

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y
AGROAMBIENTAL**



**“caracterización fisicoquímica de un cultivar de serbal tipo manzana
en 4 estados de maduración”**



TRABAJO FIN DE GRADO

JUNIO-2019

Autor: Rafael Almagro Martínez

Tutoras: María Asunción Amorós Marco

María Soledad Almansa Pascual de Riquelme



Escuela Politécnica Superior de Orihuela
Universidad Miguel Hernández



Caracterización fisicoquímica de un cultivar tipo manzana de serbal en 4 estados de maduración

Physicochemical characterization of an apple-type rowan crop in 4 stages of maturation

RESUMEN

El serbal (*Sorbus domestica* L.) es uno de los frutales menos conocidos y cultivados de la actualidad. Desde la antigüedad ha sido cultivado por sus múltiples aptitudes a nivel ambiental y paisajístico. Sus frutos han sido empleados con fines medicinales y nutritivos debido a sus altas concentraciones de compuestos antioxidantes. En este trabajo se abordará la evolución de distintos parámetros físicos, químicos y funcionales a lo largo de la maduración del fruto tipo manzana procedente de la sierra de Serón (Almería). En España este cultivo tiene un escaso nivel de interés puesto que su finalidad actual es ornamental o el autoconsumo. Los frutos estudiados presentan mayores cantidades de compuestos antioxidantes que los pertenecientes a otros países mediterráneos como Turquía, aunque estos últimos presenten mayores pesos medios. La elevada astringencia durante los primeros estados de maduración del fruto lo hace difícilmente comestible, coincidiendo con su mayor capacidad antioxidante y contenido en azúcares.

ABSTRACT

The rowanberry (*Sorbus domestica* L.) is one of the less known and cultivated fruit trees of the present time. Since ancient times it has been cultivated for its multiple environmental and landscape skills. Its fruits have been used for medicinal and nutritious purposes due to its high concentrations of antioxidant compounds. In this work, the evolution of different physical, chemical and functional parameters along the ripening of the apple-type fruit from the Sierra de Serón (Almería) will be addressed. In Spain this crop has a low level of interest since its current purpose is ornamental or self-consumption. The studied fruits present higher amounts of antioxidant compounds than those belonging to other Mediterranean countries such as Turkey, although the latter present higher average weights. The high astringency during the first stages of fruit ripening makes it hardly edible, coinciding with its greater antioxidant capacity and sugar content.

Palabras clave: Serbal, antioxidantes, propiedades funcionales, astringencia, fenoles.

Keywords: True service tree, antioxidants, functional properties, astringency, phenols.

AGRADECIMIENTOS

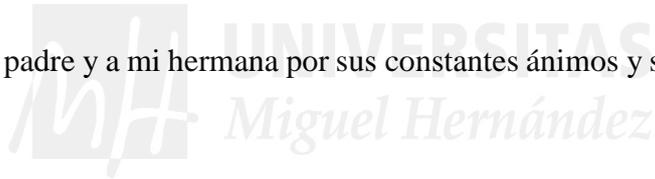
Quisiera agradecer al departamento de Biología Aplicada de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela y sobre todo a mis tutoras M^a Asunción Amorós Marco y M^a Soledad Almansa Pascual de Riquelme por todo su conocimiento aportado y la oportunidad que me dieron para realizar este trabajo.

A mi compañero Joaquín Solano Jiménez por su inestimable compañía durante estos meses de trabajo.

A mi amigo Sergio Ibáñez López por sus consejos y su constante ayuda cada vez que la he necesitado.

A Laura por aguantar todos mis altibajos y por toda la ayuda que me ha prestado.

A mi madre, a mi padre y a mi hermana por sus constantes ánimos y su confianza durante todo este tiempo.





Escuela Politécnica Superior de Orihuela
Universidad Miguel Hernández



ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	9
1.1	ORIGEN Y SISTEMÁTICA	9
1.2	ESPECIE DE CULTIVO MENOR	9
1.3	DESCRIPCIÓN DE <i>SORBUS DOMESTICA</i> L	10
1.4	IMPORTANCIA ECONÓMICA	13
1.5	PROPIEDADES ANTIOXIDANTES	13
1.6	USOS MEDICINALES	14
2	OBJETIVOS	16
3	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1	MATERIAL VEGETAL	18
3.2	DISEÑO EXPERIMENTAL	19
3.3	MEDIDAS NO DESTRUCTIVAS. PARÁMETROS FÍSICOS.	21
3.3.1	DETERMINACIÓN DEL PESO	21
3.3.2	DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO Y LONGITUD	21
3.3.3	DETERMINACIÓN DEL COLOR	22
3.3.4	DETERMINACIÓN DE LA FIRMEZA	23
3.4	MEDIDAS DESTRUCTIVAS. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE PARÁMETROS QUÍMICOS	25
3.4.1	SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES	25
3.4.2	ACIDEZ Y pH	26
3.4.3	ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES	27
3.4.4	PROTEÍNAS	29
3.5	MEDIDAS DESTRUCTIVAS. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE PARÁMETROS FUNCIONALES.	31
3.5.1	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO	31
3.5.2	FENOLES TOTALES	32
3.5.3	FLAVONOIDES TOTALES	33
3.5.4	FLAVONOLES TOTALES	33
3.5.5	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL HIDROSOLOUBLE Y LIPOSOLUBLE	34
3.5.6	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL POR LOS MÉTODOS ABTS, FRAP Y DPPH	35
3.5.7	CAROTENOIDES	36
3.5.8	CLOROFILAS	36
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1	EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS	39

4.1.1	EVOLUCIÓN DEL PESO.....	39
4.1.2	EVOLUCIÓN DEL DIÁMETRO.....	40
4.1.3	EVOLUCIÓN DE LA LONGITUD	41
4.1.4	EVOLUCIÓN DE LA FIRMEZA	42
4.1.5	EVOLUCIÓN DEL COLOR	43
4.2	EVOLUCIÓN PARÁMETROS QUÍMICOS.....	46
4.2.1	EVOLUCIÓN DE LOS SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES	46
4.2.2	EVOLUCIÓN DE LA ACIDEZ Y pH	47
4.2.3	EVOLUCIÓN DE AZÚCARES.....	48
4.2.4	EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	49
4.2.5	EVOLUCIÓN DE PROTEÍNAS	50
4.3	EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS FUNCIONALES	51
4.3.1	EVOLUCIÓN DE FENOLES, FLAVONOIDES Y FLAVONOLES TOTALES.....	51
4.3.2	EVOLUCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (FRACCIÓN HIDRO Y LIPOSOLUBLE).....	54
4.3.3	EVOLUCIÓN AAT POR MÉTODOS ABTS, DPPH Y FRAP	55
4.3.4	EVOLUCIÓN DE CAROTENOIDES	57
4.3.5	EVOLUCIÓN DE CLOROFILAS	58
5	CONCLUSIONES.....	60
6	BIBLIOGRAFÍA.....	62
	ANEXO 1 (Tablas de resultados).....	66



Escuela Politécnica Superior de Orihuela
Universidad Miguel Hernández



INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ORIGEN Y SISTEMÁTICA

El serbal se considera originario de la Europa mediterránea (incluido islas), sur de Rusia, norte de África (Argelia y Túnez) y mitad norte de Asia menor (Oria de Rueda et al., 2006). En España se puede encontrar a lo largo de su mitad oriental (Cataluña, Aragón, montañas levantinas, Islas Baleares, Sierras Béticas) y en menor proporción en zonas como Castilla y León, La Rioja y Álava.

El serbal común o jerbo (Ilustración 1) pertenece al género *Sorbus* que comprende entre 100-250 especies de árboles y arbustos (Olszewska & Michel 2009).

La clasificación sistemática del serbal común según Trópicos (2019) es la siguiente:

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Rosanae Takht.
- Orden: Rosales Bercht. & J. Presl
- Familia: Rosaceae Juss.
- Género: *Sorbus* L.
- Especie: *Sorbus domestica* L.
- Nombre común: Serbal común, jerbo.

1.2 ESPECIE DE CULTIVO MENOR

La mayoría de las especies de este género han sido empleadas como plantas ornamentales. Tan solo unas pocas han sido escogidas por el valor de sus frutos (Miko y Gazo, 2004), entre las que se puede encontrar el serbal.

En España no despierta un gran interés a nivel agronómico ya que está distribuido en zonas muy puntuales y su aplicación actual es ornamental. Al contrario que en otros países como Serbia, Croacia o República Checa en los que esta especie está, de forma general, más aprovechada. Esto se debe a que han profundizado en estudios sobre su valor nutricional y propiedades funcionales.



Ilustración 1: Ejemplar de *Sorbus domestica* L.

1.3 DESCRIPCIÓN DE *SORBUS DOMESTICA* L

El serbal es una especie de gran interés a nivel forestal, ecológico y paisajístico. Crece de forma natural en los montes por los márgenes y claros de bosques xerófilos, esclerófilos y subesclerófilos mediterráneos, en matorrales de encina, alcornoques y otras especies de *Quercus* (Oria de Rueda et al., 2006).

De naturaleza longeva, puede vivir desde 150 a 200 años de vida pudiendo alcanzar los 400 años. El serbal se comporta con cierta tendencia termófila, propio de zonas bajas y medias, desde 300 hasta 1200 metros de altitud (Oria de Rueda et al., 2006). Su carácter termófilo le permite soportar tanto el calor y sequías fuertes como el frío (hasta -25°C).

Es una especie frugal con diferencia, la más austera dentro de las de su género. Una prueba de ello se puede observar en ciertos bancales abandonados de Alicante, Murcia y Almería (las regiones más áridas de España), en donde los jerbos perviven mejor que especies tan resistentes a la sequía como olivos, algarrobos, o vides cuando dejan de

recibir las labores y riegos esporádicos que la agricultura tradicional les brindaba (Oria de Rueda et al., 2006).

Las dos variedades principales, el jerbo “pomal” o serbal-manzano y el jerbo “pero” o serbal-peral que habitan en España se dividen a su vez en numerosas formas o sub-razas. Existen tanto variedades de maduración en agosto y septiembre como en octubre (agosteñas, septembrinas y octubreñas). En efecto, existen no solamente las variedades citadas, sino multitud de razas locales propias de cada región, de gran valor desde el punto de vista de la diversidad genética de la especie. Esto hace que en las repoblaciones artificiales sea importante utilizar estirpes propias de la zona, más adaptadas a los climas y suelos locales, así como el emplear la reproducción por semilla para mantener dicha diversidad genética.

En cuanto a la morfología de sus estructuras vegetativas y reproductivas se puede observar:

- Yemas viscosas
- Hoja con 11 a 21 folíolos no dentados en su porción inferior (Ilustración 2)
- Corteza resquebrajada



Ilustración 2: Muestra de hojas de *Sorbus domestica* L.

- Flores en inflorescencia de 15 a 18 mm de anchura con 5 pétalos de color blanco/crema. Posee 5 estilos.

- Frutos de 2 a 4 cm. Pomo de gusto astringente que madura por fermentación enzimática adquiriendo un color marrón con agradable sabor. No tiene una morfología concreta, se han observado distintos cultivares de diferentes formas y tamaños (Ilustración 3).

El árbol, según Oria de Rueda et al. (2006), alcanza la madurez reproductiva entre los 10-15 años llegando a su producción máxima a los 20 años, aunque ésta no es muy homogénea debido a su carácter vecero.



Ilustración 3: Frutos tipo manzana de *Sorbus domestica* L.

1.4 IMPORTANCIA ECONÓMICA

Siendo cultivado desde la antigüedad principalmente como planta medicinal, su fruta jugaba un papel importante en los inviernos debido a su valioso nivel de vitaminas y azúcares naturales (Piagniani et al., 2012).

Otra característica importante del serbal es el valor de su madera, cuyo destino actual es la producción de muebles y herramientas de construcción (Miletic y Paunovic 2012).

Despierta un gran interés en Europa central para la producción de sidra siendo así también en España, aunque en menor proporción (Oria de Rueda et al., 2006).

Respecto a otros frutos que se producen en la actualidad, el serbal es pequeño y solamente es comestible una vez llegada una avanzada madurez, algo que no es muy apreciado por los consumidores (Piagniani et al., 2012).

1.5 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes naturales, como las vitaminas y los polifenoles, se encuentran de forma casi exclusiva en frutas y hortalizas, siendo este uno de los motivos por los que se recomienda su consumo diario en nuestra dieta.

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, pero cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos.

El consumo de frutas con una alta composición antioxidante se ha asociado con una menor incidencia de enfermedades degenerativas, como cáncer, enfermedades cardíacas, inflamación, artritis, deterioro del sistema inmunológico, disfunción cerebral y cataratas.

Los principales antioxidantes que se encuentran en la fruta son los compuestos fenólicos, el ascorbato y los carotenoides. Además de los ácidos fenólicos y sus derivados, las frutas siempre contienen miembros de uno o más grupos de flavonoides, como las flavonas/flavonoles glicosiladas, flavanonas, antocianinas, proantocianidinas, como los componentes fenólicos principales (Egea et al., 2010).

