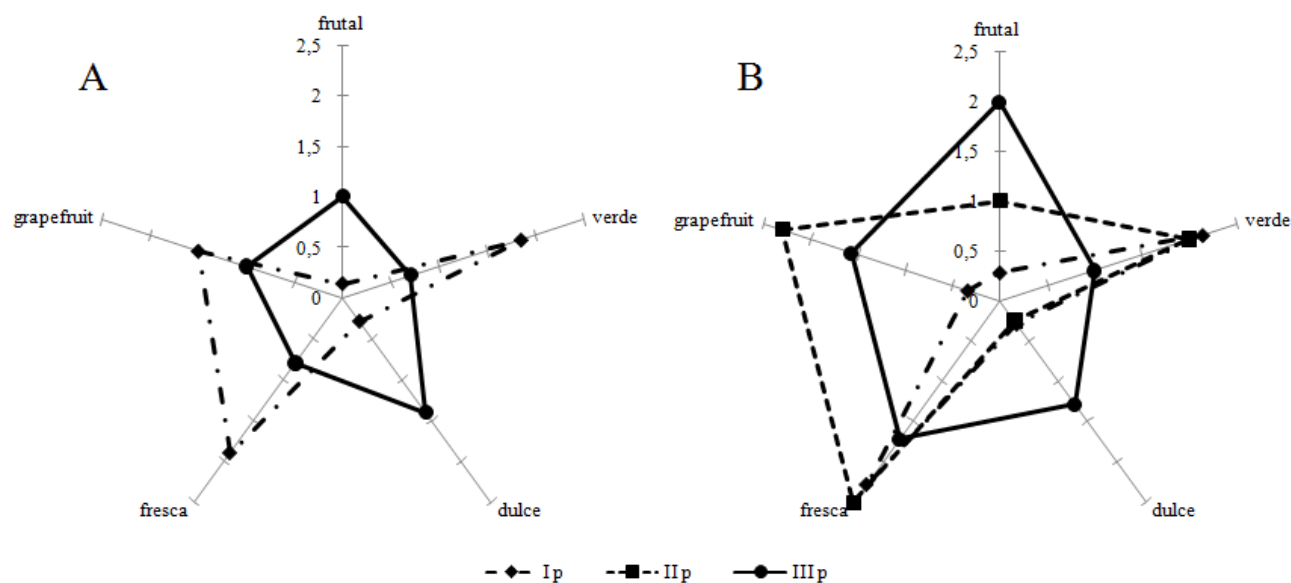


Figura 3.24 Perfil olfativo de los diferentes estados de maduración poscosecha de guayaba
A. Regional roja y B. Regional blanca

El perfil olfativo de la variedad roja en estado de madurez Ip se caracterizó por las notas verde, *grapefruit* y fresca, mientras que en el estado IIIp las notas frutal y dulce fueron predominantes. En la variedad blanca el estado Ip se observó la influencia de las notas verde y fresca; mientras que en el estado Iip las notas *grapefruit*, verde y fresca fueron las predominantes. En el estado IIIp las notas frutal y dulce fueron las más reconocidas. En las dos variedades las frutas inmaduras se caracterizaron por notas verde y fresca, mientras que en el estado maduro se desarrolló la nota *grapefruit*, la cual es bastante susceptible al manejo poscosecha. En el estado sobremaduro las notas dulce y frutal fueron las características. Un análisis AEDA comparativo con extractos de las dos variedades obtenidos a partir de la misma cantidad de fruta y bajo las mismas condiciones de extracción permitió establecer que los compuestos olfativamente activos en el aroma de las dos variedades de guayaba son los mismos y que los FD varían de acuerdo con el estado de madurez de la fruta. En la tabla 3.15 se presentan los FD de los compuestos activos olfativamente por estado de maduración en las dos variedades.

Tabla 3.15 Análisis por AEDA comparativo de guayaba regional roja y blanca en diferentes estados de maduración poscosecha

No. ^a	Compuesto	Guayaba roja		Guayaba blanca		
		FD _{Ip}	FD _{IIIp}	FD _{Ip}	FD _{IIp}	FD _{IIIp}
3	Butanoato de etilo	4	16	0	32	4
4	Hexanal	4	2	2	4	4
5	(<i>E</i>)-3-Hexenal	2	2	2	1	2
6	(<i>Z</i>)-3-Hexenal	>1024	>1024	>1024	256	>1024
50B	1,8-Cineol	0	0	32	2	32
8	1-Octen-3-ona	2	1	2	4	2
11	(<i>Z</i>)-1,5-Octadien-3-ona	0	2	8	4	4
14	Metional	2	2	2	2	4
21	4-Metoxi-2,5-dimetil-3(<i>2H</i>)-furanona	0	8	0	16	8
23	Ácido butanoico	0	2	0	8	0
25	Ácidos 2 y 3-metilbutanoico	0	1	0	1	0
26	Acetato de 3-sulfanilhexilo	0	2	1	8	0
27	Ácido pentanoico	0	1	0	8	0
29	3-Sulfanil-1-hexanol	0	1	1	4	0
35	<i>trans</i> -4,5-Epoxi-(<i>E</i>)-2-decenal	16	16	32	64	8
37	4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(<i>2H</i>)-furanona	1	2	0	32	1
38	<i>trans</i> -4,5-Epoxi-(<i>E</i>)-2-undecenal	1	4	2	8	8
41	Acetato de cinamilo	1	1	0	512	0
44	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(<i>5H</i>)-furanona	0	1	0	1	2
45	Alcohol cinámico	1	4	2	512	8
47	Ácido fenilacético	1	1	0	2	0

a. Los números corresponden con los presentados en las tablas 3.5 y 3.11. FD = factor de dilución.

