

# **El aclareo en fruto: ¿una nueva fuente de compuestos funcionales?**

Diego Redondo Taberner

Trabajo Fin de Máster

Tutores:

Esther Arias Álvarez

María Eugenia Venturini Crespo

Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

## ÍNDICE

<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Técnica agronómica del aclareo y parámetros de producción del melocotón, nectarina y paraguayo .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. El aclareo.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Parámetros de producción del melocotón .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3. Parámetros de producción de la nectarina .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.4. Parámetros de producción del paraguayo .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Aprovechamiento y revalorización de los subproductos de la industria alimentaria.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Compuestos de interés tecnológico y/o funcional.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1. Los radicales libres.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2. Los compuestos antioxidantes .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.3. Los compuestos fenólicos.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.4. Los flavonoides .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.5. Otros compuestos de interés.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.6. Productos de origen vegetal con reconocida capacidad antioxidante .....</b>	<b>13</b>
<b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Material vegetal.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Parámetros agronómicos y de calidad postcosecha .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.1. Calibre, peso y porcentaje de tipo de tejido (piel, pulpa y semilla) ..</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2. Medida instrumental del color .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3. Sólidos solubles .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.4. Acidez valorable .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.5. Índice de madurez.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.6. Textura .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.7. Actividad respiratoria.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.8. Producción de etileno .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Cuantificación de los compuestos de interés .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.1. Extracción, cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.1.1. Obtención del extracto fenólico .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos .....</b>	<b>21</b>

3.3.1.3. Cuantificación de flavonoides .....	21
3.3.1.4. Identificación de compuestos fenólicos .....	21
3.3.2. Métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante .....	22
3.3.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	22
3.3.2.2. FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica).....	23
3.3.2.3. ORAC (Capacidad Antioxidante frente al Radical Oxígeno).....	23
3.3.2.4. Poder reductor .....	24
3.3.2.5. Porcentaje de secuestro del radical superóxido .....	24
3.4. Análisis estadístico.....	24
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
4.1. Caracterización inicial del desarrollo madurativo del fruto. Estudio de los parámetros postcosecha.....	25
4.2. Estudio del contenido de compuestos fenólicos en los frutos derivados del aclareo.....	27
4.3. Identificación de los compuestos fenólicos de mayor interés .....	30
4.4. Capacidad antioxidante de los frutos derivados del aclareo .....	35
4.5. Análisis de las correlaciones entre los diferentes métodos .....	42
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>46</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Ejemplo de diferentes frutos procedentes de la técnica del aclareo en fruto.....	1
Figura 2. Ejemplo de ramas de melocotonero antes (izquierda) y después (derecha) de realizar el aclareo.....	2
Figura 3. Melocotonero en flor.....	2
Figura 4. Nectarino en flor.....	3
Figura 5. Paraguayo en flor.....	4
Figura 6. Estructura de los diferentes flavonoides (Rice-Evans et al. 1997).....	11
Figura 7. Melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO 3' (de izquierda a derecha) en aclareo (A) y madurez comercial (B).....	16
Figura 8. Medida del color mediante espectrorradiómetro IS CAS 140.....	16
Figura 9. Espacio de color CIELAB.....	17
Figura 10. Refractómetro digital ATAGO DBX 55A.....	18
Figura 11. Titulador automático Crison Compact Titrator para la determinación de la acidez.....	18
Figura 12. Ensayo de penetración mediante Texturómetro TA-XT2I (A) y curva característica (B).....	19
Figura 13. Analizador automático de gases PBI Dansensor.....	20
Figura 14. Cromatógrafo de gases FID para determinación de etileno.....	20
Figura 15. Soluciones estándar utilizadas para la recta patrón de Trolox (0-60 $\mu$ M) en la determinación de la actividad antioxidante.....	22
Figura 16. Melocotón 'Royal Glory' procedente del aclareo y cosechado en grado de madurez comercial.....	26
Figura 17. Nectarina 'Laura' procedente del aclareo y cosechado en grado de madurez comercial.....	27
Figura 18. Paraguayo 'UFO 3' procedente del aclareo y cosechado en grado de madurez comercial.....	27
Figura 19. Cromatograma de la pulpa del melocotón 'Royal Glory' en el aclareo (A) y en el grado comercial (B) a 280 nm. 1: ác. gálico; 2: ác. clorogénico; 3: ác. cumárico; 4: quer cetina.33	33
Figura 20. Cromatograma de la pulpa de la nectarina 'Laura' en el aclareo (A) y en el grado comercial (B) a 280 nm. 1: ác. gálico; 2: ác. clorogénico.....	33
Figura 21. Cromatograma de la pulpa del paraguayo 'UFO 3' en el aclareo (A) y en el grado comercial (B) a 280 nm. 1: ác. gálico; 2: ác. clorogénico.....	34
Figura 22. Evolución de la fluorescencia relativa (%) en función del tiempo (min) para la determinación de la capacidad antioxidante determinada por el método ORAC en los frutos del aclareo del melocotón, nectarina y paraguayo, con Trolox como estándar. ....	40

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Clasificación botánica del melocotonero. ....	2
Tabla 2. Clasificación botánica de la nectarina. ....	3
Tabla 3. Clasificación botánica del paraguayo. ....	4
Tabla 4. Principales especies reactivas relacionadas con el estrés oxidativo (Ramírez 2009). ....	7
Tabla 5. Capacidad antioxidante determinada por el método FRAP de diferentes productos de origen vegetal. ....	9
Tabla 6. Clasificación de los compuestos fenólicos (Martínez-Navarrete et al. 2008). ....	9
Tabla 7. Contenido en fenoles de diferentes productos de origen vegetal. ....	10
Tabla 8. Contenido en flavonoides de diferentes productos de origen vegetal. ....	12
Tabla 9. Especies y variedades estudiadas. Fechas de aclareo y recolección. ....	15
Tabla 10. Peso, porcentaje en peso del tipo de tejido y calibre del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial. ....	25
Tabla 11. Color, sólidos solubles, acidez e índice de madurez del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial. ....	25
Tabla 12. Actividad respiratoria y producción de etileno del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial. ....	26
Tabla 13. Contenido en fenoles del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial. ....	28
Tabla 14. Contenido en fenoles y flavonoides del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial. ....	29
Tabla 15. Contenido en fenoles del fruto entero del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' procedente del aclareo. ....	30
Tabla 16. Concentración (mg/100 g) de los fenoles identificados del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial. ....	32
Tabla 17. Ventajas y desventajas de los métodos utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante. ....	36
Tabla 18. Actividad antioxidante determinada por DPPH, FRAP, ORAC, poder reductor y secuestro del radical superóxido del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial <sup>a</sup> . ....	37
Tabla 19. Actividad antioxidante determinada por DPPH, FRAP, ORAC, poder reductor y secuestro del radical superóxido del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos enteros procedentes del aclareo <sup>a</sup> . ....	38
Tabla 20. Actividad antioxidante determinada por DPPH, FRAP, ORAC, poder reductor y secuestro del radical superóxido del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos enteros y la semilla procedentes del aclareo <sup>a</sup> . ....	39
Tabla 21. Correlaciones entre los diferentes métodos investigados para todas las frutas analizadas. ....	42
Tabla 22. Correlaciones entre los diferentes métodos investigados para el melocotón 'Royal Glory'. ....	43
Tabla 23. Correlaciones entre los diferentes métodos investigados para la nectarina 'Laura' ....	43
Tabla 24. Correlaciones entre los diferentes métodos investigados para el paraguayo 'UFO 3' ....	43

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Técnica agronómica del aclareo y parámetros de producción del melocotón, nectarina y paraguayo

#### 1.1.1. El aclareo

El aclareo en fruto es una técnica agrícola cuyo objetivo es descargar el árbol de un excesivo número de frutos para obtener un producto final de mayor tamaño, evitar un peso excesivo en las ramas y conseguir una distribución uniforme de los frutos por todo el árbol. Se ha comprobado además que con la etapa del aclareo, en algunas especies frutales, se logra minimizar la llamada vecería, fenómeno que consiste en que un año el árbol tiene mucha producción mientras que al año siguiente el número de frutos es menor (figura 1).



**Figura 1.** Ejemplo de diferentes frutos procedentes de la técnica del aclareo en fruto.

Igualmente, el aclareo de frutos resulta imprescindible, debido a los efectos que tiene sobre el calibre y la precocidad. La mejor época para realizar el aclareo es después de la caída de pequeños frutos no fecundados y antes del endurecimiento del hueso, aproximadamente unos 30-40 días después de la plena floración, cuando el fruto tiene un tamaño comprendido entre 2 y 5 cm. Se suele dejar un fruto por cada 15-20 cm de distancia en rama.

El momento en el que se lleva a cabo el aclareo es determinante. Si se realiza a cabo un aclareo muy precoz se favorece la formación de frutos de mayor tamaño, mientras que si se realiza un aclareo demasiado tardío éste será poco eficaz. Igualmente, la intensidad del aclareo depende del año, si hay un buen cuajado y muchos frutos, puede llegar a ser del 80 % de las piezas del árbol. En años normales el aclareo será de aproximadamente un 50 %, retirándose la mitad de los frutos de las ramas.

La selección de los frutos es muy importante, debiendo estar bien desarrollados y presentar una buena posición en la rama para que no se deformen, no tengan heridas por las ramas de alrededor y se facilite la recogida cuando esté maduro.

En la figura 2 se muestra en la imagen de la izquierda, una rama de melocotón con muchos frutos (justo antes de realizar el aclareo), y en la imagen de la derecha, el estado de la rama justo después del aclareo.



**Figura 2.** Ejemplo de ramas de melocotonero antes (izquierda) y después (derecha) de realizar el aclareo.

La práctica del aclareo supone un coste adicional para el productor. Estos costes por árbol se estiman entre 25 y 30 min y entre 3,43 y 4,11 euros, por ejemplo, en el caso del melocotón (Martín et al. 2010).

### 1.1.2. Parámetros de producción del melocotón

El melocotonero [*Prunus persica* (L.) Batsch] (figura 3) es una especie frutal originaria de China donde las referencias a su cultivo se remontan hace 3.000 años y actualmente su cultivo está muy extendido en todo el mundo. En la tabla 1 se muestra la clasificación botánica a la que pertenece el melocotón.

**Tabla 1.** Clasificación botánica del melocotonero.

<b>Clase</b>	Magnoliata
<b>Subclase</b>	Rosida
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Subfamilia</b>	Prunoidea
<b>Género</b>	<i>Prunus</i>
<b>Especie</b>	<i>persica</i>



**Figura 3.** Melocotonero en flor.

A escala mundial, el melocotonero es la segunda especie frutícola de climas templados, después del manzano, con 17,5 millones de t producidas, lo que supone el 3,5 % del total de fruta recolectada. Los principales productores son China, Italia, España, Estados Unidos y Grecia (FAOSTAT 2012).

En Europa se obtienen 4,3 millones de t de melocotón. En 2009, los principales países productores fueron Italia (1,7 millones de t), España (1,1 millones de t) y Grecia (700.000 t) (FAOSTAT 2012).

La producción de melocotón en España muestra una regionalización importante con 4 comunidades aportando el 82 % de la superficie productora. Estas cuatro comunidades son Cataluña, Aragón, Comunidad de Murcia y Andalucía (MAGRAMA 2012). En cuanto a la producción, en el año 2009 fue de 1.100.000 t, destacando Cataluña (320.554 t) y Aragón (202.795 t) (MAGRAMA 2012).

En el melocotón, el aclareo suele realizarse unos 40 días después de la floración (entorno a finales de mayo o principios de junio) y el fruto tiene un tamaño de 2-3 cm.

### 1.1.3. Parámetros de producción de la nectarina

El nectarino (figura 4) es un árbol derivado por mutación de los melocotoneros comunes y los únicos caracteres diferenciales son la ausencia de vellosidad en la piel del fruto. Su clasificación es *Prunus persica* var nectarina (figura 4).

**Tabla 2.** Clasificación botánica de la nectarina.

<b>Clase</b>	Magnoliata
<b>Subclase</b>	Rosida
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Subfamilia</b>	Prunoidea
<b>Género</b>	<i>Prunus</i>
<b>Especie</b>	<i>persica</i>
<b>Variedad</b>	nectarina



**Figura 4.** Nectarino en flor.

Las referencias históricas de la nectarina en Europa son recientes. Prácticamente no existe ningún texto escrito que la mencione hasta el siglo XVII en Inglaterra y en América, donde la llevaron los colonizadores europeos.

La producción nacional de nectarina en el año 2009 fue de 438.741 t, centrándose sobre todo en Cataluña (118.823 t) y Aragón (100.302 t) (MAGRAMA 2012).

Las nectarinas son frutales propios de las zonas de poca altitud, desde el mismo nivel del mar hasta alturas de 300 metros. Estas no tienen la necesidad de un largo

reposo invernal como ciertas variedades de melocotonero, prefiriendo climas de inviernos cortos y relativamente templados y veranos largos de atmósfera seca, por ser muy sensible a las humedades, ya que pueden favorecer el desarrollo de enfermedades y la pérdida del fruto por agrietamiento.

El aclareo en fruto en la nectarina suele realizarse a los 45-50 días después de la floración (finales de mayo o principios de junio) y con un tamaño de fruto de 2-4 cm.

#### 1.1.4. Parámetros de producción del paraguayo

El paraguayo (*Prunus persica* var. *platycarp*) (tabla 3) es una variedad de melocotón surgida también de una mutación natural (figura 5). Conserva la piel aterciopelada y la textura de algunas variedades de melocotón, pero con una descarada forma aplastada, siendo también un fruto de menor tamaño.

**Tabla 3.** Clasificación botánica del paraguayo.

<b>Clase</b>	Magnoliata
<b>Subclase</b>	Rosida
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Subfamilia</b>	Prunoidea
<b>Género</b>	<i>Prunus</i>
<b>Especie</b>	<i>persica</i>
<b>Variedad</b>	<i>platycarp</i>



**Figura 5.** Paraguayo en flor.

Igual que el melocotón, se dice que el paraguayo procede de Asia. Su cultivo en China se produce desde hace siglos, y parece ser que se introdujo en Estados Unidos en 1800, pero fue alrededor de 1990 cuando empezó a apreciarse mucho más y a realizarse grandes cultivos en otros países.

La producción de paraguayo en España en el año 2008 fue de 51.000 t, destacando la Región de Murcia y el Valle del Ebro (Iglesias 2011).

Con un porte del árbol que varía entre los 2 y los 5 metros, presenta unas exigencias de clima, suelo y cultivo similares al melocotonero y a la nectarina.

En el paraguayo, el aclareo en fruto suele realizarse transcurridos 40-50 días después de la floración (finales de mayo) y con un tamaño de fruto de 2-3 cm.

## **1.2. Aprovechamiento y revalorización de los subproductos de la industria alimentaria**

Aragón es una de las regiones más importantes en la producción de frutas y hortalizas de España ya que cuenta con más de 138.000 hectáreas de frutales y cerca de 4.200 hectáreas de hortalizas. Nuestra comunidad es la primera productora nacional de melocotón y nectarina (202.795 t) y la segunda de albaricoque (2.880 t). La producción anual de fruta es de aproximadamente 271 millones de euros, y representa el 8,6 % de la producción final agrícola de Aragón (DGA 2011). Por otro lado, la producción y transformación de estas frutas y hortalizas genera grandes cantidades de residuos sólidos y líquidos. La recuperación total o parcial de estos residuos supondría ventajas tanto de tipo económico, como social y medioambiental.