El fruto del serbal es rico en antioxidantes, hecho que parece estar correlacionado con su alto contenido en fenoles totales. Los frutos amarillos inmaduros, junto con la

pulpa del fruto, presentaron los niveles de antioxidantes más altos, mientras que los frutos marrones bien maduros presentaron niveles de antioxidantes más débiles (Termentzi et al., 2006). Termentzi et al. (2008) han aislado e identificado 62 compuestos fenólicos diferentes en los frutos de serbal, siendo diferentes en los distintos estados de madurez del fruto.

1.6 USOS MEDICINALES

Los frutos del serbal son consumidos en muchas poblaciones locales de Europa como suplemento vegetal para pacientes con diabetes mellitus. Este uso está apoyado en la creencia de que el consumo sistemático del fruto es capaz de aminorar y retrasar las complicaciones derivadas de la diabetes como neuropatía periférica, nefropatía, retinopatía, cataratas, etc. (Termentzi et al. 2008)

En Almería se consumen secos en infusiones contra el resfriado. El fruto seco y triturado en polvo es usado también en la medicina tradicional contra la diarrea para lo que pueden tomarse en mitades y secados al sol.

Brindza et al. (2016) publican que este fruto tiene propiedades astringentes, antiinflamatorias y aliviadoras del dolor y que también se puede usar en la producción de cosméticos. Estos frutos también son diuréticos, antirreumáticos y antipiréticos (Brindza et al., 2016).

El consumo de estos frutos regenera el régimen normal de los intestinos (Termentzi et al., 2008).



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización morfológica y bioquímica del fruto del serbal tipo manzana, en cuatro distintos estados de maduración, procedentes del municipio de Serón (Almería) para poder conocer si pueden llegar a tener interés a nivel alimentario.

Para la caracterización se han determinado parámetros físicos (peso, longitud, diámetro, color y firmeza), químicos (acidez, sólidos solubles, ácidos orgánicos y azúcares, pH y proteínas) y funcionales (fenoles totales, flavonoides totales, flavonoles totales, actividad antioxidante total a partir de la fracción hidro y liposoluble, y por los métodos ABTS, FRAP y DPPH, carotenoides y clorofilas).



MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal empleado es procedente de Almería, más concretamente, de la sierra del municipio de Serón (ubicado a 822 metros sobre el nivel del mar).

Para el estudio se seleccionaron 2 árboles cuyos frutos se distinguían por su forma de manzana nombrándolos como: Árbol 1 y Árbol 2.

Fueron clasificados en distintos estados de madurez en base al color del fruto siguiendo este criterio como se puede observar en la ilustración 4:

- Estado de maduración 1: Color verde
- Estado de maduración 2: Color verde-rojo
- Estado de maduración 3: Color amarillo-marrón
- Estado de maduración 4: Color marrón



Ilustración 4: Clasificación de los frutos de *Sorbus domestica* L. en función de su estado de maduración

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El día 24 de octubre de 2018 se procedió a la recogida del material en la sierra de Serón donde fueron transportados al laboratorio del departamento de Biología Aplicada de la EPSO (UMH).

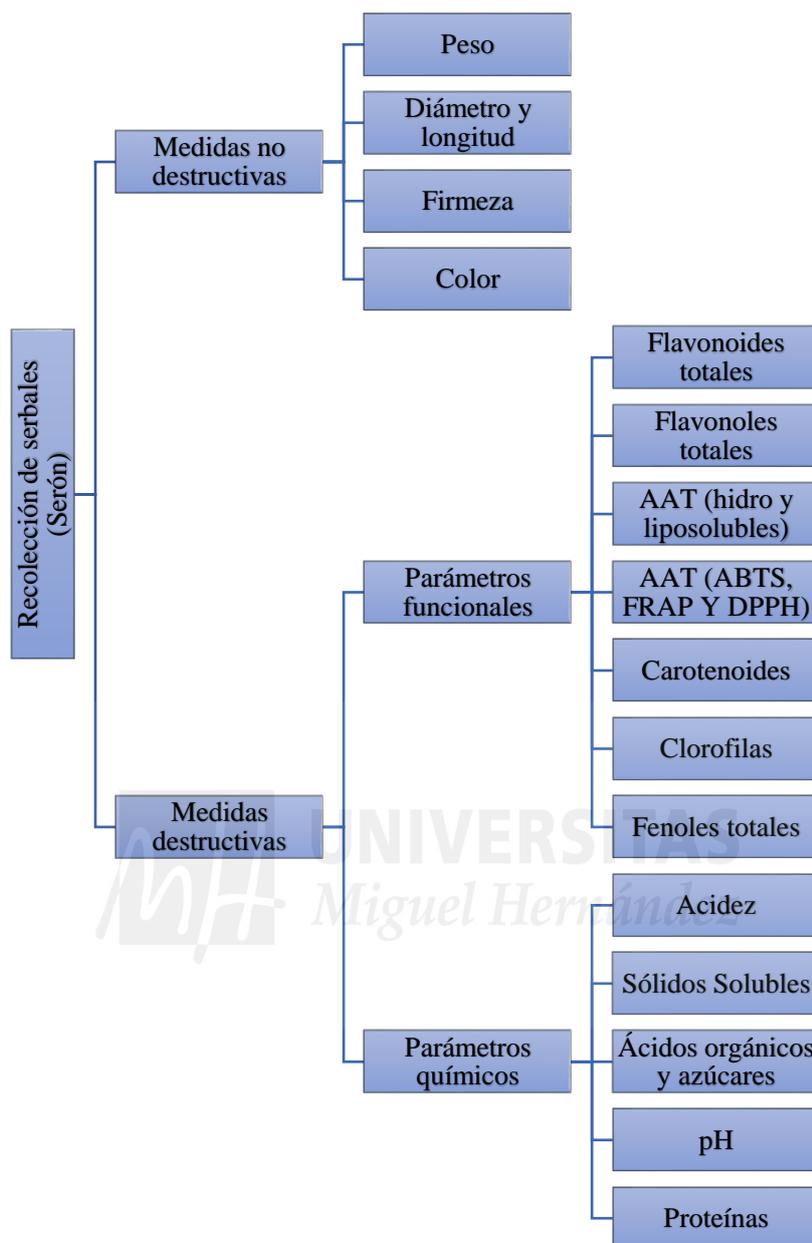
Tras la llegada al laboratorio comenzó la clasificación de los frutos en sus distintos estados de madurez, de los cuales se escogieron 10 frutos por cada estado de desarrollo para realizarle las distintas pruebas físicas. Posteriormente se realizaron las pruebas químicas (acidez, pH y sólidos solubles totales).

Una vez finalizadas la clasificación y las pruebas físicas y químicas, los serbales (en cada uno de sus distintos estados de madurez) se conservaron en un congelador a -81°C para posteriores medidas a realizar en este estudio.

Más adelante se realizó la liofilización y trituración de los frutos con el fin de poder realizar las medidas bioquímicas correspondientes y mejorar la conservación de las muestras.



A continuación, un esquema del plan experimental realizado:



3.3 MEDIDAS NO DESTRUCTIVAS. PARÁMETROS FÍSICOS.

3.3.1 DETERMINACIÓN DEL PESO

Para la determinación del peso de los serbales se utilizó una balanza analítica de precisión Startorius Basic modelo B-120S (Ilustración 5). Las medidas obtenidas se expresaron en gramos (g) y se expresó como la media \pm E.S. de las 20 medidas realizadas por muestra (10 por cada estado de madurez y árbol).



Ilustración 5: Balanza analítica de precisión Startorius Basic modelo B-120S

3.3.2 DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO Y LONGITUD

La longitud y el diámetro se midieron con un calibre electrónico digital de 150 milímetros modelo TESA-DIGIT-CAL (Ilustración 6). Se escogieron 10 frutos por cada estado de maduración y cada árbol y se obtuvo una media de éstos. Las medidas obtenidas se expresaron en milímetros (mm) y se expresó como la media \pm E.S. de las 20 medidas realizadas por muestra.



Ilustración 6: Calibre electrónico digital de 150 milímetros modelo TESA-DIGIT-CAL

3.3.3 DETERMINACIÓN DEL COLOR

La determinación del color de los frutos fue llevada a cabo mediante un colorímetro triestímulo (MINOLTA modelo CR_300). El colorímetro (Ilustración 7) emite una luz constante sobre el fruto formando un ángulo de 45°. Esta luz es reflejada verticalmente pasando a través de los filtros y la fotocélula para obtener los distintos valores de L^* , a^* y b^* .

A cada uno de los 10 frutos de cada estado de maduración y árbol se le aplicaban 3 mediciones o “disparos” los cuales eran realizados en una parte distinta del fruto para obtener una medida homogénea.



Ilustración 7: Colorímetro triestímulo MINOLTA modelo CR_300

El colorímetro utiliza el sistema CIELab (Ilustración 8) donde el parámetro L^* muestra la luminosidad del fruto desde el valor 0 (negro) hasta 100 (blanco) y los parámetros a^* y b^* muestran la cromaticidad del fruto. En el eje X se representa el parámetro a^* desde colores verdes (valores negativos de a^*) hasta colores rojos (valores positivos de a^*). Mientras que el parámetro b^* es representado en el eje Z de coordenadas obteniendo valores positivos si se trata del color amarillo y valor negativo si es próximo al azul.

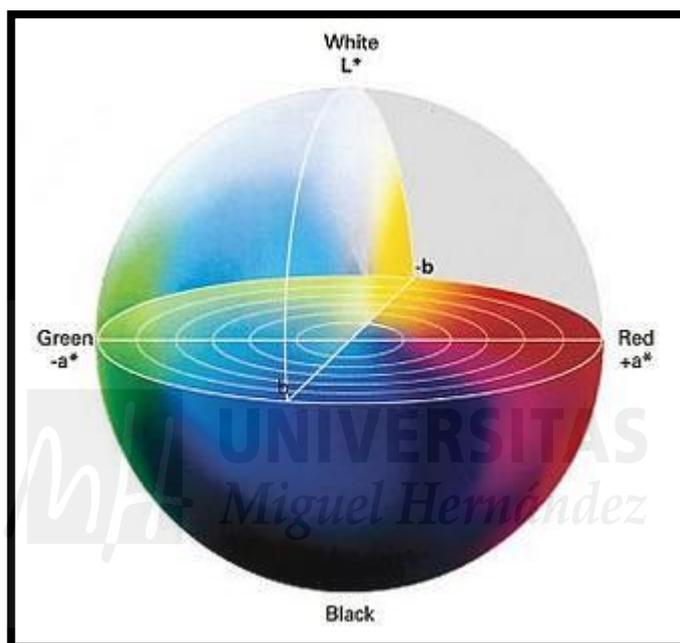


Ilustración 8: Sistema CIELab para el reconocimiento de colores

3.3.4 DETERMINACIÓN DE LA FIRMEZA

Para la determinación de la firmeza de los frutos se empleó el texturómetro TA-XTplus Texture Analyser de Stable Micro Systems (Ilustración 9). A su vez, está conectado a un ordenador cuyo software “Exponent” es capaz de leer los datos procedentes del texturómetro.

La prueba se realizó con muestra almacenada en frigorífico a 4°C después de las determinaciones explicadas anteriormente.

A través de un esfuerzo de compresión, la sonda P100 conectada al aparato descendía hacia el plato de compresión a una velocidad de 1mm/seg hasta que el fruto

contrapuso una fuerza de 15 g. Una vez que estaban en contacto, el texturómetro ejercía una velocidad de ensayo de 2 mm/seg hasta producirle una deformación del 4%. Realizada la compresión, la velocidad de la sonda de vuelta a su posición inicial era de 10 mm/s.

Finalizado el ensayo, el software interpretaba los datos y proporcionaba los resultados en Newtons. Las medidas se realizaron sobre 6 frutos de cada estado y cada árbol, siendo expresados los resultados como la media \pm E.S. de 12 medidas.



Ilustración 9: Texturómetro TA-XTplus Texture Analyser de Stable Micro Systems

3.4 MEDIDAS DESTRUCTIVAS. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE PARÁMETROS QUÍMICOS

3.4.1 SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES

Una de las propiedades que tienen los zumos con contenidos en azúcares es la capacidad de desviar la luz por medio de la refracción. Mediante esta propiedad podemos conocer la cantidad de sólidos solubles totales presentes en el zumo del fruto.

Para obtener este parámetro, se utilizó un refractómetro de bolsillo ATAGO (Ilustración 11). Se trituró 1 gramo de muestra fresca junto con 5 mL de agua destilada en el polytrón IKA T10 basic ULTRA-TURRAX a 30000 r.p.m. (Ilustración 10). Del triturado, se colocó una gota en el refractómetro calibrado con agua destilada. La medida se obtenía en Grados Brix (°).