En la variedad roja se evaluaron dos estados de madurez que pueden correlacionarse con estado inmaduro y sobremaduro. En el estado Ip los compuestos más potentes fueron (*Z*)-3-hexenal y *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal responsables de las notas verde y metálica respectivamente, los cuales poseen un alto FD en el estado IIIp, complementados con la presencia de butanoato de etilo y 4-metoxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona. Estas determinaciones coinciden con el resultado de la evaluación sensorial en el cual las notas verde en el estado Ip y las notas dulce y frutal en el estado IIIp son las más relevantes.

En la variedad blanca se evaluaron tres estados de madurez, que pueden correlacionarse con estados inmaduro, maduro y sobremaduro. En el estado Ip los mayores FD fueron determinados para (*Z*)-3-hexenal, 1,8-cineol y *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal. En el estado IIp la contribución al aroma se relaciona además con los compuestos acetato de cinamilo,

alcohol cinámico, butanoato de etilo y 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona. En el estado IIIp se observan nuevamente altos valores FD para (Z)-3-hexenal y 1,8-cineol.

Al comparar los perfiles olfativos de las dos variedades, se observó que hay un mayor aporte de las notas *grapefruit* en el perfil de la variedad blanca, lo cual coincide con los mayores valores FD detectados para los compuestos 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo en comparación con los determinados en la variedad roja.

Las diferencias en los valores FD de los compuestos detectados en el análisis AEDA, están relacionadas con su concentración y valor umbral. La concentración de volátiles durante el proceso de maduración se realizó mediante SIDA. En la tabla 3.16 se presentan los resultados de la cuantificación de los compuestos activos olfativamente en los diferentes estados de madurez en las dos variedades de guayaba.

Tabla 3.16 Análisis cuantitativo por SIDA de compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba roja y blanca por estado de madurez.

No. ^a	Compuesto	Guayaba roja ^b		Guayaba blanca ^b		
		Ip (µg/Kg fruta)	IIp (µg/Kg fruta)	Ip (µg/Kg fruta)	IIp (µg/Kg fruta)	IIIp (µg/Kg fruta)
3	Butanoato de etilo	24±7 (29%)	130 ± 9 (7%)	170 ±42 (25%)	150 ± 15 (10%)	324 ± 30 (9%)
4	Hexanal	3680± 395 (11%)	276 ± 86 (31%)	2350 ± 150 (6%)	967 ± 190 (20%)	210 ± 36 (17%)
6	(Z)-3-hexenal	9920±591 (6%)	1470 ± 88 (6%)	2690± 295 (11%)	2010 ± 460 (23%)	443±31 (7%)
14	Metional	0,25 ± 0,01 (4%)	0,07±0 (0%)	0,1 ± 0,03 (30%)	0,3 ± 0,2 (67%)	0,5±0,05 (10%)
16	(2R,3S)-2-hidroxi-3-metil-pentanoato de metilo	5,6±0,9 (16%)	3,3±0,4 (12%) ^c	ND	2,2±0,6 (27%) ^c	6,9±3,2 (46%)
18	(2S,3S)-2-hidroxi-3-metil-pentanoato de metilo	32±10 (31%)	64±3,3 (5%) ^c	ND	10±1,1 (11%) ^c	13±0,8 (6%)
21	4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	105 ± 3,7 (4%)	560 ± 81 (14%)	172 ± 11 (6%)	194 ± 25 (13%)	54 ± 2,7 (5%)
22	Benzoato de metilo	22±2,1 (10%)	110±10 (9%)	9,3±1,9 (20%)	3,2±0,5 (16%)	4,9±1,5 (31%)
24	Benzoato de etilo	101±8 (8%)	455±47 (10%)	6,0±0,6 (10%)	16±6,6 (41%) ^d	19±4,5 (24%)
26	Acetato de 3-sulfanilhexilo	ND	2,0± 0,18 (9%)	10 ± 1,3 (13%)	9,2 ± 5,6 (61%)	0,36±0,04 (11%)
29	3-Sulfanilhexanol	ND	2,2± 0,11 (5%)	16± 4 (25%)	7,8 ± 2,8 (36%)	1,7±0,1 (6%)
35	<i>trans</i> -4,5-Epoxi-(<i>E</i>)-2-decenal	2,4 ± 0,5 (21%)	2,8 ± 1,2 (43%) ^d	ND	2,3 ± 0 (0%)	0,2± 0 (0%)
37	4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	284±12 (4%)	1880 ± 102 (5%)	1100 ± 66 (6%)	3440 ± 340 (10%)	1770 ± 240 (14%)
41	Acetato de cinamilo	1,5 ± 0,1 (7%)	56 ± 8 (14%)	1,2 ±0,2 (17%)	0,8 ± 0,2 (25%)	1,3±0,1 (8%)
44	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona	ND	0,71 ± 0,04 (6%) ^d	0,08 ± 0,03 (38%)	0,53 ± 0,07 (13%)	0,3±0,02 (7%)
45	Alcohol cinamilico	1100± 56 (5%)	3230 ± 157 (5%)	115 ± 56 (49%)	620 ± 50 (8%)	266 ± 30 (11%)

a. Los números corresponden con los presentados en las tablas 3.5 y 3.11; b. concentración promedio ±desviación estándar (% desviación) resultado de tres replicas; c. concentración promedio ±desviación estándar (% desviación) resultado de cinco replicas; d. concentración promedio ±desviación estándar (% desviación) resultado de dos replicas; ND= no detectado

La comparación de los datos de cuantificación muestra que tanto en la variedad roja como en la variedad blanca, la concentración de aldehídos C₆ disminuye con el transcurso de la maduración de la fruta.