En el caso de los residuos orgánicos de origen vegetal, la valorización parece ser la alternativa con más ventajas medioambientales y económicas. Así, se define valorización como todo procedimiento que permita el aprovechamiento de los recursos contenidos en los residuos, sin poner en peligro la salud humana y sin utilizar métodos que puedan causar perjuicios al medio ambiente. El objetivo es lograr reducir al máximo el flujo de materiales residuales a vertedero o incineración, que son técnicas de eliminación altamente contaminantes, pero que se emplean mayoritariamente en muchos países europeos (Ayala-Zavala et al. 2011).

Estos subproductos proceden principalmente del procesado de la industria alimentaria pero los derivados de las propias prácticas agrícolas, dentro de las cuales podríamos destacar la etapa del aclareo, también podrían ser considerados una fuente importante. El posible aprovechamiento de este tipo de subproductos supondría un beneficio para los agricultores tanto desde un punto de vista económico, como medioambiental.

Se ha demostrado que mucho de los subproductos agroalimentarios contienen compuestos de interés que pueden ser utilizados como ingredientes con funciones nutricionales, tecnológicas o terapéuticas. Generalmente, los ingredientes alimentarios obtenidos a partir de subproductos alimenticios se consideran seguros (GRAS por la United States Food and Drug Administration), máxime si se producen mediante procesos limpios y no contaminantes. En consecuencia, la obtención de los mencionados ingredientes representa una de las vías de mayor interés para el aprovechamiento y valorización de los subproductos agroalimentarios. Además en los últimos años, las tendencias mundiales de la alimentación indican un creciente interés de los consumidores hacia ciertos alimentos que, además de contener nutrientes,

contengan sustancias que cumplan una función beneficiosa en la reducción de la incidencia de ciertas enfermedades (Ayala-Zavala et al. 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que el contenido fenólico en algunas frutas es mayor cuanto menor índice de madurez presenta el fruto (Celli et al. 2011), por lo que es de suponer que a partir de los frutos procedentes del aclareo en los que el desarrollo madurativo está muy poco avanzado, se podrían obtener compuestos de interés. Entre estos compuestos bioactivos se encuentran azúcares, ácidos orgánicos, sustancias colorantes, proteínas, antioxidantes, antimicrobianos, aromas, aceites y vitaminas, entre otras y que pueden ser importantes en las industrias alimentaria, farmacéutica, química o cosmética (Ayala-Zavala et al. 2011). Estas sustancias no solo aportan a las frutas características visuales de color y sabor, sino que también son responsables de propiedades beneficiosas para la salud por su actuación como antioxidantes mediante la neutralización de radicales libres, implicados en la mayoría de las enfermedades degenerativas (Sánchez-Moreno 2002).

### **1.3. Compuestos de interés tecnológico y/o funcional**

#### **1.3.1. Los radicales libres**

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos. Estos radicales recorren nuestro organismo intentando captar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida biológica media del radical libre es de microsegundos; pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a las moléculas y a las membranas celulares. Este daño también puede ser provocado por otro tipo de sustancias, clasificadas como no radicales, pero que son muy inestables y pueden dar lugar a radicales libres (Ramírez 2009). En la tabla 4 se muestra un resumen de las especies reactivas con mayor relevancia en el estrés oxidativo *in vivo*.

Los procesos normales del organismo producen radicales libres como producto del metabolismo de los alimentos, la actividad respiratoria y el ejercicio. También estamos expuestos a elementos del medio ambiente que generan radicales libres como la polución industrial, tabaco, radiación, medicamentos, aditivos químicos, en los alimentos procesados y pesticidas. Sin embargo, los radicales libres no son

intrínsecamente perjudiciales para la salud. De hecho, nuestro propio cuerpo los fabrica en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. Los radicales libres producidos por el cuerpo para llevar a cabo determinadas funciones son neutralizados fácilmente por nuestro propio sistema. Con este fin, nuestro cuerpo produce unos enzimas como la catalasa o la dismutasa, que son los encargados de neutralizarlos. Estos enzimas tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres sin desestabilizar su propio estado (Sánchez-Moreno 2002).

**Tabla 4.** Principales especies reactivas relacionadas con el estrés oxidativo (Ramírez 2009).

Radicales		No radicales	
$O_2^-$	Superóxido	$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
$HO^-$	Hidróxilo	$O_2$	Oxígeno singlete
$HO_2^-$	Hidroperóxilo	LOOH	Hidroperóxido lipídico
$L^-$	Lipídico	Fe=O	Complejo hierro-oxígeno
$LO_2^-$	Peroxil lipídico	HOCl	Hipoclorito
$LO^-$	Alcoxil lipídico		
$NO_2^-$	Dióxido nitrógeno		
$NO^-$	Óxido nítrico		
$RS^-$	Tiol		
$P^-$	Proteico		

No obstante, en determinadas circunstancias, la producción de radicales libres puede aumentar de forma no controlada, situación conocida con el nombre de estrés oxidativo. Este concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres. Esto puede provocar que se tomen electrones de los lípidos y proteínas de la membrana celular, haciendo imposible el proceso de regeneración y reproducción celular. En el interior de la célula, los radicales libres atacan el DNA (material genético) que provee la matriz para la replicación celular, impidiendo a la célula su reproducción (Rice-Evans et al. 1997). De esta forma, los radicales libres contribuyen al proceso del envejecimiento cuando toman el electrón que les hace falta de las células del tejido colágeno de la piel. Los radicales libres también pueden contribuir al crecimiento anormal de las células, al perder éstas la capacidad de “reconocer” las células vecinas. Esta proliferación sin control se produce en los tumores benignos o malignos. Muchas enfermedades crónicas se han ligado directamente con los radicales libres, como la enfermedad cardiovascular, Alzheimer, accidente vascular cerebral, hepatitis, hipertensión, artritis reumatoide, lupus, diabetes mellitus, enfermedad periodontal, colitis ulcerativa, aterosclerosis, fallo renal crónico y muchas otras (Martínez-Valverde et al. 2000). Por lo tanto, hay que intentar controlar el exceso de producción de estos radicales libres y

bloquear parte del daño que producen. Esta función de protección la cumplen los compuestos antioxidantes.

### **1.3.2. Los compuestos antioxidantes**

Los antioxidantes, que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos, son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros a nivel de membrana, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas.

Los antioxidantes se pueden clasificar en dos tipos (Ramírez 2009):

- Antioxidantes endógenos: son mecanismos enzimáticos del propio organismo como la superóxidodismutasa, la catalasa, el glutatióperoxidasa, el glutatió y la coenzima Q-. Algunos enzimas necesitan cofactores metálicos como selenio, cobre, zinc y magnesio para poder realizar el mecanismo de protección celular. El glutatió, por ejemplo, contiene selenio y ayuda en la prevención de la formación del radical hidroxilo, también regenera la vitamina C, que a su vez regenera la vitamina E.
- Antioxidantes exógenos: son introducidos por la dieta o añadidos a los alimentos y se depositan en las membranas celulares. Entre ellos se encuentran antioxidantes naturales como las vitaminas E y C y el caroteno. También se pueden encontrar fenoles y flavonoides que son compuestos polifenólicos encontrados en alimentos de origen vegetal, y cuya capacidad antioxidante ha sido ampliamente demostrada. Entre los antioxidantes sintéticos, destacan butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroquinona (TBHQ) o ácido nordihidroguaiaretico (ANDG), aunque la tendencia actual es evitar su uso.

En la siguiente tabla 5 se muestran algunos ejemplos de frutas con elevada capacidad antioxidante.

**Tabla 5.** Capacidad antioxidante determinada por el método FRAP de diferentes productos de origen vegetal.

Producto	Capacidad antioxidante (mmol/100g)	Referencia	Producto	Capacidad antioxidante (mmol/100g)	Referencia
Mango	0,38	(Guo et al. 2003)	Pepino	2,15	(Halvorsen et al. 2006)
Piña	0,80	(Guo et al. 2003)	Granada	3,10	(Guo et al. 2003)
Kiwi	1,32	(Halvorsen et al. 2006)	Arándano	3,28	(Halvorsen et al. 2006)
Ciruela	1,33	(Halvorsen et al. 2006)	Mora	3,99	(Halvorsen et al. 2006)
Cerezas	1,80	(Halvorsen et al. 2006)	Nueces	13,12	(Halvorsen et al. 2006)
Naranja	1,89	(Guo et al. 2003)	Clavo	125,55	(Halvorsen et al. 2006)

### 1.3.3. Los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividades (Martínez-Valverde et al. 2000). Químicamente poseen un anillo aromático, un anillo benceno (con uno o más grupos hidróxilo) que incluyen además, derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc (Martínez-Navarrete et al. 2008). Su clasificación (tabla 6) es muy compleja debido al gran número de compuestos que la forman, dividiéndose en diferentes grupos:

**Tabla 6.** Clasificación de los compuestos fenólicos (Martínez-Navarrete et al. 2008).

Compuestos fenólicos
Fenoles simples
Ácidos benzoicos y derivados
Acetofenonas y ácidos fenil acéticos
Ácidos cinámicos y derivados
Cumarinas y derivados
Flavonoides y derivados
Benzofenonas y derivados
Xantonas
Taninos

Todos ellos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal. Son los responsables del color de ciertas frutas y de la formación de quinonas durante la reacción de pardoamiento enzimático. Además, algunos de estos fenoles son responsables de la astringencia y el sabor amargo que presentan muchas frutas antes de alcanzar el grado de madurez óptimo determinado desde el punto de vista organoléptico (Martínez-Valverde et al. 2000).

Igualmente, a los compuestos fenólicos también se les relaciona con numerosos beneficios para la salud, debido sobre todo a que pueden actuar como antioxidantes. Para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante debe cumplir dos condiciones básicas. La primera es que cuando se encuentre en concentración baja

con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar, enlentecer o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre. La segunda es que el radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores. Entre los compuestos fenólicos con reconocida actividad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos, los taninos y las cumarinas, los cuales constituyen la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos, entre los que destacan las hortalizas y sobre todo las frutas, y entre ellas las que denominamos frutos rojos (tabla 7).

El potencial de los compuestos fenólicos como antioxidantes depende, en gran medida, de su estructura química. El fenol por si mismo es inactivo como antioxidante, sin embargo, los compuestos orto- y para- difenólicos poseen actividad antioxidante, la cual incrementa con la sustitución de sus átomos de hidrógeno por grupos etil- o n-butil-.

**Tabla 7.** Contenido en fenoles de diferentes productos de origen vegetal.

Producto	Fenoles (mg/100g)	Referencia	Producto	Fenoles (mg/100g)	Referencia
Pera	11,7	(Li et al. 2011)	Cereza	105,0	(Fu et al. 2011)
Banana	11,8	(Fu et al. 2011)	Frambuesa	114,0	(Aaby et al. 2012)
Melón	23,1	(USDA 2010)	Melocotón piel	133,7	(Babbar et al. 2011)
Tomate	25,9	(USDA 2010)	Ciruela roja	143,5	(Fu et al. 2011)
Melocotón pulpa	41,5	(Babbar et al. 2011)	Granada	146,9	(Fu et al. 2011)
Cáscara almendra	42,5	(Balasundram et al. 2006)	Naranja pulpa	154,0	(Balasundram et al. 2006)
Zanahoria	56,4	(USDA 2010)	Arándano	171,0	(Fu et al. 2011)
Manzana	68,3	(Fu et al. 2011)	Uva	200,1	(Fu et al. 2011)
Cebolla	76,3	(USDA 2010)	Mora	417,0	(Fu et al. 2011)

### 1.3.4. Los flavonoides

Los flavonoides son considerados el grupo de compuestos polifenólicos con la actividad antioxidante más potente. Su estructura base está formada por un anillo bencénico (A) unido a una cadena propiónica (C) que está unida a su vez a otro anillo bencénico (B) (figura 6). A partir de esta estructura básica se forman todos los flavonoides al unirse diversos grupos químicos, entre los que se encuentran azúcares o sus derivados. Así, las diferentes configuraciones posibles hacen que estos compuestos se dividan en flavonoles, flavonas, flavanoles e isoflavonas.

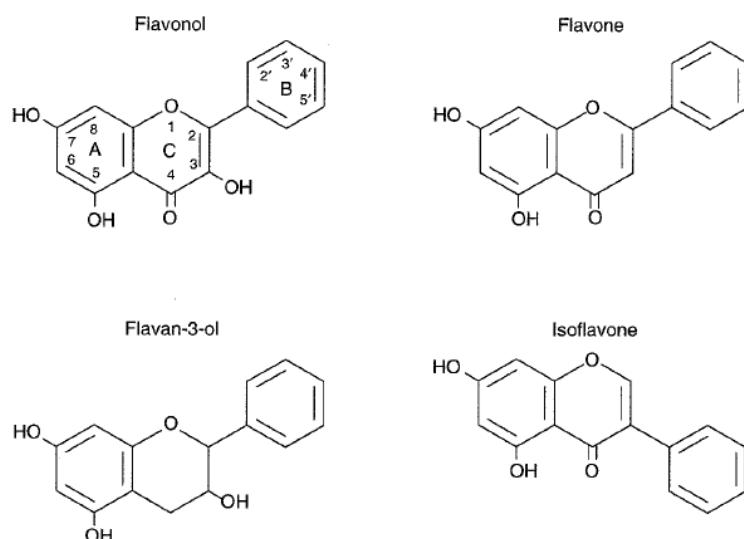


Figura 6. Estructura de los diferentes flavonoides (Rice-Evans et al. 1997).

La actividad antioxidante de estos compuestos está relacionada primero, con la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales les confieren una elevada estabilidad, participando en la deslocalización del electrón, y segundo, un doble enlace entre los carbonos C2 y C3 del anillo C en conjugación con un grupo carbonilo en la posición C4, lo cual hace posible la deslocalización de un electrón en el anillo B. La potencia antioxidante se relaciona en términos estructurales con la deslocalización de un electrón en grupos aromáticos. Cuando estos compuestos reaccionan con radicales libres, los radicales fenoxilo producidos se estabilizan por el efecto resonante de los núcleos aromáticos. Finalmente los grupos hidroxilo libres en la posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 también son importantes en la actividad antioxidante (Sánchez-Moreno 2002).

Entre todos los flavonoides, destaca la quercetina, un flavonoide que reúne todas estas características y que es uno de los antioxidantes naturales más potentes, y que se encuentra presente en frutas como manzanas, uvas, arándanos, cerezas y en verduras tales como cebollas o brócoli.

En la tabla 8 se muestran algunos de las frutas y hortalizas con mayor concentración de flavonoides.