Ilustración 11: Refractómetro de bolsillo ATAGO



Ilustración 10: polytrón IKA T10 basic ULTRA-TURRAX

3.4.2 ACIDEZ Y pH

Las determinaciones de pH y acidez se llevaron a cabo mediante un valorador potenciométrico Tetralab AT1000 series (Ilustración 12) provisto de un electrodo de pH, pudiendo así, realizar ambas medidas. Para valorar la acidez el aparato añadía la cantidad necesaria, de forma automática, de reactivo (en este caso NaOH 0.1 M) hasta alcanzar un pH final de 8.2.

Conforme se realizaba la medida de acidez, el valorador proporcionaba el pH inicial de la muestra, por lo que se obtenían los valores de ambos parámetros a la vez.

Esta prueba se realizó con frutos en fresco, de tal modo que por cada árbol y cada estado de maduración se escogieron 3 muestras. Cada fruto era troceado hasta obtener 1 gramo de peso fresco a los que se adicionaron 5 mL de agua destilada en un tubo de ensayo y se le aplicaron 2 minutos de politrón a 24000 r.p.m. para triturar la mezcla.

Una vez finalizado el triturado, se aplicaron 20 mL de agua destilada y se realizó la medida en el valorador. El resultado de la acidez se obtenía en gramos de ácido málico/100 gramos de muestra.



Ilustración 12: Valorador potenciométrico Tetralab AT1000 series

3.4.3 ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES

3.4.3.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

La realización del extracto se llevó a cabo por el siguiente método: 0,4 gramos de fruto liofilizado fueron mezclados con 5 mL de tampón fosfato pH= 7,8. Se aplicó 20 minutos de sonicador y se dejó reposar en frigorífico durante 24 horas. Tras el reposo se repitieron otros 20 minutos en el sonicador para más tarde centrifugar en la centrífuga P Selecta Medifriger (Ilustración 13) a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante utilizando jeringuilla y filtro. Se congeló cada muestra a -80°C para su posterior análisis.



Ilustración 13: Centrífuga P Selecta Medifriger

3.4.3.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES

La determinación de ácidos orgánicos y azúcares se realizó según Serrano et al. (2005). Se realizó mediante una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando los extractos previamente descritos.

Se empleó el cromatógrafo líquido de alta presión HEWLETT-PACKARD serie 1100 (Ilustración 14) que contiene un detector visible ultravioleta para medir los ácidos orgánicos y un detector de índice de refracción que detecta los azúcares.



Ilustración 14: Cromatógrafo líquido de alta presión HEWLETT-PACKARD serie 1100

Fueron medidos los patrones puros de cada ácido y azúcar para su posterior reconocimiento en el análisis. Los ácidos orgánicos y azúcares fueron separados en una columna SUPERCOGEL C-610H.

La fase móvil empleada fue ácido fosfórico al 0,1% con un flujo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Esta fase móvil recorre la columna y circula por los distintos módulos que contiene el cromatógrafo (contenedor, desgasificador, muestreador automático, termostatizador...). Finalmente se cuantificó los ácidos orgánicos con el detector visible ultravioleta a 210 nm de longitud de onda y los azúcares con el detector de índice de refracción.

Los resultados se interpretaron comparándolos con las áreas pico pertenecientes a los patrones puros empleados. Se expresaron en gramos por cada 100 gramos de peso seco.

3.4.4 PROTEÍNAS

3.4.4.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

El extracto empleado para la determinación de las proteínas es el mismo que el empleado para los ácidos orgánicos y azúcares.

3.4.4.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES

Para realizar la medición de proteínas en los frutos se empleó el procedimiento descrito por Bradford (1976) utilizando, como patrón de calibración, albúmina de suero bovino (BSA).

El ensayo colorimétrico simple de proteínas Bio-Rad fue el escogido para realizar las medidas de concentración de proteínas totales. Éste se basa en el cambio de color de rojo a azul debido al colorante azul brillante de Coomassie G-250 que se une a restos de aminoácidos (Bradford, 1976) permitiendo detectar pequeñas concentraciones de proteínas.

La determinación consistió en descongelar los extractos preparados previamente y, sobre tubos de ensayo, se realizó la mezcla: 50 μ L de muestra + 750 μ L de tampón tris-acetato 50 mM a pH 6 + 200 μ L de reactivo Bio-Rad. Se agitó la mezcla con el agitador vortex (Ilustración 15). Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5-60 minutos y se midió con el espectrofotómetro Thermospectronic Helios α (Ilustración 16) a una absorbancia de 595 nm ¹.



Ilustración 15: Agitador vortex

¹ No se deben superar 60 minutos desde la adición del reactivo Bio-Rad



Ilustración 16: Espectrofotómetro ThermoFisher Helios α

3.5 MEDIDAS DESTRUCTIVAS. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE PARÁMETROS FUNCIONALES.

Para la determinación de los parámetros funcionales se comenzó a utilizar el liofilizado del fruto que se encontraba congelado y conservado a -80°C .

3.5.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO

Se realizó un extracto metanólico mediante la preparación de metanol (MeOH)/agua (80/20% v/v) que contenía 0,0084 g de fluoruro sódico (FNa) + 20 mL de agua destilada + 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) + 80 mL de metanol. Se mezclaron 0,3 g de muestra de liofilizado por 6 mL de metanol (80%) y se homogenizó durante dos minutos en el politrón a 24000 r.p.m. Se mantuvo durante 15 minutos en el sonicador ULTRASONIC CLEAMER de TQTECH (Ilustración 17).

Seguidamente se llevó a la centrífuga durante 15 minutos a 4000 r.p.m. a 4°C y se recogió el sobrenadante sobre tubos eppendorf. La muestra se almacenó en el congelador a -80°C para posteriores análisis.

Este extracto se utilizó para las pruebas de fenoles totales, flavonoides, flavonoles y para la fracción hidrosoluble de la prueba de actividad antioxidante total.



Ilustración 17: Sonicador ULTRASONIC CLEAMER de TQTECH

3.5.2 FENOLES TOTALES

El método empleado para la determinación de fenoles totales fue el método por espectrofotometría desarrollado por Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999).

Una vez escogidas las muestras y preparado el extracto se inició la determinación de los fenoles totales mediante el siguiente procedimiento: sobre un tubo de ensayo de 10 mL se incorporó 2,5 mL de Folin al 10% + 50 μ L de muestra + 450 μ L de tampón Tris-acetato y se agitó durante 3 minutos en el agitador vórtex. Seguidamente, se aplicó a la mezcla 2,5 mL de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) a 75 g/L o 7,5% (p/v) y se agitó de nuevo durante 10 segundos. Los tubos se llevaron al baño María en el baño Termofin J.P. SELECTA (Ilustración 18) a 55°C durante 5 minutos. Durante este proceso, se produce reacción entre los distintos componentes cambiando a un color azul oscuro.



Ilustración 18: Baño de agua
Termofin J.P. SELECTA

Esta mezcla fue llevada a un vial de 2,5 mL donde el espectrofotómetro midió la absorbancia a 760nm de longitud de onda.

Las medidas de absorbancia de cada muestra se llevaron a una recta de calibrado construida a partir de medidas de absorbancia de distintas concentraciones de ácido gálico 1 mM a 760 nm (Figura 1). Este ácido se emplea como patrón de fenoles totales. Los resultados finales se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de peso seco, siendo éstos la media \pm error estándar (E.S.) de 3 mediciones por muestra y 2 repeticiones de cada muestra (n=6).

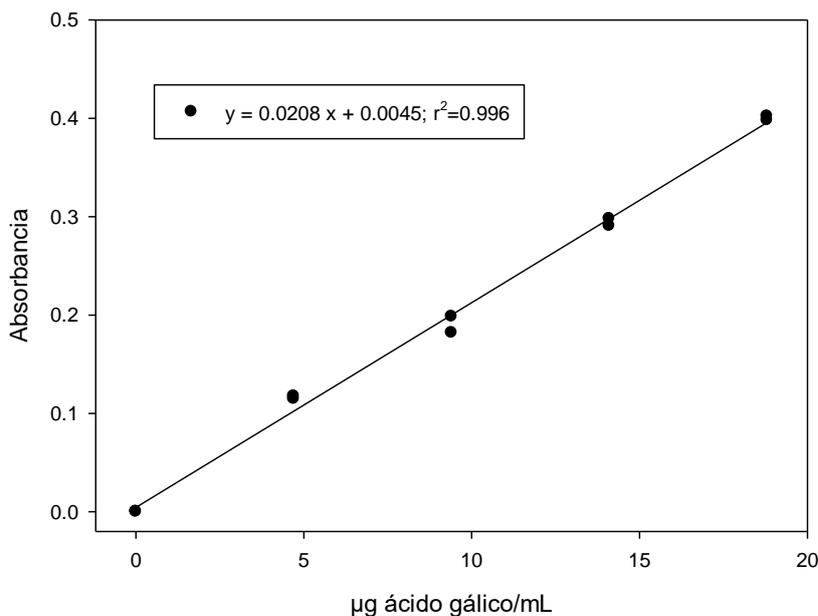


Figura 1: Recta de calibrado para fenoles totales

3.5.3 FLAVONOIDES TOTALES

Esta determinación fue llevada a cabo por espectrofotometría con el procedimiento descrito por Zhuang (1992).

El método consistió en introducir en tubos de ensayo: 150 µL de extracto metanólico + 600 µL de agua destilada + 45 µL de nitrito de sodio al 5% p/v (NaNO_2). Se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 45 µL de cloruro de aluminio al 10% p/v (AlCl_3). Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se añadió 300 µL de hidróxido de sodio 1M (NaOH) + 600 µL de agua destilada. Nuevamente se agitó durante 10 segundos con el agitador vortex. La mezcla se llevó a viales de 2,5 mL para medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 512 nm.

3.5.4 FLAVONOLES TOTALES

La determinación de flavonoles totales se basó en el método de Kumaran et al. (2007) ligeramente modificado.

El procedimiento consistió en llevar a tubos de ensayo 0,5 mL de extracto metanólico + 0,1 mL de Cloruro de Aluminio (AlCl_3) a concentración de 2 mg/mL + 1 mL de Acetato Sódico ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) en una concentración de 50 mg/mL. Se dejó reposar durante 150 minutos a temperatura ambiente. Tras el reposo se agitó durante 10 segundos

y la mezcla fue llevada a viales de 2,5 mL para medir la absorbancia con el espectrofotómetro a 440 nm.

3.5.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL HIDROSOLOUBLE Y LIPOSOLUBLE

Para la determinación de la actividad antioxidante total con las fracciones hidro y liposoluble se partió de dos extractos distintos.

Para la **fracción hidrosoluble** se utilizó el extracto preparado para fenoles totales.

Se empleó el método de Cano et al. (1998) basado en la liberación de radicales ABTS⁺ [ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico]. Los radicales libres muestran un máximo de absorbancia a 730 nm y conforme se le añade extracto de serbal liofilizado va reaccionando con los radicales libres que desaparecen, reduciendo así la absorbancia. La reacción se preparó en viales de 2,5 mL adicionando 20 µL ABTS + 20 µL H₂O₂ + 15 µL de peroxidasa.

Hecha la mezcla, se golpeó el vial contra la poyata haciendo virar el color de la mezcla hacia verde oscuro. A continuación, se adicionó 925 µL de tampón glicina y se realizó una primera medida a 730 nm en el espectrofotómetro. Se añadió 25 µL de extracto y se midió la absorbancia, después de 90 segundos, por segunda vez.

La diferencia entre las dos medidas de absorbancia permite determinar la actividad antioxidante total de la fracción hidrosoluble.

Para la **fracción liposoluble** se preparó un extracto a partir de muestras de frutos liofilizados y almacenados en el congelador a -80°C. La preparación del extracto consistió en adicionar, sobre tubos de ensayo de 15 mL, 0.5 gramos de fruto liofilizado + 10 mL de etil acetato. La mezcla se llevó a triturar al polytrón a 24000 r.p.m. durante 2 minutos y se centrifugó a 4000 r.p.m. y a 4°C. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se volvió a enrasar a 10 mL por posibles pérdidas por volatilización. Se agitó de forma manual y finalmente se almacenaron a -80°C para su posterior medición.

Este extracto es válido para las determinaciones de actividad antioxidante total de la fracción liposoluble, proteínas y carotenoides.

Al igual que para la fracción hidrosoluble, se siguió el método de Cano et al. (1998) a excepción de dos cambios:

1. Se sustituyó el tampón glicina por etanol. Su cantidad pasó a ser de 925 a 850 µL.

2. La cantidad de muestra empleada fue de 100 μ L.

Para la interpretación de los resultados finales de la actividad antioxidante total se realizó una recta de calibrado de Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo – 2-ácido carboxílico) que dependiendo de qué tipo de fracción fuese (FH o FL) le correspondería una ecuación distinta (Figura 2).