Si bien los aldehídos C₆ continúan siendo los compuestos mayoritarios en el aroma de los diferentes estados de maduración, el aumento en la concentración del butanoato de etilo, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, favorecen el aporte de notas frutal y dulce-caramelo en cada estado de madurez.

De otra parte los compuestos azufrados 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo, responsables de las notas *grapefruit* y *black-currant* respectivamente, disminuyeron su contenido en la maduración de la guayaba blanca; mientras que en la guayaba roja solo pudieron ser cuantificados en el estado sobremaduro.

Otros estudios, han evaluado el cambio en la concentración de compuestos volátiles por efecto de la maduración de la fruta. En frutas variedad Cortibel provenientes de Brasil (Soares, et al, 2007), Lucknow-49 de la India (Toth-Markus, 2005) y guayabas blancas de Taiwán (Chyau, et al, 1992) se evaluó el comportamiento de los componentes volátiles en diferentes estados de maduración. Estos estudios coinciden en que en las frutas inmaduras y en el estado intermedio de maduración predominan los aldehídos como (*E*)-2-hexenal y (*Z*)-3-hexenal, mientras que en las frutas maduras los ésteres acetato de (*Z*)-3-hexenilo y acetato de (*E*)-3-hexenilo y sesquiterpenos como cariofileno, α -humuleno y β -bisaboleno son los componentes mayoritarios. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en este estudio, sin embargo en las variedades roja y blanca la presencia de sesquiterpenos se limitó a la presencia de β -cariofileno, cuya contribución al aroma de la guayaba no es relevante. Los resultados aquí presentados muestran por primera vez el cambio en compuestos activos olfativamente por efecto de la maduración de la guayaba.

Sin embargo, para establecer el verdadero aporte sensorial de los compuestos activos olfativamente al aroma de cada estado de madurez se presenta la comparación de los

OAVs, la cual no solo muestra el incremento o la disminución de la concentración de cada componente en el proceso de maduración, sino que permite estimar como cada compuesto responsables de una nota olfativa, posee un mayor o menor efecto en el perfil de aroma. La tabla 3.17 muestra las diferencias obtenidas para los OAVs calculados en las dos variedades en los diferentes estados de maduración.

Tabla 3.17 OAV para los compuestos activos olfativamente en el aroma de guayaba roja y blanca por estado de madurez.

No. ^a	Compuesto	Valor umbral (µg/kg agua)	Guayaba roja		Guayaba blanca		
			OAV Ip	OAV IIIp	OAV Ip	OAV IIp	OAV IIIp
3	Butanoato de etilo	0,76	32	170	220	200	430
4	Hexanal	2,4	1500	120	980	400	90
6	(Z)-3-hexenal	0,12	83000	12000	22000	17000	3700
14	Metional	0,43	<1	<<1	<<1	<1	<1
16	(2R,3S)-2-hidroxi-3-metil-pentanoato de metilo	13	<1	<<1	-	<1	<1
18	(2S,3S)-2-hidroxi-3-metil-pentanoato de metilo	2,4	13	30	-	4	5
21	4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	160	<1	4	1	1	<1
22	Benzoato de metilo	73	<<1	1	<<1	<<1	<<1
24	Benzoato de etilo	53	2	9	<1	<1	<1
26	Acetato de 3-sulfanilhexilo	0,02	-	100	500	460	20
29	3-Sulfanilhexanol	0,06	-	40	270	130	30
35	<i>trans</i> -4,5-Epoxi-(E)-2-decenal	0,22	11	13	-	10	1
37	4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	40	7	50	30	90	40
41	Acetato de cinamilo	150	<<1	<<1	<<1	<<1	<<1
44	3-Hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona	1,7	-	<1	<<1	<<1	<<1
45	Alcohol cinamilico	77	14	40	1	8	3

a. Los números corresponden con los presentados en las tablas 3.5 y 3.11

Estos resultados muestran que tanto en la variedad roja como en la variedad blanca, el estado inicial Ip se caracteriza por una nota verde debida principalmente a la presencia de (Z)-3-hexenal el cual excede su valor umbral en 83000 y 22000, respectivamente. Durante

la maduración el OAV de este compuesto disminuye pero es el más influyente en el aroma total de la fruta. Un comportamiento similar se observa para hexanal aunque con un menor OAV. Los altos OAV detectados para estos compuestos durante todo el proceso de maduración sugieren que inclusive cuando la concentración disminuye su aporte al aroma continúa siendo importante.

Otros constituyentes de importancia olfativa en el aroma de la guayaba son los compuestos azufrados 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo, cuyo comportamiento según el estado de madurez de la fruta se evaluó por primera vez en este estudio. En la variedad roja estos compuestos no fueron detectados en el estado Ip. En la variedad blanca estos compuestos son importantes en el estado Ip, y son responsables de la nota *grapefruit* que disminuye significativamente con el transcurso de la madurez hasta el estado III p. Los OAV determinados poseen valores de 500 para el alcohol y de 270 para el acetato, fueron similares a los OAV determinados en el estado IIp. Así mismo se observó una reducción drástica de su aporte olfativo en el estado IIIp. Estos resultados indican la importancia de estos compuestos en el aroma de la guayaba y sugieren que estos podrían ser utilizados como indicadores del estado de madurez de la fruta.