**Tabla 8.** Contenido en flavonoides de diferentes productos de origen vegetal.

Producto	Flavonoides (mg/100g)	Referencia	Producto	Flavonoides (mg/100g)	Referencia
Tomate	12,8	Marinova et al 2005	Pera	48,5	Marinova et al 2005
Melocotón	15,0	Marinova et al 2005	Mora	55,5	Marinova et al 2005
Cereza	19,6	Marinova et al 2005	Fresa	69,7	Marinova et al 2005
Manzana Limoncella	19,8	D'Abrosca et al. 2007	Uva	77,1	Marinova et al 2005
Manzana amarilla	20,9	Marinova et al 2005	Lechuga	97,2	Marinova et al 2005
Frambuesa	26,6	Marinova et al 2005	Ciruela	136,2	Marinova et al 2005
Manzana roja	32,7	Marinova et al 2005	Arándano	190,3	Marinova et al 2005

### 1.3.5. Otros compuestos de interés

Además de fenoles y flavonoides, en la dieta se pueden introducir otras sustancias antioxidantes que ayudan al organismo a evitar el aumento de los radicales libres (Martínez-Navarrete et al. 2008):

- Beta caroteno presente en zanahoria, mango, tomates, melón ó melocotón.
- Vitamina E (tocoferol) es una sustancia antioxidante que mantiene la integridad de la membrana celular, protege la destrucción de la vitamina A, previene y disuelve los coágulos sanguíneos y retarda el envejecimiento celular. Se encuentra en muchas frutas y vegetales tales como: aguacate, boniato, espárragos, espinacas, tomates, brócoli, moras y zanahorias.
- La vitamina C (ácido ascórbico) es otro de los antioxidantes naturales que combaten el exceso de radicales libres. Necesaria para producir colágeno y para la metabolización de las grasas, por lo que se le atribuye el poder de reducir el colesterol. Las fuentes alimentarias de vitamina C más destacables son: grosellas, pimiento verde, kiwi, limón, fresas, coliflor, coles de Bruselas, naranjas, tomates y melón.
- El selenio actúa junto con la vitamina E como antioxidante, ayudando a nuestro metabolismo a luchar contra la acción de los radicales libres. También protege contra el cáncer, además de mantener en buen estado las funciones hepáticas, cardíacas y reproductoras. Las fuentes alimentarias de selenio son la carne, el pescado, los cereales integrales y los productos lácteos.

### **1.3.6. Productos de origen vegetal con reconocida capacidad antioxidante**

En la actualidad, debido a la preocupación expresada por los consumidores sobre el contenido en aditivos químicos de su dieta, existe un interés creciente en la industria alimentaria para sustituir los antioxidantes sintéticos por otros de origen natural. Este hecho ha potenciado la investigación y caracterización de compuestos antioxidantes procedentes de fuentes naturales como plantas, frutas, hortalizas, té, cereales, especias, semillas y algas, entre otros.

Algunas plantas como el romero y la salvia, poseen una gran actividad antioxidante y que debida principalmente a la presencia de abietanos o diterpenos fenólicos como el carnosol y al ácido carnósico. Otras muchas plantas y frutas de colores anaranjados o rojos, como el tomate, la zanahoria, etc., son ricas en carotenoides (xantofilas, carotenos, licopenos, etc.) que son excelentes antioxidantes lipídicos. Las frutas del bosque como las moras, grosellas, etc. y otras frutas de colores azulados-rosáceos (granada) contienen antocianinas que muestran actividades antioxidantes muy elevadas. Igualmente, en el vino tinto se ha relacionado su contenido en resveratrol, flavonoides y antocianos con la disminución de enfermedades coronarias. Se ha comprobado además que los compuestos fenólicos y oleósidos de la oliva y del aceite de oliva virgen extra actúan sinérgicamente con los tocoferoles protegiendo al aceite de la actuación del oxígeno y los radicales libres sobre los compuestos lipídicos y sobre muchas otras matrices alimenticias donde se adicionan. Diversos estudios han demostrado que los ácidos clorogénicos y algunos polifenoles del café y las catequinas y flavonoides del té reducen el riesgo de padecer diabetes tipo 2, cáncer colon-rectal y de hígado y disminuyen el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Estos compuestos parecen ejercer estas funciones tan beneficiosas para la salud humana debido principalmente a su capacidad para actuar como compuestos antioxidantes (Ramírez 2009).

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS

El presente trabajo está englobado dentro del proyecto “Caracterización y extracción de compuestos nutritivos y funcionales derivados del aclareo y procesado de la fruta” financiado por el departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente de la Diputación General de Aragón.

El **objetivo** global del estudio es la caracterización, desde un punto de vista tecnológico y funcional, de diferentes frutos de hueso procedentes de la práctica agrícola del aclareo llevada a cabo en distintas zonas de cultivo de Aragón. Los frutos seleccionados para este trabajo han sido **melocotón, nectarina y paraguayo**.

Para la consecución de este objetivo global se han planteado los siguientes objetivos parciales:

**1.- Estudio del desarrollo madurativo** de los frutos mediante el análisis de parámetros agronómicos, físico-químicos (calibre, peso, firmeza, acidez, °Brix, y color) y fisiológicos (producción de etileno y actividad respiratoria). Los frutos se caracterizarán tanto en el momento del aclareo como en su madurez comercial.

**2.- Determinación de la concentración de compuestos con interés tecnológico o funcional** de los frutos derivados del aclareo. Como control y a modo de comparación se llevará a cabo el análisis de estos mismos compuestos en el fruto recolectado en su grado de madurez comercial.

**3.- Estudio de la influencia del tipo de tejido (piel, pulpa o semilla) en la disponibilidad de los compuestos bioactivos.** Todas las determinaciones se realizarán en los tres tipos de tejido (piel, pulpa y semilla). De esta forma se comprobará la disponibilidad de los compuestos en función de su distribución en el fruto.

**4.- Identificación de los compuestos fenólicos en los distintos tipos de tejidos.**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

En la tabla 9 se detallan las especies y variedades utilizadas y sus fechas de aclareo y recolección:

**Tabla 9.** Especies y variedades estudiadas. Fechas de aclareo y recolección.

Fruto	Fecha aclareo	Fecha recolección
Melocotón 'Royal Glory'	06/05/2011	08/08/2011
Nectarina 'Laura'	27/04/2011	11/06/2011
Paraguayo 'UFO-3'	28/04/2011	22/06/2011

El melocotón 'Royal Glory' es una variedad temprana con fecha de recolección entre finales de junio y principios de julio. Es un árbol de vigor medio a fuerte con un fruto redondeado de calibre medio a grueso que se caracteriza por la coloración rojo intenso de su piel. Su pulpa está total o parcialmente desprendida del hueso, hecho especialmente relevante cuando el fruto llega a su madurez, y posee una carne jugosa, consistente y dulce.

La nectarina 'Laura' es una nueva variedad precoz con fecha de recolección aproximada comprendida entre el 1 y el 10 de julio. El árbol es de porte globoso con unas dimensiones medias de 4-6 metros y elevada productividad. Su elevada floribundidad implica un elevado coste de aclareo en zonas con poco riesgo de heladas. El fruto es de gran calibre y óptima calidad gustativa y el hueso no está adherido a la pulpa, de color amarillo. Su piel es lisa, de coloración rojo intenso.

La variedad 'UFO 3' es un paraguayo temprano que se recolecta en torno a finales de junio. El fruto presenta la pulpa de color blanco, y con el hueso adherido a ella, de gran aroma y buen sabor. La piel es de color amarillo con tonalidades rojas.

En el caso del paraguayo y la nectarina, los frutos procedieron de una finca perteneciente a la empresa Lafuente Tomey S.L. sita en el término municipal de La Almunia de Doña Godina (Zaragoza), mientras que el melocotón fue recolectado en una finca de la empresa Frutas García-Zurita sita en Nonaspe (Zaragoza).

Inmediatamente después de la práctica del aclareo o tras la recolección (figura 7) los frutos fueron transportados al laboratorio y conservados a 0 °C hasta su análisis



**Figura 7.** Melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO 3' (de izquierda a derecha) en aclareo (A) y madurez comercial (B).

### 3.2. Parámetros agronómicos y de calidad postcosecha

#### 3.2.1. Calibre, peso y porcentaje de tipo de tejido (piel, pulpa y semilla)

El diámetro, tanto polar como ecuatorial y el peso se determinaron en 25 frutos de cada especie. También se calculó el porcentaje en peso de cada tipo de tejido (piel, pulpa, y hueso o semilla).

#### 3.2.2. Medida instrumental del color

La medida instrumental del color se realizó con un espectrorradiómetro IS CAS 140 (Instrument Systems; München, Alemania), con una sonda telescópica TOP 100 de medida a distancia (figura 8) y analizada mediante el software ISCOLOR (Instrument Systems Optische Messtechnik GmbH; München, Alemania. Versión 2.53, 1996). La iluminación fue suministrada por una lámpara (12V-100W) de tipo 6834 de Royal Philips Electronics (Amsterdam, Holanda).



**Figura 8.** Medida del color mediante espectrorradiómetro IS CAS 140.

La determinación se realizó durante 3 segundos, mientras la fruta rotaba sobre sí misma 360º. Las medidas de reflexión se realizaron cada 1 nm en el espectro visible y en el infrarrojo, con un intervalo de medida de 360 nm a 900 nm. A partir de estas medidas se obtienen las coordenadas CIELAB,  $L^*, a^*, b^*$ , que forman parte de los parámetros CIE (Comisión Internationale del Éclairage). En este espacio de color,  $L^*$  indica luminosidad y  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas de cromaticidad, que indican direcciones de colores:  $+a^*$  es la dirección del rojo,  $-a^*$  es la dirección del verde,  $+b^*$  es la dirección del amarillo y  $-b^*$  es la dirección del azul (figura 9). El centro es acromático; a medida que los valores de  $a^*$  y  $b^*$  aumentan y el punto se separa del centro, la saturación del color se incrementa. Se utilizaron para estos cálculos el iluminante D65 y el observador CIE31 de 2º de campo visual adecuado al tamaño de los frutos. La medida se realizó sobre 25 muestras de cada fruta.

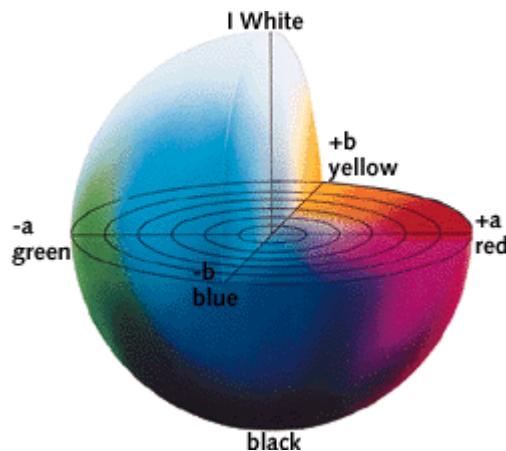


Figura 9. Espacio de color CIELAB.

### 3.2.3. Sólidos solubles

Para la determinación del contenido en sólidos solubles se siguió la técnica descrita en los Métodos Oficiales de Análisis de Zumos de Frutas (AOAC 1984). La medida se realizó por triplicado sobre los zumos obtenidos a partir de 20 frutos, analizándose en un refractómetro digital ATAGO DBX 55A, con corrector automático de temperatura (figura 10), por lo que los resultados se expresaron en °Brix a 20 °C.



**Figura 10.** Refractómetro digital ATAGO DBX 55A.

### 3.2.4. Acidez valorable

El contenido total en ácido naturales se determinó por valoración con una solución de hidróxido sódico por el método potenciométrico (AOAC 1990). El análisis se realizó por triplicado para cada una de las frutas por el siguiente procedimiento: 10 mL de zumo obtenido para la determinación de los sólidos solubles se diluyó hasta aproximadamente 100 mL con agua destilada, y se valoraron con hidróxido sódico 0,1 N hasta alcanzar pH=8,1. Se utilizó el titulador automático Crison Compact Titrator (figura 11) para la determinación de la acidez. La acidez total se expresó en gramos de ácido málico por 100 mL de zumo, por ser éste el ácido mayoritario de las frutas estudiadas.



**Figura 11.** Titulador automático Crison Compact Titrator para la determinación de la acidez.

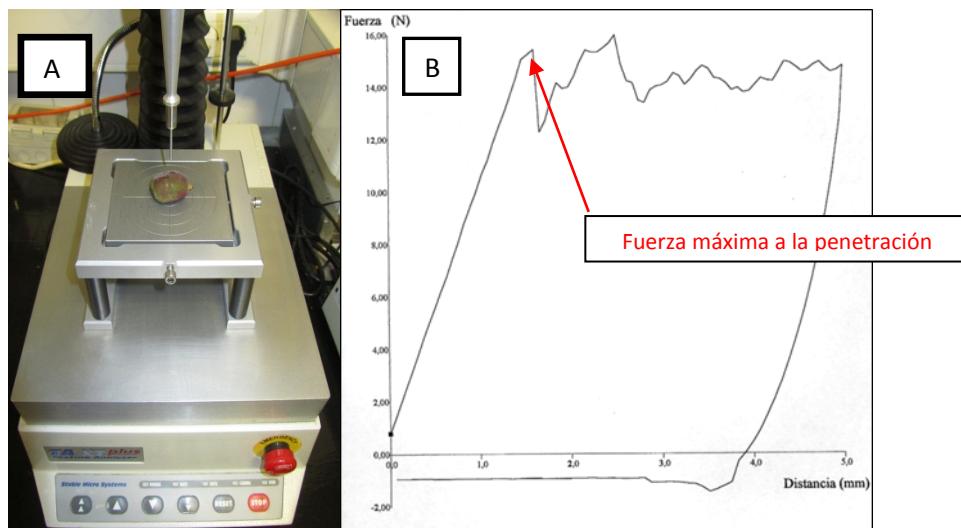
### 3.2.5. Índice de madurez

El índice de madurez se define como la relación existente entre el contenido en sólidos solubles y la acidez valorable.

### 3.2.6. Textura

La firmeza se determinó mediante un ensayo destructivo de penetración o Magness-Taylor, el cual se define como la fuerza necesaria para introducir en la zona ecuatorial del fruto un vástago cilíndrico. Las medidas instrumentales de textura se llevaron a cabo en un texturómetro TA-XT PLUS (Stable Micro Systems, Goaldming, Inglaterra) dotado con una célula de carga de 5 Kg, con el que se realizaron los ensayos de penetración sobre los frutos sin piel (figura 12A). En este ensayo se utilizó un vástago de 2 mm de diámetro, introduciéndolo hasta una profundidad de 4 mm a una velocidad de 0,83 mm/s. Los análisis se realizaron sobre 25 muestras.

Como resultado del análisis se obtienen las correspondientes curvas (figura 12B). A partir de estas gráficas se obtiene el esfuerzo máximo de penetración que se corresponde con el valor máximo sobre el eje Y, expresado por unidad de superficie (Kg/cm<sup>2</sup>).



**Figura 12.** Ensayo de penetración mediante Texturómetro TA-XT2I (A) y curva característica (B).

### 3.2.7. Actividad respiratoria

La concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> se midió empleando el sistema cerrado. Dicho método consistió en colocar los frutos, aproximadamente 200 g, en el interior de recipientes herméticos de 0,75 L y medir su tasa respiratoria después de 3 horas a temperatura ambiente. La medida de la concentración de gases en el espacio de cabeza de las muestras se realizó a través de un septum. Las muestras se analizaron utilizando un analizador automático de gases PBI Dansensor (figura 13), que nos permite obtener una medida inmediata del % de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> existente en el interior de los frascos de medida. Se realizaron 3 réplicas por cada tipo de fruta.