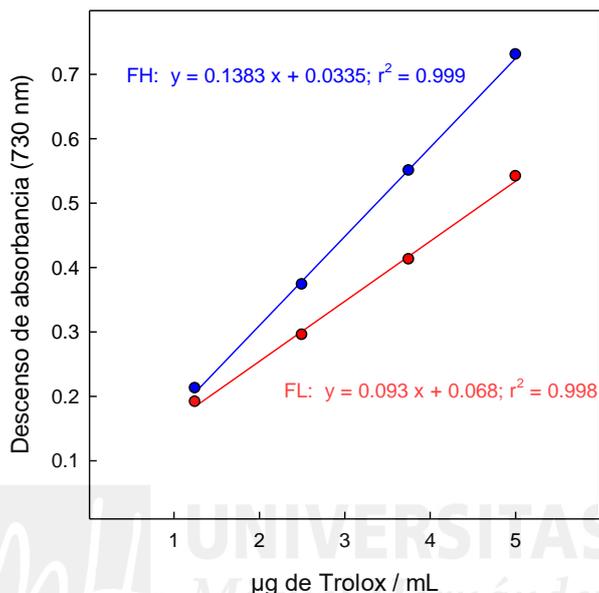


Figura 2: Recta de calibrado para actividad antioxidante total de la fracción hidrosoluble (FH) y liposoluble (FL).

3.5.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL POR LOS MÉTODOS ABTS, FRAP Y DPPH

Centrándonos en la evaluación de la actividad antioxidante total, se llevaron a cabo 3 métodos distintos con el fin de obtener una visión más global y precisa de dicho parámetro. De esta manera, se emplearon los métodos ABTS, DPPH y FRAP.

El primero en llevarse a cabo fue el método DPPH [2,2-difenil-1-picrilhidrazilo], tal y como describieron Brand-Williams et al. (1995), pero con ligeras modificaciones en cuanto al tiempo de reacción. En resumen, se mezclaron 10 μ l de extracto con 40 μ l de metanol y se añadieron 950 μ l de la solución DPPH. La mezcla se agitó energéticamente

y se dejó reposar en un lugar oscuro durante 10 minutos. Seguidamente, se midió la caída en la absorbancia a 515 nm utilizando un espectrofotómetro Unicam Heλios α.

Por otro lado, los métodos del radical ABTS [ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico] y FRAP (Poder Antioxidante Reductor Férrico, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo como describen Re el at. (1999) y Benzie y Strain (1996), respectivamente. De esta manera, se mezclaron 10 μl de extracto con 990 μl de solución ABTS o FRAP. Tras 10 minutos de reacción, se midió la absorbancia a 734 nm para ABTS y a 593 nm para el método FRAP con el mismo espectrofotómetro Unicam Heλios α.

Para la cuantificación de la actividad antioxidante por los 3 métodos se hizo uso de curvas de calibrado en el rango de 0,01-5,00 mmol trolox L⁻¹, mostrando una buena linealidad ($R^2 \geq 0,998$). Los análisis se llevaron a cabo con 3 repeticiones (n=3) y los resultados se expresaron como la media ± E.S. en mg equivalentes de Trolox/100 g de peso seco.

3.5.7 CAROTENOIDES

En este procedimiento se utilizó un extracto previamente preparado, siendo el mismo que el de la fracción liposoluble para la actividad antioxidante total. El extracto fue llevado a viales de cristal de 2.5 mL donde el espectrofotómetro midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados fueron expresados en mg eq β-caroteno/100 g de P.S.

3.5.8 CLOROFILAS

Para la determinación de las clorofilas totales se empleó el método de la acetona al 80% v/v mediante espectrofotometría. El procedimiento comenzó mezclando en tubos de ensayo 0,5 gramos de serbal liofilizado en 4 mL de acetona al 80% para los estados primarios de maduración (1 y 2) y 1 gramo en 4 mL de acetona al 80% para los estados finales de maduración (3 y 4). Esto se debe a que al comienzo de la maduración el fruto es de color verde, por lo que su contenido en clorofilas es alto. Mientras que, en los estados de maduración más avanzados, al perder el color verde, la cantidad de clorofilas

será baja y se tiene que aumentar la cantidad de muestra para que el espectrofotómetro pueda medirlas.

Se trituró con el polytrón a 24000 r.p.m. durante 2 minutos y posteriormente se introdujo en el sonicador durante 15 minutos. A continuación, se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se enrasó el sobrenadante a 5 mL de acetona al 80%. Finalmente se midió en el espectrofotómetro en dos longitudes de onda distintas: 664 y 647 nm



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS

4.1.1 EVOLUCIÓN DEL PESO

En la figura 3 se puede observar la evolución de los pesos de los frutos que, durante el proceso de maduración, van aumentando su peso. Finalmente acaba reduciéndose debido a la desecación de éstos, pero sin diferencias significativas en ningún estado de maduración.

Entre los pesos del estado 1 y estado 2 se muestra un ligero descenso en el peso de los frutos lo que es debido a que pertenecen a frutos distintos puesto que todas las muestras se tomaron a la vez.

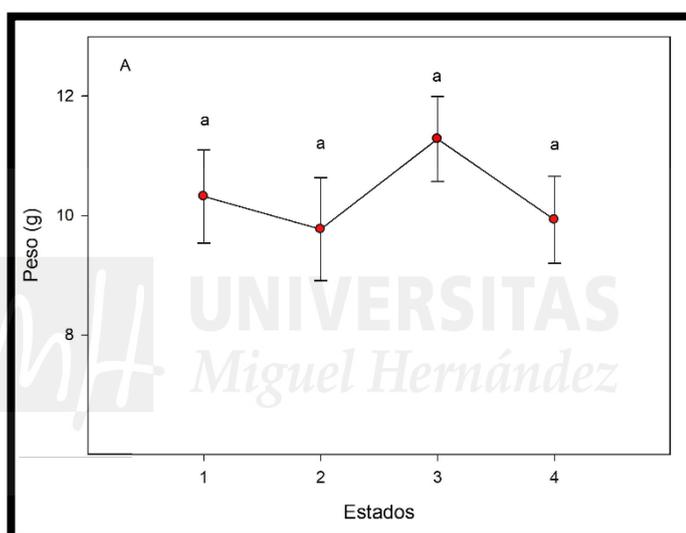


Figura 3: Evolución del peso de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 20 frutos

Los valores obtenidos en esta prueba son similares a los estudiados por Altuntas et al. (2015) en los que, al dividir la madurez del fruto en 3 etapas, obtenían los valores de 12.78 ± 0.20 g en la etapa 1 (madurez fisiológica), 11.00 ± 0.20 g en la etapa 2 (periodo de maduración), 10.09 ± 0.16 g en la etapa 3 (fruto sobremaduro). Estos autores también han encontrado una disminución en el peso de los frutos al avanzar el estado de madurez de los serbales.

4.1.2 EVOLUCIÓN DEL DIÁMETRO

En la figura 4 se muestra cómo evoluciona el valor del diámetro de los frutos, pudiéndose observar que sigue un mismo patrón si se compara con la figura correspondiente al peso del fruto. De tal forma que se puede entender que, a mayor peso del fruto mayor diámetro de éste.

Dentro de las medidas en cada estado, se puede apreciar que hay variaciones significativas en el diámetro entre los estados 1 y 3 de maduración de los frutos respecto al estado de mayor madurez.

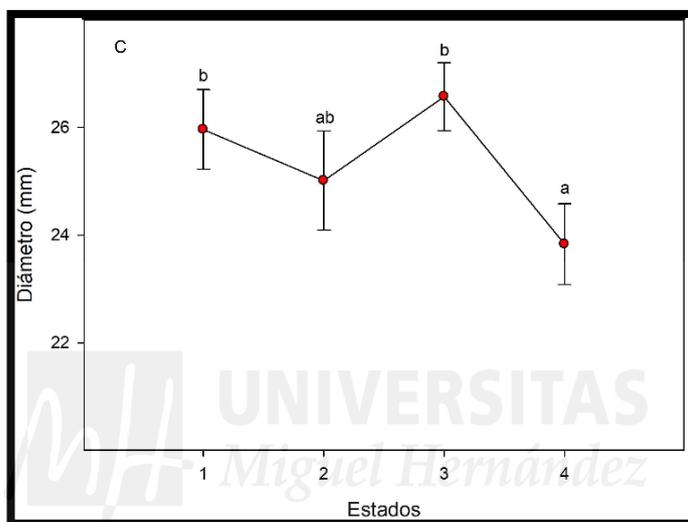


Figura 4: Evolución del diámetro de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de madurez estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 20 frutos.

Las medidas tomadas por Altuntas et al. (2015) muestran similitud con los datos obtenidos en nuestras pruebas. Sus ensayos dieron como resultado $28.54 \pm 0,19$ mm en el primer estado de maduración, 28.56 ± 1.40 mm en la etapa 2 del desarrollo y 25.77 ± 1.52 mm para el estado de mayor madurez. Ambos estudios comparten la tendencia a la pérdida de diámetro conforme avanza la maduración.

Drvodelić et al, (2018) clasificaron los frutos en función del peso en 3 clases: pequeño (5-10 g), mediano (11-15 g) y grande (16-20 g).

Con estas 3 clases se obtuvieron valores de diámetro como 23.81 ± 1.86 mm para frutos pequeños, 29.31 ± 0.81 mm para frutos medianos y 32.67 ± 1.71 mm para frutos grandes.

Respecto a las pruebas realizadas en este estudio los valores son inferiores a los citados, pero al no seguir el mismo criterio de clasificación de los frutos no son datos comparables.

4.1.3 EVOLUCIÓN DE LA LONGITUD

En la figura 5 se puede ver la evolución de la longitud del fruto respecto a cada estado de maduración. Como ocurría en el apartado anterior, los valores de peso y longitud siguen un mismo patrón. De tal manera, que a medida que el peso del fruto aumenta, la longitud aumenta con éste.

Se aprecia dentro de la figura, que hay diferencias significativas entre el estado 3 respecto a los estados 2 y 4.

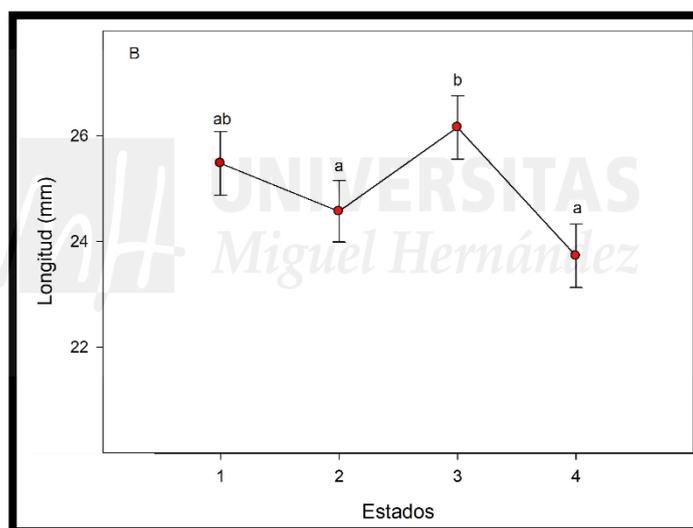


Figura 5: Evaluación de la longitud de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de madurez estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 20 frutos.

Los resultados procedentes del estudio de Altuntas et al. (2015) muestran similitud con los datos obtenidos en las pruebas. Sus ensayos dieron como resultado $29,46 \pm 0,20$ mm en el primer estado de maduración, $27,29 \pm 1,52$ mm en la etapa 2 del desarrollo y $27,11 \pm 1,17$ mm.

Drvodelić et al. (2018) calcularon los valores de diámetro obteniendo $23,19 \pm 1,90$ mm para frutos pequeños, $27,45 \pm 1,38$ mm para frutos medianos y $29,93 \pm 1,65$ mm para frutos grandes, por lo que nuestros frutos entrarán en la categoría de medianos según estos autores.

4.1.4 EVOLUCIÓN DE LA FIRMEZA

En la figura 6 se puede ver la evolución de la firmeza del fruto respecto a cada estado de maduración.

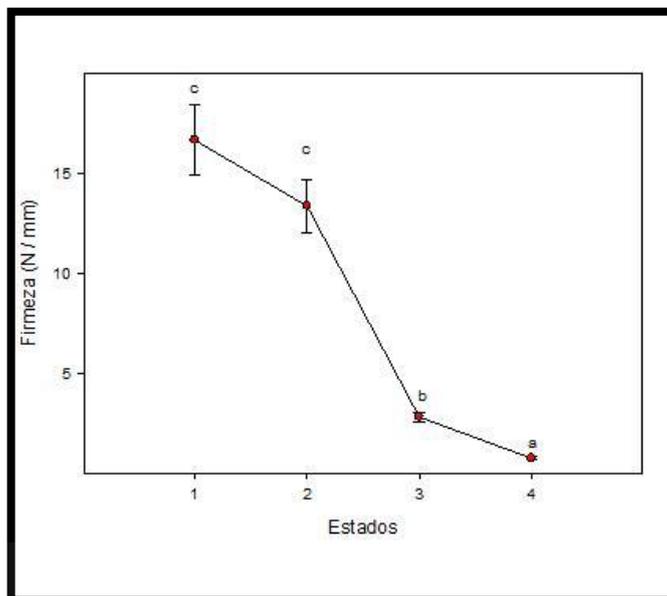


Figura 6: Evolución de la firmeza de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de madurez estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 20 frutos.