Los organismos vivos parecen ser sensibles a moléculas que contienen átomos de azufre, las cuales son capaces de transmitir información inclusive a larga distancia. El olfato humano puede detectar tioles simples y otras moléculas azufradas de bajo peso molecular presentes en concentraciones del orden de ppt y se presume que los insectos responden inclusive a concentraciones menores. Se cree que la discriminación del olor se lleva a cabo por órganos sensoriales olfativos del insecto y que cuando un componente volátil azufrado esta presente, se libera una cadena de potenciales de acción. Las plantas y los animales exploran las propiedades de los compuestos azufrados como mecanismo de atracción o defensa. La actividad de la biomoléculas azufradas depende de la relación -SH/S-S, razón por la cual directa o indirectamente el estado redox del organismo determina la regulación del proceso metabólico. Este mecanismo de control es común para todas las formas de vida (Mitchell, 1996).

Los ésteres son otros compuestos volátiles con un importante papel en el proceso de maduración cuya biogénesis se lleva a cabo mediante la ruta de β -oxidación de lípidos (Fisher y Scott, 1997)

En la guayaba varios ésteres han sido identificados y cuantificados en el proceso de maduración, asumiendo que estos compuestos imparten la nota frutal (Toth-Markus, et al, 2005; Soares, et al, 2007, Chyau, et al, 1992). De acuerdo con los resultados aquí obtenidos, únicamente el butanoato de etilo muestra un OAV que incrementa durante el proceso de maduración. Entonces esto sugiere que únicamente este éster es responsable de la nota frutal típica en los diferentes estados de madurez.

Los compuestos furánicos tales como 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, exhiben los mayores OAV en el estado III p. Estos compuestos se forman enzimáticamente a partir de carbohidratos. La D-glucosa es metabolizada en D-fructosa-6-fosfato la cual ha sido propuesta como el precursor natural de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona y de 4-metoxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona (Wein, et al, 2001).

El alcohol cinámico es otro compuesto con actividad olfativa el cual incrementa su OAV durante la maduración de las dos variedades y se considera como el responsable de la nota floral, miel. Un comportamiento diferente fue encontrado para acetato de cinamilo el cual presentó un OAV menor a 1 en ambas variedades. Estos compuestos son generados a partir de fenilalanina mediante desaminación y reducción (Fisher y Scott, 1997).

Otros compuestos con OAV menores a 1 durante todo el proceso de maduración fueron metional, 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona, *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal (variedad blanca) indicando que su contribución al aroma no es significativa. Con respecto al *trans*-4,5-epoxi-(*E*)-2-decenal, responsable de la nota metálica, este fue más importante en el aroma de la variedad roja. Sin embargo se demostró en los ensayos de omisión que no se detectan diferencias significativas en el perfil de aroma cuando este componente es omitido.

3.3.3 Consideraciones generales. La maduración es la repercusión fisiológica de cambios bioquímicos muy complejos e interrelacionados que ocurren en las frutas. La maduración es el último estado de desarrollo de la fruta, el cual contempla el desarrollo de características organolépticas ideales tales como sabor, color y aroma, atractivas para vectores responsables de dispersar las semillas en el ecosistema. En la guayaba el proceso de maduración es muy rápido y las frutas llegan a la senescencia en poco tiempo, resultando en la pérdida de cualidades sensoriales deseables. Comprender parte de la química de la maduración puede ayudar en el desarrollo de estrategias biológicas para el manejo poscosecha.

Durante el proceso de maduración de la guayaba se observa la formación de diversos compuestos, pero solo unos cuantos son responsables del aroma característico. Se confirmó que los compuestos (*Z*)-3-hexenal, butanoato de etilo, 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona, 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo son compuestos olfativamente activos en los diferentes estados de maduración estudiados de las dos variedades de guayaba.

Entre ellos la presencia de (*Z*)-3-hexenal es la responsable por la característica nota verde del estado inicial, pero que se conserva durante el proceso de maduración como una nota importante para el aroma de la fruta. Las notas frutal y dulce desarrolladas con la madurez de la fruta son debidas al butanoato de etilo y 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2*H*)-furanona respectivamente.

De otra parte se observa una fuerte influencia de la maduración en la generación de los compuestos azufrados: 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo. Estos compuestos son un claro indicio del estado de madurez de la fruta y pueden constituir un método para caracterizar el estado de madurez de la fruta. Así mismo estos compuestos pueden jugar un papel importante en el control de las múltiples plagas que afectan el cultivo de la guayaba.

En general la influencia del estado de madurez en la producción de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba muestra que las dos variedades desarrollan

compuestos volátiles comunes y que si bien es posible diferenciar los estados de maduración según la composición cuantitativa de estos compuestos, no es posible diferenciar entre el aroma de las dos variedades.

3.4 REFERENCIAS

- Askar, A., El-Nemr S.E., Bassiouny, S.S., Aroma constituents in white and pink guava fruits. *Alimenta* 6, **1986**, 162-167
- Azzolini, M., Jacomino, A.P., Urbano, I., Kluge, R., Schiavinato, M., Ripening of Pedro Sato” guava: study on its climacteric or non-climacteric nature. *Braz. J. Plant Physiol.*, **2005**, 17, 299-306
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., Food Chemistry, **2009**, 4th revised and extended edition, Springer, Germany.
- Bentley, R., The nose as a stereochemist. Enantiomers and odor. *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 4099-4112
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruége, V., Dubourdieu, D., Identificación of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 3095-3099
- Carasek, E.; Pawliszyn, J. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME Fiber., *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 8688-8696
- Cardeal, Z.L., Moreira Guimara, E., Vilela Parreira, F., Analysis of volatile compounds in some typical Brazilian fruits and juices by SPME-GC method. *Food Additives and contaminants.*, **2005**, 22, 508-513
- Corpoica-CIMPA, Informe técnico del proyecto “Desarrollo de aditivos naturales de color y aroma a partri de frutas de guayaba”, **2008**
- Chyau, C., Chen, S., Wu, M., Differences of volatile and non-volatile constituents between mature and ripe guava (*Psidium guajava* Linn.), *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 846-849
- Engel, W., Bahr, W., Schieberle, P., Solvent Assisted Flavour Evaporation: A new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.*, **1999**, 209, 237-241

Fisher, C., Scott, T.R., Food Flavours. Biology and Chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge-Reino Unido, **1997**, 165p.