**Figura 13.** Analizador automático de gases PBI Dansensor.

### 3.2.8. Producción de etileno

El método empleado para la determinación de la producción de etileno fue el del sistema cerrado, y se utilizaron los mismos frascos de la actividad respiratoria. La extracción de las muestras se realizó a través de un septum mediante una jeringa Hamilton 1001RN Gastight especial para gases. La inyección de muestra fue de 1 mL tomado del espacio de cabeza de los frascos transcurridos aproximadamente 3 horas de respiración. La cuantificación del etileno se llevó a cabo al mediante un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 4890 dotado de un detector de ionización de llama con columna Hewlett Packard 19001A-QSO (figura 14).



**Figura 14.** Cromatógrafo de gases FID para determinación de etileno.

El tiempo de análisis fue de 5 minutos en condiciones isotermas, con el horno a 50 °C, el detector a 200 °C y el inyector a 50 °C, empleándose N<sub>2</sub> como gas portador. En estas condiciones el tiempo de retención del etileno fue 2,4 minutos.

### 3.3. Cuantificación de los compuestos de interés

Todos los compuestos se determinaron en piel, pulpa y hueso tanto de los frutos procedentes del aclareo como de los de grado de madurez comercial. Además también se analizó su concentración en el fruto entero procedente del aclareo.

### **3.3.1. Extracción, cuantificación e identificación de los compuestos fenólicos**

#### **3.3.1.1. Obtención del extracto fenólico**

Se llevó a cabo la extracción de 1 g de piel, pulpa o semilla con 5 mL de solución metanol:agua (80:20; v/v) por duplicado y se homogeneizó con ultraturrax (IKA-WERKE, DI 25 Basic, yellow line) durante 2 min y en frío centrifugándose posteriormente a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se combinaron y se filtraron a través de un filtro de nylon de 45 µm.

#### **3.3.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos**

La concentración de compuestos fenólicos fue determinada según el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. 1 mL de extracto o de solución estándar de ácido gálico (0-250 mg/L) se añadió a un matraz aforado de 10 mL y se mezcló con 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 5 min, se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 7,5% y se enrasó a 10 mL con agua destilada. Después de 60 min de incubación a temperatura ambiente y oscuridad, se determinó la absorbancia a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (UNICAM, modelo UV500). El contenido en fenoles totales se expresó como mg de ácido gálico por 100 g de peso fresco, por considerarse el fenol principal de la mayoría de las frutas.

#### **3.3.1.3. Cuantificación de flavonoides**

El contenido en flavonoides se determinó sobre el extracto obtenido para la determinación de los fenoles descrito en el apartado 3.1.1.1. Para llevar a cabo la cuantificación a 0,1 mL de NaNO<sub>2</sub> 5% se le añadió 0,5 mL de extracto. Transcurridos 5 min, se añadió 0,1 mL de AlCl<sub>3</sub> al 10% y transcurridos 6 min, se añadió 0,6 mL de NaOH 1M y 1,7 mL de agua destilada (Iacopini et al. 2010). La recta de calibrado se construyó con diferentes concentraciones de catequina (0-100 mg catequina/L).

Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm utilizando para ello un espectrofotómetro (UNICAM, modelo UV500). El contenido en flavonoides se expresó como mg de catequina en 100 g de peso fresco.

#### **3.3.1.4. Identificación de compuestos fenólicos**

La identificación de fenoles se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución con un equipo Agilent Technologies 1200 Series HPLC system equipado con un detector DAD y columna Zorbax SB-C18 (150 mm x 4.6 mm i.d.; tamaño

párticula 3.5  $\mu\text{m}$ ). Como solvente A se utilizó metanol con 5% ácido fórmico y como solvente B agua con 5% de ácido fórmico. El flujo fue de 1 mL/min con el siguiente gradiente: de 0 hasta 5 min, 95% B; de 5 hasta 10 min, 95-88% B; de 10 hasta 35, 88-75% B; de 35 hasta 50, 75-50% B; de 50 hasta 52, 50-20 % B; y de 52 hasta 60 min, 20-0% B. El volumen inyectado fue de 20  $\mu\text{L}$ . El detector se fijó a las longitudes de onda de 280, 340 y 510 nm. Los grupos de compuestos fenólicos analizados fueron ácidos benzoicos (ác. gálico y vainillina), flavonoides (quercetina, catequina y epicatequina) y ácidos cinámicos (ác. ferrúlico, ác. cumárico y ác. clorogénico). Todos los patrones se disolvieron en metanol:agua (80:20; v/v).

### 3.3.2. Métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante

#### 3.3.2.1.DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

El método utilizado se ha basado en el protocolo descrito por Llorach et al. (2008) con alguna modificación. A 1 g de muestra homogénea de fruta se le añadieron 4 mL de solución metanol:agua 50:50 (v:v) que se homogeneizaron con ultraturrax (IKA-WERKE, DI 25 Basic, yellow line). Se incubó en baño termostático durante 30 minutos a 90 °C y posteriormente se enfrió en hielo 5 min. La muestra se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm y 4 °C y se recuperó el sobrenadante. El proceso de extracción se repitió una segunda vez, combinando posteriormente los sobrenadantes llevándose finalmente a un volumen total de 10 mL con metanol:agua 50:50 (v/v).

900  $\mu\text{L}$  del extracto o de sus diluciones se mezclaron con 900  $\mu\text{L}$  de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 133  $\mu\text{M}$  en metanol) y la actividad antioxidante se evaluó midiendo la variación de la absorbancia a 515 nm después de 2 h 30 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad. La recta patrón (figura 15) se realizó con Trolox (0-60  $\mu\text{M}$ ) y los resultados se expresaron como mmol de Trolox en 100 g.



**Figura 15.** Soluciones estándar utilizadas para la recta patrón de Trolox (0-60  $\mu\text{M}$ ) en la determinación de la actividad antioxidante.

Con este método se determinó además el porcentaje de reducción del radical libre DPPH que nos indica la inhibición de la actividad de los radicales libres. Se tomaron 50 µL de las muestras anteriormente obtenidas o de metanol:agua 50:50 (v/v) para su utilización como blanco, se añadieron 150 µL metanol:agua 50:50 (v/v) y 3 mL de solución de DPPH (133 µM en metanol). Se incubaron durante 2h y 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro (UNICAM, modelo UV500) a 517 nm. El porcentaje de reducción se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} * 100$$

### 3.3.2.2.FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica)

Este método utilizado está basado en el protocolo descrito por Thaipong et al. (2006). El reactivo FRAP está formado por 25 mL de tampón acetato 300 mM de pH 3,6 por adición de ácido acético glacial, 2,5 mL de solución TPTZ (2,4,6 tripyridil-s-triazine) 10 mM en 40 mM de HCl y una solución 20 mM de FeCl<sub>3</sub> • 6 H<sub>2</sub>O. 150 µL de reactivo FRAP se añadieron a una placa de cultivo de 96 pozos, se mezcló con 20 µL de extracto obtenido según se describe en el apartado 3.1.1.1 y se leyó la absorbancia transcurridos 30 min en un lector multiplaca (Tecan Trading AG, Suiza). La recta patrón se preparó con Trolox con concentraciones comprendidas entre 0 y 1000 µM. Los valores fueron expresados como mmol de Trolox por 100 g de peso fresco.

### 3.3.2.3.ORAC (Capacidad Antioxidante frente al Radical Oxígeno)

Para determinar la capacidad antioxidante mediante este método se adaptó el descrito por Zulueta et al. (2009) y fue llevado a cabo mediante un espectrofluorímetro multiplaca (Tecan Trading AG, Suiza). Todas las soluciones fueron preparadas con tampón fosfato (75 mM, pH = 7.5). Cada pocillo fue llenado con 50 µL de fluoresceína (78 nM) y 50 µL de extracto obtenido según se describe en el apartado 3.1.1.1 o solución estándar de Trolox (0-100 µM). La placa fue incubada a 37 °C durante 15 min. Después, 30 µL de APPH (2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro; 221mM) fue añadido y el descenso en la fluorescencia fue medido cada 150 segundos durante 120 min. La concentración fue medida en µmol Trolox/g aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{ORAC } (\mu\text{mol Trolox/g}) = \frac{C \text{ Trolox} * (\text{AUC muestra} - \text{AUC blanco}) * k}{\text{AUC Trolox} - \text{AUC blanco}}$$

Donde C Trolox es la concentración ( $\mu\text{mol}$ ) de Trolox, k es el factor de dilución, y AUC es el área bajo la curva.

### **3.3.2.4. Poder reductor**

Se utilizó el método descrito por Guo et al. (2011). 1 mL de diferentes concentraciones del extracto obtenido según se describe en el apartado 3.1.1.1, se mezcló con 2,5 mL de tampón fosfato (200 mM, pH 6,6) y 2,5 mL de ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) al 1%. La mezcla se incubó a 50 °C durante 15 min en un baño termostático. A continuación, se añadió 1 mL de ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. 2,5 mL del sobrenadante se mezclaron con 2,5 ml de agua destilada y 0,5 ml de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 0,1% y la absorbancia se midió a 700 nm en un espectrofotómetro (UNICAM, modelo UV500). Como control positivo se utilizó BHT. El valor  $\text{EC}_{50}$  (mg/mL) es la concentración a la cual la absorbancia del poder reductor es 0,5 y se obtiene por interpolación lineal.

### **3.3.2.5. Porcentaje de secuestro del radical superóxido**

El porcentaje de secuestro del radical superóxido se determinó según el método de Royer et al. (2011). 25 mg de fruta fresca se mezclaron con 1 mL de 0,48 mM b-nicotinamida adenina dinucleótida (NADH) y 1 mL de 0,10 mM Nitro blue tetrazolium (NBT) preparado en tampón fosfato (pH 7,4; 0,01 M). Para iniciar la reacción se añadió 100  $\mu\text{L}$  de una solución de 60  $\mu\text{M}$  de metilsulfato de fenazina (PMS) preparado en tampón fosfato (pH 7,4; 0,1 M). La reacción se midió transcurridos 15 min a 30 °C a una absorbancia de 560 nm.

## **3.4. Análisis estadístico**

Todos los datos fueron analizados mediante análisis de varianza ANOVA con el programa SPSS 16.0. Se realizó un test Duncan,  $p = 0,05$ , para estudiar las diferencias significativas entre medias. Para determinar las correlaciones se determinó un test de Pearson ( $p \leq 0,05$ ). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización inicial del desarrollo madurativo del fruto. Estudio de los parámetros postcosecha

Para estudiar las diferencias entre los frutos cosechados tras la fase de aclareo y los recolectados en su grado de madurez comercial, se analizaron diferentes parámetros agronómicos, físico-químicos y fisiológicos relacionados con la calidad postcosecha (tablas 10, 11 y 12).

Como cabía esperar, tras la recolección en su grado de madurez comercial, en las tres frutas se observó un aumento en el peso y del calibre del fruto. Además se produjo un aumento del porcentaje de peso de la pulpa y un descenso en el de la piel, en los frutos recolectados en el grado de madurez con respecto a los recogidos tras el aclareo.

**Tabla 10.** Peso, porcentaje en peso del tipo de tejido y calibre del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial.

Fruto	Momento de recolección	Peso medio fruto (g)	Peso tejido (%)			Calibre (cm)	
			Piel	Pulpa	Semilla	Ecuatorial	Axial
Melocotón	Aclareo	8,5±2,2	18,7±2,5	78,1±2,9	3,2±0,6	22,3±1,8	29,3±3,3
	Comercial	180,0±15,8	6,6±0,3	87,9±0,9	5,4±0,6	70,9±2,2	68,7±3,1
Nectarina	Aclareo	8,5±2,4	19,9±2,3	75,9±1,6	3,5±0,4	23,0±2,3	29,6±2,6
	Comercial	154,9±14,7	10,2±0,3	83,8±0,7	6,0±0,5	63,4±1,8	63,7±4,0
Paraguayo	Aclareo	3,8±0,4	21,5±2,1	73,7±1,8	3,1±0,7	23,5±2,1	13,5±1,0
	Comercial	107,2±9,9	12,9±0,3	82,97±0,6	4,1±0,3	68,0±4,3	35,9±2,5

Se llevo a cabo además la determinación instrumental de las coordenadas de color, observándose un aumento de los valores de las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$ , que indican el cambio de las tonalidades verdes presentes en los frutos del aclareo a las más anaranjadas dominantes en los frutos cosechados con grado de madurez comercial. Como es lógico, se obtuvo un aumento del índice de madurez determinado por la relación °Brix/acidez y el descenso de la firmeza del fruto. Los cambios observados están relacionados con el desarrollo madurativo natural de las frutas.

**Tabla 11.** Color, sólidos solubles, acidez, índice de madurez y textura del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial.

Fruto	Momento de recolección	Color			Sólidos solubles (°Brix)	Acidez (g ác. málico/Kg)	Índice madurez	Textura (Kg/cm <sup>2</sup> )
		L*	a*	b*				
Melocotón	Aclareo	47,0±5,0	-1,8±2,9	19,3±4,0	8,1±0,3	7,8±0,1	1,0±0,3	40,9±2,4
	Comercial	42,5±3,6	30,9±2,1	16,2±3,4	10,7±0,2	3,7±0,4	2,9±0,5	20,4±4,2
Nectarina	Aclareo	30,3±6,2	9,0±6,3	10,6±6,6	7,6±0,1	8,4±0,2	0,9±0,1	34,0±1,4
	Comercial	29,2±6,5	35,1±5,3	26,8±6,2	10,1±0,3	6,2±0,3	1,6±0,3	12,2±4,6
Paraguayo	Aclareo	45,4±4,5	-2,0±2,4	17,5±3,1	7,7±0,2	9,9±0,4	0,8±0,3	32,4±2,0
	Comercial	72,9±6,0	13,5±8,5	35,6±3,8	10,5±0,4	4,4±0,1	2,4±0,2	13,1±3,8

Además de los distintos parámetros físico-químicos analizados, también se evaluó la influencia del desarrollo madurativo de los frutos en su metabolismo respiratorio. Para ello se determinaron parámetros fisiológicos como la actividad respiratoria y la producción de etileno. La tasa respiratoria, tanto expresada como consumo de  $O_2$  como producción de  $CO_2$ , es mayor en los frutos del aclareo que los recolectados en grado de madurez comercial. Por el contrario, los frutos recolectados en pleno desarrollo presentan una elevada producción de etileno. Este comportamiento observado en el metabolismo respiratorio se debe a que estos frutos poseen un patrón de crecimiento del tipo doble sigmoidal. Así, mientras que por un lado tiene lugar un aumento en el tamaño del fruto, por el otro su respiración va descendiendo al completarse el desarrollo (Cantín et al. 2009). Respecto a la producción de etileno, los frutos climatéricos, como es el caso del melocotón, la nectarina y el paraguayo, se caracterizan por presentar un pico producción (Cantín et al. 2009) y que nos permite explicar las diferencias encontradas entre los frutos recogidos en el aclareo y los cosechados en su madurez comercial. En las figuras 16, 17 y 18 se muestran las frutas en el momento de su recolección, tras el aclareo y en su grado de madurez comercial.

**Tabla 12.** Actividad respiratoria y producción de etileno del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial.