Se deduce a partir de la figura que la firmeza de los frutos disminuye a lo largo de la maduración del fruto. Se produce un descenso general a lo largo de todos los estados siendo significativos del estado 1 y 2 respecto al 3 y del estado 3 al 4.

La firmeza de los frutos en el estado 4 es muy baja, ya que los serbales maduran por fermentación de su pulpa y son muy blandos con una pulpa pastosa.

No existen trabajos previos publicados que aborden la firmeza de los serbales, por lo que no se ha podido discutir con otros autores este aspecto.

4.1.5 EVOLUCIÓN DEL COLOR

4.1.5.1 EVOLUCIÓN DEL PARÁMETRO L*

Como se comentó anteriormente (apartado 3.3.3), el valor de L* se encargaba de medir la luminosidad del fruto.

En la figura 7 se deduce un descenso significativo por cada estado de maduración en la luminosidad del fruto. De tal forma que el estado 1 es el valor más alto, por lo tanto, el más luminoso y por contrario, el estado 4 es el valor más bajo siendo así el de menor luminosidad.

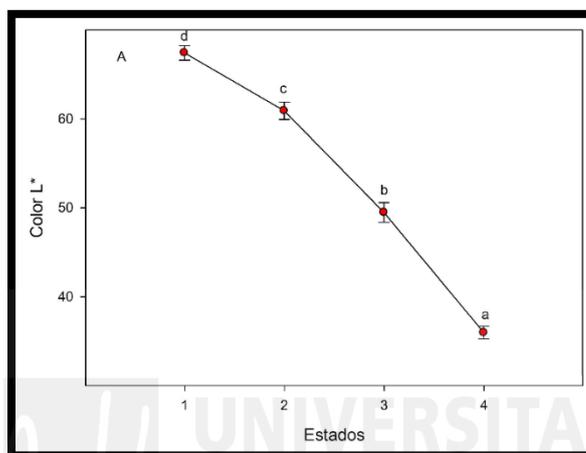


Figura 7: Evolución del parámetro L* del color de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de madurez estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 60 medidas

Estos resultados se pueden ver de forma gráfica en la ilustración 4 en la que se mostraban los frutos en sus distintos estados de madurez siendo el estado 1 de color verde y el estado 4 color marrón oscuro.

Los resultados obtenidos por Atluntas et al. (2015) en cuanto al parámetro L* de la piel del fruto son similares a los obtenidos en este estudio. Los resultados fueron de 61.31 ± 0.75 en la primera etapa de maduración. Durante la etapa 2 se obtuvo el valor de 53.55 ± 1.05 y finalmente en la etapa de sobremaduración 27.48 ± 0.31 .

Egea et al. (2010) estudiaron el color del fruto sobremaduro por lo que obtuvieron un valor de L* de 35.13 ± 3.09 siendo comparable al estado más desarrollado de este estudio.

4.1.5.2 EVOLUCIÓN DEL PARÁMETRO a^*

El parámetro a^* de CIElab mide los colores entre verde, para valores negativos de a^* , y rojo para valores positivos.

En la figura 8 se observa la evolución del parámetro a^* de los frutos \pm la desviación estándar de las medidas tomadas. El primer estado de maduración presenta un valor negativo debido a su color verde teniendo así diferencias significativas con el resto de las medidas. Conforme avanza la maduración, el valor de este parámetro va incrementando de forma que alcanza su valor máximo en el estado de maduración más avanzado presentando así diferencias significativas con el resto de los estados. Estos resultados son lógicos y esperables puesto que conforme madura el fruto va adquiriendo un color rojo.

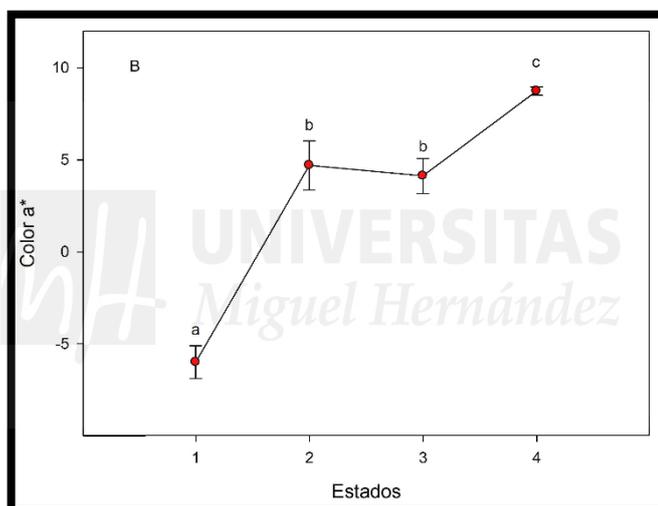


Figura 8: Evolución del parámetro a^* del color de los serbales tipo de manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 60 medidas

Se puede deducir a partir de los resultados obtenidos por Atluntas et al. (2015) que en cuanto al parámetro a^* de la piel del fruto hay disparidad respecto a los obtenidos en este estudio en los estados de maduración más avanzados ya que obtuvieron los siguientes resultados: -8.92 ± 1.40 en la primera etapa de maduración, durante la etapa 2 0.29 ± 1.14 y finalmente en la etapa de sobremaduración 3.54 ± 0.37 .

Egea et al. (2010) obtuvieron un valor para a^* de 5.54 ± 0.99 siendo ligeramente inferior en el estado más desarrollado al obtenido en este estudio. La razón puede deberse a que el fruto estudiado no se encontrase en la misma fase que el estado 4 de este trabajo.

4.1.5.3 EVOLUCIÓN DEL PARÁMETRO b^*

El parámetro b^* de CIElab mide los colores que van desde colores azules, adquiriendo valores negativos, a colores amarillos dando valores positivos.

A través de la figura 9 se deduce que a medida que avanza la maduración del serbal el parámetro de b^* disminuye con diferencias significativas en todos sus estados. De tal forma que el fruto comienza teniendo color verde amarillento hasta que llega al estado de mayor maduración adoptando un color marrón.

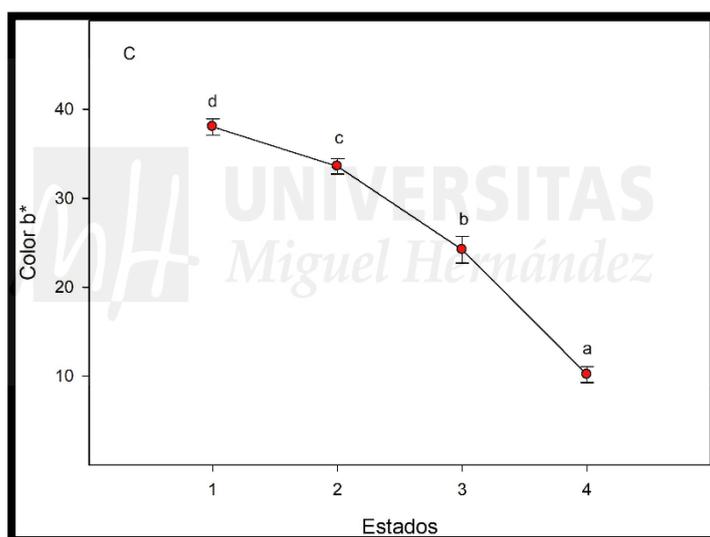


Figura 9: Evolución del parámetro b^* del color de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de madurez estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 60 medidas.

Se podría deducir a partir de los resultados obtenidos por Atluntas et al. (2015) que hay disparidad en cuanto al parámetro b^* de la piel del fruto respecto a los obtenidos en este estudio en los estados de maduración intermedios ya que los resultados de Atluntas et al. (2015) fueron de 30.64 ± 0.66 en la primera etapa de maduración. Durante la etapa 2 se obtuvo el valor de 42.66 ± 1.12 , mientras que en este estudio las etapas 2 y 3 son de descenso del valor de b^* y finalmente en la etapa de sobremaduración 12.74 ± 0.54 .

Los resultados obtenidos por Egea et al. (2010) para el parámetro b^* para frutos maduros fueron de 4.29 ± 3.75 siendo inferior al valor obtenido en este estudio en la fase de mayor desarrollo del fruto.

4.2 EVOLUCIÓN PARÁMETROS QUÍMICOS

4.2.1 EVOLUCIÓN DE LOS SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES

En la figura 10 se observa la evolución de sólidos solubles en descenso a lo largo de sus 4 estados de maduración. De tal forma que en el primer estado es en el que mayor valor de $^{\circ}$ Brix se obtuvieron y en el cuarto estado el menor. Entre cada uno de los estados de maduración hay diferencias significativas en su contenido de sólidos solubles totales a excepción del estado 3.

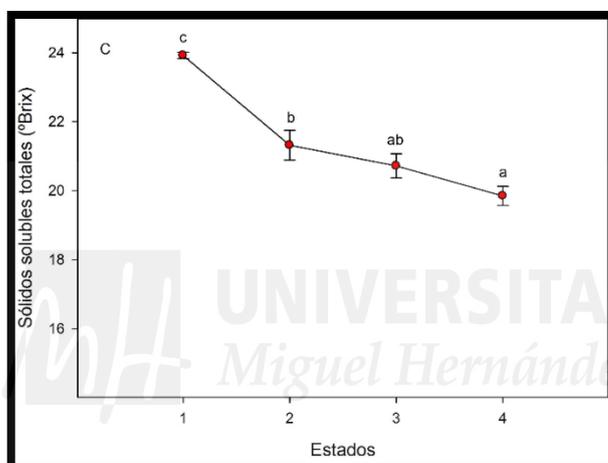


Figura 10: Evolución de los sólidos solubles totales de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 6 medidas.

Los resultados obtenidos por Atluntas et al. (2015) fueron inferiores respecto a los datos obtenidos en este estudio. 13.07° Brix \pm 0.68 en la etapa primaria, 12.22° Brix \pm 0.39 para la etapa de maduración (estado 2) y 11.75° Brix \pm 0.36. Por tanto, los serbales estudiados en la EPSO son más dulces que los de Atluntas et al. (2015)

Como se puede observar, la evolución de los sólidos solubles totales tiende a disminuir al aumentar la maduración, al revés de lo que ocurre en la mayoría de los frutos. Esto se debe a la gran deshidratación que sufren estos frutos al madurar, disminución que también obtiene Atluntas et al. (2015) en los 3 estados de maduración estudiados por esos autores.

Miletic et al. (2012) establecieron valores de sólidos solubles totales para serbales tipo manzana para fruta fresca aproximadamente con el estado 2 de los serbales de Serón y para fruta sobremadura aproximadamente al estado 4 de este estudio.

4.2.2 EVOLUCIÓN DE LA ACIDEZ Y pH

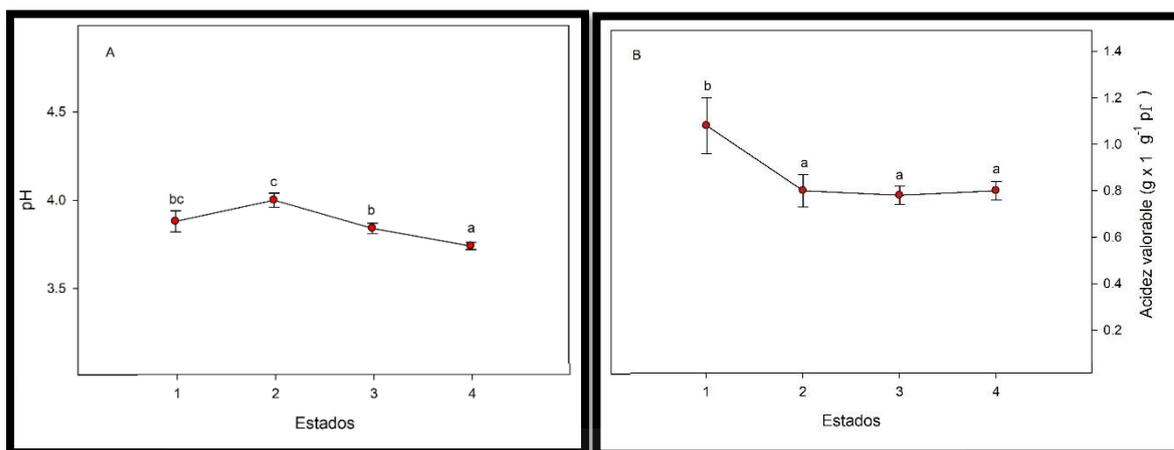


Figura 11: Evolución del pH (A) y de la acidez valorable (B) de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 6 medidas.

Los resultados de ambos parámetros fueron proporcionados al mismo tiempo puesto que el valorador potenciométrico aportaba ambos datos a la vez.

En la figura 11A se puede observar la evolución del pH a lo largo del desarrollo del fruto manteniéndose entre 3.7-4 a lo largo de toda la maduración, aunque con diferencias significativas entre ellas.

En cuanto al parámetro de acidez valorable, según muestra la figura 11B, se puede observar que en el primer estado de madurez se obtiene el valor más alto comparándolo con el resto de los estados, siendo una diferencia significativa estadísticamente. A partir del segundo estado de maduración, la acidez se mantiene constante hasta el estado de mayor desarrollo del fruto.