González I.A, Morales A, Osorio C, Meléndez-Martínez AJ, González-Miret ML, Heredia FJ (2009) *J. Sci. Food Agr.* Submitted to.

Hatanaka, A., The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, **1993**, 34, 1201-1218

Helmchen, G., Schmierer, R., Determination of the absolute configuration of chiral thiols by H-NMR Spectroscopy of diastereomeric thiol esters. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1976**, 15, 703-704

Heusinger, G., Mosandl, A., Chirale, schwefelhaltige aromastoffe der gelben passionsfrucht (*Passiflora edulis F. Flavicarpia*). Darstellung der enantiomeren und absolute konfiguration. *Tetrahedron*, **1984**, 25, 507-510

Krajewski, D., Duque, C., Schreier, P., Aliphatic β -D-glucosides from fruits of *Carica pubescens*. *Phytochemistry*, **1997**, 45, 1627-1631

Lin, J., Rouseff, R.L., Barros, S., Naim, M., Aroma composition changes in early season grapefruit juice produced from thermal concentration. *J. Agric. Food Chem.* **2002**; 50, 813-819

Mayorga, H., Knapp, H., Winterhalter, P., Duque, C., Hydroxyester disaccharides from fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Phytochemistry*, **2002**, 59, 439-445

Mestres, M., Busto, O., Guasch, J., Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 881, 569-581

Mitchell, S., Biological interactions of sulfur compounds. Taylor and Francis. Reino Unido, **1996**, p. 151-159

Morales, A.L., Duque, C., Bautista, E., Identification of free and glycosidically bound volatiles and glycosides by capillary GC and capillary GC-MS in "Lulo del Choco" (*Solanum tojiro*). *J. High Resol. Chromatogr.*, **2000**, 23, 379-385

Morales, A.L., Duque, C., Free and glycosidically bound volatiles in the mamme apple (*Mammea americana*) fruit. *Eur. Food Res. Technol.*, **2002**, 215, 221-226

Paniandy, J.C., Chane-Ming, J., Pieribattesti, J.C., Chemical composition of the essential oil and headspace solid-phase microextraction of the guava fruit (*Psidium guajava* L.), *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12, 153-158

Peyrot de Gachons, C., Tominaga, T., Dubourdiey, D., Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identificación of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4076-4079

Quijano, C., Suarez, M., Duque, C. Volatile constituents of two guava (*Psidium guajava*) varieties: Palmira ICA-1 and Glum Sali. *Rev. Col. Quim.*, **1999**, 28, 55-63

Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., Baumes, R., Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, 563, 58-64

Sinuco, D.C., Morales, A.L., Duque, C., Compuestos volátiles libres y glicosídicamente enlazados del aroma de la piña (*Ananas comosus* L.) variedad perolera. *Rev. Col. Quim.*, **2004**, 33, 47-56

Snowden, R.L., Grenno, R., Vial, C., Synthesis and organoleptic properties of various 3-methyl-2-oxopentanoates, 2-hydroxy-3-methylpentanoates, and 2-acyloxy-3-methylpentanoates. *Flavour Fragr. J.* **2005**, 20, 372-380

Soares, F.D., Pereira, T., Maio M.O., Monteiro, A.R., Volatile and non-volatile chemical composition of the White guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. *Food Chem.*, **2007**, 100, 15-21

Suarez, M., Duque, C., Bicchi, C., Wintoch, H., Full, G., Schreier, P., Volatile constituents from the peelings of Lulo (*Solanum vestissimum* D.) fruit. *Flavour Fragrance J.*, **1993**, 8, 215-220

Tominaga, T., Niclass, Y., Frérot, E., Dubourdie, D., Stereoisomeric distribution of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made from *Vitis vinifera* (Var. Sauvignon blanc and semillon). *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 7251-7255

Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D., Contribution of volatile thiols to the aroma of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Am. J. Enol. Viticult.* **2000**, 51, 178-181

Tominaga, T., Dubourdieu, D., Identificación of cysteinylated aroma precursors of certain volatile thiols in passionfruit. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 2874-2876

Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., Dubourdieu, D., Identificación of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Fragr. J.*, **1998**, 13, 159-162

Torrado, A., Suarez, M., Duque, C., Krajewski, D., Neugebauer, W., Shcreier, P., Volatile constituents from tamarillo (*Cyphomandra betacea* SENDTN) fruit. *Flavour Fragr. J.* **1995**, 10, 349-354

Toth-Markus, M., Siddiqui, S., Kovacs, E., Roth, E., Nemeth-Szerdahelyi, E. Changes in flavour, cell wall degrading enzymes and ultrastructure of guava (*Psidium guajava* L.) during ripening, *Acta Alimentaria*, **2005**, 34, 259-266

Tressl, R., Heidlas, J., Albrecht, W., Engel, K.H., Biogenesis of Chiral Hydroxyacid Esters. En Bioflavour'87, Schreier, P., Ed. Walter de Gruyter, Berlin, Alemania, **1988**, 555p

UN virtual, Curso Agronomia, <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2006228/teoria/obboca/prese.htm>. Consultada en Junio 2009

Vermeulen, C., Lejeune, I., Tran, T.T.H., Collin, S., Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 5061-5068

Vermeulen, C., Gijs, L., Collin, S., Sensorial contribución and formación pathways of thiols in foods: A review. *Food Rev. Int.*, **2005**; 21, 69-137