Fruto	Época recolección	Actividad respiratoria		Producción etileno ( $\mu L/Kg^*h$ )
		$O_2$ ( $mL/Kg^*h$ )	$CO_2$ ( $mL/Kg^*h$ )	
Melocotón	Aclareo	82,1 $\pm$ 3,4	58,6 $\pm$ 2,7	0,2 $\pm$ 0,1
	Comercial	43,4 $\pm$ 3,9	44,2 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2
Nectarina	Aclareo	63,2 $\pm$ 4,5	49,4 $\pm$ 4,7	0,1 $\pm$ 0,1
	Comercial	27,2 $\pm$ 4,5	25,8 $\pm$ 3,4	1,9 $\pm$ 1,0
Paraguayo	Aclareo	69,4 $\pm$ 6,6	56,9 $\pm$ 6,1	0,2 $\pm$ 0,1
	Comercial	41,7 $\pm$ 4,6	36,1 $\pm$ 3,1	3,5 $\pm$ 0,9



**Figura 16.** Melocotón 'Royal Glory' procedente del aclareo y cosechado en grado de madurez comercial. 26



Figura 17. Nectarina 'Laura' procedente del aclareo y cosechado en grado de madurez comercial.



Figura 18. Paraguayo 'UFO 3' procedente del aclareo y cosechado en grado de madurez comercial.

#### 4.2. Estudio del contenido de compuestos fenólicos en los frutos derivados del aclareo

La concentración de compuestos fenólicos varió según la especie y el tejido estudiado (tabla 13), siendo en general, más elevada en los frutos recogidos tras el aclareo (respecto a los de madurez comercial) y con respecto a los tres tipos de tejido, en la semilla.

En el caso de los frutos del aclareo del melocotón, los valores más altos se presentaron en semilla y pulpa (156,1 y 154,4 mg ác. gálico/100 g, respectivamente) mientras que la piel mostró la menor concentración (65,4 mg ác. gálico/100 g). Esta concentración se redujo en un 93,1% (10,7 mg ác. gálico/100 g) y 30,7% (108,2 mg ác. gálico/100 g), en pulpa y semilla, respectivamente, al madurar el fruto. Sin embargo en la piel (62,1 mg ác. gálico/100 g) no se detectaron diferencias significativas.

En la nectarina, los frutos del aclareo también mostraron las concentraciones más elevadas, tanto en la piel (92,5 mg ác. gálico/100 g) como en la pulpa (119,1 mg ác. gálico/100 g). Sin embargo, la semilla del fruto de madurez comercial presentó una concentración superior (278,2 mg ác. gálico/100 g) siendo además el valor más alto de todas las especies y tipos de tejidos analizados.

El comportamiento observado en la tercera especie estudiada, el paraguayo, fue similar a la nectarina. En el aclareo, la mayor concentración se presentó en la semilla (167,6 mg ác. gálico/100 g), seguida de la piel y la pulpa, que no evidenciaban diferencias significativas entre ellas. En el grado de madurez de comercial de nuevo el mayor contenido se obtuvo en la semilla (175,6 mg ác. gálico/100 g).

**Tabla 13.** Contenido en fenoles del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial.

Fruto	Época recolección	Tejido	Fenoles (mg ác. gálico /100 g) <sup>a</sup>
Melocotón	Aclareo	Piel	65,4±9,2 b
		Pulpa	<b>154,4±7,6 a</b>
		Semilla	<b>156,1±24,7 a</b>
	Comercial	Piel	62,1±20,1 c
		Pulpa	10,7±0,8 b
		Semilla	<b>108,2±18,7 a</b>
Nectarina	Aclareo	Piel	92,5±6,4 c
		Pulpa	119,1±2,4 ab
		Semilla	<b>133,4±12,6 a</b>
	Comercial	Piel	64,2±10,0 b
		Pulpa	9,2±0,4 c
		Semilla	<b>278,2±46,9 a</b>
Paraguayo	Aclareo	Piel	57,3±6,1 b
		Pulpa	51,7±3,2 b
		Semilla	<b>167,6±20,2 a</b>
	Comercial	Piel	93,1±14,8 b
		Pulpa	27,6±2,4 c
		Semilla	<b>175,6±19,2 a</b>

<sup>a</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ( $p<0,05$ ) para cada fruto en cada época de recolección. En negrita los valores más altos de cada época de recolección.

En lo que respecta al contenido en flavonoides (tabla 14), se observó un comportamiento similar a lo obtenido en el análisis de compuestos fenólicos. En todas

las frutas estudiadas, la concentración más elevada se obtuvo en la semilla de los frutos del aclareo.

**Tabla 14.** Contenido en fenoles y flavonoides del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial.

Fruto	Época recolección	Tejido	Flavonoides (mg catequina/100 g) <sup>a</sup>
Melocotón	Aclareo	Piel	27,3±7,2 c
		Pulpa	83,7±0,8 b
		Semilla	<b>99,6±3,6 a</b>
	Comercial	Piel	28,3±7,1 b
		Pulpa	5,2±0,5 c
		Semilla	<b>68,2±14,3 a</b>
Nectarina	Aclareo	Piel	48,1±2,2 b
		Pulpa	<b>67,9±4,8 a</b>
		Semilla	<b>68,5±8,5 a</b>
	Comercial	Piel	24,1±6,4 b
		Pulpa	6,1±0,5 c
		Semilla	<b>177,4±40,5 a</b>
Paraguayo	Aclareo	Piel	24,8±4,1 b
		Pulpa	22,5±1,0 b
		Semilla	<b>93,9±10,7 a</b>
	Comercial	Piel	43,6±6,0 b
		Pulpa	12,9±0,6 c
		Semilla	<b>95,8±1,7 a</b>

<sup>a</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ( $p<0,05$ ) para cada fruto en cada época de recolección. En negrita los valores más altos de cada época de recolección.

Los resultados obtenidos en el análisis de fenoles y flavonoides presentes en frutos inmaduros, como pueden ser los procedentes de la práctica del aclareo, coinciden con lo observado por otros autores. Celli et al. (2011), estudiaron el contenido de fenoles de diferentes variedades de cerezas en distintos grados de madurez. Obtuvieron valores comprendidos entre 414 y 518 mg ác. ferrúlico/100 g para estados precoces de madurez y comprendidos entre 245 y 309 mg ác. ferrúlico/100 g para el grado de madurez comercial. Por su parte, Çelik et al. (2008) en un estudio realizado en arándanos determinaron una reducción de la concentración de los compuestos fenólicos desde 799 hasta 474 mg ác. gálico/100 g de en frutos verdes y maduros, respectivamente. Estos descensos pueden ser atribuidos a una serie de cambios ocurridos durante la maduración y que incluyen la hidrólisis de glucósidos, la oxidación de fenoles por polifenoloxidases y la polimerización de fenoles libres (Remorini et al. 2008). Además, la biodisponibilidad de estos compuestos en función del tejido estudiado también ha sido objeto de diferentes investigaciones. Remorini et al. (2008) obtuvieron mayores concentraciones (entre 2-6 veces) de fenoles totales en la piel de melocotones que en la pulpa. Tomás-Barberán et al. (2001) también encontraron que

la piel de nectarinas, melocotones y ciruelas contenía mayores cantidades de fenoles, antocianinas y flavonoles que la pulpa.

Desde el punto de vista de la utilización de estos subproductos obtenidos de la práctica del aclareo, la forma más fácil y práctica de utilizarlos sería su procesado como fruto entero. Por este motivo se llevó a cabo el análisis tanto de compuestos fenólicos como de flavonoides en el fruto entero, sin diferenciar entre los tres tejidos presentes. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 15.

**Tabla 15.** Contenido en fenoles del fruto entero del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' procedente del aclareo.

Fruto	Fenoles (mg ác. gálico /100 g) <sup>a</sup>	Flavonoides (mg catequina/100 g) <sup>a</sup>
Melocotón	<b>123,9±10,8 a</b>	<b>82,9±7,9 a</b>
Nectarina	105,9±1,2 b	67,5±4,7 b
Paraguayo	59,2±4,6 c	24,5±6,1 c

<sup>a</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ( $p<0,05$ ). En negrita los valores más altos de cada método analizado.

De los tipos de fruto estudiados, el melocotón es el que presenta la mayor concentración de fenoles y flavonoides, mientras que el paraguayo es el que presenta la menor. En este caso, en el que la máxima concentración se da en el semilla se tendría que plantear una etapa previa en el procesado que nos permitiera separar la semilla del resto del fruto. De esta forma la eficacia de la extracción sería mucho mayor.

Por otro lado, resulta interesante comparar los valores de concentración obtenidos (tanto de fenoles como de flavonoides) en el análisis de nuestros frutos del aclareo, con los encontrados en distintos tipos de fruta reconocidos por su alto contenido en compuestos bioactivos, como pueden ser la cereza (105,0 mg ác. gálico/100 g), la ciruela roja (143,5 mg ác. gálico/100 g), la granada (146,9 mg ác. gálico/100 g), el arándano (171,0 mg ác. gálico/100 g), la uva (200,1 mg ác. gálico/100 g) o la mora (417,0 mg ác. gálico/100 g) (Fu et al. 2011).

#### 4.3. Identificación de los compuestos fenólicos de mayor interés

Como hemos dicho, en general a los compuestos fenólicos se les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud. Sin embargo existen un gran número de fenoles y no todos poseen la misma actividad. Por ejemplo, a la querctetina se le atribuyen efectos metabólicos como antioxidante, antimutagénico y además ayuda a disminuir la agregación plaquetaria. Con todo ello previene la carcinogenia, el infarto de miocardio y las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. La catequina

es antimutagénica y disminuye la agregación plaquetaria, previniendo de esta forma la carcinogenia. El ác. gálico es capaz de reducir la peroxidación de lípidos y por ello es capaz de prevenir las enfermedades cardiovasculares. Y el ác. clorogénico previene el cáncer de hígado y colon (Martínez-Navarrete et al. 2008).

En el caso del melocotón (tabla 16) procedente del aclareo los fenoles identificados de mayor concentración fueron el ác. gálico en la piel (31,3 mg/100 g), y el ácido clorogénico en la pulpa (77,1 mg/100 g) y en la semilla (70,6 mg/100 g). En el grado de madurez comercial desaparecieron el ác. cumárico y la epicatequina y disminuyeron el ác. gálico, el ác. clorogénico y la quercetina.

En los frutos de aclareo de nectarina, el fenol con mayor presencia fue el ác. clorogénico en los tres tejidos estudiados (59,4, 22,9 y 43,9 mg/100 g para piel, pulpa y semilla, respectivamente) mientras que en los frutos de madurez comercial fue el ác. clorogénico en la piel (16,6 mg/100 g) y la semilla (35,7 mg/100 g) y la quercetina en la pulpa (5,5 mg/100 g). En este caso destaca la aparición de ácido ferrúlico, quercetina y catequina al ir desarrollándose el fruto (tabla 16).

En el caso del paraguayo (tabla 16), se observa como en el momento del aclareo, el fenol más abundante es, al igual que en la nectarina, el ácido clorogénico, con concentraciones de 19,0, 4,5 y 72,8 mg/100 g en piel, pulpa y semilla, respectivamente. Al madurar se comprueba como en el fruto se mantiene como fenol principal el ác. clorogénico en la piel y la pulpa (34,6 y 8,0 mg/100 g, respectivamente), mientras que en el hueso es la catequina (12,6 mg/100 g) junto con el propio ác. clorogénico (12,3 mg/100 g).

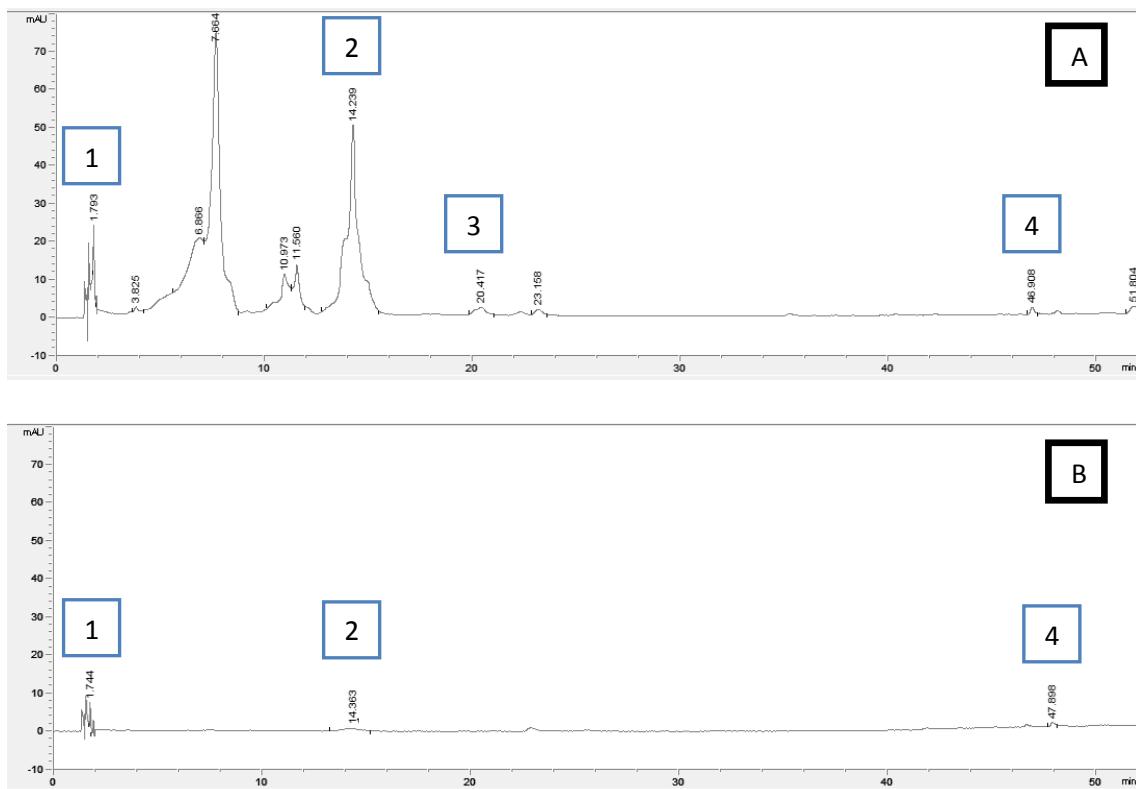
En la figura 19 se presenta, a modo de ejemplo, el cromatograma obtenido para la identificación de los distintos compuestos fenólicos en la pulpa del melocotón derivada de frutos del aclareo o cosechados en grado de madurez comercial. Se puede comprobar claramente la influencia del momento del desarrollo madurativo en el perfil fenólico del fruto y como al ir avanzando en dicho desarrollo la presencia de los compuestos fenólicos se va modificando. La degradación y síntesis de nuevos compuestos es continua durante todo el desarrollo madurativo, comenzando en los estados más precoces hasta llegar al grado de madurez organoléptico.

En la nectarina y el paraguayo se observó un comportamiento similar (figuras 20 y 21).