Los resultados obtenidos por Atluntas et al. (2015) para el parámetro de pH son más elevados que los de este estudio. En la etapa 1 se alcanzaron valores de 4.637 ± 0.003 , para la etapa 2 valores de 4.683 ± 0.022 y para la etapa 3 se obtuvo 4.647 ± 0.012 . Pese a que sea un pH menos ácido que los serbales de este estudio, el patrón de evolución es el mismo, su valor se mantiene constante a lo largo de la maduración.

No existen trabajos previos publicados que aborden la acidez de los serbales, por lo que no se ha podido discutir con otros autores este aspecto.

4.2.3 EVOLUCIÓN DE AZÚCARES

En este estudio los azúcares detectados en los frutos fueron sacarosa, maltitol, glucosa y fructosa.

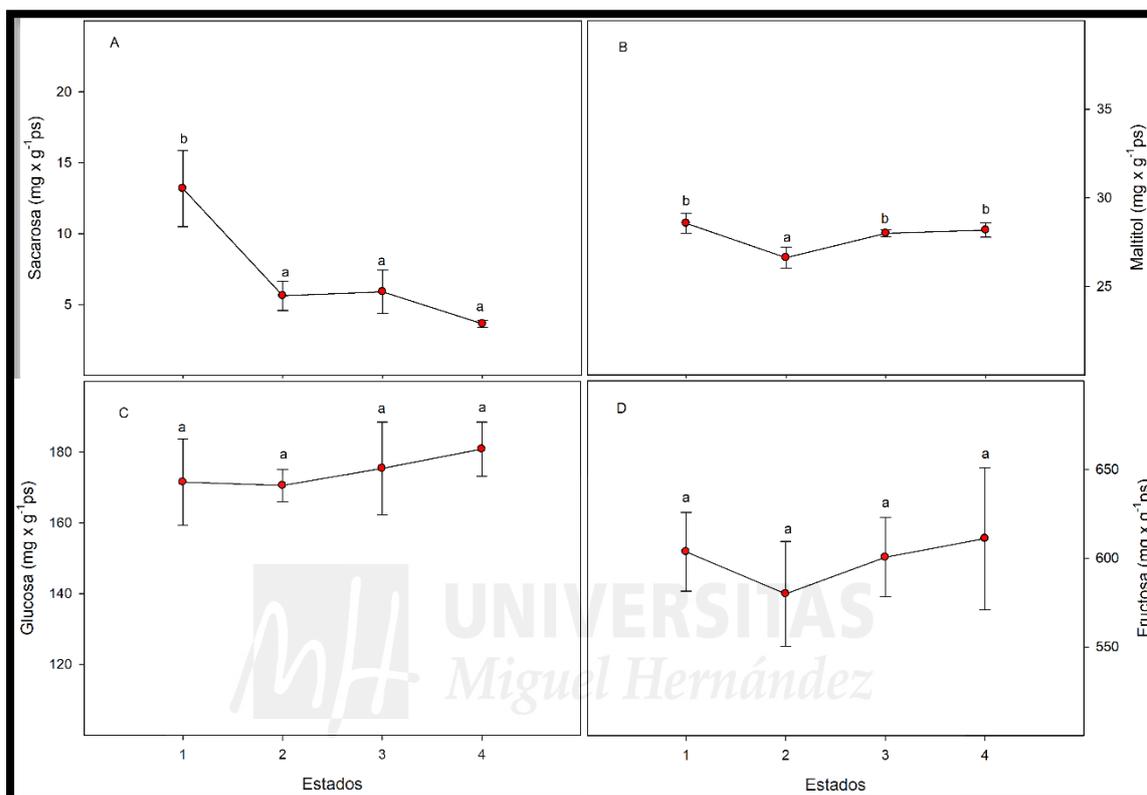


Figura 12: Evolución de sacarosa (A), maltitol (B), glucosa (C) y fructosa (D) de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 6 medidas.

En la figura 12A se muestra la evolución del nivel de sacarosa a lo largo de los distintos estados de maduración del fruto. Se observa un descenso significativo de la cantidad del disacárido desde el estado 1 al estado 2. A partir de ese momento se mantiene constante hasta su mayor estado de madurez.

En la figura 12B, se observa que la cantidad de maltitol se encuentra en bajas proporciones y manteniéndose estable a lo largo de su desarrollo. Se aprecian diferencias significativas entre el primer estado y el segundo, pero su cantidad por gramo de peso seco es escasa, lo que no influye de gran manera sobre los azúcares en general.

En la figura 12C, se observa la evolución del contenido en glucosa en el fruto a lo largo de su desarrollo en la maduración. Desde el primer estado hasta el último la cantidad de glucosa es estable con un ligero ascenso, sin llegar a ser significativo, en el estado final. Esto se debe a que, como en el caso de la fructosa, la sacarosa se ha ido degradando a lo largo del proceso de maduración. Como se puede observar, la glucosa es el segundo azúcar con más presencia en el fruto después de la fructosa.

La figura 12D nos permite conocer la evolución de la cantidad de fructosa en el fruto, manteniéndose estable a lo largo de todo su desarrollo y llegando a aumentar al final de éste sin ser significativo. Esto se explica por la degradación de la sacarosa (disacárido de glucosa y fructosa) a lo largo del desarrollo del fruto, lo que provoca un aumento en las cantidades de los dos monosacáridos. Cabe destacar que la fructosa es el azúcar más abundante respecto a los demás obtenidos en esta prueba.

No existen trabajos previos publicados que aborden los azúcares de los serbales, por lo que no se ha podido discutir con otros autores este aspecto.

4.2.4 EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

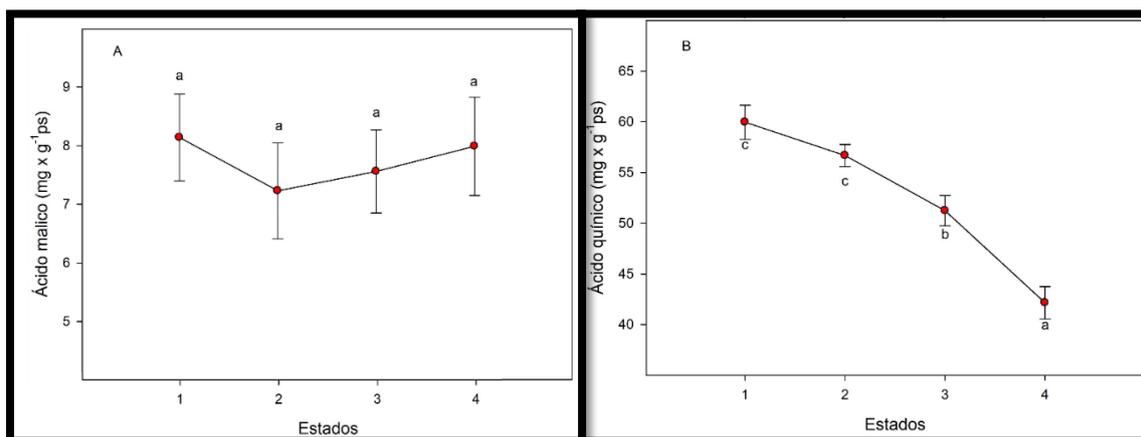


Figura 13: Evolución de los ácidos orgánicos málico (A) y quínico (B) de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 6 medidas.

En la figura 13B queda reflejado un claro descenso de la cantidad de ácido quínico a lo largo de los estados de maduración llegando a haber diferencias significativas entre los estados 1 y 2 con el estado 3 y con el estado 4. Este resultado explica el descenso en el valor de acidez valorable obtenido en el apartado anterior. De los resultados obtenidos, este ácido es el más abundante.

En la figura 13A se observa la evolución del ácido málico a lo largo de los estados de desarrollo del fruto. La cantidad de este ácido no sufre variaciones significativas y se mantiene estable en sus cuatro estados.

4.2.5 EVOLUCIÓN DE PROTEÍNAS

En la figura 14 se indica la evolución de la concentración de proteínas en el fruto a lo largo de los 4 estados de desarrollo. La cantidad de proteínas disminuye significativamente del primer estado al segundo, manteniéndose estable hasta el estado 3. Cuando llega la sobremaduración (Estado 4), hay un ligero aumento no significativo del nivel de proteínas respecto al estado anterior.

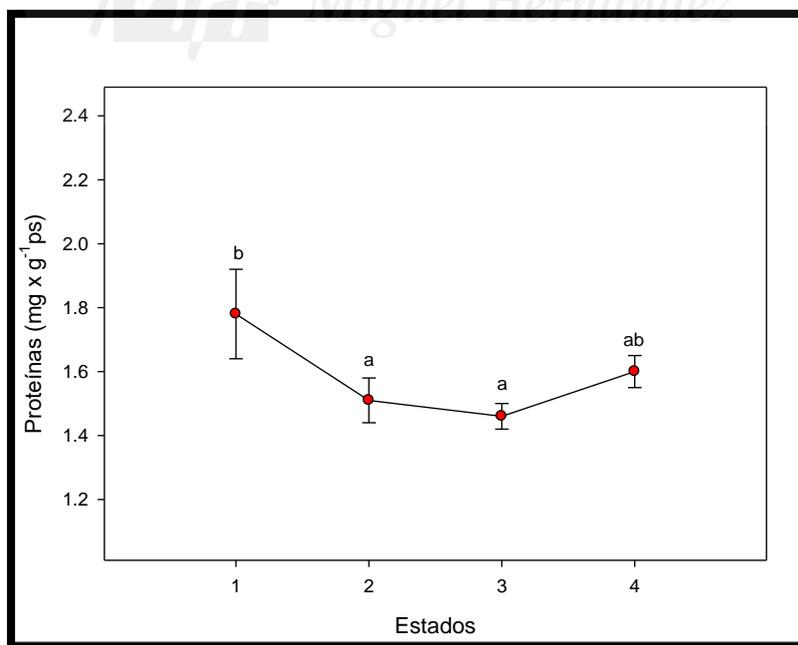


Figura 14: Evolución de las proteínas de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 12 medidas.

4.3 EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS FUNCIONALES

4.3.1 EVOLUCIÓN DE FENOLES, FLAVONOIDES Y FLAVONOLES TOTALES

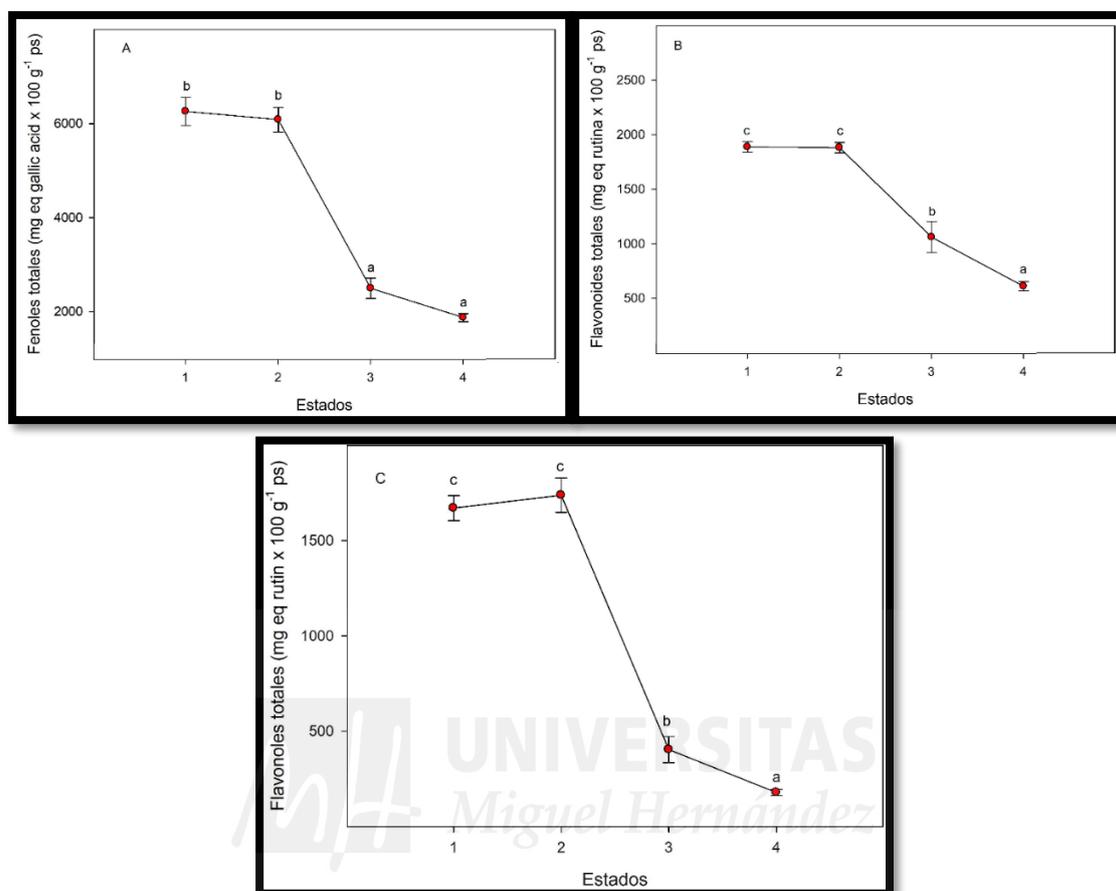


Figura 15: Evolución de fenoles (A), flavonoides (B) y flavonoles totales (C) de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de 12 medidas.