Vermeulen, C., Collin, S., Combinatorial synthesis and sensorial properties of 21 mercapto esters. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 3618-3622

Wakabayashi, H. Wakabayashi, M., Eisenreich, W., Engel, K.H., Stereochemical course of the generación of 3-mercapto hexanal and 3-mercaptohexanol by b-lyase catalysed cleavage of cysteine conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 110-116

Weber, B., Maas, B., Mosandl, A., [Stereoisomeric flavor compounds. 72. Stereoisomeric distribución of some chiral sulfur-containing trace components of yellow passionfruits.](#) *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 2438

Wein, M., Lewinsohn, E., Schwab, W., Metabolic fate of isotopes during the biological transformación of carbohydrates to 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 2427-2432

Werkhoff, P., Güntert, M., Krammer, G., Sommer, H., Kaulen, J. Vacuum headspace method in aroma research: flavor chemistry of yellow passionfruits. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1076-1093.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Mediante el desarrollo de este trabajo se estableció que en el aroma de la guayaba variedad regional roja existen 48 compuestos activos olfativamente, entre los cuales 9 fueron identificados por primera vez en el aroma de esta fruta. Con base en la cuantificación realizada por SIDA, los ensayos de recombinación y omisión, se estableció que los compuestos impacto de esta variedad son: el butanoato de etilo responsable de la nota frutal; hexanal y (*Z*)-3-hexenal responsables de la nota verde; metional responsable de la nota papa; acetato de 3-sulfanilhexilo y 3-sulfanil-1-hexanol responsables de las notas *grapefruit* y *black-currant*; 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(*2H*)-furanona, responsable de la nota dulce y acetato de cinamilo responsable de la nota floral.

Como parte de este trabajo, se realizó la síntesis estereoselectiva de los enantiómeros del acetato de 3-sulfanilhexilo y del 3-sulfanil-1-hexanol y de los cuatro diastereoisómeros del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo. Aunque no se percibieron diferencias olfativas entre los enantiómeros ni entre los diastereoisómeros del hidroxiester, se estableció que el valor umbral de olor fue semejante para los isómeros de 3-sulfanil-1-hexanol y en tanto que el valor umbral del acetato de (*3S*)-sulfanilhexilo fue 3 veces menor que el de su enantiómero, y los (*3S*)-hidroxiésteres fueron más potentes olfativamente. En la guayaba colombiana, la distribución enantiomérica del acetato de 3-sulfanilhexilo y del 3-sulfanil-1-hexanol en guayaba fue cercana al racemato y en cuanto al 2-hidroxi-3-metil pentanoato de metilo solo se detectaron los epimeros (*2R*, *3S*) y (*2S*, *3S*) en proporción 3:2.

Se comprobó que la formación de los aldehídos C₆, hexanal, (*Z*)-3-hexenal y (*E*)-2-hexenal, en guayaba depende del grado de disrupción celular y del tiempo que dure este proceso. Se sugiere que este fenómeno es provocado por la activación de reacciones enzimáticas relacionadas con la ruta de la lipoxigenasa.

El estudio del aroma de la guayaba colombiana variedad regional blanca, permitió establecer que en su aroma existen 34 compuestos activos olfativamente, de los cuales solo 7 presentaron FD mayores o iguales a 32. La cuantificación realizada por SIDA, los

ensayos de recombinación y de omisión permitieron establecer que en el aroma de esta variedad los compuestos impacto son: butanoato de etilo (frutal), (Z)-3-hexenal (verde), acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol (*grapefruit*) y 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (dulce-caramelo). El análisis AEDA comparativo permitió determinar que si bien los compuestos activos olfativamente en el aroma de la variedad blanca son los mismos determinados en la variedad roja, estos poseen FD menores comparados con los determinados en la variedad roja. Desde el punto de vista olfativo, el aroma de las dos variedades es indistinguible.

El seguimiento del aroma por HS-MEFS durante la maduración *in situ* de guayaba evidenció que los aldehídos C₆ disminuyen durante este proceso, en tanto que los ésteres acetato de hexilo y acetato de (Z)-3-hexenilo aumentan con la maduración.

El seguimiento del aroma de la guayaba durante la maduración poscosecha permitió establecer que el butanoato de etilo (frutal), (Z)-3-hexenal (verde), acetato de 3-sulfanilhexilo, 3-sulfanil-1-hexanol (*grapefruit*) y 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (dulce-caramelo) son componentes activos olfativamente durante este proceso y que su aporte al aroma determina las características olfativas de cada estado. El aporte olfativo de estos compuestos en los diferentes estados de maduración se presenta por primera vez.

Se recomienda evaluar la presencia de precursores cisteinilizados en el aroma de la guayaba en diferentes estados de maduración.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema del equipo para extracción de componentes volátiles por <i>headspace</i> .	5
Figura 1.2 Esquema del equipo para extracción por HS-MEFS.	6
Figura 1.3. Esquema del equipo para extracción de aroma asistida por solvente. (SAFE).	8
Figura 1.4 Espectro de masas (IE) de las pirazinas isoméricas: A. 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina y B. 3-metoxi-2,5-dimetilpirazina.	10
Figura 1.5 Esquema del sistema de análisis CHARM.	12
Figura 1.6 Análisis enantioselectivo de <i>trans</i> - α -ionona en jugo de frambuesa a. y b. artificiales y c. natural.	14
Figura 1.7 Cuantificación por SIDA de 2-furfuriltiol, 3-mercapto-2-pentanona y 2-metil-3-furantiol. a) Corriente total iónica; b-g) espectro de masas de los analitos y compuestos de referencia deuterados en modo SIM.	15
Figura 1.8 Perfil olfativo de duraznos frescos (--) y la mezcla recombinada (-).	18
Figura 1.9 Principales funciones azufradas determinadas como constituyentes de productos naturales.	20
Figura 1.10 Reacción de derivatización para extracción selectiva de tioles.	21
Figura 1.11 Vías de formación y transformación de tioles para la formación de diversos compuestos azufrados.	22
Figura 1.12 Posibles rutas de biogénesis de compuestos azufrados en vino. a. A partir de precursores conjugados S-cisteína y b. Por adición de H ₂ S sobre aldehídos.	24
Figura 1.13 Guayaba a. Regional Roja y b. Regional Blanca (<i>Psidium guajava</i> L.).	27
 Figura 2.1 Recolección y clasificación de frutos de guayaba regional roja y blanca.	 41
Figura 2.2 Diagrama de la síntesis de los cuatro isómeros de 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo.	46
Figura 2.3 Síntesis para la separación de enantiómeros (3 <i>R</i> /3 <i>S</i>)-sulfanil-1-hexanol y acetato de (3 <i>R</i> /3 <i>S</i>)-sulfanilhexilo.	48