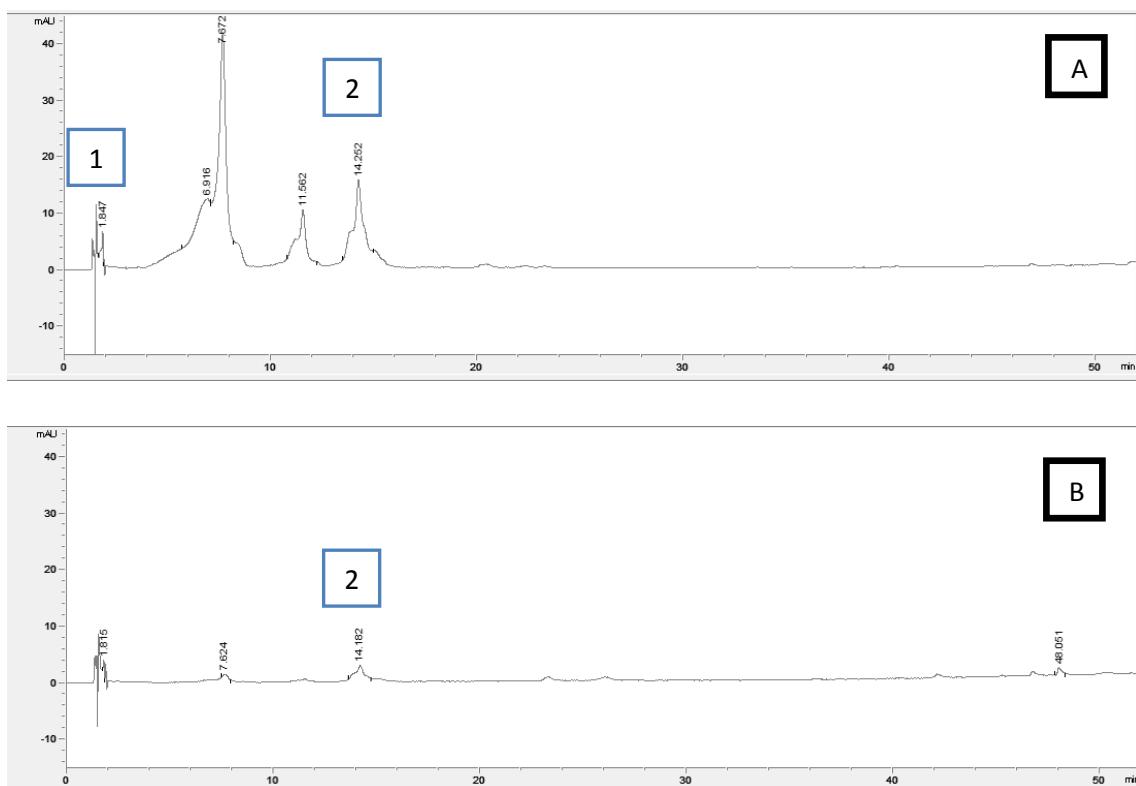
**Tabla 16.** Concentración (mg/100 g) de los fenoles identificados del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial.

Fruto	Época recolección	Tejido	Fenoles (mg/100 g) <sup>a</sup>							
			Ác. gálico	Ác. clorogénico	Epicatequina	Vainillina	Ac. cumárico	Ác. ferrúlico	Quercetina	Catequina
Melocotón	Aclareo	Piel	<b>31,3±7,2 a</b>	10,4±0,2 b	5,5±0,1 c	-	2,9±0,2 d	-	12,1± 0,3 b	-
		Pulpa	9,9±0,3 b	<b>77,1±4,4 a</b>	-	-	2,9±0,3 c	-	5,6±0,1 b	-
		Semilla	10,2±0,8 b	<b>70,6±8,5 a</b>	-	-	3,5±1,4 c	-	-	-
	Comercial	Piel	3,9±0,6 c	<b>7,1±0,5 a</b>	-	-	-	-	6,2±0,2 b	-
		Pulpa	1,2±0,2 b	4,8±1,1 ab	-	-	-	-	<b>5,4±0,1 a</b>	-
		Semilla	4,0±0,1 b	4,9±1,9 ab	-	-	-	<b>5,7±0,7 a</b>	<b>5,5±0,1 a</b>	-
Nectarina	Aclareo	Piel	4,2±0,5 b	<b>59,4±3,3 a</b>	-	-	3,6±0,1 c	-	5,4±0,1 b	-
		Pulpa	3,1±0,3 b	<b>22,9±7,8 a</b>	-	-	-	-	-	-
		Semilla	7,5±0,9 b	<b>43,9±1,5 a</b>	-	-	5,3±0,3 c	-	-	-
	Comercial	Piel	3,2±0,6 c	<b>16,6±0,9 a</b>	-	-	-	1,6±0,4 c	6,3±0,2 b	-
		Pulpa	-	2,6±0,1 b	-	-	-	-	<b>5,5±0,1 a</b>	-
		Semilla	0,1±0,0 d	<b>35,7±1,4 a</b>	-	-	3,5±0,2 c	-	5,8±0,1 b	0,4±0,1 d
Paraguayo	Aclareo	Piel	7,1±0,3 b	<b>19,0±0,6 a</b>	5,4±0,1 c	-	3,2±0,1 d	-	5,5±0,1 c	-
		Pulpa	2,9±0,3 b	<b>4,5±0,1 a</b>	-	-	-	-	-	-
		Semilla	7,0±0,7 b	<b>72,8±2,5 a</b>	-	-	4,8±0,1 c	-	-	-
	Comercial	Piel	0,1±0,1 d	<b>34,6±0,5 a</b>	-	-	2,9±0,1 c	-	5,5±0,1 b	-
		Pulpa	0,1±0,1 b	<b>8,0±1,0 a</b>	-	-	-	-	-	-
		Semilla	0,1±0,1 e	<b>12,3±1,1 a</b>	7,9±0,1 b	0,8±0,3 d	3,2±0,1 c	2,4±0,5 c	-	<b>12,6±0,7 a</b>

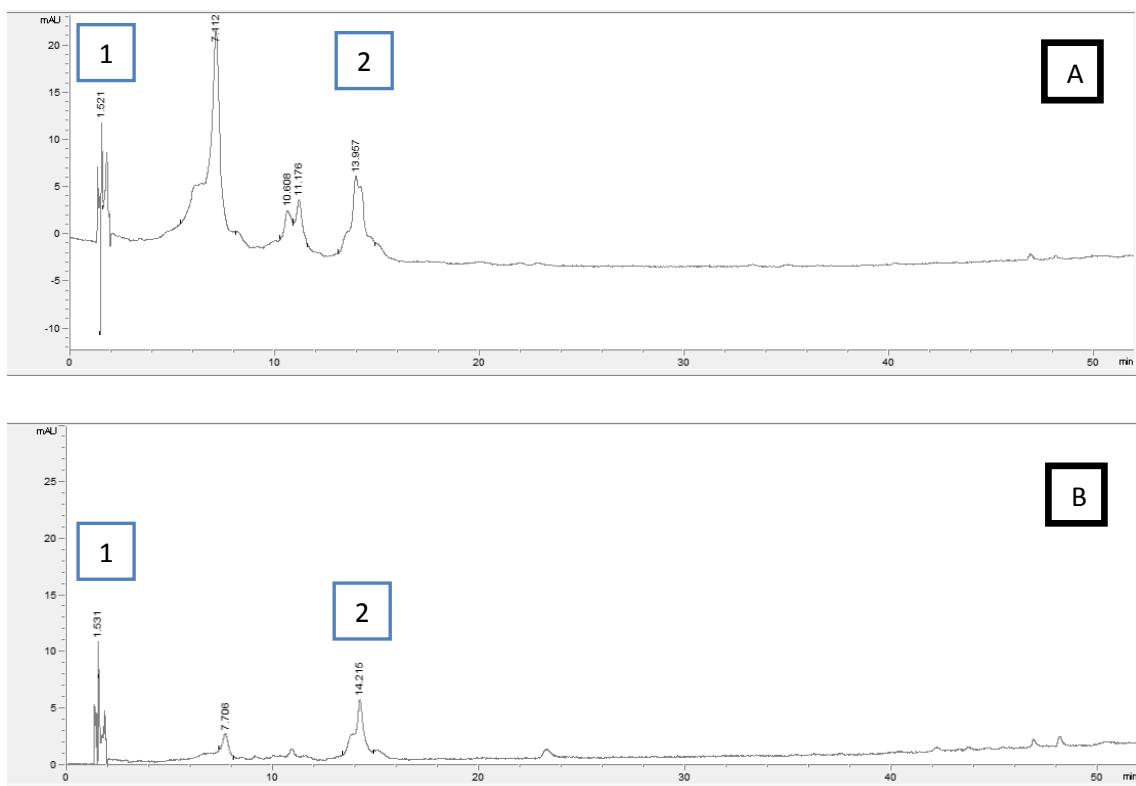
<sup>a</sup>Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre medias ( $p<0,05$ ) en cada tejido. En negrita los valores más altos.



**Figura 19.** Cromatograma de la pulpa del melocotón 'Royal Glory' en el aclareo (A) y en el grado comercial (B) a 280 nm. 1: ác. gálico; 2: ác. clorogénico; 3: ác. cumárico; 4: quer cetina.



**Figura 20.** Cromatograma de la pulpa de la nectarina 'Laura' en el aclareo (A) y en el grado comercial (B) a 280 nm. 1: ác. gálico; 2: ác. clorogénico.



**Figura 21.** Cromatograma de la pulpa del paraguayo 'UFO 3' en el aclareo (A) y en el grado comercial (B) a 280 nm. 1: ác. gálico; 2: ác. clorogénico.

Zheng et al. (2012) también observaron una disminución de la concentración de compuestos fenólicos en manzana 'Fuji' desde el aclareo hasta el momento óptimo de su recolección. En su caso, desciende el contenido de todos los fenoles estudiados: procianidina B1, catequina, ác. clorogénico, ác. cafeico, ác. cumárico, quercetina-3-galactósido y quercetina-3-glucósido.

Tomás-Barberán et al. (2001), evaluaron los cambios producidos en la composición fenólica de piel y pulpa de cultivares de melocotón y nectarina. En general, encontraron un mayor contenido en la piel de ác. clorogénico, ác. neoclorogénico, catequina, epicatequina, procianidina B1, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glucósido y quercetina-3-rutinósido. Como ocurre en nuestro caso, algunos de estos compuestos son detectados en la piel pero no en la pulpa. De este estudio se podría deducir que entre los compuestos que no hemos identificado y que se repiten en melocotón y nectarina se encuentran flavanoles tales como la procianidina B1 o flavanoles como la quercetina-3-glucósido. Orazem et al. (2011) también encontraron el ác. clorogénico como el fenol más abundante en la piel de 11 cultivares de melocotón, mientras que en la pulpa se alternaba entre el ác. clorogénico y el ác. neoclorogénico. En el caso del paraguayo, existen muy pocos trabajos relacionados con su estudio. Únicamente hemos encontrado una publicación (Fu et al. 2011) en la

que al igual que nosotros, también se identificó al ác. clorogénico como el compuesto fenólico más importante de la pulpa.

#### **4.4. Capacidad antioxidante de los frutos derivados del aclareo**

En la bibliografía se pueden encontrar numerosas publicaciones en las que se describe la capacidad antioxidante de diferentes frutas y hortalizas determinada por distintos métodos. Entre estos métodos se encuentre el DPPH, FRAP, ORAC, ABTS (2,2-azinobis (3-etyl-benzotiazolina-6-ácido sulfónico), TEAC (capacidad antioxidante de equivalentes de Trolox), poder reductor, secuestro del radical superóxido, secuestro del radical hidroxilo, reducción del cobre, fotoluminiscencia, etc. Esto conlleva un problema asociado y es que no existe un método estandarizado para la determinación de la capacidad antioxidante total lo que exige una optimización de la metodología para cada tipo de producto (Prior et al. 2005).

Esta diversidad de métodos es debida a que ninguno de ellos es capaz de determinar de forma exacta la capacidad antioxidante total de un producto. Esto puede ser debido a varios factores. Uno es que existen numerosos radicales libres. Además también puede ser debido a que tanto oxidantes como antioxidantes tienen distintas características físicas y químicas. Por último, cada método posee un mecanismo de reacción diferente que puede estar basado principalmente en la transferencia de electrones (TE) o en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH). En el primer grupo encontramos métodos como el FRAP o el DPPH, mientras que en el segundo grupo encontramos el ORAC (Thaipong et al. 2006).

En nuestro estudio, la capacidad antioxidante fue determinada por 5 métodos distintos. En la tabla 17 se indican las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos utilizados.

**Tabla 17.** Ventajas y desventajas de los métodos utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante.

Método	Ventajas	Inconvenientes
DPPH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simple</li> <li>• Rápido</li> <li>• Espectrofotométrico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los carotenoides pueden interferir la medida</li> <li>• Es más accesible para las moléculas pequeñas</li> <li>• Afectado por agentes reductor no antioxidantes</li> </ul>
FRAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simple</li> <li>• Rápido</li> <li>• Robusto</li> <li>• Espectrofotométrico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo reacción variable</li> <li>• No detecta antioxidantes con radical tiol</li> </ul>
ORAC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utiliza una fuente de radicales libres biológica</li> <li>• Método estandarizado que permite una fácil comparación</li> <li>• Automatizado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coste equipo necesario elevado</li> <li>• Sensible a cambios de pH</li> <li>• Elevado tiempo de análisis</li> <li>• Procesado de datos complejo</li> </ul>
P. reductor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápido</li> <li>• Espectrofotométrico</li> <li>• Repetible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiempo reacción variable</li> <li>• Límite de cuantificación alto</li> </ul>
Superóxido	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simple</li> <li>• Rápido</li> <li>• Espectrofotométrico</li> <li>• Precursor de otros oxidantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No es un oxidante</li> <li>• Comparación difícil</li> </ul>

El método del **radical DPPH** mide el cambio de color desde un color violeta a un color amarillo, cuando el radical libre es reducido por un proceso de donación de electrones (Liu et al. 2008).

Utilizando este método se ha comprobado como la mayor capacidad antioxidante se presenta en la semilla, tanto en el aclareo como en la madurez comercial de las tres frutas analizadas (tabla 18).

Wijngaard et al. (2012) obtuvieron concentraciones similares a las nuestras en diferentes frutas y en sus subproductos derivados utilizando el método del DPPH. El residuo procedente de la elaboración de zumo de manzana 'Pink Lady', presentó una concentración 0,16 mmol Trolox/100 g, similar a lo que obtenemos nosotros en el análisis de la capacidad antioxidante del fruto de melocotón, nectarina y paraguayo derivado del aclareo (tabla 19). Buran et al. (2012) obtuvieron resultados de 2,7 y 2,4 mmol Trolox/100 g para las variedades de arándanos Star y Windsor, respectivamente, utilizando el método del DPPH. Celli et al. (2011) concluyeron que las cerezas de variedades moradas y rojas de origen brasileño presentan una concentración de 1,1 y 0,8 mmol Trolox/100 g, respectivamente.

**Tabla 18.** Actividad antioxidante determinada por DPPH, FRAP, ORAC, poder reductor y secuestro del radical superóxido del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos del aclareo y madurez comercial<sup>a</sup>.