En la figura 15A se representan los resultados obtenidos gráficamente y se puede apreciar cómo la cantidad de fenoles totales va disminuyendo a lo largo de la maduración del fruto. El mayor descenso se produce entre los estados 2 y 3 de forma significativa. Entre los estados 1 y 2 y el estado 3 y 4 el descenso es ligero sin llegar a ser significativo.

Este hecho se puede relacionar con el nivel de astringencia del fruto ya que uno de los responsables de la astringencia del fruto son los taninos. Los taninos son uno de los componentes de los fenoles de tal forma que, si hay una reducción en los fenoles totales como ocurre en la figura 15A, los taninos disminuirán y a su vez la astringencia del fruto. Por lo que a medida que el fruto avanza en su maduración, el nivel de astringencia se reduce.

Termentzi et al. (2006) llevaron a cabo un estudio sobre la cantidad de fenoles totales en el serbal utilizando distintos extractos. De entre todos los extractos empleados, uno de ellos fue el extracto metanólico el cual, también se utilizó para el método empleado en este trabajo.

Clasificó los frutos en dos estados de maduración: fruto verde y fruto bien maduro en el árbol. Éstos se pueden relacionar con los estados 1 y 4 de los serbales estudiados en este trabajo. El resultado que obtuvieron para sus frutos verdes fue de $32.5 \pm 3.63 \mu\text{g}$ ácido gálico/mg P.S. y para su fruto maduro en el árbol fue $10.3 \pm 2.08 \mu\text{g}$ ácido gálico/mg P.S.

Los resultados obtenidos en este trabajo para el estado de maduración 1: $6260.28 \pm 297.344 \text{ mg}/100\text{g P.S.}$; y para el estado de maduración más avanzado: $1877.94 \pm 83.7254 \text{ mg}/100\text{g P.S.}$ por lo que los frutos de este estudio tendrían más concentración de fenoles totales que los de Termentzi et al. (2006).

En la figura 15B se representa la evolución de los flavonoides en el fruto respecto a su estado de maduración. Al igual que en los fenoles totales, se produce un descenso en la cantidad de flavonoides conforme a lo largo de toda la maduración del fruto.

Se observan diferencias significativas entre los estados 2 y 3 en los que se produce un amplio descenso de flavonoides totales y entre los estados 3 y 4 que también se produce un descenso significativo, pero de forma más paulatina que en los estados anteriores.

Se trata de un resultado paralelo al contenido de fenoles totales puesto que los flavonoides son un compuesto que forma parte de los fenoles totales. Por lo tanto, obtener resultados paralelos entre estos dos parámetros puede indicar que los flavonoides son una parte importante de los fenoles totales.

Termentzi et al. (2006, 2008) realizó un análisis cuantitativo de los extractos aislados de las frutas de *Sorbus domestica* el cual reveló grandes diferencias entre las muestras de diferentes categorías de frutas. Las categorías de frutas A, C (frutas no maduras) y E (pulpa de la fruta) eran ricas en flavonoides, mientras que las categorías B y D (frutas bien maduras) tenían un contenido de flavonoides más bajo, tal como también se ha obtenido en este trabajo.

En la figura 15C se representa la evolución en la cantidad de flavonoles totales a lo largo de la maduración de los frutos. Como en los casos anteriores (fenoles y flavonoles totales) se produce un súbito descenso de forma significativa entre el segundo y el tercer estado de desarrollo. También se produce un descenso significativo entre los estados 3 y 4 pero de una forma más paulatina.

Al igual que ocurría en el caso anterior, los flavonoles descienden de una forma paralela a los flavonoides y los fenoles totales. Esto se explica porque los flavonoles son compuestos que forman parte de los flavonoides.

Por tanto, si se comparan las 3 figuras observadas, podemos deducir que, al depender flavonoides de flavonoles y fenoles de flavonoides, los resultados deben de ser paralelos.

4.3.2 EVOLUCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (FRACCIÓN HIDRO Y LIPOSOLUBLE)

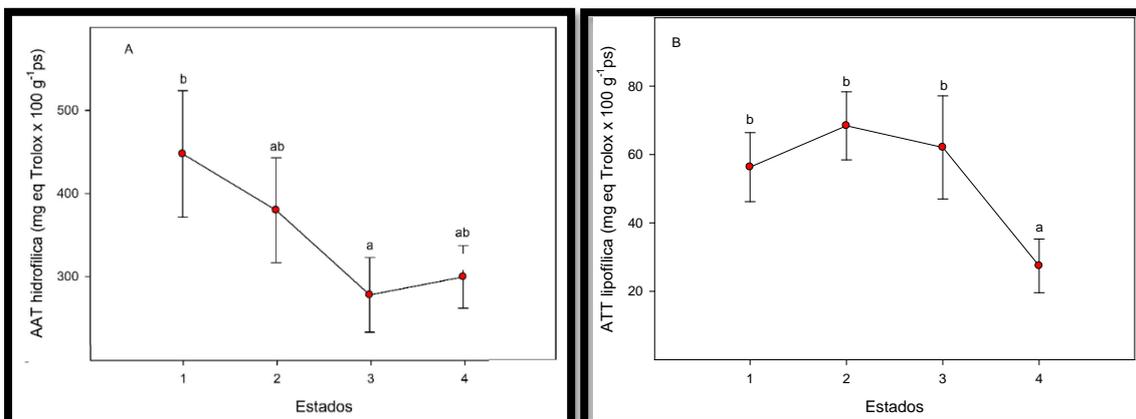


Figura 16: Evolución de la AAT de la fracción hidrosoluble (A) y de la fracción liposoluble (B) de los serbales tipo manzana en sus cuatro estados de madurez estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de doce medidas.

En la figura 16A se representa la evolución de la actividad antioxidante total de la fracción hidrosoluble a lo largo de la maduración del fruto. De tal forma que existe un descenso general y significativo de este parámetro entre el estado 1 y 3. Entre el estado 3 y el estado 4 se produce un ligero aumento sin llegar a ser significativo.

En la figura 16B, se muestra la evolución de la actividad antioxidante total de la fracción liposoluble en relación con el estado de maduración del fruto. Los resultados obtenidos son inferiores en comparación con la fracción hidrosoluble.

Para este caso, durante los 3 primeros estados se produce un ligero aumento valor de la actividad antioxidante sin llegar a ser significativo mientras que, al llegar a la sobremadurez, se produce un descenso súbito y significativo de la actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos tanto para la fracción hidrosoluble como para la fracción liposoluble se pueden relacionar con los resultados de fenoles totales puesto que éstos son los principales participantes en la actividad antioxidante de los frutos. De tal forma que el descenso en la actividad antioxidante puede verse influido por la disminución de fenoles totales.

Para la fracción liposoluble Termentzi et al. (2006) obtuvieron resultados paralelos empleando el mismo extracto, pero con distinto método. Los valores de actividad antioxidante total se obtuvieron en los primeros estados de maduración mientras que para los estados finales se producían descensos significativos al igual que los frutos estudiados en este trabajo.

4.3.3 EVOLUCIÓN AAT POR MÉTODOS ABTS, DPPH Y FRAP

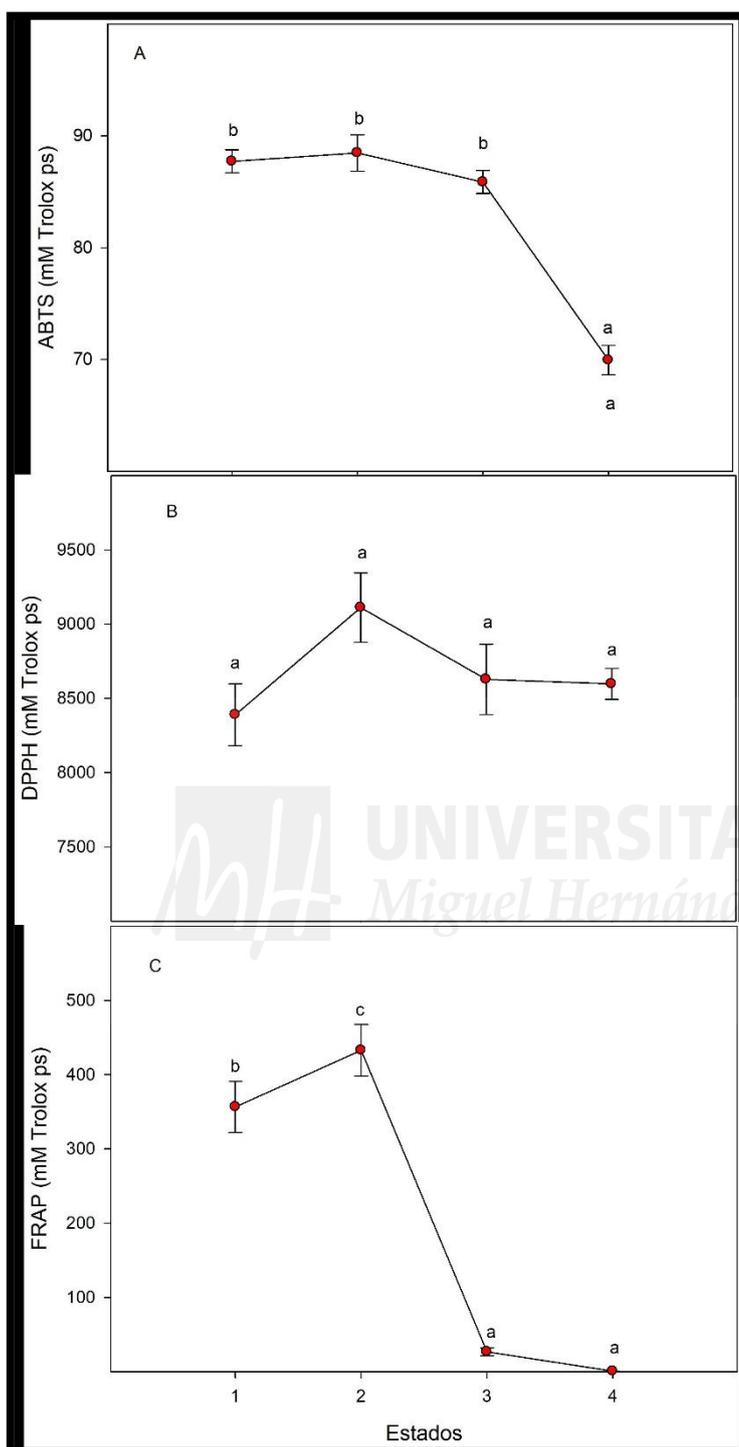


Figura 17: Evolución de la AAT por los métodos ABTS (A), DPPH (B) y FRAP (C) de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de seis medidas.

En la figura 17A se muestra la evolución de la actividad antioxidante total por el método ABTS por cada estado de desarrollo del fruto. Como en el apartado de la fracción liposoluble, la actividad antioxidante total se mantiene estable sin cambios significativos hasta el estado 3 de maduración. A partir de éste, se produce un descenso significativo al llegar a la sobremadurez.

Como se puede observar en la figura 17B los resultados están expresados de la misma forma que en el método anterior. La actividad antioxidante total por DPPH se mantiene estable habiendo un ligero aumento de ésta en el estado 1 al estado 2. A partir de éste vuelve a descender hasta alcanzar los valores iniciales. Se trata del único procedimiento que no sigue el mismo patrón de resultados que el resto de los métodos empleados en este estudio.

La actividad antioxidante total obtenida por el método FRAP se expresa de igual forma que en los métodos anteriores.

Queda reflejada en la figura 17C en la que se puede observar el mismo comportamiento que en otros métodos como ABTS y las fracciones hidro y liposoluble. Entre el estado 1 y 2 se produce un incremento significativo de la actividad antioxidante mientras que del segundo al tercer estado sufre un súbito descenso significativo a valores muy pequeños. Cuando alcanza la sobremadurez la actividad antioxidante total es muy baja.

4.3.4 EVOLUCIÓN DE CAROTENOIDES

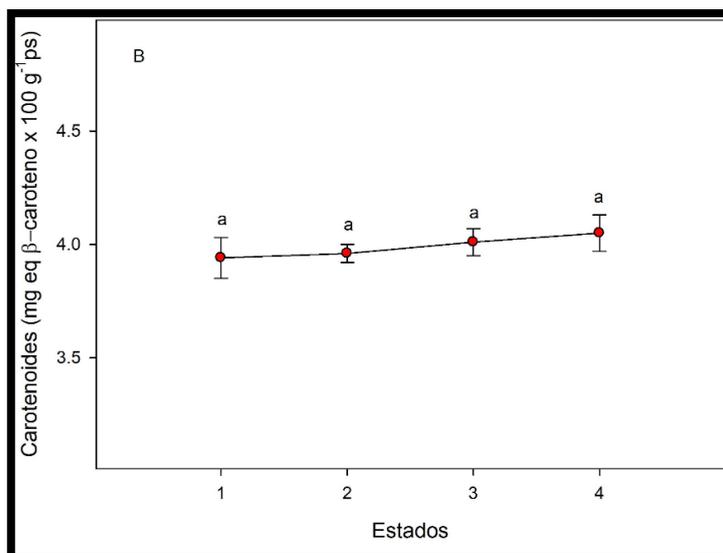


Figura 18: Evolución de los carotenoides de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de seis medidas.