- Figura 2.4** Diagrama de la síntesis de derivados de los acetatos (2*R*,3*S*) y (2*R*,3*R*)-2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo. **49**
- Figura 2.5** Esquema de la síntesis de [1,1-²H₂]-3-sulfanil-1-hexanol (29*d*) y [1,1-²H₂]-acetato de 3-sulfanilhexilo (26*d*). Síntesis de a. 3-(acetiltio)-hexanal; b. ácido 3-(acetiltio)-hexanoico; c. [1,1-²H₂]-3-sulfanil-1-hexanol y d. [1,1-²H₂]-acetato de 3-sulfanilhexilo. **51**
- Figura 2.6** Equipo SAFE (Solvent Assisted Flavor Extraction). **57**
- Figura 2.7** Diagrama del equipo CGMD-EM. **68**
-
- Figura 3.1** Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción FNB del aroma de la guayaba variedad regional roja. **76**
- Figura 3.2** Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción FA del aroma de la guayaba variedad regional roja **77**
- Figura 3.3** Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción de volátiles obtenida por *headspace* de guayaba regional roja. **79**
- Figura 3.4** Análisis por CGMD-EM de la FT del aroma de guayaba variedad regional roja. A. Columna FFAP; B. Columna DB-5. **83**
- Figura 3.5** Análisis cromatográfico de los derivados clorocamfenoicos de acetato de (3*S*) y (3*R*)-sulfanilhexilo. (Columna RP-18). A. Mezcla; B. enantiómero 3*R* (99,8%) y C. enantiómero 3*S* (99,3%) **85**
- Figura 3.6** Modelo de Helmchen para la determinación de la configuración de 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo. **86**
- Figura 3.7 A.** Espectro RMN ¹H (C₆D₆, 360MHz) de los derivados del acetato de (2*R*,3*S*) y (2*R*,3*R*)-2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo. **87**
- Figura 3.7 B.** Ampliación del espectro RMN ¹H (C₆D₆, 360MHz) de los acetatos (2*R*,3*S*) y (2*R*,3*R*)-2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo. **88**
- Figura 3.8** Espectros de masas del compuesto 16R A. Impacto electrónico y B. ionización química (isobutano). **93**
- Figura 3.9** Perfil cromatográfico de A. los cuatro esteroisómeros del 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo y B. de la fracción 15 del extracto de aroma de guayaba. **95**
- Figura 3.10** Curva de calibración para diferenciar entre ácido 2-metilbutanoico y ácido 3-metilbutanoico por iones fragmento. **96**

- Figura 3.11** Estructuras de los compuestos marcados isotópicamente usados como estándares internos en la cuantificación del aroma de guayaba regional roja. **99**
- Figura 3.12** Determinación del factor de respuesta (FR) del acetato de 3-sulfanilhexilo. **100**
- Figura 3.13** Intensidad de los fragmentos característicos de la IQ de a. [²H₅]-(*Z*)-3-hexenal y b. (*Z*)-3-hexenal para el análisis cuantitativo de (*Z*)-3-hexenal. **102**
- Figura 3.14** Intensidad de los fragmentos característicos de la IQ de a. [²H₂]-3-sulfanil-1-hexanol y b. 3-sulfanil-1-hexanol para el análisis cuantitativo de 3-sulfanil-1-hexanol **103**
- Figura 3.15** Perfil olfativo de la recombinación de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba regional roja en puré **107**
- Figura 3.16** Formación de (*Z*)-3-hexenal en A. puré y B. en cubos de guayaba. **108**
- Figura 3.17** Perfil olfativo de la recombinación de los compuestos activos olfativamente en el aroma de guayaba regional roja en cubos. **109**
- Figura 3.18** Ruta biogénica para la formación de aldehídos C₆ **110**
- Figura 3.19** Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción FNB del aroma de la guayaba variedad regional blanca. **118**
- Figura 3.20** Análisis cromatográfico y resultados del AEDA de la fracción FA del aroma de la guayaba variedad regional blanca. **119**
- Figura 3.21** Perfil del aroma de cubos de guayaba blanca en comparación con la solución recombinada y cubos de guayaba roja. **123**
- Figura 3.22** Perfil olfativo por estados de madurez *in situ* (Ii, Iii, IIIi) de: A. Guayaba Regional Roja y B. Guayaba Regional Blanca. **128**
- Figura 3.23** Perfiles cromatográficos HS-MEFS para tres estados de maduración en A. guayaba regional roja y B. guayaba regional blanca. **129**
- Figura 3.24** Perfil olfativo de los diferentes estados de maduración poscosecha de guayaba A. Regional Roja y B. Regional Blanca. **131**