Fruto	Momento recolección	Tejido	DPPH		FRAP (mmol Trolox/100g)	ORAC (μmol Trolox/g)	Poder reductor EC <sub>50</sub> (mg/mL)	Radical superóxido <sup>c</sup> (% secuestro)	
			mmol Trolox/100g	% reducción <sup>b</sup>					
Melocotón	Aclareo	Piel	0,09±0,01 c	39,2±5,9 c	1,1±0,6 b	11,1±1,6 b	38,2±2,1 c	33,5±1,4 c	
		Pulpa	0,17±0,02 b	83,2±0,4 b	<b>2,9±0,5 a</b>	12,8±0,8 b	15,0±1,2 b	61,4±1,2 b	
		Semilla	<b>0,57±0,03 a</b>	<b>91,6±0,4 a</b>	<b>2,7±0,4 a</b>	<b>16,6±0,6 a</b>	<b>12,2±0,6 a</b>	<b>65,0±1,2 a</b>	
	Comercial	Piel	0,13±0,01 b	66,1±9,1 b	2,2±0,7 b	15,6±1,0 b	<b>38,5±2,0 a</b>	21,5±0,9 b	
		Pulpa	0,04±0,01 c	8,5±1,0 c	0,2±0,1 c	14,2±0,3 c	250,2±8,9 b	0,3±0,1 c	
		Semilla	<b>0,42±0,5 a</b>	<b>87,8±7,1 a</b>	<b>3,3±0,6 a</b>	<b>17,7±0,6 a</b>	<b>35,3±2,1 a</b>	<b>25,3±1,0 a</b>	
Nectarina	Aclareo	Piel	0,14±0,01 b	87,0±1,1 b	<b>3,0±0,2 a</b>	16,6±04 c	28,3±0,9 b	32,4±1,1 b	
		Pulpa	0,10±0,03 c	42,1±10,0 c	2,3±0,9 b	17,5±0,3 b	35,8±1,7 c	<b>41,1±1,2 a</b>	
		Semilla	<b>0,49±0,04 a</b>	<b>91,9±0,4 a</b>	<b>3,2±0,4 a</b>	<b>18,7±0,5 a</b>	<b>16,2±0,9 a</b>	11,8±1,3 c	
	Comercial	Piel	0,26±0,03 b	83,7±0,4 b	2,6±0,3 b	21,4±2,1 b	23,6±1,5 b	28,5±2,5 b	
		Pulpa	0,05±0,01 c	21,8±3,7 c	0,8±0,1 c	9,9±0,7 c	192,1±6,5 c	1,4±0,2 c	
		Semilla	<b>0,62±0,09 a</b>	<b>91,7±2,5 a</b>	<b>5,8±0,9 a</b>	<b>26,7±0,3 a</b>	<b>5,4±0,3 a</b>	<b>33,1±1,7 a</b>	
Paraguayo	Aclareo	Piel	0,10±0,01 b	41,0±2,9 b	1,2±0,4 b	1,1±0,1 b	51,8±1,2 b	11,6±1,5 c	
		Pulpa	0,12±0,02 b	41,4±12,7 b	1,2±0,3 b	1,9±0,2 b	49,6±3,2 b	21,5±1,5 ab	
		Semilla	<b>0,57±0,03 a</b>	<b>91,8±0,3 a</b>	<b>3,0±1,1 a</b>	<b>13,4±1,1 a</b>	<b>&lt;5,0 a</b>	<b>23,8±1,3 a</b>	
	Comercial	Piel	0,25±0,01 b	83,8±0,5 b	1,6±0,3 b	13,4±0,7 c	16,7±1,8 b	35,9±2,4 b	
		Pulpa	0,09±0,01 c	63,7±3,0 c	0,6±0,1 c	14,8±0,7 b	69,8±4,0 c	0,1±0,1 c	
		Semilla	<b>0,73±0,07 a</b>	<b>92,4±0,3 a</b>	<b>3,4±0,4 a</b>	<b>16,8±0,6 a</b>	<b>&lt;5 a</b>	<b>66,7±3,2 a</b>	
BHT			-	-	-	-	<5	-	
Catequina <sup>b</sup>			-	-	-	-	-	83,9±0,6	

<sup>a</sup>Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ( $p<0,05$ ) de cada fruto para cada época de recolección. En negrita los valores más altos de cada época de recolección.

<sup>b</sup>Concentración de 100 mg/mL.

<sup>c</sup>Concentración de 0,2 mg/mL.

**Tabla 19.** Actividad antioxidante determinada por DPPH, FRAP, ORAC, poder reductor y secuestro del radical superóxido del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos enteros procedentes del aclareo<sup>a</sup>.

Fruto	DPPH		FRAP (mmol Trolox/100g)	ORAC ( $\mu$ mol Trolox/g)	Poder reductor EC <sub>50</sub> (mg/mL)	Radical superóxido <sup>b</sup> (% secuestro)
	mmol Trolox/100g	% reducción <sup>b</sup>				
Melocotón	<b>0,20<math>\pm</math>0,03 a</b>	<b>84,2<math>\pm</math>1,2 a</b>	2,0 $\pm$ 0,3 b	13,1 $\pm$ 0,9 b	21,0 $\pm$ 1,0 c	<b>50,6<math>\pm</math>2,0 a</b>
Nectarina	<b>0,22<math>\pm</math>0,01 a</b>	<b>86,4<math>\pm</math>0,9 a</b>	<b>2,4<math>\pm</math>0,1 a</b>	<b>15,8<math>\pm</math>0,3 a</b>	29,6 $\pm$ 1,5 b	38,7 $\pm$ 0,8 b
Paraguayo	<b>0,22<math>\pm</math>0,03 a</b>	<b>85,1<math>\pm</math>1,6 a</b>	1,5 $\pm$ 0,1 c	3,4 $\pm$ 0,5 c	<b>37,7<math>\pm</math>2,2 a</b>	20,1 $\pm$ 1,6 c

<sup>a</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ( $p<0,05$ ). En negrita los valores más altos de cada método analizado.

<sup>b</sup> Concentración de 0,2 mg/mL.

Otra forma de expresar la actividad antioxidante utilizando el método DPPH es determinar el porcentaje de reducción del radical. Este método es más rápido y es muy útil para poder comparar muestras, siempre y cuando las condiciones de extracción y medida sean las mismas. Sin embargo, tiene el inconveniente de que comparar el resultado con otros estudios que no utilicen el mismo método, puede ser no del todo fiable. En nuestro caso, los valores más altos del porcentaje de reducción se presentan de nuevo en la semilla de los tres frutos (91,6, 91,9 y 91,8 % de reducción para melocotón, nectarina y paraguayo, respectivamente).

El ensayo del **FRAP** está basado en la capacidad de la formación del complejo  $\text{Fe}^{+2}$ –TPTZ a partir de  $\text{Fe}^{+3}$ , y la medida del color azul generado en la muestra debida esa unión (Vijaya Kumar Reddy et al. 2010). Hemos comprobado como utilizando el método FRAP, obtenemos valores de capacidad antioxidante más elevados. Esto puede ser debido, como hemos dicho antes, a la existencia de numerosos radicales, las distintas características físicas y químicas de los oxidantes y al diferente mecanismo de reacción.

Aunque los valores de capacidad antioxidante son más elevados que los obtenidos mediante el primer método, la tendencia observada es la misma. En la mayoría de los casos la actividad antioxidante encontrada en la semilla es significadamente superior a la mostrada por el fruto entero (tabla 19), lo que nos lleva a plantearnos de nuevo la necesidad de incluir una etapa previa a la extracción de compuestos de interés en la que se separe la semilla del resto del fruto. En función de los casos (del tipo de fruto y tipo de procesado industrial) la necesidad de incluir esta etapa previa dependerá de si las diferencias encontradas en la concentración de los compuestos de interés son mas elevadas o menos (tabla 20).

**Tabla 20.** Actividad antioxidante determinada por DPPH, FRAP, ORAC, poder reductor y secuestro del radical superóxido del melocotón 'Royal Glory', nectarina 'Laura' y paraguayo 'UFO3' de los frutos enteros y la semilla procedentes del aclareo<sup>a</sup>.

Fruto	Tejido	DPPH (mmol Trolox/100g)	FRAP (mmol Trolox/100 g)	ORAC ( $\mu$ mol Trolox/g)	Poder reductor EC <sub>50</sub> (mg/mL)	Radical superóxido <sup>b</sup> (% secuestro)
Melocotón	Semilla	<b>0,57<math>\pm</math>0,03 a</b>	<b>2,7<math>\pm</math>0,4 a</b>	<b>16,6<math>\pm</math>0,6 a</b>	<b>12,2<math>\pm</math>0,6 a</b>	<b>65,0<math>\pm</math>1,2 a</b>
	Enteró	0,20 $\pm$ 0,03 b	<b>2,0<math>\pm</math>0,3 a</b>	13,1 $\pm$ 0,9 b	21,0 $\pm$ 1,0 b	50,6 $\pm$ 2,0 b
Nectarina	Semilla	<b>0,49<math>\pm</math>0,04 a</b>	<b>3,2<math>\pm</math>0,4 a</b>	<b>18,7<math>\pm</math>0,5 a</b>	16,2 $\pm$ 0,9 b	11,8 $\pm$ 1,3 b
	Enteró	0,22 $\pm$ 0,01 b	2,4 $\pm$ 0,1 b	15,8 $\pm$ 0,3 b	<b>29,6<math>\pm</math>1,5 a</b>	<b>38,7<math>\pm</math>0,8 a</b>
Paraguayo	Semilla	<b>0,57<math>\pm</math>0,03 a</b>	<b>3,0<math>\pm</math>1,1 a</b>	<b>13,4<math>\pm</math>1,1 a</b>	<5,0 a	<b>23,8<math>\pm</math>1,3 a</b>
	Enteró	0,22 $\pm$ 0,03 b	1,5 $\pm$ 0,1 b	3,4 $\pm$ 0,5 b	37,7 $\pm$ 2,2 b	<b>20,1<math>\pm</math>1,6 a</b>

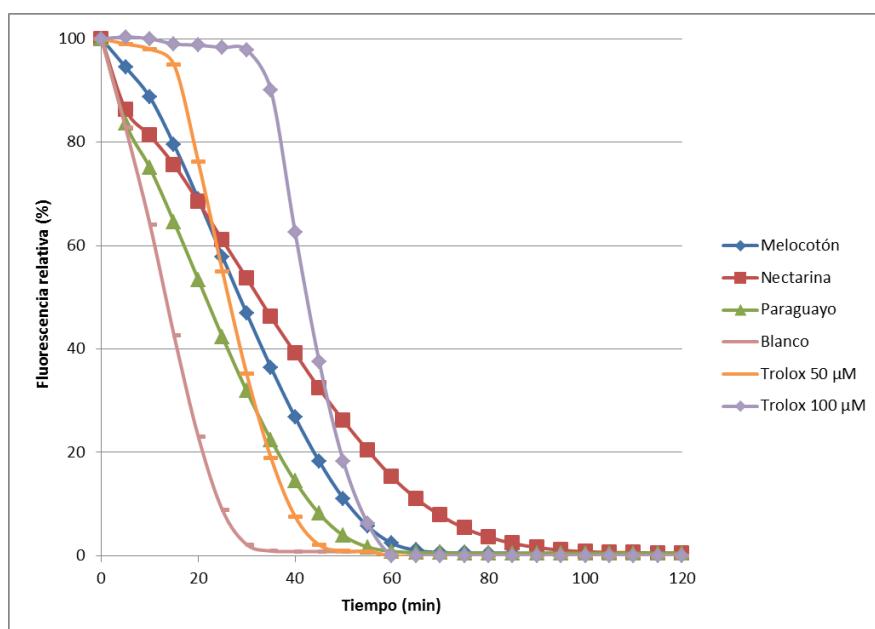
<sup>a</sup> Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias ( $p<0,05$ ) para cada fruto.

<sup>b</sup> Concentración de 0,2 mg/mL.

Šamec et al. (2011) también estudiaron la influencia del desarrollo madurativo en la capacidad antioxidante de diferentes variedades de pepino, utilizando el método FRAP. Observaron un descenso en la concentración de Trolox desde la semana 4 hasta la semana 30 después de la floración. Saura-Calixto y Goñi (2006) determinaron la capacidad antioxidante de diferentes productos consumidos en la dieta mediterránea española utilizando también este método y obtuvieron valores comprendidos entre 0,2 y 4,5 mmol Trolox/100 g. Halvorsen et al. (2006) también analizaron, mediante el método FRAP, diferentes tipos de alimentos consumidos en Estados Unidos. Los valores de los considerados 50 alimentos con mayor capacidad antioxidante estaban comprendidos entre 1.0 y 125.5 mmol/100g. Los frutos procedentes del aclareo evaluados en este estudio presentaron valores comprendidos en este rango y cercanos al perejil, chili o pimiento, por lo que podrían ser considerados una importante fuente de compuestos beneficiosos por su alta capacidad antioxidante. El método FRAP también se ha utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en la piel, pulpa y semilla de multitud de frutas. Guo et al. (2011) encontraron los mayores valores en la piel de frutos como el kiwi o la granada y en la semilla de la uva o el lichi, detectando el menor contenido generalmente en la pulpa, resultados que coinciden con lo observado en nuestro caso.

El tercer método empleado (método ORAC) tiene un fundamento diferente. Consiste en la medida del descenso de la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre un daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO<sup>·</sup>) y actuando los antioxidantes mediante la transferencia de átomos de hidrógeno (Zulueta et al. 2009). Aunque los valores de actividad antioxidante son diferentes, el comportamiento es similar a lo encontrado utilizando los otros dos métodos.

En la figura 22 se muestra la evolución de la fluorescencia relativa en función del tiempo medida por el método ORAC para los frutos enteros procedentes de la práctica del aclareo. La actividad antioxidante se obtiene al medir el área bajo la curva (AUC), siendo la actividad mayor cuanto más alta es el AUC. Se puede observar que la muestra denominada blanco y que no posee antioxidante, presenta un AUC inferior a la muestra con 50  $\mu$ M de Trolox, y ambas muestras inferior a la de 100  $\mu$ M de Trolox. También se observa que la nectarina presenta mayor capacidad antioxidante que el melocotón, siendo el paraguayo el que presenta una menor AUC.



**Figura 22.** Evolución de la fluorescencia relativa (%) en función del tiempo (min) para la determinación de la capacidad antioxidante determinada por el método ORAC en los frutos del aclareo del melocotón, nectarina y paraguayo, con Trolox como estándar.

Wu et al. (2004) analizaron una amplia variedad de frutas y hortalizas usando el método ORAC, y obtuvieron valores comprendidos entre 1,42 (sandía) y 94,6  $\mu$ mol Trolox/g peso fresco (arándanos), con valores de 7,5 y 18,6  $\mu$ mol Trolox/g peso fresco para nectarina y melocotón, respectivamente. Estos valores están en consonancia con los obtenidos en nuestro estudio, con concentraciones más altas en el melocotón que en la nectarina, y con la semilla de la nectarina en el grado de madurez comercial presentando el valor más elevado de todos. En un informe emitido por el United States Department of Agriculture (USDA 2010) donde se analizaron diferentes productos alimentarios consumidos en Estados Unidos, se detallan valores de 9,19  $\mu$ mol Trolox/g para nectarina y 19,2  $\mu$ mol Trolox/g para melocotón, muy similares a los nuestros.

Existen muy pocos estudios que determinen la capacidad antioxidante de frutos procedentes del aclareo, y ninguno en frutos de hueso. Zheng et al. (2012) estudiaron

la evolución de la actividad antioxidante de la manzana 'Fuji' recolectada en diferentes fechas, desde el aclareo hasta el momento óptimo de recolección. Para ello determinaron la capacidad antioxidante utilizando los tres métodos, DPPH, FRAP y ORAC, y observaron un descenso de casi el 98% al ir completando el desarrollo madurativo de los frutos. Este estudio es otro ejemplo del alto potencial que podrían llegar a tener los frutos del aclareo como fuente importante para la valoración de los subproductos.

Además de los tres métodos más ampliamente utilizados para analizar la capacidad antioxidante, se han optimizado otras dos metodologías relacionadas con la capacidad antioxidante, el poder reductor y el método del radical superóxido.