En la figura 18 se observa que la evolución de cantidad de β -caroteno es estable desde el primer estado de maduración hasta el estado de mayor desarrollo sin apreciar diferencias significativas.

La cantidad de carotenoides se puede relacionar con el parámetro b^* del color medido anteriormente (Figura 9). El comportamiento del parámetro b^* tendía al descenso mientras que los carotenoides se mantienen estables sin variaciones significativas. Por lo que se deduce que otro pigmento será el que se encargue de aportar el color al fruto ya que no se produce una respuesta equitativa entre los carotenoides y el parámetro b^* .

No existen trabajos previos publicados que aborden la cantidad de clorofilas de los serbales, por lo que no se ha podido discutir con otros autores este aspecto

4.3.5 EVOLUCIÓN DE CLOROFILAS

A partir de la figura 19 se observa cómo el nivel de clorofilas desciende desde el primer estado de maduración hasta el cuarto estado de desarrollo con diferencias significativas entre el segundo y tercer estado. Es un resultado lógico puesto que el color verde que posee el fruto al comienzo de su etapa de maduración se va perdiendo a lo largo del desarrollo. Por lo que las clorofilas, que son las encargadas de aportar el color verde al fruto, disminuyen a la par que el fruto madura.

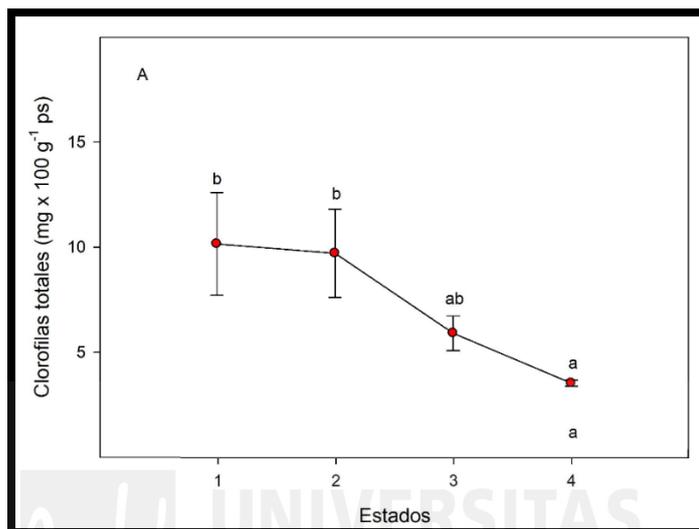


Figura 19: Evolución de los carotenoides de los serbales tipo manzana en los cuatro estados de maduración estudiados. Cada dato es la media \pm E.S. de seis medidas.

Las clorofilas pueden relacionarse con el parámetro a^* del color del fruto (Figura 8) de forma que, al ir perdiendo el color verde, las clorofilas se reducen a lo largo de la maduración. El parámetro a^* se incrementa conforme el fruto va adoptando un color rojizo por lo que se puede establecer la relación de que, al reducirse el contenido en clorofilas, el parámetro a^* se incrementa.

No existen trabajos previos publicados que aborden la cantidad de clorofilas de los serbales, por lo que no se ha podido discutir con otros autores este aspecto.



CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Las conclusiones que se obtienen del análisis de los parámetros físicos, químicos y funcionales determinados durante los cuatro estados de maduración de los frutos de serbal tipo manzana se detallan a continuación:

1. El fruto del serbal tiene una alta capacidad antioxidante en sus primeros estados de maduración por la presencia de elevadas cantidades de fenoles, flavonoides y flavonoles.
2. Las diferencias existentes entre los serbales estudiados en la EPSO con el resto estudios llevados a cabo por otros autores pueden deberse a factores genéticos como a las distintas características edafoclimáticas.
3. La mayoría de frutos tienden a aumentar su peso a lo largo de su maduración y conservarlo cuando ésta ha finalizado. El serbal crece conforme madura pero cuando éste llega al final de su madurez, disminuye su peso.
4. A nivel alimentario la elevada astringencia de los frutos dificulta poder consumirlo en fresco en sus primeros estados de maduración. Al poder consumirlo solo en su estado más avanzado, dificulta su procesado debido a su baja firmeza.



BIBLIOGRAFÍA

6 BIBLIOGRAFÍA

Altuntas, E., Yildiz, M. y Gul, E. 2015. The effect of ripening periods of physical, chemical and mechanical properties of service tree (*Sorbus domestica* L.) fruits. 17: 261-265.

Benzie, I. F. F. y Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70–76.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. U-Technol.* 28; 25-30.

Brindza, J., Toth, D., Brindza, P., Grygorieva, O., Sajbidor, J. y Kucelova, L. 2016. Forgotten and Less Utilised Plant Species as Functional Food Resources. 12: 222-223.

Cano, A., J. Hernández-Ruiz, F. García-Canovas, Acosta, M. y Arnao M.B. 1998. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem.* 9: 196-202.

Drvodelić, D., Oršanić, M., Vuković, M., Jatoi, M.A. y Jemrić, T. 2018. Co-rrelation of Fruit Size with Morphophysiological Properties and Germination Rate of the Seeds of Service Tree (*Sorbus domestica* L.). *Genetika.* 44: 47-54.

Egea, I., Sánchez-Bel, P., Romojaro, F. y Pretel, M.T. 2010. Six Edible Wild Fruits as Potential Antioxidant Additives or Nutritional Supplements. *Plant Foods for Human Nutrition.* 65:121-129.

Miko, M. y Gazo, J. 2004. Morphological and biological characteristics of fruits and seed of the service tree (*Sorbus domestica* L.). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.* 12: 139-146.

Miletic, R. y Paunovic, S. M. 2012. Research into service tree (*Sorbus domestica* L.) population in Eastern Serbia. *Genetika.* 44: 483-490.

Olszewska M. y Michel P. 2009. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition. 23: 1507–1521.

Oria de Rueda Salgueiro, J.A., Martínez de Azagra Paredes, A. y Álvarez Nieto, M.A. 2006 Botánica forestal del género *Sorbus* en España. Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales; Fuera de serie:166-186.

Piagniani, M.C., Debellini, C. y LoScalzo, R. 2012. Phyllometry and carpometry, chemical and functional characterization of fruits of *Sorbus domestica* L. (service tree) selections. Journal of Berry Research; 2: 7-22.

Re, R., N. Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, M. O. Yang y C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26: 1231–1237.

Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S. y Valero, D. 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 2741-2745.

Singleton, V. L., R. Orthofer y R. M. Lamuela- Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299: 159-178.

Termentzi, A y Kokkalou E. 2008. LC-DAD-MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage. Food Chemistry. 106: 1234-1245.

Termentzi, A., Kokkalou E. y Kelafas P. 2006. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. Food Chemistry. 98: 599-608.

Termentzi, A., Kokkalou, E. y Zervou, M. 2008. Isolation and structure elucidation of novel phenolic constituents from *Sorbus domestica* fruits. Food Chemistry. 116: 371-81.

Trópicos, 2019 consultado en la siguiente página web:
<https://www.tropicos.org/Name/27803722>

Zhuang, X.P. & Lu, Y.Y. & Yang, G.S. (1992). Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. Chinese Herbal Medicine. 23: 122-124.



ANEXOS

ANEXO 1 (Tablas de resultados)

PESO	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	10.3205 ± 0.779388
Estado 2	9.7665 ± 0.861649
Estado 3	11.2785 ± 0.706338
Estado 4	9.928 ± 0.734487

DIÁMETRO	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	25.9555 ± 0.745378
Estado 2	25.0155 ± 0.916222
Estado 3	25.57 ± 0.632539
Estado 4	23.8305 ± 0.755801

LONGITUD	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	25.4765 ± 0.595056
Estado 2	24.5745 ± 0.576851
Estado 3	26.159 ± 0.606044
Estado 4	23.7295 ± 0.602764

COLOR L*	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	67.4245 ± 0.829075
Estado 2	60.908 ± 0.989578
Estado 3	49.478 ± 1.11439
Estado 4	35.994 ± 0.733686

COLOR a*	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	-6.006 ± 0.894481
Estado 2	4.705 ± 1.32597
Estado 3	4.1335 ± 0.959673
Estado 4	8.7395 ± 0.230023

COLOR b*	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	38.03 ± 0.923643
Estado 2	33.588 ± 0.858858
Estado 3	24.21 ± 1.50951
Estado 4	10.185 ± 0.890015

SST	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	23.9167 ± 0.0872417
Estado 2	21.3167 ± 0.433141
Estado 3	20.7167 ± 0.349682
Estado 4	19.85 ± 0.284898

ACIDEZ	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	1.08333 ± 0.123576
Estado 2	0.801667 ± 0.0740008
Estado 3	0.785 ± 0.0371259
Estado 4	0.805 ± 0.0369459

pH		
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media</i>	<i>Error estándar</i>
Estado 1	3.88167	
Estado 2	4.00167	
Estado 3	3.83833	
Estado 4	3.754	

SACAROSA	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	13.195 ± 2.69712
Estado 2	5.63167 ± 1.04581
Estado 3	5.91167 ± 1.53933
Estado 4	3.365 ± 0.253597

MALTITOL	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	28.5567 ± 0.569618
Estado 2	26.6217 ± 0.597882
Estado 3	27.9967 ± 0.196344
Estado 4	28.18 ± 0.397635

FRUCTOSA	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	603.648 ± 22.1448
Estado 2	579.948 ± 29.5284
Estado 3	600.557 ± 22.3702
Estado 4	611.1 ± 39.9954

GLUCOSA	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	171.543 ± 12.1065
Estado 2	170.578 ± 4.54996
Estado 3	175.388 ± 13.0973
Estado 4	180.858 ± 7.62139

QUÍNICO	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media Error estándar</i>
Estado 1	59.9583 ± 1.68639
Estado 2	56.6833 ± 1.09715
Estado 3	51.2433 ± 1.48652
Estado 4	42.15 ± 1.60638

MÁLICO	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	8.145 ± 0.744646
Estado 2	7.23 ± 0.820455
Estado 3	7.55667 ± 0.713357
Estado 4	7.98833 ± 0.845354

PROTEÍNAS	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	1.78125 ± 0.140171
Estado 2	1.50875 ± 0.0748674
Estado 3	1.4625 ± 0.041003
Estado 4	1.59625 ± 0.0492783

FENOLES TOTALES	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	6260.28 ± 297.344
Estado 2	6083.94 ± 263.314
Estado 3	2499.04 ± 215.397
Estado 4	1877.94 ± 83.7254

FLAVONOIDES TOTALES		
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media</i>	<i>Error estándar</i>
Estado 1	1888.95	
Estado 2	1882.01	
Estado 3	1061.71	
Estado 4	611.051	

FLAVONOLES TOTALES	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	1670.6 ± 65.6191
Estado 2	1738.49 ± 90.1372
Estado 3	404.159 ± 68.6427
Estado 4	178.526 ± 16.6962

AAT HIDROSOLUBLE	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	447.703 ± 76.0541
Estado 2	379.823 ± 63.2
Estado 3	277.998 ± 44.8658
Estado 4	299.703 ± 37.6137

AAT FRACCIÓN LIPOSOLUBLE	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	56.3092 ± 10.0847
Estado 2	68.3925 ± 9.95283
Estado 3	62.08 ± 15.0669
Estado 4	27.455 ± 7.84796

ABTS	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	87.7133 ± 1.03431
Estado 2	88.4617 ± 1.63524
Estado 3	85.8583 ± 1.01805
Estado 4	69.935 ± 1.32274

DPPH	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	8389.39 ± 207.449
Estado 2	9111.5 ± 233.97
Estado 3	8627.58 ± 237.598
Estado 4	8598.57 ± 104.066

FRAP	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media Error estándar</i>
Estado 1	356.533 ± 34.2927
Estado 2	432.743 ± 34.8181
Estado 3	26.6467 ± 5.25589
Estado 4	0.566667 ± 0.114504

CAROTENOIDES		
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media</i>	<i>Error estándar</i>
Estado 1	3.94517	
Estado 2	3.957	
Estado 3	4.0095	
Estado 4	4.04617	

CLOROFILAS TOTALES	
<i>Estado de maduración</i>	<i>Media ± Error estándar</i>
Estado 1	10.1595 ± 2.44694
Estado 2	9.7125 ± 2.10496
Estado 3	5.9135 ± 0.823096
Estado 4	3.5375 ± 0.146119