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Valores umbral de ciertos compuestos volátiles en agua y en aire.	2
Tabla 1.2 OAV de algunos componentes volátiles del aroma de tomate.	16
Tabla 1.3 Diferencias morfológicas y composicionales de diferentes variedades de guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.).	26
Tabla 1.4. Resumen de los estudios publicados sobre el aroma de guayaba (<i>Psidium guajava</i>).	29
Tabla 2.1 Características físico-químicas de las frutas de guayaba en diferentes estados de madurez.	42
Tabla 3.1 Datos de RMN ¹ H (C ₆ D ₆ , 360 MHz) para enantiómeros de los acetatos de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>) y (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-fenilpropanoil-3-sulfanilhexilo.	89
Tabla 3.2 Parámetros cromatográficos y descripción olfativa de los enantiómeros de 3-sulfanil-1-hexanol y acetato de 3-sulfanilhexilo.	90
Tabla 3.3 Distribución enantiomérica de compuestos azufrados presentes en el aroma de la guayaba regional roja.	91
Tabla 3.4 Datos cromatográficos y descripción olfativa de los cuatro isómeros de 2-hidroxi-3-metilpentanoato de metilo.	94
Tabla 3.5 Componentes activos olfativamente en el aroma de la guayaba regional roja.	97
Tabla 3.6 Parámetros cromatográficos, espectrales y FR de los compuestos marcados isotópicamente utilizados en la cuantificación del componentes activos olfativamente del aroma de guayaba regional roja.	101
Tabla 3.7 Resultados del análisis cuantitativo de los compuestos de mayor actividad olfativa en el aroma de la guayaba regional roja.	105
Tabla 3.8 Concentración y OAVs de los aldehídos C ₆ según el procesamiento de la guayaba regional roja.	108
Tabla 3.9 Resultados de los ensayos de omisión aplicados a la recombinación de aroma de la guayaba regional roja.	111

Tabla 3.10 Cuantificación de los compuestos activos olfativamente de la guayaba en el aroma del bocadillo.	113
Tabla 3.11 Compuestos activos olfativamente del aroma de la guayaba regional blanca.	120
Tabla 3.12 Resultados del análisis cuantitativo de los compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.) regional blanca.	122
Tabla 3.13 Ensayos de omisión en el aroma de guayaba regional blanca.	124
Tabla 3.14 Distribución porcentual de los compuestos detectados por HS-MEFS en diferentes estados de maduración de guayaba regional roja y blanca.	129
Tabla 3.15 Análisis por AEDA comparativo de guayaba regional roja y blanca en diferentes estados de maduración poscosecha.	132
Tabla 3.16 Análisis cuantitativo por SIDA de compuestos activos olfativamente en el aroma de la guayaba roja y blanca por estado de madurez.	134
Tabla 3.17 OAV para los compuestos activos olfativamente en el aroma de guayaba roja y blanca por estado de madurez.	136

ANEXO 1
EVALUACION SENSORIAL

A. Perfil olfativo

PERFIL OLFATIVO
GUAYABA REGIONAL ROJA O BLANCA

NOMBRE _____

FECHA _____

Califique de 0 a 3 la sensación olfativa percibida para cada una de las notas indicadas.

FRUTAL	_____			
	0	1	2	3
VERDE	_____			
	0	1	2	3
DULCE	_____			
	0	1	2	3
FRESCO	_____			
	0	1	2	3
GRAPEFRUIT	_____			
	0	1	2	3
FLORAL	_____			
	0	1	2	3
METALICO	_____			
	0	1	2	3
ESPECIADO	_____			
	0	1	2	3

B. Prueba triangular**PRUEBA TRIANGULAR
GUAYABA REGIONAL ROJA O BLANCA**

NOMBRE _____

FECHA _____

En las soluciones presentadas hay dos soluciones producto de la recombinación completa del aroma de la guayaba (roja o blanca) y una en la cual se ha omitido un compuesto. En cualquier caso que usted detecte una diferencia entre las soluciones presentadas por favor marque con una X el número de la solución con percepción olfativa diferente.

897	480	886
-----	-----	-----

Gracias!

PRODUCCION CIENTIFICA

Artículos

Steinhaus, M., Sinuco, D., Polster, J., Osorio, C., Schieberle, P., Characterization of the Aroma Active Compounds in Pink Guava (*Psidium guajava* L.) by Application of the Aroma Extract Dilution Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 4120-4127

Steinhaus, M., Sinuco, D., Polster, J., Osorio, C., Schieberle, P. Characterization of the Key Aroma Compounds in Pink Guava (*Psidium guajava* L.) by Means Aroma Re-engineering Experiments and Omission Tests. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 2882-2888

Sinuco, D., Steinhaus, M. Osorio, C., Schieberle, P. Characterization of odour-active compounds in two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during ripening. *Eur. Food Res. Int.*, **Submitted**

Congresos

Sinuco, D., Osorio, C., Solarte, M., Melgarejo, L.M., Evaluation of antioxidant activity, chemical and sensorial changes in two varieties of Colombian guava (*Psidium guajava* L.) during their ripening. 236th ACS National Meeting and Exposition, Philadelphia, USA, Agosto-2008

D.C. Sinuco, M. Steinhaus, C. Osorio, P. Schieberle. Characterization of the key aroma compounds in Colombian white guavas (*Psidium guajava* L.). International Flavor Conference, George Charambolous Memorial, Skiathos, Grecia, Mayo- 2009

M. Steinhaus, D.C. Sinuco, J. Polster, C. Osorio, P. Schieberle. The aroma of guavas. Key aroma compounds and influence of tissue disruption. International Flavor Conference, George Charambolous Memorial, Skiathos, Grecia, Mayo- 2009