El **poder reductor** evalúa la capacidad de un antioxidante para donar electrones y reducir el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  (Guo et al. 2011), indicando los valores más bajos de  $\text{EC}_{50}$  un mayor poder reductor, que en nuestro caso corresponden, de nuevo, con la semilla de las tres frutas, destacando el poder reductor de la semilla del paraguayo que llega a ser igual que el control empleado como referencia (antioxidante artificial BHT) (tabla 18).

Babbar et al. (2011) determinaron el poder reductor de diferentes residuos tropicales. Establecieron un  $\text{EC}_{50}$  de 10 mg/mL para el BHT, 15 mg/ml para la piel de la mandarina 'kinnow' y de entorno a 20 mg/mL para la semilla y la piel de lichi, valores que en la mayoría de los casos, superan a los obtenidos en nuestros frutos.

Aunque el **radical superóxido** no es por si mismo un gran oxidante, es el precursor de otras especies reactivas, tales como  $\text{HO}^-$ ,  $\text{O}_2^-$  y  $\text{NO}^-$ . En este estudio, los radicales superóxido son generados por el sistema PMS/NADH y actúan como agentes reductores del NBT. Por lo tanto se comprueba la capacidad de nuestros extractos de secuestrar el radical superóxido, disminuyendo así la reducción del NBT (Royer et al. 2011).

El comportamiento observado fue similar al método del ORAC, con los porcentajes superiores de secuestro en el aclareo en cada fruta del 65,0%, en la semilla del melocotón, seguido de un 41,1% en la pulpa de la nectarina y por último un 23,8% la semilla del paraguayo (tabla 18). Son destacables los descensos observados en la actividad de la pulpa durante el desarrollo madurativo del fruto, produciéndose secuestros del radical superóxido de solamente un 0,3, un 1,4 y un 0,1 % en el melocotón, la nectarina y el paraguayo, respectivamente (tabla 18).

Oliveira et al. (2008) obtuvieron reducciones del 20, 25 y 28 % en residuos de acerola, piña y fruta de la pasión, respectivamente, con una concentración de 0,5 mg/ml, por lo que a concentración superior a la utilizada por nosotros, obtienen reducciones menores. Estos autores relacionan esta actividad no solo a los compuestos fenólicos, si no a otros compuestos tales como vitaminas o carotenoides.

#### 4.5. Análisis de las correlaciones entre los diferentes métodos

En la tabla 21 se observan las correlaciones existentes para los distintos métodos investigados en la totalidad de las frutas estudiadas. Se presentan altas correlaciones positivas entre fenoles y flavonoides ( $p: 0,957$ ), y entre FRAP y fenoles ( $p: 0,836$ ) y FRAP y flavonoides ( $p: 0,813$ ). Esto indicaría que los flavonoides son una tipo de compuestos fenólicos y que por tanto están altamente relacionados con la capacidad reductora de los fenoles. Además demostraría que el método FRAP está altamente relacionado con la capacidad antioxidante de los fenoles y los flavonoides. Sin embargo, el resto de parámetros obtiene unas correlaciones muy pequeñas sobre todo en el poder reductor y el radical superóxido. Esto indicaría que para estas tres frutas, sería necesario investigar todos los métodos para determinar la capacidad antioxidante total.

**Tabla 21.** Correlaciones entre los diferentes métodos investigados para todas las frutas analizadas

	Fenoles	Flavonoides	DPPH	FRAP	ORAC	P. reductor	Superóxido
Fenoles		<b>0,957**</b>	0,643**	<b>0,836**</b>	0,553**	-0,232	0,613**
Flavonoides			0,591**	<b>0,813**</b>	0,566**	-0,235	0,595**
DPPH				0,666**	0,427**	-0,299*	0,535**
FRAP					0,661**	-0,197	0,411**
ORAC						0,411*	0,263*
P. reductor							-0,245
Superóxido							

\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$

Estas correlaciones cambian si estudiamos cada fruta por separado. En el melocotón (tabla 22), se presentan altas correlaciones entre fenoles y flavonoides ( $p: 0,967$ ), DPPH ( $p: 0,856$ ), FRAP ( $p: 0,809$ ) y radical superóxido ( $p: 0,905$ ), entre flavonoides y DPPH ( $p: 0,858$ ) y superóxido ( $p: 0,858$ ) y entre DPPH y FRAP ( $p: 0,884$ ) y poder reductor ( $p: -0,850$ ). Esto indicaría que sólo sería necesario realizar dos de estos métodos para conocer la capacidad antioxidante total de esta fruta, y que suele estar relacionado con el contenido en fenoles y flavonoides. También se observa que el método ORAC, al tener correlaciones bajas con fenoles y flavonoides y con el resto de métodos, reacciona con otro tipo de sustancias presentes en los frutos procedentes del aclareo, además de presentar un mecanismo de acción (transferencia de átomos de hidrógeno) diferente al del resto de métodos. Al-Laith (2010) también observó, en

especies de trufas del género *Terfezia*, una alta correlación positiva entre la porcentaje de reducción del DPPH y los flavonoides ( $p: 0.966$ ) y entre el método FRAP y los fenoles ( $p: 0.973$ ).

**Tabla 22.** Correlaciones entre los diferentes métodos investigados para el melocotón 'Royal Glory'

	Fenoles	Flavonoides	DPPH	FRAP	ORAC	P. reductor	Superóxido
Fenoles		<b>0,967**</b>	<b>0,856**</b>	<b>0,809**</b>	0,170	-0,758**	<b>0,905**</b>
Flavonoides			<b>0,858**</b>	0,785**	0,180	-0,713**	<b>0,858**</b>
DPPH				<b>0,884**</b>	0,358	<b>-0,850**</b>	0,787**
FRAP					0,496*	-0,749**	0,579**
ORAC						-0,041	-0,093
P. reductor							-0,770**
Superóxido							

\*:p≤ 0,05; \*\*: p≤ 0,01

En la tabla 23, para la nectarina se detectan altas correlaciones positivas entre los fenoles y flavonoides ( $p: 0,950$ ), FRAP ( $p: 0,889$ ) y ORAC ( $p: 0,822$ ), entre flavonoides y FRAP ( $p: 0,813$ ) y entre FRAP y ORAC ( $p: 0,865$ ). Sin embargo no se detecta ninguna alta correlación con el poder reductor o el radical superóxido. Para el paraguayo (tabla 24) el número de correlaciones es menor, y sólo se presenta entre fenoles y flavonoides ( $p: 0,981$ ) y entre el FRAP y los fenoles ( $p: 0,813$ ) y los flavonoides ( $p: 0,824$ ).

**Tabla 23.** Correlaciones entre los diferentes métodos investigados para la nectarina 'Laura'

	Fenoles	Flavonoides	DPPH	FRAP	ORAC	P. reductor	Superóxido
Fenoles		<b>0,950**</b>	0,525*	<b>0,889**</b>	<b>0,822**</b>	-0,063	0,415
Flavonoides			0,496*	<b>0,813**</b>	0,730**	-0,142	0,466
DPPH				0,677**	0,656**	0,283	0,370
FRAP					<b>0,865**</b>	0,119	0,391
ORAC						0,460*	0,467*
P. reductor							0,236
Superóxido							

\*:p≤ 0,05; \*\*: p≤ 0,01

**Tabla 24.** Correlaciones entre los diferentes métodos investigados para el paraguayo 'UFO 3'

	Fenoles	Flavonoides	DPPH	FRAP	ORAC	P. reductor	Superóxido
Fenoles		<b>0,981**</b>	0,678**	<b>0,813**</b>	0,566**	0,470*	0,764**
Flavonoides			0,657**	<b>0,824**</b>	0,569*	0,451	0,789**
DPPH				0,594**	0,676**	0,270	0,555**
FRAP					0,485*	0,065	0,577**
ORAC						0,197	0,442
P. reductor							0,607**
Superóxido							

\*:p≤ 0,05; \*\*: p≤ 0,01

Todo esto nos sirve para concluir que cada fruta se comporta de forma diferente, y hay que estudiarla de forma individual, ya que nos es posible extrapolar los diferentes

métodos entre las distintas frutas, si bien es verdad que en todas se produce una alta correlación positiva entre fenoles y flavonoides, debido, posiblemente como hemos dicho, a que son compuestos de la misma índole.

## 5. CONCLUSIONES

- 1.- Todos los frutos estudiados (melocotón, nectarina y paraguayo) presentan una elevada concentración de fenoles totales ( $> 100$  mg ác. gálico/100g) y flavonoides ( $> 80$  mg catequina/100g), en su fase de desarrollo más temprana, cuando son recogidos tras la práctica del aclareo.
- 2.- El fruto entero del melocotón procedente de la etapa de aclareo es el que mayor concentración de fenoles y flavonoides presenta, seguido de la nectarina y por último el paraguayo.
- 3.- Respecto a los distintos tejidos estudiados, el mayor contenido de fenoles totales y flavonoides se encuentra en la semilla, sobre todo en los frutos procedentes del aclareo, por lo que esta parte del fruto podría considerarse como una fuente importante de compuestos bioactivos.
- 4.- Los compuestos fenólicos más abundantes en los frutos del aclareo son el ác. gálico y el ác. clorogénico, especialmente este último, estando presentes en todas las frutas y tejidos analizados.
- 5.- Los frutos enteros procedentes del aclareo presentan una elevada capacidad antioxidante ( $> 2$  mmol/100 g determinado por el método FRAP), similar a la observada en frutas con reconocido potencial antioxidante como cereza, granada, arándano o mora. El tejido que presenta una mayor capacidad antioxidante es la semilla.
- 6.- Las diferencias observadas entre los distintos métodos de análisis de la capacidad antioxidante indican la necesidad de identificar otros compuestos (no analizados en el presente estudio) con poder antioxidante y que también puedan contribuir al potencial reductor del fruto, como pueden ser las vitamina C y E o algunos pigmentos como carotenoides o antocianos.
- 7.- Los frutos derivados de la práctica del aclareo de melocotón, nectarina y paraguayo podrían ser considerados una **nueva fuente de compuestos bioactivos** debido a su elevado contenido en fenoles totales y flavonoides y su alta capacidad antioxidante (principalmente, melocotón y nectarina). De esta forma, el aprovechamiento de este tipo de residuo agrícola permitiría reducir los problemas asociados a su gestión, al permitir su reutilización y disminuir los posibles problemas medioambientales que generan.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aaby K, Mazur S, Nes A, Skrede G (2012) Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chem* 132:86-97
- Al-Laith AAA (2010) Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *Journal of Food Composition and Analysis* 23:15-22
- AOAC (1990) Official Methods of Analysis 22.060
- AOAC (1984) Método nº 8 Fédération International des Producteurs de Jus de Fruits
- Ayala-Zavala JF, Vega-Vega V, Palafox-Carlos H, Villa-Rodriguez JA, Siddiqui MW, Dávila-Aviña JE, González-Aguilar GA (2011) Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Res Int* 44:1866-1874
- Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT (2011) Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Res Int* 44:391-396
- Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 99:191-203
- Buran TJ, Sandhu AK, Azereido AM, Bent AH, Williamson JG, Gu L (2012) Effects of exogenous abscisic acid on fruit quality, antioxidant capacities, and phytochemical contents of southern high bush blueberries. *Food Chem* 132:1375-1381
- Cantín CM, Moreno MÁ, Gogorcena Y (2009) Evaluation of the Antioxidant Capacity, Phenolic Compounds, and Vitamin C Content of Different Peach and Nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] Breeding Progenies. *Journal of Agricultural and Food Chem* 57:4586-4592
- Çelik H, Özgen M, Serçe S, Kaya C (2008) Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae* 117:345-348
- Celli GB, Pereira-Netto AB, Beta T (2011) Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry throughout the fruit developmental stages. *Food Res Int* 44:2442-2451
- DGA (2011) Estadística Agraria. Departamento Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente
- FAOSTAT (2012). In: [www.fao.com](http://www.fao.com)
- Fu L, Xu B, Xu X, Gan R, Zhang Y, Xia E, Li H (2011) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chem* 129:345-350
- Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y (2003) Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr Res* 23:1719-1726

Guo T, Wei L, Sun J, Hou C, Fan L (2011) Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Massee. Food Chem 127:1634-1640

Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR, Blomhoff R (2006) Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. The American Journal of Clinical Nutrition 84:95-135

Iacopini P, Camangi F, Stefani A, Sebastiani L (2010) Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus x domestica* Borkh. in a peroxynitrite-induced oxidative process. Journal of Food Composition and Analysis 23:518-524

Iglesias I (2011) Nuevas variedades de fruta dulce. Innovación, diversificación y calidad, en beneficio de la salud y del disfrute de los consumidores. Guía de las mejores frutas y hortalizas, <http://www.frutashortalizas.com>

Li X, Gao W, Huang L, Zhang J, Guo X (2011) Antioxidant and Antiinflamaation capacities os some pear cultivar. Journal of Food Science 76:985-990

Liu X, Zhao M, Wang J, Yang B, Jiang Y (2008) Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. Journal of Food Composition and Analysis 21:219-228

Llorach R, Martínez-Sánchez A, Tomás-Barberán FA, Gil MI, Ferreres F (2008) Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. Food Chem 108:1028-1038

MAGRAMA (2012) Anuario estadístico. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente

Martín B, Torregrosa A, García Brunton J (2010) Post-bloom thinning of peaches for canning with hand-held mechanical devices. Scientia Horticulturae 125:658-665

Martínez-Navarrete N, del Mar Camacho Vidal M, José Martínez Lahuerta J (2008) Los compuestos bioactivos de las frutas. Actividad Dietética 12:64-68

Martínez-Valverde I, Periago MJ, Ros G (2000) Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 50

Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L, Pereira JA (2008) Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food and Chemical Toxicology 46:2326-2331

Oraczem P, Stampar F, Hudina M (2011) Quality analysis of 'Redhaven' peach fruit grafted on 11 rootstocks of different genetic origin in a replant soil. Food Chem 124:1691-1698

Prior R, Wu X, Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:4290-4302

Ramírez AC (2009) Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales. Tesis

Remorini D, Tavarini S, Degl'Innocenti E, Loreti F, Massai R, Guidi L (2008) Effect of rootstocks and harvesting time on the nutritional quality of peel and flesh of peach fruits. *Food Chem* 110:361-367

Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2:152-159

Royer M, Diouf PN, Stevanovic T (2011) Polyphenol contents and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food and Chemical Toxicology* 49:2180-2188

Šamec D, Piljac-Žegarac J, Bogović M, Habjanič K, Grúz J (2011) Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae* 128:78-83

Sánchez-Moreno C (2002) Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*:29-40

Saura-Calixto F, Goñi I (2006) Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem* 94:442-447

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdc-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:669-675

Tomás-Barberán FA, Gil MI, Cremin P, Waterhouse, A.L, Hess-Pierce B, Kader, A.A. (2001) HPLC-DAD-ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4748-4760

USDA (2010) USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2

Vijaya Kumar Reddy C, Sreeramulu D, Raghunath M (2010) Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Res Int* 43:285-288

Wijngaard H, Hossain MB, Rai DK, Brunton N (2012) Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res Int* 46:505-513

Wu X, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior R (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry* 52:4026-37

Zheng H, Kim Y, Chung S (2012) A profile of physicochemical and antioxidant changes during fruit growth for the utilisation of unripe apples. *Food Chem* 131:106-110

Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem* 114:310-316